

第82卷第1号

平成17年

3月

慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

綜 説

- 胆嚢癌治療の現況佐久間正祥(1)
- 角膜パーツ移植榛村 重人(9)
- 片頭痛の病態 update—中枢神経疾患としての片頭痛—鈴木 則宏(15)

講 座

- C型ウイルス肝炎における臨床分子生物学熊谷 直樹(21)
- 患者の自己決定権と医療機関の説明義務
—医療行為の選択をめぐる問題を中心として—宗像 雄(29)

学 位 論 文

- 低酸素イメージング薬剤を用いた核医学的手法による放射線治療効果の予測鈴木 天之(T1)
- 1型糖尿病の発症機序の解明に関する研究
—動物モデルを用いた1型糖尿病におけるIL-18の役割—及川 洋一(T11)
- 2型糖尿病の腎症進展・増悪に関する遺伝学的研究
—NADPH オキシダーゼ遺伝子およびRAGE遺伝子多型の関与—入江 聖子(T27)

号 外

- 博士(医学)学位論文—内容および審査要旨— (第175号)(別頁)

降圧する。

守る。

1999 ELITE II
Evaluation of Losartan
in the Elderly Study I

2001 RENAL
Reduction of Endpoints in EODDM with
A-II Antagonist Losartan

2002 LIFE
The Losartan Intervention For Endpoint
Reduction in Hypertension Study

2002 OPTIMAL
Optimal Therapy by Myocardial Infarction
with the Angiotensin II Antagonist Losartan

脳心腎

ニューロタンの実証

【禁忌（次の患者には投与しないこと）】

- (1) 本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者
- (2) 妊婦又は妊娠している可能性のある婦人
- (3) 重篤な肝障害のある患者

【効能・効果】 高血圧症

【用法・用量】 通常、成人にはロサルタンカリウムとして25～50mgを1日1回経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減するが、1日100mgまで増量できる。

【使用上の注意】

1. 慎重投与（次の患者には慎重に投与すること）

- (1) 両側性腎動脈狭窄のある患者又は片腎で腎動脈狭窄のある患者 (2) 高カリウム血症の患者 (3) 重篤な腎機能障害のある患者 (4) 肝機能障害又はその既往のある患者 (5) 脳血管障害のある患者 (6) 体液量が減少している患者 (7) 高齢者

2. 重要な基本的注意

- (1) 両側性腎動脈狭窄のある患者又は片腎で腎動脈狭窄のある患者においては、腎血流量の減少や糸球体ろ過圧の低下により急速に腎機能を悪化させるおそれがあるので、治療上やむを得ないと判断される場合を除き、使用は避けること。
- (2) 高カリウム血症の患者においては、高カリウム血症を増悪させるおそれがあるので、治療上やむを得ないと判断される場合を除き、使用は避けること。また、腎機能障害、コントロール不良の糖尿病等により血清カリウム値が高くなりやすい患者では、高カリウム血症が発現するおそれがあるので、血清カリウム値に注意すること。
- (3) 本剤の投与によって、一過性の血圧低下（ショック症状、意識喪失、呼吸困難等を伴う）を認らすおそれがあるので、そのような場合には投与を中止し適切な処置を行うこと。また、特に次の患者では投与は少量より開始し、増量する場合は患者の状態を十分に観察しながら徐々に行うこと。
- (4) 利尿剤併用投与中の患者 イ、厳重な減塩療法中の患者 ウ、血液透析中の患者 降圧作用が強くなり、ふらつきがあらわれることがあるので、高所作業、自動車の運転等危険を伴う機械を操作する際には注意させること。
- (5) 手術前24時間は投与しないことが望ましい。
- (6) 本剤を含むアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬投与中にまれに肝炎等の重篤な肝障害があらわれたとの報告がある。肝機能検査を実施するなど、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止するなど適切な処置を行うこと。

3. 相互作用

（併用注意）（併用に注意すること）

カリウム保持性利尿剤：スピロノラクトン、トリアムテレン等
カリウム補給剤：塩化カリウム

4. 副作用

臨床試験（治験）

国内で実施された臨床試験で副作用が報告されたのは709例中71例(10.0%)であり、主な副作用は頭痛13件(1.8%)、めまい9件(1.3%)、嘔吐・嘔気6件(0.8%)、ほてり5件(0.7%)であった。また、主な臨床検査値異常は、ALT(GPT)上昇19件(2.7%)、AST(GOT)上昇15件(2.1%)、CK(CPK)上昇15件(2.7%)、総コレステロール上昇11件(1.6%)、LDH上昇10件(1.4%)、赤血球減少10件(1.4%)であった。なお、65歳以上の高齢者における副作用発現率は9.6%(156例中15例)で、65歳未満の非高齢者群(553例中56例、10.1%)と同様であり、主な副作用はめまい14件(2.6%)及び頭痛2件(1.3%)であった。

(1) 重大な副作用（すべて頻度不明）

次のような副作用があらわれることがあるので、症状があらわれた場合には、投与を中止し、適切な処置を行うこと。

- 1) アナフィラキシー様症状：不快感、口内異常感、発汗、昏倒、呼吸困難、全身潮紅、浮腫等が症状としてあらわれることがあるので観察を十分に行うこと。
- 2) 血腫浮腫：顔面、口唇、咽頭、舌等の腫脹が症状としてあらわれることがあるので観察を十分に行うこと。
- 3) 急性肝炎または慢性肝炎
- 4) 腎不全
- 5) 失神・意識喪失：血圧低下に伴う一過性のショック症状があらわれることがある。
- 6) 横紋筋融解症：筋肉痛、脱力感、CK(CPK)上昇、血中及び尿中ミオグロビン上昇を特徴とする横紋筋融解症があらわれることがあるので、このような場合には投与を中止し、適切な処置を行うこと。また、横紋筋融解症による急性腎不全の発症に注意すること。
- 7) 高カリウム血症：重篤な高カリウム血症があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、直ちに適切な処置を行うこと。
- 8) 不整脈：心室性期外収縮、心房細動等の不整脈があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、直ちに適切な処置を行うこと。
- 9) 汎血球減少、白血球減少、血小板減少：汎血球減少、白血球減少、血小板減少があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、直ちに適切な処置を行うこと。

本剤のご使用にあたり、「使用上の注意」等詳細については、製品添付文書をご参照ください。

AA
NU-LOTAN[®]

A-IIアンタゴニスト

ニューロタン錠50

(ロサルタンカリウム錠)〈薬価基準収載〉

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



製造販売元【資料請求先】

万有製薬株式会社

〒103-8416 東京都中央区日本橋本町2-2-3

ホームページ <http://www.banyu.co.jp/>

©Trademark of Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
2004年7月作成 07-05CZR 04-J 4721J

綜 説

胆嚢癌治療の現況

水戸赤十字病院外科

佐久間 正 祥

Masayoshi Sakuma

Key Words : gallbladder carcinoma, radical surgery, review

はじめに

2001年国民衛生の動向¹⁾によれば、「胆嚢およびその他の胆道」の悪性新生物による死亡数は1999年の男性が6748人で「肺癌」、「胃癌」、「肝癌」、「結腸癌」、「膀胱癌」、「食道癌」、「直腸癌」、「前立腺癌」について第9位であった。また、女性の胆道癌は8149人で「胃癌」、「肺癌」、「結腸癌」、「肝癌」、「乳癌」、「膀胱癌」に次ぐ第7位と多く、特に胆嚢癌では、女性に多い胆石症と関連している。前立腺、乳癌などの診断、治療が年々進歩しているのに比べ、胆嚢癌は膀胱癌と同様、罹患率と死亡率に差がみられない予後のいまだ悪い癌の一つといわれる²⁾。画像診断の進歩により、以前よりは診断例、切除例が多くなってはきたが、全国集計では治癒切除率37.7%であり非治癒切除で終わる進行癌も多い(第1表a)^{3,4)}。腹部超音波検査、CTなどの画像診断の進歩、ドック健診などにより、早期癌で診断され胆嚢摘出のみで治癒できる症例から、進行癌ではあるが外科手術により治癒が期待できる症例、拡大手術をしないと切除できない例など、胆嚢癌の治療には症例に応じた多様な術式がある。早期症例においては現在普及している腹腔鏡下の胆嚢摘出術の是非について、また、胆嚢の進行度は主として壁深達度によることが多いことから、漿膜下浸潤(ss)に対する手術術式を中心に、se/siなどの予後の悪いといわれる進行例の治療法についても最近の文献から概説してみる。また、肝浸潤(Hinf)、肝十二指腸間膜浸潤(Binf)、血管浸潤(PV, A)から表現される胆嚢周囲進展度(T)、リンパ節転移(n)などからのStage分類による治療成績についても先進的施設からの報告を中心に述べる。胆嚢癌手術症例はいずれの施設でも年間に経験する数が少なく、短期の一定した術式での成績で

はなく、10年、20年にわたる長期間のretrospective studyが多い。

第1表 a 全国集計(1988~1997)による胆嚢癌治療の実態

登録症例	切除症例	治癒切除例	直接死亡例 (術後1カ月以内)
4774	3328 (69.7%)	1800 (37.7%)	41/3328 (1.7%)

b 胆嚢癌 Stage 別 5年生存率

Stage	登録症例数	5年生存率
Stage I	1,122	77%
Stage II	373	53%
Stage III	420	31%
Stage IV	1,204	9%

(永川ら³⁾, 2000年)

c 胆嚢癌リンパ節転移群別5年生存率

	n	5年生存率
全国集計 (1988~1997年)	n ₀ (n = 1405)	65%
	n ₁ (n = 311)	25%
	n ₂ (n = 431)	16%
	n ₃ (n = 208)	7%
	n ₄ (n = 135)	2%

(永川ら⁴⁾, 1999年)

(永川宅和他：胆道癌治療成績からみた胆道癌治療の実態、胆道、14：23-28, 2000, 永川宅和他：胆道癌取扱い規約における胆嚢癌の進展様式の考え方、消化器外科、22：31-38, 1999, 清水宏明他：胆嚢癌の治療に関する最新データ、臨外、57(増)：235-238, 2002の表および論文中的数据を、許可を得て改編、転載。)

第2表 TNM Clinical Classification, Gallbladder

T-Primary Tumour	
TX	Primary tumour cannot be assessed
Tis	Carcinoma in situ
T1	Gallbladder wall
T1a	Lamina propria
T1b	Muscle
T2	Perimuscular connective tissue
T3	Serosa, one organ and/or liver
T4	Portal vein, hepatic artery, or two or more extrabepatic organs
N-Regional Lymph Nodes	
[The regional lymph nodes are the cystic duct node and the pericholedochal, hilar, peripancreatic (head only), periduodenal, periportal, coeliac, and superior mesenteric nodes.]	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Regional lymph node metastasis
M-Distant Metastasis	
MX	Distant metastasis cannot be assessed
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

UICC の胆道癌 TNM 分類
Gallbladder (ICD-OC23) より改編⁹⁾

(TNM Classification of Malignant Tumours. Edited by L.H.Sobin and Ch.Wittekind Sixth Edition 2002 Wiley-Liss, Inc. の表を、許可を得て改編、転載。)

第3表 胆道癌取扱い規約「第5版」による胆嚢癌の組織学的胆嚢周囲進展度

pT ₁ : m, mp	pHinf ₀	pBinf ₀	pPV ₀ /PV ₀	pA ₀ /A ₀
pT ₂ : ss	pHinf ₁	pBinf ₀	pPV ₀ /PV ₀	pA ₀ /A ₀
pT ₃ : se	pHinf _{1b}	pBinf ₁	pPV ₀ /PV ₀	pA ₀ /A ₀
pT ₄ : any	pHinf _{2,3}	pBinf _{2,3}	pPV _{1,2,3} /PV _{1,2,3}	pA _{1,2,3} /A _{1,2,3}

胆嚢癌の総合的進行度 (Final stage, fStage)

	H ₀ P ₀ M (-)				H ₁ , P ₁ 以上または M (+)
	pN ₀	pN ₁	pN ₂	pN ₃	
pT ₁	I	II		IVa	
pT ₂	II		III		
pT ₃			IVa		IVb
pT ₄		IVa			

胆道癌取扱い規約 [第5版]⁹⁾

(日本胆道外科研究会編：胆道癌取扱い規約、第5版、金原出版、2003の表を、許可を得て改編、転載。)

胆嚢癌の取扱い規約について

本邦での胆嚢癌は胆道外科研究会による「胆道癌取扱い規約」により詳細な分類があり、国内での発表はこの規約に基づき記載されているが、欧米では UICC による TNM 分類であり（第2表）⁹⁾、日本からの発表もこれに沿った形で、両者を比較する煩雑さがある。最近では平成 15 年 9 月に改訂されたため、これまでの文献に発表されている Stage 分類と若干異なることを知っておく必要がある（第3表）⁹⁾。T 分類では TNM で T1 は T1a, T1b とされ、本邦では T1 だけで m, mp に一致している。N については、本邦では 3 群まで分類しているが、TNM 分類では、リンパ節転移の予後に重きがおかれ、第2表のようにリンパ節転移があるか、ないか、すなわち N1 と N0 とされており、本邦での 2 群リンパ節 + No9, No14 までを regional lymph nodes とし、転移があると N1 とされ、それ以遠のものは遠隔転移 M とされている。欧米では、肝内直接浸潤度 (Hinf), 肝十二指腸間膜浸潤度 (Binf), 血管浸潤度 (PV, A) などの分類はされていない。血管浸潤は T4 とされ、Hinf, Binf の状態は T3 に分類される。手術成績から見ると、se/si 癌 (T3/T4) は予後が悪いため、大きな差にはならない。N016 が stage 分類上、TNM 分類で M とされ、M1 で stage IV と分類される。しかし、本邦の規約では N016 は 3 群として pT2 までを stage IVa, pT3, pT4 で stage IVb とし、長期生存に期待を見出そうとしている“違い”がある。

m (粘膜), mp (固有筋層) 胆嚢癌 (pT1)

m については、術前診断される多くはポリープであり、術後に病理組織で胆嚢癌とされたものも多い。胆嚢結石、コレステロールポリープの術前診断で、腹腔鏡下の単純胆嚢摘出後に判明したもの、胆石胆嚢炎で開腹胆嚢摘したものなどが含まれる。胆嚢管断端が組織学的に癌陰性であれば、再手術は必要ないとされる。リンパ管浸潤 ly, 血管浸潤 v, 神経周囲浸潤 pn は見られず、リンパ節転移 n もないとされている。しかし、水本らのアンケート調査では m 癌に 2.7%, mp 癌に 15.7% にリンパ節転移を認めた⁷⁾と報告されたが、病理学的検索が詳細になった最近では m 癌の転移報告はないという⁸⁾。mp 症例では全国集計でもリンパ節転移がありうるので、胆嚢全層切除を伴う胆嚢摘出と D1 リンパ節廓清が望ましいとされるが、再手術をしなくても予後に変わりないとする報告も多い^{9, 10)}。

胆嚢癌に対する腹腔鏡下胆嚢摘出術 (LC) の是非：腹腔鏡下の胆嚢摘出術が普及したことから、術前予測しない胆嚢癌が術後に診断されることが多くなり、port site の再発、腹膜再発など問題が提起されている。術前早期胆嚢癌を疑う例、術後判明した早期癌の再手術（特に mp 癌）をどのように考えるか、controversial である。port site の再発は 10~30%^{11, 12, 13)}といわれており、胆嚢穿孔による胆汁漏出などが原因とされている。術前に癌が疑われるようなポリープ、胆石症には開腹手術が原則という意見が多い^{14, 15)}が、Ouchi ら¹⁶⁾は 498 例の LC で行われた胆嚢癌を集計し、術後判明した治療結果から、追加切除を行えば予後は悪くないという。pT1 (m, mp) では 5 年生存率も m で 99%, mp で 95% と良好であったことから、疑診例に LC を行ってもよいのではないかとしている。しかし、20% の症例に術中胆嚢穿孔を認めたので、LC 施行中は、胆汁の流出に特別の配慮が必要という。術後の組織で pT2 以上の進行癌にたいしては症例に応じた根治術が必要となる。

ss (漿膜下浸潤) 癌 (主として pT2)

胆嚢癌が薄い筋層を破り漿膜下層に浸潤した場合は、腹腔側、肝臓側、占拠部位により術式が複雑となる。mp 癌で n1 も pT2 に分類されるが、極めて稀であり、ss 癌が胆嚢周囲進展度からは、肝臓側は hinf1a で、pT2 になる。漿膜下には血管、リンパ管が豊富で、脈管浸潤、神経周囲浸潤などから容易に肝門部や肝十二指腸間膜内へ進展する。ss 癌の全国集計では 5 年生存率は 48% といわれており¹⁷⁾、施設によっては癌遺残のないリンパ節廓清例で 5 年生存率が 83% という報告もある¹⁰⁾。また、pT2 で、stage II, III の全国集計での 5 年生存率はそれぞれ、53%, 31% であった（第3表、第1表 b）。したがって外科手術により治療成績が発揮できる領域であるので、術前、術中にいかに正確に深達度を判定するかが重要である。しかし、ss 胆嚢癌と術前に診断できた症例はそれほど多くはない。胆嚢癌全体で腹部エコーの正診率は 83% であったが、ss 癌では 67%、EUS (超音波内視鏡) でも 60% といわれる¹⁷⁾。外科的治癒が期待できる進行癌であり、いかにしてこの段階までの症例を発見するかが大切である。ss 癌はその多様な浸潤形式から術式が一樣ではなく、術式の選択が予後に影響する。

肝切除範囲：肝臓側では hinf1a が ss に相当するが、肝切除範囲をどうするか、胆嚢癌の部位、リンパ節の転移

度、肝十二指腸間膜浸潤度なども考慮して決める必要がある。腹腔側ではどうするか、いろいろな意見がある。術中エコーで深達度を正確に判定することは困難といわれる。胆嚢床切除では、胆嚢底部側では2~3 cmのsurgical marginをとれるが頸部から肝門部では約1cmしかとれないといわれる⁹⁾。田代ら¹⁰⁾はss胆嚢癌でhinf 0で胆嚢床切除13例中3例に、hinf1aで胆嚢床切除6例中1例に肝転移再発を認めたという。千々岩ら¹¹⁾はss胆嚢癌の静脈侵襲が60%に陽性であること、選択的胆嚢動脈造影下CTを行い胆嚢静脈経由の肝灌流域を検討したところ、95%以上でS4aとS5に灌流することを報告した。静脈(またはリンパ行性²⁰⁾もある)からの肝転移がこの領域に多いことからS4aとS5の系統的肝切除の妥当性を述べている。内村ら²¹⁾は、stage IIまでの胆嚢癌54例で再発死亡した13例のうち、9例が肝床を中心とした再発であったと報告しており、また、微小肝転移巣の70%がS4aとS5領域であったとの報告もある²²⁾。一方、Tsukadaら¹⁰⁾は、胆嚢床切除で肝転移再発が多いという結果はなく、切離断端付近の再発が多いこともなく、さらに予後の差もないことなどの臨床的検討からS4a、S5切除を広く適応する意義はないと述べている。近藤ら²³⁾も肝進展がないかあっても軽微な例では、腫瘍が腹腔側であれば肝切除を行う必要はないが、肝側にある場合には肝床浸潤型と同様に癌浸潤部より1 cm以上離して肝床部切除を行っており、潜在性の限局性肝転移を切除するための予防的S4a、S5切除の意義は明らかではないとしている。胆嚢摘出術後の場合はss浸潤増殖様式も考慮すると、ssaは胆嚢摘出や肝床部切除術で良好な予後が期待できるが、ssβ、ssγであればS4a、S5切除術が必要という報告もある²⁴⁾。三宅ら⁹⁾は癌占拠部位が腹腔側で、術中エコーでssかmpか判断が困難で、結果的に術後検索でss癌と診断されるような症例でリンパ節転移が陰性の例に対して胆嚢床切除が適応となると述べている。ss胆嚢癌に対しての胆嚢床切除か肝区域切除かは肝切除の技術が進み安全になってきたのであまり差はないという意見もあるが、一般病院の外科医にとっては、系統的S4a、S5区域切除と胆嚢床切除とでは術前準備に多少の違いがあり、リンパ節郭清、胆管切除などよりも拡大手術と考えられる。一方、S4a、S5切除例にも肝転移再発例がみられ、転移が両葉に多発するため、肝切除だけでは対処できないという意見もある²⁵⁾。

胆管切除の意義: 最近、比較的早期の症例、ss胆嚢癌症例などに、肝外胆管を切除することが多い。その期待

される効果として、1) 直接的な効果として、胆嚢管を介した進展または肝十二指腸間膜浸潤による肝外胆管への直接浸潤の除去、2) 潜在的な効果として、肝十二指腸間膜は脈管構造が複雑で十分な郭清ができないので胆管切除をすべきとの意見がある。しかし、小菅ら²⁶⁾は、胆管切除を行ってもstage IからIIIでは生存率に有意差はなく、stage IVにのみ意義があるとしている。Ishizukaら²⁷⁾は、明らかな12b(+)で郭清後胆管虚血による穿孔の危険を指摘し、ss以上でリンパ節転移が強く疑われる場合には肝外胆管を切除すべきという。pT3、pT4などではリンパ節転移、Binfも多く、胆管への癌浸潤例も多くなり、胆管切除は必要である。胆管切除を加えなくてもよいpT2症例もあるが、清水ら²⁸⁾は、組織学的に肝十二指腸間膜浸潤陽性が、18例のpT2症例中2例にみられたとしている。リンパ節12bに転移が術中迅速検査などで陽性の場合には胆管を切除すべきと考える。

リンパ節郭清: リンパ節転移は胆嚢癌の予後不良因子であるとされ、全国集計でもn0で5年生存率が65%であるのに、n1では25%と低下し、n2、n3になるとそれぞれ16%、7%と極めて悪い(第1表c)。胆嚢からのリンパ流^{29、30)}は、主経路である右側系(cholecysto-retropancreatic pathway)は肝十二指腸間膜の右側を胆管に沿って下行し、N012b2、p2、No13aからN016a2、blinterに至る。副経路とされる左側系(cholecysto-celiac pathway)は肝十二指腸間膜の左側を肝動脈に沿って下行し、N08、9を経由してN016a2、b1lateroに至る。北川ら³¹⁾は進行胆嚢癌に対する拡大リンパ節郭清を行い、n1症例はn0症例と同等の予後(それぞれ5年生存率、66%、62%)であり、n2やn3転移例でも少数ながら5年生存例(それぞれ29%、10%)が得られたという。しかし、郭清が過剰であった症例もあり、sentinel node conceptを応用して、N012b、c、N08をkey nodeと位置づけ、N016の左腎静脈周囲大動脈間リンパ節のsamplingなどから郭清範囲を決めている。N013a、N08はN016のkey nodeになりうる。一方、新井田ら³²⁾によるとHPD(hepatopancreatoduodenectomy、肝膵同時切除)を行った進行胆嚢癌では1群リンパ節であるN012c、12bの転移率は75%と高く、sentinel node navigation surgeryの可能性を検索したが、N012c、bをskipする転移が33%に認められた。8a、12p1、p2、13a、14aなどのリンパ節への跳躍転移であったとして、胆嚢癌では乳癌などのように1群リンパ節をsentinel nodeとして扱うことは難しいと報告している。Tsukadaら³³⁾はリ

リンパ節転移陽性の胆嚢癌根治切除後5年生存例を15例、5年生存率31% (N=48)と報告、Chijiwaら³⁴⁾もN1症例で5年生存4例、30%と報告している、このように進行胆嚢癌の予後にリンパ節転移が大きく影響しており、TNM分類の合理性が理解できる。ただ、以上のように系統的リンパ節郭清が有効である症例もあることを示唆してくれる。

se (漿膜浸潤)、si (他臓器浸潤) を伴う 進行胆嚢癌 (pT3, pT4) の治療

これらの進行胆嚢癌では、局所の浸潤傾向がss癌とは様相が一変し、多くは腹膜播種 (P)、肝転移 (H)、肝十二指腸間膜浸潤 (Binf1, 2, 3)、大動脈周囲リンパ節 (N016) 転移 (pN3, TNMではM) などから非手術または姑息手術になることが多く、切除できても治癒切除は少ない。しかし、本邦では局所の多臓器浸潤、Hinf (+)をはじめ、Binf (+), N016 (+), PV/Aなど血管浸潤の症例へも積極的に根治をめざした拡大手術が専門の施設から報告されてきた。

1. 高度進行胆嚢癌の進展様式と術式

高度進行胆嚢癌の進展様式は近藤ら³⁵⁾により、1) 肝床浸潤型、2) 肝門浸潤型、3) 肝床肝門浸潤型、4) 合流部浸潤型、5) リンパ節浸潤型に大別される。肝床浸潤型は胆嚢底部原発で腫瘍は大きく発育し、肝右葉グリソンは温存できるので肝切除範囲はS4a, S5切除、中央2区域切除、拡大右葉切除など肝浸潤の程度に応じて選択することになる。Hinfとsiが高度、binfは軽度である。胆管切除や尾状葉切除、血管合併切除は回避できることが多いが、十二指腸、結腸などの消化管への浸潤を伴うことが多く、合併切除が必要となる。肝門浸潤型はbinf主体の進展形式であり、腫瘍は比較的小さいが浸潤傾向が強く、肝門部に浸潤して閉塞性黄疸をきたす。肝門部胆管癌と誤られやすいが、浸潤傾向ははるかに強い。拡大右葉切除以上の肝切除が必要で、PD (臍頭十二指腸切除) や門脈合併切除もしばしば必要となる。肝床肝門浸潤型は1)と2)の両方の性質を併せもった癌でさらに手術侵襲は大きくなる。合流部浸潤型は、胆嚢管原発で三管合流部へ発育し、閉塞性黄疸をきたす。癌腫は小さくても拡大右葉切除やPD、血管合併切除が必要となる可能性が高い。リンパ節転移型は、原発巣は胆嚢にとどまるが、リンパ節転移が著明で、リンパ節転移の直接浸潤によりPDや門脈合併切除を要することが

ある。杉岡ら³⁶⁾は、胆嚢癌切除115例のうちse, siの高度進行癌62例の術式について報告し、HPD21例、右3区域切除5例、左3区域切除1例、拡大右葉切除8例、中央2区域切除2例、S4a, S5切除9例、肝床切除18例であり、門脈切除7例、肝動脈合併切除を3例に施行した。進行胆嚢癌の根治切除は53例で、5年生存率は29.5%であったが、HPD (21例) では8例 (38%) が手術関連死となったが、1例に5年生存が得られたと報告している。HPDの手術死亡は肝不全が多いことから、術前に門脈塞栓術を行い、最近8年間の症例では死亡はHPD12例中1例 (8.3%) と改善したという。上坂ら³⁷⁾は約22年間に根治切除を行ったt3, t4の進行胆嚢癌93例について検討を加えている。t3例では右葉切除以上の大量肝切除が15例中3例 (20%) に対して、t4例は78例中、大量肝切除は62例 (79%) であった。門脈合併切除は32例、PDは30例、このうち大量肝切除を伴うHPDは19例含まれる。在院死亡16例 (17%)、全例肝大量切除、このうち12例が門脈合併切除例、また5例がPD併施例であった。t3の5年生存率40%、t4は14%であった。在院死亡の主な原因は大量肝切除後の肝不全であり、適切な減黄処置、門脈枝塞栓術などが重要であると述べている。

2. HPDの適応

PDに関しては臍頭部周囲のリンパ節の直接浸潤や胆管切除断端の癌陰性化が計れない場合、あるいは十二指腸への直接浸潤が高度な例に対して行う場合と、吉川ら³⁸⁾のいうように臍頭部周囲のリンパ節の郭清はPDを行わなければ十分ではないという意見がある。肝切除の範囲については上記の報告のように、右葉切除以上の拡大切除は術後の肝不全が多く、在院死につながるため、できるだけS4a, S5切除などを考慮する必要がある。欧米からの報告では拡大手術に悲観的意見が多い^{39, 40)}。嶋田ら²⁵⁾による本邦での拡大手術例は、第4表のように各施設40例以上の報告がある。術後の合併症は35~50%にみられ、死亡率も10~20%と高い。5年生存率は10~20%であり各施設とも数例である。Nakamuraらの治癒切除率84.6%、手術死0%は注目に値するが、Todorokiらの進行胆嚢癌切除93例中、治癒切除率は15.1%であり、多くの施設では50~60%までの治癒切除率である。Binf, リンパ節転移、血管浸潤から多くは非治癒切除となり、合併症も拡大肝右葉切除後の肝不全が多いので症例を慎重に選択する必要がある。広松ら⁴¹⁾は、拡大郭清 (所属リンパ節と大動脈周囲リンパ節郭清)

第4表 Outcome of aggressive surgery for advanced gallbladder cancer (UICC stageIV)

Reference	Year	Subject	No of patients	Curative resection (%)	Morbidity (%)	Mortality (%)	Survival rate (%) 5y
Miyazaki	1996	stage III, IV	44	52.3	45.5	20.5	21
Todoroki	1996	stage IV	93	15.1	17.2	5.4	9.8
Nakamura	1999	Nevin's stage IV	13	84.6	46.2	0	15.4
Muratore	2000	stage IV	9			11.1	0
Kondo	2002	stage IV	59	62	50.8	20.3	17
Shimada	2003	stage IV	40	60	35	10	11.5

[文献25]より, 改編, 引用]

(嶋田 紘:胆嚢(悪性)の治療:第39回日本胆道学会学術集会, 教育セミナー, テキスト, 42-47, 2003の表を, 許可を得て改編, 転載.)

をルーチンに行った進行胆嚢癌症例根治切除90例中64例(71.1%)にリンパ節転移が認められ, 40例(44.4%)で大動脈周囲リンパ節(N016)転移陽性であったという。遠隔転移を伴わないN016陽性症例では, 1年生存率36.4%, 中央値4.5ヶ月で遠隔転移による非根治症例の1年生存率22.2%, 中央値6.3ヶ月と同等であった。しかし, 所属リンパ節(pN1)に限局しN016陰性の症例においては1年生存率66.7%, 3年生存率18.2%, 中央値19.9ヶ月であり, N016陽性に比べ有意に良好であった。この結果からN016陽性例には, 拡大切除(拡大右葉切除, PD, HPDなど)は行わない方針としている。

集学的治療

胆嚢癌は手術による切除が唯一の治療とされてはきたが, 上記のように拡大手術を行っても非治癒切除となることが多いので, Todorokiら⁴²⁾のいうIORT(術中照射)なども延命効果が期待できる。また, 最近では化学療法, 特にgemcitabineの有効性が報告されてきており⁴³⁾, 進行胆嚢癌に対してはこれらの集学的治療の開発, 進歩が期待される。

おわりに

進行癌に対する先進施設の血管合併切除を併施した超拡大手術の努力に敬意を表するものではあるが, 早期の症例に対する確実な手術, 再手術, 特に腹腔鏡下胆嚢摘出術が普及している現在, 術中の胆嚢穿孔に注意を払い, 術中迅速病理検査を適宜行い, 過不足のない治療を遂行

することも大切である。また, 鑑別診断として胆嚢腺筋症, 膵胆管合流異常合併例, 黄色肉芽腫性胆嚢炎などを念頭におき, 術前診断を的確に行うことも重要である。ss胆嚢癌は進行癌ではあるが, 長期生存の期待できるstageであることから, ドック検診などでの腹部超音波検査の重要性を強調したい。胆嚢癌は胃癌, 大腸癌などに比べ専門の施設でも年間に経験する症例が極めて限られ, 多彩なstageで発見されることが多い。一例ずつ治癒切除をめざして症例を集積するとともに, 生物学的悪性度を示す指標の解明が望まれる。現時点での胆嚢癌の標準的治療, EBMに基づいた治療, ガイドラインなどの作成は困難であり, 今後は多施設による共同研究が必要であろうといわれる⁴⁴⁾。

文 献

- 1) 厚生省(編):2001年国民衛生の動向, 厚生指標48n414-417, 2001
- 2) 安部秀樹, 野澤聡志, 長田拓哉, 塚田一博:胆嚢癌の疫学に関する最新のデータ. 臨外57:226-229, 2002
- 3) 永川宅和, 菅原正都:胆道癌治療成績からみた胆道癌治療の実態. 胆道, 14:23-28, 2000
- 4) 永川宅和, 菅原正都, 小西一郎, 太田哲生, 北川裕久:胆道癌取扱い規約における胆嚢癌の進展様式の考え方. 消化器外科, 22:31-38, 1999
- 5) TNM Classification of Malignant Tumours. Edited by L.H.Sobin and Ch.Wittekind Sixth Edition 2002 Wiley-Liss, Inc. より抜粋
- 6) 日本胆道外科研究会編:胆道癌取扱い規約, 第5版, 金原出版, 2003
- 7) 水本龍二:第18回日本胆道外科研究会アンケート調査報告. 1989
- 8) 塚田一博, 阿部秀樹, 横山義信, 坂東 正, 広川慎一郎, 山岸文範:胆嚢癌に対する単純胆嚢摘出術. 胆と膵,

- 25 : 131-134, 2004
- 9) 三宅秀則, 藤井正彦, 佐々木克哉, 鷹村和人, 高木敏秀, 田代征記 : sss 胆嚢癌の治療をどうする - 主として胆嚢床切除の立場から. 臨外, 58 : 169-172, 2003
- 10) Tsukada K, Hatakeyama K, Kurosaki I, Uchida K, Shirai Y, Muto T, Yoshida K : Outcome of radical surgery for carcinoma of the gallbladder according to the TNM stage. *Surgery* 120 : 816-821, 1996
- 11) Suzuki K, Kimura T, Ogawa H : Is laparoscopic cholecystectomy hazardous for gallbladder cancer? *Surgery* 123 : 311-314, 1998
- 12) Z'graggen K, Birrer S, Maurer CA, Wehrli H, Klaiber C, Baer HU : Incidence of port site recurrence after laparoscopic cholecystectomy for preoperatively unsuspected gallbladder carcinoma. *Surgery* 124 : 831-838, 1998
- 13) Paolucci V, Scheff B, Gutt MSC : Tumor seeding following laparoscopy ; International survey : *World J Surg* 23 : 989-997, 1999
- 14) Lundberg O, Kristoffersson A : Open versus laparoscopic cholecystectomy for gallbladder carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 8 : 525-529, 2001
- 15) Sirai Y, Ohtani T, Hatakeyama K, et : Is laparoscopic cholecystectomy indicated for early gallbladder cancer? *Surgery* 122 : 120-121, 1997
- 16) Ouchi K, Mikuni J, Kkugawa Y : Laparoscopic cholecystectomy for gallbladder carcinoma ; results of a Japanese survey of 498 patients. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9 : 256-260, 2002
- 17) 鈴木智博, 堀口裕爾, 今井英夫, 林 隆男 : ss 胆嚢癌の各種画像診断と治療成績. *消化器外科*, 30 : 496-500, 2000
- 18) 田代征記, 宮家秀則 : 胆嚢癌治療の最近の知見. *日本医事新報*, 4038, 1-4, 2001
- 19) 千々岩一男, 大内田次郎, 上田純二, 江藤忠明, 牧野一郎, 甲斐真弘 : 胆嚢癌の Surgical decision making. *外科治療*, 88 : 926-932, 2003
- 20) 持永瑞忠, 田代征記, 石原信彦, 野田健治, 河野通文, 吉田正樹, 坂口 潮, 中川逸男, 横山育三 : 胆嚢癌術後の予後からみた治療法の検討 - 特に組織学的深達度とリンパ流を中心に. *外科*, 37 : 952-958, 1975
- 21) 内村正幸, 臨 慎治, 木田栄郎, 西脇由朗, 太田大作, 北中秀法 : 胆嚢癌に対する肝床合併切除. *手術*, 50 : 1237-1244, 1996
- 22) Ohtsuka M, Miyazaki M, Itoh H, Nakagawa K, Ambiru S, Shimizu H, Nakajima N, Akikusa B, Kondo Y : Route of hepatic metastasis of gallbladder carcinoma. *Am J Clin Pathol* 109 : 62-68, 1998
- 23) 近藤 哲, 二村雄次, 神谷順一, 柳野正人, 金井道夫, 宮地正彦, 早川直和 : 胆嚢癌に対する肝切除. *胆と膵*, 17 : 145-149, 1996
- 24) 木下壽文, 原雅雄, 大堂雅春, 平城 守, 今山裕康, 奥田康司, 青柳成明, 白水和雄 : ss 胆嚢癌の治療をどうする - 主として肝 S4a, S5 切除の立場から. *臨外*, 58 : 175-180, 2003
- 25) 嶋田 紘 : 胆嚢 (悪性) の治療. 第 39 回日本胆道学会学術集会, 教育セミナー, テキスト, 42-47, 2003
- 26) 小菅智男, 島田和明, 佐野 力, 坂本良弘 : 胆嚢切除の根拠 - 臨床成績からみた検討 - . *胆と膵*, 25 : 155-158, 2004
- 27) Ishizuka D, Shirai Y, Hatakeyama K : Ischemic biliary stricture due to lymph node dissection in the hepatoduodenal ligament. *Hepatogastroenterology* 45 : 2048-2050, 1998
- 28) 清水康仁, 大塚将之, 伊藤 博, 木村文夫, 清水宏明, 安森 聡, 外川 明, 吉留博之, 加藤 厚, 宮崎 勝 : 胆嚢切除の根拠 - 病理組織学からみた検討 - . *胆と膵*, 25 : 159-163, 2004
- 29) 佐藤健次, 佐藤達夫 : 胆嚢癌手術に必要な局所解剖 - 特にリンパ管系について. *臨外*, 44 : 1715-1722, 1989
- 30) Ito M, Mishima Y : Lymphatic drainage of the gallbladder. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1 : 302-308, 1994
- 31) 北川裕久, 太田哲生, 菅原正都, 西村元一, 藤村 隆, 清水康一, 三輪晃一 : 進行胆嚢癌に対する拡大リンパ節郭清の適応と意義. *外科*, 65 : 422-428, 2003
- 32) 新井田達雄, 吉川達也, 太田岳洋, 高崎 健 : 胆嚢癌のセンチネルリンパ節に関する研究. *日臨外会誌*, 65 : 1767-1771, 2004
- 33) Tsukada K, Kurosaki I, Uchida K, Shirai Y, Oohashi Y, Yokoyama N, Watanabe H, Hatakeyama K : Lymph node spread from carcinoma of the gallbladder. *Cancer* 80 : 661-667, 1997
- 34) Chijiwa K, Yamaguchi K, Tanaka M : Clinicopathologic differences between long-term and short term postoperative survivors with advanced gallbladder carcinoma. *World J Surg* 21 : 98-102, 1997
- 35) 近藤 哲, 二村雄次, 早川直和, 神谷順一, 柳野正人, 金井道夫, 上坂克彦, 湯浅典博, 佐野 力 : 膵フロンティア (2), 胆嚢癌 - 新取扱い規約, 画像診断, 診断と治療社, 133-138, 1998
- 36) 杉岡 篤, 堀口明彦, 藤田順子, 守瀬善一, 石原 慎, 蓮見昭武, 宮川秀一 : 胆嚢癌の術前進展度診断と術式決定 - 外科の要求. *消化器画像*, 5 : 375-382, 2003
- 37) 上坂克彦, 神谷順一, 柳野正人, 新井利幸, 西尾秀樹, 湯浅典博, 小田高司, 二村雄次 : 高度進行胆嚢癌に対する積極的切除療法の意義 - t 因子に着目して. *外科*, 65 : 441-445, 2003
- 38) 吉川達也, 太田岳洋, 新井田達雄 : 胆嚢癌に対する肝膵同時切除 (HPD) の適応と治療成績. *日外会誌*, 99 : 717-721, 1998
- 39) Muratore A, Polastori R, Capussotti L : Radical surgery for gallbladder cancer ; current options. *Eur J Surg Oncol* 26 : 438-443, 2000
- 40) Donohue HJ : Present status of the diagnosis and treatment of gallbladder carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8 : 530-534, 2001
- 41) 広松 孝, 柳野正人, 近藤 哲, 新井利幸, 江畑智希, 湯浅典博, 小田高司, 二村雄次 : 至適リンパ節郭清の根拠 - 拡大リンパ節郭清 - . *胆と膵*, 25 : 175-178, 2004
- 42) Todoroki T, Kawamoto T, Otsuka M, Koike N, Yoshida S, Takada Y, Adachi S, Kashiwagi H, Fukao

- K, Kiyoshi O : Benefits of combined radiotherapy with aggressive resection for stage IV gallbladder cancer. Hepato-Gastroenterology 46 : 1585-1591, 1999
- 43) Imtiaz A. Malik, Zeba Aziz, S.H.Manzoor Zaidi, Goparan Sethuraman : Gemcitabine and Cisplatin is a highly effective combination chemotherapy in patients with advanced cancer of the gallbladder . Am J Clin Oncol (CCT) 26 : 174-177, 2003
- 44) 嶋田 紘 : 胆嚢癌の治療の現況と展望. 胆道, 18 : 507-512, 2004
-

綜 説

角膜パーツ移植

¹東京歯科大学眼科学教室, ²慶應義塾大学眼科学教室

しん じら しげ と つは た かず お
榛 村 重 人・坪 田 一 男

Shigeto Shimmura and Kazuo Tsubota

Key Words：角膜移植, 角膜上皮, マイクロケラトーム, 粘弾性手術補助剤, アイバンク

角膜は眼表面を構成する無色透明な組織であり, 上皮, 実質と内皮の3層構造を形成している(第1図). 直径は約11ミリで, 厚みは周辺部が約1ミリで中心部では約500 μ mである. 全体の厚みのうち, 実質がほとんどを占めており, 上皮は5～6層に重層化し, 内皮はデスメ膜と呼ばれる基底膜を持つ単細胞層である. 角膜各層は固有の機能を有し, いずれが傷害されても角膜の透明性が損なわれてしまう. 角膜上皮は, 頑強なバリアーを形成しており, その円滑な表面は良好な屈折を得るために必要不可欠である. 実質は均一な厚みと透明性を維持することで, 角膜全体のレンズとしての性質を保っている. 角膜実質細胞の生理的機能にはまだ解明されていない点が多く, 間葉系細胞以外にも抗原提示細胞の存在が示唆されている. 一方で, 角膜内皮はNaKポンプの作用で実質中の水分を前房(眼内)側に排出する重要な機能を担っている. 角膜実質が静水圧によって浮腫が生じると, 全体の透明性が不可逆的に損なわれる水疱性角膜症の状態となる(第2図).

角膜の疾病には様々な病態が存在するが, 感染症と免疫反応が絡む炎症によるものが多い. 抗菌剤, 抗ウィルス剤やステロイド剤の点眼が多く存在し, 高濃度で直接投与できることより, 多くの疾患は保存的に治療することが可能である. しかし, 病態が進行し, 瘢痕形成や角膜内皮障害によって角膜が混濁すると, 視力を回復するには角膜移植が必要となる. 角膜移植の術式としては, 上皮, 実質および内皮の全てを移植する全層角膜移植(penetrating keratoplasty, PKP)が一般的である(第3図). すなわち, ドナー角膜の全層をそのまま移植する方法である. しかし, 角膜の3層全てが傷害される疾患はむしろ少なく, 特定の層に限局されている場合が多い. この際, 健全な組織をも移植することは理論的に

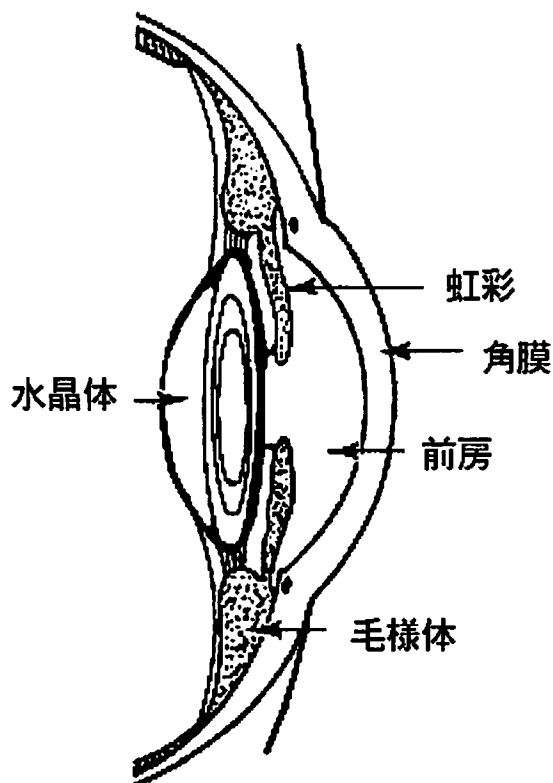
不要であるばかりか, 拒絶反応のリスクを増加させる. とくに角膜内皮細胞は免疫応答の対象となりやすく, ヒト角膜では増殖しないためにドナー角膜不全を来す. 移植されたドナー角膜上皮も, 術后感作の抗原になるとも言われている.

理想的な角膜手術は, 疾病によって傷害された組織のみを移植する方法である. 理論的には, 水疱性角膜症に対しては角膜内皮のみを移植できれば済むことであり, 角膜全層を縫合することに伴う屈折の変化や乱視を防ぐことが可能となる. 実質のみが傷害される円錐角膜や様々な遺伝性の変性症では実質を移植する方法があれば理想である. スティーブンスジョンソン症候群や眼類天疱瘡など, 眼表面の疾患に対してはすでに角膜上皮移植という術式が臨床応用されている^{1,2}.

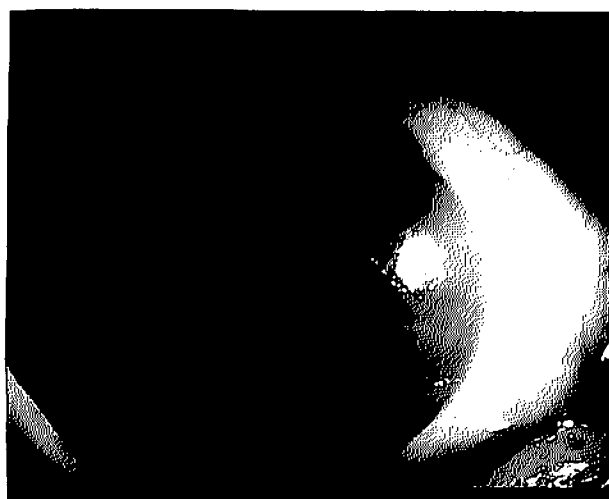
角膜の各層(パーツ)を別々に移植することは, 今までの医療技術では難しかった. 透明性という, 角膜にとっては必要不可欠の状態が手術によって損なわれてまでパーツ移植をする価値がないためである. しかし, 器具の改良や, 術式の工夫によって新しい術式がここ数年の間だけでも飛躍的に増えた. その多くは角膜各層を層間でスムーズに切除する工夫を取り入れている. 本稿では最新の角膜移植で見られるトレンドについて紹介する.

角膜上皮

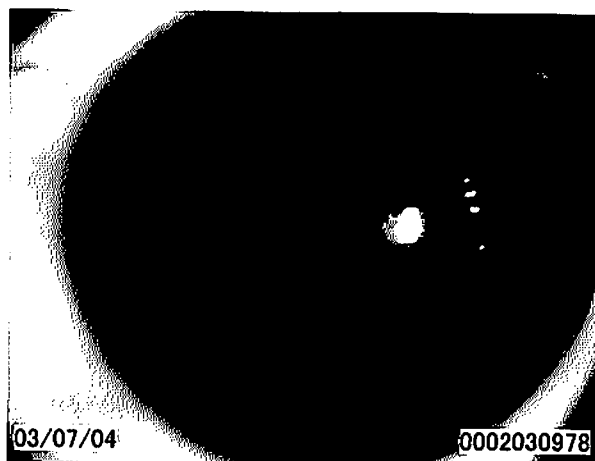
角膜上皮の幹細胞は, 角膜周辺部の輪部に存在する^{3,4}. 角膜中央の上皮が剥離しても, 通常は速やかに周辺より上皮が遊走して欠損部は修復される. しかし, 幹細胞を含む角膜輪部の上皮が角膜全周にわたって傷害されると, 角膜表面は結膜上皮によって被覆される. 結膜上皮は, 角膜上皮と比較してタイトジャンクションの



第1図 前眼部の構造。角膜は中心で約 500 μm で、表層に角膜上皮細胞が5~6層を形成し、眼内は単層の内皮細胞によって構成される。厚み全体の9割以上を実質が占めており、コラーゲン繊維、グリコサミノグリカンと角膜実質細胞が規則正しく配列している。



第2図 水疱性角膜症の症例。ヒトでは増殖しない角膜上皮細胞が傷害され、角膜の透明性が維持できなくなった状態。通常は全層角膜移植が適応となる。



第3図 全層角膜移植術後、混濁した角膜を除去し、上皮、実質および内皮の全層を含むドナー片を移植した。

形成が不十分であり、また血管新生を伴うために透明性も損なわれる。角膜上皮幹細胞の疲弊を来す代表的な病態にスティーブンスジョンソン症候群、眼類天疱瘡と角膜熱傷・化学傷が挙げられる(第4図)。通常のPKPは幹細胞を供給することはできず、これらの疾患では禁忌とされている。幹細胞を移植するには、角膜輪部を移植する必要があり、一定の成績が上げられている。我々も、重症症例を対象に施行したドナー輪部移植の成功率が約50%であることを報告した⁵⁾。

角膜輪部移植の数年後、組織工学技術を応用した培養角膜上皮シートが登場した。本法はまず *in vitro* で重層化した角膜上皮シートを作成するが、キャリアーとしてヒト胎盤由来の羊膜⁶⁾、フィブリン⁷⁾が報告されており、最近ではキャリアーを用いない方法も紹介された⁸⁾。培養上皮シートのメリットとして、数少ない細胞より角膜全体を覆う大きな移植シートが作成できることが挙げられる。健眼の幹細胞を用いる場合や、親族よりの生体移植を行う場合にドナー眼の負担を大幅に軽減することができる。培養方法も様々であるが、移植シート内に上皮細胞の前駆細胞、あるいは幹細胞が含まれているかがポイントとなる。幹細胞の特異的なマーカーがない中、p63発現や分化マーカーの欠如を根拠に上皮シートの品質管理が検討されている。

培養上皮シート移植の長期予後は今後の術後成績によって判明すると思われる。現在までの症例を検討する限り、角膜上皮を再生する手段としては角膜輪部移植と遜色ない。しかし、重症症例では未だ長期予後は不良である傾向が見られ、今後の課題である。培養上皮シートに幹細



第4図 眼類天疱瘡。慢性炎症と癬痕化によって角膜上皮幹細胞が疲弊し、周辺より結膜上皮が角膜上に侵入。通常の角膜移植では幹細胞が移植されず、本症例のような患者では禁忌である。

胞が当初は含まれていても、長期にわたって維持できなければ移植片の寿命は限られてしまう。我々を含め、多くの施設で幹細胞ニッチについて研究を進めており、近い将来には名実共に幹細胞移植が実現する可能性は高い。

角膜実質

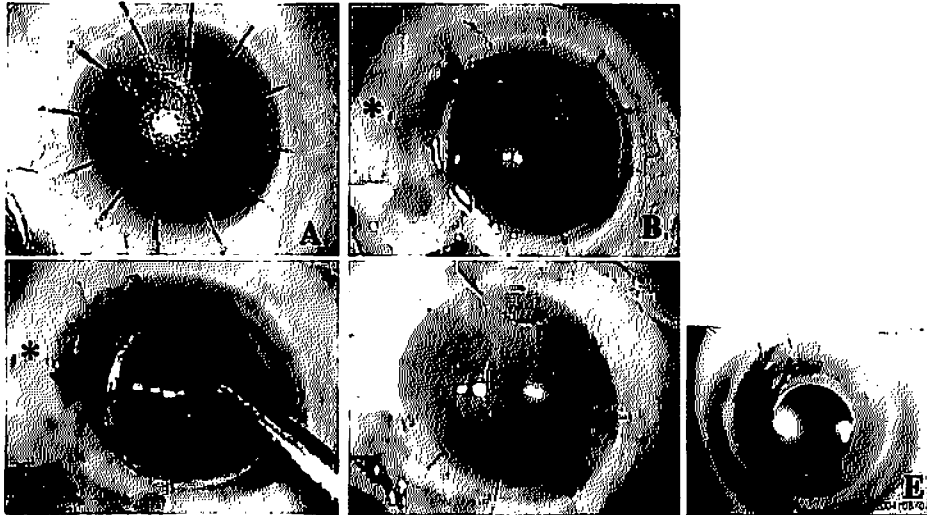
質量では角膜全体の90%以上を占める実質は、I型コラーゲン繊維にケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンを中心とした細胞外基質と神

経堤由来の実質細胞が秩序良く配列している。コラーゲン繊維間の間隙が均一であることが実質を透明にしている最大の要素であり、浮腫や癬痕化によって秩序が乱れることで角膜は混濁する。角膜移植の適応となる疾患はこの実質の混濁が主病因であることが多い。若年者に多い円錐角膜や、感染症、遺伝子変異が代表的であり、今まではPKPによる移植が行われてきた。しかし、理論的には抗原性の高い上皮や、拒絶反応の標的となる内皮まで移植する必要はない。ドナー角膜の上皮は約半年でホスト細胞に入れ替わるためさほど問題にならないが、ドナー角膜の内皮は恒久的に機能しなければならない。そこで開発されたのが、ホスト側の内皮を温存して、ドナーの上皮と実質のみを移植する深層表層角膜移植 Deep lamellar keratoplasty (DLKP) である⁹⁾。

角膜内皮の基底膜であるデスメ膜は非常に脆弱であり、手術中に温存することは難しいとされてきた。従来の方法では、実質の組織を徐々に切除して、最終的にデスメ膜を露出する手順で行われていた。しかし、Mellesらが提唱した革新的な方法では、デスメ膜を純的に剥離して手術時間を大幅に短縮した¹⁰⁾。その後筆者らは、デスメ膜をさらに安全かつ確実に分離する方法へと改良を重ね、現在では熟練した術者でなくても安全に施行できるようになった¹¹⁾。DLKPの術後成績は良好であり、屈折面ではPKPと遜色はない(第5図)。一方で、DLKPを施行した症例では今のところ明らかな拒絶反応は認められず、拒絶反応のハイリスクでもDLKPによる実質移植は可能となる。また、上皮幹細胞移植との同時手術



第5図 深層表層角膜移植術。(A) 前房を空気置換し、鏡面反射を参考にスパーテルを角膜内皮と実質の層間に挿入する。(B) 手術用粘弾性物質を用いて、角膜内皮のみを広範囲に渡って剥離する。上皮と実質はトレパンにて切除して、患者自身の内皮を温存した角膜移植が可能である。(Shimmura S, Shimazaki J, Omoto M, Teruya A, Ishioka M, Tsubota K: Deep lamellar keratoplasty (DLKP) using viscoadaptive viscoelastics in keratoconus patients. *Cornea*, in press を、許可を得て転載。)



第6図 深層角膜内皮移植：(A) 角膜内皮障害による水疱性角膜症。(B) マイクロケラトームにて、表層実質と上皮を約250 μ mの厚みで切除し、一部残った組織を機転としてフラップ上に反転した(*)。(C) レシビエント角膜を直径7.5 mmで切除し、深層組織のみのドナー角膜を固定。(D) 反転したフラップをドナー上に戻して縫合。(E) 術後一ヶ月の所見。ドナーを移植した部分は全体が透明治癒している。本症例は白内障手術を同時に施行したため、眼内レンズが挿入されている。

も可能であり、重症眼表面疾患の治療にとっては大きな武器である。

角膜内皮

角膜内皮が傷害され、角膜全体が浮腫状になる水疱性角膜症は全層角膜移植の代表的な適応例である。内皮を温存するDLKPの適応はなく、今までは内皮を移植する手段としてPKPしなかった。しかし、最近のパーツ移植への傾向をうけて、角膜内皮だけを移植する技術がいくつか報告されている。現在普及しつつある方法は、やはりMellesらが提唱したdeep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK)である¹²⁾。幾度かの改良を重ね、現在では角膜内皮と深層実質の一部をドナー片として移植する方法が定着しつつある。創口が小さく、屈折への影響が小さいのが最大のメリットと言える。一方で、深層実質をサージカル・ナイフでマニュアル切除するため、術者の経験によっては層間に混濁を来す場合がある。一度瘢痕化を起こした実質組織が透明に戻ることはないため、手術中は最新の配慮が必要となる。

角膜内皮を移植する別の術式として、Azarらがマイクロケラトームを使う手技Endothelial lamellar keratoplasty (ELK)を報告した¹³⁾。マイクロケラト-

ムは近視矯正手術のために開発された全自動の表層角膜切除装置であり、鉋(かんな)に似た構造で表層角膜を一定の厚みで切除する。完全に切除せず、一部の組織を蝶番(ちょうつがい)状に残すことで一時的なフラップを作成することが可能である。近視矯正手術ではフラップの下にある実質組織をレーザーで切除するが、ELKではフラップの下で実質と内皮を切除し、ドナー角膜より採取した同様の組織を移植する。本法のメリットは、機械的に表層切除することで非常に円滑な切除面が得られることである。一方で、マイクロケラトーム装置が高価であることが最大のデメリットであり、手術手技も習得するのに時間を要する。我々は現時点でELKを10例ほど経験しているが、術後成績は全層角膜移植と比較して遜色ない(第6図)。一方でPKPの約2割で見られる拒絶反応も、現時点では経験していない。しかし、一部症例で矯正が困難な乱視を呈していることもあり、さらなる詳細な検討が必要である。

角膜再生医療

角膜のパーツ移植技術が最終的に役立つのは、組織工学の成果によって今後開発が予想される様々なバイオ角膜関連の臨床応用であろう。角膜上皮、実質および内皮

の全層を備えた人工角膜を開発するのは困難なことと思われる。それぞれを組み合わせるくらいであれば、胚性幹細胞から眼球そのものを再生した方が早い可能性すらある。しかし、角膜各層を自己細胞や幹細胞バンクからのマテリアルを用いて作成することは近い将来可能になる。個々の症例に対して傷害された組織を評価し、必要最低限の移植をする。テーラーメイド医療が今後の主流になると予想される。すでに羊膜をキャリアーとした培養上皮移植はこの領域の技術と言える。最近では患者本人の口腔粘膜上皮細胞を培養して、眼表面に移植する方法が行われるようになった¹⁴⁾。培養口腔粘膜上皮細胞は *in vitro* で培養することによって、ケラチンの発現や重層化像が角膜上皮に類似した所見を示すようになる。

各種細胞を支持するためのキャリアー、あるいは、scaffold (足場) の開発も進められている¹⁵⁾。角膜実質は巧みな scaffold であり、角膜実質細胞や上皮、内皮をそれぞれ支持しながらも透明であり続ける。角膜実質の代替物質を開発することが一番難しいと考えられており、長期にわたってドナー実質と成り代わるものはなかなか見いだされていない。現在では合成ポリマー、天然ポリマーなどを組み合わせる (hybrid) ことで生体適合性の高い、透明な scaffold が完成することが期待されている。

おわりに

角膜移植は歴史が古いわりに、進歩が長い間見られなかった。ところがここ数年を見るだけで一気に様々な新しい術式が登場し、角膜手術のビッグバンが到来したと言っても過言ではない。多くの技術改良と組織工学の研究成果が発表されていることも、その背景に存在する。もちろん全ては角膜疾患によって失明状態を強いられている患者の社会復帰が目的であり、ドナー不足の現状も、再生医療の発展と新しい角膜移植技術の開発によって打開されようとしている。

文 献

- 1) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. Arch Ophthalmol 119 : 298-300, 2001
- 2) Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Tsubota K : Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders.

- Ophthalmology 109 : 1285-90, 2002
- 3) Cotsarelis G, Cheng S-Z, Dong G, Sun T-T, Lavker R M : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : Implications on epithelial stem cells. Cell 57 : 201-209, 1989
- 4) Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M : Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. J Cell Biol 145 : 769-82, 1999
- 5) Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J : Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. N Engl J Med 340 : 1697-703, 1999
- 6) Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S : Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. Cornea 19 : 65-71 2000
- 7) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet 349 : 990-993, 1997
- 8) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, Yamamoto K, Nagai S, Kikuchi A, Tano Y, Okano T : Functional bio-engineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. Transplantation 77 : 379-85, 2004
- 9) Sugita J, Kondo J : Deep lamellar keratoplasty with complete removal of pathological stroma for vision improvement. Br J Ophthalmol 81 : 184-8, 1997
- 10) Melles GR, Lander F, Rietveld FJ, Remeijer L, Beekhuis WH, Binder PS : A new surgical technique for deep stromal, anterior lamellar keratoplasty. Br J Ophthalmol 83 : 327-33, 1999
- 11) Shimmura S, Shimazaki J, Omoto M, Teruya A, Iishioka M, Tsubota K : Deep lamellar keratoplasty (DLKP) using viscoadaptive viscoelastics in keratoconus patients. Cornea, 2004
- 12) Melles GR, Lander F, van Dooren BT, Pels E, Beekhuis WH : Preliminary clinical results of posterior lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision. Ophthalmology 107 : 1850-6 ; discussion 1857, 2000
- 13) Azar DT, Jain S, Sambursky R : A new surgical technique of microkeratome-assisted deep lamellar keratoplasty with a hinged flap. Arch Ophthalmol 118 : 1112-5, 2000
- 14) Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, Koizumi N, Inatomi T, Sano Y, Kinoshita S : The successful culture and

autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 44 : 106-16, 2003
15) Shimmura S, Doillon CJ, Griffith M, Nakamura M,

Gagnon E, Usui A, Shinozaki N, Tsubota K : Collagen-poly(N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. Cornea 22 : S81-8, 2003

綜 説

片頭痛の病態 update—中枢神経疾患としての片頭痛—

慶應義塾大学医学部内科学教室

すずき のりひろ
鈴木 則 宏

Norihiro Suzuki

Key Words：片頭痛，脳幹，三叉神経，セロトニン，トリプタン

October 3rd and 4th 1832

—I was confined for these two days to my bed by a headache. A good natured old woman, who attended me, wished me to try many odd remedies. A common practice is, to bind an orange-half or a bit of black plaster to each temple : and a still more general plan is, to split a bean into halves, moisten them, and place one on each temple, where they will easily adhere. It is not thought proper, ever to remove the beans or plaster, but to allow them to drop off, and sometimes, if a man, with patches on his head, is asked, what is the matter? he will answer, 'I had a headache the day before yesterday.'

Charles Darwin—The voyage of the Beagle. 1845

1832年10月3-4日 フェノスアイレスからサンタフェへ

頭痛のためにこの2日を臥床して過ごした。世話をしてくれる性のよい老婆が種々の不思議な療法をすすめた。普通に行われる療法はオレンジの葉か黒い膏葉を両方のこめかみに貼るのだが、それよりも流布しているのは豆を二つに割ってしめし、両方のこめかみにつけるものである。これはよく付着する。その豆や膏葉は取り除かず、自然に落ちるまで放置する。したがって、顔に斑点のある人が「どうしたのですか」と尋ねられると、「一昨日から頭が痛かったので」と答えることもある。

チャールズ・ダーウィン著「ビーグル号航海記(1845)」島地威雄訳・岩波文庫1959年

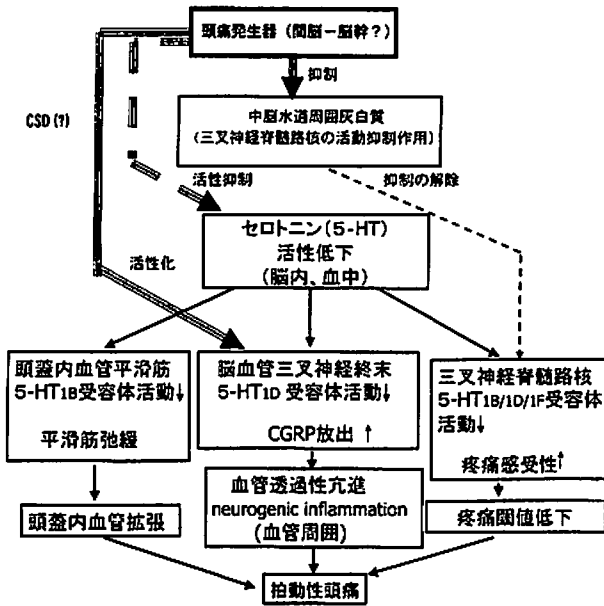
はじめに

頭痛は、経験したことのない人がいないほど一般的な症状である。しかし、片頭痛や群発頭痛などの慢性頭痛は頭痛自体が疾患であり、わが国でもその有病率は40%にのぼるとされている¹⁾。その慢性頭痛の中でも片頭痛は、日常生活に支障をきたすほどの一側頭部の激しい拍動性の痛みを主徴とする疾患で、悪心・嘔吐、光過敏・音過敏などを伴う特異な頭痛である。片頭痛はこれまで長い間、頭蓋内外の血管の primary な疾患、すなわち「血管性頭痛」であると考えられてきた。しかし、片頭痛前兆の研究やトリプタンの薬理作用機序などから、現在では血管疾患ではなく、中枢神経疾患(primary disorder of the brain)としてとらえるべきであるという

概念が有力になってきている。すなわち、片頭痛のメカニズムは中枢神経系において生じた変化が2次的に脳血管に分布する三叉神経線維を活性化させ血管を拡張させ、さらに炎症を起こさせて疼痛を発生させるという「三叉神経血管説」の考え方が主流になっている。近年ではさらにこれを発展させて、片頭痛に対して中枢神経系と三叉神経血管系を結びつけた「神経血管性頭痛」ともいえる概念が提唱されている。ここでは、このような片頭痛のメカニズムについての最近のトピックスを述べる。

片頭痛三叉神経血管説の成り立ち

片頭痛の原因についてはその症状の特異性から次のようないくつかの考案が成り立つ。①片頭痛が頭蓋内の特



第1図 片頭痛の発生メカニズム (仮説). 現時点で、強い光・騒音・強い匂いなどにより活性化される片頭痛発生器はおそらく間脳-脳幹に存在するであろうといわれている。この興奮は①cortical spreading depression (CSD) により脳血管、硬膜血管周囲に分布する三叉神経終末を脱分極し、②三叉神経脊髄路核での痛覚伝達機構へ抑制的作用を有する中脳水道周囲灰白質 (PAG) を抑制することにより、疼痛の中樞への伝達を促進する。また③脳内・血中のセロトニン活性を低下させることにより、a) 血管平滑筋 5-HT_{1B}受容体活動を低下させ、平滑筋が弛緩し、血管拡張が生ずる。また、b) 脳血管三叉神経終末の 5-HT_{1D}受容体活動を低下させ、CGRP の放出が促進され、血管周囲に無菌性炎症が生ずる。c) 三叉神経脊髄路核での 5-HT_{1B/1D/1F}受容体活動を低下させ、疼痛感受性を亢進させる。現時点で、片頭痛発作は以上のようなメカニズムで起こるのであろうと考えられている。

定部位に起因する痛みであると仮定した場合、その拍動性の痛みが三叉神経第1枝分布皮膚領域に感ずる現象を説明するためには、三叉神経が疼痛の伝達と脳血流変化に深く関わっているはずである。②もし片頭痛の原因が、血管や神経以外の循環因子であったとしても、片頭痛の特徴である「片側の頭痛」の発生には分布の特異性から三叉神経が深く関与しているはずである。③前兆期において脳循環代謝が低下している事実があり、その状態に引き続き片頭痛が発症することから、ウィリス動脈輪およびその分枝が疼痛の主たる病巣部位であるはずである。④ウィリス動脈輪の血管周囲からの求心性神経線維については、神経解剖学・神経化学・神経生理学の分野にお

いて一切記載されていないが、この系が存在するはずである。

以上のような基本的な考案から、1979年 Moskowitzらは、この系が片頭痛の病態研究にきわめて重要であることを強調し²⁾、これを「三叉神経血管系 (trigeminovascular system)」と呼び、何らかの刺激が脳硬膜動脈や脳軟膜動脈に分布している三叉神経終末に作用して片頭痛発作が発生するとする仮説「三叉神経血管説 trigeminovascular theory」を発表した³⁾。

すなわち、何らかの「不明の刺激 (unknown trigger)」が発生し、髄膜血管周囲に分布する三叉神経線維を脱分極させることによって CGRP などのニューロトランスマITTERを放出させ頭痛発作を惹起するという仮説を提唱した⁴⁾。

三叉神経血管説における痛みのメカニズムの特徴は、片頭痛の痛みが従来の血管説に基づくような血管拡張によるものではなく、三叉神経求心線維の興奮自体によって惹起されるものであるとしていることであった。そして、片頭痛の諸症状の経時的進展から、発作発症のきっかけは多因子よりなると考えられるが、最終的に片頭痛の痛みは三叉神経系の脱分極に基づくものであろうとした⁵⁾。

片頭痛の痛みのメカニズム

三叉神経血管説にもとづく片頭痛の痛みの発生は、脳血管周囲の三叉神経終末の活性化によって CGRP の放出が促進され血管周囲に神経原性炎症が惹起されることによる⁶⁾。しかし、ヒトにおいては三叉神経の末梢性の刺激によって CGRP が放出されることは、確認されているが、それが神経原性炎症を実際に引き起こしているかどうかはまだ明らかではない。最近では、片頭痛の痛みの機序として、中枢および末梢での感覚神経系で感作 (sensitization) が生ずることにより、通常は痛覚としては認識されない刺激が異常な痛みとして感じるという、いわゆる allodynia の概念を導入する解釈もみられる⁶⁾。また、この概念に前述の PAG の機能障害が関連してくるものと思われる。

三叉神経血管系とセロトニン受容体

5-HT は、片頭痛発作後にその代謝産物の尿中排泄が著増したり⁷⁾、その拮抗薬 methysergide が予防に有効であったり⁸⁾、5-HT 自体が片頭痛発作を抑制する⁹⁾事実から、以前から片頭痛の病態と治療の鍵を握る物質であ

ろうことが推定されていたが、その片頭痛の病態における意義と薬理学的作用点は長い間不明であった。しかし、近年の神経系受容体研究の進歩により 5-HT 受容体亜型が次々と発見同定され¹⁰⁾、5-HT₁ 受容体の亜型である 5-HT_{1B} および 5-HT_{1D} さらに近年、5-HT_{1F} 受容体が片頭痛に深く関与しており、しかもすべて三叉神経血管系に存在分布していることが明らかになった¹¹⁾。

5-HT_{1B} 受容体は脳血管・硬膜血管の中膜平滑筋に分布しその活性化は平滑筋を収縮させる¹²⁾。一方、5-HT_{1D} 受容体は血管周囲に分布する三叉神経終末上に存在し、その活性化は三叉神経終末から CGRP などのニューロトランスミッターの放出を抑制する¹³⁾。さらに 5-HT_{1D} 受容体は 5-HT_{1F} 受容体とともに三叉神経脊髄路核内に存在してその活性化はおそらく核内の興奮性を抑制しているであろうとされている¹⁴⁾。

三叉神経血管系とトリプタン系薬剤

トリプタン系薬剤は、特異的に 5-HT_{1B/1D/1F} 受容体を刺激する。すなわち、上に述べたように 5-HT_{1B} 受容体を介して脳血管・硬膜血管平滑筋を収縮させ、5-HT_{1D} 受容体を介しては血管周囲に分布する三叉神経終末からのニューロトランスミッターの放出を抑制する。さらに、5-HT_{1D/1F} 受容体を介して三叉神経脊髄路核の興奮性を抑制する。以上のような一連の作用により急性期片頭痛発作を頓挫させるとされている¹⁵⁾。

これらの薬理学的特性の中で、片頭痛治療戦略上、現在最も重要視されているものは三叉神経終末に存在する 5-HT_{1B} 受容体である。血管収縮作用が主体である酒石酸エルゴタミンに比べ、トリプタン系薬剤が片頭痛急性期治療に確固たる有効性を示す理由が、5-HT_{1B} 受容体刺激による脳血管周囲の三叉神経終末抑制による神経原性炎症の抑制にあると想定されるからである。

血管収縮作用を有するために、トリプタン系薬剤は心血管系合併症リスクの高い症例には使用することはできない。もし、血管収縮作用をとまわずに神経原性炎症のみを抑制することができれば、心血管系副作用への懸念のない片頭痛治療が確立されることが期待された。このような状況下で、三叉神経血管説および 5-HT 受容体薬理学に基づく片頭痛急性期治療開発の方向性は一時、選択的 5-HT_{1B} 受容体刺激薬へ向かった。しかし、実際に 5-HT_{1B} 受容体選択性の高い CP 122,288 が開発され、片頭痛急性期治療に関する大規模臨床試験が行われたが失望的な結果に終わっている¹⁶⁾。さらに最近では、同様の選択的 5-HT_{1B} 受容体刺激薬である PNU-142633 が開

発され臨床試験が行われたが、これもまた芳しくない結果に終わっている¹⁷⁾。しかも PNU-142633 により心血管の虚血性イベントが合併しており、5-HT_{1B} 受容体の分布とその作用の見直しの必要性が提起される結果となった。

このように現在のところ 5-HT 受容体亜型の分布・薬理学的特異性の知見も流動的であり、片頭痛急性期治療に著効するトリプタン系薬剤の作用点と作用機序もいまだ明らかでないことが浮き彫りにされた。

Cortical spreading depression と片頭痛

片頭痛発作の視覚性前兆は脳血流測定上の変化—乏血 (oligemia) の波状推移の反映であり、これは Leao の動物実験での cortical spreading depression¹⁸⁾ に相当するものであるとする仮説「片頭痛の神経説」が三叉神経血管説と前後して注目されていた。果たして、最近 fMRI を用いた研究により短時間の脳充血がこの乏血に先行して観察され、まさに片頭痛前兆の閃輝に相当するであろうことが示された¹⁹⁾。この乏血は神経機能の抑制状態を示すものであり、片頭痛の頭痛発作はこの乏血の時期にすでに始まっている事実や、さらに脳局所酸素供給は消費を上回っていることから、片頭痛は単に血管だけの異常ではその病態は説明がつかず、中枢神経全体の異常であることが強く示唆されている。近年、この組織障害を伴わない脳血流の減少は酸化蛋白の発現調節作用を有する transcription factor である Nrf2 を帯状回や小脳プルキンエ細胞に特異的に発現させることが報告されている²⁰⁾。

中枢神経疾患としての片頭痛

三叉神経血管説における脳血管三叉神経終末を活性化する「不明の刺激」は現在もおも明らかではない。しかし、近年片頭痛患者の発作期の PET や fMRI を用いた研究により、脳幹の活性化が確認されており、脳幹—間脳の異常が痛覚求心性線維に何らかの影響を及ぼしていることが想定されている^{21, 22)}。

最近高解像度 MR を用いることにより、片頭痛患者の中脳水道周囲灰白質 (PAG) の鉄含有量が増加していることが明らかにされ、PAG の片頭痛発生器としての役割が注目されている²³⁾。すなわち、PAG は前頭葉や視床下部から入力を受け、出力を延髄腹内側経路で、三叉神経脊髄路核や脊髄後角へ投射する抗侵害受容の神経回路を形成しているとされている。すなわち疼痛伝達

のモデレーターとして抑制的に作用しており、この系の障害は疼痛発生を助長する。片頭痛患者でのPAGでの鉄含有量増加の臨床的意義は不明であるが、頭痛発作の発生に何らかの意味をもつ可能性があるといえる。実験的にもPAGの神経細胞の5-HT_{1B/1D}受容体を刺激が侵害受容系を抑制することが示されている²⁴⁾。また、最近、視覚誘発性片頭痛を対象としてblood oxygen level-dependent (BOLD) fMRIを用いた研究で、T^{*}強調MR信号の増強が後頭葉におけるよりも、より早期に赤核および黒質で観察されることが報告されている²⁵⁾。

おわりに

このように三叉神経血管説の提示により、片頭痛の病態解明へ様々な方向からのアプローチがなされるようになった。その結果、片頭痛発作の疼痛発生メカニズムはある程度明らかにされ、急性期疼痛への対応もトリプタンに出現により確立されたといえる。しかし、本説はあくまで急性期片頭痛発作の病態に関する仮説であって片頭痛の病態の全体像を説明するものではない。すなわち片頭痛の病態解明には、発作発生機序と疼痛機序の2つのメカニズムへのアプローチが必要であることが浮き彫りにされた。近年、この流れに沿って、上に述べたように頭痛発生器に関して具体的に議論されるようになってきている。頭痛発生器はどこか、また本体は何か、などを明らかにしてこれを標的とすることが、根本的な片頭痛治療の最終目標になることは言うまでもない。かつて「血管性頭痛」として分類されていた片頭痛は、もはや脳血管あるいは硬膜血管に原因を帰することはできず、視覚前兆の研究から後頭葉が注目され、画像解析の進歩によりさらに視床下部から脳幹に発生器の存在が示唆されるようになってきている。片頭痛を中枢神経疾患としてとらえることにより、その根治治療法開発に向けての研究の活発化が期待される。

文 献

- 1) Sakai F, Igarashi H : Prevalence of migraine in Japan : a nationwide survey. *Cephalalgia* 17 : 15-22, 1997
- 2) Moskowitz MA, Reinhard Jr JF, Romero J, Mellamed E, Pettibone DJ : Neurotransmitters and the fifth cranial nerves : Is there a relation to the headache phase of migraine? *Lancet* 2 : 883-885, 1979
- 3) Moskowitz MA : The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol* 16 : 157-168, 1984
- 4) Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig P : Neocortical

spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminonascular mechanisms. *J Neurosci* 13 : 1167-1177, 1993

- 5) Sanchez del Rio, M., Moskowitz, M. : The trigeminal system. In: *The Headaches*, Second Edition, (J. Olsen, P. Tfelt-Hansen, K.M.A. Welch, eds.), Lippincott & Wilkins, Philadelphia, pp. 141-149, 2000
- 6) Burstein R, Yarnitsky D, Goor-Aryeh I, Ransil BJ, Bajwa ZH : An association between migraine and cutaneous allodynia. *Ann Neurol* 47 : 614-624, 2000
- 7) Sicuteri F, Testi A, Anselmi B : Biochemical investigation in headache : increase in hydroxyindoleacetic acid excretion during migraine attacks. *Int Arch Allergy* 19 : 55-58, 1961.
- 8) Sicuteri F : Prophylactic and therapeutic properties of UML-491 in migraine. *Int Arch Allergy* 15 : 300-307-58, 1959
- 9) Kimball RW, Friedman AP, Vallejo E : Effect of serotonin in migraine patients. *Neurology (Minneapolis)* 10 : 107-111, 1961
- 10) Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP : International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin) *Pharmacol Rev* 46 : 157-203, 1994
- 11) Matsubara T, Moskowitz MA, Byun J : CP-93,129, a potent and selective 5-HT_{1B} receptor agonist blocks neurogenic plasma extravasation within rat but not guinea-pig dura mater. *Br J Pharmacol* 104 : 3-4, 1991
- 12) Hamel E, Bouchard D : Contractile 5-HT₁ receptors in human isolated pial arterioles : correlation with 5-HT_{1D} binding sites. *Br J Pharmacol* 102 : 227-233, 1991
- 13) Hamel E, Fan E, Linville D, Ting V, Villemure JG, Chia LS : Expression of mRNA for the serotonin 5-hydroxytryptamine_{1D} beta receptor subtype in human and bovine cerebral arteries. *Mol Pharmacol* 44 : 242-246, 1993
- 14) Goadsby P, Hoskin KL : Serotonin inhibits trigeminal nucleus activity evoked by craniovascular stimulation through a 5-HT_{1B/1D} receptor : A central action in migraine? *Ann Neurol* 43 : 711-718, 1998
- 15) Humphrey PP, Feniuk W, Perren MJ, Connor HE, Oxford AW : The pharmacology of the novel 5-HT₁-like receptor agonist, GR43175. *Cephalalgia* 9 (Suppl 9) : 23-33, 1989
- 16) Roon KI, Olesen J, Diener HC, Ellis P, Hettiarachchi J, Poole PH, Christianssen I, Kleinermans D, Kok JG, Ferrari MD : No acute antimigraine efficacy of CP-122, 288, a highly potent inhibitor of neurogenic inflammation : results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Ann Neurol* 47 : 238-241, 2000.

- 17) Gomez-Mancilla B, Cutler NR, Leibowitz MT, Spierings EL, Klapper JA, Diamond S, Goldstein J, Smith T, Couch JR, Fleishaker J, Azie N, Blunt DE : Safety and efficacy of PNU-142633, a selective 5-HT_{1D} agonist, in patients with acute migraine. *Cephalalgia* 21 : 727-732, 2001.
 - 18) Leao AAP : Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7 : 359-390, 1944
 - 19) Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA : Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 4687-4692, 2001
 - 20) Liverman CS, Cui L, Yong C, Choudhuri R, Klein RM, Welch KMA, Berman NEJ : Response of the brain to oligemia : gene expression, c-Fos, and Nrf2 localization. *Mol Brain Res* 126 : 57-66, 2004
 - 21) Weiller C, May A, Limmroth V, Juptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC : Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med* 1 : 658-660, 1995
 - 22) Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ : Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet* 357 : 1016-1017, 2001
 - 23) Welch KM, Nagesh V, Aurora SK, Gelman N : Periaqueductal gray matter dysfunction in migraine : cause or the burden of illness? *Headache* 41 : 629-637, 2001
 - 24) Bartsch T, Knight YE, Goadsby PJ : Activation of 5-HT_{1B/1D} receptor in the periaqueductal gray inhibits nociception. *Ann Neurol* 56 : 371-381, 2004
 - 25) Cao Y, Aurora SK, Nagesh V, Patel SC, Welch KMA : Functional MRI-BOLD of brainstem structures during visually triggered migraine. *Neurology* 59 : 72-78, 2002
-

講 座

C型ウイルス肝炎における臨床分子生物学

北里研究所病院内科

くま がい なお き
熊 谷 直 樹

Key Words：C型肝炎ウイルス，分子生物学，インターフェロン，リバビリン，レプリコン

はじめに

C型肝炎ウイルスの臨床は、C型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus, 以下HCV)の発見の契機^{1), 2)}から現在の様々な抗ウイルス療法の開発に至るまであらゆる場面で分子生物学の進歩が多大な貢献をしている分野である。その意味で我々臨床医にとっても分子生物学は避けては通れない領域であり、今回特にC型肝炎の診療という観点からその意義を解説したいと思う。

HCVゲノム(HCVRNA)の構造と機能

C型肝炎の診断と治療はHCVゲノムの構造と機能を解析することから発展してきた。

HCVは9500-9600塩基からなるプラス鎖RNAをウイルスのゲノムとしてもち、その遺伝子構造からフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類されている(第1図)。HCVゲノムから前駆体蛋白質が産生されこれが宿主細胞由来のシグナルペプチターゼとHCVゲノムにコードされている2種類のプロテアーゼにより切断され各種蛋白質が産生される。アミノ末端側にはウイルス粒子を構成する構造蛋白が位置し、コア蛋白質(C)、エンベロープ蛋白質(E1, E2)の順に配置されている。この後には一連の非構造(Non-structural region, NS)蛋白質が配置されている。

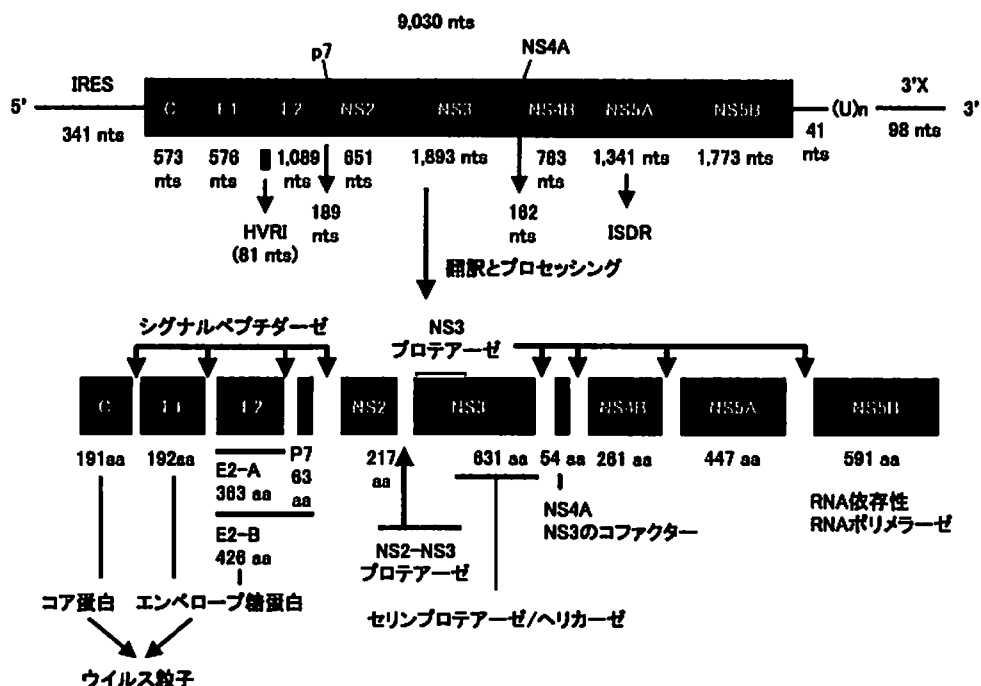
(1)5'非翻訳領域(5'UTR)：5'UTRは339塩基以上存在し、全体的には高度に保存されており、ウイルスゲノムの複製やウイルス蛋白質の翻訳などに重要な機能を果たしている。この領域の重要な点はHCV蛋白翻訳のためのリボソームの内部開始機構によるエントリー部位(internal ribosomal entry site, IRES)が存在することである。また5'UTRはHCV株間で塩基配列が最もよく保存されている領域なので、後述するRT-PCRに

おけるプライマーに用いられる。

(2)コア領域(C)：分子量20kDa前後のコア蛋白質がコードされている。コア蛋白質はHCVゲノムを包むカプシドを形成する。

(3)エンベロープ領域(E1, E2)：この領域からはウイルスの外被を形成するE1(分子量35kDa前後)とE2(分子量70kDa前後)と呼ばれる糖蛋白質が産生される。E2蛋白質のアミノ末端部にはHCV株間で著しく配列の異なる領域が存在し、超可変領域1(HVR1)と呼ばれている^{3), 4)}。HVR1は高度な変異性を示すことから後述するようにHCVの持続感染の成立に関与していると考えられている。

(4)非構造領域(NS)：この領域からはHCVゲノムのプロセッシングと複製に必要な一連の機能的蛋白質(NS蛋白質)が産生される。ウイルス自身のmetaloproteaseとserine proteaseによる切断の結果NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5Bの6種類の非構造蛋白質が産生される。NS2蛋白は膜蛋白であること以外その働きについては明確ではない。NS2からNS3の一部にかけてmetaloprotease活性が存在しNS2-NS3間を自己切断する。NS3は70kDaの蛋白でそのN末端側1/3にserine protease活性があり、NS3-NS4A間をシス切断する。切断されたNS3はそのserine protease活性によって残りのNS蛋白を切断する。NS3C末端側1/2にはhelicase活性が認められ二重鎖RNAを解いて一本鎖RNAにする機能をもち、ウイルス由来RNAの生成に関与している。これらHCV遺伝子にコードされているproteaseやhelicaseなどの酵素は抗ウイルス療法の標的として現在研究や薬剤の開発が進められている領域でもある。NS4AはNS3蛋白と強固な複合体を形成して、proteaseの補酵素として働く。NS4Bの機能は十分に分かっていないがNS4A/B蛋白は宿主の総合的な蛋白合成機能を抑制し、ウイル



第1図 HCV ゲノムの遺伝子構造と産生蛋白

ス蛋白合成を優先させる機能を持つ可能性が示唆されている。NS5A 蛋白は約 450 アミノ酸残基からなるリン酸化蛋白で、その作用が注目されたのはわずか 40 アミノ酸残基の変異がインターフェロン (Interferon, 以下 IFN) の治療効果に関与すると報告されたことである⁵⁾。同部位は interferon sensitivity determining region, ISDR とよばれ、double strand RNA-activated protein kinase (PKR)-binding domain の N 末端側に位置することから、NS5A は IFN によって誘導され抗ウイルス作用を起こす酵素の一つである PKR を抑制すると考えられている。NS5B には RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase, 以下 RdRp) 活性があり、ウイルス RNA 複製において中心的に働く。他の polymerase と同様に 'finger-palm-thumb' 様の蛋白立体構造をとる。最近 C 型肝炎の治療に IFN と併用で用いられるようになった Ribavirin という nucleoside analogue の作用機序の一つとして、RdRp に対する直接の阻害作用が考えられている^{6), 7)}。

(5)3'非翻訳領域 (3'UTR)：ウイルスゲノムの 3'末端領域と考えられていた U ストレッチの下流に 98 塩基からなる配列が確認され、3'X と命名された。後述する細胞内で自立複製ができる HCV レプリコン細胞⁸⁾の登場で、3'X が 5'UTR とともに HCV ゲノムの複製に必須

であることが証明された。

HCV ゲノムの多様性

一般に RNA ウイルスの RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)には DNA polymerase がもつような修復機構がなく、polymerase によるゲノムの読み間違いが受け継がれていってしまう。これが原因となって RNA ウイルスでは DNA ウイルスと比べてゲノムに多様性が生じると考えられている。また生体内では宿主の免疫学的圧力 (immune pressure) やウイルスの生存能力などによってもゲノムの選択が起こりウイルスは経時的に変化していく。このようにして生じた多様性を quasispecies と呼んでいる。

(1)遺伝子型：HCV ウイルス間の相同性をもとに現在までに 11 種類の大きなグループ (genotype) の中に 30 以上の遺伝子型が同定されている⁹⁾。それぞれの遺伝子型間では塩基配列レベルで 20%以上、アミノ酸配列レベルで 15%以上の違いがある。領域別にみると 5' UTR, コア領域, 3'X では 90%以上の相同性があるが、エンベロープ領域や NS2 領域では塩基配列で 40%程度も異なっている。わが国では 1b が主要な遺伝子型 (約 70%) で、そのほかに 2a (約 20%), 2b (約 10%)

第1表 HCV持続感染者におけるHVR1領域の変異の解析

	無症候性キャリア	慢性活動性肝炎	有意差検定
ALT 平均値 (IU/l)	21.6±7.0	62.4±16.0	p=0.00001
◆クローン数			
開始期	6.2±3.5	4.5±2.5	NS
終了期	7.9±2.0	6.8±3.1	NS
年平均変化率	0.52±1.40	0.91±1.82	NS
◆塩基多様度			
開始期	8.9±7.6	8.1±7.6	NS
終了期	11.1±8.1	9.6±7.5	NS
年平均変化率	0.86±3.5	0.51±2.56	NS

平均観察期間：約3年間 NS=not significant

が存在する。この遺伝子型によって IFN 治療に対する反応性が大きく異なることは周知の事実である。すなわち一般に genotype 2, 3, 6 は IFN 感受性があり、genotype 1, 4 は IFN 抵抗性である。

(2)同一宿主内での多様性：同一宿主内に存在する HCV ゲノム全体の多様性についても検討が行なわれ、全体としては、塩基配列で 1% 程度、アミノ酸配列で 0.7% 程度異なっている。すなわち HCV は生体内で変異しながら polyclonal に存在していると考えられる。

(3)超可変領域 (HVR)：HCV ゲノムの中でもっとも多様性の富む部分が E2 蛋白質のアミノ末端部に存在する HVR である^{3), 4)}。一般にウイルスの外被を形成するエンベロープ領域には中和抗体のエピトープが存在すると考えられる。宿主の免疫監視機構から逃避 (escape) するため HCV が変異を繰り返す結果、HVR の多様性が生じると考えられている。HVR の多様性は HCV に対するワクチンの開発が困難な原因にもなっている。肝炎の活動性と HVR1 の変異の速さとの関係も注目されてきたが、筆者らの C 型慢性活動性肝炎と無症候性 C 型肝炎ウイルスキャリアーを対象とした自然経過の中での検討からは、血清 ALT 値の変動と HVR1 の quasispecies の進展との間には明らかな相関関係は認められなかった¹⁰⁾ (第1表)。

HCV 関連検査法の進歩

(1)HCV 抗体検査法：現在日常の診療で最も汎用されているのは第3世代 HCV 抗体測定系である。これはコア抗原エピトープとして c22-3 抗原、NS 抗原エピトープとして c200 抗原および遺伝子組み換え発現蛋白である NS5 エピトープ (aa2054-2995) を用いている。この測定系により HCV 感染をより確実に診断できるよう

になった。高力価陽性の場合には HCV キャリアと判定して良いが、低力価陽性の場合、ウイルス血症があるのか過去の既感染を示しているのかの鑑別が必要になる。感染の直接的な証明には次項の血清 HCV RNA 測定が必要になるが、抗体測定系としては HCV コア抗体測定系 (コア領域の遺伝子組み換え発現蛋白または合成ペプチドを抗原エピトープとして用いている) が有用である。コア抗体は HCV の構造蛋白に対する抗体であるため HCV の感染を確実に診断できる利点がある。コア抗体が陰性または低力価の場合は過去の感染の既往を示唆するので IFN 治療後の経過観察にも適している。

(2)HCV RNA 検出検査法：定性的測定法と定量的測定法がある。(a)定性的法は定量法より感度が良く 1. HCV 抗体低力価の場合の既感染と HCV キャリアの鑑別、2. 急性 C 型肝炎の早期診断、3. IFN 治療の効果判定などに適している。現在臨床で測定可能な定性的法は「アンプリコア定性法」で、 10^2 copies/ml の感度がある。実験室レベルでは 10 copies/ml 以下の感度をもつ nested RT-PCR 法も用いられている。(b)定量法には CRT-PCR 法、bDNA 法、アンプリコア-M 法などがあるが詳細はここでは省略する。これまでの検討からは血清中の HCV RNA 量と C 型肝炎の臨床像や予後との間には一定の関係は見出されていない。従って定量法の臨床的意義は IFN 治療の効果予測といえる。C 型肝炎に対して様々な抗ウイルス療法が開発されてきたが、多くのレジメにおいて永続的なウイルス排除 (sustained viral response, 以下 SVR) が得られるか否かは HCV の genotype と血清 HCV RNA 量に大きく依存している。現在臨床で汎用されているアンプリコア-M 法は高濃度領域の定量性が不十分であったが、最近高 HCV RNA 量測定に適した「ハイレンジ法」が開発され、

5000KIU/ml まで測定が可能となり、治療前の血清 HCV RNA 量のより正確な層別化が可能となった。HCV の定量法としては以上の RNA 遺伝子検出法の他に抗 HCV コアモノクローナル抗体を固相化したサンドウィッチ EIA 法による「HCV コア抗原測定法」がある。これは PCR 法と較べて簡便で安価な点が利点であるが詳細は割愛する。

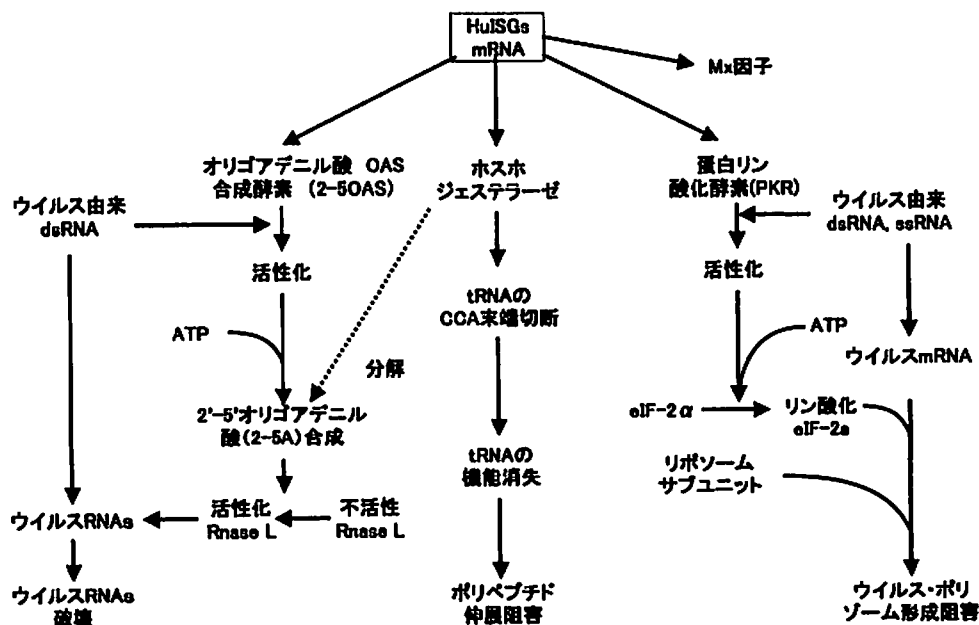
(3)HCV のタイピング：HCV の遺伝子型の判定は臨床的に IFN 治療に対する反応性を予測する上で必要不可欠であるが、現在臨床の間では血清反応を用いた HCV 郡別判定 (HCV グルーピング) が汎用されている。これは genotype 1 と genotype 2 間で塩基配列の大きな差が存在する NS4 領域の合成ペプチドを各々作成し、microplate に固相化し ELISA 法で抗体を検出する方法で、同方法での遺伝子型判別可能率は約 80% といわれている。PCR 法を用いた HCV genotyping は NS5 領域の配列をもとに判別が行なわれ、当然精度は高いがまだ保険収載はされていない。

インターフェロンの抗ウイルス作用

IFN が C 型肝炎に対する抗ウイルス療法の主役として汎用されて久しい。IFN の抗ウイルス作用発現の分子機構も詳細に検討され、臨床にフィードバックされて

いる部分も多い。IFN レセプターとシグナル伝達に関しては割愛し、ここでは IFN により誘導される抗ウイルス因子について触れることにする¹¹⁾ (第 2 図)。ヒト・インターフェロン (HuIFN) によって発現が誘導・増強されるヒト遺伝子 (IFN stimulated genes, HuISGs) は多種多様で 2001 年現在その数は 335 個と報告されており、その遺伝子産物の機能は多岐にわたっている。C 型肝炎治療に用いられる IFN は IFN α または IFN β でこれらは I 型 IFN と総称されるが、I 型 IFN で誘導される HuISGs の中で主要な抗ウイルス因子としては、2'5'-oligoadenylate synthetase (2-5OAS), RNA dependent protein kinase (PKR), Mx 因子などがあげられる。

(1)2-5OAS：ウイルス由来の高分子量 2 重鎖 RNA (dsRNA) と結合することにより活性化されてオリゴアデニール酸 (2-5A) を産生する。2-5A は細胞内に不活性化型で存在する RNAase L を活性化しこれがウイルス RNA (mRNA およびゲノム RNA) を分解することによりウイルスの増殖を阻害する。ウイルス感染細胞内では広範囲での 2-5OAS の活性化が起こり、細胞側の mRNA などの分解とそれに続く蛋白合成の停止からアポトーシスの誘導も起こる。臨床の間での血清 2-5OAS の測定は IFN の効果発現のモニターとしての意義があり、治療途中の 2-5OAS 活性の低下は IFN 中和抗体の



第 2 図 I 型 IFN のよる抗ウイルス作用発現機構

出現等による効果失活を示唆する。

(2)PKR はリボソームと結合して存在する蛋白リン酸化酵素であり、dsRNA あるいは特定の高次構造を有する ssRNA と結合することにより活性化される。活性化された PKR はリボソームを構成する eukaryotic initiation factor-2 (eIF-2)の α subunit をリン酸化してその GTP 結合能を消失させ、ウイルス蛋白の合成を阻害する。ウイルス感染細胞内では 2-5OAS と同様に PKR によるアポトーシスも誘導される。

前述のように HCV の NS5A 領域の ISDR を含む領域 (PKR binding domain) は PKR と直接結合することにより PKR の抗ウイルス作用を阻害する¹²⁾。したがって ISDR の変異が HCV の IFN 感受性に影響をもたらすと考えられている。

リバビリンの抗ウイルス作用

リバビリン (ribavirin, 以下 RBV) は、1972 年に Witkowski らによって合成されたプリンヌクレオシッドアナログで、イノシン、アデノシンとグアノシンの構造に類似することが可能である¹³⁾。RBV は *In vitro* で種々の DNA および RNA ウイルスに対して抗ウイルス効果を示すが、その正確な抗ウイルス作用機序は判明していない。临床上 RBV 単独では C 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス効果は明らかではないが、IFN と併用することにより IFN 単独療法では得られない優れたウイルス排除効果が期待できる薬剤である。現時点で想定される RBV の作用機序としては以下の分子機構がある。

(1)エラーカタストロフの誘導：HCV の RNA polymerase が proof-reading 機構を有さないため高頻度でゲノム変異を来しその結果 quasispecies とよばれる多様な遺伝子変異を有する変異株が混在した状態を

形成していることは既に述べた。このような変異は宿主の免疫監視機構からの逃避や抗ウイルス療法に対する抵抗性の獲得などには有利に働くが、変異によりウイルスの遺伝子情報を保持できなくなるとウイルスは死滅することになる。RdRp により二重鎖 RNA が合成される際、RBV が誤って取り込まれることでウイルス変異を加速させるという考え方が error catastrophe 仮説である。

(2)RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) の阻害：RBV は組織細胞中でリン酸化され代謝物として 3 種類のリン酸化体 (mono-, di-, tri-phosphate) を生じる。RdRp を用いた実験系で RBV 三リン酸 (RTP) が誤って RNA に取り込まれ、この RTP が取り込まれた RNA を基質とした場合、新たな RNA の合成が阻害されることが示され RBV の HCV の RdRp に対する直接的な阻害作用の存在が考えられた^{6), 7)}。C 型慢性肝炎の IFN-RBV 併用療法における治療効果予測の観点から、RdRp が存在する NS5B 蛋白の変異が RBV の抗ウイルス効果にどのような影響をもたらすかが注目されたが、筆者らは IFN と RBV の併用療法を行なった genotype 1b の C 型慢性肝炎で治療前に NS5B 領域の遺伝子解析を行ない、その early viral response の有無に關与する NS5B 蛋白の変異点を見出した¹⁴⁾ (第 2 表)。

(3)宿主免疫能に及ぼす影響：*in vivo*, *in vitro* の研究より RBV が type 1 cytokine (IL-2, IFN γ など) の発現を亢進させ、type 2 cytokine (IL-4, IL-6 など) の発現を抑制することが報告され、RBV の抗ウイルス作用機序の一つとして注目されている¹⁵⁾。

今後の治療戦略 (分子生物学的アプローチ)

HCV のゲノム解析に伴い抗ウイルス療法の研究は飛躍的な進歩を続けている。臨床応用にはまだ年数を有す

第 2 表 Amino acid residues at position 85 and 124 and early clearance of HCV by interferon plus ribavirin (文献 14 より改変)

Patient No.	Viral Clearance in serum at 8 weeks Tx	NS5B Position 85	NS5B Position 124
1	Yes	V (valine)	K (lysine)
2	Yes	V	K
3	Yes	V	K
4	Yes	V	K
5	Yes	V	K
6	No	I (isoleucine)	E (glutamic acid)
7	No	I	E
8	No	I	E

るが、現在進行中の新たな治療へのアプローチについて触れてみる。

(1)ウイルス酵素阻害剤：既述のように HCV の非構造蛋白は HCVRNA の複製に関与している。特に NS3 蛋白は抗ウイルス療法の格好の標的となってきた。現在 protease inhibitor が臨床応用に向けて開発中である。helicase inhibitor などとも検討されている。RdRp である NS5B 蛋白は HCV の遺伝子型を超えて高度に保存され、ウイルス特異的でもあるので、これを標的とした RdRp inhibitor の開発も進められている。

(2)nucleoside analogues：RBV に続く各種 nucleoside analogue の臨床試験も進行中である。

(3)antisense oligonucleotides：標的となる mRNA に特異的に結合して蛋白合成を抑制する 15~40 塩基の合成 nucleotide で、5'UTR 領域の HCV 蛋白翻訳のための IRES の initiation codon をターゲットとしてデザインされたものが検討中である。

(4)short interfering RNA (siRNA)：RNA interference (RNAi) とは二本鎖 RNA (dsRNA) を細胞に導入することにより相同な mRNA が特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象を指す¹⁶⁾。これまで哺乳動物細胞に長鎖の dsRNA を導入すると IFN によって誘導された PKR によって蛋白翻訳が停止されるため有意な効果が観察されなかったが、21 塩基前後の short iRNA (siRNA) として導入すれば PKR による反応を起こさずに RNAi としての特異的な効果が発現することが分かった。その分解機構としては siRNA に特異的な蛋白が結合して RISC (RNA-induced silencing complex) を形成し、この RISC が同じ配列をもつ mRNA を認識して結合し、siRNA の中央部で mRNA を切断するといわれている。臨床応用に向けて後述する

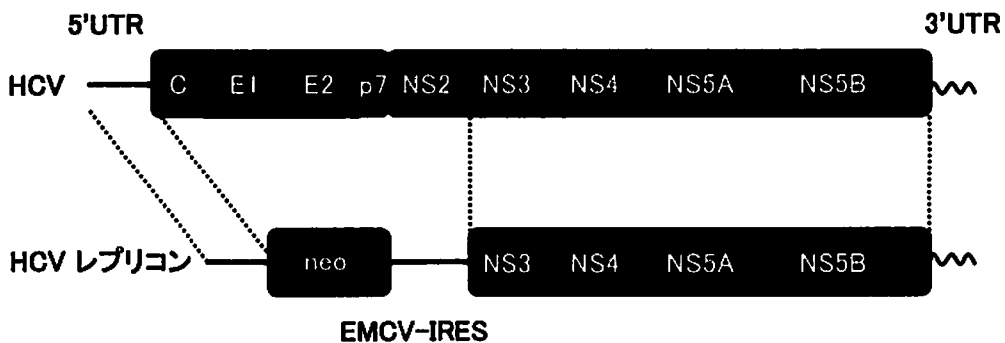
レプリコンシステムを用いた HCV ゲノムのコア遺伝子領域に対する siRNA の導入効果などが検討されている¹⁷⁾。

その他、RNA を塩基配列特異的に切断する RNA (ribozyme) が IRES の切断を目的に研究されたが、臨床応用にまでは至っていない。

HCV レプリコンシステムについて

最後に HCV の複製、増殖機構の解明に大きな進展をもたらした実験系である HCV レプリコンについて触れる。

1999 年 Lohmann らによって、HCVRNA 複製に必須と思われるウイルス遺伝子領域をもち自己複製できる HCV レプリコンが作成された¹⁸⁾。このレプリコンは HCVRNA の複製に必要な蛋白をコードする非構造領域、および非翻訳領域 (5'UTR, 3'UTR) に存在する機能ドメインを含み、さらにネオマイシン薬剤耐性遺伝子を組み込んだ組み替えサブゲノム RNA で、導入細胞においてウイルスゲノムの持続的な自己増殖を得ることができる。(第3図)。このシステムにより従来解析が困難であった細胞内ウイルス複製増殖機構を培養細胞にて再現することが可能となり、感染機序の解明や、抗ウイルス療法における感受性や抵抗性の解明のための重要なツールとなりつつある。



第3図 HCV レプリコンの遺伝子構造

おわりに

これまで概説したように、C型ウイルス肝炎の臨床は分子生物学と深く関わって進歩してきた。分子生物学的アプローチの結果新たな抗ウイルス療法が開発され、結果としてわれわれ臨床医は治療のための様々な modality を得ることができた。その意味でC型ウイルス肝炎の診療はまさに translational research の賜物といえるかもしれない。基礎的研究の臨床応用に際してその臨床的意義を検証するとともに、臨床の場から生じた疑問やアイデアを再度基礎研究へフィードバックしていくこともわれわれ臨床医の使命であると考え次第である。

文 献

- 1) Choo Q-L, et al : Isolation of a cDNA derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244 : 359-362, 1989
- 2) Kuo G, et al : An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244 : 362-364, 1989
- 3) Hijikata M et al : Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 175 : 220-228 1991
- 4) Weiner AJ et al : Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180 : 842-848, 1991
- 5) Enomoto N, et al : Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 96 : 224-230, 1995
- 6) Maag D, et al : Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem* 276 : 46094-46098, 2001
- 7) Vo NV, et al : Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* 42 : 10462-10471, 2003
- 8) Lohmann V, et al : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285 : 110-113, 1999
- 9) Robertson B, et al : Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses : proposals for standardization. *Arch Virol* 143 : 2493-2503, 1998
- 10) Kumagai N, et al : Changes in complexity of HVR-1 quasispecies and its relation to disease activity in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 123(suppl) : 51-52, 2002
- 11) 吉田逸郎：ヒト・インターフェロンの抗ウイルス作用発現の分子機構。日本臨床, 62 (増刊：ウイルス性肝炎(上)) : 448-458, 2004
- 12) Gale MJ Jr, et al : Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Hepatology* 28 : 1147-1153, 1998
- 13) Wu JZ, et al : Ribavirin, viremide and adenosine-deaminase-catalysed drug activation : implication for nucleoside prodrug design. *J Antimicrob Chemother* 52 : 543-546, 2003
- 14) Kumagai N, et al : Polymorphism of NS5B protein relates to early clearance of hepatitis C virus by interferon plus ribavirin : a pilot study. *J Viral Hepatitis* 11 : 225-235, 2004
- 15) Tam RC, et al : Contact hypersensitivity responses following ribavirin treatment *in vivo* are influenced by type 1 cytokine polarization, regulation of IL-10 expression, and costimulatory signaling. *J Immunol* 163 : 3709-3717, 1999
- 16) Hannon GJ, et al : RNA interference. *Nature* 418 : 244-251, 2002
- 17) Randall G, et al : Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 235-240, 2003

講 座

患者の自己決定権と医療機関の説明義務
—医療行為の選択をめぐる問題を中心として—

慶應義塾リーガルアドバイザー委員会

関谷法律事務所 弁護士

宗 像 雄

Key Words：自己決定権，インフォームド・コンセント，説明義務，医師の裁量権，医療水準

私が所属する「慶應義塾リーガルアドバイザー委員会」とは、慶應義塾の委嘱を受けて、義塾に関係する様々な法律問題についてアドバイスをし、あるいは義塾の代理人としてその問題の解決にあたる弁護士集団です。委員長である関谷巖弁護士（塾員，昭和43年法卒）を中心に、現在11人の弁護士（いずれも塾員）が、日々、諸問題の処理にあたっています。その中で、私は、主に慶應義塾大学病院関係の問題を担当しています。

このような経緯もあり、私は、平成16年10月30日、第74回生涯教育研修セミナーにおいて、「司法における患者の自己決定権」というテーマで講演する機会をいただきました。ただ、そのときは、時間的な制約から詳しい説明を省略した箇所も多く、若干理解し難い内容となってしまったのではないかと、今更ながら反省しております。

そこで、この機会に紙面をお借りして、近時、医師、歯科医師、薬剤師、看護師その他医療に従事する者はもちろん、医療施設の管理者等にとって、極めて関心が高いと思われる「患者の自己決定権と医療機関の説明義務」について、あらためて発表させていただくことにしました。

ただ、「患者の自己決定権と医療機関の説明義務」というテーマは、後に詳しく述べるとおり、現代における医療問題の全てといっても過言ではないほど、極めて広い射程距離を有しています。そこで、今回は、主に、医療行為の選択をめぐる問題について発表したいと思えます。また、私の（個人的な）見解ではなく、あくまでも具体的な裁判例に基づいて、現在、司法（裁判所）では

どのように考えられているか、という点を中心にご紹介していきたく思います。

発表にあたっては、医療をご専門とする方にお読みいただくことを前提に、可能な限り、専門的な法律用語、法学に特有の言い回しや表現を避けるとともに、平易な表現を心がけました。少しでも読み易くするため、参考にした文献等については、個別の引用を省略し、末尾にまとめて記載をいたしました。しかし、学問的な正確性を期すため、あるいは、私の力量不足のため、所々分かり難い部分もあるかと存じます。予めご容赦ください。

甚だ拙い論考ではございますが、ご参考にいただければ幸いです。今後の日本の医療の発展のために、少しでもお役に立てば、望外の幸せでございます。

患者の自己決定権とは

1. 自己決定権について

そもそも、自己決定権とは、生き方や行動など自己に関する事項について、自ら主体的に選択・決定する権利をいいます。自律的決定権といわれることもあります。

日本国憲法は、「個人の尊厳」を保障しています（第13条）。これは、ひとりひとりの人間は、道徳的な主体として尊重されなければならない、という意味です。このことから、人間は誰でも、自己の生き方や行動などについて自ら主体的に選択・決定する権利を有する、という考え方が導き出されます。

すなわち、自己決定権は、憲法によって国民に保障されている「基本的人権」なのです。

本論文は第74回生涯教育セミナー（平成16年10月30日開催）の講演を基に構成された。

2. 医療をめぐるパラダイム・シフトと患者の自己決定権

従来、医療の中心は、医師ないし医療機関であると考えられていました。これは、いわば「医師本位の医療」という考え方です。患者の自己決定権という考え方も、当初は、この「医師本位の医療」の下で患者の地位を強化するために主張されました。

ところで、ご承知のとおり、近時、医療をめぐる基本的な考え方（パラダイム）が大きく転換（シフト）しています。具体的には、「医師本位の医療」から、いわば「医師・患者協働型の医療」ないし「患者本位の医療」へと推移しています。

そして、このようなパラダイム・シフトに伴って、医師ないし医療機関の地位も、大きく変化します。具体的には、「患者本位の医療」を志向する場合、医療の中心は、患者自身であって、医師らではありません。医師らは、もはや「医療の主宰者」ではなく、「患者の自己決定の支援者」と位置づけられることとなります。

そして、以上のようなパラダイム・シフトは、主として、患者の自己決定権をどのようなものと理解するか、という点に関連しています。逆の言い方をすれば、患者の自己決定権こそが、パラダイム・シフトの「原動力」となっているのです。

したがって、現代における医療をめぐる様々な問題を考えるにあたっては、患者の自己決定権に関する理解が、極めて重要な意味を有しています。

3. 法的な権利としての患者の自己決定権の内容

患者の自己決定権とは、一般的に定義すれば、医療行為を受けるか否か、どのような医療行為を受けるかなどについて、患者自身が主体的にこれを決定することができる権利をいいます。

裁判所も、「自己決定権」と呼ぶかどうかは別にして、患者が（法的権利である）人格権の一内容として上記のような「意思決定をする権利」を有していることを認めています（最判平成12年2月29日参照）。

※最判平成12年2月29日は、いわゆる「エホバの証人」の信者である患者が輸血を伴う医療行為を拒否していたにもかかわらず、医療機関がこれを強行した事案である。裁判所は、「患者が、輸血を受けることは自己の宗教上の信念に反するとして、輸血を伴う医療行為を拒否するとの明確な意思を有している場合、このような意思決定をする権利は、人格権の一内容として尊重されなければならない。」と判示した。

ただ、法的な権利ないし法的に保護されるべき利益としての自己決定権の内容について、一般的に定義づけた裁判例はありません。むしろ、多くの裁判例においては、患者の自己決定権は、診療契約の具体的内容（例えば、医師ないし医療機関が果たすべき義務の内容や、契約違反に基づく損害賠償の範囲など）を導き出すための法的な根拠として用いられています。すなわち、患者の自己決定権は、実際には、患者と医師ないし医療機関の間の診療契約関係の具体的な内容を考える上での「背景的な権利」として機能していると考えられます。

したがって、法的権利ないし法的利益としての患者の自己決定権の具体的な内容（外延）は、必ずしも明確ではありません。この点を明らかにするには、後述するような、患者の自己決定権と関係する個別の法的な問題点に関する裁判例を分析ないし集積していく必要があります。

なお、法的権利であっても、これを濫用することが許されないことは、当然です（民法第1条3項参照）。したがって、患者の意思決定が、自己決定権の濫用と認められる場合には、法的効果が否定されることとなります。

4. 実際のケースでの患者の自己決定権をめぐる問題の考え方（枠組み）

近時、医療行為に関し、患者側（患者本人、その家族等）が医師や医療機関に対して何らかの「要求」を行う場合が、非常に増えています。このような「要求」は、医療行為に関して行われることも、少なくありません。

ただ、このような患者側の「要求」にも、実際には、様々な意味合い（トーン）のものがあります。例えば、単なる要望やお伺いの類のものもありますし、宗教的信念やこれに準じる主義ないし世界観に基づく場合もあります。首尾一貫しているものもあれば、一時的な感情や思いつきに過ぎないものもあります。そして、例えば、単なる要望やお伺いの類のもの、一時的な感情や思いつきに過ぎない場合には、その「要求」は、未だ法的権利としての自己決定権の行使とはいえない、と考えられます。

また、患者側の「要求」には、実際には、様々な内容のものがあります。患者側としてもっともだと考えられる内容のものもあれば、例えば、医師や医療機関に無理難題を押しつけるもの、誤った医学的知識に基づくものなど、不合理な内容のものもあります。そして、前述のとおり、法的権利であっても濫用することは許されません。それゆえ、例えば、患者側が「要求」する内容がおよそ合理的ではなく、自己決定権の濫用と認められる場

合には、その「要求」は、法的には無効である、と考えられます。

このように、実際には、患者側の医療行為に関する「要求」が、全て前述のような法的保護を受ける（に足りる）自己決定権の行使である、とはいえません。

そこで、患者側から何らかの「要求」を受けた場合、医師や医療機関としては、次のように2段階に分けて、検討を加える必要がある、と考えられます。

- ①それが確固たる自己決定権の行使と称するものか否か
- ②(確固たる自己決定権の行使と称するものであるとして)それが自己決定権の適正な行使といえるか否か(濫用にわたるものでないか)

そもそも、患者側の「要求」が自己決定権の行使として法的に保護されるのは、①それが確固たる自己決定権の行使といえるものであり、かつ、②それが自己決定権の適正な行使(濫用にわたらない)と認められる場合のみです。したがって、これら①及び②の要件を満たしていないときは、当該自己決定にかかる患者の意思は、法的に保護されず、医師ないし医療機関がこれに反して医療行為を行っても、患者に対して法的責任を負わない、と考えられます。

例えば、患者側の意見が遅延逡巡して、特定の治療法を選択しても、すぐにそれが撤回されるような状況である場合には、当該選択は、①確固たる自己決定権の行使といえない、と考えられます。また、患者が選択した治療法が、当時の患者の状態によれば、成功率が低く、かつ、失敗すれば死亡ないし重篤な後遺症を残す可能性が極めて高いような場合には、当該選択は、自己決定権の適正な行使とはいえない、と考えられます(福井地判平成元年3月10日判決参照)。

※後出の福井地判平成元年3月10日判決は、治療法を選択に関する患者側(患者の家族)の医師ないし医療機関に対する要求について、①それが確固たる自己決定権の行使と称するものか否か、②(確固たる自己決定権の行使と称するもの)であるとして、それが自己決定権の適正な行使といえるか否か、という2段階で、その法的効果を検討する。

ところで、前述②の(確固たる自己決定権の行使と称するものであるとして)それが自己決定権の適正な行使といえるか否か(濫用にわたるものでないか)を判断する上では、診療当時のいわゆる臨床医学の実践における医療水準が、極めて重要な意味を有する、と考えられます。

そもそも、医師は、診療契約上、患者に対し、危険防

止のために実験上必要とされる最善の注意義務を負っています(最判昭和36年2月16日参照)。また、個々のケースにおいて医師が負う注意義務の基準は、診療当時のいわゆる臨床医学の実践における医療水準である、とされています(最判昭和57年3月30日参照)。そして、確固たる自己決定権の行使と称するものであったとしても、患者が意思決定した具体的な内容が前述の意味の医療水準を下回るものである場合には、医師がそれに従うこと自体が、その医療水準を逸脱することになります。それゆえ、この場合には、医師は、当該意思決定の内容に従わなければならないとはいえない、と考えられるからです。

医師ないし医療機関の説明義務の意義

1. Informed Consent 理論について

第二次世界大戦後、世界的に、「医療においては、Informed Consent(説明に基づく同意)が必要である、」との認識が広まりました。Informed Consent 理論とは、簡単に言えば、医療行為を行うにあたっては、患者が、十分な情報を与えられ、それに基づいて同意したことが必要である、という考え方をいいます。そして、このような世界的な動きの背景には、ナチスによる人体実験等に医師が協力していたという事実がありました。すなわち、Informed Consent 理論の根底には、「患者も人間である」という患者の強い主張が存在していたのです。

このようなInformed Consent 理論は、当初は、倫理的な意味で主張されていました。その後、法的にも、医療行為に当たっては患者の説明に基づく同意が必要である、と考えられるようになりました。

2. 患者に対する説明が必要とされる理由

それでは、何故、法的にも、同意の前提として患者に対する説明が必要となるのでしょうか。

従前は、患者に対する説明は、(違法性阻却事由としての)同意の有効要件として必要となる、と考えられていました。すなわち、患者の同意を得ないで医療行為を行うことは、原則として(刑事及び民事ともに)違法である。そして、この場合の「同意」は、単なる同意では足りない。患者が、説明を受け、十分な情報を与えられた上で、同意したことが必要となる。説明がなされず、十分な情報を与えられていない状況で行われた同意は、法的に無効である。それゆえ、法的に有効な同意を獲得するために、患者に対する説明が必要となる、と考えられていました。

その後、患者は自己決定権を有する、という考え方の高まりとともに、前述のような考え方は、修正を余儀なくされました。

現在は、患者の自己決定権という観点から、患者に対する説明の法的意義が理解されています。具体的には、患者に対する説明は、同意の有効要件にとどまらず、患者の自己決定権を充足するために必要となる、と考えられています。すなわち、患者は自己決定権を有している。医療行為を受けるか否か、どのような医療行為を受けるかなどについては、患者自身が、説明を受け、十分な情報を与えられた上で、主体的にこれを決定できることが保障されなければならない。それゆえ、このような患者の自己決定権を実質的に担保するために、患者に対する説明が必要となる、と考えられています。

※後出の最判平成13年11月23日は、説明義務の意義について、「説明義務における説明は、患者が自らの身に行われようとする療法（術式）につき、その利害得失を理解した上で、当該療法（術式）を受けるか否かについて熟慮し、決断することを助けるために行われるものである。」と判示する。

3. 説明義務の法的な位置付け

そもそも、患者と医師ないし医療機関とは、法的には、診療契約関係で結ばれています。また、前述のとおり、患者には自己決定権が認められるというものの、当該患者の病状等に関する情報や医学的知識（以下、これらをあわせて「医療情報」という）のほとんどは、事実上、医師ないし医療機関の管理下にあります。患者は、事実上、医師らの協力なくしては、自己決定を行うために必要かつ十分な医療情報を獲得することは困難です。

これらのことを背景として、患者の自己決定権は、主として、診療契約上の医師ないし医療機関の説明義務、すなわち、医師らは、患者に対して、医療を行う上で必要かつ十分な医療情報を提供しなければならない、という形で発現します。比喩的にいえば、患者の自己決定権が診療契約関係というプリズムを透過して投影されたものが、医師ないし医療機関の説明義務である、ということができそうです。

裁判所も、比較的早くから、（その理由付けには何通りかものがあります）結論的には、医師が、法的義務として説明義務を負うことを認めていました。

※最判昭和56年6月19日は、医師には、手術を行うにあたって、「同手術の内容およびこれに伴う危険性を患者またはその法定代理人に対して説明する義務がある」と判示した。

※後出の最判平成13年11月23日は、「診療契約に基づき、…説明すべき義務がある」と判示する。

※最判平成14年9月24日は、癌の告知に関し、患者の家族等に対する告知義務について、「診療契約に付随する義務として、…診断結果等を説明すべき義務を負う」と判示した。

なお、平成9年に医療法が改正され、いわゆる「努力義務」ではあるものの、説明義務について実定法上の根拠が与えられました（医療法第1条の4第2項・3項参照）。これによれば、説明義務を負うのは、「医師、歯科医師、薬剤師、看護師その他医療の担い手」（同法第1条の4第2項参照）とされています。医師や歯科医師だけは限定されていません。

説明義務の具体的内容

1. 説明を行うべき相手方

医師らが説明を行うべき相手方は、原則として、患者本人です。前述のとおり、そもそも、説明義務は、患者の自己決定権を担保する（実質的に保障する）ためのものです。したがって、原則として、説明を行うべき相手方は、自己決定権を有する者、すなわち、患者本人となります。

ただし、①対象となっている医療行為の性格・内容、②患者本人の精神的・徳的な成熟度、③その時点における患者の精神状態、などの事情によっては、患者本人に対して説明し、その同意を得ただけでは、説明義務の履行として不十分とされる場合があります。

例えば、患者が成年に達していても、精神病に罹患している等のために、患者本人が、医療行為の内容等について十分に理解して判断することができない状態にある場合には、家族や近親者など、患者と密接な関係を有する第三者に対して説明を行わなければならない、と考えられます。

なお、このような事情がある場合でも、患者が説明の内容を理解できないというような特段の事情がない限り、患者本人に対しても説明する必要があります。すなわち、このような事情があっても、患者本人は、（限定された範囲ではあるが）なお自己決定権を有しているのです。

※札幌地判昭和53年9月23日は、精神疾患患者に対していわゆるロボットミ手術を行った事案である。病院側は、患者の妻から承諾を得て、当該手術を行った。患者側は、患者本人からの承諾が存在しないことを問題にした。裁判所は、（手術に関する承諾）について、「患者本人において自己の状態、当該医

療行為の意義・内容、及びそれに伴う危険性の程度につき認識し得る程度の能力を備えている状況にないときは格別、かかる程度の能力を有する以上、本人の承諾を要するものと解するのが相当である。従って精神障害者或いは未成年者であっても、右能力を有する以上、その本人の承諾を要するといわなければならない。」と判示した。

2. 説明義務の範囲（説明すべき事項）

医師らが説明しなければならない事項は、抽象的にいえば、患者等が、治療の内容、性質等について十分な理解をもって判断するのに必要な全ての情報です。

これらの情報は、大きく次の3種類に分類することができます。

①現在の病状及び今後の予測に関する情報

②提供する医療行為の態様に関する情報

これは、医療行為を選択する上で必要な情報です。

具体的には、医療行為の必要性、医療行為の具体的な内容、手術的治療か保存的治療かの選択、等です。

③選択された医療行為の効果（利益）と危険性（リスク）に関する情報

ただ、患者の自己決定権の内容をどのようなものと理解するかによって、説明を要する事項の具体的な範囲・内容が異なってくる、と考えられます。

この点、裁判所は、一般的な医師の説明義務の範囲（説明すべき事項）について、主に、①患者の病状、②実施予定の治療方法の内容、③当該治療方法に付随する危険性、④他に選択可能な治療方法があれば、その内容と利害得失、⑤予後、の各事項である、と考えています（最判平成13年11月27日参照）。それゆえ、後述のとおり、医師が現実に決定（選択）した医療行為の内容について説明するだけでは、不十分です。

※最判平成13年11月27日は、乳癌の治療に関する手術に関する事案において、「医師は、疾患の治療のために手術を実施するに当たっては、診療契約に基づき、特別の事情のない限り、患者に対し、当該疾患の診断（病状と病名）、実施予定の手術の内容、当該手術に付随する危険性、他に選択可能な治療方法があれば、その内容と利害得失、予後などについて説明すべき義務がある」と判示した。

ところで、前述の最高裁判決の判示内容によれば、「特別の事情」があれば、説明義務の範囲（説明すべき事項）が縮小（軽減）される場合もありうる、と考えられます。

例えば、緊急手術のケースでは、最低限、手術の内容

及びこれに伴う危険性について説明すれば足りる、と考えられます（最判昭和56年6月19日参照）。

※最判昭和56年6月19日は、頭蓋骨陥没骨折の傷害を受け、それによる脳内出血の疑いのある患者に対し、医師が脳内血腫の除去手術を行ったが患者が死亡した事案において、緊急開頭手術を行うにあたり、医師は、「手術の内容及びこれに伴う危険性を患者またはその法定代理人に対して説明する義務があるが、そのほかに患者の現症状とその原因、手術による改善の程度、手術をしない場合の具体的予後内容、危険性についての不確定要素がある場合にはその基礎となる症状把握の程度、その要素が発現した場合の対処の準備状況についてまで説明する義務はない」と判示した。

医療行為の選択に関する 医師の裁量権と説明義務の範囲

1. 医療行為の選択に関する患者の自己決定権

従来、医療行為の選択に関しては、医師の裁量権が広く認められていました。すなわち、どのような医療行為を行うかについては、専ら医師が、その医学的所見に基づいて判断し、決定していました。

しかし、患者の自己決定権は、当然、医療行為の選択の局面にも及ぶはず（最判平成12年2月29日参照）。すなわち、患者は、医療行為を行うか否かだけでなく、どのような医療行為を行うかについても、自ら主体的に決定する権利を有している、と考えなければなりません。

※前出の最判平成12年2月29日は、「患者が、輸血を受けることは自己の宗教上の信念に反するとして、輸血を伴う医療行為を拒否するとの明確な意思を有している場合、このような意思決定をする権利は、人格権の一内容として尊重されなければならない。」と判示する。

なお、患者が医療行為を選択するにあたっては、様々な理由がありうる。宗教上の信念を理由とする場合には、上記のように、その意思決定は法的にも保護されなければならない。ただ、いかなる理由による場合にも本件と同じレベルで保護されなければならないかは、疑問である。特定の医療行為を選択する理由が著しく合理性を欠くものである場合は、自己決定権の「濫用」として、医師がこれに従わなくても違法ではない、と考えるべきである。

本件は、医療機関が、患者をいわば「騙し討ち」

にした事案である。本件判決は、このような事案の特性をふまえての判示であり、その射程距離はそれほど広いものではない、と考えられる。

そして、このような患者の自己決定権を前提にすれば、医療行為の選択に関しても、患者による選択・決定が重要な意味を有することになります。

2. 医療行為の選択に関する医師の説明義務の範囲

前述のとおり、患者の自己決定権は、医療行為の選択の局面にも及びます。それゆえ、医師らの説明義務の範囲（説明を要する事項）は、患者等が医療行為を選択するために必要な事項にも及ぶ、と考えられます。

したがって、個々のケースにおいて医師が現実（選択）した医療行為の内容を患者に説明するだけでは、説明義務の履行として不十分です。従来、「ムンテラ」として行われてきたものには、このような内容のものが多かったと思われま

具体的には、医師らは、患者が選択しうる医療行為としてどのようなものがあるか、代替的な方法としてどのようなものがあるのか、それぞれの医療行為にはどのような効果（利益）・危険性（リスク）があるのか、を含めて、説明する必要があります（最判平成13年11月27日参照）。

3. 有効な治療法として確立されていない場合の説明義務の範囲

ところで、同じ治療目的を達成するための方法（手段）として、複数の治療法が存在することがあります。むしろ、実際には、このようなことが一般的だと思われま

ただ、複数の治療法が存在するといっても、その中には、医療水準上有効な治療法として確立されているものもあれば、そうでないものもあります。医療水準上有効な治療法として確立されているものが全く存在しない場合もあります。このような場合に、医師は、医療水準上確立されていない治療法についても、患者に説明しなければならないのでしょうか。この問題は、未熟児網膜症、乳癌の治療のための手術、脳動静脈奇形（AVM）等に関する事案において、実際に問題となっています。

この点、一般的には、医師には、医療水準上確立されていない治療法についての説明義務はない、と考えられています。すなわち、前述のとおり、個々のケースにおいて医師が負う注意義務の基準は、診療当時のいわゆる臨床医学の実践における医療水準である、とされています（最判昭和57年3月30日参照）。それゆえ、医療水準上未確立の治療法については、医師は、当該治療法の

存在自体を知っている必要すらないこととなります。したがって、医師が当該治療法について説明義務を負わないのは、むしろ当然のことと考えられています。

※最判昭和61年5月30日は、未熟児網膜症に関する事案において、「光凝固法は当時の臨床医学の実践における医療水準としては本症の有効な治療方法として確立されていなかった」と認定した上で、担当医師には、眼底検査を実施すべき義務がない上、「眼底検査を行った結果を告知説明すべき義務まではなかったというべきである」と判示した。

※前出の最判平成13年11月27日は、乳癌の治療に関する手術に関する事案において、「一般的にいうならば、実施予定の療法（術式）は医療水準として確立したものであるが、他の療法（術式）が医療水準として未確立のものである場合には、医師は、後者について常に説明義務を負うと解することはできない。」と判示する。

しかし、一般的にはこのように考えられるとしても、個別の事案における具体的な事実関係の如何によっては、医療水準上確立されていない治療法についても、医師に説明義務がある、と判断される場合もあります。

例えば、①患者が、担当医師に対して、当該治療方法について積極的に質問を行っていた場合や、②当該治療方法が、未だ確立されていないとしてもそれに近い評価を受けており、患者も当該治療方法について強い関心を有していた場合などは、医師は、当該治療方法についても説明義務を負う、と考えられます。

※京都地判平成9年4月17日は、乳癌の治療のための手術に関する事案である。乳房切除術を受けた患者が、医師が乳房温存療法について説明をしなかったために、術式選択の機会を奪われた、と主張した。裁判所は、患者が、できる限り乳房温存をしたいと希望しており、医師に対して温存療法について質問をした事実を認定した上で、患者の請求を認容した。

※前出の最判平成13年11月27日は、「このような未確立の療法（術式）ではあっても、医師が説明義務を負う場合があることも否定できない、少なくとも、当該療法（術式）が少なからぬ医療機関において実施されており、相当数の実施例があり、これを実施した医師の間で積極的な評価もされているものについては、患者が当該療法（術式）の適応である可能性があり、かつ、患者が当該療法（術式）の自己への適応の有無、実施可能性について強い関心を有していることを医師が知った場合などにおいては、…医師の知っている範囲で、当該療法（術式）の内

容、適応可能性やそれを受けた場合の利害得失、当該療法（術式）を実施している医療機関の名称や所在などを説明すべき義務があるというべきである。」と判示する。

なお、差戻後の大阪高裁では、説明義務違反を理由に、慰謝料として120万円の支払いが命じられた（大阪高判平成14年9月26日参照）。この内容は、再度の上告審である最高裁でも維持された（最判平成15年6月12日参照）。

個別の事案において医師の説明義務の有無を判断する際に重要となる事実としては、例えば、次のようなものが考えられます。

- ①当該治療方法の実施数とこれに対する評価の内容
- ②当該患者に対する当該治療方法の適応可能性の高低
- ③当該治療方法に対する当該患者の関心の高低
- ④当該患者の当該治療方法に関する情報収集態度

なお、新規の治療法等が医療水準上確立されていると認められるためには、その治療法に関する知見が、類似の医療機関に相当程度「普及」していれば足りる、とされています（最判平成7年6月9日参照）。その治療法としての有効性が「確立」され、その知見が「定着」していることまでは要求されていません。

※最判平成7年6月9日は、さらに、医療水準であるかどうかの具体的な決定方法（基準）について、「新規の治療法に関する知見が当該医療機関と類似の特性を備えた医療機関に相当程度普及しており、当該医療機関において右知見を有することを期待することが相当と認められる場合には、特段の事情がない限り、右知見は右医療機関にとっての医療水準であるというべきである。」と判示した。

4. 医療行為の選択に関する医師の裁量権

ところで、患者の自己決定権を強調して、医師は、いわば「患者の自己決定の支援者」にすぎない、と主張されることがあります。このような見解を前提にすれば、医療行為の選択に関しても、患者が選択・決定した内容こそがいわば「決定的」なものとされ、医師が裁量によって決定できるのは、極めて限られた範囲にとどまることとなります。果たして、このような見解は、正当なのでしょうか。

この点、裁判所は、必ずしもこの見解のようには考えていない、と思われれます。すなわち、「専門技術としての適正な医療を実現する」という観点から、医師は、患者の選択に従うのではなく、医療水準に従い、正当と信じる医療を行うべきである、とする裁判例があります

（東京高判昭和60年4月22日参照）。やはり重要となるのは、医療水準なのです。さらに、この裁判例は、医療行為の選択にあたっては、患者が決定した内容ではなく、それぞれの医療効果が問題とされなければならない、と判示しています。

この裁判例は、医療行為の専門性に基づき、患者の自己決定権については、制限的なものと理解しています。他方で、医療水準の範囲内でも、医師には、広い裁量権を認めています。やはり、医師は、「患者の自己決定の支援者」ととどまらないのです。

※東京高判昭和60年4月22日は、小児科医が麻疹患児にガンマグロブリンをを軽減量投与したが、患児が麻疹脳炎に罹患した事案である。患者側は、医師は、患者に対し、軽減量投与方法と予防量投与方法の2つの治療法があることなど、その説明義務を尽くして、患者の自己決定権を尊重し、その同意を得る必要がある旨を主張した。これに対し、裁判所は、患者側が主張するように「いかなる医療措置を採るかを一様に患者の『自己決定』ないし選択に委ねることを前提として、そのために医師が患者に対して説明義務を負うとは考えられない。何となれば、医療はまさに医師の職責で、高度の専門性があり、医師は、医療水準に従い、正当と信じる医療を行うべきものであって、もし患者の選択に従って医療をしなければならぬとすれば、医師は常に患者の意向を確認すべきことになって混乱し、専門技術としての医療は到底行われぬからである（その代わりに患者には転医の自由がある）。」と判示した。

※福井地判平成元年3月10日判決は、脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血の患者に関する事案において、症状の改善が期待でき、かつ、その時点で根治手術を断行することは、一般的に成功率が低く、死亡ないしは重篤な後遺症を残す可能性が極めて高い状況の下で、「医師が自己の信念に従った治療（グレードの改善を待っての根治手術実施）をしている場合、患者側は医師に対し一か八かの極めて成功率の低い手術の強行を求めることは、患者の自己決定権の適正な行使とは到底いえない」として、医師ないし医療機関が患者側のこのような要求に従わなかったとしても、当該医師ないし医療機関が法的責任を負うことはない旨を判示した。

最後に

1) 以上、主に、医療行為の選択をめぐる問題における

「患者の自己決定権と医療機関の説明義務」について、現在、司法（裁判所）ではどのように考えられているか、という点を中心にご紹介しました。

繰り返しになりますが、「患者の自己決定権」という考え方は、現代の医療のあり方を考える上で、避けては通れない重要なテーマです。

そして、前述した医療をめぐるパラダイム・シフトは、正に今、進行中です。今後、この点がどのように推移していくのか、具体的には、このまま徹底した「患者本位の医療」へと突き進んでいくのか、それとも、あくまでも医師と患者の間のパートナーシップを重視し、「医師・患者間協働型の医療」にとどまるのか、先行きは未だ不透明であるといわざるをえません。

ただ、前述のとおり、少なくとも現時点では、医師は、単なる「患者の自己決定の支援者」ではありません。「専門技術としての適正な医療を実現する」という観点から、医療水準に従い、正当と信じる医療を行うべき職責を有している、と考えられます（東京高判昭和60年4月22日参照）。

2) 前述のとおり、医師、歯科医師、看護師その他医療に従事する者は、その業務の性質に照らし、危険防止のために実験上必要とされる最善の注意義務を負っています（最判昭和36年2月16日参照）。このように、

医療従事者には、極めて高度の注意義務が課されています。さらに、これらの医療従事者には、最善の注意義務を果たすために、絶えず研さんし、新しい治療法についても、その知識を得る努力をする義務が課されています（最判昭和63年1月19日伊藤補足意見参照）。

医療に従事する者は、常にこのことを自覚し、日々研さんに励む必要があるのです。

文 献

- 1) 畔柳達雄：医療事故と司法判断。判例タイムズ社、2002
- 2) 畔柳達雄他編：わかりやすい医療裁判処方箋。判例タイムズ社、2004
- 3) 植木哲他：医療判例ガイド。有斐閣、1996
- 4) 植木哲：医療の法律学。有斐閣、1998
- 5) 稲垣喬：医師責任訴訟の構造。有斐閣、2002
- 6) 菅野耕毅：医療過誤責任の理論〔増補新版〕。信山社、2001
- 7) 大谷実：医療行為と法〔新版補正第2版〕。弘文堂、1997
- 8) 中村哲：医師の説明と患者の判断・同意について。判例タイムズ、(773)：4、1992
- 9) 加藤新太郎：医療過誤訴訟の現状と展望。判例タイムズ、(884)：4、1995

雜 報

慶應医学会例会第 1384 回

日 時 平成 16 年 11 月 15 日 (月) 午後 6 時
 場 所 カンファレンスルーム
 演 題 A critical review of hormone therapy for carcinoma of the prostate
 演 者 Gerald Walter Chodak, MD
 Clinical Professor of Surgery, The University of Chicago Director, Midwest Prostate & Urology Health Center, Chicago, IL USA
 担 当 泌尿器科学教室教室

慶應医学会例会第 1385 回

日 時 平成 16 年 11 月 16 日 (火) 午後 6 時 30 分
 場 所 総合医科学研究棟 2 階 南側会議室
 演 題 Radiotherapy based on sentinel node procedure
 演 者 Ion Christian Kirikuta, MD, PhD
 Professor, Dr., Institute of Radiation Oncology, St. Vincenz Hospital (Limburg University), Limburg/Lahn, Germany
 担 当 放射線科学教室

慶應医学会例会第 1386 回

日 時 平成 16 年 11 月 16 日 (火) 午後 5 時
 場 所 新棟 11 階大会議室
 演 題 Mother-Infant psychotherapy and transgenerational transmission of conflicts
 演 者 Bertrand Cramer, PhD, MD
 Professor of Medicine, Director, Clinique de Psychiatrie infantile, Universitaires de Psychiatrie Genève, Genève, Switzerland
 担 当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1387 回

日 時 平成 16 年 11 月 22 日 (月) 午後 6 時
 場 所 包括先進医療センター新館 3 F
 演 題 How do intestinal stem cells protect their DNA from genotoxic damage
 演 者 Christopher S Potten, MD
 Chairman and Scientific Director, EpiStem Limited, Incubator Building, Grafton Street, Manchester, UK
 担 当 内科学教室・生理学教室

慶應医学会例会第 1388 回

日 時 平成 16 年 11 月 25 日 (木) 6 時 30 分
 場 所 新教育研究棟講堂 3
 演 題 New era of implant dentistry
 演 者 Clarence C. Lindquist, DDS
 President, Academy of Osseointegration, Washington DC, USA
 担 当 歯科・口腔外科学教室

慶應医学会例会第 1389 回

日 時 平成 16 年 11 月 29 日 (月) 午後 2 時
 場 所 新教育棟 4 階 講堂 3
 演 題 Dendritic cells : from the bench to the bedside
 演 者 Jacques Banchereau, PhD
 Director, Baylor Institute for Immunology Research, Dalas, TX USA
 担 当 微生物学・免疫学教室

慶應医学会例会第 1390 回

日 時 平成 16 年 11 月 26 日 (金) 午後 4 時
 場 所 総合医科学研究棟 5 階 会議室 5
 演 題 ① Percutaneous vertebroplasty : new technique using a pillow reduction for acute osteoporotic vertebral compression fracture
 ② Morphological changes in the bone fusion site after Posterior Lumbar Interbody Fusion (PLIF) using carbon cages impacted with laminar bone chips : follow-up study over more than four years
 演 者 ① Dong Kyu Chin, MD
 Associate Professor, Spine Center, Department of Neurosurgery, Yongdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea
 ② Keun Su Kim, MD
 Associate Professor of Neurosurgery at Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea
 担 当 外科学教室

慶應医学会例会第 1391 回

日 時 平成 16 年 12 月 6 日 (月) 午後 7 時 30 分
 場 所 11 階中会議室
 演 題 Polarization in general surgery : minimally vs. maximally invasive surgery
 演 者 Pierre F. Saldinger, MD, FACS
 Chairman, Department of Surgery, Carmen and Peter Buck Chair in Surgical Oncology, Associate Professor of Clinical Surgery, New York Medical College, Danbury Hospital, Danbury, CT USA
 担 当 外科学教室

慶應医学会例会第 1392 回

日 時 平成 16 年 12 月 16 日 (木) 午後 5 時
 場 所 総合医科学研究棟 1F ラウンジ
 演 題 A comparative study on the alcohol dehydrogenase (ADH) Class I gene cluster in primates : duplicated genes "escaped" from homogenization via gene conversion (?)
 演 者 Hiroki Oota, PhD
 Yale University School of Medicine, Department of Genetics, New Haven, CT USA
 担 当 分子生物学教室

慶應医学会例会第 1393 回

日 時 平成 17 年 1 月 19 日 (水) 午後 6 時
 場 所 新教育研究棟講堂 3
 演 題 Role of COUP-TFII in cardiogenesis
 演 者 Ming-Jer Tsai, PhD
 Professor, Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX USA
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1394 回 (開催中止)

日 時 平成 17 年 1 月 25 日 (火) 午後 6 時 30 分
 場 所 本館臨床講堂
 演 題 Responses of the microcirculation to inflammation
 演 者 Daniel Neil Granger PhD
 Department of Molecular and Cellular Physiology, Louisiana State University Health Sciences Center, Shreveport, LA USA
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1395 回

日 時 平成 17 年 1 月 25 日 (火) 午後 5 時
 場 所 新教育研究棟 講堂 2
 演 題 Photodiagnostic test procedures : an algorithm to diagnose patients with photosensitivity
 演 者 Percy Lehmann, MD
 Professor, Clinic for Dermatology, Allergology and Environmental Medicine, Wuppertal Hospital, Wuppertal, Germany
 担 当 皮膚科学教室

慶應医学会例会第 1396 回

日 時 平成 17 年 1 月 24 日 (月) 午後 4 時
 場 所 新棟 11 階大会議室
 演 題 Pharmacogenetics in clinical practice
 演 者 Anders Rane, MD, PhD
 Professor of Clinical Pharmacology, Head, Division of Clinical Pharmacology, Karolinska Institute at Karolinska University Hospital, Huddinge, Stockholm, Sweden
 担 当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1397 回

日 時 平成 17 年 1 月 27 日 (木) 午後 7 時
 場 所 カンファレンスルーム (中央棟 5 階)
 演 題 Cardiac Inflammation and Matrix Remodeling Heart Failure Belonging Heart & Stroke/Richard Lewar Centre of Excellence University of Toronto
 演 者 Peter Liu, MD
 Heart and Stroke/Polo Chair Professor of Medicine and Physiology, University Health Network, Director, Heart & Stroke/Richard Centre of Excellence in Cardiovascular Research, Associate Director, Division of Cardiology, University of Toronto, Toronto General Research Institute, Toronto General Hospital, Toronto, Ontario, Canada
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1398 回

日 時 平成 17 年 1 月 28 日 (金) 午後 6 時
 場 所 総合医科学研究棟会議室 5
 演 題 Have the primary goals of therapy in CML changed?
 演 者 Jorge E Cortes, MD
 Professor of Medicine, University of Texas, MD
 Anderson Cancer Center, Department of
 Leukemia, Houston, TX USA
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1399 回

日 時 平成 17 年 1 月 31 日 (月) 午後 6 時
 場 所 総合医科学研究棟会議室 5
 演 題 Reversing epithelial mesenchymal transdifferentiation
 演 者 Jun-ichi Hanai, MD, PhD
 Renal Division, Beth Israel Deaconess Medical
 Center, Harvard Medical School
 Boston, MA USA
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1400 回

日 時 平成 17 年 1 月 31 日 (月) 午後 6 時
 場 所 総合医科学研究所 6 階会議室
 演 題 Clinical and Pathology Utility of
 Predictive Molecular Biomarkers in
 Cancer Patients
 演 者 Dave Hoon, PhD
 Director, Department of Molecular Oncology,
 John Wayne Cancer Institute, Santa Monica,
 CA USA
 担 当 先端医科学研究所・細胞情報研究部門

慶應医学会例会第 1401 回

日 時 平成 17 年 2 月 4 日 (金) 午後 6 時
 場 所 リサーチパーク 1F ラウンジ
 演 題 Role of cytokines in the pathogenesis of experimentation ileitis
 演 者 Fabio Cominelli, MD, PhD
 Professor of Internal Medicine, Microbiology
 and Immunology, Chief, Division of Gastro-
 enterology and Hepatology, Director, Digestive
 Health Center of Excellence, University of
 Virginia, Charlottesville, VA USA
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1402 回

日 時 平成 17 年 2 月 7 日 (月) 午後 6 時
 場 所 慶應義塾大学総合医科学研究棟 1 F ラウンジ
 演 題 Quality of life after esophagectomy
 演 者 Claude Deschamps, MD
 Professor, Division of General Thoracic
 Surgery, Mayo Clinic, Rochester, MN USA
 担 当 外科学教室

慶應医学会例会第 1403 回

日 時 平成 17 年 2 月 18 日 (金) 午後 6 時
 場 所 新教育研究棟 2 階 講堂 1
 演 題 Alterations in coagulation and fibrinolysis in ARDS
 演 者 Lorraine Ware, MD
 Allergy, Pulmonary and Critical Care Medicine,
 Vanderbilt University School of Medicine,
 Nashville, TN USA
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1404 回

日 時 平成 17 年 2 月 24 日 (木) 午後 6 時
 場 所 新教育棟 4 階 講堂 3
 演 題 Translational research in stroke and migraine
 2005 : Will one pill ever be enough?
 演 者 Michael A. Moskowitz, MD
 Professor of Neurology, Harvard Medical
 School, Charlestown, MA USA
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1405 回

日 時 平成 17 年 3 月 9 日 (水) 午後 7 時
 場 所 新教育研究棟 講堂 2 (3 階)
 演 題 Professionalism
 演 者 Gregory Adams Plotnikoff, PhD
 Department of Oriental Medicine, Keio
 University School of Medicine, Tokyo, Japan
 担 当 医学教育統轄センター

慶應医学会例会第 1406 回

日 時 平成 17 年 3 月 9 日 (水) 午後 5 時
 場 所 東校舎 1 階 セミナー室
 演 題 Mucosal mast cells : Part of the TH2-mediated
 innate defense system of the gut
 演 者 Hugh Robert Peel Miller, Ph.D.
 Department of Microbiology and Immunology,
 University of Edinburgh, Midlothian, UK
 担 当 微生物学・免疫学教室

慶應医学会例会第 1407 回

日 時 平成 17 年 3 月 10 日 (木) 午後 6 時
場 所 総合医科学研究棟 1F ラウンジ
演 題 Role of IGF-I as a neuroprotective factor
演 者 Ignacio Torres Aleman, PhD
Neuroendocrinology Laboratory, Department, of Neural
Plasticity, Cajal Institute, Madrid, Spain
担 当 分子生物学教室

慶應医学会例会第 1408 回

日 時 平成 17 年 3 月 10 日 (木) 午前 11 時
場 所 総合医科学研究棟会議室 2
演 題 Adventures with Hydroxysteroid Dehydro-
genases
演 者 J Ian Mason, PhD
Professor and Chair of Clinical Biochemistry,
University of Edinburgh Medical School,
Edinburgh, Scotland, UK
担 当 医化学教室

『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ません。新知見の所在が明確で、論旨が一貫して明解な論文をお寄せ下さい。記述は簡潔にし、類似する図表は省略して下さい。学位申請論文に関しては「学位申請論文」投稿の手引きを参照して下さい。

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

論文の受付

原著、学位申請論文投稿は慶應医学学会会員に限ります。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
慶應医学学会「慶應医学」編集室

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9：00～午後 5：00

(土曜日は受付をしません)

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

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

論文原稿の作成上の注意

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

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学部に帰属する。

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、略号とともにフロッピーディスクのラベルに記載する。

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

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

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

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

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

「学位申請論文」投稿の手引き

「学位申請論文」について

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

1. 学位取得の十分条件ではない。

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

2. 二重投稿が回避できる。

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

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

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

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

3. プライオリティーを主張することはできない。

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

論文作成上の注意

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

ある。

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

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

編集後記

昨今はいわゆるペーパーレス社会への急速な移行期にあるといわれていますが、慶應医学も世の中の流れに逆らうことはできません。従来にもましてコンテンツ勝負になってきていることを意識して編集する時代と感じています。
(饗庭 了)

編集委員 (◎副会長, ○理事)

◎相磯貞和 ○岡田保典 ○末松 誠 ○戸山芳昭
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 17 年 3 月 18 日 印刷

平成 17 年 3 月 25 日 発行

編 集 者 北 島 政 樹

発 行 者

印 刷 所 学術図書出版株式会社

電話 (3948) 7516 番

印 刷 者 富 田 進

発 行 所 慶 應 医 学 会

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

慶應義塾大学医学部企画室

電話(3353)1211(大代)内線62766

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

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、©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方でない限り、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。

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル (中法) 学術著作権協会
電話(03)-3475-5618 FAX(03)3475-5619 E-mail: jaacc@mtd.biglobe.ne.jp

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。

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 1-978-750-8400 FAX 1-978-646-8600

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 copy right owner of this publication.

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

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

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

In the USA Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

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

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



**クラビットの
特徴**

1. 適応31菌種におよぶ広い抗菌スペクトラム
2. 肺炎球菌や緑膿菌などに対しオフロキサシン (OFLX) のほぼ2倍の抗菌力
3. 良好な組織移行性と未変化体での高い尿中排泄
4. 各種感染症に対し幅広く取得した43の適応症
5. 副作用の発現率2.77% (101/3,649例)
6. 通常用量に加え、重症または効果不十分例への投与が可能

広範囲経口抗菌製剤
指定医薬品、要指示医薬品*

クラビット[®]錠・細粒

Cravit[®] (レボフロキサシン製剤) (薬価目録収載)

*注意—医師等の処方せん・指示により使用すること

【禁忌(次の患者には投与しないこと)】

1. 本剤の成分またはオフロキサシンに対し過敏症の既往歴のある患者
2. 妊婦または妊娠している可能性のある婦人(「妊婦、産婦、授乳婦等への投与」の項参照)
3. 小児等(「小児等への投与」の項参照)

ただし、妊婦または妊娠している可能性のある婦人および小児等に対しては、炭疽等の重篤な疾患に限り、治療上の有益性を考慮して投与すること。

■効能・効果

〈適応菌種〉

本剤に感性的ブドウ球菌属、レンサ球菌属、肺炎球菌属、腸球菌属、淋菌、モラクセラ(ブランハマ)・カタラーリス、炭疽菌、大腸菌、赤痢菌、サルモネラ属、チフス菌、パラチフス菌、シロバクテラ属、クレブシエラ属、エンテロバクテラ属、セラチア属、プロテウス属、モルガネラ・モルガニー、プロビデンシア属、ペスト菌、コレラ菌、インフルエンザ菌、緑膿菌、アシネトバクテラ属、ブルセラ属、野兔菌属、カンピロバクテラ属、ペプトストربتコッカス属、アクネ菌、Q熱リケッチア(コクシエラ・ブルネティ)、トラコマクラミジア(クラミジア・トラコマティス)

〈適応症〉

表在性皮膚感染症、深在性皮膚感染症、リンパ管・リンパ節炎、慢性膿皮症、ざ瘡(化膿性炎症を伴うもの)、外傷・熱傷および手術創等の二次感染、乳腺炎、肛門周囲膿瘍、咽頭・喉頭炎、扁桃炎(扁桃周囲炎、扁桃周囲膿瘍を含む)、急性気管支炎、肺炎、慢性呼吸器病変の二次感染、膀胱炎、腎盂腎炎、前立腺炎(急性性、慢性性)、精巣上体炎(副睪丸炎)、尿道炎、子宮頸管炎、胆嚢炎、胆管炎、感染性腸炎、腸チフス、パラチフス、コレラ、バルトリン腺炎、子宮内感染、子宮付風器炎、涙嚢炎、麦粒腫、睑板腺炎、外耳炎、中耳炎、副鼻腔炎、化膿性硬膜外炎、歯周組織炎、歯冠周囲炎、顎炎、炭疽、ブルセラ症、ペスト、野兔病、Q熱

■用法・用量

通常、成人に対して、レボフロキサシンとして1回100mg(錠:1錠または細粒:1g)を1日2~3回経口投与する。なお、感染症の種類および症状により適宜増減するが、重症または効果不十分と思われる症例にはレボフロキサシンとして1回200mg(錠:2錠または細粒:2g)を1日3回経口投与する。腸チフス、パラチフスについては、レボフロキサシンとして1回100mg(錠:1錠または細粒:1g)を1日4回、14日間経口投与する。炭疽、ブルセラ症、ペスト、野兔病、Q熱については、レボフロキサシンとして1回200mg(錠:2錠または細粒:2g)を1日2~3回経口投与する。

〈用法・用量に関連する使用上の注意〉

1. 本剤の使用にあたっては、耐性菌の発現等を防ぐため、原則として感受性を確認し、疾病の治療上必要な最小限の期間の投与にとどめること。

2. 炭疽の発症および進展の抑制には、類薬であるシプロフロキサシンについて米国疾病管理センター(CDC)が、60日間の投与を推奨している。
3. 長期投与が必要となる場合には、経過観察を十分に行うこと。

■使用上の注意

1. 慎重投与(次の患者には慎重に投与すること)
 - 1) 高度の腎障害のある患者
[高い血中濃度の持続が認められている(「薬物動態」の項参照)。]
 - 2) てんかん等の痙攣性疾患またはこれらの既往歴のある患者(痙攣を起こすことがある。)
 - 3) キノロン系抗菌薬に対し過敏症の既往歴のある患者
 - 4) 高齢者(「高齢者への投与」の項参照)

2. 相互作用

- 併用注意(併用に注意すること)
- ・ フェニル酢酸系またはプロピオン酸系非ステロイド性消炎鎮痛薬(フェンブフェン等)
 - ・ アルミニウムまたはマグネシウム含有の制酸薬等、鉄剤
 - ・ クマリン系抗凝固薬(ワルファリン)

3. 副作用

副作用発生状況の概要
承認前の調査3,649例中報告された副作用は2.8%(101例)で、主な副作用は下痢・軟便、胃・腹部不快感、嘔気・悪心等の消化器症状1.9%(68例)、発疹等の過敏症状0.4%(15例)、頭痛・頭重感、不眠等の精神神経系症状0.5%(19例)であった。
承認後における使用成績調査(3年間)16,117例中報告された副作用は1.3%(203例)で、主な副作用は下痢、腹部不快感等の消化器症状0.6%(95例)、AST(GOT)・ALT(GPT)上昇等の肝機能異常0.2%(40例)であった。

1) 重大な副作用(頻度不明^(注))
下記の重大な副作用があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止し、適切な処置を行うこと。

- (1) ショック、アナフィラキシー様症状
(初期症状: 紅斑、悪寒、呼吸困難等)
- (2) 中毒性表皮壊死症(Lyell症候群)、皮膚粘膜眼症候群(Stevens-Johnson症候群)
- (3) 痙攣
- (4) 急性腎不全、間質性腎炎
- (5) 肝機能障害、黄疸(劇症肝炎があらわれることがある)(初期症状: 嘔気・嘔吐、食欲不振、倦怠感、悪痒等)
- (6) 無顆粒球症
(初期症状: 発熱、咽頭痛、倦怠感等)
- (7) 汎血球減少症
- (8) 血小板減少
- (9) 溶血性貧血(症状: ヘモグロビン尿)
- (10) 間質性肺炎、好酸球性肺炎
(症状: 発熱、咳嗽、呼吸困難、胸部X線異常、好酸球増多等)
(処置方法: 副腎皮質ホルモン剤投与等)
- (11) 偽膜性大腸炎等の血便を伴う重篤な大腸炎(症状: 腹痛、頻回の下痢等)
- (12) 横紋筋融解症(急激な腎機能悪化を伴うことがある)
(症状: 筋肉痛、脱力感、CK(CPK)上昇、血中および尿中ミオグロビン上昇等)

- (13) 低血糖
(糖尿病患者、腎障害患者であらわれやすい)
 - (14) アキレス腱炎、腱断裂等の腱障害
(症状: 腱辺りの痛み、浮腫)
 - (15) 錯乱等の精神症状
 - (16) 過敏性血管炎
(症状: 発熱、腹痛、関節痛、紫斑、斑状丘疹、皮膚生検で白血球破砕性血管炎等)
- 2) 類薬での重大な副作用**
抑うつ
他のニューキノロン系抗菌薬で抑うつが報告されているので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止し、適切な処置を行うこと。
- 3) その他の副作用**
下記の副作用があらわれることがあるので、異常が認められた場合には必要に応じて投与を中止するなど適切な処置を行うこと。

種類	副作用発現頻度 (承認時までの調査および市販後調査の結果)		
	0.1~5%未満	0.1%未満	不明 ^(注)
過敏症	発疹等	浮腫、じん麻疹、熱感、光線過敏症、悪痒等	
精神神経系		振戦、しびれ感、視覚異常、耳鳴、不眠、めまい、頭痛	幻覚、脱力感、意識障害
腎臓	BUN上昇等	クレアチニン上昇等	血尿
肝臓	AST(GOT)上昇、ALT(GPT)上昇、ALP上昇、γ-GTP上昇等		
血液	白血球減少、好酸球増多等	貧血等	
消化器	悪心、腹痛、下痢、食欲不振	嘔吐、消化不良、口内炎、舌炎、口臭、腹部膨満感、便秘	
その他		倦怠感、発熱、関節痛、動悸、味覚異常	筋肉痛

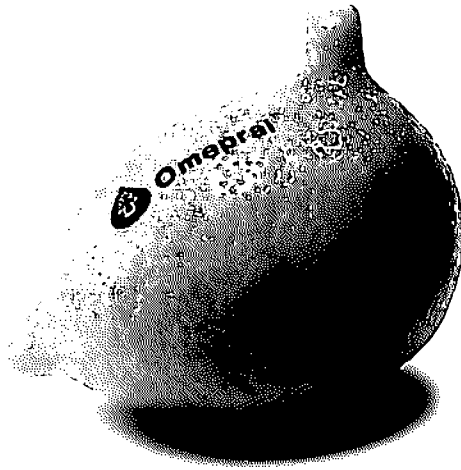
(注) 自発報告または海外において認められている副作用のため頻度不明。

★その他の詳細につきましては、製品添付文書をご参照ください。

いのち、ふくらまそう。

第一製薬株式会社

資料請求先
〒103-8234 東京都中央区日本橋三丁目14番10号
ホームページアドレス
<http://www.daiichipharm.co.jp/>
(B4)



プロトンポンプ・インヒビター

オメプラール®錠10

Omepral[®] Tablets 10・Tablets 20 オメプラソール錠

指定医薬品

薬価標準収載

プロトンポンプ・インヒビター

オメプラール®注用20

Omepral[®] Injection 20 オメプラソールナトリウム注射剤

指定医薬品

薬価標準収載

効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意等については、各製品添付文書をご参照下さい。

慶應医学 第82巻第1号別頁
平成17年3月25日

学位論文

慶應医学会

学位論文

低酸素イメージング薬剤を用いた核医学的手法による
放射線治療効果の予測

慶應義塾大学医学部放射線科学教室

(指導: 久保敦司教授)

鈴木 天之

(平成 16 年 3 月 11 日受付)

Key Words : ^{99m}Tc -HL91, tumor hypoxia, autoradiography, radiation therapy, radiosensitivity

腫瘍の放射線感受性はその組織型, 細胞の分化度, 間質の状態, 担癌個体の状態, 酸素分圧など様々な要素により決定され, 中でも腫瘍の酸素分圧は治療中に大きく変化することがあり, 腫瘍内の酸素状態を逐次把握することが重要である. これまでにも, 子宮頸癌の酸素分圧が低い群で有意に治療成績が悪かったこと¹⁾, 腫瘍低酸素が頭頸部癌²⁾や肺癌³⁾などの放射線治療の予後因子であること, 低酸素が食道癌⁴⁾や脳腫瘍⁵⁾では放射線および化学療法抵抗性の重要な因子であることなどが報告されている. すなわち, 腫瘍組織の酸素状態は放射線療法や化学療法の効果を決定する重要な要素であり^{6, 7)}, 治療前あるいは治療中の腫瘍の酸素状態は治療効果を予測するための大きな情報である. したがって治療の経過で腫瘍の酸素状態を把握することは癌治療において急務とされている.

一方, 腫瘍の酸素状態は酸素プローブを用いて電気化学的に直接測定した値を酸素分圧の標準値のひとつとしているが, 臨床上でプローブを刺入することは侵襲的であり, そのために腫瘍の転移を引き起こす危険性も指摘されている⁸⁾. また, magnetic resonance spectroscopy (MRS)⁹⁾や phosphorometer¹⁰⁾などによる測定は非侵襲的であるが, 特定の部位の酸素分圧を測定しているとはいえない.

非侵襲的に生体内の生化学状態を明示しうる方法としては, 放射性薬剤を用いた核医学的イメージングが考えられる. metronidazole¹¹⁾や misonidazole¹²⁾などの nitroimidazole 化合物¹³⁾が低酸素領域に集まる性格を利用して, これを放射性核種で標識した放射性薬剤により酸素状態を核医学的にイメージングする方法がこれまでに報

告されている. われわれはこれらの化合物よりも低酸素組織に対して高い親和性を示す化合物である ^{99m}Tc -HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime)¹⁴⁻¹⁸⁾の共同開発に参画し, その生体内分布および集積と酸素状態との関係を検討し, 当化合物が従来低酸素イメージング製剤よりも優れた特徴を有することをすでに報告してきた^{19, 20)}.

本研究は, ^{99m}Tc -HL91 の腫瘍への取り込みと腫瘍の放射線反応性との相関を検討し, 放射線治療の効果を予測する上で臨床的に有用であることを証明することを目的とした.

実験材料と方法

1. 動物モデル

ヒト腫瘍(ヒト胃癌 MKN45, ヒト類上皮癌 KB-31, ヒト結腸癌 COLO205, ヒト肺腺癌 HLC, ヒト喉頭癌 HEP2)を移植したヌードマウスを使用した. 腫瘍細胞 1×10^7 個をマウスの大腿皮下に接種し, 腫瘍の大きさが肉眼的に成育していることを確認してから ($300\text{-}600\text{ mm}^3$ または $100\text{-}200\text{ mm}^3$) 実験に供した.

2. ^{99m}Tc -HL91

HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime) 約 0.2 mg を含むバイアルに 5 ml の過テクネチウム (^{99m}Tc) 酸ナトリウム (約 370 MBq/ml) を加え室温にて振盪し標識した. なお, TLC (thin-layer chromatography) にて測定した ^{99m}Tc -HL91 の放射性化学的純度は標識後 10 分から 1 時間以

内の範囲で95%以上であった。

3. シンチグラフィ

0.1-0.2 ml (37-74MBq) の^{99m}Tc-HL91 を標識後10分以上、1時間以内にマウスに尾静注し、3時間後にペントバルビタール (50mg/kg) をマウスの腹腔内に投与して麻酔し、ガンマカメラ (東芝 GCA901A) にてマウスの全身プラナ像 (256×256) を10分間収集した。照射実験のシンチグラムの撮像は照射前、照射4日後、8日後、3週または4週間後の実験最終日に行った。

4. 腫瘍の酸素分圧の測定

プローブは関電極と不関電極とが一体となりチューブ内に封入されたカテーテルタイプのクラーク型電極 (MT 技研製ニードル型 MPO-100 ; 0.2 mm 径, 100 mm 長) を使用した。プローブを20℃の生理食塩水にて150 mmHg に標準化した後、麻酔をかけたマウスの体温が下がらないように注意しながら、プローブを腫瘍内3-7 mm の深さに刺入して測定した。刺入は一腫瘍につき2回までとし、一度刺した部位には再度刺さないようにした。対側大腿の筋肉の酸素分圧も同様に測定し、腫瘍の酸素分圧との比を求めた。

5. 腫瘍組織内^{99m}Tc-HL91 の分布

^{99m}Tc-HL91 を担癌マウスに尾静注して一定時間後に心臓から脱血し犠死させ、摘出した腫瘍の一部をドライアイスにて-70℃に冷却したアセトン内で直ちに凍結し、-20℃に保ったクライオスタットにて10 μm 程度の薄切切片を作成した。切片をオートラジオグラフィ用フィルム (Kodak Scientific Imaging Film X-OMAT AR) に2日間曝露した後、現像した。同一切片をHE染色して顕微鏡にて組織像を観察した。

6. 放射線照射

マウスをペントバルビタールの腹腔内麻酔下に固定器具に固定し、腫瘍を移植した大腿のみに4MV リナック X 線 (三菱 ML6M) を線量率 150c Gy/min にて照射した。腫瘍への線量が一定となるように、照射する下肢上に5 mm 厚の水等価物質 (フローテーション・ベット・パット, サクラ医療器) をボラスとして載せた。各腫瘍について2匹から4匹のマウスに10 Gy, 15 Gy または20 Gy の1回照射を行い、照射前後2, 3日ごとに照射群と非照射群 (照射をしていない対照群) のマウスについて3方向の腫瘍径 L, W, H を測定して、腫瘍の成育を観測した。腫瘍を楕円体と仮定し、その体

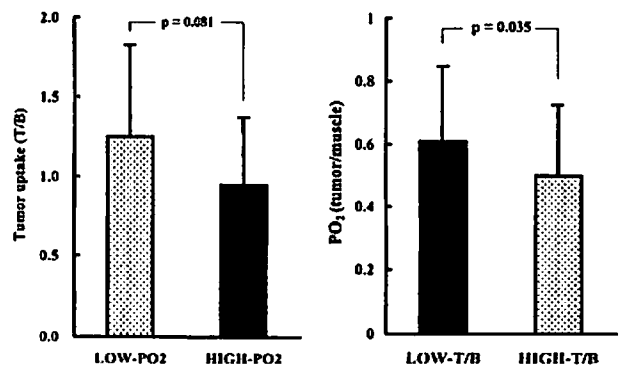
積は $(4/3)\pi(L/2)(W/2)(H/2) \approx LWH/2$ として求めた^{21, 22)}。照射実験における^{99m}Tc-HL91 の取り込みは、シンチグラムより腫瘍、対側大腿の筋肉、全身に関心領域 region of interest (ROI) を設定し測定した。シンチグラムから求めた腫瘍の取り込みは対全身 (%) で表した。観測は照射後2~4週間に行い、その実験最終日に犠死させ血液、筋肉、腫瘍を摘出し、その重量と放射能を測定した。血液、筋肉、腫瘍への取り込み量 (% injection dose/g, 以下%ID/g と記載) を求め、血液との比 (Tumor-to-blood, 以下 T/B と記載) を算出した。

結 果

1. 腫瘍への取り込みと酸素分圧の関係

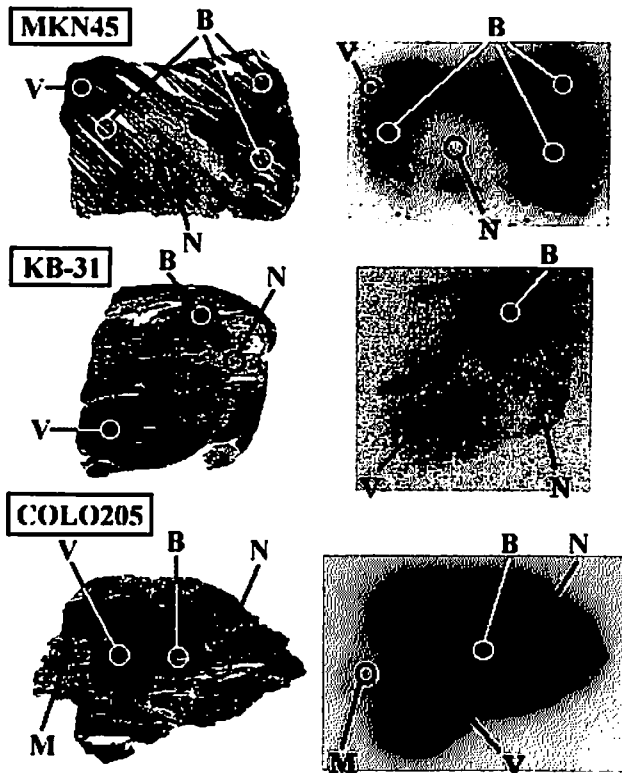
1) 腫瘍の酸素分圧と^{99m}Tc-HL91 取り込み量の関係

腫瘍内部の酸素分圧を測定した後、腫瘍を細分割して各々への^{99m}Tc-HL91 の取り込みを腫瘍対血液比 (T/B) で求めた。前記5種類のヒト腫瘍を用い、計21腫瘍片に関して計算した。第1図に示すように酸素分圧 (対筋肉比) が0.55未満の腫瘍は^{99m}Tc-HL91 の取り込みが T/B=1.25±0.44 と高く、酸素分圧が0.55以上の腫瘍は^{99m}Tc-HL91 の取り込みが0.95±0.31 と低い傾向 (P=0.081) があった。また^{99m}Tc-HL91 の取り込み (T/B) が1.0以上の腫瘍の酸素分圧 (対筋肉比) は0.50±0.19 と低く、取り込みが1.0未満の腫瘍は酸素分圧が0.61±0.20 と高かった (P=0.035)。



第1図 ^{99m}Tc-HL91 の腫瘍への取り込み (腫瘍対血液比) および酸素状態 (腫瘍対筋肉比)。

LOW-PO2: 酸素分圧 < 0.55, HIGH-PO2: 酸素分圧 ≥ 0.55, LOW-T/B: 腫瘍への取り込み < 1.0, HIGH-T/B: 腫瘍への取り込み ≥ 1.0, 平均値 ± 標準誤差で示した。(鈴木天之内, 他: 核医学, 38: 333-341, 2001 の第5図を許可を得て改変し転載)



第2図 腫瘍切片のHE染色およびオートラジオグラム。
 N：壊死部，V：viable部，B：境界領域，M：筋肉。
 (鈴木天彦，他：核医学，38：333-341，2001の第9図を許可を得て改変し転載)

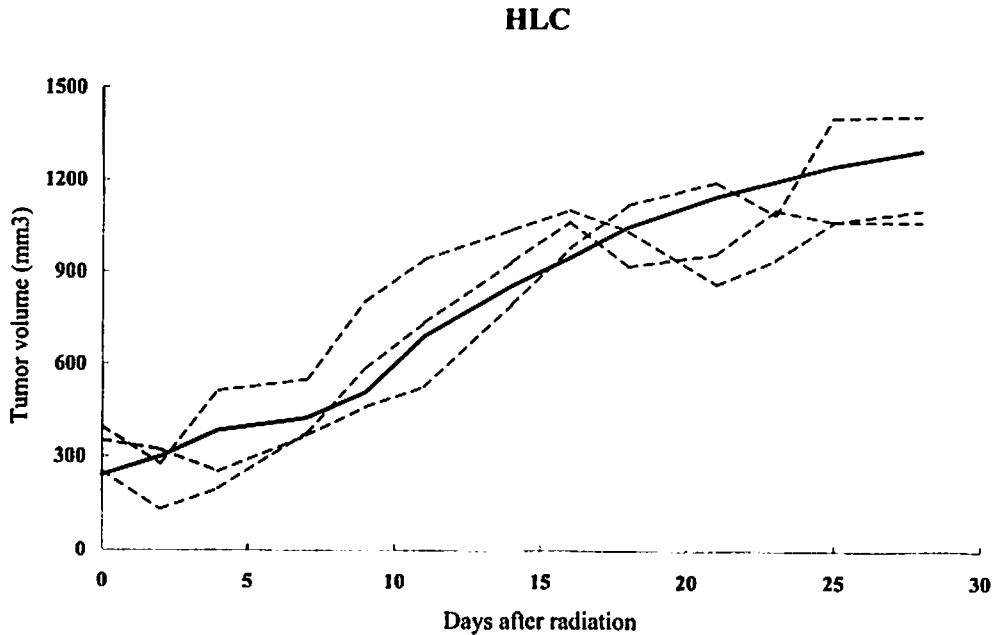
2) オートラジオグラフィ所見

各腫瘍についてオートラジオグラフィとHE染色した病理標本を比較検討した。病理標本にて、明瞭に紫色に濃染した核を有する細胞の密集する部分を“viable”，核構造を欠き細胞密度が疎で薄い赤紫色に染まった部分を壊死とし、さらにその境界領域の三つの部分に分けて^{99m}Tc-HL91の集積を評価した。代表的な病理標本とオートラジオグラムを第2図に示す。いずれの腫瘍においても壊死部(N)とviable部(V)の^{99m}Tc-HL91集積は低く、その境界領域(B)への集積が高いことが認められた。COLO205やHEP2の標本の一部に含まれていた筋肉(M)には^{99m}Tc-HL91の集積がほとんど認められなかった。

2. 放射線照射の影響

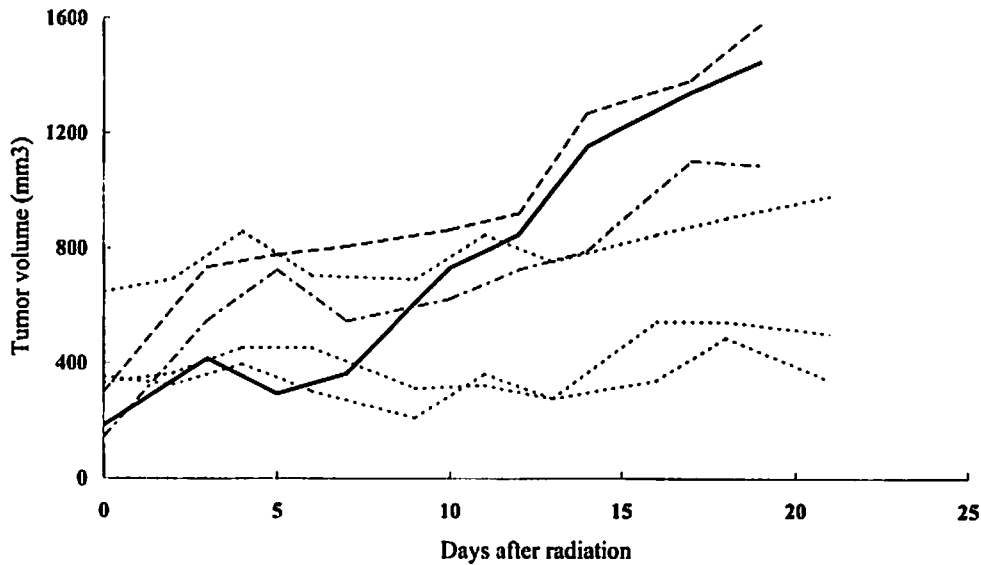
1) 肺腺癌 HLC

第3図に肺腺癌 HLC の成育曲線を示す。腫瘍に 10 Gy 照射したが、いずれのマウスも非照射のコントロール群と同様に腫瘍が増大し、肺腺癌 HLC は放射線にほとんど反応しなかった。照射して 28 日後の^{99m}Tc-HL91の腫瘍への取り込み(T/B)は照射群では 1.7~1.9 であり、非照射群のそれ、平均 1.7 との間に有意な差がなかった。また、シンチグラムの腫瘍に ROI を設定して



第3図 肺腺癌 HLC の成育曲線。
 -----：10Gy 照射腫瘍群，———：非照射腫瘍群の典型例。(Suzuki T et al：Ann Nucl Med 17：131-138，2003のFig 1を許可を得て改変し転載)

MKN45



第4図 胃癌 MKN45 の成育曲線。

----- : 15Gy 照射腫瘍 A 群, ——— : B 群, - - - - - : 20 Gy 照射腫瘍群, — · — · — : 非照射腫瘍群の典型例。(Suzuki T et al : Ann Nucl Med 17 : 131-138, 2003 の Fig 5, Fig 7 を許可を得て改変し転載)

求めた取り込み(対全身%)は、照射前(測定初日)と28日後で、照射群は1.1%、1.2%、1.3%から各々3.3%、3.7%、8.0%へ、非照射群は1.1%から5.9%へ、いずれも増加した。すなわち、非照射群では、初日と比較して28日後の取り込みは約5倍増加した。一方、照射群でも、照射前と比較して照射後には3~6倍に増加した。

2) 胃癌 MKN45

第4図に胃癌 MKN45 の成育曲線を示す。MKN45 に 15 Gy の放射線照射を行ったところ、非照射のコントロール群と同様の成育を示すマウス群 MKN45-A と、照射後に成育抑制の認められたマウス群 MKN45-B とに分かれた。測定を開始して19日目の非照射群の^{99m}Tc-HL91 取り込み(T/B)は平均0.95で、照射して19日後のA群、B群の取り込み平均はそれぞれ、0.82、0.68であった。すなわち、成育抑制を示さなかったA群の取り込みは非照射群と有意差が認められず、成育抑制を示したB群の取り込みは非照射群よりも有意に低かった。シンチグラムから求めた腫瘍への取り込み(対全身%)は、照射前(測定初日)と照射19日後で、A群では3.1%から4.3%へ増加、B群では2.6%から2.0%へ減少、非照射群では0.8%から3.7%へ大きく増加

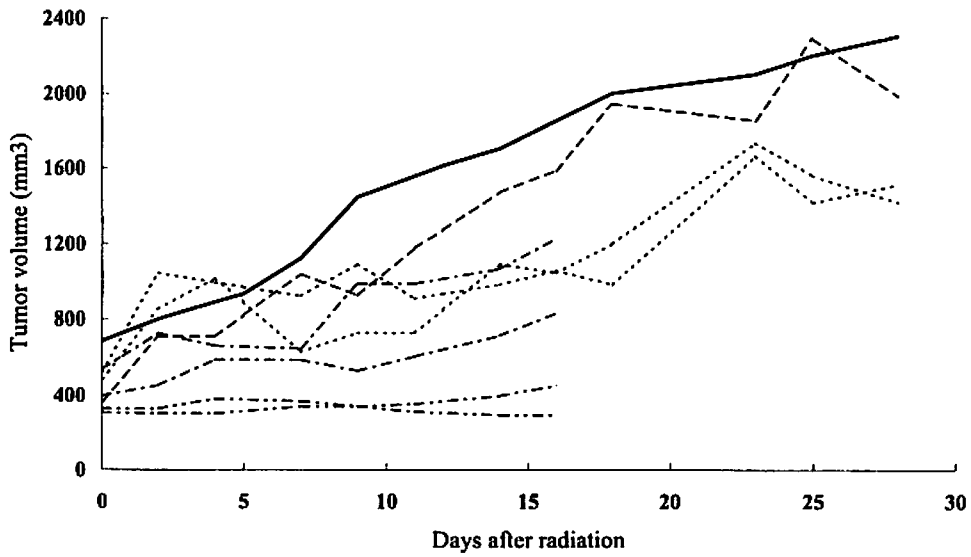
した。

照射線量が20 Gy のときは、全ての腫瘍の成育が抑制された。腫瘍への取り込み(対全身%)は、照射前と照射21日後で、0.7%、1.6%、0.5%から各々1.1%、2.3%、1.5%へと1.4~3.0倍に増加したが、非照射のコントロール群のそれ(19日間で4.6倍)よりは小さかった。

3) 類上皮癌 KB-31

第5-1図に比較的大きい(300-600 mm³)類上皮癌 KB-31 の成育曲線を示す。10 Gy の照射を行ったところ、成育抑制がほとんど認められなかったマウス群 KB-31-A と、照射後に成育が遅滞したマウス群 KB-31-B とに分かれた。測定を開始して28日目の非照射群の^{99m}Tc-HL91 取り込み(T/B)は平均1.7で、照射群のA、Bともに0.4~0.7であり、非照射群よりも有意に低かった。腫瘍への取り込み(対全身%)は、照射前(測定初日)と28日後で、A群では1.7%から2.7%へ増加(1.6倍)、B群では7.3%、1.5%から各々3.6%、1.2%へ減少(0.5~0.8倍)、非照射群では2.0%から3.0%へ増加した。例えばA群マウスの照射前の腫瘍への取り込みは1.7%で、B群のそれは7.3%であり、照射前の取り込みと放射線照射の効果との間には相関が認

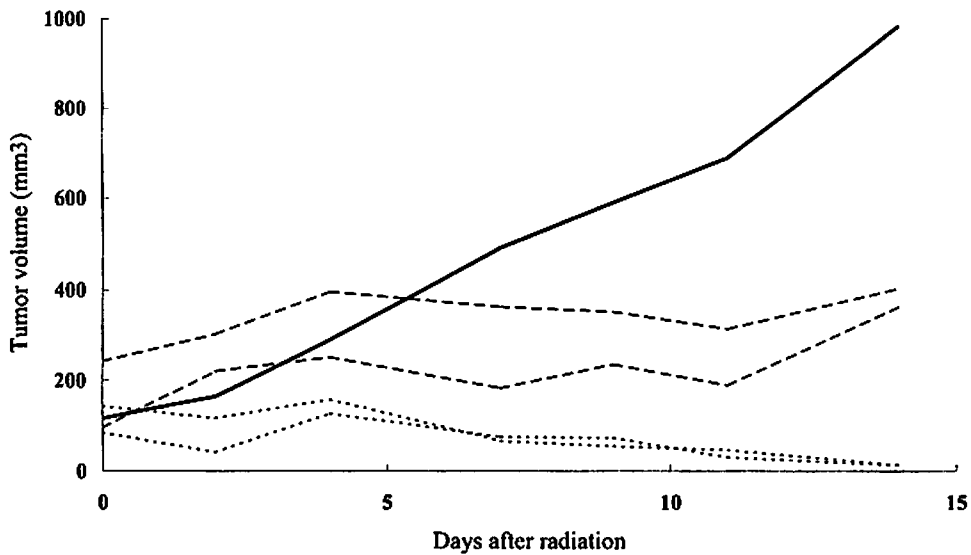
KB-31 (large tumors)



第5-1図 類上皮癌 KB-31 (300-600 mm³) の成育曲線。

----- : 10Gy 照射腫瘍 A 群, : B 群, -.-.- : 20Gy 照射腫瘍 C 群, - - - : D 群,
 ——— : 非照射腫瘍群の典型例。(Suzuki T et al : Ann Nucl Med 17 : 131-138, 2003 の Fig 3, Fig 9 を許可を得て改変し転載)

KB-31 (small tumors)



第5-2図 類上皮癌 KB-31 (100-200 mm³) の成育曲線。

----- : 20Gy 照射腫瘍 E 群, : F 群, ——— : 非照射腫瘍群の典型例。(Suzuki T et al : Ann Nucl Med 17 : 131-138, 2003 の Fig 10 を許可を得て改変し転載)

められなかった。

照射線量を 20 Gy に増加すると、すべてのマウスで腫瘍の成育抑制が認められたが、その程度はマウスごとに異なっていた。照射をしないコントロール群の腫瘍は 16 日間で体積が約 5.3 倍に増加し、^{99m}Tc-HL91 の取り込み (対全身%) も 16 日間で 1.7% から 3.6% へ増加した。照射後の体積の増加が平均で 2.2 倍であった『成育抑制の程度が小さい群』KB-31-C では HL91 取り込み (対全身%) は、照射前、照射 4 日後、8 日後、16 日後で、{3.7%, 2.2%, 2.8%, 3.3%}, {2.7%, 2.3%, 3.0%, 4.2%} といったん減少した後に増加した。16 日目の取り込みは照射前の 0.9~1.5 倍となり、照射前と比較して有意な低下が認められなかった。一方、照射によって腫瘍体積の変化が平均 1.3 倍であった『成育抑制の程度が大きい群』KB-31-D では、^{99m}Tc-HL91 取り込み (対全身%) は照射後 16 日間増加する腫瘍はなく ({3.3%, 1.9%, 1.8%, 1.9%}, {3.4%, 2.4%, 2.1%, 1.7%})、16 日目には平均 0.5 倍に低下していた。

第 5 - 2 図に比較的小さい (100-200mm³) 類上皮癌 KB-31 の成育曲線を示す。非照射のコントロール群では、14 日間で腫瘍体積は平均 8.5 倍に増大した。腫瘍への^{99m}Tc-HL91 取り込み (対全身%) は、測定初日と 4 日後、8 日後、14 日後で、1.2%, 2.6%, 2.7%, 3.9% と次第に増加し、14 日間で約 3.3 倍となった。20 Gy の照射を行ったところ、すべてのマウスで腫瘍の成育抑制が認められたが、その程度はマウスごとに異なっていた。照射によって体積の増加が平均で 2.8 倍であった『成育抑制の程度が小さい群』KB-31-E では^{99m}Tc-HL91 取り込み (対全身%) は、照射前と 4 日後、8 日後、14 日後で、{3.1%, 2.5%, 3.4%, 5.3%}, {1.4%, 1.4%, 1.5%, 1.9%} と推移し、14 日目には平均 1.5 倍に増加した。一方、照射によって容積の変化が平均 0.12 倍であった『成育抑制の程度が顕著な群』KB-31-F では、^{99m}Tc-HL91 取り込み (対全身%) は照射して 14 日間低下し続け ({2.3%, 2.0%, 1.6%, 1.0%}, {2.2%, 1.4%, 1.2%, 1.0%})、14 日目には平均 0.4 倍であった。また、F 群の腫瘍組織の病理所見は壊死がほとんどを占めていた。

考 察

1. ^{99m}Tc-HL91 の特性

酸素分圧は酸素プローブを用いて電気化学的に直接測定した値を標準値としている。本研究では、この測定値と^{99m}Tc-HL91 の取り込みとの関係を明らかにしようと

した。しかし、滲出液に富んだ腫瘍ではプローブ挿入位置の少しのずれで測定値が変動し、プローブで測定した部位と^{99m}Tc-HL91 集積部位とを一对一で対応させることは困難であった。また、一般的に低酸素分圧とされている値より高い場合でも、^{99m}Tc-HL91 が集積することも認められた。しかし、今回検討した実験腫瘍では、プローブで測定した酸素分圧値 (対筋肉比) の低い腫瘍は^{99m}Tc-HL91 の取り込みが大きく、酸素分圧値の高い腫瘍の取り込みは小さいこと、逆に取り込みの高い腫瘍は全体的に酸素分圧値が低く、取り込みの低い腫瘍は酸素分圧値が高いことが示された。これらの結果から、^{99m}Tc-HL91 は全体的にみて、酸素分圧がより低い腫瘍に集積する性質があると判断した。

オートラジオグラフィと病理組織像との比較から、壊死部と viable 部への^{99m}Tc-HL91 の集積は低く、その境界領域の集積が高いことを観察した。Horsman によると、このような境界領域は viable な組織と壊死組織が混在し細胞密度がその中間程度であり、炎症細胞の浸潤がみられ、viable な部分よりは酸素分圧が低下していると報告されている²³⁾。したがって、^{99m}Tc-HL91 が集積する部位は酸素分圧のより低い領域であると判断した。

低酸素細胞のイメージング製剤は投与した後、血流不足のために酸素分圧が低い領域に運ばれる必要がある²⁴⁾。^{99m}Tc-HL91 は投与後比較的早く腫瘍に取り込まれ、血中から速やかに消失することをわれわれがすでに証明した¹⁹⁾。腫瘍と血液との取り込み比は投与後 30 分後に平均 1.21 となり、この値はこれまでに開発されている低酸素イメージング製剤の^{99m}Tc-BMS181321²⁵⁾ や^{99m}Tc-BRU59-21²⁶⁾ のいずれよりも高く、^{99m}Tc-HL91 が優れた低酸素イメージング製剤であることを示していた。また、腫瘍対筋肉比が投与 3 時間後に平均 4.18 に達して、その後も変化しなかったことから、イメージングは投与 4 時間後に行った。

2. 放射線照射の治療効果と^{99m}Tc-HL91 取り込み

今回検討した実験腫瘍への^{99m}Tc-HL91 取り込みは同種の腫瘍であっても、マウス間のばらつきが大きく、取り込みの値そのものから放射線治療の効果をあらかじめ予測することは困難であった。しかし、照射後^{99m}Tc-HL91 の集積を経日的に追跡し、腫瘍の成育状況を併せて検討したところ、放射線に反応し成育の抑制が認められた腫瘍は、非照射の腫瘍や成育抑制を示さなかった照射腫瘍よりも^{99m}Tc-HL91 の取り込みが低かった。放射線照射後、放射線に反応する腫瘍組織は壊死に陥り、

^{99m}Tc -HL91 の取り込みが低くなったためと考えられる。他方、放射線に反応しない腫瘍は照射後も腫瘍が成育し続け、大きくなった腫瘍組織は血流が充分に行きわたらない部分＝低酸素領域が増したと考えられる。

さらに、数回のイメージングで ^{99m}Tc -HL91 の集積が照射後も増加し続けた腫瘍では、腫瘍の成育抑制が認められなかった。また、集積が減少し続けた腫瘍では、腫瘍の増大は認められず、最終的にほとんど完治した。経日的に観察した ^{99m}Tc -HL91 の取り込みがわずかながら低下した、または変化しなかった腫瘍では、成育の一時抑制や遅延が認められたが、その後取り込みが再び増加した場合には、腫瘍は再度増殖を続けた。 ^{99m}Tc -HL91 の集積が照射後も変化しない、または一度低下した後に再び増加する現象は、照射後一部が放射線に反応して壊死領域となり、一部が放射線照射により低酸素腫瘍細胞になり、 ^{99m}Tc -HL91 の集積増減が相殺され、照射前と比較して取り込みの変化が小さかったと考えられる。さらに、この低酸素腫瘍細胞はその後も増殖を続けたために、再び ^{99m}Tc -HL91 の集積値が大きくなったと考える。以上の結果より放射線感受性を評価するには取り込みの値そのものよりも、照射前後での取り込みの変化を逐次把握することが肝要と考えられた。

今回の検討から放射線治療と ^{99m}Tc -HL91 による核医学イメージングを組み合わせた臨床プロトコルを以下のように考えている。照射前および照射後数日おきに腫瘍部分のイメージングを行い、 ^{99m}Tc -HL91 の集積を測定して、①腫瘍の縮小が認められず、 ^{99m}Tc -HL91 の取り込みが増加し続ける場合は、腫瘍が大きくなり血流が不十分な領域が増加すること、または照射によって低酸素となった腫瘍細胞が増殖し続けることと判断し、再度の放射線照射には一考を要する。②腫瘍の縮小が認められ、 ^{99m}Tc -HL91 の取り込みが低下し続ける場合は、腫瘍組織に壊死部が増加し、腫瘍細胞は死滅していると判断し、経過観察を行うか、または放射線治療効果のある腫瘍と判断して、再度の放射線照射を考慮する。③腫瘍の増大が認められず、 ^{99m}Tc -HL91 の取り込みにも変化がない場合は、さらに ^{99m}Tc -HL91 イメージングを繰り返す行い、その増減の程度から、放射線治療の効果判定、再照射などの治療管理を決定する。

以前のわれわれの実験¹⁹⁾の結果では、 ^{99m}Tc -HL91 は正常肺への生理的集積がほとんどなかったので、このプロトコルは肺癌の放射線治療管理計画を立てる場合に特に有用であると思う。また身体の表面近くに存在する頭頸部癌などは描出が容易であり、 ^{99m}Tc -HL91 イメージングの有効な適応症例と考える。さらに、低酸素領域

を ^{99m}Tc -HL91 イメージングで照射前に同定することができれば、強度変調照射法 (intensity-modulated radiation therapy ; IMRT)²⁷⁾によって正常組織を選択的に避け、腫瘍内の放射線抵抗性と考えられる領域により多くの線量を照射することも可能となる。

以上、 ^{99m}Tc -HL91 を用いた核医学的検査により腫瘍の低酸素の状態を非侵襲的に評価することができ、腫瘍への ^{99m}Tc -HL91 の取り込みを経時的に追うことで、放射線照射に対する反応性を非侵襲的に評価しうる可能性をわれわれの実験ではじめて示唆した。さらに放射線抵抗性の腫瘍に対してもその体積増大の程度と ^{99m}Tc -HL91 の取り込み増加の程度との関係を検討することで、放射線治療の継続や変更などの照射計画を立てるに際して臨床的に有用と考えられた。

結 論

担癌ヌードマウスを用いて、 ^{99m}Tc -HL91 の腫瘍への取り込みと酸素分圧の関係および放射線治療反応性予測の可否について検討し、以下の結論を得た。

1. ^{99m}Tc -HL91 が集積する組織・細胞はそこが、低酸素状態であることを反映していた。

2. 放射線照射前と比較して、照射後に集積が増加した腫瘍は照射の効果が不良で、腫瘍が成育し続けた、または照射により低酸素細胞が増加し、これが増殖を続けたことが示唆される。したがって、放射線に対する感受性は低いと判断した。

3. 照射後に集積が低下した腫瘍は腫瘍組織が壊死に陥った、または低酸素細胞が減少したことが示唆される。したがって、放射線に対する感受性は高いと判断した。

放射線治療の前と治療中に ^{99m}Tc -HL91 シンチグラフィを逐次行うことにより、放射線治療の効果を非侵襲的に予測しうる可能性を示唆した。本シンチグラフィは再照射や他の治療方法への変更などの治療方針を決定する上でも、有用であると考えられる。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部放射線科学教室久保敦司教授に深甚なる謝意を表します。また直接の御指導をいただきました慶應義塾大学医学部放射線科学教室中村佳代子講師に感謝いたします。また、照射と撮像にご協力いただきました慶應義塾大学病院中央放射線技術室の岩崎隆一郎氏、北川五十雄氏、山下範太郎氏に感謝いたします。

本論文は、鈴木天、中村佳代子、川瀬貴嗣、久保敦司：低酸素イメージング製剤、 ^{99m}Tc -HL91 (4,9-diaza-

3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime) の担癌ヌードマウスにおける生体内分布と腫瘍内分布. 核医学, 38 : 333-341, 2001 の一部, および Suzuki T, Nakamura K, Kawase T, Kubo A : Monitoring of response to radiation therapy for human tumor xenografts using ^{99m}Tc-HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime). Ann Nucl Med 17 : 131-138, 2003 の一部を含む.

本研究の一部は文部科学省科学研究費(11670912, 12877144)補助金によった.

文 献

- 1) Höckel M, Schlenger K, Mitze M, Schaeffer U, Vaupel P : Hypoxia and radiation response in human tumors. Seminars in Radiation Oncology 6 : 3-9, 1996
- 2) Nordsmark M, Overgaard J : A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy. Radiother Oncol 57 : 39-43, 2000
- 3) Choi N, Baumann M, Flentjie M, Kellokumpu-Lehtinen P, Senan S, Zamboglou N, Kosmidis P : Predictive factors in radiotherapy for non-small cell lung cancer : present status. Lung Cancer 31 : 43-56, 2001
- 4) Taussky D, Rousson V, Pescia R : Clinical markers of hypoxia and other predictive factors of survival in conservative therapy of squamous-cell carcinoma of the esophagus. Int J Colorectal Dis 18 : 167-171, 2002
- 5) Knisely JP, Rockwell S : Importance of hypoxia in the biology and treatment of brain tumors. Neuroimaging Clin N Am 12 : 525-536, 2002
- 6) Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA : Concentration of oxygen dissolved in tissues at time of irradiation as a factor in radiotherapy. Br J Radiol 26 : 638-648, 1953
- 7) Moulder JE, Rockwell S : Tumor hypoxia : its impact on cancer therapy. Cancer Metastasis Rev 5 : 313-341, 1987
- 8) Steinberg F, Hildenhausen-Brügemann E, Konerding MA : Oxygen electrode injury in tumour tissue. Tumor Oxygenation. (Ed) Vaupel PW, Kelleher DK, Günderoth M, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 185-193, 1995
- 9) Chapman JD : Measurement of tumor hypoxia by invasive and non-invasive procedures : a review of recent clinical studies. Radiother Oncol 20 : 13-19, 1991
- 10) Wilson DF, Vinogradov SA, Dugan BW, Biruski D, Waldron L, Evans SA : Measurement of tumor oxygenation using new frequency domain phosphorimeters. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 132 : 153-159, 2002
- 11) Urtasun R, Band P, Chapman JD, Feldstein ML, Mielke B, Fryer C : Radiation and high-dose metronidazole in supratentorial glioblastomas. N Engl J Med 294 : 1364-1367, 1976
- 12) Overgaard J, Hansen HS, Andersen AP, Hjelm-Hansen M, Jorgensen K, Sandberg E, Berthelsen A, Hammer R, Pedersen M : Misonidazole combined with split-course radiotherapy in the treatment of invasive carcinoma of larynx and pharynx : report from the DAHANCA 2 study. Int J Radiat Oncol Biol Phys 16 : 1065-1068, 1989
- 13) Chapman JD : Hypoxic sensitizers : implications for radiation therapy. N Engl J Med 301 : 1429-1432, 1979
- 14) Archer CM, Edwards B, Kelly JD, Kelly AC, King AC, Burke JF : Technetium labelled agents for imaging tissue hypoxia *in vivo*. Proceedings of the fourth international symposium on technetium in chemistry and nuclear medicine 535-539, 1995
- 15) Cook GJR, Barrington S, Houston S, Maisey MN, Fogelman I : HL91, a new Tc-99m-labelled agent with potential for identifying tumour hypoxia : correlation with FDG PET. J Nucl Med 37 : 87-88, 1996
- 16) Zhang X, Melo T, Ballinger JR, Rauth AM : Studies of ^{99m}Tc-BnAO (HL91) : a nonnitroaromatic compound for hypoxic cell detection. Int J Radiat Oncol Biol Phys 42 : 1-4, 1998
- 17) Yutani K, Kusuoka H, Fukuchi K, Tatsumi M, Nishimura T : Applicability of ^{99m}Tc-HL91, a putative hypoxic tracer, to detection of tumor hypoxia. J Nucl Med 40 : 854-61, 1999
- 18) Honess DJ, Hill SA, Collingridge DR, Edwards B, Brauers G, Powell Na, Chaplin DJ : Preclinical evaluation of the novel hypoxic marker ^{99m}Tc-HL91 (Prognox) in murine and xenograft systems *in vivo*. Int J radiat Oncol Biol Phys 42 : 731-5, 1998
- 19) 鈴木天之, 中村佳代子, 川瀬貴嗣, 久保敦司 : 低酸素イメージング製剤, ^{99m}Tc-HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime) の担癌ヌードマウスにおける生体内分布と腫瘍内分布. 核医学, 38 : 333-341, 2001
- 20) Suzuki T, Nakamura K, Kawase T, Kubo A : Monitoring of response to radiation therapy for human tumor xenografts using ^{99m}Tc-HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime). Ann Nucl Med 17 : 131-138, 2003
- 21) Hopkins HA, Ritenour ER, MacLeod MS, Looney WB : The effect of varying the time between irradiation and cyclophosphamide on growth response of hepatoma 3924A. Int J Radiat Oncol Biol Phys 5 : 1455-1459, 1979
- 22) Looney WB, Hopkins HA, Carter WH Jr. : Solid tumor models for the assessment of different treatment modalities : XXIII. A new approach to the more

- effective utilization of radiotherapy alternated with chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11 : 2105-2117, 1985
- 23) Horsman MR : Nicotinamide and other benzamide analogs a agents for overcoming hypoxic cell radiation resistance in tumors. *Acta Oncologica* 34 : 571-587, 1995
- 24) 中村佳代子：新しいイメージング製剤の研究。最新臨床核医学（久田欣一，利波紀久，久保敦司編集）。金原出版，p. 560-569, 1999
- 25) Ballinger JR, Kee JW, Rauth AM : In vitro and *in vivo* evaluation of a technetium-99m-labeled 2-nitroimidazole (BMS181321) as a marker of tumor hypoxia. *J Nucl Med* 37 : 1023-1031, 1996
- 26) Melo T, Duncan J, Ballinger JR, Rauth AM : BRU59-21, a second-generation 99mTc-labeled 2-nitroimidazole for imaging hypoxia in tumors. *J Nucl Med* 41 : 169-176, 2000
- 27) Chao KS, Bosch WR, Mutic S, Lewis JS, Dehdashti F, Mintun MA, Dempsey JF, Perez CA, Purdy JA, Welch MJ : A novel approach to overcome hypoxic tumor resistance : Cu-ATSM-guided intensity modulated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49 : 1171-1182, 2001
-

学位論文

1型糖尿病の発症機序の解明に関する研究
—動物モデルを用いた1型糖尿病におけるIL-18の役割—

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

おい かわ よう いち
及 川 洋 一

(平成16年6月25日受付)

Key Words : type 1 diabetes mellitus, interleukin-18, insulinitis, nonobese diabetic mouse

1型糖尿病は膵β細胞の破壊によるインスリン欠乏を成因とする糖尿病であり¹⁾、インスリン依存状態にある典型例では絶対的インスリン欠乏状態に対して適切なインスリン治療を行わないと著明な高血糖状態やケトアシドーシスなどの代謝失調にいたりしばしば致命的となる。比較的若齢における発症が多いために発症早期の若齢期からインスリン治療に依存した生活を強いられるケースが多く、また糖尿病性腎症、網膜症や神経障害などの合併により患者の quality of life (QOL) が著しく損なわれ精神的な苦痛を伴うこともしばしば見受けられる。現在、強化インスリン療法を基本とした適切な血糖管理や糖尿病合併症への迅速な対応が医療体制の改善とともに普及し、腎症や急性合併症による1型糖尿病患者の死亡は大幅に減少しているが、それでも今なお生命予後は悪い²⁾。したがって1型糖尿病の病態解明ならびにそれに基づく発症予防や疾患の根治が可能な治療法の開発が急務である。

1型糖尿病の病態に関する研究は、この20余年の間に飛躍的な進歩を遂げたが、その大きな要因として1980年に日本で確立された nonobese diabetic (NOD) マウス³⁾の存在が挙げられる。本マウスでは、最も強力な1型糖尿病疾患感受性遺伝子 *Idd1* の候補遺伝子である主要組織適合遺伝子複合体 major histocompatibility complex (MHC) class II 領域の I-A 分子、I-E 分子に特徴がみられるが^{4, 5)}、ヒト1型糖尿病患者においても I-A 分子、I-E 分子にそれぞれ対応する Human Leukocyte Antigen (HLA)-DQ, HLA-DR 領域に疾患特異的な特徴が認められており^{6, 7)}、NOD マウスとヒト1型糖尿病患者との間に遺伝的背景・免疫学的背景にお

ける類似性が認められる。さらに NOD マウスは自然発症モデル動物であることなどから、1型糖尿病における自然経過、特に膵島炎の出現・進展や糖尿病の発症機序などについて研究する上で極めて優れた動物モデルであることが知られている。

この NOD マウスを用いた研究から、1型糖尿病の多くは T helper 1 (Th1) タイプの自己免疫疾患と考えられている^{8, 9)}。NOD マウスでは4週齢頃から樹状細胞やマクロファージが膵島に浸潤しはじめ、続いて膵島周囲を中心に T 細胞の浸潤 (膵島周囲炎) がみられる¹⁰⁻¹³⁾ (本稿では膵島関連の免疫反応とともに膵島炎が出現しはじめる4週齢前後の時期を“膵島炎進展初期段階”と表記する)。その後16週齢頃から主に T 細胞を介した膵β細胞の破壊が始まり (破壊性膵島炎)、顕性糖尿病を発症する¹⁴⁾。膵島炎の出現や進展に直接寄与する自己抗原は現在も明らかではないが、インスリン^{15, 16)}、熱ショック蛋白 (heat shock protein)¹⁷⁻¹⁹⁾、グルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamic acid decarboxylase : GAD)^{20, 21)} などの自己抗原に対する免疫応答が NOD マウスにおいて観察されており、これらの抗原を NOD マウスに免疫することによって糖尿病発症の抑制をみた報告が多くみられる²²⁻²⁹⁾。これまでの報告から、NOD マウスにおける糖尿病の発症には Th1/Th2 バランスの不均衡が関与しているが³⁰⁻³²⁾、実際に Th1/Th2 バランスに直接影響を及ぼすと考えられている CD28/B7 副刺激経路の機能異常、すなわち T 細胞表面上の副刺激分子 CD28 と抗原提示細胞表面上の副刺激分子 B7 との間における相互作用の異常が NOD マウスにおいて報告されており³³⁾、糖尿病発症に寄与する因子の1つと推測されている。

Interleukin-18 (IL-18) は interferon (IFN)- γ 産生を誘導する interferon-gamma-inducing factor (IGIF) として Okamura らによって発見された分子量 18kDa のサイトカインであり、IL-12 と同様、Th1 タイプの免疫応答に関与している³⁴⁾。IL-18 は IL-12 の共存下で活性化マクロファージを介して Th1 反応を惹起し、T 細胞や natural killer (NK) 細胞からの IFN- γ 産生を促進する^{34~36)}。ところが近年、IL-18 は IL-12 の非共存下で T 細胞や NK 細胞から Th2 タイプのサイトカインである IL-13 の産生を誘導することが明らかになった³⁹⁾。更に IL-4、IL-10、IL-5 といった他の Th2 サイトカインや、immunoglobulin (Ig) E および IgG1 の産生にも関与していることが報告され^{40~43)}、現在 IL-18 は IL-12 存在の有無に依存して、Th1 作用と Th2 作用の両面性を持つサイトカインと考えられている⁴⁴⁾。

IL-18 遺伝子は NOD マウスにおける糖尿病の疾患感受性遺伝子の 1 つである *Idd2* の近傍に局在しており⁴⁵⁾、IL-18 は NOD マウスにおいて糖尿病の発症に関係していると考えられている。実際、シクロホスファミド (cyclophosphamide : CY) によって糖尿病発症を誘発させた系では、糖尿病の発症直前に膵局所の IL-12 mRNA の発現が増強するが、それに追隨して IL-18 mRNA の発現も経時的に増強する⁴⁶⁾。しかしながら、CY による糖尿病発症誘発モデルさらには自然発症の系において、10 週齢以降に IL-18 を NOD マウスに連日投与すると糖尿病発症が強力に抑制される^{47, 48)}。このように IL-18 と糖尿病発症との関係は報告によって大きく異なり、IL-18 の投与時期や投与方法、投与量などがこれらの違いに大きく寄与している可能性がある。

一方、自然経過における膵島炎の出現・進展と外因性 IL-18 との関係はこれまで報告されていない。実際に若齢から数週にわたって IL-18 を生体に投与することは動物への侵襲も強く、コストもかかり現実的ではないためと考えられる。近年、Aihara らによって、遺伝子発現プラスミド DNA の筋肉内注射 (筋注) 法に *in vivo* electroporation (電気穿孔法) を併用した画期的な遺伝子導入法が開発された⁴⁹⁾。本法は 1 回のプラスミド DNA 筋注に電気刺激を組み合わせることにより、極めて効率よく目的の遺伝子が長期間にわたって筋注部位で発現され、発現蛋白が全身性に高濃度に供給される有用な遺伝子導入システムである。本研究ではマウス IL-18 発現プラスミド DNA を用いて若週齢の NOD マウスに IL-18 を全身性に投与し、IL-18 が膵島炎の進展や糖尿病発症にどのような影響を与えるか検討した。

対象と方法

1. 動物

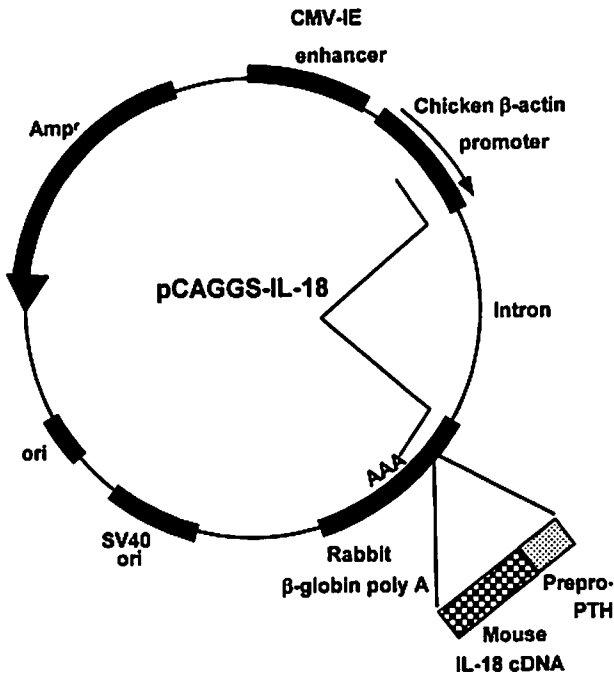
4 週齢の雌性 NOD マウスを日本クレア (東京) より購入し、動物室にて特定病原体非感染 (specific pathogen-free : SPF) 環境下にて飼育した。本実験は、慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号 : 012039)。飼育及び実験処置にあたっては、慶應義塾大学実験動物取扱マニュアルに準拠した。8 週齢より週 1 回の割合でテストテープ (Eli Lilly 社, 米国) を用いて尿糖を定性的に確認した。尿糖陽性時にグルテストエース (三和化学, 東京) を用いて血糖値を測定し、血糖値 250 mg/dl 以上時に糖尿病と判定した。用いた NOD マウスの最終糖尿病発症率は 40 週齢の時点で約 70%であった。

2. IL-18 発現ベクターの作成・精製

本研究では、哺乳類細胞で強い発現力を呈する CAG プロモーターを組み合わせた発現プラスミド pCAGGS (サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリ β -アクチンプロモーターを結合し、さらにウサギ β -グロビン遺伝子のポリ A シグナルを結合したもの : 第 1 図) を発現ベクターとして利用した。マウス成熟型 IL-18 cDNA を pCAGGS の CAG プロモーターとウサギ β -グロビン遺伝子のポリ A シグナルとの間に存在する EcoRI 部位に組み込んで IL-18 発現ベクター (pCAGGS-IL-18) を作成した (第 1 図)。IL-18 cDNA には IL-18 の細胞外分泌に必要なシグナルペプチドが存在しないため、その代用としてヒト prepro PTH 遺伝子のリーダーシーケンスを成熟型マウス IL-18 cDNA の上流にあらかじめ組み込んでおき、IL-18 の細胞外分泌の効率上昇を図った⁵⁰⁾。作成した発現ベクターは *Escherichia coli* (BH10B) を用いて増やしたあと、プラスミド精製カラム (Qiagen 社, ドイツ) を用いて精製し、さらに塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にて精製を繰り返した。

3. 発現ベクター筋肉内注射法および *in vivo* electroporation (電気穿孔法)

4 週齢の NOD マウスをベントバルビタールで麻酔し、50 μ g の pCAGGS-IL-18 を両側の前脛骨筋に 27 ゲージ針を用いて計 100 μ g 筋注した後、同部位に電気刺激パルス (*in vivo* electroporation : 電気穿孔法) を加えた。すなわち、DNA 筋注部位を挟むように 2 本の電極針を筋肉内に刺入し、電気刺激パルスを加えた。至適条



第1図 pCAGGS-IL-18の構造。マウス成熟型IL-18 cDNAをpCAGGSのCAGプロモーターとウサギβ-グロビン遺伝子のポリAシグナルとの間に存在するEcoRI部位に組み込んでIL-18発現ベクターを作成した。IL-18 cDNAにはIL-18の細胞外分泌に必要なシグナルペプチドが存在しないため、その代用としてヒトprepro PTH遺伝子のリーダーシーケンスを成熟型マウスIL-18 cDNAの上流にあらかじめ組み込んでおき、IL-18の細胞外分泌の効率上昇を図った。(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig1を許可を得て転載)

件として1パルスあたり100Vで持続時間を50ミリ秒とし、1秒ごとに計6回の電気刺激パルスを加えた⁴⁹⁾。同様な方法でコントロール群には空ベクターであるpCAGGSを筋注し *in vivo* electroporation を施行した。pCAGGS-IL-18 および pCAGGS 投与の両群とも、同一の操作を6週齢時に繰り返し行った。

4. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射部位におけるIL-18 mRNA 発現の確認

pCAGGS-IL-18 または pCAGGS 筋注後2日目に局所の筋肉を採取し、液体窒素で凍結後RNAの抽出まで-80℃で保存した。RNAの抽出は酸性グアニジンチオシアネート-フェノール/クロロホルム法 (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform: AGPC) 法で行った。すなわち、グアニジンチオシアネート (guanidinium thiocyanate: GTC) 溶液中で組織をホモジナイズし、

RNaseを失活させ、細胞のタンパク質を可溶化した。続いて液性を酸性に保ちながらフェノール/クロロホルム処理を行い、水層 (GTC層) に分離したRNAをアルコールで塩析し抽出した。次に、アデニン (A) の連続配列であるポリAシグナルを有するmRNAの性質を利用して、オリゴdTプライマーを用いた逆転写反応にてcDNAを作成した。最後に、得られたcDNAを鋳型としてTaq polymerase (Takara社、大津)にてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行った。IL-18 および hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT: 内部標準として使用) に対するPCR用プライマーはIL-18 5'プライマー: 5'-TCT GAC TGA CCG CGT TAC TC-3', IL-18 3'プライマー: 5'-CTG CGG TTG TAC AGT GAA GT-3', HPRT 5'プライマー: 5'-CTC GAA GTG TTG GAT ACA GG-3', HPRT 3'プライマー: 5'-TGG CCT ATA GGC TCA TAG TG-3'であった。設計したプライマーはゲノム上のイントロン配列を挟む形で、連続する2つのエクソン上に設計されており、目的のPCR産物と混在したゲノムDNA由来の産物との区別が電気泳動上可能となっている。PCR反応は94℃×2分の熱変性処理後、94℃×15秒 (熱変性)→55℃×15秒 (アニーリング)→72℃×30秒 (伸長反応)を1サイクルとして30サイクル施行し、最後に72℃×10分間の伸長反応を行った。PCR産物は2%アガロースゲルを用いて電気泳動法により分離し、エチジウムブロマイド液に浸した後、トランスイルミネーター上で紫外線を照射して各種遺伝子発現の有無を検討した。

5. 組織学的検討

採取した膵臓は10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。100 μm以上の間隔をあけた非連続切片にてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作成し、膵島炎の程度 (膵島への炎症細胞浸潤) を以下のようにスコア化し、各膵臓における膵島炎スコアの平均値を算出した。なお、1膵臓あたり25個以上の膵島を観察した。

- grade 0: 炎症細胞浸潤を膵島に認めない。
- grade 1: 炎症細胞浸潤領域が膵島面積の25%未満。
- grade 2: 炎症細胞浸潤領域が膵島面積の25%以上50%未満。
- grade 3: 炎症細胞浸潤領域が膵島面積の50%以上75%未満。
- grade 4: 炎症細胞浸潤領域が膵島面積の75%以上または退縮した膵島炎。

6. ポリクローナルなリンパ球刺激によるサイトカイン反応の検討

各マウスより採取した脾臓および脾局所リンパ節をナイロン・メッシュ (Becton Dickinson 社, 米国) にて無菌的に細胞分散し, エチレンジアミンテトラ酢酸ナトリウム (2Na-EDTA) 0.045 g, 塩化アンモニウム (NH₄Cl) 8.34 g, 重炭酸ナトリウム (NaHCO₃) 1.0 g を 1000 ml の水に溶解して作成した液を用いて赤血球を溶血させた後に, ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 10% 仔牛胎児血清 (fetal calf serum: FCS) (JRH Bioscience 社, 米国) を含む RPMI1640 (GibcoBRL 社, 米国) (以下 10%FCS-RPMI1640) に浮遊させた。この細胞浮遊液を 5×10^6 個/ml に調整し 96 穴 U 底マイクロプレート (Cornig 社, 米国) の各ウェルに 200 μ l ずつ加えた後, 最終濃度が 5 μ g/ml になるように抗 CD3 抗体 (145-2C11, Pharmingen 社, 米国) を添加し, リンパ球にポリクローナルな刺激を加えた。コントロールのウェルには何も加えなかった。5%CO₂・37°C の条件下で 72 時間培養した後上清を回収し, サイトカイン濃度測定まで -80°C にて凍結保存した。

7. ELISA 法によるサイトカインの測定

サイトカイン (IFN- γ , IL-4) の定量は Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法によって測定した⁵¹⁾。すなわち, 96 穴平底マイクロプレート (Cornig 社, 米国) の各ウェルを抗 IFN- γ 抗体 (XMG1.2, Pharmingen 社) または抗 IL-4 抗体 (BVD4-1D11, Pharmingen 社) でコーティングし, 4°C で 48 時間静置した。続いて, 上清あるいは標準溶液 (組換えマウス IFN- γ , 同 IL-4, 以上 Pharmingen 社) を各ウェルに加え 2 時間室温に静置した。0.1% Tween20 (BioRad 社, 米国) を加えたリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) (以下 0.1% Tween20-PBS) で洗浄後, ビオチン化抗マウス IFN- γ 抗体 (XMG1.3, Pharmingen 社) あるいはビオチン化抗マウス IL-4 抗体 (BVD6-24G2, Pharmingen 社) を加え, さらに 1 時間室温で静置した。続いて 0.1% Tween20-PBS で洗浄したのち, AB 溶液 (Vector Laboratories 社, 米国) を加え 30 分間静置した。最後に発色試薬 2, 2'-azinobis-3-ethylbenz-thiazolinesulfonic acid (ABTS, Sigma 社, 米国) を加え, ELISA リーダー (BioRad 社, 米国) にて吸光度 (A₄₀₅) を測定して各サイトカインを検出した。サイトカイン濃度は, 標準溶液を利用して作成した標準曲線から算出した (検出感度: 20 pg/

ml)。本法の日差再現性試験および同時再現性試験における変動係数 (coefficient of variation 値: C.V. 値) は, それぞれ 3% および 4% であった。マウス血清 IL-18 濃度も同様な方法で測定した。すなわち, 抗マウス IL-18 モノクローナル抗体 (clone74, MBL 社, 名古屋) をコーティングした 96 穴マイクロプレートのウェルに血清を添加し, 抗原-抗体反応させた。洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗マウス IL-18 モノクローナル抗体 (clone93-10c, MBL 社) を添加して反応させ, 抗体-抗原-標識抗体の複合物を形成させた。洗浄後, テトラメチルベンチジンと過酸化水素の溶解液を基質溶液として添加し, ペルオキシダーゼにより発色させ, 吸光度 (A₄₅₀) を測定してマウス IL-18 を検出した。日差再現性試験および同時再現性試験における C.V. 値は, それぞれ 6% および 4% であり, 検出感度は 12.5 pg/ml であった。

8. 各種サイトカイン, IP-10/CXCL10 および CD86 mRNA の定量的リアルタイム PCR 分析

各マウスごとに脾臓, 脾局所リンパ節および脾臓から AGPC 法にて RNA を抽出し, Dnase I (タカラバイオ社, 大津) を用いてゲノム DNA の分解処理を行った。続いて, ポリ A シグナルを有する mRNA の性質を利用して, オリゴ dT プライマーである Not1-d(T)18 を用いた逆転写反応により cDNA を作成した。得られた cDNA は, 定量的リアルタイム PCR 分析まで -80°C で保存した。IFN- γ , IL-4, IL-12(p40), Interferon-inducible protein-10/CXC chemokine ligand10 (IP-10/CXCL10), CD86 および β -アクトチン (内部標準として使用) の各 mRNA 発現レベルは, ABI Prism 7700 sequence detector (PE Applied Biosystems 社, 米国) を利用してリアルタイム PCR 法にて定量的に測定した⁵²⁾。利用したプローブの 5' 側は蛍光リポーターの 6-carboxyl-fluorescein (FAM) で, 3' 側はクエンチャー (消光分子) の carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) で修飾されている (TaqMan プローブ)。TaqMan プローブ上に結合している FAM は 3' 側のクエンチャー TAMRA の影響により蛍光を発しない。しかし, その後 DNA ポリメラーゼ活性と 5'-3' エキソヌクレアーゼ活性をあわせもつ Taq ポリメラーゼによってプライマーからの伸長反応が生じ, TaqMan プローブが分解されると, TaqMan プローブから遊離した蛍光リポーター FAM は TAMRA の影響を受けなくなり蛍光を発するようになる。リアルタイム PCR 法は, この蛍光を検出することによって目的遺伝子の増幅の程度をリアルタイム

第1表 定量的PCR解析に利用したプライマー対およびTaqManプローブ

遺伝子	5'プライマー	3'プライマー	TaqManプローブ
IFN- γ	5'-CAGCAACAGC AAGGCGAAA-3'	5'-GCTTCCTGAG GCTGGATTCC-3'	5'-AGGTCAACAACC CACAGGTCCAGCG-3'
IL-4	5'-TCTCATGGAGC TGCAGAGACTCT-3'	5'-GCTCTTTAGGC TTTCCAGGAAGT-3'	5'-CTGCACCATGAATG AGTCCAAGTCCACA-3'
IL-12 (p40)	5'-TCCTGAAGTGT GAAGCACCAAAT-3'	5'-CTTCAAGTCCA TGTTTCTTTGCA-3'	5'-ACTCCGGACGG TTCACGTGCTCA-3'
IP-10/CXCL10	5'-CGTCATTTTC TGCCTCATCCT-3'	5'-TGGTCTTAGAT TCCGGATTCAG-3'	5'-AAGCTTGAAATCA TCCCTGCGAGCC-3'
CD86	5'-TGGTTCTGTACG AGCACTATTTGG-3'	5'-CATGTCCTTGAT CTGAACATTGTG-3'	5'-CCGCACGAGCTTT GACAGGAACAAC-3'
β -アクチン	5'-CAACGTCACAC TTCACGATGGA-3'	5'-TCCAGCCTTC CTTCTTGGGTA-3'	5'-TGTAGTTTCATGGA TGCCACAGGATTCC-3'

ムに定量できるシステムである。本研究で使用したプライマーとTaqManプローブは第1表に示した。リアルタイムPCR反応は、反応溶液としてTaqMan Universal MasterMix (PE Applied Biosystems社)を用いて行われた。サンプルにおける各mRNA発現レベルは、同一サンプルから増幅された β -アクチンPCR産物に対する相対的な量として算出した。

9. 抗原特異的な細胞内サイトカイン産生細胞数の測定

GADあるいはインスリンに対して反応性を示すリンパ球のサイトカイン産生プロファイルをフローサイトメーターにて同定し、その細胞数を定量した⁵³。すなわち、各マウスから採取した脾臓あるいは脾局所リンパ節を無菌的に細胞分散して溶血した後に、ペニシリン/ストレプトマイシン添加10%FCS-RPMI1640に浮遊させた。この細胞浮遊液を 5×10^6 個/mlに調整し、96穴U底マイクロプレートの各ウェルに200 μ lずつ加えた。各ウェルには速効型インスリン (Novo Nordisk Pharma社、デンマーク)あるいは酵母菌で発現させ精製した組換えGAD65 (RSR社、英国)を最終濃度が5 μ g/mlになるように調整して加えた。なお、組換えGAD65の内毒素レベルは、10 μ g/mlのGAD65に対して0.1 EU/ml以下であった(比色法)⁵⁴。コントロールのウェルには何も添加しなかった。5%CO₂・37°C条件下で72時間培養し、終了4時間前にBrefeldin A (Sigma社、最終濃度10 μ g/ml)を各ウェルに加え、産生サイトカインの細胞外分泌を防止した。培養終了後、サンプル150 μ lを5 mlポリスチレンチューブ (Becton Dickinson社)に移し、phycoerythrin/cyanine5 (Cy-chrome) 標識抗マウスCD4抗体 (H129.19、

Pharmingen社) 5 μ lを加えた。15分間室温静置後、FACS lysing solution (Becton Dickinson社)を4 ml加え、室温で10分間静置した。続いてサンプルを0.1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA, Sigma社)・PBS (以下0.1%BSA-PBS)で洗浄して遠沈(1600rpm \times 5分間)し、上清を除去してからFACS permeabilizing solution (Becton Dickinson社) 4 mlを加え、室温で10分間静置した。0.1%BSA-PBSで洗浄後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスIFN- γ 抗体 (IgG1, Pharmingen社) 3 μ lおよびphycoerythrin (PE) 標識抗マウスIL-4抗体 (IgG2b, Pharmingen社) 3 μ lを加え室温で30分間静置した。なお、FITC標識IgG1およびPE標識IgG2b (以上Pharmingen社)をアイソタイプコントロールとして加えたサンプルを別に準備し、FACS分析の際のカットオフラインの決定に利用した。最後に0.1%BSA-PBSで洗浄しサンプル調整の終了した細胞浮遊液をフローサイトメーター (Epics Altra, Coulter社、米国)で分析した。なお、この細胞内サイトカイン蛍光標識システムが機能していることを確認するためにovalbumin (OVA) 反応性サイトカイン産生細胞の検出をあらかじめ試みた。すなわち、10週齢C57BL/6マウスをincomplete Freund's Adjuvant (IFA, Sigma社)と共にOVAで免疫した後14日目に脾臓を無菌的に採取し、ペニシリン/ストレプトマイシン添加10%FCS-RPMI1640に浮遊させた。この細胞浮遊液をマイクロプレートのウェルに分注し、OVAを添加後(最終濃度: 10 μ g/ml)72時間培養した。得られたサンプルを前述の細胞内サイトカイン蛍光標識システムに適用し、本システムが機能していることを確認した。本研究において、

抗原未投与時の IFN- γ および IL-4 産生 CD4 細胞は検出感度(細胞数 50,000 個あたり 5 個)以下であった。

10. 統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表示した。糖尿病累積発症率の比較には χ^2 検定を行った。血清 IL-18 濃度、IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルの経時的な変化に関しては、一元配置分散分析による F 検定で解析した。その他の mRNA 発現レベル、膵島炎スコア、サイトカイン産生量および GAD 反応性サイトカイン産生 CD4 細胞数の比較は、Mann-Whitney *U* 検定で解析した。膵局所 IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルと膵局所 IFN- γ mRNA 発現レベル、膵局所 IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルと膵島炎スコア、さらに膵局所 IFN- γ mRNA 発現レベルと膵島炎スコアの相互関係については、Pearson の相関係数 (ρ) を算出し評価した。また、GAD 反応性 IFN- γ 産生 CD4 細胞数と膵島炎スコアの相互関係、および同細胞数と膵局所 IFN- γ mRNA 発現レベルの相互関係は、Spearman の相関係数 (ρ_s) を算出し評価した。p<0.05 を統計学的に有意差があると判定した。

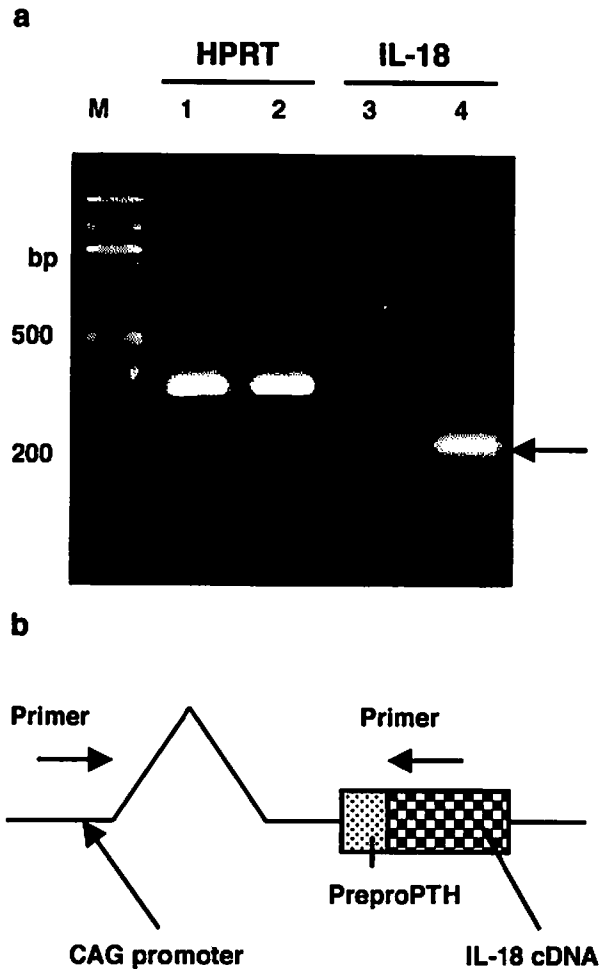
成績

1. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射部位における IL-18 mRNA 発現の確認

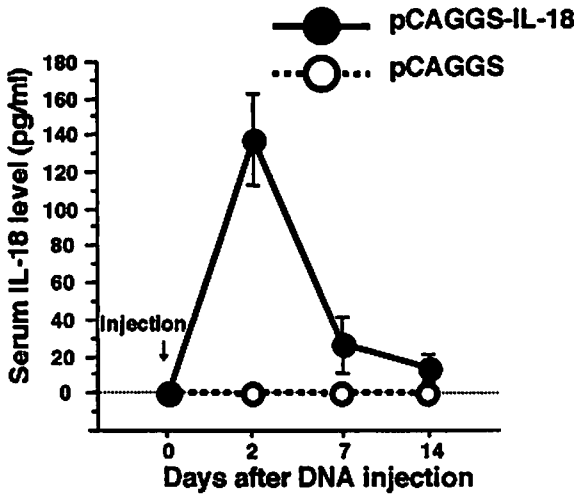
pCAGGS-IL-18 筋注部位における IL-18 mRNA の発現を RT-PCR にて確認した。IL-18 mRNA は、pCAGGS-IL-18 筋注部位のみに確認され(第2a図, 第4レーン), pCAGGS 筋注部位では確認されなかった(第2a図, 第3レーン)。

2. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射後の血清 IL-18 濃度

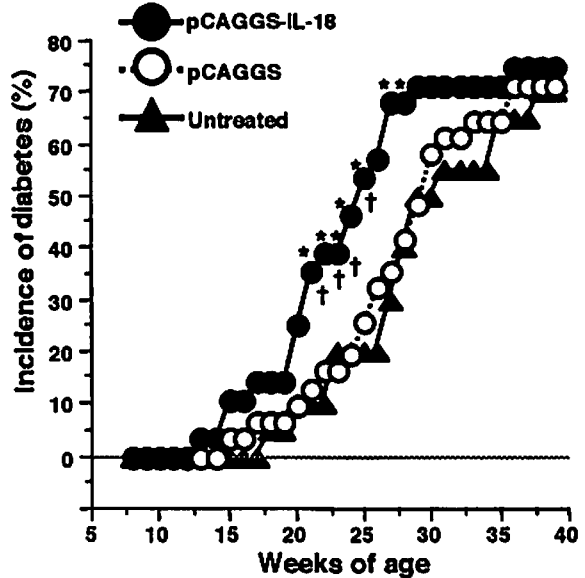
pCAGGS-IL-18 筋注後、全身性に IL-18 が供給されているか否かを評価するために、50 μ g の pCAGGS-IL-18 または pCAGGS を 6 週齢雌性 NOD マウスの両側前脛骨筋に計 100 μ g ずつ注射し、同部位に *in vivo* electroporation を施行して遺伝子発現レベルの増強を図った。血清 IL-18 濃度は、ベクター筋注後 2 日目、7 日目および 14 日目に血清を採取し、ELISA 法で測定した。その結果、pCAGGS-IL-18 筋注群における血清 IL-18 濃度は、筋注後 2 日目でピークに達しその後徐々に低下したが、2 週間以上にわたって IL-18 が全身性に供給されることが確認された(第3図)。一方、pCAGGS 筋注群および未処置群では検出感度(12.5



第2図 pCAGGS-IL-18 筋注部位における IL-18 mRNA の発現。pCAGGS-IL-18 または pCAGGS 筋注後 2 日目に局所の筋肉を採取し、RNA を抽出した。その後、逆転写反応にて cDNA を作成し PCR を行った。IL-18 mRNA は、pCAGGS-IL-18 筋注部位のみに確認され(a; 第4レーン), pCAGGS 筋注部位では確認されなかった(a; 第3レーン)。IL-18 の5'プライマーはCAGプロモーターの転写開始部位下流の配列を認識するように設計されているため(b), pCAGGS-IL-18 由来の IL-18 cDNA のみが増幅され、内因性 IL-18 遺伝子は増幅されない。PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動法により分離した。M レーン: 分子量マーカー (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 3 を許可を得て転載)



第3図 プラスミドDNA筋注後の血清IL-18濃度の経時的变化。6週齢のNODマウスに、pCAGGS-IL-18またはpCAGGSを計100 μ gずつ筋注し、*in vivo* electroporationを行った。筋注後2日目、7日目および14日目に血清を採取し、ELISA法で測定した。pCAGGS-IL-18筋注後2日目に血清IL-18濃度がピークに達しその後徐々に低下したが、2週間以上にわたってIL-18が全身性に供給された。一次元配置分散分析によるF検定を行い、血清IL-18濃度の上昇には有意性 ($p < 0.0001$) があることを確認した。(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 4を許可を得て転載)



第4図 プラスミドDNA筋注後の糖尿病累積発症率。計100 μ gのpCAGGS-IL-18(以下IL-18群; n=28)またはpCAGGS(以下コントロール群; n=31)を4週齢時に筋注し、*in vivo* electroporationを行った。さらに2週後(6週齢)に同様な処置を繰り返した後、8週齢より週1回の割合で糖尿病発症の有無を確認した。22~27週齢における糖尿病の累積発症率は、コントロール群および未処置群(n=20)と比較してIL-18群において有意に高値となった。*, $p < 0.05$ vs control group, †; $p < 0.05$ vs untreated group (χ^2 検定により解析)(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 2を許可を得て転載)

pg/ml) 以下であった。

3. pCAGGS-IL-18筋肉内注射後の糖尿病累積発症率

最初に、50 μ gのpCAGGS-IL-18(以下IL-18群; n=28)またはpCAGGS(以下コントロール群; n=31)を、4週齢雌性NODマウスの両側前脛骨筋に計100 μ g注射し、同部位に*in vivo* electroporationを行った。さらに2週後(6週齢)に、同様な処置を繰り返した。その結果、22週齢以降における糖尿病の累積発症率は、コントロール群および未処置群(n=20)と比較してIL-18群において有意に高値となった(第4図)。しかし、28週齢以降はコントロール群や未処置群における糖尿病発症も進み、IL-18群との差はみられなくなった。一方、コントロール群における糖尿病の累積発症率は、未処置群と有意差が認められず、pCAGGS投与そのものが糖尿病発症に影響しないことが示唆された。

この糖尿病発症促進効果が発現ベクターの投与週齢の差によって異なるか評価するために、同様な処置を8週齢時および10週齢時に繰り返し雌性NODマウスに行ったが、IL-18投与群とコントロール群との間に糖尿病累

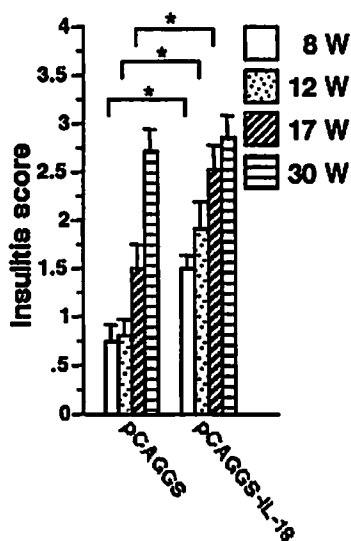
積発症率に差は認められなかった。

4. 全身性IL-18投与が膵島炎の進展に与える影響

pCAGGS-IL-18筋注による全身性IL-18投与が膵島炎の進展に与える影響を評価するために、IL-18およびコントロールの各群における膵島炎の程度をスコア化して経時的に検討した。第5図に示すように、IL-18群では、糖尿病発症前期の8-17週齢における膵島炎の進展が確認された。一方、30週齢における膵島炎スコアは両群で差を認めず、第4図で示した糖尿病累積発症率を反映する結果となった。以上よりpCAGGS-IL-18筋注による膵島局所への著しい炎症細胞浸潤が示され、全身性IL-18投与は糖尿病原性リンパ球による膵 β 細胞の破壊を促進する可能性が示唆された。

5. pCAGGS-IL-18筋肉内注射による全身性および膵島局所サイトカインバランスの評価

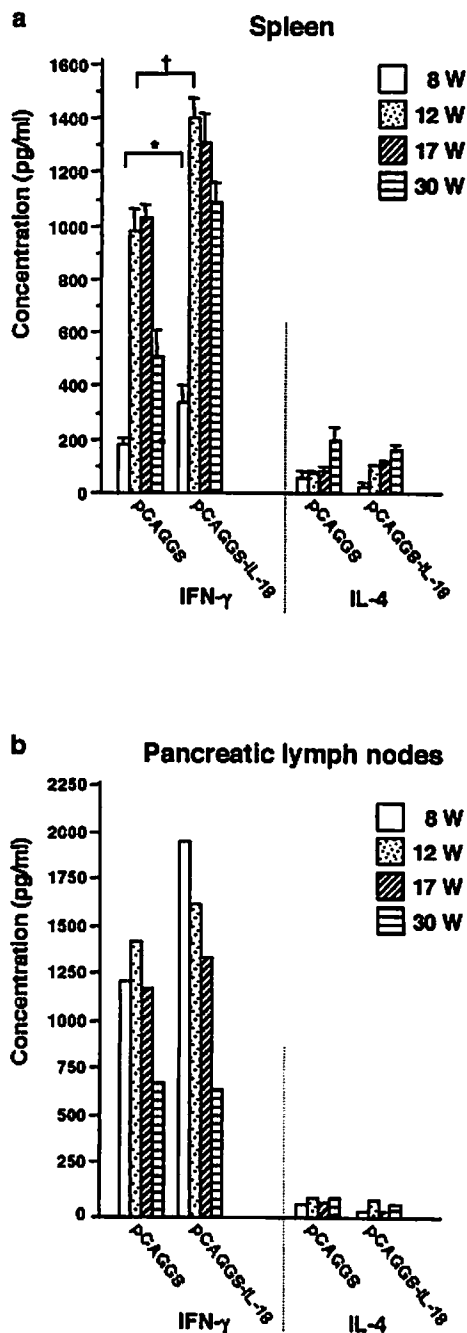
全身性Th1/Th2サイトカインバランスに対する外因



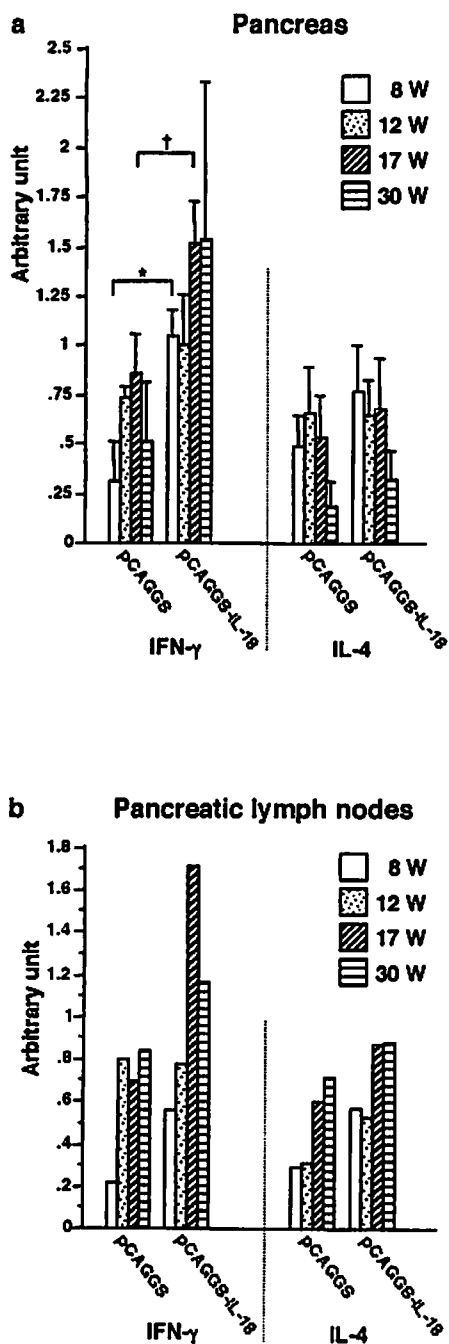
第5図 プラスミド DNA 筋注後の膵島炎の進展. IL-18 群 (pCAGGS-IL-18) およびコントロール群 (pCAGGS) における膵島炎の程度を週齢別にスコア化して検討した. IL-18 群では, 糖尿病発症前期 (8-17 週齢) における膵島炎の進展が確認された. *, $p < 0.05$ (Mann-Whitney U 検定により解析). 8 週齢 (IL-18 群, $n=7$; コントロール群, $n=5$), 12, 17 および 30 週齢 (IL-18 群, $n=5$; コントロール群, $n=5$) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 5 を許可を得て転載)

性 IL-18 の影響を評価するために, 抗 CD3 抗体刺激によって観察される脾細胞のサイトカイン反応を検討した. なお, IL-18 およびコントロールの両群間において, 脾臓のリンパ球分画中における CD4 および CD8 細胞の組成に有意差は認めない (IL-18 群: CD4 細胞, $32.4 \pm 1.1\%$, CD8 細胞, $17.2 \pm 0.8\%$; コントロール群: CD4 細胞, $29.5 \pm 2.2\%$, CD8 細胞, $14.6 \pm 1.4\%$). その結果, IFN- γ 産生量がコントロール群と比較して IL-18 群で増加しており (8 週齢時: $p < 0.05$, 12 週齢時: $p < 0.01$). 全身性サイトカインバランスは Th1 優位な状態であった (第 6 a 図). また, 脾局所リンパ節における検討でも同様の傾向が認められた (第 6 b 図). ただし, コントロール群および未処置群の両群間では, 全身性サイトカインバランスに差を認めず, 今回使用したベクター (pCAGGS) そのものがサイトカイン反応に直接影響を及ぼさないことが確認された. さらに, 抗 CD3 抗体未刺激による脾細胞からの各サイトカインの産生量は, ELISA 法の検出感度 (20 pg/ml) 以下であった.

続いて, 脾局所のサイトカインバランスに対する外因



第6図 脾臓および脾局所リンパ節におけるリンパ球のサイトカイン産生量. IL-18 群 (pCAGGS-IL-18) およびコントロール群 (pCAGGS) から脾臓 (a) あるいは脾局所リンパ節 (b) を採取し, 週齢別に抗 CD3 抗体刺激によるリンパ球のサイトカイン産生量を ELISA 法にて検討した. リンパ節については採取したリンパ球を各週齢ごとにプールし, 1 回の測定で評価した. 脾臓および脾局所リンパ節のいずれも, IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17 週齢) において IFN- γ 産生の亢進が認められた. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Mann-Whitney U 検定により解析). 8 週齢 (IL-18 群, $n=7$; コントロール群, $n=5$), 12, 17 および 30 週齢 (IL-18 群, $n=5$; コントロール群, $n=5$) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 6 を許可を得て転載)



第7図 膵臓および膵局所リンパ節におけるサイトカイン mRNA 発現レベル。IL-18 群 (pCAGGS-IL-18) およびコントロール群 (pCAGGS) から膵臓 (a) あるいは膵局所リンパ節 (b) を採取し、週齢別にサイトカイン mRNA 発現レベルを定量的リアルタイム PCR 法にて検討した。リンパ節については採取したリンパ球を各週齢ごとにプールし、1回の測定で評価した。膵臓および膵局所リンパ節のいずれも、IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17 週齢) において IFN- γ mRNA 発現レベルが増強していた。*, $p < 0.05$; †, $p < 0.01$ (Mann-Whitney U 検定により解析)。8 週齢 (IL-18 群, $n=7$; コントロール群, $n=5$), 12, 17 および 30 週齢 (IL-18 群, $n=5$; コントロール群, $n=5$) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 7 を許可を得て転載)

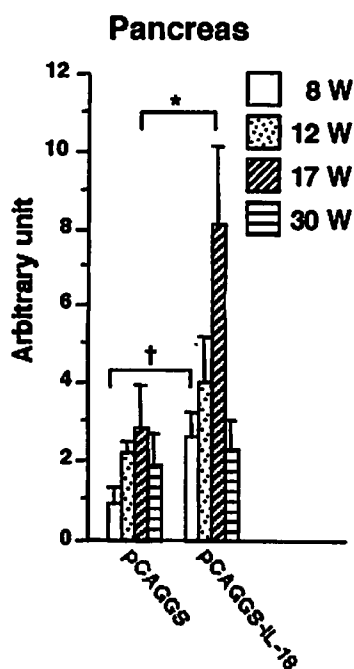
性 IL-18 の影響を評価するために、膵臓における IFN- γ および IL-4 の mRNA 発現レベルを定量的リアルタイム PCR 分析にて検討した。第 7 a 図に示すように、IL-18 群における膵臓の IFN- γ mRNA 発現レベルは糖尿病発症前期においてコントロール群より有意に高値であったが (8 週齢時: $p < 0.05$, 17 週齢時: $p < 0.01$)、IL-4 mRNA 発現レベルは 2 群間で有意差が認められなかった。したがって、膵局所におけるサイトカインバランスは、IL-18 群において Th1 優位な状態であることが示唆された。同様な傾向が膵局所リンパ節においても観察された (第 7 b 図)。さらに、糖尿病発症前期において膵臓の IFN- γ mRNA 発現レベルと膵島炎スコアの間には正の順位相関があった ($\rho = 0.563$; $p < 0.001$)。これらの所見から、若齢 NOD マウスへの全身性 IL-18 投与が免疫制御性の Th2 細胞ではなく、糖尿病原性 Th1 細胞の膵島浸潤を促進し、膵 β 細胞の破壊に関わる可能性が示唆された。

6. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射における膵局所の IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルの検討

IP-10/CXCL10 は活性化 Th1 細胞の遊走を促進するケモカイン⁵⁵⁻⁵⁷)であり、自己免疫性疾患の病因との関連が複数報告されている^{53, 56})。外因性 IL-18 による膵局所の IP-10/CXCL10 発現レベルの変化や膵島炎との関係の評価するために、定量的リアルタイム PCR 法にて膵臓における IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルを評価した。第 8 図に示すように IL-18 群では、膵局所の IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルが、糖尿病発症前期において顕著に増加していた (8 週齢時: $p < 0.01$, 17 週齢時: $p < 0.05$)。さらに、膵局所の IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルは、膵島炎スコア ($\rho = 0.517$; $p < 0.01$) や膵局所の IFN- γ mRNA 発現レベル ($\rho = 0.510$; $p < 0.01$) と正の相関があった。これらの所見から、外因性 IL-18 が膵局所における IP-10/CXCL10 発現を増加させることによって、膵島への糖尿病原性 Th1 細胞の浸潤による膵島炎の進展を促進する可能性が示唆された。

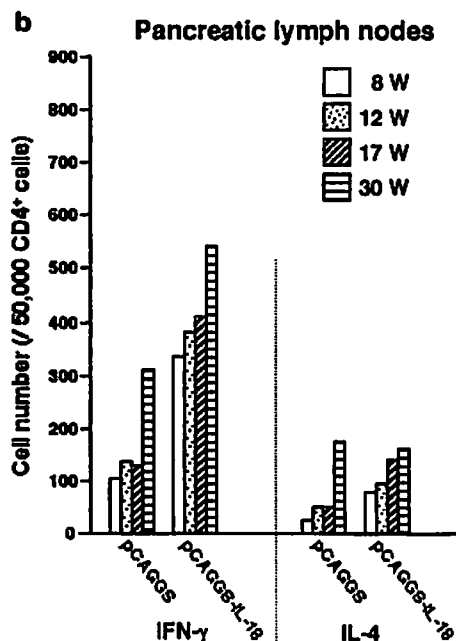
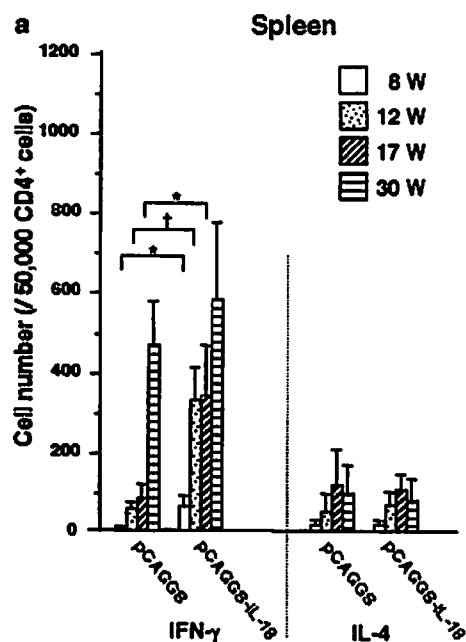
7. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射における GAD 反応性 IFN- γ 産生 CD4 細胞数の検討

全身性 IL-18 投与による膵島関連自己抗原反応性リンパ球への影響を評価するために、フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン検出システムを利用して GAD およびインスリン反応性 IFN- γ ならびに IL-4 産生 CD4 細胞数を検討した。第 9 a 図に示すように、糖

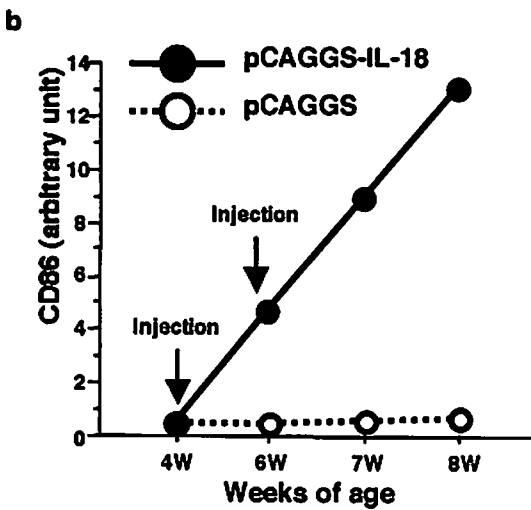
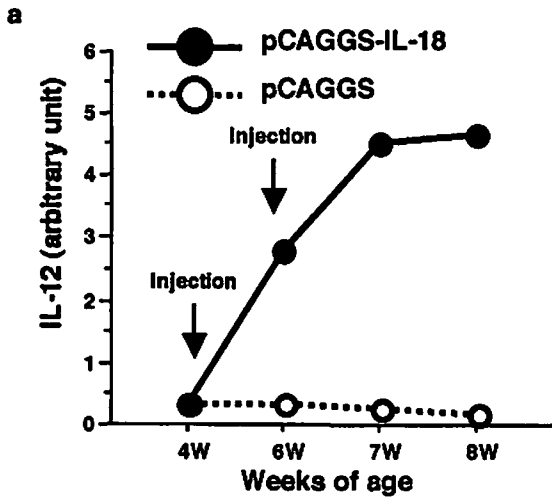


第8図 膵臓におけるIP-10/CXCL10 mRNA 発現レベル、IL-18 群 (pCAGGS-IL-18) およびコントロール群 (pCAGGS) から膵臓を採取し、週齢別にIP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルを定量的リアルタイムPCR法にて検討した。IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17 週齢) においてIP-10/CXCL10 mRNA 発現レベルが増強していた。*, $p < 0.05$; †, $p < 0.01$ (Mann-Whitney U 検定により解析)。8 週齢 (IL-18 群, $n=7$; コントロール群, $n=5$), 12, 17 および 30 週齢 (IL-18 群, $n=5$; コントロール群, $n=5$) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 8 を許可を得て転載)

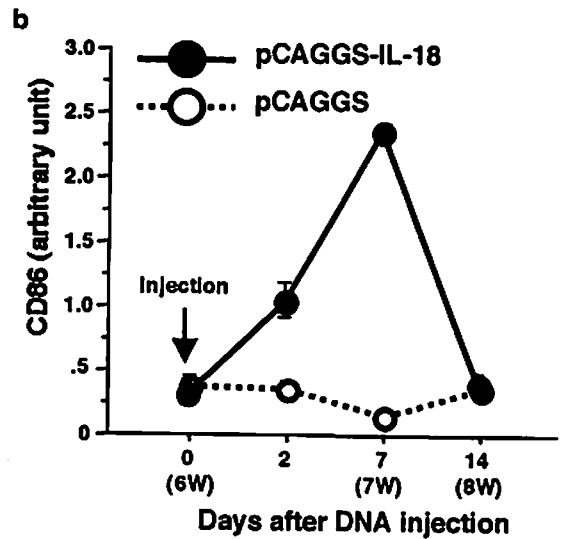
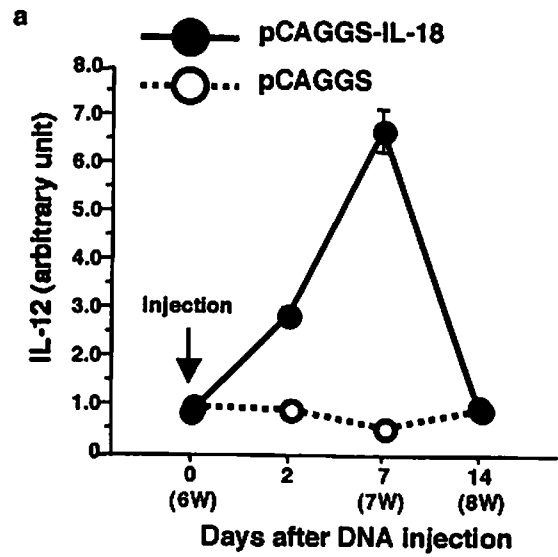
糖尿病発症前期において、IL-18 群では脾細胞中の GAD 反応性 IFN- γ 産生 CD4 細胞が有意に増加していた (8 および 17 週齢時: $p < 0.05$, 12 週齢時: $p < 0.01$)。膵局所リンパ節においても同様な傾向が認められた (第9b 図)。さらに、糖尿病発症前期における GAD 反応性 IFN- γ 産生 CD4 細胞数は、膵島炎スコア ($\rho = 0.510$; $p < 0.01$)、膵局所の IFN- γ mRNA 発現レベル ($\rho = 0.429$; $p < 0.03$) および膵局所 IP-10/CXCL10 mRNA 発現レベル ($\rho = 0.479$; $p < 0.01$) と有意な正の相関を示した。しかし、GAD 反応性 IL-4 産生 CD4 細胞数 (第9a 図) あるいはインスリン反応性 IFN- γ または IL-4 産生 CD4 細胞数は、2 群間に差が認められなかった。以上の結果から全身性 IL-18 投与は、GAD 反応性 Th1 細胞の増加を促し、破壊性膵島炎の促進に寄与する可能性が示唆された。



第9図 脾臓および膵局所リンパ節における GAD 反応性サイトカイン産生 CD4 細胞数の検討。IL-18 群 (pCAGGS-IL-18) およびコントロール群 (pCAGGS) から脾臓 (a) あるいは膵局所リンパ節 (b) を採取し、GAD65 刺激後の GAD 反応性サイトカイン産生 CD4 細胞数をフローサイトメーターにて検討した。リンパ節については採取したリンパ球を各週齢ごとにプールし、1 回の測定で評価した。脾臓および膵局所リンパ節のいずれも、IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17 週齢) において GAD 反応性 IFN- γ 産生 CD4 細胞が増加していた。*, $p < 0.05$; †, $p < 0.01$ (Mann-Whitney U 検定により解析)。8 週齢 (IL-18 群, $n=7$; コントロール群, $n=5$), 12, 17 および 30 週齢 (IL-18 群, $n=5$; コントロール群, $n=5$) (Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003 の Fig 9 を許可を得て転載)



第10図 脾局所リンパ節におけるIL-12(p40)およびCD86 mRNA発現レベル。計100 μ gのpCAGGS-IL-18 (以下IL-18群; n=13) またはpCAGGS (以下コントロール群; n=10) を4週齢時に筋注し, *in vivo* electroporationを行った。さらに2週後(6週齢)に, 同様な処置を繰り返した。4, 6, 7および8週齢時に脾局所リンパ節を回収し, IL-12(p40) (a) およびCD86 (b) mRNA発現レベルを定量的リアルタイムPCR法にて検討した。IL-18群では筋注後から経時的にIL-12(p40) およびCD86 mRNA発現レベルが増強した。リンパ節については採取したリンパ球を各週齢ごとにプールし, 1回の測定で評価した。(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 11を許可を得て転載)



第11図 脾臓におけるIL-12(p40)およびCD86 mRNA発現レベル。計100 μ gのpCAGGS-IL-18 (以下IL-18群; n=13) またはpCAGGS (以下コントロール群; n=10) を4週齢時に筋注し, *in vivo* electroporationを行った。さらに2週後(6週齢)に, 同様な処置を繰り返した。2回目の筋注前, 筋注後2日目, 7日目および14日目に脾臓を回収し, IL-12(p40) (a) およびCD86 (b) mRNA発現レベルを定量的リアルタイムPCR法にて検討した。IL-18群ではpCAGGS-IL-18筋注後7日目をピークとして一過性にIL-12(p40)およびCD86 mRNA発現レベルが増強した。一次元配置分散分析によるF検定を行い, 両者の増強には有意性 ($p < 0.0001$) があることを確認した。(Oikawa Y et al: J Immunol 171: 5865-5875, 2003のFig 10を許可を得て転載)

8. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射における末梢 IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルの検討

近年、未分化 CD4 細胞の Th1 または Th2 細胞への分化に、抗原提示細胞 (antigen presenting cell: APC) と T 細胞との間の適切な CD28/B7 副刺激経路が重要な役割を担っていることが報告されている。同様なことが NOD マウスでも報告されており、同マウスにおける CD28 と B7 分子の1つである CD86 を介した副刺激経路の機能障害が自己免疫性糖尿病の発症と関連していると考えられている³³⁾。さらに膵局所リンパ節における未分化糖尿病原性 T 細胞の活性化が、膵島周囲炎の出現に密接に関連があることも報告されている³⁹⁾。そこで APC の機能に対する IL-18 の効果を評価するために、膵局所リンパ節および脾臓における IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルを定量的リアルタイム PCR 法を用いて検討した。

第 10 図および第 11 図で示すように、膵局所リンパ節および脾臓における IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルは、コントロール群と比較して IL-18 群において増加していた。さらに IL-18 群では、膵局所リンパ節における IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルが 4 週齢から 8 週齢まで直線的に増加した (第 10a 図および第 10b 図) のに対し、脾臓における IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルは pCAGGS-IL-18 筋注後 7 日目にピークに達したのち、14 日目までに徐々に基礎レベルに低下していった (第 11a 図および第 11b 図)。この IL-18 群における脾臓の IL-12(p40) および CD86 mRNA 発現レベルの経時的な変化は、同群における血清 IL-18 濃度 (第 3 図) の経時的変化とほぼ平行していた。これらの所見は、全身性 IL-18 投与が若齢 NOD マウスの末梢および膵局所リンパ節における APC 機能、すなわち IL-12 産生や CD28/CD86 副刺激系に何らかの影響を与えている可能性を示唆するものであり、結果的に GAD 反応性 IFN- γ 産生 CD4 細胞の増加 (第 9 図) や他の糖尿病原性 Th1 細胞の分化促進に寄与した可能性がある。

考 察

本研究では、若齢 (4 週齢) NOD マウスへの全身性 IL-18 投与により糖尿病発症の促進が観察された。IL-18 は Th1 および Th2 作用の両面性を持ったサイトカインであり⁴⁴⁾、これまでに筆者らのグループは 10 週齢の NOD マウスへの IL-18 の腹腔内投与により全身性サイトカインバランスが Th2 優位になり、CY 投与に

よる糖尿病発症が抑制されることを報告した⁴⁷⁾。同様に、Rothe らは 10 週齢の NOD マウスに IL-18 を連日腹腔内投与し続けたところ、糖尿病の累積自然発症が低下したことを報告している⁴⁸⁾。彼らの報告でも、IL-18 投与 NOD マウスの膵局所における IL-4 mRNA 発現レベルがコントロール群に比し上昇しており、IL-18 投与が膵島に浸潤している Th1 細胞を Th2 細胞へ変化させた可能性を提唱している。

しかし、これまでの報告とは異なり、本研究では若齢 NOD マウスへの全身性 IL-18 投与による糖尿病発症促進効果が観察された (第 4 図および第 5 図)。全身性および膵局所のサイトカインバランスは IL-18 群において Th1 優位な状態にシフトしており (第 6 図および第 7 図)、この所見は IL-18 の Th1 サイトカインとしての元来の性質⁴⁴⁾と一致するものであった。本研究とこれまでの外来性 IL-18 の糖尿病抑制作用を示した報告^{47, 48)}との相違は、次の 3 点、すなわち IL-18 投与方法、血清 IL-18 濃度および IL-18 投与週齢の違いに起因していると考えた。

IL-18 投与方法に関して、本研究では IL-18 発現プラスミド DNA 筋注法を利用した。ウィルスなどを利用した他のベクター⁶⁰⁻⁶³⁾を用いた遺伝導入システムと比較して、この DNA 筋注法は簡単で安価であり、かつ安全な方法であることが知られている。しかし、この方法では、遺伝子の発現レベルが比較的低いという短所があった^{63, 64)}。近年、Aihara らは、DNA 筋注法に *in vivo* electroporation を組み合わせることによって、非常に高レベルのサイトカイン遺伝子発現が観察され、サイトカインの安定した長期的全身供給を可能にした⁴⁹⁾。第 3 図で示すように、1 回の pCAGGS-IL-18 筋注により、血清 IL-18 レベルは筋注後 2 日目にピーク (約 130 pg/ml) に達し、2 週以上にわたり IL-18 が全身性に供給された。一方、これまでの報告^{47, 48)}で行われていた IL-18 (0.3 μ g/マウス) の腹腔内連日投与では平均 150,000 pg/ml という極めて高い血清 IL-18 濃度に達しており⁴⁷⁾、このことが糖尿病発症に対する Th2 作用の誘因になっていた可能性がある。実際、これまでに IL-18 の Th2 作用は *in vitro* の系^{39, 42)}のほか、*in vivo* の系では大量 IL-18^{40, 41, 43)}の生体内投与や IL-18 トランスジェニックマウス⁶⁵⁾を用いた検討で観察されてきた。すなわちこれらすべての報告が非生理的な IL-18 レベルにおける検討であり、そのような高 IL-18 レベルでは本来の生理的な IL-18 の作用ではなく非生理的な作用を観察してしまう可能性がある。筆者は実際に pCAGGS-IL-18 を 8 週齢、10 週齢と続けて NOD マウスに筋注したが、従来の報

告^{47, 48)}にみられていた糖尿病発症の抑制は観察されなかった。それゆえに、外因性IL-18によるNODマウスの糖尿病発症抑制効果は、おそらく血清IL-18濃度の極端な高値に起因していたと考えている。

本研究では、IL-18投与により全身性および膵局所のサイトカインバランスがTh1優位な状態にシフトし(第6図および第7図)、さらにGAD反応性IFN- γ 産生CD4細胞の増加も観察された(第9図)。“膵島炎進展初期段階”では、膵島関連自己抗原に反応性を示す未分化T細胞が抗原提示細胞によって刺激を受け、IL-12の存在下では糖尿病原性のTh1細胞へ、一方IL-4の存在下では免疫制御性のTh2細胞へ分化することが想像される。したがって、第10a図および第11a図で示したAPCからのIL-12の産生亢進を考慮すると、“膵島炎進展初期段階”におけるIL-18の全身性投与はTh1細胞への分化の補助因子あるいは促進因子として働いているものと推測される。これまでのところ外因性IL-18が内因性IL-12の産生を誘導するという報告はなく、今後、両者の関係を解明する必要がある。

pCAGGS-IL-18筋注によるTh1作用が筋注時の週齢によって異なるか否か評価するために、8週齢および10週齢と続けてNODマウスにpCAGGS-IL-18の筋注および*in vivo* electroporationを施行した。しかし、全身性および膵局所のTh1/Th2サイトカインバランス、およびGADまたはインスリン反応性IFN- γ ならびにIL-4産生CD4細胞数は、pCAGGSのみを筋注したコントロール群とIL-18群との間に明らかな差がみられなかった。すなわち、全身性IL-18投与による糖尿病発症促進は週齢に依存してみられる現象であり、“膵島炎進展初期段階”ではIL-18が膵島炎の進展過程上、免疫学的に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

これまでに筆者らの研究室では、IP-10/CXCL10がNODマウスの膵島炎において発現していることを確認し、CY誘発性糖尿病モデルの系で抗IP-10/CXCL10抗体をNODマウスに腹腔内投与すると糖尿病発症が抑制されることを報告した⁶⁴⁾。さらにヒトでも1型糖尿病患者では血清IP-10/CXCL10値が高く、疾患活動性と相関していることを報告した⁵³⁾。以上より、膵局所におけるIP-10/CXCL10発現は自己免疫性膵島炎の病因および膵島炎の活動性と関連があると考えられる。本研究では、膵局所のIP-10/CXCL10 mRNA発現レベルがコントロール群と比較して、IL-18群で増加していることを示した(第8図)。さらに、膵局所のIP-10/CXCL10 mRNA発現レベルは、膵島炎スコアおよび膵局所のIFN- γ mRNA発現レベルとの間に正の相関

を認めた。これらの所見は外因性IL-18が膵島におけるIP-10/CXCL10発現を増加させる可能性を示唆するものであり、膵島炎への糖尿病原性Th1細胞の遊走や、その後の膵 β 細胞破壊を促進する可能性を示唆している。しかし、IL-18とIP-10/CXCL10との直接的な関係についてはこれまで報告されていないため、両者の関係について今後詳細に検討を行う必要があると考える。

NODマウスではAPCの分化異常や機能異常が報告されており、このことが糖尿病原性のTh1タイプCD4細胞およびCD8細胞の分化・成熟に寄与していると考えられている⁶⁷⁻⁷⁰⁾。実際、NODマウスにおけるマクロファージではIL-12の高い産生・分泌能が観察されており、他の非自己免疫種のマウスと比較して、Th1細胞あるいは細胞障害性T細胞への優先的な分化促進が観察される⁶⁷⁾。さらに、CD28/B7経路を介したナイーブT細胞の活性化についても、自己免疫性糖尿病を含む自己免疫疾患で検討されてきた³³⁾。本研究では、末梢におけるIL-12(p40)およびCD86のmRNA発現レベルが、IL-18群において一過性に増強することを示した(第11a図および第11b図)。そこでGAD反応性IFN- γ 産生CD4細胞がIL-18群において増加した(第9図)ことを考慮すると、外因性IL-18によるAPC上のCD86発現増強とIL-12産生亢進が、結果的に膵 β 細胞反応性CD4細胞のTh1細胞への分化促進に寄与したものと考えられた。

CD86に関するこれらの所見は、NODマウスを用いた諸報告と一致する³³⁾。たとえばSalomonらは、CD86ノックアウトNODマウスを作成し、同マウスでは破壊性膵島炎にいたらず膵島周囲炎でとどまるため、糖尿病発症が観察されなかったと報告している⁷¹⁾。また、Lenschowらは、2週齢から7週齢までのNODマウスでは、抗CD86抗体を投与してCD86経路を遮断すると糖尿病発症が抑制されるが、10週齢以降のNODマウスに投与すると抗CD86抗体による糖尿病発症抑制効果はみられなくなると報告している⁷²⁾。これらの2つの報告は、CD28/CD86副刺激系の活性化が“膵島炎進展初期段階”における糖尿病原性リンパ球の分化・成熟において重要な役割を担っていることを示唆している³³⁾。

Hoglundらは、“膵島炎進展初期段階”におけるナイーブ膵 β 細胞反応性T細胞が膵島ではなく膵局所リンパ節のAPCによって活性化されることを見出し、その後、膵島局所へ同細胞が遊走し膵島周囲炎を形成していくことを報告した⁵⁹⁾。実際に、膵局所リンパ節でIL-12(p40)およびCD86 mRNAの発現レベルがIL-18群において著しく増加したこと(第10a図および第10b図)を考

えれば、“膵島炎進展初期段階”における外因性 IL-18 投与が膵局所リンパ節における APC 機能に影響を与え、糖尿病原性リンパ球の分化・成熟に寄与した可能性が推測された。

以上より、膵島炎の進展初期の段階において IL-18 が Th1 タイプの免疫促進因子として膵島炎の進展に関与し、結果的に糖尿病の発症促進に寄与し得る可能性が示された。今後、IL-18 ノックアウトモデルの作成によって、1型糖尿病における IL-18 の役割に関するより詳細な検討が可能になると考えられる。そして、IL-18 の重要性をさらに明確化することによって、IL-18 をターゲットとした1型糖尿病の発症予防や治療法の開発が進むものと期待される。一方、これまでに NOD マウスへの IL-18 投与による糖尿病発症抑制効果が示され、将来的に IL-18 が1型糖尿病の発症予防に有用である可能性が報告されてきた⁴⁰⁾。しかし、IL-18 の投与法や血清 IL-18 濃度、IL-18 の投与時期によって、逆に糖尿病の発症を促進させてしまう可能性があることを本研究は示しており、ヒトへの IL-18 投与の適用に関しては更なる慎重な検討が必要であることをここで強調しておきたい。

総括

1型糖尿病の多くは T helper 1 (Th1) タイプの自己免疫性疾患と考えられているが、膵島炎の出現やその進展における IL-18 の役割を検討する目的で、若齢 NOD マウス (1型糖尿病モデル動物) に IL-18 を全身性に投与し、膵島炎ならびに糖尿病の発症におよぼす影響を検討した⁷³⁾。

1. IL-18 発現ベクター (pCAGGS-IL-18) を作成し、4週齢、6週齢と続けて NOD マウスの前脛骨筋に筋肉内注射した。さらに同部位に *in vivo* electroporation を施行して遺伝子発現の増強を図った。1回の pCAGGS-IL-18 筋肉内注射で2週間以上にわたって全身性に IL-18 が供給された。

2. pCAGGS-IL-18 筋肉内注射群 (以下 IL-18 群と略す) では、22週齢以降における糖尿病累積発症率が有意に高値となった。しかし、28週齢以降は pCAGGS 筋肉内注射群 (以下コントロール群と略す) や未処置群における糖尿病発症も進み、IL-18 群との差はなくなった。

3. IL-18 群では糖尿病発症前期 (8-17週齢) において膵島炎が有意に進展していた。

4. 全身性サイトカインバランス、膵臓や膵局所リンパ節におけるサイトカインバランスはいずれも IL-18 群に

おいて Th1 優位であった。

5. IL-18 群では、膵局所における IP-10/CXCL10 (Th1 タイプのケモカイン) mRNA 発現レベルが増強しており、外因性 IL-18 が膵島における IP-10/CXCL10 発現を増加させる可能性が示唆された。

6. 膵島関連自己抗原の1つであるグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamic acid decarboxylase : GAD) に対して反応性を示す IFN- γ 産生 CD4 細胞が IL-18 群の脾細胞において有意に増加していた。

7. IL-18 群では、膵局所リンパ節あるいは脾臓における IL-12(p40)および CD86 mRNA 発現レベルがいずれも増強しており、外因性 IL-18 が抗原提示細胞に影響を与える可能性が示唆された。

以上より、膵島炎の進展初期の段階において、IL-18 は Th1 タイプの免疫応答を介した膵島炎の進展促進に寄与し、結果的に糖尿病の発症を促進することが示唆された。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部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、直接御指導いただきました、慶應義塾大学医学部内科学教室島田朗博士に深謝いたします。さらに、発現ベクターの開発、作成および遺伝子導入法に関して多大なる御指導、御協力を賜りました大阪大学大学院医学系研究科幹細胞制御分野宮崎純一教授、倭英司助教授、東京大学医科学研究所外科田原秀晃教授、大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座大崎匡博士、また動物管理に御協力を賜りました東京電力病院内科春日明博士に深謝いたします。最後に本研究に御助言、御協力いただきました埼玉社会保険病院内科丸山太郎博士、ならびに慶應義塾大学医学部内科腎臓内分泌代謝科内分泌代謝研究室の諸先生方に感謝いたします。本研究の一部は第45回日本糖尿病学会年次学術集会 (2002年、東京) および第32回日本免疫学会総会・学術集会 (2002年、東京) にて発表した。

本論文は Oikawa Y, Shimada A, Kasuga A, Morimoto J, Osaki T, Tahara H, Miyazaki T, Tashiro F, Yamato E, Miyazaki J, Saruta T : Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice. *J Immunol* 171 : 5865-5875, 2003 の一部を含む。

文 献

- 1) 葛谷健, 中川昌一, 佐藤謙, 金澤康徳, 岩本安彦, 小林正, 南條輝志男, 佐々木陽, 清野裕, 伊藤千賀子, 島健二, 野中共平, 門脇孝: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. 糖尿病, 42 : 385-404, 1999
- 2) Nishimura R, Matsushima M, Tajima N, Agata T, Shimizu H, LaPorte RE : A major improvement in the prognosis of individuals with IDDM in the past 30 years in Japan. The Diabetes Epidemiology Research International Study Group. Diabetes Care 19 : 758-760, 1996
- 3) Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y : Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. Jikken Dobutsu 29 : 1-13, 1980
- 4) Hattori M, Buse JB, Jackson RA, Glimcher L, Dorf ME, Minami M, Makino S, Moriwaki K, Kuzuya H, Imura H, Strauss WM, Seidman JG, Eisenbarth GS : The NOD mouse : recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. Science 231 : 733-735, 1986
- 5) Acha-Orbea H, McDevitt HO : The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. Proc Natl Acad Sci U S A 84 : 2435-2439, 1987
- 6) Maruyama T, Shimada A, Kasuga A, Kasatani T, Ozawa Y, Ishii M, Takei I, Suzuki Y, Kobayashi A, Takeda S, Matsubara K, Saruta T : Analysis of MHC class II antigens in Japanese IDDM by a novel HLA-typing method, hybridization protection assay. Diabetes Res Clin Pract 23 : 77-84, 1994
- 7) Melanitou E, Fain P, Eisenbarth GS : Genetics of type 1A (immune mediated) diabetes. J Autoimmun 21 : 93-98, 2003
- 8) Eisenbarth GS : Type 1 diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. N Engl J Med 314 : 1360-1368, 1986
- 9) Bach JF : Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. Endocr Rev 15 : 516-542, 1994
- 10) Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA : Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. Diabetes 43 : 667-675, 1994
- 11) Kay TW, Campbell IL, Harrison LC : Characterization of pancreatic T lymphocytes associated with beta cell destruction in the non-obese diabetic (NOD) mouse. J Autoimmun 4 : 263-276, 1991
- 12) Kay TW, Chaplin HL, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE : CD4+ and CD8+ T lymphocytes : clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. Res Immunol 148 : 320-327, 1997
- 13) Wong FS, Janeway CA, Jr. : The role of CD4 vs. CD8 T cells in IDDM. J Autoimmun 13 : 290-295, 1999
- 14) Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE : NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. Immunol Today 14 : 193-196, 1993
- 15) Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R : Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. Diabetes 39 : 933-937, 1990
- 16) Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL : Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. Proc Natl Acad Sci U S A 88 : 10252-10256, 1991
- 17) Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR : Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. Proc Natl Acad Sci U S A 87 : 1576-1580, 1990
- 18) Elias D, Reshef T, Birk OS, van der Zee R, Walker MD, Cohen IR : Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. Proc Natl Acad Sci U S A 88 : 3088-3091, 1991
- 19) Elias D, Cohen IR : Peptide therapy for diabetes in NOD mice. Lancet 343 : 704-706, 1994
- 20) Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV : Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. Nature 366 : 69-72, 1993
- 21) Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO : Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. Nature 366 : 72-75, 1993
- 22) Bergerot I, Arreaza GA, Cameron MJ, Burdick MD, Strieter RM, Chensue SW, Chakrabarti S, Delovitch TL : Insulin B-chain reactive CD4+ regulatory T-cells induced by oral insulin treatment protect from type 1 diabetes by blocking the cytokine secretion and pancreatic infiltration of diabetogenic effector T-cells. Diabetes 48 : 1720-1729, 1999
- 23) Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N : Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. J Clin Invest 95 : 628-634, 1995
- 24) Urbanek-Ruiz I, Ruiz PJ, Paragas V, Garren H, Steinman L, Fathman CG : Immunization with DNA encoding an immunodominant peptide of insulin prevents diabetes in NOD mice. Clin Immunol 100 : 164-171, 2001
- 25) Daniel D, Wegmann DR : Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). Proc Natl Acad Sci U S A 93 : 956-960, 1996
- 26) Tian J, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Middleton B, Newman D, Mueller R, Arita S, Evans C, Atkinson MA, Mullen Y, Sarvetnick N, Tobin AJ, Lehmann PV, Kaufman DL : Modulating autoimmune responses to

- GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nat Med* 2 : 1348-1353, 1996
- 27) Sai P, Rivereau AS, Granier C, Haertle T, Martignat L : Immunization of non-obese diabetic (NOD) mice with glutamic acid decarboxylase-derived peptide 524-543 reduces cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Clin Exp Immunol* 105 : 330-337, 1996
- 28) Elliott JF, Qin HY, Bhatti S, Smith DK, Singh RK, Dillon T, Lauzon J, Singh B : Immunization with the larger isoform of mouse glutamic acid decarboxylase (GAD67) prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 43 : 1494-1499, 1994
- 29) Pleau JM, Fernandez-Saravia F, Esling A, Homodelarche F, Dardenne M : Prevention of autoimmune diabetes in nonobese diabetic female mice by treatment with recombinant glutamic acid decarboxylase (GAD 65). *Clin Immunol Immunopathol* 76 : 90-95, 1995
- 30) Shimada A, Rohane P, Fathman CG, Charlton B : Pathogenic and protective roles of CD45RB(low) CD4+ cells correlate with cytokine profiles in the spontaneously autoimmune diabetic mouse. *Diabetes* 45 : 71-78, 1996
- 31) Shimada A, Charlton B, Rohane P, Taylor-Edwards C, Fathman CG : Immune regulation in type 1 diabetes. *J Autoimmun* 9 : 263-269, 1996
- 32) Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathman CG : Beta-cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45 : 1063-1067, 1996
- 33) Salomon B, Bluestone JA : Complexities of CD28/B7 : CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19 : 225-252, 2001
- 34) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M : Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378 : 88-91, 1995
- 35) Hunter CA, Timans J, Pisacane P, Menon S, Cai G, Walker W, Aste-Amezaga M, Chizzonite R, Bazan JF, Kastelein RA : Comparison of the effects of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma-inducing factor on the production of interferon-gamma by natural killer. *Eur J Immunol* 27 : 2787-2792, 1997
- 36) Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K : Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 10 : 259-264, 1998
- 37) Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M : Overview of interleukin-18 : more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol* 63 : 658-664, 1998
- 38) Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M : Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18 : A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 187 : 2103-2108, 1998
- 39) Hoshino T, Wiltout RH, Young HA : IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells : a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol* 162 : 5070-5077, 1999
- 40) Hoshino T, Yagita H, Ortaldo JR, Wiltout RH, Young HA : In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 30 : 1998-2006, 2000
- 41) Wild JS, Sigounas A, Sur N, Siddiqui MS, Alam R, Kurimoto M, Sur S : IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Immunol* 164 : 2701-2710, 2000
- 42) Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE, Nakanishi K : IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 13962-13966, 1999
- 43) Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, Izumi S, Okamura H, Paul WE, Nakanishi K : IL-18 induction of IgE : dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol* 1 : 132-137, 2000
- 44) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H : Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 12 : 53-72, 2001
- 45) Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H : Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest* 99 : 469-474, 1997
- 46) Rothe H, Hibino T, Itoh Y, Kolb H, Martin S : Systemic production of interferon-gamma inducing factor (IGIF) versus local IFN-gamma expression involved in the development of Th1 insulinitis in NOD mice. *J Autoimmun* 10 : 251-256, 1997
- 47) Tokui M, Shimada A, Funae O, Nomaguchi H, Okamura H, Takei I, Saruta T : Recombinant IL-18 administration suppresses cyclophosphamide-induced diabetes in NOD mice. *Diabetes* 47(Suppl.1) : A222, 1998
- 48) Rothe H, Hausmann A, Casteels K, Okamura H, Kurimoto M, Burkart V, Mathieu C, Kolb H : IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis. *J Immunol* 163 : 1230-1236, 1999
- 49) Aihara H, Miyazaki J : Gene transfer into muscle by

- electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 16 : 867-870, 1998
- 50) Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H : Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther* 6 : 808-815, 1999
- 51) Funae O, Shimada A, Tokui M, Takei I, Saruta T : Balance of GAD65-specific IL-10 production and polyclonal Th1-type response in type 1 diabetes. *Autoimmunity* 34 : 45-52, 2001
- 52) Casteels K, Waer M, Laureys J, Valckx D, Depovere J, Bouillon R, Mathieu C : Prevention of autoimmune destruction of syngeneic islet grafts in spontaneously diabetic nonobese diabetic mice by a combination of a vitamin D3 analog and cyclosporine. *Transplantation* 65 : 1225-1232, 1998
- 53) Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T, Narumi S : Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24 : 510-515, 2001
- 54) Yano S, Hotta Y, Takahashi S : Determination of endotoxin in injectable antibiotic preparations by the chromogenic assay method using a Limulus reagent (Tachypleus hemocyte lysate) and a chromogenic substrate. *J Clin Microbiol* 23 : 11-16, 1986
- 55) Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B : Chemokine receptor specific for IP10 and mig : structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 184 : 963-969, 1996
- 56) Tamaru M, Tominaga Y, Yatsunami K, Narumi S : Cloning of the murine interferon-inducible protein 10 (IP-10) receptor and its specific expression in lymphoid organs. *Biochem Biophys Res Commun* 251 : 41-48, 1998
- 57) Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, Murphy M, Liao F, Farber J, Cassatella MA : Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 162 : 4928-4937, 1999
- 58) Nishioji K, Okanoue T, Itoh Y, Narumi S, Sakamoto M, Nakamura H, Morita A, Kashima K : Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 123 : 271-279, 2001
- 59) Hoglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D : Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J Exp Med* 189 : 331-339, 1999
- 60) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL : Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247 : 1465-1468, 1990
- 61) Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J, Whalen RG : Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 4 : 733-740, 1993
- 62) Schofield JP, Caskey CT : Non-viral approaches to gene therapy. *Br Med Bull* 51 : 56-71, 1995
- 63) Davis HL, Michel ML, Whalen RG : Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Ann N Y Acad Sci* 772 : 21-29, 1995
- 64) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DL, Liu MA : Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259 : 1745-1749, 1993
- 65) Hoshino T, Kawase Y, Okamoto M, Yokota K, Yoshino K, Yamamura K, Miyazaki J, Young HA, Oizumi K : Cutting edge : IL-18-transgenic mice : *in vivo* evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. *J Immunol* 166 : 7014-7018, 2001
- 66) 森本二郎, 米山博之, 島田朗, 山田悟, 及川洋一, 松島綱治, 猿田亨男, 成見正作 : NOD マウスにおける抗 CXCL10 抗体の糖尿病発症抑制効果の検討. 日本免疫学会総会・学術集会記録, 33 : 283, 2003
- 67) Alleva DG, Pavlovich RP, Grant C, Kaser SB, Beller DI : Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains : elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes* 49 : 1106-1115, 2000
- 68) Jun HS, Yoon CS, Zbytniuk L, van Rooijen N, Yoon JW : The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 189 : 347-358, 1999
- 69) Piganelli JD, Martin T, Haskins K : Splenic macrophages from the NOD mouse are defective in the ability to present antigen. *Diabetes* 47 : 1212-1218, 1998
- 70) Serreze DV, Gaskins HR, Leiter EH : Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice. *J Immunol* 150 : 2534-2543, 1993
- 71) Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A, Soliven B, Arcella J, Girvin AM, Padilla J, Miller SD, Bluestone JA : Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med* 194 : 677-684, 2001
- 72) Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, Herold KC, Bluestone JA : Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody

treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181 : 1145-1155, 1995

73) Oikawa Y, Shimada A, Kasuga A, Morimoto J, Osaki T, Tahara H, Miyazaki T, Tashiro F, Yamato E,

Miyazaki J, Saruta T : Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice. *J Immunol* 171 : 5865-5875, 2003

学位論文

2型糖尿病の腎症進展・増悪に関する遺伝学的研究
—NADPH オキシダーゼ遺伝子および RAGE 遺伝子多型の関与—

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田亨男教授)

いり え せい 子
入江聖子

(平成 16 年 8 月 27 日受付)

Key Words : type 2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy, oxidative stress, gene polymorphism

糖尿病性腎症は糖代謝異常により発症・進展し、慢性の経過をたどる腎合併症である。臨床的にはアルブミン尿で発症し、徐々に顕性蛋白尿に進展し、腎不全にいたる経過を示すことが多い¹⁾。糖尿病性腎症は末期腎不全の主たる原因とされており、現在わが国の新規透析導入患者の原因疾患の第一位を占め、なお増加傾向を示している。糖尿病性腎症の発症・進展には網膜症、神経障害と同様長期的な血糖コントロールの不良が主要な原因となっていることは議論のないところであり²⁾、加えて高血圧、高脂血症、蛋白過剰摂取などの関連も指摘されている³⁾。また、家族内集積が認められること⁴⁾、人種により罹患率に差があること⁵⁾などから遺伝因子もその一因であると推測されている。現在のところ、糖尿病性腎症に影響を与える遺伝子群について明らかなものはないが、候補遺伝子として糖代謝、脂質代謝、血圧調節、糸球体構成成分に関与する遺伝子⁶⁾などに加え、superoxide dismutase 2⁷⁾、paraoxonase2⁸⁾などの酸化ストレスに関与している遺伝子と糖尿病性腎症の関連も報告されている。

酸化ストレスとは、生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ前者に傾いた状態と定義され、近年、酸化ストレスの亢進が糖尿病患者の細小血管障害や大血管障害の発症・進展に強く関わっていることが明らかになってきている⁹⁾。高血糖状態においては、ポリオール代謝の活性化¹⁰⁾、終末糖化産物 (advanced glycation end-product: 以下 AGE と略す) の形成および AGE 受容体 (receptor for AGE: 以下 RAGE と略す) の関与¹¹⁾、ミトコンドリア伝達系の関与¹²⁾、そしてプロテインキナー

ゼ C の活性化とそれに伴う nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (以下 NADPH と略す) オキシダーゼの活性化による活性酸素産生¹³⁾が酸化ストレス亢進の原因として注目されている。

NADPH オキシダーゼは好中球やマクロファージなどの貪食細胞、血管平滑筋細胞、腎メサンギウム細胞などにおいてスーパーオキシドを産生している膜型酵素である¹⁴⁾。NADPH オキシダーゼは貪食細胞型を中心に研究が進んでおり、免疫機構に重要な役割を果たす酵素と考えられているが、酵素活性を担う細胞膜貫通型蛋白チトクローム b558 を構成する gp91phox, p22phox, および細胞質分画に存在する p47phox, p67phox, p40phox および small G protein rac から構成され、そのうち p22phox の遺伝的欠損は慢性肉芽腫症の原因であることが知られている¹⁵⁾。またこの p22phox は貪食細胞系、血管細胞系に共通したコンポーネントであることも明らかにされている¹⁶⁾。近年、NADPH オキシダーゼ p22phox C242T 遺伝子多型が冠動脈疾患の頻度¹⁷⁾とその患者における血管壁におけるスーパーオキシドの産生¹⁸⁾に関連していると報告され、本多型の血管障害における重要性が注目されるようになった。さらに糖尿病性腎症に関して Etoh らにより、糖尿病ラットにおいて腎メサンギウム細胞に p22phox の発現が強く認められることが報告された¹⁹⁾。

一方、AGE は糖尿病性網膜症、腎症の進展・増悪における一因となることが推測されている。AGE の組織障害機序としては、非酵素的なグリケーションや蛋白の架橋形成による直接の細胞外マトリックス構造変化に伴う組織障害メカニズムに加え、AGE を特異的リガンド

とする AGE 特異的細胞表面受容体によって仲介される細胞応答の機序が考えられている²⁰⁾。AGE 特異的細胞表面受容体には、RAGE をはじめ 60kDa 蛋白 oligo-saccharyltransferase (OST-48)²¹⁾、90kDa 蛋白 80K-H²¹⁾、32kDa 蛋白ガレクチン 3²²⁾、スカベンジャー受容体ファミリークラス A²³⁾、クラス B²⁴⁾などが知られている。RAGE は血管内皮細胞、平滑筋細胞、腎メサンギウム細胞などに発現が認められ²⁵⁾、生理的条件下ではその発現は低い、AGE 蓄積部位では RAGE の発現増強が認められ糖尿病状態で発現が増強されることが知られており²⁶⁾、その AGE-RAGE 系シグナルが糖尿病性細小血管障害に関与していると考えられている²⁷⁾。RAGE 遺伝子に関して多くの遺伝子多型の報告²⁸⁻³²⁾があるが、イントロンに位置する G1704T 遺伝子多型は糖尿病患者の細小血管性皮膚炎、酸化状態と関連していることが報告されている^{31, 32)}。さらに近年、AGE 刺激による RAGE の活性酸素産生は NADPH オキシダーゼを介していることが示唆されている³³⁾。

そこで本研究³⁴⁾では、日本人 2 型糖尿病患者を対象とし、糖尿病性腎症における NADPH オキシダーゼ p22phox 遺伝子 C242T 多型と RAGE 遺伝子 G1704T 多型の臨床的意義について検討した。

対象と方法

1990 年より埼玉社会保険病院にて定期的に外来で経過観察されており、世界保健機構 (WHO) の基準³⁵⁾により診断された 2 型糖尿病患者 691 名を対象とした。このうち以下に示す基準を満たす 181 名を対象患者として登録し、糖尿病性腎症のない正常群 108 名 (グループ N) と、糖尿病性腎症の発症進展を認めた進行群 73 名 (グループ D) の 2 群に分類した。グループ N は以下の定義、すなわち、1) 2 型糖尿病と診断されて 10 年以上経過しており、2) 経過観察期間を通して正常アルブミン尿である患者、を満たすものとした。一方、グループ D は以下の定義、すなわち、1) 経過観察のはじめの段階で正常アルブミン尿 (ステージ 0) あるいは微量アルブミン尿 (ステージ 1) の患者、2) 経過観察中に、正常アルブミン尿 (ステージ 0) から微量アルブミン尿 (ステージ 1) あるいは顕性蛋白尿 (ステージ 2)、あるいは微量アルブミン尿 (ステージ 1) から顕性蛋白尿 (ステージ 2) に進行した患者、を満たすものとした。腎症のステージは尿中微量アルブミン値を基に、正常アルブミン尿 <20mg/gCr をステージ 0、微量アルブミン尿 30-300 mg/gCr をステージ 1、顕性蛋白尿 >300

mg/gCr をステージ 2 と分類した。微量アルブミン 20-30 mg/gCr の糖尿病患者は境界線領域と考え本研究からは除外した。糖尿病以外の腎障害の患者を除外するために、顕微鏡的血尿、臨床的膿尿、尿培養による細菌感染を認めた患者は本研究から除外した。糖尿病性網膜症は、少なくとも 1 年に 1 回は眼科医によって診断した。糖尿病性網膜症のステージは単純性、前増殖性、増殖性に分類した。HbA1c 値、脂質、血圧、微量アルブミン値は少なくとも 1 年に 1 回は測定した。糖尿病発症年齢、糖尿病診断時の Body mass index (以下 BMI と略す)、糖尿病診断後の罹病期間、HbA1c 値、血圧、脂質、糖尿病治療歴などの臨床データは医事記録より得た。インフォームドコンセントは本研究の目的、性質、すべての手順での危険性を説明した上で本研究への同意を得た患者より得た。本研究のプロトコールは埼玉社会保険病院の倫理委員会により承認された。

検体収集と p22phox 多型と RAGE 多型の解析

DNA は 181 名の患者の末梢白血球より抽出・精製した³⁶⁾。NADPH オキシダーゼ p22phox 遺伝子 C242T 遺伝子変異はエクソン 4 に存在しており、

Taqman polymerase chain reaction (以下 PCR と略す) 法³⁷⁾により同定した。Forward プライマーは 5'-TTC CTC CCT CCC CCA GG-3'、reverse プライマーは 5'-CCT GGT AAA GGG CCC GAA-3'を使用し、また T-アレル特異的プローブは、5'-Vic-ACA GAA GTA CAT GAC CG-3' ; C-アレル特異的プローブは、5'-Fam-AGA AGC ACA TGA CCG-3'を使用した。RAGE 遺伝子 G1704T 遺伝子変異はイントロン 7 に存在しており、同じく TaqmanPCR 法により同定した。Forward プライマーは 5'-AGG ATG TGA GTG ACC TGG AGA GA-3'、reverse プライマーは 5'-TCA GCT CCT AGC CTG CCT TTC-3'を使用し、また T-アレル特異的プローブは 5'-Vic-CCA TAA CTA TCA ACA GGG-3 ; G-アレル特異的プローブは 5'-Fam-CAT AAC TAG CAA CAG GG-3'を使用した。反応組成は Universal Master Mix (Applied Bio System ; USA) 12.5 μl、プライマー各 22.5pmol、プローブ各 5 μmol とし、蒸留水を加えて全量で 25 μl として反応させた。PCR は ABI Prism 7700 を用いて 50°C 2 分 1 サイクル、95°C 15 分 1 サイクルの後、95°C 15 秒、58°C 1 分 (p22phox) /60°C 1 分 (RAGE) を 40 サイクルで行った。

統計学的解析

本研究のサンプルサイズはパイロット研究をもとに確立した。p22phox に関しては、パイロット研究では CT+TT の患者の頻度はグループ D で 0.10 であるのに対し、グループ N は 0.28 であった。この値より 2 群間の比較において 80% の検出力で有意な結果を得るために必要なサンプルサイズは 59 であった。また RAGE に関しては、パイロット研究では GT+TT の患者の頻度はグループ D で 0.30 であるのに対し、グループ N は 0.13 であった。この値より 2 群間の比較において 80%

の検出力で有意な結果を得るために必要なサンプルサイズは 72 であった。

すべてのデータは平均値±標準偏差として示した。平均値の統計学的有意差は Student t 検定あるいは Mann-Whitney U 検定を使用した。各群におけるアレルまたは遺伝子多型の頻度の比較には χ^2 検定を使用した。ロジスティック多重回帰分析はオッズ比の計算および遺伝子多型をその他の危険因子の関連性の評価に用いた。すべての統計学的解析には Statview ソフトウェア (Ver5.0J, SAS インスティテュート社, 米国カリフォルニア州) を使用した。

第 1 表 各群の臨床的特徴

	Group N (n=108)	Group D (n=73)	p
Sex (M/F) (n)	52/56	39/34	NS
Onset age (years)	44.3±7.2	45.2±8.2	NS*
Disease duration (years)	18.4±5.4	18.5±5.5	NS*
BMI at onset (Kg/m ²)	23.4±3.7	24.0±3.2	NS
HbA1c (%)	7.3±1.1	8.0±1.2	0.0002
Total cholesterol (mmol/l)	5.11±0.73	5.15±0.78	NS
Triglyceride (mmol/l)	1.25±0.73	1.53±0.97	0.0137*
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.08±0.71	3.06±0.74	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	134.0±15.2	149.6±18.0	<0.0001
Diastolic blood pressure (mmHg)	81.2±8.8	86.2±9.5	0.0004
Retinopathy (%)	43	67	0.0014
Medication (diet/OHA/insulin) (n)	43/36/29	9/29/34	0.0002

表の数値は平均値±標準偏差を示す。* Mann-Whitney U test で検討した。OHA：経口血糖降下薬 (Matsunaga-Irie et al : Diabetes Care 27 : 303-307, 2004 Table 1 を許可を得て転載)

第 2 表 p22phox C242T と RAGE G1704T 遺伝子多型の頻度

		Group N	Group D	χ^2	p
p22phox242	CC	85 (79%)	66 (90%)	4.318	0.0427
	CT+TT	23 (21%)	7 (10%)		
RAGE1704	GG	94 (87%)	54 (74%)	4.987	0.0313
	GT+TT	14 (13%)	19 (26%)		

(Matsunaga-Irie et al : Diabetes Care 27 : 303-307, 2004 Table 2 を許可を得て転載)

第3表 糖尿病性腎症危険因子のロジスティック多重回帰分析

Variables	OR (95% CI)	p
HbA1c (%)	1.50 (1.10-2.03)	0.0089
Triglyceride (mmol/l)	1.01 (1.00-1.01)	0.041
Systolic blood pressure (mmHg)	1.06 (1.04-1.09)	<0.0001
Retinopathy	1.87 (0.89-3.91)	0.0976
p22phox CC	2.45 (0.85-7.12)	0.0991
HbA1c (%)	1.54 (1.13-2.10)	0.0069
Triglyceride (mmol/l)	1.01 (1.00-1.01)	0.0639
Systolic blood pressure (mmHg)	1.06 (1.04-1.09)	<0.0001
Retinopathy	1.85 (0.88-3.91)	0.1049
RAGE GT+TT	2.47 (0.99-6.17)	0.0522

独立変数：発症年齢，罹病期間，診断時 BMI，HbA1c，総コレステロール 中性脂肪，収縮期血圧，網膜症の有無，p22phox および RAGE 遺伝子多型，網膜症；無=0，有=1，p22phox 遺伝子多型；CT+TT=0，CC=1 RAGE 遺伝子多型 GG=0，GT+TT=1

第4表 各群における p22phox C242T と RAGE G1704T 遺伝子多型の組み合わせの頻度

p22phox and RAGE	Group N	Group D	χ^2	p
CT+TT and GG	18 (17%)	54 (5%)		
CT+TT and GT+TT/CC and GG	81 (75%)	53 (73%)		
CC and GT+TT	9 (8%)	16 (22%)	10.338	0.0057

(Matsunaga-Irie et al : Diabetes Care 27 : 303-307, 2004 Table 3 を許可を得て転載)

第5表 糖尿病性腎症危険因子のロジスティック多重回帰分析

Variables	OR (95% CI)	p
HbA1c (%)	1.54 (1.13-2.10)	0.0034
Triglyceride (mmol/l)	1.01 (1.00-1.01)	0.0388
Systolic blood pressure (mmHg)	1.06 (1.03-1.09)	<0.0001
Retinopathy	1.78 (0.83-3.80)	0.067
p22phox CC and RAGE GT+TT	2.93 (1.34-6.41)	0.0073

独立変数：発症年齢，罹病期間，診断時 BMI，HbA1c，総コレステロール，中性脂肪 網膜症の有無，p22phox and RAGE 遺伝子多型，収縮期血圧 R^2 (決定係数) =0.267, $p<0.0001$ 網膜症の有無；無=0，有=1 p22phox と RAGE 遺伝子多型；CT+TT and GG=0，CT+TT and GT+TT/CC and GG=1，CC and GT+TT=2.

(Matsunaga-Irie et al : Diabetes Care 27 : 303-307, 2004 Table 4 を許可を得て転載)

結 果

第1表に登録した患者の臨床的特徴を示した。HbA1c値、脂質、血圧、糖尿病治療歴、網膜症の有無を含む臨床データは2001年に測定したものを使用した。糖尿病発症年齢、糖尿病診断後の罹病期間、糖尿病診断時のBMI、総コレステロールおよびLDLコレステロールに関しては2群間で有意な差は認めなかったが、血圧、HbA1c値、中性脂肪値、網膜症を有する患者の割合、糖尿病治療群の割合はグループDにおいてグループNよりも有意に高値を示した。

各群におけるこれらの遺伝子多型の分布を第2表に示した。多型の頻度は両群においてHardy-Weinbergの法則に合致していた。p22phoxのCC、CT、TTのゲノタイプの割合は、グループNにおいて79%、20%、1%であり、グループDにおいて90%、8%、2%であった。Cアレル、Tアレルの頻度はグループDで95%と5%であるのに対し、グループNでは89%と11%であった。TTゲノタイプの頻度は少なかったため、登録患者をCC群とCT+TT群の2群に分けることとした。CT+TTの頻度はグループNにおいてグループDより有意に高値を示した(第2表; $\chi^2=4.318$, $p=0.0427$, 2×2)。加えて、糖尿病発症年齢、糖尿病診断後の罹病期間、糖尿病診断時のBMI、HbA1c値、総コレステロール値、中性脂肪値、血圧、網膜症の有無、p22phox遺伝子多型を独立変数としてロジスティック多重回帰分析を行ったところ、HbA1c値、収縮期血圧値、中性脂肪値は糖尿病性腎症の発症、進展に関する独立した危険因子であることが示されたが、p22phox CCは独立した危険因子とは認められなかった(第3表)。RAGEのGG、GT、TTのゲノタイプの割合はグループNにおいて87%、12%、1%であり、グループDにおいて74%、23%、3%であった。Gアレル、Tアレルの頻度はグループDで87%と13%であるのに対し、グループNでは93%と7%であった。TTゲノタイプの頻度は少なかったため、登録患者をGG群とGT+TT群の2群に分けることとした。GT+TTの頻度はグループDにおいてグループNより有意に高値を示した(第2表; $\chi^2=4.987$, $p=0.0313$, 2×2)。加えて、前述の項目およびRAGE遺伝子多型を独立変数としてロジスティック多重回帰分析を行ったところ、HbA1c値、収縮期血圧値が糖尿病性腎症の発症、進展に関する独立した危険因子であることが示されたが、RAGE GT+TTは独立した危険因子とは認められなかった(第3表)。

次にこれらの遺伝子多型の組み合わせと糖尿病性腎症との関連性について解析を行った。第2表の結果に基づきこれらのゲノタイプの組み合わせを糖尿病性腎症の進展を予測する危険因子として、高リスク群(p22phox CCとRAGE GT+TT)、中リスク群(p22phox CCとRAGE GG、p22phox CT+TTとRAGE GT+TT)、低リスク群(p22phox CT+TTとRAGE GG)の3群に分類した。グループDにおけるp22phox CCとRAGE GT+TT(高リスク群)の割合はグループNに比して有意に高値を示した($\chi^2=10.338$, $p=0.0057$, 2×3)(第4表)。加えてロジスティック多重回帰分析を行ったところHbA1c値、中性脂肪値、収縮期血圧値に加え、p22phox CCとRAGE GT+TTの組み合わせも独立した危険因子であることが認められた($p=0.0073$)(第5表)。これらの解析によりこの遺伝子多型の組み合わせは糖尿病性腎症の発症進展における重要な危険因子であることが示された。

考 案

糖尿病性腎症は糖尿病患者の死因の10~15%を占め、糖尿病慢性合併症の中でも予後を規定する重要な疾患の一つである。その成因には遺伝素因の関与が想定され、さまざまな候補遺伝子が検討されている²⁾。糖尿病性腎症の発症・進展には血糖コントロール、血圧コントロールとは独立して個人差があることをふまえ、著者もその一因として遺伝的素因があると予測し遺伝子多型を検討することとした。

糖尿病性腎症は臨床的にアルブミン尿で発症し、徐々に進行して腎不全にいたる経過を示すことが多い。2型糖尿病においては、アルブミン尿を発症した患者の20~40%が5~10年の経過で顕性蛋白尿に進展するものの、その後20年の間に末期腎不全にいたる患者は20%程度であると報告されている²⁾。蛋白尿が糖尿病性腎症に由来するものか、他の腎疾患の偶発合併かを鑑別する必要があり、確定診断を下すためには腎生検が望ましいとされているが、すべての症例に行うことは困難である。そこで診断は、罹病期間、血糖を含めた血液化学検査、尿所見(血尿、膿尿の有無)、眼底所見などを参考にして臨床的判断が下されることが多い。糖尿病性網膜症は通常糖尿病性腎症に先行して生じるとされ、糖尿病性腎症の診断の上で重要であるとされているが、網膜症を欠く2型糖尿病患者に腎生検を施行し70%に糖尿病性変化を認めたとの報告もあり^{38, 39)}完全とはいえない。そこで本研究では網膜症の有無を必須条件とはせず、臨

床経過から糖尿病性腎症と考えられる症例を選択するため、10年間以上のアルブミン尿の経過を追った。その中で微量アルブミン尿の漸増が認められ、糖尿病性腎症の経過と考えられた患者を進行群(グループD)とした。そして正常群(グループN)と進行群を臨床的に比較したところ、糖尿病性腎症の原因と考えられている血圧、中性脂肪値、HbA1c値が進行群で有意に高く、このことはこの2群の分類の正当性を裏付けるものと考えられた。

そこで、この2群において遺伝子多型の検討をすることとし、その中でも近年糖尿病性腎症との関与が注目されている酸化ストレスに関連したNADPHオキシダーゼおよびRAGEについて検討した。

NADPHオキシダーゼは近年、血管壁における酸化ストレス亢進に重要な役割を果たしていると考えられている膜型酵素であり、Guzikらは糖尿病患者におけるヒト血管壁でのスーパーオキシドの産生はPKCを介したNADPHオキシダーゼ活性によると報告した^{18, 40)}。そのp22phoxのC242T多型はヘム結合部位に位置しており、72番目のヒスチジン残基をタイロシンに変化させるアミノ酸変異である⁴¹⁾。ヒスチジン残基はチトクロームbのヘム補欠分子群のリガンドの候補と考えられており⁴²⁾、この遺伝子多型は直接的にp22phoxの機能、NADPHオキシダーゼの酵素活性と関連していると推測されている⁴²⁾。Inoueらは日本人における心血管疾患のリスクは242Tアレルを有している方が低いと報告している¹⁷⁾が、他の研究者たちは心血管疾患、脳血管疾患においてさまざまな見解を示している⁴³⁻⁴⁶⁾。また、Guzikらは動脈硬化の患者の大伏在静脈を用いてTアレルを有する患者がNADPH誘導性の血管スーパーオキシド産生が有意に低下していることを報告している¹⁸⁾。このことは、本多型が血管壁において機能的な役割を果たしていることを証明するものであり、242Tアレルを有する患者は242Cアレルを有する患者に比しスーパーオキシド産生が低下している結果として血管障害が軽減しているのではないかと考えられている。またNakanoらは糖尿病患者においてCT+TTを有する群がCCを有する群に比し有意に酸化HDLの産生が低いことを報告している⁴⁹⁾。本研究では242Tを有している患者が糖尿病性腎症の進展のリスクが低いことを示したが、この結果はNADPHオキシダーゼの機能に関する現在までの報告や1型糖尿病患者における腎症と本多型との関連性との報告とも一致している⁵⁰⁾。更に、今回我々は本多型の生体における酸化ストレスに対する影響を検討するため、対象者のうち129名(正常群79名、進行群50

名)の早朝随時尿の尿中8-Hydroxydeoxy-Guanosineの測定を行ったが、2群間で有意な差が認められなかった。この原因としては、24時間尿ではなく随時尿での検討であったこと、既に一部の患者は抗酸化作用を有していると考えられている薬剤を服用していたことなどが影響していたと考えられるが、今後本多型の機能、酵素活性などについて更なる検討を要すると考えられた。なお、本研究でのコントロール群のTアレルの頻度は0.11であったが、この値は日本人の以前の報告と近似していた^{17, 45, 48)}。

AGEは、持続的な高血糖により生体内で形成される物質であり、糖尿病血管障害の発生に関わる可能性が示唆されている。AGEが糖尿病性腎症の病態生理に役割を果たしていることが明らかになってきており、AGE形成阻害薬のアミノグアニジンやOPB-9195といった薬剤が糖尿病性腎症の予防に効果的であることが報告されている^{51, 52)}。AGEが糖尿病合併症の発症進展に関わるメカニズムの一つとしてRAGEをはじめとしたAGEを特異的リガンドとするいくつかの細胞表面受容体に結合することにより細胞応答を引き起こすことが考えられている²⁰⁾。Yamamotoらにより、血管内皮細胞にRAGEを過剰発現させたトランスジェニックマウスとインスリン依存性糖尿病発症トランスジェニックマウスを交配させたダブルトランスジェニックマウスでは同程度の血糖コントロールにも関わらず糖尿病性腎症の有意な進行を認めたことが報告された⁵³⁾。このことは、AGE-RAGE系が糖尿病性腎症の発症進展に機能的に関与していることを示している。メサンギウム細胞や壁細胞におけるAGE-RAGE系の相互関係は酸化ラジカルの生成に影響し、続くNF- κ Bの活性化や催炎症性サイトカイン、接着分子の放出を促し、メサンギウム細胞のコラーゲン遺伝子の発現へと導くとされている⁵⁴⁾。RAGEにはいくつかの多型が報告されているが、G1704T遺伝子多型は糖尿病患者の細小血管性皮膚炎、抗酸化状態と関連していることが報告されている^{31, 32)}。RAGE1704Tアレルを有している患者は1704Gアレルを有している患者に比しいくつかの抗酸化物質(トータルカロチン、ルテイン、リコピン、トコフェロール)の血清レベルが有意に低く、このことは、本遺伝子多型が酸化ストレス制御と関与していることを示しており、1704Tアレルを有している患者が糖尿病性腎症の発症進展のハイリスク群であるという本研究の結果を支持するものである。イントロン部位の機能的な役割は明らかではないが、オルタナティブスプライシングやmessenger RNA安定性の変化、近接のコーディングsingle

nucleotide polymorphism (SNP) とのリンケージなどのメカニズムに影響する可能性が考えられる。

本研究では、生体での両者の役割を考え、糖尿病性腎症の感受性と p22phox C242T, RAGE G1704T 遺伝子多型の組み合わせの関連性も検討した。p22phox CC と RAGE GT+TT ゲノタイプの組み合わせを有する患者は p22phox CT+TT と RAGE GG ゲノタイプの組み合わせを有する患者よりも有意に糖尿病性腎症の危険性が高いことを示した。本研究では p22phox 遺伝子多型単独では糖尿病性腎症の感受性との関連性は弱い ($p=0.991$) が p22phox と RAGE の遺伝子多型を組み合わせることによってより有意な糖尿病性腎症との関連性が示された。NADPH オキシダーゼと RAGE はともにメサングウム細胞に発現していることが知られており、近年 AGE が RAGE に結合した後、NADPH オキシダーゼを活性化し活性酸素を産生し、p21^{ras}, erk1/2/MAPK, NF- κ B などのシグナルを活性化するという機序が報告されている³³⁾。本研究は、こうした NADPH オキシダーゼと RAGE の関連性の報告を支持するものと考えられる。

結論として、NADPH オキシダーゼ p22phox C242T と RAGE G1704T 遺伝子多型の組み合わせは糖尿病性腎症の発症・進展と関係していることを提唱した。微量アルブミンが糖尿病性腎症の最もよい予知因子であることは明らかである⁵⁶⁾。しかしながら本研究のような遺伝子多型に基づくリスクアセスメントも重要であると提唱する。糖尿病性腎症の候補遺伝子として数多くの報告がなされているがいずれも決定的なものではなく、複数の遺伝子による複合的な関与が考えられる。こうした遺伝子多型から糖尿病性腎症の発症・進展の危険性を予知し、腎症予防により有効な治療を必要とする患者を同定するため、今後本研究をもとに更なる研究を行う必要があると考えられた。

総 括

酸化ストレスと糖尿病性腎症の関連性に注目し、NADPH オキシダーゼ p22phox 遺伝子、RAGE 遺伝子 G1704T 多型と糖尿病性腎症の発症・進展の関連性に関して日本人 2 型糖尿病患者 181 名を対象として検討し、以下の結論を得た。

1. NADPH オキシダーゼ p22phox 遺伝子 C242T 多型において C アレルを有している患者が糖尿病性腎症の発症・進展のリスクが有意に高いことが示された。
2. RAGE 遺伝子 G1704T 遺伝子多型において T アレ

ルを有している患者が糖尿病性腎症の発症・進展のリスクが有意に高いことが示された。

3. 両遺伝子多型の組み合わせで検討したところ、p22phox CC と RAGE GT+TT ゲノタイプの組み合わせを有する患者は p22phox CT+TT と RAGE GG ゲノタイプの組み合わせを有する患者よりも有意に糖尿病性腎症の危険性が高いことが示された。またロジスティック多重回帰分析を行ったところ HbA1c 値、中性脂肪値、収縮期血圧値と並びこの遺伝子多型の組み合わせも独立した危険因子であることが認められた。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご高関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、本研究に関してご指導、ご高関を頂きました埼玉社会保険病院内科丸山太郎先生に深謝いたします。ご協力いただきました研究室の諸先生方に感謝いたします。

本論文は、Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, Murata M, Saruta T : Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27 : 303-307, 2004 の一部を含む。

文 献

- 1) Krolewski AS, Warram JH : Natural history of diabetic nephropathy. *Diabetes Reviews* 3 : 446-459, 1995
- 2) American Diabetes Association : Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* 25 Suppl 1 : S85-89, 2000
- 3) Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J : Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 320 : 1161-1165, 1989
- 4) Teutsch S, Newman J, Eggers P : The problem of diabetic renal failure in the United States : an overview. *Am J Kidney Dis* 13 : 11-13, 1989
- 5) Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR : UKPDS GROUP : Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes : the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 63 : 225-232, 2003
- 6) Chowdhury TA, Dyer PH, Kumar S, Barnett AH, Bain SC : Genetic determinants of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 96 : 221-230, 1999
- 7) Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L, Nagasaka K, Sakai K, Ogihara T, Nakajima K, Watada H, Kawamori R : The polymorphism of manganese superoxide dismu-

- tase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *J Hum Genet* 48 : 138-141, 2003
- 8) Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, Temler E, Gaillard RC, Ruiz J : Paraoxonase2 polymorphisms are associated with nephropathy in Type II diabetes. *Diabetologia* 44 : 104-107, 2001
 - 9) Baynes JW, Thorpe SR : Role of oxidative stress in diabetic complications : a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48 : 1-9, 1999
 - 10) Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK : Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 14 : S233-236, 2003
 - 11) Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, Watanabe T, Tanaka N, Li H, Rahman AK, Myint KM, Kim CH, Yamamoto H : The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14 : S259-263, 2003
 - 12) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M : Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404 : 787-790, 2000
 - 13) Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H : High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49 : 1939-1945, 2000
 - 14) Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M : NAD(P)H oxidase : role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86 : 494-501, 2000
 - 15) Babior BM : NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16 : 42-47, 2004
 - 16) Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK : p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271 : 23317-23321, 1996
 - 17) Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M : Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* 97 : 135-137, 1998
 - 18) Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM : Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 102 : 1744-1747, 2000
 - 19) Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H : Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment. *Diabetologia* 46 : 1428-1437, 2003
 - 20) Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R, Arnold B, Nawroth PP, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM : Glucose, glycation, and RAGE : implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14 : 1383-1395, 2003
 - 21) Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H : Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors : relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 11047-11052, 1996
 - 22) Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A : Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE) : a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med* 1 : 634-646, 1995
 - 23) Horiuchi S, Higashi T, Ikeda K, Saishoji T, Jinnouchi Y, Sano H, Shibayama R, Sakamoto T, Araki N : Advanced glycation end products and their recognition by macrophage and macrophage-derived cells. *Diabetes* 45 : S73-76, 1996
 - 24) Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H : Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 276 : 3195-3202, 2001
 - 25) Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D : RAGE : a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* 45 Suppl 3 : S77-80, 1996
 - 26) Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, Allenberg J, Otto G, Roth H, Bierhaus A : Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol* 146 : 688-694, 1995
 - 27) Yamamoto Y, Yamagishi S, Yonekura H, Doi T, Tsuji H, Kato I, Takasawa S, Okamoto H, Abedin J, Tanaka N, Sakurai S, Migita H, Unoki H, Wang H, Zenda T, Wu PS, Segawa Y, Higashide T, Kawasaki K, Yamamoto H : Roles of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 902 : 163-170, 2000
 - 28) Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI, Perola M, Grant PJ, Groop PH : Finn-Diane Study Group. The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 52 : 891-894, 2003
 - 29) Poirier O, Nicaud V, Vionnet N, Raoux S, Tarnow L, Vlassara H, Parving HH : Cambien Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation

- end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 50 : 1214-1218, 2001
- 30) Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ : Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 50 : 1505-1511, 2001
- 31) Kankova K, Zahejsky J, Marova I, Muzik J, Kuhrova V, Blazkova M, Znojil V, Beranek M, Vacha J : Polymorphisms in the RAGE gene influence susceptibility to diabetes-associated microvascular dermatoses in NIDDM. *J Diabetes Complications* 15 : 185-192, 2001
- 32) Kankova K, Marova I, Zahejsky J, Muzik J, Stejskalova A, Znojil V, Vacha J : Polymorphisms 1704G/T and 2184A/G in the RAGE gene are associated with antioxidant status. *Metabolism* 50 : 1152-1160, 2001
- 33) Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL : Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 : E685-694, 2001
- 34) Matsunaga-Irie S, Maruyama T, Yamamoto Y, Motohashi Y, Hirose H, Shimada A, Murata M, Saruta T : Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27 : 303-307, 2004
- 35) Alberti KG, Zimmet PZ : Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1 : Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15 : 539-553, 1998
- 36) Blin N, Stafford DW : A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryocytes. *Nucleic Acids Res* 3 : 2303-2308, 1976
- 37) Whitcombe D, Brownie J, Gillard HL, McKechnie D, Theaker J, Newton CR, Little S : A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons : its application to real-time, single-tube genotyping. *Clin Chem* 44 : 918-923, 1998
- 38) Christensen PK, Larsen S, Horn T, Olsen S, Parving HH : Causes of albuminuria in patients with type 2 diabetes without diabetic retinopathy. *Kidney Int* 58 : 1719-1731, 2000
- 39) Kanauchi M, Kawano T, Uyama H, Shiiki H, Dohi K : Discordance between retinopathy and nephropathy in type 2 diabetes. *Nephron* 80 : 171-174, 1998
- 40) Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM : Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus : role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxidase synthase. *Circulation* 105 : 1656-1662, 2002
- 41) Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH : Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 86 : 1729-1737, 1990
- 42) Wolin MS : How could a genetic variant of the p22 phox component of NAD(P)H oxidases contribute to the progression of coronary atherosclerosis? *Circ Res* 86 : 365-366, 2000
- 43) Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W : The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 145 : 315-323, 1999
- 44) Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ : A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res* 86 : 391-395, 2000
- 45) Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, Fukuuchi Y : C242T polymorphism of NADPH oxidase p22 PHOX gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke* 31 : 936-939, 2000
- 46) Stanger O, Renner W, Khoschsorur G, Rigler B, Wascher TC : NADH/NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease. *Clin Physiol* 21 : 718-722, 2001
- 47) Cai H, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL : NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur J Clin Invest* 29 : 744-748, 1999
- 48) Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Hatazaki M, Hazama Y, Hori M : Association of NAD(P)H oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26 : 458-463, 2003
- 49) Nakano T, Matsunaga S, Nagata A, Maruyama T : NAD(P)H oxidase p22phox Gene C²⁴²T polymorphism and lipoprotein oxidation. *Clin Chim Acta* 335 : 101-107, 2003
- 50) Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG : Association of the p22phox component of NAD(P)H oxidase with susceptibility to diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26 : 3111-3115, 2003
- 51) Soulis T, Cooper ME, Vranes D, Bucala R, Jerums G : Effects of aminoguanidine in preventing experimental diabetic nephropathy are related to the duration of treatment. *Kidney Int* 50 : 627-634, 1996
- 52) Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, Kawata T, Koike T : Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is

- prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes* 46 : 895-899, 1997
- 53) Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H : Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest* 108 : 261-268, 2001
- 54) Heidland A, Sebekova K, Schinzel R : Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis* 38 : S100-106, 2001
- 55) Parving HH, Chaturvedi N, Viberti G, Mogensen CE : Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy? *Diabetes Care* 25 : 406-407, 2002
-

慶應医学 第82巻第1号号外
平成17年3月25日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第175号

慶應義塾大学

論文の内容および審査要旨公表

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

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成16年12月13日 慶大博士甲第2318号	足立雅之	昭和46年6月30日
平成17年1月17日 慶大博士甲第2323号	大田孝幸	昭和46年8月14日
平成17年2月14日 慶大博士甲第2349号	小林佐紀子	昭和48年8月15日
同 同 第2350号	鈴木美佐子	昭和48年3月5日

論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科の行う論文博士の審査および試験に合格した次の者に対し、博士（医学）の学位を授与したので学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成16年12月13日 慶大博士乙第3862号	秋山芳伸	昭和38年6月10日
同 同 第3863号	及川洋一	昭和45年7月24日
同 同 第3864号	北村誠司	昭和36年12月7日
同 同 第3865号	小林絵美	昭和48年2月27日
同 同 第3866号	土岐めぐみ	昭和44年4月5日
同 同 第3867号	渡邊宏治	昭和39年7月27日
平成17年1月17日 慶大博士乙第3870号	安西秀美	昭和43年5月30日
同 同 第3871号	齊藤英子	昭和40年12月31日
同 同 第3872号	谷垣伸治	昭和45年3月11日

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成17年 1月17日 慶大博士乙第3873号	伯野春彦	昭和45年 7月15日
同 同 第3874号	矢島賢	昭和46年 2月21日
平成17年 2月14日 慶大博士乙第3882号	東宏一郎	昭和47年10月25日
同 同 第3883号	石川光也	昭和44年 2月 5日
同 同 第3884号	入江潤一郎	昭和47年 2月25日
同 同 第3885号	江下忠彦	昭和44年 1月10日
同 同 第3886号	小川健夫	昭和47年 4月12日
同 同 第3887号	栗村誠	昭和33年 7月23日
同 同 第3888号	小浦優佳子	昭和46年 5月14日
同 同 第3889号	小宮山慎一	昭和41年 5月22日
同 同 第3890号	小見山貴継	昭和44年10月27日
同 同 第3891号	鈴木竜司	昭和44年 5月14日
同 同 第3892号	多田由布子	昭和44年 5月16日
同 同 第3893号	田中京子	昭和45年 1月26日
同 同 第3894号	寺内正子	昭和42年10月 2日
同 同 第3895号	前田憲男	昭和44年 1月27日
同 同 第3896号	松本幸裕	昭和42年 7月 6日
同 同 第3897号	山崎智	昭和37年 9月18日
同 同 第3898号	山本幸宏	昭和46年 6月30日
同 同 第3899号	横山剛義	昭和44年 1月18日

目 次

足立 雅之	<p>Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. (急性アルコール投与によるラット肝細胞アポトーシスにおけるBaxと電位依存性アニオンチャンネルの相互作用) …………… 5</p>
大田 孝幸	<p>Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. (末梢抗原(デスモグレイン3)に対する自己反応性B細胞はトレランスのメカニズムから逃れられる) …………… 6</p>
小林佐紀子	<p>Ubc9 interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor 1 and represses receptor-dependent transcription. (Ubc9はchicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor 1と結合し、受容体依存性の転写活性を抑制する) …………… 7</p>
鈴木美佐子	<p>Von Willebrand因子切断酵素(ADAMTS-13)の発現部位に関する検討…………… 8</p>
秋山 芳伸	<p>B7/CTLA4 PATHWAY IS ESSENTIAL FOR GENERATING REGULATORY CELLS AFTER INTRATRACHEAL DELIVERY OF ALLOANTIGEN IN MICE. (マウス心移植実験におけるアロ抗原気管投与による拒絶反応調節性細胞の誘導と、これに対するB7-CTLA4経路の必要性) …………… 9</p>
及川 洋一	<p>1型糖尿病の発症機序の解明に関する研究 動物モデルを用いた1型糖尿病におけるIL-18の役割…………… 10</p>
北村 誠司	<p>卵管内胚移植のための子宮鏡用カテーテルの開発 —組織学的評価およびその臨床応用—…………… 11</p>
小林 絵美	<p>Hepatocyte growth factor regulates proteoglycan synthesis in interstitial fibroblasts. (腎間質線維芽細胞における肝細胞増殖因子によるプロテオグリカン発現調節機構の検討) …………… 12</p>
土岐めぐみ	<p>阻血による片側下肢の神経遮断が立位姿勢制御に与える影響…………… 13</p>
渡邊 宏治	<p>Endogenous expression of Müllerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites. (出生後のラットセルトリ細胞におけるミューラー管退縮物質の内因性発現における複数のSteroidogenic factor-1結合部位とGATA-4結合部位の必要性について) …………… 14</p>
安西 秀美	<p>Conformational epitope mapping of antibodies against desmoglein 3 in experimental murine pemphigus vulgaris. (天疱瘡モデルマウスにおけるデスモグレイン3抗原の3次元エピトープ解析) …… 15</p>
齊藤 英子	<p>Galactosyltransferase associated with tumor in patients with ovarian cancer : Factors involved in elevation of serum galactosyltransferase. (卵巣癌患者血清中の癌関連ガラクトース転移酵素上昇に関与する因子の検討) …… 16</p>
谷垣 伸治	<p>Pulmonary Hypoplasia : Prediction with Use of Ratio of MR Imaging-measured Fetal Lung Volume to US-estimated Fetal Body Weight (高速度MRIを用いた胎児肺形成指標の確立) …………… 17</p>
伯野 春彦	<p>Effects of inactivation and stimulation of locus coeruleus on respiratory activity of neonatal rat. (青斑核の不活性化および刺激が新生ラットの呼吸性神経活動に与える影響) …… 18</p>
矢島 賢	<p>肥満2型糖尿病モデル動物db/dbマウスにおけるPPARγ、PPARαアゴニストの影響 …… 19</p>
東 宏一郎	<p>若年非糖尿病肥満患者における肥満・糖尿病関連遺伝子resistinの血中濃度と遺伝子多型の検討 …………… 20</p>

石川 光也	子宮頸部腫瘍におけるp16 ^{INK4a} 蛋白質過剰発現の解析	21
入江潤一郎	1型糖尿病発症における抗酸化薬の効果 - 1型糖尿病モデル動物におけるN-acetyl-cysteineの影響 -	22
江下 忠彦	Retinal Blood Flow in the Macular Area Before and After Scleral Buckling Procedures for Rhegmatogenous Retinal Detachment Without Macular Involvement. (裂孔原性網膜剥離に対する強膜バックリング術前後における黄斑部周囲の網膜血流量の測定解析の研究)	23
小川 健夫	インスリン抵抗性およびインスリン分泌能に関連する血中可溶性レプチン受容体および脂肪酸受容体遺伝子多型の検討	24
栗村 誠	Factors for the presence of anteromedial rotatory instability of the knee. (膝関節前内側回旋不安定性の発現機序について)	25
小浦優佳子	Anandamide Decreases Glomerular Filtration Rate through Predominant Vasodilation of Efferent Arterioles in Rat Kidneys. (アナンダマイドはラット腎輸出細動脈優位の血管拡張により糸球体濾過率を低下させる)	26
小宮山慎一	子宮内膜症が卵巣明細胞腺癌に与える生物学的影響 - Transforming growth factor-beta 1とそのレセプターおよびurokinase type-plasminogen activatorの関与を中心として -	27
小見山貴継	Novel technique for peripheral nerve reconstruction in the absence of an artificial conduit (人工の管腔構造を用いない新しい末梢神経の再建方法)	28
鈴木 竜司	インスリン非依存糖尿病と自己免疫 ~ 膵島関連自己抗体陽性者における細胞性免疫異常 ~	29
多田由布子	Ovariectomy enhances renal cortical expression and function of cyclooxygenase-2. (卵巣摘出は腎皮質シクロオキシゲナーゼ-2の発現および機能を増強する)	30
田中 京子	Expression of an Isoform of the Testis-Specific Estrogen Sulfotransferase in the Murine Placenta during the Late Gestational Period. (精巣特異的エストロゲン硫酸基転移酵素遺伝子の妊娠後期マウス胎盤における発現)	31
寺内 正子	Interactions of HLA-DRB4 and CTLA-4 genes influence thyroid function in Hashimoto's thyroiditis in Japanese population. (日本人橋本病患者の甲状腺機能に及ぼすHLA-DRB4とCTLA-4遺伝子の相互作用の研究)	32
前田 憲男	Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone. (C型肝炎ウイルスの感染性クローンをを用いたヒト肝組織移植マウスへの感染実験)	33
松本 幸裕	Autologous Serum Application in the Treatment of Neurotrophic Keratopathy. (神経麻痺性角膜症に対する自己血清点眼の有効性)	34
山崎 智	Effect of walking exercise on bone metabolism in postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis. (閉経後骨量減少および骨粗鬆症女性における歩行運動が骨代謝に及ぼす影響)	35
山本 幸宏	脂肪細胞特異的分泌蛋白質アディポネクチンと糖・脂質代謝	36
横山 剛義	Differences between scirrhous and non-scirrhous human gastric carcinomas from the aspect of proMMP-2 activation regulated by TIMP-3 (TIMP-3によって制御されるproMMP-2活性化機構からみたヒトスキルス胃癌と非スキルス胃癌の相違)	37

Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes.

(急性アルコール投与によるラット肝細胞アポトーシスにおけるBaxと
電位依存性アニオンチャンネルの相互作用)

足 立 雅 之

内容の要旨

アルコール性肝障害の病態には肝細胞アポトーシスの関与が重要である。本研究ではエタノールによる培養肝細胞アポトーシス誘導機序について検討した。

ラット初代培養肝細胞にエタノール50mMを投与したところアポトーシスが誘導された。このアポトーシス誘導過程において、ミトコンドリア中心とした酸化ストレスの増強、アポトーシス誘導性Bcl-2ファミリー蛋白であるBaxの細胞質からミトコンドリアへの移行、それに引き続くチトクロームc放出、カスパーゼ3活性化といったアポトーシス実行シグナルが惹起された。これらの変化は抗酸化物質により抑制されたことから、エタノール投与後に生じる酸化ストレスがアポトーシスに重要な役割を果たすと考えられた。さらに、チトクロームc放出とカスパーゼ3活性化がシクロスポリンAで抑制されたことから、これらの変化がミトコンドリア膜上チャンネルMPT (Mitochondrial permeability transition) ポア依存性の現象であると考えられた。MPTポアはミトコンドリア外膜の電位依存性アニオンチャンネル (VDAC ; voltage dependent anion channel) を始め種々の蛋白で構成される蛋白質複合体であり、ミトコンドリア膜透過性を調節しアポトーシスに重要な役割を果たすと考えられているが、その分子メカニズムは不明な部分が多い。本研究では、エタノールを急性投与後に細胞質からミトコンドリアへ移行したBaxがVDACに結合することを明らかにした。さらに、抗VDAC中和抗体のマイクロインジェクションによりエタノール投与による肝細胞アポトーシスが抑制されたことは、アポトーシス誘導におけるVDACの役割を裏付けた。一方、TNF α (Tumor Necrosis Factor α) によるアポトーシスにおいては、BaxとVDACとの結合は観察されず、Baxのホモ多量体化が観察された。

以上の結果により、エタノールによる肝細胞アポトーシスにおいて、BaxとBaxの機能ターゲットとしてミトコンドリア外膜のVDACが重要であることが明らかになった。さらに、肝細胞においてエタノールによる細胞死誘導レセプター非依存性のアポトーシスとTNF α による細胞死誘導レセプター依存性アポトーシスの誘導機序では、Baxのミトコンドリアにおける動態が異なることが明らかになった。この研究により、エタノールによる培養肝細胞のアポトーシスの過程において酸化ストレスが重要な機序となっていること、酸化ストレスの主要な標的器官はミトコンドリアであり、酸化ストレスはBaxを介してミトコンドリア膜透過性を調節し、ミトコンドリアにアポトーシスシグナルを誘起することを示した。今回の結果は、アルコール性肝細胞障害の機序の更なる解明につながるだけでなく、肝細胞死のシグナル伝達経路の解明の一助となるものと考えられる。

論文審査の要旨

アルコール性肝障害など肝疾患の病態に酸化ストレスの重要性が示唆されているが、その機序は不明な点が多い。本研究は、エタノール (以下EtOH) による肝細胞アポトーシスの誘導機序を解明し、TNF α によるアポトーシスとの差異について検討した。その結果、EtOH投与後ミトコンドリアを中心に酸化ストレスが増強し、更にBaxが酸化ストレス依存性にミトコンドリアへ移行して外膜上のVDACと結合すること、BaxとVDACの結合がミトコンドリア膜透過性を亢進し、チトクロームc (以下cyt-c) 放出を惹起することが明らかになった。更にTNF α 投与時にはBaxはVDACと結合せず、ホモ多量体化することから、EtOHとTNF α によるアポトーシスの誘導機序は異なることを示した。

審査ではまず、ミトコンドリアの形態変化について質問があり、cyt-c放出機序としてミトコンドリア膨化・膜破裂によりcyt-cが漏出する機序と膨化・膜破壊を伴わない機序があり、電顕下の観察ではEtOH投与後cyt-cの放出が起こる時点では膨化は観察されず、この結果はBaxがミトコンドリアの膨化を伴わずcyt-cを放出するという過去の報告と合致すると説明された。次にEtOH濃度の妥当性について質問があり、本研究で用いたEtOHの濃度は生体においてアルコール摂取後に到達し得る血中濃度の範囲であると回答された。次に今回の研究が*in vivo*アルコール投与モデル、あるいは慢性アルコール投与モデルの病態と差異があるかとの質問があり、*in vivo*では本検討で示した肝細胞内酸化ストレスを介した肝細胞傷害の他、肝臓洞壁細胞や炎症細胞も病態に関与するがいずれも酸化ストレスの関与が重要である事、慢性モデルでは抗酸化物質の減少により酸化ストレスが増強するとの回答があった。次に臨床における酸化ストレスの重要性について質問があり、アルコール性肝障害に対してビタミンE等の抗酸化物質が治療に利用されており、酸化ストレスの重要性を裏付けるものとの回答があった。次にミトコンドリア透過性調節のメカニズムについて質問があり、MPTポアは生理的状況下でも細胞内Ca²⁺濃度などにより開閉するが、cyt-cの放出には不十分であり、BaxとVDACとの結合が必要不可欠であるとの回答がされた。次にBaxをターゲットとした現実的な臨床応用の可能性について質問があり、Baxを特異的に阻害するBH4ペプチドについて例を挙げて回答があった。更に、Baxのホモ多量体の検討においてはクロスリンカーを用いない方法によっても検討を行なう必要があるとの指摘を受けた。最後に、本研究の今後の課題として、BaxがVDACとの結合を介してアポトーシスのみならず、ミトコンドリアでのエネルギー産生調節に関与する可能性を検討するために、低濃度のEtOHを用いた更なる検討が必要である旨旨言がされた。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、アルコール性肝障害の機序を明らかにした点、EtOH、TNF α それぞれによる肝細胞アポトーシスの機序の差異を明らかにした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 日比 紀文
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：
審査委員長：末松 誠

試問日：平成16年11月10日

Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism.

(末梢抗原 (デスモグレイン 3) に対する自己反応性B細胞は
トレランスのメカニズムから逃れられる)

大 田 孝 幸

内容の要旨

自己反応性B細胞のトレランスは、除去、不活化、receptor editingなどの機序があることが、これまで様々な系のトランスジェニックマウスを組み合わせるにより示されてきた。しかしながら末梢抗原に対するB細胞の挙動は、自己抗原の発現臓器により異なり、一定した見解は得られていない。今回我々は、尋常性天疱瘡抗原であるデスモグレイン3 (Dsg3) に特異的なIgM-B細胞トランスジェニックマウスを作成し、B細胞の挙動を解析した。尋常性天疱瘡はIgGによる水疱性自己免疫疾患であり、Dsg3は主に皮膚、粘膜に発現し骨髄には発現しておらず、ケラチノサイトの細胞間接着因子の1つである。天疱瘡モデルマウスより作成した、Dsg3に特異的なモノクローナル抗体、AK7 mAbの変換領域を用い、H鎖、L鎖、両鎖を有するIgMトランスジェニックマウスを作成した。AK7 mAbは新生仔マウスを用いた実験で、明らかな水疱形成を示さず、病原性を有しない。AK7 IgMトランスジェニックマウスは、皮膚、粘膜にDsg3を発現しているが、Dsg3反応性B細胞は骨髄で検出されただけでなく、末梢リンパ組織である脾臓、リンパ節でも検出され、除去されていなかった。また血中抗Dsg3-IgMを検出し、直接蛍光抗体法にて口蓋へのIgMの沈着を認めた。脾臓由来のDsg3に特異的なB細胞はLPS、抗IgM抗体、rDsg3のin vitroの刺激にて増殖したのみならず、抗IgM抗体、rDsg3の刺激にて細胞内の一時的なカルシウム濃度の上昇がみられた。以上の結果より、Dsg3反応性B細胞は、不活化の状態にもないと考えられた。従って、末梢抗原であるDsg3に反応するAK7 B細胞は、トレランスによる除去、不活化も受けられないことが示された。以上の結果より少なくとも明らかな病原性を有しない抗体を発現する場合、末梢抗原に対する自己反応性B細胞はトレランスのメカニズムから逃れることができ、正常のヒトにおいても、ある頻度で自己反応性B細胞が末梢に存在する可能性が示唆された。

論文審査の要旨

尋常性天疱瘡抗原であるデスモグレイン3 (Dsg3) に対するB細胞のトレランスに関し、Dsg3に特異的なB細胞トランスジェニックマウスを作製することにより解析を行った。得られたマウスにおいて、Dsg3に特異的なB細胞は、骨髄ならび末梢臓器である脾臓、リンパ節でも認められ、さらに不活化などの影響は受けていなかった。従って免疫学的監視機構に認識されていないと考えられ、正常なヒトにおいても、ある頻度で自己反応性のB細胞が存在する可能性が示唆された。

審査では、まず自己反応性のB細胞の存在することが一般的であるか否か、質問された。ブラジルのある地域では、Dsg1に対する自己免疫疾患である落葉状天疱瘡が風土病として発症し、その地域において発症前のヒトにおいてもDsg1に対する抗体が存在することが報告されており、自己反応性B細胞の存在の可能性があると説明された。得られたマウスにおいてIgM^{high}とIgM^{low}の2分画が存在するが、その差に関する質問に対しDsg3に対する反応性とIgMに対する程度は一致し、IgM^{high}の分画は、いわゆるT2ステージの未熟なB細胞であり、IgM^{low}の分画は成熟したB細胞であること、またDsg3反応性のB細胞はすべてfollicular B細胞に成熟することが説明された。Dsg3に反応するB細胞がB1-B細胞へ分化しなかったことに関し、現在はB1-B細胞への分化はpositiveselectionと考えられており、Dsg3のmRNAは骨髄でRT-PCRでは検出できないため、B1-B細胞へ分化できなかったと説明された。また本マウスで用いた抗体 (AK7) は明らかな病原性を示さないため、病原性を有する抗体を産生するトランスジェニックマウス (AK23) を用いて現在解析中であり、AK23を用いた場合でも、Dsg3に特異的なIgMは末梢まで成熟するようであると説明された。これらのマウスはクラススイッチが生じず、天疱瘡患者では、Dsg3に対するほとんどの抗体がIgGであることからknock-inマウスでの検討が必要であるとの助言がなされた。

以上、本研究にはなお検討すべき点が残るものの、Dsg3に対するB細胞のトレランスの一部を明らかにし、臓器特異的な自己免疫疾患のトレランス機構の理解を深めた点で、意義のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 皮膚科学 西川 武二

微生物学・免疫学 石川 博通 先端医学 河上 裕

内科学 池田 康夫

学力確認担当者:

審査委員長: 石川 博通

試問日: 平成16年12月29日

Ubc9 interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I and represses receptor-dependent transcription.

(Ubc9はchicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I と結合し、受容体依存性の転写活性を抑制する)

小林 佐紀子

内容の要旨

副腎皮質において、ステロイド17 α -水酸化酵素 (CYP17) は、糖質コルチコイド産生の鍵となる酵素である。これまで私どもは、マウス副腎皮質Y-1細胞において、CYP17遺伝子の転写が、核内受容体COUP-TFIにより抑制されること、またクッシング症候群副腎腺腫において、CYP17の過剰発現とCOUP-TFIの低発現があることを見だしてきた。本論文では、COUP-TFIによるCYP17発現調節の分子機構を明らかにするために、yeast two-hybrid systemを用いて、ヒト副腎腺腫cDNAライブラリーからCOUP-TFI結合蛋白のスクリーニングを行なった。

COUP-TFIの新規結合蛋白として、Ubiquitin-conjugating enzyme 9 (Ubc9) を同定した。Ubc9は、small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) による蛋白修飾 (SUMO化) におけるSUMO-1 conjugating enzymeとしての機能が報告されている。Ubc9とCOUP-TFIの結合は、yeastに加えて、*in vitro* glutathione-S transferase-pulldown法でも確認された。さらに、共焦点顕微鏡による検討では、COS-1細胞の核内でCOUP-TFIとUbc9が共存し、免疫共沈降法にて細胞内での複合体形成が確認された。次に、N末端およびC末端欠変異体を用いた結合部位の検討の結果、Ubc9のC末端 (アミノ酸59-158) と、COUP-TFIのC末端 (アミノ酸383-403) の結合を認めた。Northern blotによる組織分布の検討では、COUP-TFI、Ubc9共に広く分布し、特に副腎皮質、精巣、卵巣などのステロイド産生組織に高発現を認めた。

次に、COS-1細胞を用いたtransient transfection法により、Ubc9の機能解析を行った。Ubc9は、COUP-TFIと共発現させた場合、CYP17レポーター活性の転写抑制にはたらくCOUP-TFIの新規corepressorであることが示された。また、Ubc9をGal4転写因子のDNA結合部位との融合蛋白 (Gal4-Ubc9) として発現させた結果、Ubc9は内因性に転写抑制部位を有していたが、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬のtrichostatin A処置により、Gal4-Ubc9による転写抑制は変化を示さず、trichostatin A感受性HDACの直接的な関与は少ないと考えられた。さらに、Ubc9のSUMO化活性欠変異体C93Sは、野生型と同様にCOUP-TFIによる転写抑制を示した。以上の結果より、Ubc9は、SUMO化活性とは独立したCOUP-TFIのcorepressorとしての機能を持つことが明らかとなった。

論文審査の要旨

副腎皮質に存在する17 α -水酸化酵素 (CYP17) は、糖質コルチコイドの産生に関与する鍵となる酵素である。このCYP17の発現調節に核内受容体であるchicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI) が重要であり、CYP17遺伝子の転写抑制に働くことが示唆されている。この転写抑制に何らかのcorepressorが関与している可能性があることから、当研究者は、yeast two-hybrid systemを用いてヒト副腎腺腫のcDNAライブラリーからCOUP-TFI結合蛋白のスクリーニングを行い、新規結合蛋白としてubiquitin-conjugating enzyme (Ubc9) を同定した。このUbc9とCOUP-TFIの結合は、yeastに加えて、*in vitro* glutathione-S transferase-pulldown法でも確認された。共焦点顕微鏡でCOUP-TFIとUbc9がCOS-1細胞の核内に共存し、免疫沈降法で細胞内での複合体形成が確認された。COUP-TFIとUbc9の結合部位の検討では、COUP-TFIのC末端とUbc9のC末端との結合を認めた。さらにUbc9の生体内の分布に関して、副腎皮質、性腺などのステロイド産生組織に強く発現していることを認めた。Ubc9の機能解析では、Ubc9がCYP17レポーター活性の転写抑制に働くCOUP-TFIの新規corepressorであり、SUMO化活性とは独立して機能を発揮することが明らかにされた。

このような研究に関して、Ubc9がCOUP-TFIの新規corepressorであることをyeast two-hybrid systemだけでなく、*in vitro* glutathione-S transferase-pulldown法でも確認しており、さらに結合部位についても詳細な検討がなされており、Ubc9がCOUP-TFIのcorepressorとして間違いないと考えられた。共焦点顕微鏡による観察、また免疫共沈降法により、COS-1細胞の核内にCOUP-TFIとUbc9が共存すること、また細胞内で複合体が形成されることが示されたが、写真のとり方に問題があり、もう少し明瞭な写真が示されるべきであったとされた。

この研究で最も注目された点は、Ubc9の生体の分布状態と副腎皮質の各ゾーンでの発現状態である。Ubc9は広汎な組織分布を示すが、副腎皮質と性腺に特に高発見がみられた点が注目された。当研究者は、ステロイド産生と関係しているとしたが、今回は性腺での検討はなされておらず、今後の検討課題とされた。またUbc9が副腎皮質球状層に強く発現していたことから、CYP17ばかりでなく、CYP11Bとの関係も検討すべきであるとされた。

Ubc9がCOUP-TFIのcorepressorとして働き、CYP17の発現に抑制的に働くことから、臨床的には、アルドステロン産生腺腫、Cushing症候群やpreclinical Cushing症候群、さらに非活動性副腎腺腫でのUbc9が注目された。当研究者らの検討では、Cushing症候群の腺腫のみで発現の低下を認め、他の腺腫での変化は少なく、その意義の検討は今後の課題とされた。

以上のように、本研究ではCYP17の転写抑制に働くCOUP-TFIの新規corepressorとしてUbc9を同定したことから、今後のこの領域の研究発展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 亨男
医化学 末松 誠 泌尿器科学 村井 勝
先端医科学 河上 裕
学術確認担当者：
審査委員長：末松 誠

試問日：平成17年 1月20日

Von Willebrand因子切断酵素 (ADAMTS-13) の発現部位に関する検討

鈴木 美佐子

内容の要旨

Von Willebrand因子 (VWF) は血栓止血機構における重要な因子でありその血栓形成能はマルチマー構造に依存している。血管内皮由来のVWFマルチマーは血漿中でVWF切断酵素 (ADAMTS-13) により分解され、血小板血栓形成能が制御されている。現在まで、ADAMTS-13の発現部位に関しては種々の臓器におけるmRNA発現の報告はあるものの血小板での発現の有無に関する言及はない。VWFが血小板に結合するという現象は血小板血栓形成の上で必須のものであり、VWFの15~25%が血小板 α 顆粒中に存在していることに着目し、血小板におけるADAMTS-13の発現と血小板での局在を検討した。また、全長mRNAが肝臓で特異的に発現していることから血漿ADAMTS-13は肝臓由来であろうと考えられているが、現在まで肝臓でのADAMTS-13の産生についての証明はされていない。肝硬変患者血漿でのADAMTS-13酵素活性は健常血漿に比し低下しており、生体肝移植により血漿ADAMTS-13の酵素活性が変化したという臨床報告を考慮し、我々はADAMTS-13の肝細胞での発現の有無についての検討を行った。まずウェスタンブロットを用い血小板におけるADAMTS-13タンパクの発現を確認し、フローサイトメトリーにより、permeabilization処理前後の血小板の反応性を比較することにより血小板の内部にADAMTS-13が存在することを確認した。さらに抗ADAMTS-13モノクローナル抗体を用いた血小板凍結超薄切片による免疫電顕法で α 顆粒内の局在を示した。またRT-PCRにより血小板でのADAMTS-13mRNAの発現を示し、得られたcDNAの塩基配列が、ADAMTS-13 cDNA (exon1-7) であることを確認した。次に血漿ADAMTS-13の由来に関する検討の一環として肝臓に着目し、正常肝細胞ならびに肝細胞癌の細胞株、肝組織において免疫組織染色を行い、肝細胞の細胞質におけるADAMTS-13の発現を確認した。HepG2細胞の培養上清を用いたウェスタンブロットにてADAMTS-13タンパクの発現を確認し、HepG2がADAMTS-13を合成し培養上清に分泌する可能性が示唆された。またRT-PCRにて正常肝細胞ならびに肝細胞癌の細胞株でADAMTS-13 mRNAの発現を認めた。これらの結果より、血小板ADAMTS-13が血栓止血機構において局所でVWFを制御している可能性が示唆された。また血漿ADAMTS-13の起源として肝細胞での産生が示唆され、今後肝機能とADAMTS-13の相関、各種疾患におけるADAMTS-13の動態等を検索することにより、血栓形成に関与するADAMTS-13の特性にさらなる知見が加わることと考えられる。

論文審査の要旨

Von Willebrand因子 (VWF) の血栓形成能はマルチマー構造に依存しており、VWFマルチマーは血漿中でVWF切断酵素 (ADAMTS-13) により分解され、血小板血栓形成能が制御されている。VWFと血小板の結合は血小板血栓形成の上で必須であり、VWFの15~25%が血小板 α 顆粒中に存在することに着目し、血小板におけるADAMTS-13の発現と局在を検討した。また、全長mRNAが肝臓で特異的に発現していることから血漿ADAMTS-13は肝臓由来と推定されているが、肝臓でのADAMTS-13の産生は証明されていないため肝細胞での発現の有無について検討を行った。ウェスタンブロットでADAMTS-13蛋白が血小板に含まれていることを示した後、フローサイトメトリーによりADAMTS-13が血小板内部に存在することを確認した。さらに免疫電顕法で α 顆粒内の局在を示した。またRT-PCRにより血小板でのADAMTS-13mRNAの発現を示し、得られたcDNAの塩基配列は、ADAMTS-13 cDNAと一致した。次に正常肝細胞、HepG2、肝組織で免疫組織染色を行い、肝細胞の細胞質におけるADAMTS-13の発現を確認した。HepG2の培養上清を用いたウェスタンブロットでADAMTS-13蛋白の発現を確認、HepG2がADAMTS-13を合成し培養上清に分泌する可能性が示唆された。またRT-PCRにて正常肝細胞、HepG2でADAMTS-13 mRNAの発現を認め血漿ADAMTS-13の起源として肝細胞における産生の可能性が強く示唆された。

審査では、血小板ADAMTS-13蛋白量について質問があり、ウェスタンブロットの結果より1 ng/2 $\times 10^7$ 個血小板と推定されるが、蛋白量と機能の相関については今後の検討を要すると回答された。また血小板の活性化とADAMTS-13の関係についての質問に、 α 顆粒内のVWFはトロンビンまたはADP刺激により血小板から血漿中に放出される。血小板のADAMTS-13がVWFのサイズを制御している可能性が考えられ、血小板活性化時のADAMTS-13の動態を研究する必要があると回答された。また肝細胞での蛋白発現の証明にHepG2の培養上清を用いた理由について正常肝細胞は継代不可能であり肝細胞の生合成と分泌のモデルとしてHepG2を用いたと回答された。

以上のように、本研究はさらに検討すべき課題を残すものの血小板におけるADAMTS-13の局在を新規に証明した点、ADAMTS-13の肝細胞での発現を明らかにした点において血栓止血機構の研究上、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

病理学 岡田 保典 発生・分化生物学 須田 年生

衛生学公衆衛生学 大前 和幸

学力確認担当者:

審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成16年12月24日

B7/CTLA4 PATHWAY IS ESSENTIAL FOR GENERATING REGULATORY CELLS AFTER INTRATRACHEAL DELIVERY OF ALLOANTIGEN IN MICE.

(マウス心移植実験におけるアロ抗原気管投与による拒絶反応調節性細胞の誘導と、これに対するB7-CTLA4経路の必要性)

秋山 芳伸

内容の要旨

移植臓器の生着はレシピエントの免疫反応の変化によりもたらされるが、その一つが特定の移植抗原に対して免疫系が不応答状態となる免疫寛容と呼ばれるものである。現在、臓器移植の場において、手術手技の向上および免疫抑制剤の進歩により臓器の長期生着が望めるようになってきているが、免疫抑制剤による全免疫システムの抑制は、感染症の発症、抗腫瘍免疫の低下による腫瘍発生を問題として提示してくる。したがって、移植臓器に対し反応する免疫系のみを制御できれば、この問題を解決できると考えられる。

すでにドナー抗原の大量経口投与により抗原特異的に移植臓器の生着延長を誘導できることが報告されているが、消化管同様、常に外来抗原にさらされている気管粘膜を介した寛容誘導に関しては、自己免疫疾患の研究においてわずかに記載されているのみである。

今回、消化管同様外界に接している気管粘膜を介した免疫寛容の研究が呼吸器自己免疫疾患の制御を目的として行われていることに注目し、移植抗原の経気管投与により、移植臓器にたいする拒絶反応の制御が可能であるか検討した。さらに免疫制御細胞の存在についても検討を加えた。

移植モデルとして、マウス異所性心移植モデルを使用した。ドナー心の上行大動脈、および肺動脈をそれぞれ、レシピエント腹部大動脈、下大静脈に顕微鏡下に吻合した。8-12週の雄性マウスを使用し、レシピエントはCBA (H-2^d)、ドナーはC57BL/10 (B10, H-2^b)、third partyとしてBALB/c (H-2^d)を用いた。無処置群および、レシピエントタイプ、およびthird partyの脾細胞の気管投与群では移植心はMedian Survival Time (MST) 7-8日に拒絶されたが、C57BL/10の脾細胞投与群ではMST81日と有意に生着延長効果が認められた。またC57BL/10の脾細胞の気管投与を受けたCBAマウスの脾細胞を、ナイーブなCBAマウスに経静脈的に移入した実験では、このCBAマウスはthird partyの移植心は拒絶したが、C57BL/10の移植心はMST62日と生着延長効果が認められた。これによりドナー抗原(脾細胞)の経気管投与によりドナー特異的な免疫反応制御細胞が誘導されていることが証明された。

次に抗原提示細胞からT細胞への抗原提示において、その副刺激であるCD80/CD86-CD28/CTLA4の遮断がT細胞をアナジーにし、移植臓器の生着を誘導する報告があることから、本モデルにおける副刺激の役割について検討した。

CTLA4Igを用いた、APCからT細胞に対する副刺激(B7-CD28, CTLA4)の遮断による移植心生着延長効果は多数報告されているが、われわれの移植抗原の経気管投与モデルでは、B7-CD28副刺激のみならずB7-CTLA4副刺激の遮断は拒絶抑制効果、さらには調節性細胞の誘導をも妨げることとなった。この結果はCTLA4によるT細胞の活性化抑制が、移植抗原経気管投与モデルにおける移植臓器拒絶抑制にも必要であり、さらには調節性細胞の誘導にも必要であるといえた。移植臓器拒絶反応には様々なサイトカインの関与が報告されているが、一般に拒絶反応の抑制、調節にはTh2タイプのサイトカインの関与が考えられている。今回脾細胞混合培養試験および、その上滑のサイトカインの定量試験の結果からもIL-4およびIL-10の関与が示唆された。

論文審査の要旨

臓器不全の最終的治療法として臓器移植が考えられるが、その拒絶反応の制御はいまだ不完全なものである。これを解決するための移植免疫学の目標の一つが、免疫抑制剤を使うことなく、移植臓器の生着を成し遂げる、抗原特異的(移植臓器特異的)免疫寛容導入である。

本実験から、臨床応用が可能な、移植抗原の術前経気管投与により、移植臓器に対する拒絶反応の制御が可能であることが示され、そのメカニズムとして、免疫制御細胞の存在が示唆された。さらにこの制御細胞の誘導において、抗原提示細胞からT細胞に対する副刺激B7-CTLA4が必要であることが示された。

審査ではまず、移植心の生着判定について質問があり、心拍動の触診、開腹下直視による判定、および病理組織学的判定が用いられると回答された。さらに気管投与された、脾細胞の到達部位について質問がなされた。これに対し蛍光ビーズ気管投与実験、蛍光染色した脾細胞の気管投与実験の結果から、気管投与された脾細胞は肺泡内に到達し、マクロファージに貪食されており、脾細胞そのものは、気管周囲リンパ節、脾臓では検出できなかったと回答された。次に寛容誘導において消化管を介した場合と気管を介した場合の違いについての質問があり、消化管を介した寛容の誘導には抗原投与時に免疫をモジュレーションする抗体の投与を必要としているが、気管投与ではそれを必要としない。その理由として消化管の寛容誘導に関与している樹状細胞は、TGF-β優位にサイトカインを産生するのにに対し、肺泡内樹状細胞はIL-10優位にサイトカインを産生していることが、経消化管と経気管の寛容誘導の違いとなっている可能性があることが回答された。制御細胞のポピュレーションとしては、気管投与前処置マウスの脾細胞を種々の分画に分けた移入実験で、樹状細胞とCD25陽性細胞の移入が移植心生着延長を認めたことから、この分画に制御細胞が含まれている可能性が示唆された。最後に臨床応用についての質問があり、現在の脳死移植においては術前7日前にドナー抗原を気管投与することは不可能であるが、何らかの処置を加えて気管投与から移植までのプライミングの期間を短縮できれば、また気管への抗原投与量を削減できれば、比較的早期に臨床応用が可能であろうとの助言があった。さらにペプチドの気管投与でも制御細胞が誘導できることから、ヒトMHCにおいて拒絶反応にドミナントな部分のペプチドを作成できれば、移植待機中に、このペプチドの気管内吸入を施行することにより、急性拒絶反応の抑制が可能であろうとのコメントがなされた。以上のように本研究はそのメカニズムの解明、ならびに臨床応用へ向け、さらに検討されるべき点を残しているが、臨床応用可能な、移植抗原の経気管投与による移植臓器拒絶反応の制御を示唆した点において有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
微生物学・免疫学 小安 重夫 外科学 四津 良平
微生物学・免疫学 石川 博通
学術確認担当者: 北島 政樹、小安 重夫
審査委員長: 小安 重夫

試問日: 平成16年11月 1日

1型糖尿病の発症機序の解明に関する研究

動物モデルを用いた1型糖尿病におけるIL-18の役割

及川 洋一

内容の要旨

1型糖尿病の発症に関して、T helper 1 (Th1) タイプの自己免疫機構が重要と考えられている。これまでその発症機序に関してnonobese diabetic (NOD) マウスを用いて多くの研究がなされてきた。近年、10週齢以降の膵島炎の進展したNODマウスに、Th1作用のほかにTh2作用を併せ持つサイトカインであるinterleukin-18 (IL-18) を投与すると糖尿病の発症が抑制されることが報告された。しかし、膵島炎の出現時期や膵島炎発症前の4～6週齢で、IL-18の全身投与が膵島炎の進展や糖尿病発症にどのような影響を与えるのかは明らかでない。そこで若齢のNODマウスにIL-18を投与し、膵島炎の進展や糖尿病発症への影響を検討した。

(対象と方法)

IL-18発現ベクター (pCAGGS-IL-18) を作製し、4週齢および6週齢のNODマウスの前脛骨筋に注射した。さらに同部位に*in vivo* electroporationを施行し遺伝子発現の増強を図った。このようなIL-18発現ベクター注射群において糖尿病発症率、膵島炎の進展度、全身性サイトカインバランスおよび膵臓や膵局所リンパ節のサイトカインバランスを評価した。さらに膵局所におけるinterferon-inducible protein-10/CXC chemokine ligand 10 (IP-10/CXCL10) や抗原提示細胞に特異的に発現しているIL-12、CD86の各mRNA発現レベルも検討した。また、膵島関連自己抗原の1つであるグルタミン酸脱炭酸酵素glutamic acid decarboxylase (GAD) に対して反応性を示すinterferon (IFN) γ 産生CD4細胞の脾細胞における数的変化も観察した。

(結果と考察)

pCAGGS-IL-18の1回の筋肉注射で、IL-18が2週間以上にわたって全身に供給された。このIL-18投与群では、22週齢以後に糖尿病の累積発症率が有意に高値となった。しかし28週齢以後になると、IL-18群とpCAGGSのみを注射したコントロール群あるいは未処置群との間に糖尿病発症率に差がなくなった。膵組織の観察で、IL-18投与群では糖尿病発症前期に膵島炎が有意に進展していた。全身性サイトカインバランス、および膵臓や膵局所リンパ節におけるサイトカインバランスはいずれもIL-18群においてTh1優位であった。またIL-18群では膵局所におけるIP-10/CXCL10 mRNA発現レベルが増強しており、外因性IL-18が膵島におけるIP-10/CXCL10発現を増加させる可能性が示唆された。さらにGADに対して反応性を示すIFN γ 産生CD4細胞がIL-18投与群の脾細胞において有意に増加していた。以上より、IL-18はNODマウスにおいてTh1タイプの免疫応答を介して膵島炎の進展促進に関与し、結果的に糖尿病の発症を促進することが示唆された。

論文審査の要旨

1型糖尿病の発症にはT helper 1 (Th1) タイプの自己免疫機構が重要と考えられている。最近、Th1作用とともにTh2作用をもつサイトカインであるinterleukin-18 (IL-18) が糖尿病の発症と密接に関係することが示唆されているが、その関与の詳細は明らかでない。そこで本研究では、4～6週齢のnonobese diabetic (NOD) マウスを用い、IL-18発現ベクターを注射し、経時的に糖尿病発症率、膵炎の進行度、全身および膵臓や膵局所リンパ節のサイトカインバランス等を検討した。さらに膵局所におけるinterferon-inducible protein-10/CXC chemokine ligand 10 (IP-10/CXCL10) や抗原提示細胞に特異的に発現しているIL-12、CD86の各mRNA発現レベルも検討した。

IL-18投与群では、22週齢以後に糖尿病の累積発症率が有意に高値となったが、28週齢以後になると、糖尿病発症率に関して無処置群との間に差がなくなった。膵組織の観察では、IL-18群では、膵島炎が糖尿病発症前期にすでに進展していた。また全身的にも局所的にもサイトカインバランスは、IL-18群ではTh1優位であった。さらに膵局所でIP-10/CXCL10やIL-12またCD86のmRNA発現が増強しており、外因性IL-18がこれらの発現を増加させる可能性が示唆された。以上の成績から、IL-18はNODマウスにおいてTh1タイプの免疫応答を介して膵頭炎を誘発し、糖尿病の発症に促進的に関与していると結論した。

このような研究に対し、まずIL-18投与をIL-18発現ベクターを用いて行ったことが議論された。用いた発現ベクターの性状が問題とされたが、この方法で血清IL-18値が著明に高値になっていたことから、妥当なベクターであったとされた。ベクターを用いる必要性に関しては、一定量のIL-18を全身に供給するためには必須であったとされた。

IL-18群の組織学的検討で、糖尿病前期にかなりの膵頭炎が生じており、全身性に、また膵局所においてもサイトカインバランスがTh1優位になっていながら、糖尿病の発症がみられないこと、しかし22週齢になると著明に糖尿病の発症が増加し、28週齢後には無処置群と同程度となるという一連の変化に対して議論がなされた。本研究は、IL-18群の8～10週齢では、膵頭炎を生じているものの膵頭障害性T細胞の成熟度が不十分なため、糖尿病の発症が少なく、22週齢頃より成熟度が十分となり急速に糖尿病が発症してくると思った。一方28週齢以後になると無処置NODマウスでも加齢に伴って膵頭障害がひどくなり、糖尿病の発症が高くなるためIL-18群と糖尿病発症率に差がなくなってくるとされた。

このような動物実験成績をヒトの糖尿病治療に応用することについても議論があった。IL-18の発現をどの時点で阻止するかが治療法として重要であるが、今後の課題とされた。

以上のように本研究はNODマウスでの研究であるが、IL-18がTh1タイプの免疫応答を介して糖尿病を発症させることを明らかにし、1型糖尿病の発症機序の解明に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
医化学 末松 誠 微生物学・免疫学 小安 重夫
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16年10月25日

卵管内胚移植のための子宮鏡用カテーテルの開発

—組織学的評価およびその臨床応用—

北 村 誠 司

内容の要旨

体外受精-胚移植 (IVF-ET) における胚移植あたりの妊娠率は、20%前後と必ずしも高率とはいえない。現在の標準的な胚移植時期は採卵後2-3日目であり、胚が移植されてから着床する迄の2-3日の時間差を解消するとともに初期胚にとり体外環境に比べ至適であると考えられている卵管環境を生かすために卵管移植法が考案されている。従来の卵管移植法は腹腔鏡下で経卵管採的に施行されてきたが、子宮鏡下卵管胚移植法 (hysteroscopic tubal stage transfer : h-TEST) などの卵管への経腔的胚移植法の確立が望まれている。しかし、卵管の内腔にカテーテルを挿入し、さらにその先端を正確な位置に到達させることは困難であると考えられてきた。

本研究では、本来の受精の場である卵管膨大部へ正確に胚を移植するために、より細く最適な長さの先端を持つ子宮鏡用の新規カテーテルを開発した。次に光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いてカテーテル挿入が及ぼす卵管の形態学的変化について検討を加えた。さらに、この新規カテーテルを用いた胚移植の臨床成績を従来のIVF-ETの成績との間で前方視的に比較検討した。カテーテル操作の点から、カテーテルの形状は先端の一部分を卵管挿入に適した細い径とし、残りの部分は優れた操作性を持つ太い径を持つものとする必要があると考えられ、高い完全挿入率より先端3cmが細くなっているものを新規カテーテルに選択した。光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡による観察では、カテーテル挿入後の卵管内腔表面の線毛細胞と非線毛細胞には変形あるいは欠損を認めず、線毛細胞の脱線毛化も認めなかった。透過型電子顕微鏡による観察では、カテーテル挿入後の卵管内腔表面には損傷がないことを示した。さらに、カテーテルの挿入は卵管内腔上皮の細胞接着装置や基底膜に損傷を与えず、ミトコンドリア数に変化を与えないことから卵管の構造に損傷を与えず、卵管の生体変化への影響を及ぼさない可能性を示した。色素通水検査の結果より、子宮外妊娠の予防のために移植時の胚をカテーテル内に装填する際の培養液量を0.05mlとした。この新規カテーテルを用いた子宮鏡下卵管胚移植法 (h-TEST) では、従来のIVF-ETに比べ有意に高い妊娠率、着床率と低い傾向の流産率が得られ、h-TESTの有用性が示唆された。以上の結果より、本カテーテルを用いるh-TESTは難治性不妊症に対する生殖補助医療技術として有用であると考えられた。

論文審査の要旨

体外受精-胚移植 (IVF-ET) における標準的な胚移植時期は採卵後2-3日目であり、着床する迄の2-3日の時間差を解消するとともに初期胚にとり至適である卵管環境を生かすために卵管移植法が考案され、子宮鏡下卵管胚移植法 (h-TEST) などの卵管への経腔的胚移植法の確立が望まれている。本研究では、卵管膨大部へ正確に胚を移植するために、先端3cmが細くなっている子宮鏡用の新規カテーテルを開発し、高い卵管挿入率を確認した。次に光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡及び走査型電子顕微鏡を用いてカテーテル挿入が及ぼす卵管の形態学的変化について検討を加えた。カテーテル挿入後の卵管内腔表面の線毛細胞と非線毛細胞における変形あるいは欠損、線毛細胞の脱線毛化も認めず、透過型電子顕微鏡による観察では、卵管内腔表面には損傷がないことを示し、卵管内腔上皮の細胞接着装置や基底膜における損傷、ミトコンドリア数の変化が認められないことからカテーテル挿入は卵管の生体変化への影響を及ぼさない可能性を示した。この新規カテーテルを用いたh-TESTでは、胚移植の臨床成績を前方視的に比較検討すると、従来のIVF-ETに比べ有意に高い妊娠率、着床率と低い傾向の流産率が得られ、h-TESTの有用性が示唆された。

審査では、カテーテル挿入による卵管上皮の変化の様態について質問があり、線毛が消失する様な損傷では基底膜まで破壊されるのでは、という指摘があった。カテーテル挿入による組織変化についての報告は今までに無く、変性による上皮表面の線毛、細胞接着装置や基底膜、細胞内小器官に変化が生じる可能性が考えられると回答された。次に検体作成時間に関してカテーテル挿入から検体作成までに10から30分を要したが、短時間にそのような形態的变化を生じるとの指摘があり、対象がヒトであり、検体作成時間については制限があると回答された。また、カテーテル挿入が及ぼす卵管の長期間の形態学的変化について指摘があったが、新規カテーテルと同様のカテーテル挿入による卵管形成術後の累積妊娠率が術後1~2年まで上昇するとの報告が複数あり、臨床的には長期間の形態学的変化は小さいと考えられた。次に卵管走行の検討について質問がなされ、カテーテル挿入し易い卵管の有無について指摘があった。大きい子宮腔や卵管挿入困難の症例は除外していると回答された。

以上のように、本研究ではさらに検討すべき課題を残しているが、新規カテーテル使用の卵管に対する形態学的評価を試み、許容範囲内であることを確認し、さらにこの新規カテーテルを用いたh-TESTが難治性不妊症に対する生殖補助医療技術として有用であると考えられ、今後の生殖医療において有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
泌尿器科学 村井 勝 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、村井 勝
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成16年10月15日

Hepatocyte growth factor regulates proteoglycan synthesis in interstitial fibroblasts.

(腎間質線維芽細胞における肝細胞増殖因子によるプロテオグリカン発現調節機構の検討)

小林 絵美

内容の要旨

〔目的〕肝細胞増殖因子(HGF)は腎臓の間質において抗線維化作用を有し、線維化に対する治療薬としての応用が期待されている。一方、細胞外マトリックスの主要な構成成分であるプロテオグリカンはコア蛋白にグリコサミノグリカン側鎖が共有結合した構造をしており、サイトカインや増殖因子の機能調節などに関与していることが知られている。特にプロテオグリカンのひとつであるデコリンは抗TGF- β 1作用をもつことが知られており、HGF同様に腎線維化抑制に対しての有用性が指摘されているが、今までHGFとプロテオグリカンの関係は明らかにされていない。そこで本研究では、HGFが腎間質線維芽細胞においてプロテオグリカン発現に与える影響とその機序の検討を行った。

〔方法〕ラット腎間質線維芽細胞(NRK-49F)およびヒト初代線維芽細胞(NHF)を実験に用いた。HGFの特異的受容体であるcMetのmRNA発現およびそのリン酸化、細胞内情報伝達経路をRT-PCR、免疫ブロット解析により検討した。次にHGFによるプロテオグリカン産生量の変動を塩化セチルピリニジウム沈殿法および陰イオンクロマトグラフィー法により、サブタイプ別に検討した。一部のプロテオグリカンはその発現量の変動をコア蛋白レベルでも評価した。次にHGFによるバイグリカン転写レベルでの調節をプロモーター解析により測定した。またバイグリカンが細胞増殖に与える作用を ^3H チミジンの取り込みにより検討した。

〔結果と考察〕NRKおよびNHFでc-Met mRNAの発現、HGF投与後のc-Metのリン酸化を確認した。HGF投与後、ERK1/2およびp38MAPKの著明なリン酸化亢進を認めたがJNKには明らかな変動は見られず、HGFの細胞内情報伝達経路はERK1/2、p38MAPKの両者を介している可能性が示唆された。次にHGF投与がプロテオグリカン合成に与える影響を検討した結果、時間・濃度依存性に増加することが示され、そのサブタイプ別検討では、陰イオン交換クロマトグラフィー法でHGF刺激後にピークIIの増加を認め、コア蛋白別の検討でもそのピークに相当するデコリン、バイグリカンの有意な増加を認めた。プロモーター解析ではヒトバイグリカンプロモーターの-1212から-686の部位にHGFに対する応答部位がある可能性が示された。また、TGF- β 1によるNRKでの ^3H -チミジン取り込みの増加がバイグリカン投与により濃度依存性に抑制され、バイグリカンは抗TGF- β 1作用を有することが示唆された。以上より、腎臓におけるHGFの抗線維化作用の機序の一つとして、HGFが抗TGF- β 1因子として働くプロテオグリカンの発現をプロモーターレベルで調節している可能性が示唆された。このことは、慢性腎不全などにおける腎間質障害の治療法を考える上で参考となる可能性が考えられた。

論文審査の要旨

諸種腎疾患の増悪さらに腎不全の発症には、腎間質の線維化が重要な役割を果しており、近年その抑制法に関して多くの研究がなされている。最近になってhepatocyte growth factor (HGF)が腎において抗線維化作用を呈することが明らかにされ、また細胞外マトリックスの主要構成成分であるプロテオグリカン(PG)のサブタイプの1つであるデコリン(DCN)が、抗transforming growth factor (TGF)- β 作用を有し、HGFと同様に抗線維化作用を有することが明らかにされてきた。そこで本研究では、HGFのPG産生への影響、さらに腎間質の線維化抑制効果について検討した。

実験は腎間質線維芽細胞(NRK)とヒト初代線維芽細胞の2種を用いて行われた。まずこれらの両細胞において、HGFの特異的受容体であるcMetの発現と、HGF投与後cMetのリン酸化が生じ、細胞内情報伝達系としてERK1/2、p38MARKの両者を介している可能性を示唆した。HGFの投与はPG合成を刺激し、PGのタイプ別の検討で、DCNとベーチカン(BGN)が有意に増加することを明らかにした。またTGF- β によるNRKにおける ^3H -チミジン取り込み増加が、BGNで有意に抑制されることを明らかにし、BGNが抗TGF- β 作用を有することを示唆した。

以上のような一連の研究に対して、まずHGFの腎線維芽細胞への作用が特異的であるのか、それともHGFの肝細胞への作用と同様な作用であるのかを議論された。HGFによる腎における線維化抑制作用はTGF- β を介するものであり、その抑制には本研究で示されたようにDCNやBGNを介するTGF- β 抑制作用と、HGFによる直接作用とがあるが、HGFの直接作用の方がよく、肝細胞への作用と類似するものであるとされた。腎間質におけるBGNの増加によってTGF- β による線維化促進が抑制されることを明らかにした点が、本研究の新知見であり、その裏付けがさらになされたかが問われた。それに関して本研究者は、腎尿管の結紮による腎間質線維化モデルにおいて、BGNのトランスジェニックマウスでは腎間質の線維化抑制が生じることを明らかにしたとされた。

諸種腎疾患モデルでの腎線維化促進においてPGの関与に差がみられることが指摘されたが、本研究は腎間質の線維芽細胞を用いた研究であり、糸球体の線維化への関与と異なる可能性があると考えられた。今後本研究の成果を踏えて、HGFを腎の線維化阻止治療に応用していくにあたり、問題となる点も議論がなされた。まずHGFの投与方法であり、腎への作用を強めるには、遺伝子治療が必要であること、その投与量も問題であり、投与量が多くなると腎毒性が生じる可能性があること、またHGFの作用を持続させていく必要があることなどが付言され、今後の検討課題とされた。

以上のように本研究は腎間質線維芽細胞を用いたin vitroでの研究であったが、HGFがBGNを介してTGF- β の作用を抑制して腎間質の線維化阻止に作用することを明らかにし、今後の腎疾患の治療を考える上で、価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
泌尿器科学 村井 勝 病理学 岡田 保典
内科学 日比 紀文
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16年10月30日

阻血による片側下肢の神経遮断が立位姿勢制御に与える影響

土岐めぐみ

内容の要旨

【はじめに】下腿筋群からの体性感覚入力、足関節の制御に基づく立位姿勢の構築に重要な役割を果たしている。下肢からの体性感覚入力の遮断により、中枢神経系は、身体の安定のため、新たな姿勢制御を適用する必要があるが、その再構築の過程を検討した報告は少ない。そこで、健康者を対象に、片側下肢の阻血による神経遮断が、立位姿勢制御に及ぼす影響について検討した。

【対象と方法】健康成人男性19名を対象に、立位姿勢の変化を、床反力計、関節角度計、表面筋電図によって解析した。床反力データより、左右の荷重量と、前後方向における足底圧 (center of pressure ; COP) の動揺中心の位置を算出した。

実験1. 安静立位姿勢を解析後、座位姿勢にて脛骨神経刺激により右腓腹筋のH反射とF波の導出を確認した。次に、駆血帯を用いて右下肢大腿部を300mmHgで圧迫し、以下の条件下での立位姿勢を解析した。A. H反射とF波がともに誘発可能な右大腿部圧迫直後 (H+, F+)、B. H反射が消失した直後でF波は誘発が可能な状態 (H-, F+)、C. H反射、F波とも消失した状態 (H-, F-)。

実験2. 荷重指示による立位姿勢の変化を、A. 駆血帯による圧迫前における左下肢への随意的な荷重、B. (H-, F-) 条件下での両下肢への随意的な荷重、について解析した。

【結果】実験1. (H+, F+) 時に比べて (H-, F+) 時では、右股関節と右膝関節が屈曲した。右下肢への荷重量は体重の約15%減少し、右足部におけるCOPの動揺中心は後方へ変位した。その結果、COP動揺中心は全体として6%後退した。積分筋電値は、右腓腹筋で減少し、左下肢と右下肢近位筋で増加した。しかし、(H-, F-) 条件と (H-, F+) 条件の間に有意な差はなかった。

実験2. A. 左下肢への随意的な荷重により、積分筋電値は右腓腹筋で減少、左下腿筋群で増加したが、全体のCOP動揺中心の位置は変化しなかった。B. (H-, F-) 条件下での両側下肢への均等な荷重指示は、左腰部脊柱起立筋、右内側広筋、左前脛骨筋の筋活動を増加させたが、関節角度およびCOP動揺中心の位置に変化はなかった。

【考察】感覚入力が遮断された下肢では、足関節の制御に基づく立位保持は困難となり、非阻血側下肢と近位筋群による姿勢制御が適用された。立位の安定には、重心を足関節軸に一致させる必要があり、非阻血側下肢を中心に、体幹を後方へ回旋させた立位姿勢が構築された。片側下肢へ随意的に荷重した場合には、全体のCOP動揺中心は変位せず、片側下肢の神経遮断時における立位姿勢の再構築は、阻血側下肢への荷重の困難さだけに起因してはいないと示唆される。一方、神経遮断された下肢に随意的に荷重するためには、両下肢・体幹筋の代償が必要であった。本論文によって、片側下肢の神経遮断に対する立位姿勢の構築過程が初めて明らかにされた。

論文審査の要旨

本研究は片側下肢の阻血による神経遮断が、立位姿勢制御に及ぼす影響について、運動学的検討を行ったものである。健康成人19名を対象に、立位姿勢の変化を床反力計、関節角度計、表面筋電図によって解析した。さらに神経遮断の過程を右腓腹筋のH反射、F波の変化によりモニターした。その結果、右大腿部末梢の阻血による神経遮断後の立位は、右下肢荷重量の減少、右側の股関節と膝関節の屈曲、右足底圧の動揺中心の後退により構築された。その際、右腓腹筋の筋活動が減少し、左下肢筋群と右大腿および体幹筋群の筋活動が増加した。片側下肢の感覚神経遮断は、'ankle strategy' に基づいた姿勢制御を困難にし、神経遮断された下肢に荷重するためには、両下肢・体幹筋の代償が必要となることが確認された。本研究によって、片側下肢の神経遮断に対する立位姿勢の構築過程が初めて明らかにされた。

審査では、今回の実験が想定している臨床モデルについて質問され、体性感覚障害を伴う末梢神経障害や脳血管障害、切断を念頭に置いていると回答された。これに対し、阻血による神経遮断が、必ずしもこれらの臨床モデルには適合しないのではないかと指摘されたが、これらの病態では臨床的に同様の姿勢構築が観察されることが関連研究によって報告されていると回答された。次に、実験の精度や再現性について問われ、予備実験において5名の被検者で測定値の再現性を確認したこと、および、個体により測定値にばらつきはあるものの、関節角度や重心動揺中心、筋活動の変化のパターンは共通していたことが説明された。対象のサンプリングを男性のみとした理由については、女性では体型の差や脂肪の影響が神経遮断の経過に関与する可能性が高いため、平均的な体型の健康男性を選んだと回答された。さらに、阻血操作に伴う痛みの影響や測定時の気温の設定について質問され、痛みがでないように細心の注意を払って阻血操作を工夫し、痛みがでた場合には実験を中止したこと、および、気温はほぼ一定に保ったことが回答された。本研究の結果を、リハビリテーション医療にどのように応用していくかの質問に対しては、運動療法における立位訓練の導入時などに、姿勢制御の変化のメカニズムを考慮しながら、患者に指導していくことや、重心動揺中心の測定などを用いて、患者に視覚的なフィードバックを与えながら、より効率的な運動療法や装具療法を進めていける可能性があるかと回答された。

以上、本研究にはなお検討すべき点が残るものの、リハビリテーション治療の中で重要な立位姿勢の制御について、片側下肢の神経遮断に対する立位姿勢の構築過程を明らかにし、今後の感覚障害を有する患者に対する治療方法への応用を示唆した点で、意義ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 リハビリテーション医学 里宇 明元
整形外科学 戸山 芳昭 内科学 鈴木 則宏
解剖学 仲嶋 一範
学力確認担当者：北島 政樹、戸山 芳昭
審査委員長：戸山 芳昭

試問日：平成16年11月10日

Endogenous expression of Müllerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites.

(出生後のラットセルトリ細胞におけるミューラー管退縮物質の内因性発現における複数の Steroidogenic factor-1結合部位とGATA-4結合部位の必要性について)

渡 邊 宏 治

内容の要旨

ミューラー管退縮物質 (Müllerian inhibiting substance ; MISあるいは antiMüllerian hormone ; AMH) は、男児胎生中の精巣において分泌され、女性内生殖器の原基であるミューラー管を退行させることによって正常な男性内生殖器の形成に導く重要な役割を果たしている。正常な性分化過程においてMISの発現は厳密に制御されており、特異的な時間的、空間的発現パターンを示すことがヒト、マウス、ラットなどで詳しく報告されている。最近の研究で性分化に関わる遺伝子産物SF-1およびGATA4蛋白などがMISのトランス発現制御因子として広く認知されるようになったが、その複雑な発現制御がどのようにおこなわれているかはまだ十分に解明されていない。

われわれはこの問題解決のためにMISのシスエレメントの検討が必要と考え、ヒトMISプロモーターの上流-269塩基対を使用して、更に種を超えてよく保存された塩基配列部位がSF-1およびGATA4蛋白のDNA結合配列に一致していることに注目し、これらの結合部位がMISの転写活性にどのように関わっているかを研究した。より生理的な条件下でのMISプロモーター活性を検討するため、培養初期の短期間のみ内因性にMISを発現する生後2日目のラット精巣由来のセルトリ細胞初代培養を用い、セルトリ細胞への遺伝子の導入効率の高いアデノウィルスベクターに種々のMISプロモーターとレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、トランジェントアッセイを行った。さらにプロモーター上のDNA-蛋白結合能はDNase I フットプリント法とゲルシフト法で検討した。

この結果、従来報告されていたSF-1結合部位 (proSF-1) とGATA4結合部位 (proGATA4) の上流に第二のSF-1結合部位 (disSF-1) とGATA結合部位 (disGATA) をヒトMISプロモーター上で新たに同定し、これら複数のSF-1結合部位とGATA結合部位の存在がMISの転写活性上昇に必要であることを示した。

論文審査の要旨

性分化過程に重要なミューラー管退縮物質 (MISまたはAMH) の発現パターンは、哺乳類において時間的、空間的に厳密な制御がなされているが、その発現制御機構はいまだ十分には解明されていない。本研究ではヒトMISプロモーターの上流-269塩基対の塩基配列部位がMISの転写活性にどのように関わっているか、特にこの範囲内に複数存在する精巣形成に必要なSF-1およびGATA4蛋白のDNA結合配列がどのような役割を果たしているかに注目して検討がおこなわれた。この結果、従来報告されていたSF-1結合部位 (proSF-1) とGATA4結合部位 (proGATA4) の上流に第2のSF-1結合部位 (disSF-1) とGATA結合部位 (disGATA) を新たに同定し、複数のSF-1結合部位とGATA結合部位の存在がMISの転写活性上昇に必要であることが示された。

審査ではまず2か所の結合部位の転写活性の調節機序について、特に立体構造的な検討はあったのかという質問がなされた。これに対し本研究では立体構造的な検討はなされていないが、SF1とGATA4の蛋白が結合してMISの転写活性を上昇させるという他施設からの報告があること、更にこの上流と下流の結合部位の中間にDNAの屈曲作用があるSOX9の結合部位があり、立体的構造の変化による転写効率の上昇が生じている可能性があるとの説明が行われた。次に初代培養でのSOX9のmRNAの発現の確認と共発現実験についての質問がされた。これに対しSOX9は生後2日目のセルトリ細胞初代培養からははっきりとした発現が確認できなかったこと、共発現の実験は興味があったが今回の検討では行っていないことが説明された。また成人男性でのMISの発現の低下の機序についての説明が可能かどうかの質問については、テストステロンの上昇にともなうMISの発現低下が一般にいわれているが今回検討した範囲にはテストステロンが作用する結合部位は存在せず別の制御機構が関与するものと推察されたとの回答がなされた。次に初代培養にMISの発現が高い出生前の精巣を使用することは考えなかったかという点と初代培養への生殖細胞の混入による影響について質問がなされた。これに対し実験に十分な量の胎児の精巣を摘出、確保することが困難であったとの説明がなされた。また生殖細胞の混入の可能性は否定できないことへの回答に対し、セルトリ細胞を直接染色するようなマーカーにて純度の検討がなされるべきだったとの指摘がおこなわれた。

以上のように、本研究は今後検討すべき課題を残すもののMISの内因性発現のある細胞を用いてプロモーターアッセイを行った点など実験のデザインがよくされており、その結果として複数のSF1およびGATA4の結合部位がMISの転写活性に重要であることを示した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
産婦人科学 吉村 泰典 解剖学 相磯 貞和
小児科学 高橋 孝雄
学力確認担当者: 北島 政樹、吉村 泰典
審査委員長: 吉村 泰典

試問日: 平成16年10月15日

Conformational epitope mapping of antibodies against desmoglein 3 in experimental murine pemphigus vulgaris.

(天疱瘡モデルマウスにおけるデスモグレイン3抗原の3次元エピトープ解析)

安西 秀美

内容の要旨

尋常性天疱瘡 (PV) は、カドヘリン型細胞接着分子デスモグレイン3 (Dsg3) に対するIgG自己抗体による自己免疫性水疱症である。ヒトPV患者の抗Dsg3 IgG自己抗体の主要エピトープは、細胞間接着機能上重要である細胞外N末領域(1-161)にある事が既に示されている。

Dsg3に対する免疫寛容が成立していないDsg3-/-マウスを、マウスデスモグレイン3 (mDsg3) で免疫すると抗Dsg3 IgG抗体を産生する。このDsg3-/-マウスの脾細胞を、Dsg3を発現する免疫不全マウスRag2-/-マウスに移植すると、持続的に抗mDsg3 IgG抗体が産生され、PVの表現型(水疱・びらん・脱毛等)を呈する。Dsg3-/-マウス由来の非免疫ナイーブ脾細胞を移植した場合も、同様のPVの表現型を呈する。本研究では、免疫脾細胞およびナイーブ脾細胞を用いたPVモデルマウスにおける抗mDsg3抗体のエピトープの局在と病原性を明らかにする事を目的とした。

mDsg3とその類似分子mDsg1間のスワッピング分子を作成、これらに対するPVモデルマウス血清の反応性をCompetition ELISAにより検討した。対象血清は、免疫脾細胞を用いたPVモデルマウス53例、ナイーブ脾細胞を用いたPVモデルマウス56例とした。更に、mDsg3細胞外領域のN末側及びC末側に対する抗体の病原性を比較する為、N末側アミノ酸残基1-162及びC末側アミノ酸残基403-565による免疫脾細胞を用いたモデルマウスの表現型を比較検討した。

その結果、mDsg3細胞外C末領域(195-565)に対する抗体産生が、免疫脾細胞を用いたPVモデルマウス53例中51例(96.2%)、ナイーブ脾細胞を用いたPVモデルマウス56例中45例(80.4%)で認められた。一方、N末領域(1-162)に対しては、免疫脾細胞を用いたPVモデルマウス53例中3例(5.7%)、ナイーブ脾細胞を用いたPVモデルマウス56例中8例(14.3%)で認められた。又、C末側アミノ酸残基による免疫脾細胞を用いたモデルマウスでは、PVの表現型と抗体産生がN末側アミノ酸残基のものと同等に或いは若干顕著に認められた。

本研究により、PVモデルマウスでは、ヒトPV患者とは異なり、mDsg3細胞外C末領域に対し抗体産生が高率に認められ、これらC末領域に対する抗体も水疱形成を誘導し病原性がある可能性が示唆された。

論文審査の要旨

尋常性天疱瘡(以下PV)は、カドヘリン型接着分子であるデスモグレイン(Dsg)3に対するIgG自己抗体を主体とする自己免疫性水疱症であり、そのIgG自己抗体の主要抗原エピトープはDsg3細胞外領域N末側側にあることが最近のヒトDsg1/Dsg3間のスワッピング分子を用いたcompetition ELISAによって示されている。本研究では、本教室で自己抗原ノックアウトマウスを用いて作成された2種のPVモデルマウスにおけるDsg3の三次元エピトープの分子上局在とその細胞外領域C末側に対する抗体に病原性があるか否かを検討した。その結果、PVモデルマウスにおいてはヒトPV患者とは異なり主としてDsg3細胞外領域C末側に対するIgG抗体が高率に産生されており、これらC末側に対する抗体にも病原性がある可能性が示唆された。

審査ではまず実験に使用した2種のモデルマウスの特性やデスモグレインを含む細胞接着分子またこれまでの本研究に関連した実験データ更にはヒト天疱瘡の抗体、水疱形成と接着分子などについて基本的な質問があり申請者から明確な回答があった。ついでスワッピング分子において糖鎖修飾の有無と抗原性への影響はないかとの質問についてはDsgの機能は糖鎖independentといわれているが、N末側に糖鎖のサイトがあるので全く独立か否かについての証明はえられてはいないと説明され了解された。また、スワッピング分子がDsgの細胞外ドメインの切れ目と一致していない点に関してはヒトでの検討と条件を合わせたためと説明され了解された。すでにヒトPVの自己抗体の主要抗原エピトープはDsg3のN末側にあるとわかっているのにモデルマウスの抗体を検索した理由については、新たに作成されたモデルマウスの免疫学的な性状を明らかにするためであったと説明された。今回の研究は患者およびモデルマウスの多数例の解析による傾向からの考察であるが、患者においてはC末側と反応する抗体のみを有する症例があるかとの問いに対しては10%以下の症例に認められると回答された。またキメラのコンストラクトが本当に三次元構造を保っているかとの質問には、やはり構造の変化する可能性は否定できないと回答され了解された。Competition ELISAのコントロールの取り方、キメラのコンストラクトで免疫した場合に得られる抗体プロファイルの分析結果などについても質問があった。申請者の観察したモデルマウスの抗原エピトープの病期による変化も興味深い現象であるとの指摘があった。

以上のように、本研究は要検討あるいは改善すべき点をいくつか残しているが、新たな手法を用いて作成された、自己の成分に対する抗体を持続的に産生するPVモデルマウスにおける三次元エピトープを解析しDsg3細胞外領域C末側に対する抗体の病原性の可能性を初めて検討したもので、今後難治性疾患であるPVの解明、さらには自己免疫疾患の詳細な発症機序解明へ向けて、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 皮膚科学 西川 武二

微生物学・免疫学 小安 重夫 微生物学・免疫学 石川 博通
病理学 岡田 保典

学力確認担当者: 北島 政樹、小安 重夫

審査委員長: 小安 重夫

試問日: 平成16年12月13日

Galactosyltransferase associated with tumor in patients with ovarian cancer :

Factors involved in elevation of serum galactosyltransferase.

(卵巣癌患者血清中の癌関連ガラクトース転移酵素上昇に関与する因子の検討)

齊 藤 英 子

内容の要旨

論文審査の要旨

【目的】糖転移酵素の1つである β 1,4-galactosyltransferase (β 1,4-GalT)は、膜結合型蛋白であるが、可溶性になると体液中に放出される。可溶性の本酵素には卵巣癌患者血清中で上昇する癌関連ガラクトース転移酵素 (GAT) の分画と、健常人血清中にも存在するnormal GalTの分画とがあり、これらは共通の遺伝子産物由来とされていることから、卵巣癌患者血清中における両者の動向を比較し、卵巣癌患者血清中でGATが上昇する機序について検討した。

【方法】上皮性卵巣癌完全手術例の術前・術後の血清を対象に、可溶性 β 1,4-GalT全量 (total GalT) とそこに含まれるGAT, normal GalTの量を検討した。卵巣癌患者血清中には正常組織由来の酵素も存在するので、ヒト卵巣癌担癌ヌードマウスを作製し、ヒト卵巣癌由来の酵素のみを検出した。またGATを多量に含有するヒト初乳に血清を添加し、血清因子がGATやtotal GalTの量に及ぼす影響を検討した。

検体中の可溶性 β 1,4-GalTの検出にはモノクローナル抗体Mab8628とMab8513を用いた。Mab8628はヒトのGATとnormal GalTの両者を認識し、マウスの酵素には反応しない。Mab8513はGATのみを認識する。そこでGATの検出にはMab8628とMab8513によるdouble determinant EIAを用い、total GalTの検出にはMab8628によるWestern blottingを施行した。またnormal GalTは、Mab8513固相化ピースによってGATを予め吸着除去した検体を用いてWestern blottingを行い、Mab8628にて検出した。

【結果】卵巣癌患者血清中では腫瘍摘出後GATが一律に低下したのに対して、total GalTの増減は症例ごとにさまざまであった。またヒト卵巣癌担癌マウスの血清中にはGATとnormal GalTが存在し、腫瘍摘出後、GAT分画は1日で消失したのに対しnormal GalTは50日以上存在した。

ヒト初乳中のGATは血清添加により減少したが、total GalT量は添加の前で変化しなかった。また卵巣癌担癌患者血清を添加した場合は健常女性血清の場合に比べてGAT減少効果が小さかった。

【考察】卵巣癌患者血清中でGATのみが腫瘍の動向を反映していたが、担癌マウスの検討から腫瘍細胞はGATもnormal GalTも放出していることが判明した。放出されたGATは血清中の因子によって減少すると考えられるがtotal GalT量としては減少しない。以上に加え、GAT分子とnormal GalT分子とは大部分が共通であるとの報告があることから、血清因子は「GATをnormal GalTへと変換する」と推察され、したがって卵巣癌担癌状態でのGAT上昇は、腫瘍からGATが放出されるのに加え、血清中でGATからnormal GalTへの変換が抑制されているため、という機序が示唆された。

癌関連ガラクトース転移酵素 (GAT) は、ゴルジに局在する膜結合型 β 1,4-galactosyltransferase (β 1,4-GalT) に由来する可溶性酵素で、卵巣癌患者血清中で上昇する。一方、卵巣癌患者血清中には健常人でも認められるnormal GalTの分画も存在し、GATとnormal GalTは共通の遺伝子産物であることから、卵巣癌患者血清中における両者の動向を比較し、GATが上昇する機序について検討した。

検討には2種のモノクローナル抗体を用い、この内Mab8628はヒトの β 1,4-GalT全てを認識するのに対して、Mab8513はGATのみを認識する。GATの検出にはMab8628とMab8513によるdouble determinant EIAを、 β 1,4-GalT全量であるtotal GalT検出にはMab8628によるWestern blottingを、normal GalTの検出にはMab8513にてGATを吸着除去した検体を用いたWestern blottingを行なった。その結果、卵巣癌患者血清では腫瘍摘出後にGATが一律に低下し、腫瘍の動向を反映したのに対して、total GalTは症例ごとに増減が異なった。またヒト卵巣癌担癌マウスの検討により、腫瘍由来酵素としてはGATとnormal GalTの両者が検出され、しかもGATの血中半減期はnormal GalTに比して極めて短いことが判明した。そこで血清因子の影響を検討するため、 β 1,4-GalTをGATとして含有するヒト初乳に血清を添加したところ、GAT量は減少したが、total GalT量は変化せず、卵巣癌患者血清の添加では健常女性血清の場合に比べてGAT減少効果が小さかった。以上より血清因子はGATをnormal GalTへと変換することが推察され、卵巣癌担癌状態でのGAT上昇は、腫瘍からのGAT放出に加え、血清中でGATからnormal GalTへの変換の抑制、という2段階の機序が示された。

審査では、GATはWestern blottingで検出可能か、との質問に対して、可能であるが、量的変化についてはdouble determinant EIAの方が感度が高い、との回答があった。次にGATおよびnormal GalTにおいて2種のモノクローナル抗体の認識するエピトープが明らかにされているかとの質問があり、過去に検討が行なわれ、2種のモノクローナル抗体の認識部位がともにstem regionであり、互いに異なることは明らかにされているが、GATのN末端側がblockされアミノ酸配列を決定できないことから、具体的なエピトープの差異は明らかでない、との回答があった。続いてGAT量を減少させる血清因子の実態は明らかになっているか、との質問があり、血清分画添加により、比較的分子量の大きい分画にその因子が存在することが明らかになっていること、詳細については検討中である、との回答があった。また、乳清への血清添加実験においてヒト卵巣癌担癌マウスの腫瘍摘出前後の血清を用いることにより、GAT量減少を抑制する物質が、腫瘍に、あるいは他臓器に由来するかを明らかにすることができるであろう、という指摘があった。以上のように、本研究はさらに検討すべき課題を残しているものの、normal GalTとGATの動向の差異を明らかにし、卵巣癌でGATが特異的に上昇する機序に血清因子が関与しているという極めて興味深い現象を初めて明らかにした点で、有用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
病理学 坂元 亨宇 先端医科学 河上 裕
病理学 岡田 保典
学力確認担当者: 北島 政樹、坂元 亨宇
審査委員長: 坂元 亨宇
研究指導者: 野澤 志朗 (産婦人科学)

試問日: 平成16年12月17日

Pulmonary Hypoplasia : Prediction with Use of Ratio of MR Imaging-measured Fetal Lung Volume to US-estimated Fetal Body Weight

(高速度MRIを用いた胎児肺形成指標の確立)

谷 垣 伸 治

内容の要旨

肺低形成は、胎児期における肺の発育・形成不全の為、分娩直後より重度の呼吸障害に陥る新生児死亡率が高い疾患である。肺低形成を出生前診断することは、胎児治療や帝王切開術の適応を決定する際に重要である。従来、肺低形成の出生前診断は、現病歴に加え、超音波断層法(以下USとす)が用いられてきたが、一定の見解が得られていない。また、USは、羊水過少例、母体の肥満、胎児の骨化の進行等により胎児肺の描出が困難である。

肺容積は肺低形成の発症に関与する最も重要な因子であり、胎児肺容積の評価は、肺低形成の出生前診断に有用と考えられる。従来胎児MRI検査は、撮像中の胎動によるmotion artifactを減少させる為、胎児への鎮静剤投与が必要であった。高速度MRIは、母体息こらえの短時間に撮像が可能となり、胸郭内臓器である胎児肺も明瞭に全肺野を撮像可能となった。これまでMRIを用いた胎児肺形成の評価は、妊娠週数から予測される肺容積と、MRIにて測定した肺容積とを比較し行われていた。しかし、妊娠週数から予測される肺容積は、巨大児や子宮内胎児発育遅延児のように胸郭の大きさが平均的な発育の児と異なる場合不正確である。

初めに、高速度MRIを用いて得られた胎児肺容積(以下MR-FLVとす)とUSより算出された胎児推定体重(以下US-FBWとす)から肺低形成の出生前診断のための新指標MR-FLV/US-FBWを作成した。MR-FLV/US-FBWは、ハイリスク群において対照群に比し有意に低値であった。さらにハイリスク群における検討で、肺低形成と出生後診断された児のMR-FLV/US-FBWは、肺低形成と診断されなかった児に比し有意に低値を示した。現在最も広く用いられている肺低形成の確定診断法は、体重/肺重量比であり、MR-FLV/US-FBWは、最も近い方法である。これまでに肺低形成の出生前診断について胎児肺と体重についての報告はなかったが、今回肺低形成を発症する児は、胎児期より体重に比して肺容積が少ないことを表し、MR-FLV/US-FBWが肺低形成の出生前診断の指標になりうることを示した。

次に従来から用いられてきたUSによる肺低形成の出生前診断の各指標とMR-FLV/US-FBWを比較し、臨床的有用性について検討した。MR-FLV/US-FBWは、USによる各指標に比し最も高い診断精度を示した。これは、USによる指標は2次元であり、立体的な評価であるMRIの優位性を示唆した。

以上高速度MRIより測定した胎児肺容積(MR-FLV)とUSより算出された胎児推定体重(US-FBW)を用いた新しい指標MR-FLV/US-FBWは、胎児の肺形成を推測可能とし、肺低形成の出生前診断に有用であった。

論文審査の要旨

肺低形成は、胎児期における肺の発育・形成不全の為、分娩直後より重度の呼吸障害に陥る新生児死亡率が高い疾患である。肺低形成の出生前診断は、胎児治療や帝王切開術の適応の決定に重要である。近年開発された高速度MRIにより、短時間に撮像可能となり、胎児肺も明瞭に撮像可能となった。そこで本研究では、高速度MRIより得られた胎児肺容積(MR-FLV)と超音波断層法(US)より算出された胎児推定体重(US-FBW)から肺低形成の出生前診断の新指標MR-FLV/US-FBWを作成し、肺低形成の出生前診断を試みた。現在汎用されている肺低形成の確定診断法は、剖検時の体重/肺重量比であり、MR-FLV/US-FBWは出生前診断としては最も理想的な方法である。我々は、本研究によって、肺低形成を発症する児が、胎児期より体重に比して肺容積が少ないことを明らかにし、MR-FLV/US-FBWが肺低形成の出生前診断の指標になりうることを示した。次に従来からのUSによる肺低形成の各指標とMR-FLV/US-FBWを比較、有用性について検討した。MR-FLV/US-FBWは、USの各指標に比し最も高い診断精度を示した。以上、高速度MRIとUSを用いた新しい指標MR-FLV/US-FBWは、胎児の肺形成を推測可能とし、肺低形成の出生前診断に有用であった。

審査では、まず、MRIの安全性について質問がなされ、器官形成期を過ぎて撮像していること、十分なインフォームドコンセントを得て検査を施行していると回答された。次に今回用いられた高速度MRIの撮像方法について説明が求められ、1回のパルスのみを用いて画像を作成することにより、撮像時間の短縮が図られたため、出生前診断に応用されたことが説明された。今回の新指標の偽陽性症例については、骨系統疾患のUS-FBW測定の困難さが説明され、そのような症例についてはMRIを用いての体重の推定が有効である可能性が示唆された。従来USを用いた指標に比しての利点については、MRIは胎児の大きさや母体の撮像条件によらず、正確な胎児肺容積が測定できることから、胸腔内病変をもつ胎児に対して特に有効であることが説明され、偽陰性症例が存在するものの横隔膜ヘルニア症例においてその予後を推測できる初めての指標が作成されたと回答された。肺低形成と診断された児の胎内治療について質問されたが、現在肺低形成に対する有効な胎内治療はないものの本研究により、正確な胎内診断がなされることで、今後の治療法の開発にもつながる可能性があることと回答された。

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、高速度MRIを使用することにより、USでは困難であった肺低形成を出生前診断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
放射線医学 栗林 幸夫 小児科学 高橋 幸雄
外科学 小林 紘一
学力確認担当者: 北島 政樹、栗林 幸夫
審査委員長: 栗林 幸夫

試問日: 平成16年12月20日

Effects of inactivation and stimulation of locus coeruleus on respiratory activity of neonatal rat.

(青斑核の不活性化および刺激が新生ラットの呼吸性神経活動に与える影響)

伯野 春彦

内容の要旨

論文審査の要旨

【緒言】青斑核(LC)は橋背側第4脳室底外側縁に沿って存在するノルアドレナリン作動性神経核である。最近では、LCが呼吸を調節する神経回路に組み込まれ、呼吸性神経活動形成に興奮性に作用している可能性が示唆されている。本研究の目的は新生ラット摘出脳幹脊髄標本における呼吸性神経活動形成に対するLCの日齢依存的影響を検討することである。具体的にはLCの薬理的な不活性化および電気刺激が新生ラット摘出脳幹脊髄標本の呼吸性神経活動に与える影響について検討した。さらに、新生ラット橋スライス標本を用いてLCの電気刺激がA5領域の神経活動に与える影響についても検討した。

【材料・方法】Sprague-Dawley新生ラット(生後1-4日)の脳幹と脊髄を一塊にして摘出し、2%CO₂を含むガスで平衡させたpH 7.8の人工脳脊髄液で灌流した。呼吸性神経活動を舌下神経あるいは上位頭髄神経(C1-4)前根から吸引電極を用いて記録した。薬理的な不活性化:1-10μMのテトロドトキシン溶液、あるいは200μMのノルアドレナリン溶液を両側のLCに注入し、その前後で呼吸頻度(RR)を測定した。電気刺激:ステンレス電極を用いて、パルス電流(25-50μA, 30ms, 0.5Hz)を3-4分間、同時に両側のLCに加え、刺激前と刺激中のRRを測定した。LCの電気刺激がA5領域の神経活動に与える影響:新生ラット(生後1-4日)から橋スライス標本を作製し、同側あるいは反対側のLCにパルス電流(50μA, 30ms)を加え、A5領域の神経活動の変化を解析した。

【結果】テトロドトキシンあるいはノルアドレナリンによるLCの薬理的な不活性化により、1-2日齢の標本ではRRに変化を認めなかったが、3-4日齢の標本ではRRは有意に減少した。両側LCの電気刺激により、1-2日齢標本のRRは変化しなかったが、3-4日齢のRRは有意に増加した。すべての日齢において、同側あるいは対側LCの電気刺激はA5領域の神経活動を変化させなかった。

【考察・結論】以上の結果よりLCが新生ラット摘出脳幹脊髄標本における呼吸性神経活動の形成に対して日齢依存性の興奮作用を有していることが示唆された。この標本における呼吸性神経活動形成の中核である延髄へのノルアドレナリン投与はRRを減少させることが知られている。したがって、LCのノルアドレナリン性出力は延髄呼吸中枢に対して直接作用し得ず、介在ニューロンが存在しなければならない。A5領域は呼吸中枢に対して抑制作用を有し、かつノルアドレナリンに対して抑制性の反応を示すことからA5領域が介在領域である可能性が存在する。しかしながら、LCの電気刺激がA5領域の神経活動に有意な影響を与えなかったことから、本研究の結果はA5領域がLCと延髄呼吸中枢をつなぐ介在領域ではないことを示している。

青斑核(LC)は橋背側第4脳室底外側縁に沿って存在するノルアドレナリン作動性神経核である。最近では、LCが呼吸を調節する神経回路に組み込まれ、呼吸性神経活動形成に興奮性に作用している可能性が示唆されている。本研究では新生ラット摘出脳幹脊髄標本における呼吸性神経活動形成に対するLCの日齢依存的影響を検討した。具体的にはLCのテトロドトキシンあるいはノルアドレナリンによる薬理的な不活性化および電気刺激が新生ラット摘出脳幹脊髄標本の呼吸性神経活動に与える影響について検討した。さらに、新生ラット橋スライス標本を用いてLCの電気刺激がA5領域の神経活動に与える影響についても検討した。その結果、テトロドトキシンあるいはノルアドレナリンによるLCの薬理的な不活性化により、early群(1-2日齢)の標本では呼吸頻度(RR)に変化を認めなかったが、late群(3-4日齢)の標本ではRRは有意に減少した。一方、両側LCの電気刺激により、late群のRRは有意に増加した。したがって、LCが新生ラット摘出脳幹脊髄標本における呼吸性神経活動の形成に対して日齢依存性の興奮作用を有していることが示唆された。また、A5領域がLCと延髄呼吸中枢との介在領域である可能性が考えられたが、LCの電気刺激がA5領域の神経活動に有意な影響を与えなかったため、A5領域は介在領域ではない可能性が示唆された。

審査では、まずLCが呼吸性神経活動形成に関与していると考えた理由について質問がなされた。これに対し、LCニューロンの膜電位および発火頻度が1)呼吸性神経活動によって修飾されること、2)高炭酸ガス性アシドーシスに対して、シナプス伝達によらずに、興奮性応答を示すこと、3)高炭酸ガス状態に曝露されたラットのLCでニューロンの活性化を意味するc-fosの発現が認められること、が理由としてあげられた。次に、日齢によってearly群とlate群に分ける根拠について質問がなされた。これに対して、ラットの2-3日は寿命から概算してヒトのSIDS好発時期(80日から120日目)に相当するため、神経回路の発達に変化を来す時期であることが推定されるとの説明がされた。しかし、1-2日齢と3-4日齢という形で比較するのではなく、1日齢と4日齢を比較してはどうかとの指摘もあった。また、この標本において呼吸頻度が少ない点が指摘されたが、1)灌流液の温度が低いこと、2)迷走神経を遮断していることなどが理由として説明された。審査の後半では、α2ブロッカーを用いた薬理学的実験をすることや電気刺激の実験は細胞内記録を用いて行うことが望ましいこと、電気刺激は単発ではなく頻回に繰り返す必要があることなど数点の助言がなされた。また、当該領域の障害をもたらす各種神経疾患での呼吸調節との関連性についての質問もなされた。

以上、本研究はいくつか検討すべき課題が残されているものの、呼吸性神経活動形成に対する青斑核の日齢依存的影響を検討したもので、SIDSの病態解明に寄与するものと評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
解剖学 仲嶋 一範 内科学 鈴木 則宏
外科学 小林 紘一
学術確認担当者: 北島 政樹、仲嶋 一範
審査委員長: 仲嶋 一範

試問日:平成16年12月24日

肥満2型糖尿病モデル動物db/dbマウスにおける PPAR γ 、PPAR α アゴニストの影響

矢 島 賢

内容の要旨

肥満2型糖尿病は、高血圧や高脂血症などを高率に合併し、動脈硬化を引き起こす疾患である。その病態の基盤にはインスリン抵抗性があり、それは肥大した脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインが正常のバランスを失った状況下でおこるほか、肝臓や筋肉などの末梢組織にトリグリセリド(TG)が蓄積するためと考えられている。また、肥満2型糖尿病ではインスリン抵抗性と同時にインスリン分泌も障害されており、血糖値が上昇しはじめる前段階で遊離脂肪酸が引き起こす脂肪毒性説が報告されている。近年、インスリン抵抗性改善薬としてperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ アゴニストが開発され、血糖改善効果のほか脂質改善効果および抗動脈硬化作用も報告されており、注目されている。また、高脂血症の治療薬であるフィブラート系薬剤は、PPAR α アゴニストであることが判明した。これらのPPARアゴニストの併用や両アゴニストによる治療は、単独療法と比較してより脂肪毒性を改善するであろうとの仮説のもとに、インスリン抵抗性やインスリン分泌不全に及ぼす影響を検討した。

(対象と方法)

5週齢の雄性C57BL/6Jマウスおよび同週齢のdb/dbマウスを用いて実験した。これらのマウスに、PPAR γ アゴニストのpioglitazone (P)やPPAR α アゴニストのbezafibrate (B)、さらにPPAR γ/α アゴニストである5-[(2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl]-2-N-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl]methyl]benzamide (KRP-297)を単独あるいは併用投与し、4週間後に血漿のパラメーター、膵臓のインスリン含量およびTG含量を測定した。また膵液実験において、グルコース刺激性インスリン分泌(GSIS)反応を観察し、さらに膵臓の病理組織学的検討をした。

(結果と考察)

肥満2型糖尿病モデル動物であるdb/dbマウスは、コントロールのC57BL/6Jマウスと比較して、肥満や体重増加から高血糖、高脂血症および高インスリン血症を呈し、GSISの消失、膵 β 細胞膜の糖輸送担体(GLUT2)の消失および膵ラ島のインスリンの枯渇が認められた。db/dbマウスにPPAR γ アゴニストのPを投与すると、体重は増加したが、高血糖、高脂血症および高インスリン血症が改善し、アディポネクチンは増加した。GSIS、膵 β 細胞膜のGLUT2および膵ラ島のインスリンは保持され、インスリン抵抗性やインスリン分泌不全を改善させた。PとPPAR α アゴニストであるBの併用やPPAR γ/α アゴニストの効果はGSISが増強したことであり、 γ/α アゴニストでは体重増加の抑制、膵ラ島過形成の抑制およびアディポネクチンのさらなる上昇が認められた。肥満2型糖尿病において、PPAR γ アゴニストとPPAR α アゴニストの併用やPPAR γ/α アゴニストによる治療は、PPAR γ アゴニスト単独よりも体重増加の抑制および膵臓のGSIS増加の両面においてより効果的である可能性を示した。

論文審査の要旨

肥満2型糖尿病の基盤にはインスリン抵抗性があり、その改善薬としてperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ アゴニストの有用性が報告されている。また高脂血症治療薬のフィブラート系薬剤は、PPAR α アゴニストであることが判明し、両アゴニストの併用はインスリン抵抗性の改善により有効と考えられている。そこでこの両アゴニストのインスリン抵抗性やインスリン分泌不全の影響を、肥満2型糖尿病モデル動物であるdb/dbマウスを用いて検討した。

db/dbマウスにPPAR γ アゴニストのpioglitazone (P)を投与すると体重は増加したが、高血糖、高インスリン血症および高脂血症が改善し、アディポネクチンが増加した。さらにグルコース刺激性インスリン分泌(GSIS)、膵細胞膜の糖輸送担体および膵ラ島のインスリンは保持された。PとPPAR α アゴニストのbezafibrate (B)の併用あるいはPPAR γ/α アゴニストであるKRP-297の投与は、Pの単独投与の場合よりもGSISを増強し、併用効果が明らかであった。しかし、P+Bの投与効果とKRPの投与効果には差があり、アディポネクチンの増量度や膵ラ島の過形成抑制制度および体重増加抑制制度は、KRP投与群で著明であった。

このような研究に関して、まずPPAR γ アゴニストPの単独効果に比し、PにPPAR α アゴニストのBを併用した場合、あるいは両受容体アゴニストとして開発されたKRPを投与した場合に、Pの効果が増強される機序、さらにPとBの併用効果とKRPの効果に差がみられたことが議論された。Pの単独投与とPとBの併用あるいはKRPの投与とで血糖、血漿インスリン、中性脂肪等に差はなく、膵インスリン含量にもそれほど差はないが、GSISが、P+BあるいはKRP投与群で有意に増強されたことは、膵 β 細胞の糖に対する感受性が増強したためではないかとされた。これらの薬剤投与時にアディポネクチンが著明に増加しており、このアディポネクチンがGSISを増強させている可能性も議論されたが、P単独投与時とP+Bの併用投与時とでアディポネクチン値にそれほど差がないことから、アディポネクチンのGSIS増強への影響は少ないとされた。

KRP群はP+B群に比し、体重増加の抑制制度、膵ラ島の過形成抑制制度、アディポネクチンの増量度が著明であった。このような差が生じた原因として、PPAR γ およびPPAR α 受容体への薬剤の作用機序の差であるのか、KRPの特異な作用であるかも議論された。KRP群では食事摂取量が減って、体重増加の抑制さらにそれが原因して膵ラ島の過形成が抑制されている可能性もあり、薬剤の特異的な作用に基づくものと考えられた。

以上のように、PPAR γ とPPAR α のアゴニストの併用によるインスリン分泌増強機序の詳細をさらに解明する課題が残されたが、研究の計画と結果は妥当であり、2型糖尿病の治療を考える上で、価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
医化学 末松 誠 内科学 池田 康夫
薬剤学 谷川原 祐介
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16年12月21日

若年非糖尿病肥満患者における肥満・糖尿病関連遺伝子 resistinの血中濃度と遺伝子多型の検討

東 宏 一 郎

内容の要旨

論文審査の要旨

Resistinはマウスにおいて、インスリン抵抗性改善薬のチアゾリジン系薬剤で発現が抑制される遺伝子として発見されたサイトカインで、肥満やインスリン抵抗性と関連するホルモンと考えられている。本研究では、非糖尿病肥満患者を対象として、体組成、インスリン抵抗性などの表現型を詳細に評価するとともに、resistin遺伝子多型の探索、resistin血中濃度の測定を行い、表現型との関連を検討することを目的とした。さらに、一部の症例では、1.5年の食事と運動による介入前後の長軸的検討や運動耐容能の検討もあわせて行った。

対象は当院肥満外来通院中の若年非糖尿病肥満患者70名(男36/女34)である。水中体重秤量法を用いた体脂肪率・体脂肪量、腹部CTスキャンを用いた腹部体脂肪分布、75g糖負荷試験による血糖・インスリンを評価した。Resistin血中濃度の臨床的検討は、64名を対象とし、非肥満者15名とも比較した。64名中35名で、食事と運動による介入前後の長軸的検討を行い、64名中38名で、運動耐容能との関連を検討した。Resistin遺伝子の解析は、70名中60名で行い、resistin遺伝子全体をシーケンシ、resistin一塩基遺伝子多型の探索を行った。さらに、同定したresistinプロモーター領域の遺伝子多型の中でresistin血中濃度と相関を認めた多型についてluciferase assayにより転写活性への影響を検討した。

Resistin血中濃度は断面的検討で肥満症例で非肥満者に比し高値で、BMIと正相関した。長軸的検討では、resistin血中濃度の変化率はBMI、体脂肪率、体脂肪量、内臓脂肪面積、糖負荷試験中の血糖の曲線面積・インスリンの曲線面積のそれぞれの変化率と正相関した。遺伝子解析により、10個の一塩基遺伝子多型を同定し、この中でプロモーター領域の多型である-638G>A多型と-420C>G多型の組み合わせが、resistin血中濃度と関連した。Luciferaseを用いたin vitroの検討より同多型の組み合わせが転写活性に影響を与えることが示された。

以上のことから、ヒトresistinは体組成、特に体脂肪量と関連があり、インスリン抵抗性とも関連しうることが示唆された。また、プロモーター領域のSNPsである-638G>A多型と-420C>G多型の組み合わせが、転写活性に影響をおよぼし、resistin発現を規定する遺伝的因子の1つと考えられた。

Resistinはマウスで、肥満とインスリン抵抗性を結び付けるadipocytokineとし発見されたホルモンであるが、ヒトにおける意義はあまり明らかにされていない。そこで本研究では、非糖尿病肥満患者においてresistin血中濃度、resistin遺伝子多型の検索を行い、BMI、体脂肪量、内臓脂肪面積、血糖あるいはインスリン抵抗性との関係、さらに減食+運動療法による1年半の介入試験後の変化も検討された。

以上の検討の結果、resistin血中濃度は肥満者で明らかに高値で、BMIと正相関を示した。長期間にわたる介入試験前後では、BMI、体脂肪量、内臓脂肪面積、平均血糖値の変化率とresistin血中濃度の変化率との間に有意な正相関がみられた。Resistinの遺伝子解析では、10個の一塩基遺伝子多型が同定され、この中でプロモーター領域の多型である-638G>A多型と-420C>G多型の組み合わせが転写活性に影響することを明らかにした。このような結果から、ヒトresistinは体脂肪量やインスリン抵抗性と関連すること、またresistin遺伝子多型の検討で、-638G>A多型と-420C>G多型の組み合わせが転写活性に影響し、resistin発現を規定しているとした。

以上の研究に対して、まずヒトにおけるresistinの産生部位、resistinの血中濃度に影響する因子およびresistinの日内変動など基本的な事項が問題とされた。ヒトでの産生部位は、脂肪細胞、単球さらに骨髄細胞など多岐にわたるが、未だ主たる産生部位がどこか明らかでなく、resistinの日内変動は明らかでないことが示された。Resistinのヒトにおける刺激因子、抑制因子も明らかにされていないが、肥満者では明らかに高く、減量に伴って減少してくることは確かとされた。Resistinはヒトでは脂肪細胞とともに単球でも多く産生されていることから、炎症との関係が注目されたが、炎症との間には明らかな関係はないとされた。

1年半にわたる食事と運動療法で、肥満者のBMI、体脂肪率、インスリン抵抗性に明らかな改善がみられたが、resistin血中濃度の低下は軽度であった。そのためか、resistin遺伝子解析で、-638G>A多型と-420C>G多型の組み合わせがresistin血中濃度と関連するものの、その多型から介入効果を推測することはできなかったとされた。長期間にわたる介入試験を完了した症例数が少なかったこともあり、さらに多数例での検討が必要であるとされた。

遺伝子および蛋白レベルで、ヒトとマウスresistinの相同性は60%にすぎず、その機能および発現部位もなかり異なり、今後ヒトにおける発現部位や機能についてさらに検討してみる価値があるとされた。

以上のように発見されて間もないadipocytokineの1つであるresistinの体脂肪量やインスリン抵抗性との関係を明らかにし、肥満およびインスリン抵抗性の研究領域に新しい示唆を与える研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男

分子生物学 清水 信義 内科学 日比 紀文

内科学 池田 康夫

学力確認担当者：北島 政樹、清水 信義

審査委員長：清水 信義

試問日：平成17年 1月13日

子宮頸部腫瘍におけるp16^{INK4a}蛋白質過剰発現の解析

石川 光也

内容の要旨

ハイリスク型ヒトパピローマウイルス（以下HR-HPVと略す）は子宮頸部扁平上皮癌の発癌因子とされている。HR-HPVのウイルス遺伝子産物であるE7蛋白質は宿主細胞の癌抑制遺伝子産物Rb蛋白質の機能を抑制して宿主の細胞周期を攪乱しているが、この時同時に細胞周期調節蛋白質であるp16^{INK4a}蛋白質の過剰発現を導いている。このためp16^{INK4a}蛋白質の過剰発現はHR-HPVのE7蛋白質によるRb蛋白質不活化の指標として解析することが可能である。ところでHR-HPV感染者が発癌に至るか否かを定める因子はわかっておらず、HR-HPV感染による子宮頸部扁平上皮癌の発癌機構にはまだ不明の点が多い。また子宮頸癌の一組織型である頸部腺癌の発癌機構にHR-HPV感染が関与しているのか否かは不明である。そこで本研究では子宮頸部扁平上皮系病変および頸部腺癌についてHR-HPV感染とp16^{INK4a}蛋白質過剰発現の相関を検討することにより、子宮頸部発癌機構におけるHR-HPVの関与を分子生物学的に解析した。

PCR法およびDirect sequencing法でHR-HPV感染が検出された子宮頸部扁平上皮系病変患者を対象として、免疫組織化学染色にてp16^{INK4a}蛋白質過剰発現の検出を行ったところ、p16^{INK4a}蛋白質は病変に局限して高率に過剰発現していた。さらにp16^{INK4a}蛋白質過剰発現の頻度は病変の進行と共に増加し、特に軽度異形成から中等度異形成に進行する際に有意に上昇していた。この結果、HR-HPV感染による発癌機構においてRb蛋白質の不活化は中等度異形成に進行する際に生じていることが判明した。

子宮頸部腺癌症例を対象としてp16^{INK4a}蛋白質過剰発現の検出およびnested PCR法によるHPV16型、18型感染の検出を行ったところ、頸部腺癌の65%の症例でHR-HPVが検出されその内の94%の症例はp16^{INK4a}蛋白質過剰発現を示した。頸部腺癌の61%を占めるこれらの症例では、発癌にHR-HPV感染が関与していた可能性が強く示唆された。

さらに子宮頸部擦過細胞浮遊液を用いてp16^{INK4a}蛋白質免疫細胞化学染色を行ったところ、組織検体と同様に正常細胞と腫瘍細胞が容易に鑑別することができた。

本研究では、p16^{INK4a}蛋白質過剰発現とHR-HPV感染を指標として子宮頸癌の分子生物学的解析を試みた。その結果、扁平上皮系病変においてはHR-HPV感染により引き起こされる宿主の変化と病変の進行との関連を解析することができ、頸部腺癌においてもHR-HPV感染と発癌を結びつけることができた。また細胞診検体を用いた臨床応用の可能性も示唆された。以上から、p16^{INK4a}蛋白質の過剰発現を解析することは、子宮頸癌における発癌機構の解明や診断ツールに利用可能であることが明らかとなった。

論文審査の要旨

ヒトパピローマウイルス（HPV）は子宮頸部扁平上皮癌の発癌因子とされているが、HPVによる発癌機構にはまだ不明の点が多い。また頸部腺癌とHPVの関連も明らかにされていない。そこで本研究では、ハイリスク型HPVによるRb蛋白質の不活化から誘導されるp16^{INK4a}蛋白質（p16蛋白質）過剰発現を指標として頸部扁平上皮系病変および頸部腺癌の発癌機構におけるHPVの関与を解析した。扁平上皮系病変においてp16蛋白質は病変に局限して過剰発現し、過剰発現の頻度は軽度異形成から中等度異形成に進行する際に有意に上昇しており、HPVによるRb蛋白質の不活化は中等度異形成に進行する際に生じることが判明した。頸部腺癌の61%の症例でハイリスク型HPVとp16蛋白質過剰発現が検出され、発癌にHPVが関与していた可能性が強く示唆された。また頸部擦過細胞を用いて免疫細胞化学染色を行ったところ、組織検体と同様に腫瘍細胞でp16蛋白質過剰発現が検出された。以上から、p16蛋白質過剰発現を解析することは子宮頸部発癌機構の解明や診断ツールに利用可能であることが明らかとなった。

審査では、p16蛋白質の過剰発現は何を意味するのかという質問がなされた。これに対して、p16蛋白質過剰発現がもたらす効果は解明されていないが、p16蛋白質の発現とRb蛋白質の機能には逆相関が成り立つことからp16蛋白質過剰発現はHPVに起因しているものと考えられると回答された。HPV E7蛋白質は免疫染色で検出可能かという質問がなされた。これに対して、E7蛋白質には有効な抗体がなく免疫染色での検出は不可能であると回答された。ハイリスク型とローリスク型のE7蛋白質に分子生物学的な差異はあるのかという質問がなされた。これに対して、E7蛋白質とRb蛋白質の結合親和性に差が認められ、その違いはE7蛋白質のアミノ酸配列に起因していると回答された。p16蛋白質が過剰発現をしている症例が将来高度の病変に進行していくのかという質問がなされた。これに対して、本研究では軽度異形成症例の追跡調査を行ったが症例が少なく観察期間が充分でないため、未だ結論は得られていないと回答された。頸部腺癌とHPVの関連についてこれまで分かっている事項は何かという質問がなされた。これに対して、頸部腺癌でのHPV検出頻度は報告により差がありHPVが発癌に関与しているか否かは明らかにされておらず、また検出されたHPVは18型と16型が多いため本研究ではこの2型に絞ってHPV感染を検出しp16蛋白質過剰発現との関連を解析したと回答された。

以上のように、本研究ではなお検討すべき課題を残しているものの、子宮頸部扁平上皮系病変の進行と頸部腺癌におけるHPVの関与を分子生物学的に解析した点および細胞診への臨床応用の可能性を示した点で価値ある研究であると評価された。

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

試問日：平成17年 1月18日

1型糖尿病発症における抗酸化薬の効果

— 1型糖尿病モデル動物におけるN-acetyl-cysteineの影響 —

入 江 潤 一 郎

内容の要旨

自己免疫1型糖尿病は膵β細胞の破壊により生じ、その過程では酸化ストレスが関与しているとされている。1型糖尿病モデル動物であるNODマウスでは、抗酸化薬の投与にて免疫担当細胞による膵β細胞破壊を抑制できることが知られている。システイン誘導体であるN-acetyl-cysteine (NAC) は広く使用されている抗酸化薬で、臓器保護に関する有益な報告が多く、2型糖尿病では膵β細胞の保護が糖尿病の改善につながるとされている。しかし、システイン誘導体は免疫担当細胞に対してTh1タイプの免疫応答を惹起し、1型糖尿病に対するNACの投与は逆に膵β細胞破壊を助長する可能性がある。そこで本研究では、NODマウスを用いて、1型糖尿病発症におけるNACの影響を検討した。

【方法】糖尿病を発症した雌NODマウスより脾細胞を得て4-10週令の雌NOD-scidマウス50匹に 2×10^6 個ずつ移入した。一方はNACを含む飲水を与え(NAC群)、他方は蒸留水とし(対照群)糖尿病発症を追跡した。細胞移入後14日目、および糖尿病発症後にレシピエントの膵島炎、膵臓でのサイトカイン産生量、脾細胞のサイトカイン産生量を検討した。また得られた脾細胞をin vitroで刺激し、NACを添加した際のサイトカイン産生量の変化を検討した。

【結果と考察】NAC群の100%、対照群の88%に糖尿病を移入し得た。糖尿病移入に要した期間は有意にNAC群で短縮された($p < 0.002$, log-rank検定)。この傾向は細胞移入前のNACの投与では認められなかった。脾細胞移入後14日目のレシピエントの膵島炎はNAC群で増悪しており($p = 0.025$, Mann-Whitney U検定)、さらにNAC群の膵島炎はCD8陽性細胞が有意に増加していた($p < 0.001$, Fisher検定)。また膵臓でのIFN- γ mRNA発現がNAC群で高い傾向を認め、これは糖尿病発症後に有意に高値となった($p = 0.004$, Mann-Whitney U検定)。細胞移入後のレシピエントのCD4陽性、CD8陽性T細胞数には差を認めなかった。レシピエントの脾細胞の抗CD3抗体刺激によるサイトカイン産生量は、細胞移入後14日目では差を認めなかったが、糖尿病発症後はIFN- γ 、IL-2産生量がNAC群で有意に増加していた(それぞれ $p = 0.033$, $p = 0.015$, Mann-Whitney U検定)。In vitroでは糖尿病を発症したNODマウスのCD4陽性T細胞によるIFN- γ 、IL-2産生量、CD8陽性T細胞によるIFN- γ 産生量がNACの添加で増加した。

以上より、システイン誘導体は抗酸化作用のみならず、免疫担当細胞にも影響して自己免疫の病勢を悪化させる可能性が示唆され、自己免疫疾患患者へのシステイン誘導体の投与には疾患を増悪させる可能性も念頭に置くべきと考えられた。

論文審査の要旨

1型糖尿病は膵頭関連自己抗体の関与を介し、膵β細胞の破壊により発症し、その過程に酸化ストレスの関与が示唆されている。その際抗酸化作用を有するN-acetyl-cysteine (NAC) の投与が糖尿病の発症阻止に働くのか、逆に病態の悪化に働くのか明らかでない。そこで本研究では、non-obese diabetic (NOD) マウスを用いて、1型糖尿病の発症に果たすNACの役割を検討した。

糖尿病を発症した雌のNODマウスの脾細胞を雌NOD scidマウスに移入する実験において、移入と同時にNACを与えた群と対照として蒸留水を与えた群との比較において、NAC投与群では糖尿病の発症が有意に早まった。脾細胞移入後14日目の膵島の観察では、膵島炎はNAC群で増悪しており、対照群に比してNAC群の膵頭炎ではCD8陽性細胞が有意に増加し、さらに膵臓のIFN- γ 、IL-2産生量もNAC群で高値であった。この結果より、当研究者は、システイン誘導体は抗酸化作用のみならず、免疫担当細胞にも影響して自己免疫の病勢を悪化させる可能性があるとした。

このような研究においてまず、抗酸化薬としてシステイン誘導体のNACが用いられたことが議論された。抗酸化作用を呈する薬剤にはいくつかの種類があるが、糖尿病の発症に関するこれまでの研究で、NACが抗酸化作用を有しながら糖尿病を増悪させるとする報告があり、一致した成績が得られていないことから本研究ではNACを用いたとされた。

次に本研究では膵頭の病理所見と免疫学的検討が重要な点であるが、膵頭の形態的観察の写真が悪く、正しい判定が困難であることが指摘された。とくに写真の撮り方が悪く、本研究で最も重要なラ氏島に焦点をあてて綺麗な写真をとるべきであったと助言された。

以上のほか最も重要な点は、抗酸化作用を呈するNACがなぜ1型糖尿病を悪化させたかである。当研究者はNAC投与がグルタチオン合成を促進することにより、膵β細胞の破壊防止に働く反面、NACはin vitroでは細胞内に取り込まれて分解され、システインを細胞に供給することでグルタチオン合成を促進し、経口投与された場合は小腸より吸収され、シスチンとなることで、免疫担当細胞に影響し、T細胞の増殖、IL-2産生の促進およびリンパ球の活性酸素産生を亢進させること等により、ラ氏島破壊を促進して糖尿病を悪化させる可能性があるとした。当研究結果からこの考え方は妥当と考えられるが、免疫担当細胞という言葉が漠然と用いることには問題があり、考察の書き方も含めて検討する必要があるとされた。

以上のように本論文には写真の欠点や言葉の使い方、また考察の書き方を再検討する課題が残されたが、NACのように明らかな抗酸化作用のある薬剤が、自己免疫が関与する疾患には増悪因子として働く可能性があることを明らかにした点で、価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
医化学 末松 誠 微生物学・免疫学 小安 重夫
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17年 1月24日

Retinal Blood Flow in the Macular Area Before and After Scleral Buckling Procedures for Rhegmatogenous Retinal Detachment Without Macular Involvement.

(裂孔原性網膜剥離に対する強膜バックリング術前後における
黄斑部周囲の網膜血流量の測定解析の研究)

江 下 忠 彦

内容の要旨

裂孔原性網膜剥離は網膜に形成された裂孔から液化した硝子体が網膜下に流れ込んで網膜色素上皮から感覚網膜が剥離する病態であり、強膜バックリング術により90%以上に初回復位が得られる。網膜剥離が黄斑部に及んでいない段階、ないしは及んでいても早期の手術によって網膜復位が得られれば視力は良好に維持されうるが、合併症のない強膜バックリング術後に著しい視野障害ないしは視力低下を生じる症例が経験され、臨床所見から網膜ないし視神経の虚血が示唆されている。さらに、黄斑部に網膜剥離が及んでいない状態で強膜バックリング術を施行された症例においても、黄斑部局所網膜電図や静的自動視野計を用いた解析では黄斑部機能の低下が術後に認められたという報告もある。これらから強膜バックリング術による網脈絡膜循環障害を介した黄斑部機能障害が推測されてきたが、これまで黄斑部の網膜循環の評価は困難であった。今回、我々が使用した Heidelberg Retina Flowmeter はレーザードブラーフローメトリーの原理と共焦点レーザー走査技術を組み合わせた装置で脈絡膜血管の影響をほとんど受けることがなく血管径30 μ m未満の血管の血流量の非侵襲的かつ定量的な測定解析を可能にした。本研究では黄斑部に及んでいない網膜剥離眼を対象に、強膜バックリング術前後において黄斑部周囲網膜の組織血流を初めて測定解析した。患者の術前の患眼と健眼の平均血流量の比 (a/f値) は平均0.81 \pm 0.11、健常人の右眼と左眼の平均血流量の比 (R/L値) は平均1.02 \pm 0.11で有意差を認めた (P<0.0001)。剥離範囲が1.0、1.5、2.0、2.5象限の患者のa/f値は、それぞれ平均0.86 \pm 0.16、0.81 \pm 0.07、0.75 \pm 0.08、0.70 \pm 0.05で、負の相関関係を認めた (ρ =-0.609, P=0.0015)。術後2週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月のa/f値はそれぞれ平均0.72 \pm 0.09、0.96 \pm 0.09、0.97 \pm 0.10、0.97 \pm 0.05、0.97 \pm 0.02で、術後2週間では術前より減少傾向が認められ、術後1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月ではいずれの時点においても、術前および術後2週と比較して有意に増加していた (P<0.05)。また、術後1ヶ月のa/f値は健常人のR/L値と比べて有意差を認めなかった。術後2週のa/f値の術前に対する減少率に影響を及ぼす明らかな因子は認められなかった。黄斑部に及んでいない網膜剥離眼においても黄斑部の網膜血流量は減少しており剥離範囲と相関すること、さらに強膜バックリング術2週後には一度さらに減少するものの、1ヶ月後には正常レベルまで回復することを初めて明らかにした。すべての対象患者において視力は手術前後を通じて良好に維持されていたが、subclinicalな黄斑部の循環障害の存在が明らかになったことから、周辺部だけの網膜剥離例においても、早期の手術が推奨されるべきであると考えられた。

論文審査の要旨

裂孔原性網膜剥離に対する強膜バックリング術後に著しい視野障害ないしは視力低下を生じる症例が経験される。黄斑部局所網膜電図や静的自動視野計より網脈絡膜循環障害の関与が推測されてきたが、これまで黄斑部の網膜循環の評価は困難であった。今回、我々が使用した Heidelberg Retina Flowmeter (HRF) はレーザードブラーフローメトリーの原理と共焦点レーザー走査技術を組み合わせた装置で脈絡膜血管の影響をほとんど受けることがなく血管径30 μ m未満の血管の血流量の非侵襲的かつ定量的な測定解析を可能にした。本研究では黄斑部に及んでいない網膜剥離眼を対象に、強膜バックリング術前後において黄斑部周囲網膜の組織血流を初めて測定解析した。全例とも視力は手術前後を通じて良好であったが、術前すでに血流量の低下がsubclinicalに存在し、その減少量は剥離範囲と負の相関関係を認めた。黄斑部の循環障害は、剥離網膜領域の循環障害に伴って後極部の主要な網膜動脈の血流の減少が生じることによって引き起こされる可能性が考えられた。また、術後2週間で一時的な減少が認められるが、術後1ヶ月で正常レベルまで回復し12ヶ月まで維持されることを明らかにした。

審査では、比較的若年から青年期が多かった健常人と患者との年齢差について質問がなされ、患者では患眼と健眼の比を、健常人では右眼と左眼の比を算出しているの、年齢による影響は少ないものの、さらなる壮年期健常人データ収集も必要だと思おうと回答された。つぎに術後減少することなく術後1ヶ月で正常レベルに回復した例があったか、また術前値が特に低い患者と高い患者で何か違いがあったか、との質問があった。すべての患者で術後2週間で減少しており、個々の検討では、特に差はなかったと回答された。また、個々のデータも表示することにより、早期手術を積極的に推奨される症例の選択、さらに糖尿病などの毛細血管障害のある網膜剥離患者グループとの比較で循環障害や回復の差の検討もより臨床的に有用であるとの助言がなされた。また血流減少量と剥離範囲の関係について、剥離範囲をゼロとした健常人データもあわせて相関関係を検討するとより価値があると助言された。HRFの測定深度は300 μ mであるが、中心窩網膜の厚さは約135 μ mと非常に薄いため脈絡膜の血流が含まれる可能性があるが、中心窩は直径350 μ mの範囲で、約2.7 \times 0.7mm²に相当する今回の測定範囲の5.1%を占めるにすぎず、今回の測定値に対する脈絡膜血流の影響は極めて少ないと考えられること、自動解析ソフトにより獲得した1画像全体を一度に解析するので測定範囲誤差によるバイアスが小さいことが説明され了承された。

以上のように、本研究はいくつかの検討課題を残しているものの、黄斑部に及んでいない裂孔原性網膜剥離に対する強膜バックリング術前後における黄斑部の毛細血管レベルでの網膜血流量を初めて測定解析したのもので、subclinicalな黄斑部の循環障害の存在が明らかになった点で、意義のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 坪田 一男
医化学 末松 誠 解剖学 仲嶋 一範
内科学 鈴木 則宏
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17年 1月22日

インスリン抵抗性およびインスリン分泌能に関連する 血中可溶性レプチン受容体および脂肪酸受容体遺伝子多型の検討

小川 健夫

内容の要旨

論文審査の要旨

2型糖尿病は、インスリン分泌低下やインスリン抵抗性をきたす複数の遺伝素因に、過食、運動不足および肥満などの環境因子が加わり発症する。レプチンは、脂肪組織から産生され循環血中へ分泌され、摂食抑制とエネルギー消費亢進により体重調節に重要な役割を果たしている。レプチン受容体にはアイソフォームがあり、可溶性レプチン受容体soluble leptin receptor (sOB-R) も報告された。血中sOB-R濃度は肥満者で低く、body mass index (BMI) および血中レプチン濃度と負の相関を示すことが報告され、また、ヒトレプチン受容体 (LEPR) 遺伝子多型とBMIおよび血中レプチン濃度との関連も示唆されているが、いずれもインスリン抵抗性や糖・脂質代謝との関連は不明であった。そこで著者は、血中sOB-R濃度およびLEPR遺伝子多型とインスリン抵抗性および糖・脂質代謝指標との関連を検討した。さらに、G-protein coupled receptor 40 (GPR40) が臍β細胞に特異的に発現し、脂肪酸はGPR40を活性化することにより、グルコース刺激に対するインスリン分泌を増強することが最近示されたため、GPR40遺伝子多型とインスリン分泌能との関連も検討した。

(対象と方法)

定期健康診断を受診した30～65歳の健常者419名および2型糖尿病患者150名を対象とした。対象者の身長、体重、血圧を測定し、空腹時採血にて血糖、血清脂質、血清インスリン、血中レプチン、sOB-Rおよびアディポネクチン濃度を測定した。基礎インスリン分泌および抵抗性の指数は、homeostasis model assessmentを用いて計算した (HOMA-βおよびHOMA-IR)。LEPR遺伝子Lys109Arg多型、Gln223Arg多型およびGPR40遺伝子Arg211His多型を、TaqMan polymerase chain reaction法により同定した。

(結果と考察)

1. 血中sOB-R濃度は年齢、性別およびBMIとは独立して、血清インスリン、HOMA-IR、中性脂肪および血中レプチン濃度と負の相関を示し、高比重リポ蛋白コレステロールおよび血中アディポネクチン濃度と正の相関を示した。

2. LEPR遺伝子Lys109Arg多型およびGln223Arg多型は、BMI、血清インスリン、HOMA-IR、血清脂質、血中レプチンおよびsOB-R濃度との関連を認めなかった。

3. GPR40遺伝子Arg211His多型と血清インスリン、HOMA-IRおよび特にHOMA-βと強い関連を認め、年齢およびBMIで補正した後もそれらの関連は有意であった。

以上より、sOB-Rはインスリン抵抗性に関連する因子の一つであることが示唆された。また、GPR40遺伝子Arg211His多型はインスリン分泌能に関連する可能性が示唆された。インスリン抵抗性やインスリン分泌低下と関連する既知の危険因子に加えて、これらの新たな分泌因子や遺伝子多型が2型糖尿病の予測因子となる可能性があり、今後さらに検討していくことが必要であると考えられた。

レプチンは脂肪細胞で産生されて循環血中へ分泌され、摂食抑制とエネルギー消費亢進により体重調節に重要な役割を果たしている。レプチンの受容体にはいくつかのアイソフォームがあり、最近になって可溶性レプチン受容体 (sOB-R) も報告された。このsOB-Rがインスリン抵抗性の改善効果を有することも判明してきたことから、本研究では、sOB-Rの糖・脂質代謝への影響を検討するとともに、ヒトレプチン受容体 (LEPR) の遺伝子多型と糖・脂質代謝との関係を検討した。さらに脂肪酸がG-protein coupled receptor 40 (GPR40) を活性化し、糖によるインスリン分泌刺激を増強することも判明したので、GPR40の遺伝子多型と糖・脂質代謝の関係も合わせて検討した。

30～65歳の健常者419名と2型糖尿病患者150名を対象とした検討で、血中sOB-R濃度は血清インスリン、インスリン抵抗性、中性脂肪および血中レプチン濃度と負の相関を示し、HDL-コレステロールと正の相関を示した。次に遺伝子多型の検討では、LEPR遺伝子Lys109Arg多型とGln223Arg多型は、血清インスリン、インスリン抵抗性、血清脂質やレプチン濃度と関連を認めなかったのに対し、GPR40遺伝子Arg211His多型は、血清インスリン、インスリン抵抗性等と強い関連を認めた。このような結果から、sOB-RやGPR40遺伝子Arg211His多型が、インスリン抵抗性に関連する1因子であり、これらが2型糖尿病の予後予測因子となると報告した。

このような研究に対して、まずレプチン受容体のアイソフォームの数と、その中でなぜsOB-Rに注目したかが議論された。マウスでは5つのアイソフォームが同定されていること、ヒトではsOB-Rは特殊な受容体で、肥満者で低く、BMIや血漿レプチン濃度と負の相関を示すことが明らかにされたが、糖・脂質代謝での役割が不明なため研究したとされた。LEPRの遺伝子多型に関して当研究では、Lys109Arg多型とGln223Arg多型は血清インスリンやレプチン濃度等との関連がみられなかったとされたが、さらに詳細な検討が必要であるとされた。

次にレプチンおよびsOB-Rに性差がみられたことに関して議論があり、性ホルモンの関与が示唆されたが、機序の詳細は明らかでなく、今後の検討課題とされた。インスリン抵抗性や糖・脂質代謝に関する研究では、肝臓の関与が重要であるが当研究では検討されておらず、今後肝臓状態の検討が必要であるとされた。

脂質と糖代謝の関係において、GPR-40の遺伝子多型とインスリン分泌能の検討は重要であり、Arg211His多型が血清インスリンやインスリン抵抗性と密接に関係することが明らかにされた意義は大きい。sOB-Rとの関連性等、その整合性が論文上もう少し明瞭にされるべきであったと助言された。

以上のように論文のまとめ方や遺伝子多型の検討法など問題も指摘されたが、多数例でsOB-RやGPR40のインスリン分泌能や糖・脂質代謝への役割を明らかにした点で、価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
医化学 末松 誠 分子生物学 清水 信義
内科学 日比 紀文
学力確認担当者: 北島 誠樹、末松 誠
審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成17年 1月24日

Factors for the presence of anteromedial rotatory instability of the knee.

(膝関節前内側回旋不安定性の発現機序について)

栗 村 誠

内容の要旨

膝関節靭帯損傷は関節不安定性が主な症状である。これまでその分析には一方向の関節不安定性が議論されてきたが、近年、脛骨の回旋要素を加えた回旋不安定性という三次元の不安定性が注目されている。特に前内側回旋不安定性 (AMRI) と呼ばれる脛骨の外旋と前方不安定性の合併が臨床的にしばしば問題となるが、その病態については未だに不明な点が多い。本研究は、前十字靭帯 (ACL) 損傷患者およびACL+内側側副靭帯 (MCL) 損傷患者を対象に、ACL損傷やACLとMCLの合併損傷がAMRIの出現にどのように関与しているかを検討した。

健常者30名 (健常群) および陳旧性ACL単独損傷患者20名 (ACL群)、同じく陳旧性ACL+MCL複合損傷患者10名 (ACL+MCL群) を対象とした。膝関節の前方不安定性を定量化する装置を自作した。膝関節20° および90° 屈曲位、足部は内外旋中間位、30° 外旋位、30° 内旋位のそれぞれの肢位で脛骨近位端に前方引き出し力を加え、100N負荷時の脛骨の前方変位量 (anterior displacement : AD) およびstiffness (anterior stiffness : AS) の2つのパラメーターを求めて分析した。健常群については両側の、ACL群およびACL+MCL群については患健側双方について測定を行った。

ACL群では、ADは20° 屈曲位では中間位、外旋位、内旋位で、また、90° 屈曲位では中間位、内旋位で有意に増加していたが、90° 屈曲位、外旋位では有意差は認められなかった。また、ADは20°、90° 屈曲位とも、各回旋位間では外旋位で最小であった。ASは20°、90° 屈曲位とも中間位、内旋位では有意に低下していたが、外旋位では有意差は認められなかった。ACL+MCL群では、ADは膝関節20° 屈曲位では中間位、外旋位、内旋位で、90° 屈曲位では中間位、外旋位で有意に増大し、その差は外旋位で最大であった。ASは、20° 屈曲位では中間位でのみ有意に低下していた。90° 屈曲位では中間位、外旋位で有意に低下していた。

今回の結果から、ACL単独損傷膝では、脛骨の前方不安定性の量的指標であるAD、制動効果の指標であるASのいずれの評価からも、脛骨を外旋すると前方不安定性が抑制されることが明らかとなった。特に90° 屈曲位では有意な患健側差は認められず、AMRIの制御にはACL以外の組織が関与していると考えられる。また、ACL+MCL損傷膝の測定結果から、ADは外旋位で最も大きくなっており、これはMCL損傷を合併すると外旋位での前方不安定性制御機能が働かないためと考えられる。したがってAMRIの発現にはACLとMCL両方の損傷が必須であると考えられる。

論文審査の要旨

膝前十字靭帯 (ACL) 損傷は、スポーツや日常生活動作時に膝くずれなどの症状を起し、活動制限を強いることが知られている。かつては、このACL損傷に伴う関節不安定性について、脛骨が大腿骨に対して前方に過剰に移動する前方不安定性のみが注目されていた。しかし近年では、回旋不安定性という3次元の不安定性が注目されるようになり、ACL損傷に伴って「前内側回旋不安定性」と呼ばれる脛骨外旋位での前方不安定性が生じるとされているが、臨床例の病態が複雑なことから回旋不安定性の解釈が統一されていなかったことなどから、その発現機序はなお不明な点が多かった。本研究では、ACL単独損傷患者と内側側副靭帯 (MCL) との合併損傷患者を対象として、膝関節20° および90° 屈曲位、下腿回旋位における膝関節前方不安定性を定量的に分析し、前内側回旋不安定性の機序解明を試みた。その結果、ACL単独損傷膝では前方不安定性は外旋すると小さくなり、90° 屈曲位、外旋位では前方不安定性は認められなかった。また、ACL+MCL合併損傷膝では前方不安定性は外旋位で最大となった。以上の結果から、前内側回旋不安定性 (脛骨外旋位での前方不安定性) の発現には、ACLとMCL両方の損傷が必須であることが明らかとなった。

審査では、今回の計測方法の臨床応用について質問がなされた。それに対して、靭帯損傷の診断に対してより詳細な検討ができ、さらに複合靭帯損傷の治療方針が立てられ、その評価も可能になるとの回答がなされた。また、今回の対象症例について、術後評価も行っていくべきとの助言もなされた。次に、周囲の筋肉など軟部組織の影響についての質問がなされた。それに対して、確かに影響は否定できないが、今回の計測では患健側について比較しているので相殺され、影響は小さいとの回答がなされた。また、前方負荷として100Nを選択した理由について質問がなされた。それに対して、過去の報告からACL損傷患者では100Nの前方負荷が前方制御や変位量を調べるのに一番適しているとの回答がなされた。最後に、測定装置について下腿に力を加える位置や膝の固定方法について質問がなされた。それに対して、力を加える位置は直線変位計に影響を与えない位置で下腿近位部で行っているとの回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、膝前十字靭帯損傷患者の回旋位における前方不安定性を解析し、そこから膝関節の前内側回旋不安定性の発現機序を解明した点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科 戸山 芳昭
リハビリテーション医学 里宇 明元 解剖学 相磯 貞和
形成外科学 中島 龍夫
学力確認担当者: 北島 政樹、里宇 明元
審査委員長: 里宇 明元

試問日: 平成16年12月25日

Anandamide Decreases Glomerular Filtration Rate through Predominant Vasodilation of Efferent Arterioles in Rat Kidneys.

(アナンダマイドはラット腎輸出細動脈優位の血管拡張により糸球体濾過率を低下させる)

小 浦 優 佳 子

内容の要旨

【緒言】敗血症において、全身血圧の低下のみられない早期の段階から糸球体濾過率 (GFR) の低下が認められる。近年、敗血症では内因性カンナビノイド (CB) が増加し、これがCB1受容体を介して全身血圧を低下させていることや、敗血症性ショックの治療に用いられるポリミキシンB固定化カラムがCBの一つであるアナンダマイド (ANA) を吸着して臨床効果を発現することが報告されている。また、腎内にはANAやその代謝産物、代謝酵素、CB1受容体が存在することも確認されている。しかしANAが腎機能に及ぼす影響について十分に検討されていない。

【対象と方法】雄SDラット250~300gを用いて、ANA (15~1500pmol/kg) 動脈内投与が、単独あるいはCB受容体拮抗薬 (1500pmol/kg) 前投与下において腎クリアランスに及ぼす影響を検討した。また、血液灌流下傍髄質ネフロン手技により、ANA (0~10 μ M) およびCB受容体拮抗薬 (1 nM) 表面灌流液内投与が腎細動脈径に及ぼす影響を検討した。免疫染色法によるCB1受容体の腎臓内分布の同定やRT-PCR法による腎輸入細動脈からのCB1受容体mRNAの検出も行った。

【結果と考察】150pmol/kgまでのANA単独投与は、平均動脈圧 (MAP) に影響を与えることなくGFRを低下させ、腎血流量 (RBF) を増加させた。神経系にも存在するCB受容体の影響を除外するため両腎の除神経処置を施したラットでも同様の観察を行ったが、同様の結果が得られた。CB1受容体阻害薬であるAM251前投与下ではANA 150pmol/kg投与によりMAPの変化なくGFR上昇・RBF増加が認められ、それ以上のANAではGFR・RBFに変化はみられなかった。非選択的CB受容体阻害薬であるAM281前投与下ではANAによる変化は完全に抑制された。一方、高濃度のANAは輸入・輸出細動脈両者を拡張させたが、低濃度のANAは輸出細動脈のみを拡張させた。AM251はANAによる輸入細動脈の拡張反応を減弱させ輸出細動脈の拡張反応を完全に抑制したのに対し、AM281はANAによる輸入・輸出細動脈両者の拡張反応とも完全に抑制した。免疫染色法では、CB1受容体は輸入・輸出細動脈両者に存在したが、糸球体・尿管・間質には存在しなかった。さらに、分離した輸入細動脈からCB1受容体mRNAが検出された。

以上より、敗血症における全身血圧低下に関与するANAは、血圧や腎神経に影響しない低容量でGFR低下作用とRBF増加作用を示し、このGFR低下はCB1および非CB1受容体を介する輸入細動脈拡張作用とCB1受容体を介するそれより強い輸出細動脈拡張作用によるものと考えられた。敗血症早期のGFR低下には、このようなANAの腎局所における作用が重要な役割を担っていることが示唆された。

論文審査の要旨

敗血症では内因性カンナビノイド (CB) が増加し、それがCB1受容体を介してショック状態を惹起すると考えられている。CBの1つであるアナンダマイド (ANA)、その代謝物およびCB1受容体は腎内に存在し、ショック時の腎血行動態の変化に重要な役割を果たしていると考えられているが、その機序の詳細は明らかでない。そこで本研究では、CB1受容体の腎内の局在を明らかにするとともに、ANAの腎機能への影響を検討した。

ANA15~150pmol/kgの投与では全身血圧の変化に影響なく腎血流量を増加させ、糸球体濾過率 (GFR) を低下させた。免疫染色法によりCB1受容体は輸入・輸出の両細動脈に存在し、糸球体や尿管には存在しなかった。ANAの主たる腎作用は、輸入・輸出細動脈のCB1受容体を介して発揮されていると考えたが、CB1受容体拮抗薬であるAM251と、CBの非選択的拮抗薬であるAM281とを前投与した場合とで、ANAの効果に差がみられた。すなわち、低濃度のANAは輸出細動脈を主として拡張し、高濃度になるに従って輸入・輸出両細動脈を拡張させたが、CB1選択的拮抗薬のAM251の前投与は、ANAの輸出細動脈への効果を主として抑制し、非選択的拮抗薬のAM281の前投与は、両細動脈への効果を抑制した。

以上の成績から、ANAが腎の循環動態の変化を介してGFRを低下させ、その受容体の選択的拮抗薬はGFRの低下阻止など、急性腎不全の治療に有用性である可能性が示唆された。

このような研究に関して、まず研究に用いたANAや拮抗薬の使用量がどう決定されたのか、またそれらの薬剤の半減期がどの位であるかが問題とされた。投与量については、ショック時のANAの血中濃度がどの位であるか明らかでないため、諸家が実験に用いてきた投与量を参考とし、低濃度から高濃度までの効果を試験的に検討して決定したとされた。半減期に関しては、1実験が約3時間で、間隔を開けて低濃度から高濃度の試薬へと投与量を変更した実験であり、十分な検討がなされるべきであったが、各試薬投与前に30分間の非投与期間を置き、元の反応と同じになることを確認して行ったとされた。

次に最も問題となったのが、CB受容体の腎内局在とその受容体を介する効果についてである。免疫染色写真から、CB1受容体は輸入・輸出細動脈に存在することは確かであるが、血管内皮であるのか、平滑筋細胞であるかが明らかでなく、その点を受容体後の伝達系の変化などを検討して明らかにする必要があるとされた。またCB1受容体拮抗薬と、非選択的拮抗薬とでANAの作用阻止効果に差があることから、腎内にCB受容体のサブタイプが存在することは確かであり、その検索と、内因性CBの腎内における産生部位を、今後明らかにする必要があるとされた。

以上のように本研究には今後の検討課題が残されたが、敗血症による急性腎不全の発症機序と阻止の解明にきわめて価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
泌尿器科学 村井 勝 医化学 末松 誠
薬剤学 谷川原 祐介
学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝
審査委員長: 村井 勝

読問日: 平成17年 1月 8日

子宮内膜症が卵巣明細胞腺癌に与える生物学的影響

— Transforming growth factor-beta 1とそのレセプターおよび
urokinase type-plasminogen activatorの関与を中心として—

小 宮 山 慎 一

内容の要旨

卵巣明細胞腺癌には子宮内膜症と共存する頻度が高率であるという特徴があるが、両者の共存の有無による生物学的特性の差異について検討した報告はない。一方、子宮内膜症の病因や進展のメカニズムは不明点が多く、Transforming growth factor-beta 1 (TGFβ1)を始めとする様々な分子の関与が考えられている。そこで子宮内膜症と卵巣明細胞腺癌の共存が生物学的にどのような意義を持つのか臨床病理学的に検討し、続いてTGFβ1をkey-moleculeと認識し、子宮内膜症がTGFβ1の動態を介して共存する卵巣明細胞腺癌へ影響をおよぼす因子となりうるか検討した。その結果、

1. 対象とした卵巣明細胞腺癌全53例（I期32例、II期3例、III期15例、IV期3例）は子宮内膜症との共存群20例、非共存群33例に分類された。症例数が最も多いI期における共存群（13例）の累積生存率は、非共存群（19例）より有意に良好であった。
2. TGFβ1 mRNAの発現は正常子宮内膜組織より子宮内膜症性嚢胞組織で亢進している傾向にあった。免疫組織化学的検索によればTGFβ1タンパクは主として腺上皮でその発現を認め、強発現例の割合は正常内膜より内膜症性嚢胞で有意に高値であった。
3. 内膜症性嚢胞内容液および内膜症患者腹水中のTGFβ1、ならびにTGFβ1の活性化に関与するurokinase type-plasminogen activator (uPA)、plasmin/alfa-2 plasmin inhibitor complex (PIC)を測定したところ、いずれも内膜症性嚢胞内容液中の濃度が腹水中の濃度より高値を示し、特にTGFβ1とuPAでは有意差を示した。
4. 内膜症性嚢胞および正常子宮内膜におけるuPAタンパク発現を免疫組織化学的に検討したところ、正常子宮内膜ではほとんど発現が認められなかったのに対し、内膜症性嚢胞では主として腺上皮でその発現を認め、強陽性例の割合は、内膜症性嚢胞が有意に高値を示した。
5. ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株HUOCA-II、ES-2、KK、RMG-I、RMG-IIの細胞増殖に対するTGFβ1の作用を検討したところ、HUOCA-IIでは増殖促進効果、その他の株では増殖抑制効果を示した。またTGFβレセプターI型mRNAはこれらすべての細胞株で、TGFβレセプターII型mRNAはHUOCA-IIを除くすべての細胞株において発現が確認された。
6. 卵巣明細胞腺癌I期症例の腫瘍増殖能を抗proliferating cell nuclear antigen (PCNA)抗体との反応性を指標に検討し、labeling indexによって比較したところ、共存群では非共存群より有意に低値であった。

以上より、卵巣明細胞腺癌症例では子宮内膜症共存の有無によって生物学的特性の相違が生じ、I期症例において顕著であること、子宮内膜症の局所においてはTGFβ1の産生が亢進し、さらにuPAを介してTGFβ1が活性化されやすい環境であること、活性化されたTGFβ1は卵巣明細胞腺癌細胞に増殖抑制効果を発揮し、その際にはTGFβレセプターI型およびII型の発現、とりわけ後者が重要であること、卵巣明細胞腺癌I期症例の子宮内膜症共存群では腫瘍増殖が抑制されていること、が判明した。これはTGFβ1による局所におけるparacrine作用の影響である可能性が示唆された。

論文審査の要旨

卵巣明細胞腺癌は近年本邦でその増加傾向が指摘され、他の卵巣癌組織型に比べ予後不良であることから臨床的に問題になっている。加えて卵巣明細胞腺癌には子宮内膜症と共存する頻度が高率であるという特徴がある。一方、子宮内膜症の病因病態は不明点が多く、TGFβ1を始めとする様々な分子の関与が考えられている。そこで子宮内膜症と卵巣明細胞腺癌の共存が生物学的にどのような意義を持つのか臨床病理学的に検討し、続いて子宮内膜症がTGFβ1の動態を介して共存する卵巣明細胞腺癌へ影響をおよぼす因子となりうるか検討した。その結果、卵巣明細胞腺癌症例では子宮内膜症共存の有無によって生物学的特性の相違が生じ、両者の共存により予後が良くなること、子宮内膜症の局所ではTGFβ1の産生が亢進し、uPAを介してTGFβ1が活性化されやすい環境であること、TGFβ1は卵巣明細胞腺癌細胞に増殖抑制効果を発揮し、その際にはTGFβレセプターI型およびII型の発現が重要であること、卵巣明細胞腺癌I期症例の子宮内膜症共存群では腫瘍増殖が抑制されていること、が判明した。これらはTGFβ1の局所におけるparacrine作用の影響である可能性が示唆された。

審査ではまず、卵巣明細胞腺癌と子宮内膜症との関連性について、*in vitro*や*in vivo*の実験系で検討すべきであること、また共存群と非共存群の分子レベルの差異に関しては網羅的解析で検討すべきであるとの助言があった。次に内膜症性嚢胞内容液中のプラスミンのアクセシ系においてPICを測定することは不適切であるとの指摘があった。これに対し、プラスミンは失活しやすいため、プラスミンとの複合体であり安定して測定できるPICを代用したとの回答がなされた。さらにプラスミン以外の活性化経路に関与する酵素等も検討すべきであるとの助言がなされた。次いでuPAの免疫染色において、腺上皮のapicalに発現していることの意義に関する質問に対しては、腺上皮で産生放出され、腺上皮細胞自身が有するuPAレセプターに結合しているのだろうとの回答がなされた。また共存群と非共存群の生物学的特性の相違は増殖能ではなく、浸潤能に関与しているのではないかと指摘があったが、preliminaryな実験において卵巣明細胞腺癌細胞株は、極めて低い増殖能とともに浸潤能も低いこと、さらにTGFβ1によってPAI-1が誘導され、浸潤能に影響をおよぼしている可能性もあることとの回答がなされた。その他、卵巣明細胞腺癌細胞株のうちHUOCA-IIのみにTGFβレセプターII型mRNA発現を認めないことの意義に関する更なる検討が提案された。

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、子宮内膜症共存の有無により卵巣明細胞腺癌の生物学的特性が異なるという初めての知見を得た点と、それらの生物学的相違を生む原因としてTGFβ1を中心としたカスケードが関与している可能性あることを見出した点において、有意義な研究であると評価された。

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

試問日：平成16年12月15日

Novel technique for peripheral nerve reconstruction in the absence of an artificial conduit

(人工の管腔構造を用いない新しい末梢神経の再建方法)

小見山 貴継

内容の要旨

末梢神経の損傷は重篤な四肢の機能障害を生じるが、マイクロサージャリーによって縫合すると神経再生により再び元の機能を回復できる。しかしながら、欠損部が大きい場合は何らかの代用物を移植し欠損部を架橋する必要があった。シュワン細胞を含有する人工神経は理論上ではチュービング単独よりも有利と思われるが、問題点もあり臨床応用には未だ到っていない。それは、生体吸収素材による異物反応やチューブという閉鎖空間で移植した脆弱な成体シュワン細胞が長期生存できない点などである。その一方で、シュワン細胞は高密度で培養された場合、自家栄養供給で長期生存できることが分かってきた。本研究では、組織工学の技術を応用することで移植した細胞を長期間生存させ、従来から試みられてきた管腔構造に代わる新たな構造の人工神経を作製しその有用性を検討した。10週齢ラットより成体シュワン細胞を採取し*in vitro*で4週間培養したのち、生体吸収性ゲルとポリグリコール酸繊維 (PGA) 複合体に播種しシリコン鋳型とともに8週齢のヌードマウスの皮下に移植した。6週後にシリコン鋳型を摘出し、その管腔より白い線維性の神経様の組織を得た。HE染色では自家坐骨神経と比較して類似した構造が認められた。また免疫染色では、S100・GFAP・DAPIで染色される細胞が多数認められた。1群：上記で得られた神経様組織を10週齢ヌードラットの左坐骨神経欠損部1cmに移植した。2群：1群と同様に神経欠損部を同量のシュワン細胞とゲル、PGA複合体を含有したシリコンチューブで架橋した。3群：1cm長の左坐骨神経を切除し、再び移植片を縫合した。8週間後、移植部は、1群では白い神経様組織で架橋され、2群でもシリコンチューブ内に細い再生した神経が認められた。3群では、移植した神経片は良好に生着していた。電顕で軸索径は3群で有意に高値であった。軸索数は1、3群に有意差は認められなかったが、2群で有意に低下していた。運動機能評価は1、3群に有意差は認められなかったが、2群で有意に低下していた。GFPの発現は、1群で移植後8週においても認められたが、2群では認められず、有意に低下していた。これらの結果から、作製した人工神経内で成体シュワン細胞が長期生存し、それが軸索の伸展または内因性のシュワン細胞の遊走に寄与したと考えられた。以上より、患者自身の細胞を使用し、人工の管腔構造を用いない今回の人工神経は今後の臨床で、末梢神経再建法の一つとして有効である事が示唆された。

論文審査の要旨

末梢神経損傷後の欠損部には何らかの代用物を移植しその欠損部を架橋する必要があった。シュワン細胞を含有する人工神経は理論上ではチュービング単独よりも有利と思われるが、臨床応用となるとまだ多くの問題点を残している。それは、生体吸収素材による異物反応やチューブという閉鎖空間で移植した脆弱な成体シュワン細胞が長期生存できないためと考えられる。本研究では、組織工学の技術を応用することで移植した細胞を長期間生存させ、従来から試みられてきた管腔構造に代わる新たな構造の人工神経を作製しその有用性を検討した。10週齢ラットより成体シュワン細胞を採取し*in vitro*で4週間培養したのち、生体吸収性ゲルとポリグリコール酸繊維複合体に播種しシリコン鋳型とともに8週齢のヌードマウスの皮下に移植した。6週後にシリコン鋳型を摘出し、その管腔より白い線維性の神経様の組織を得た。HE染色では自家坐骨神経と比較して類似した構造が認められ、免疫染色ではS100・GFAP・DAPIで染色される細胞が多数認められた。次に得られた神経様組織を10週齢ヌードラットの左坐骨神経欠損部1cmに移植し、8週間後摘出したところ、移植部は白い神経様組織で架橋され再生した軸索が認められた。組織像では移植したシュワン細胞が発現するGFPが認められた。運動機能評価では自家神経移植に匹敵する良好な成績が得られた。以上の結果から、作製した人工神経内で成体シュワン細胞が長期生存し、それが軸索の伸展または内因性のシュワン細胞の遊走に寄与したと考えられた。

審査では、まず移植後GFPの減少する理由が質問された。それに対して、移植した細胞のアポトーシスや内因性シュワン細胞の遊走などが考えられるとの回答がなされた。また、シュワン細胞のアポトーシスなどは測定したか、という質問がなされ、Tunnel ASSAYにて検証済みであるとの回答がなされた。さらに、電顕像でのミエリンが内因性のシュワン細胞によるものか移植した細胞によるものか識別可能か、との質問がなされたが、残念ながら電顕では移植した細胞の識別方法は施行していないとの回答がなされた。移植した細胞の役割を明らかにするため、さらなる検証が必要であるとの示唆を受けた。またシュワン細胞の軸索誘導の機構はどういうものであるかとの質問がなされ、軸索の伸展に先んじてシュワン細胞が遊走し、それにともないNCAMやPOなどの蛋白の発現が認められるとの回答がなされた。現在の諸説では、NGF、IGF、PDGFなどの液性因子がシュワン細胞から発現され軸索の誘導がなされると言われており、本研究でもそれらの液性因子の定量が必要であるとの示唆を受けた。

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ものの、シュワン細胞を用いた人工神経の開発への新たな道を切り拓いた点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
生理学 岡野 栄之 内科学 鈴木 則宏
解剖学 仲嶋 一範
学力確認担当者：北島 政樹、岡野 栄之
審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成16年12月17日

インスリン非依存糖尿病と自己免疫

～膵島関連自己抗体陽性者における細胞性免疫異常～

鈴木 竜司

内容の要旨

糖尿病発症より6ヵ月以上インスリン治療を必要とせず、臨床的に2型糖尿病と考えられる糖尿病（本論文では、NIDDM；non-insulin-dependent diabetes mellitusと呼ぶ）におけるインスリン依存状態への進行の予知、すなわち緩徐進行1型糖尿病の早期診断には、抗GAD65抗体（GAD65Ab）の測定が重要であるが、陽性例がすべてインスリン依存状態へ進行するわけではない。抗体価10U/ml以上（正常値1.3U/ml未満）の高抗体価群では高率にインスリン治療が必要になるが、1.3-9.9U/mlの低抗体価群ではインスリン治療が必要になることは少ない。今回、高抗体価群と低抗体価群の病態の違いを明らかにするため、1型糖尿病の成因がT細胞機能異常であるとされていることから、両群のT細胞を中心とする種々の細胞性免疫指標の差異について比較検討した。

（対象と方法）高抗体価群36名、低抗体価群48名、急性発症典型例のGAD65Ab陽性1型糖尿病患者36名、GAD65Ab陰性2型糖尿病患者47名の4群を対象とした。1. 末梢血リンパ球のポリクローナルな刺激に対するサイトカイン（interferon (IFN)- γ 、interleukin (IL)-10）分泌能、2. 血清CXC chemokine ligand-10 (CXCL-10) /interferon-inducible protein-10 (IP-10) 値、3. 膵 β 細胞抗原特異的的刺激に反応する末梢血CD4陽性細胞数を測定した。

（結果と考察）1. 末梢血リンパ球をポリクローナルに刺激した際のIL-10産生能は、高抗体価群が低抗体価群に比して有意に低値であった。2. 血清IP-10値は、高抗体価群が低抗体価群より高い傾向を示した。3. 末梢血のGAD65反応性CD4陽性細胞は、高抗体価群、低抗体価群、ともに検出されたが、高抗体価群でのみ血清IP-10値とGAD65反応性CD4陽性細胞数との有意な正相関を認めた。4. このGAD65反応性CD4陽性細胞と血清IP-10値がともに高値を呈することが、高抗体価群におけるインスリン依存状態への進展に関与すると推察された。5. このように、高抗体価群と低抗体価群との間にT細胞機能の差異が認められ、過去に報告されていた両者の臨床像の違いを強く支持する結果となった。6. 以上は、高抗体価群においては早期にインスリンによる治療を開始し、将来の内因性インスリン分泌能の枯渇を予防し、一方、低抗体価群においてはインスリンを早期から使用せずに経過観察してもよいというGAD65Ab陽性NIDDM患者に対する治療（あるいは介入）方針の裏付けとなる重要な知見と考えられた。また、膵 β 細胞機能の残存しているこのようなGAD65Ab陽性NIDDM患者群の「細分類」の必要性が示唆された。

論文審査の要旨

臨床的に2型糖尿病と考えらる糖尿病患者の中の約10%のもので、膵頭関連自己抗体の1つであるanti-glutamic acid decarboxylase 65抗体（GAD65Ab）が陽性である。このGAD65Ab陽性例をみると、抗体価が高値を呈するもの（抗体価が10U/ml以上）と、低値を呈するもの（抗体価が1.3～9.9U/ml）とがあり、この2群の臨床経過が大きく異なることが判明してきている。このうち高抗体価群は1型糖尿病の可能性が高く、将来インスリン依存状態になるものが多い。そこで本研究は、高抗体価群と低抗体価群の病態の差を明らかにするため、自己免疫疾患の発症に重要な役割を果たしているT細胞を中心とする種々の細胞性免疫指標の差異について比較した。

GAD65Abの高抗体価のもの36名と低抗体価のもの48名、さらに対照として典型的な1型糖尿病患者36名と、GAD65Ab陰性の2型糖尿病患者47名の4群で検討した。その結果、末梢血リンパ球のポリクローナルな刺激に対するIL-10産生能は、高抗体価が低抗体価群より有意に低値であること、血清IP-10値は、高抗体価群が低抗体価群より高い傾向にあること、さらに、末梢血のGAD65反応性CD4陽性細胞は、高抗体価群と低抗体価群の両者に検出されたが、高抗体価群でのみ血清IP-10とGAD65反応性CD4陽性細胞数との間に有意な正相関を認めた。このように高抗体価群と低抗体価群との間にT細胞機能に差異が認められ、両群の臨床像に違いがあることを明瞭に示した。

このような研究に対してまず問題とされたことは、GAD65Abが陽性であることが、1型糖尿病を強く示唆すると考えた点である。当研究者は、その抗体価が高い群では、低い群に比しT細胞機能に明らかな差異が認められたほか、臨床的にも高抗体価群では早期にインスリン治療が必要となっており、GAD65Abの抗体価の高低から、1型糖尿病の発症を予測できるとした。通常2型糖尿病患者は肥満、高脂血症、高血圧を伴うことが多いので、そのような臨床像の差の有無が注目されたが、高抗体価群では、低抗体価群に比しやせ型が多かったとされた。T細胞機能の検討成績において、GAD65Ab陰性の典型的2型糖尿病患者の成績と低抗体価群の成績とがきわめて類似し、他方対照とした1型糖尿病患者の成績と高抗体価群の成績とが類似したことも、高抗体価群と低抗体価群の明らかな差を裏付けた。本研究で検討され、また示されたT細胞機能の成績は妥当なものであったが、論文における図表の呈示法に問題が指摘され、図のスケールのとり方の不統一の訂正、さらに図を理解しやすいようにまとめることが必要であるとされた。

以上のように本論文では、図表のまとめ方に問題があったが、研究内容は、2型糖尿病と診断された患者の中から、徐々に1型糖尿病へ移行していく患者を早期に発見し、その治療方針の決定に大変有用な示唆を与える貴重な論文と高く評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
微生物学・免疫学 小安 重夫 医化学 末松 誠
微生物学・免疫学 石川 博通
学力確認担当者：北島 政樹、小安 重夫
審査委員長：小安 重夫

試問日：平成17年 1月24日

Ovariectomy enhances renal cortical expression and function of cyclooxygenase-2. (卵巣摘出は腎皮質シクロオキシゲナーゼ-2の発現および機能を増強する)

多田 由布子

内容の要旨

論文審査の要旨

【対象と方法】種々のホルモンがCOX-2発現に影響を及ぼす可能性が報告されているが、エストロゲンが腎臓COX-2の発現と機能に与える影響は検討されていない。本研究は、卵巣摘出雌ラットを用いて、エストロゲンや塩分制限が腎COX-2発現とCOX-2依存性腎血流調節に及ぼす影響を検討した。雌Sprague-Dawleyラットに両側卵巣摘出術またはSham手術を行い、正塩(NaCl 0.4%)または減塩(NaCl 0.02%)食を与え、卵巣摘出-正塩食群(Ox+NS)、卵巣摘出-減塩食群(Ox+LS)、Sham-正塩食群(Sh+NS)、Sham-減塩食群(Sh+LS)の4群(n=6ずつ)に分け14日間飼育した後、麻酔下でCOX-2阻害薬であるNS398(1および10ng/g体重, i.v.)を投与し、腎クリアランス研究を施行した。また、COX-2抗体による腎の免疫組織染色とウェスタンブロット解析を施行し、エストロゲン補充療法の効果も検討した。

【結果と考察】COX-2は腎皮質において緻密斑近傍Henle係蹄上行脚細胞に存在した。卵巣摘出は腎皮質COX-2発現を摂取塩分と独立して増加させ、卵巣摘出により増加した腎皮質COX-2発現はエストロゲン補充により減少した。一方、Shamラットの腎髄質COX-2の発現は減塩により減少したが、卵巣摘出ラットの腎髄質COX-2発現は、正塩食下で減少し減塩食下で増加した。エストロゲン補充は、卵巣摘出ラットの腎髄質COX-2発現を正塩食下で増加し減塩食下で低下した。尿中PGE₂排泄は減塩によって影響を受けず卵巣摘出により有意に増加したが、尿中6-keto PGF_{1α}排泄は卵巣摘出、減塩のいずれによっても増加した。NS398の投与は血圧、イヌリンクリアランス、尿中ナトリウム排泄に影響を与えず、これら尿中プロスタグランジン排泄を有意に抑制した。また、NS398はSh+NSのバラアミノ馬尿酸クリアランス(CPAH)に影響しなかったが、Sh+LS、Ox+NS、Ox+LSはCPAHを低下させ、中でもOx+LSではその変化率が有意に高かった。腎皮質血流もCPAHと同様の傾向であった。腎髄質血流はNS398投与により、Sh+NSとOx+LSにおいて同程度に低下したが、Ox+NSとSh+LSは影響を受けなかった。卵巣摘出によって生じたこれらCOX-2依存性血流変化はエストロゲン補充療法によって抑制されたことより、腎COX-2発現とCOX-2依存性腎血流調節にエストロゲンが中心的役割を担うことが示唆された。

【結論】卵巣摘出により血中エストロゲン濃度が低下すると、腎緻密斑細胞近傍のHenle係蹄上行脚のCOX-2発現は摂取塩分量とは独立して増加し、増加したCOX-2が産生する血管拡張性プロスタグランジンを介して腎血流調節に影響を及ぼす可能性が示唆された。

閉経女性でみられるように、エストロゲン低下時には腎血流に変化が生じ、ナトリウム排泄が減少する。このような変化にシクロオキシゲナーゼ(COX)-2の関与が示唆されていることから、本研究では、卵巣摘出した雌ラットを用いて、腎におけるCOX-2の発現の変化とCOX-2依存性腎血流動態の変化を観察した。

COX-2は免疫染色法により、腎ではヘンレ上行脚の太い部分に存在し、卵巣摘出や減塩時に腎緻密斑周辺にその発現が増強し、卵巣摘出+減塩ではその発現部位がさらに拡がり、皮質から髄質に向けてヘンレ上行脚に沿って発現の増加がみられ、この変化はエストロゲンの補充で抑制された。次にウエスタンブロット法による蛋白レベルでの検討では、腎皮質と髄質とでその発現に差があり、皮質では卵巣摘出あるいは減塩でCOX-2の発現が増強するのに反し、髄質では低下した。COX-2は腎で血管拡張に働くプロスタグランジン(PG)E₂やI₂を増加させて作用することから、尿中PGE₂およびPGI₂の代謝産物である6-keto PGF_{1α}を測定し、卵巣摘出によりこれらがともに増加し、COX-2阻害薬NS398の投与で著明に低下することを確認した。COX-2の腎血流動態への変化はバラアミノ馬尿酸を用いて検討され、NS398の投与は正常ラットの腎血流に変化を与えなかったが、卵巣摘出ラットでは投与量の増加に伴って皮質および髄質血流が低下した。

以上の結果から、エストロゲン低下時には、COX-2が腎緻密斑を中心にヘンレ上行脚に発現が増強し、このCOX-2がPGE₂やPGI₂を増量させて腎血流調節に影響していると結論した。

このような論文において、まず免疫染色で観察したCOX-2の発現部位と腎皮質・髄質の蛋白レベルで検討したCOX-2の発現量との間に差異が生じていることが指摘された。COX-2の発現量は皮質と髄質で明らかに異なるが、免疫染色では切片の作製の仕方や写真のとり方が関係していた可能性があると考えた。

次にPGE₂とPGI₂の2種を測定した意義、さらにこれらのPGの変化と卵巣摘出によるCOX-2の発現分布の変化が議論された。PGの基礎値はPGE₂の方がPGI₂よりはるかに多く、しかし卵巣摘出によって両者とも著増するが、その増量はPGI₂でとくに著明であり、このことがCOX-2の発現増強と一致しているのか、もう少し詳細な検討が必要であったとされた。またこのようなPGの変化の腎血流動態の変化との関係についても議論があり、卵巣摘出によるCOX-2の発現増強およびPGE₂やPGI₂の変化に比し、腎血流動態の変化は少なく、COX-2の発現増強に基づくPGの変化が腎血流分布に果たす役割はそれほど大きくないのではないかと助言された。

以上のほか、本研究では腎のCOX-2のみの観察であったが、COX-1の観察と合わせれば、さらに臨床的意義が高かったと助言された。

研究の結果に対する考察に改良すべき点も指摘されたが、エストロゲンの低下時の腎COX-2の変化とその役割を明らかにした点で価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
産婦人科学 吉村 泰典 泌尿器科学 村井 勝
医化学 末松 誠
学力確認担当者: 北島 政樹、吉村 泰典
審査委員長: 吉村 泰典

試問日: 平成17年 1月 7日

Expression of an Isoform of the Testis-Specific Estrogen Sulfotransferase in the Murine Placenta during the Late Gestational Period.

(精巣特異的エストロゲン硫酸基転移酵素遺伝子の妊娠後期マウス胎盤における発現)

田 中 京 子

内容の要旨

ステロイドの硫酸化反応は、ステロイドが受容体へ結合することを阻害し活性を調節する重要な反応となっている。この反応を触媒する硫酸基転移酵素 (Sulfotransferase ; ST) には異なる基質特異性を持ったイソ酵素が存在し、硫酸化されるステロイド構造の違いにより2つのグループに大別されている。いずれのSTも複数の基質を硫酸化することができるが、STの性質および遺伝子の転写調節には不明な点が多い。妊娠中のステロイドホルモンの活性調節にもSTは重要な役割を果たしていると考えられるが、妊娠子宮や胎盤におけるSTの発現調節に関する研究は行われていない。本研究では妊娠維持に必要と考えられているステロイドホルモンの1つであるエストロゲンとその硫酸化反応を担っているエストロゲン硫酸基転移酵素 (Estrogen ST ; EST) に着目し、子宮内膜や胎盤におけるエストロゲンの硫酸化反応について酵素レベルで明らかにすることを目的としてESTの遺伝子発現を調べるとともに、妊娠後期マウスの胎盤から遺伝子をクローニングし遺伝子組み換え酵素を作成してその酵素学的性質について検討した。

異なる妊娠期間のマウス子宮と胎盤のシトゾール画分を酵素源としてエストロンを基質としたEST活性が認められた。EST活性は非妊娠時には低い妊娠週数が進むにつれて子宮と胎盤で増加することが明らかとなった。

次にRT-PCR法を用いて妊娠子宮と胎盤におけるEST遺伝子発現を調べた (プライマーは遺伝子バンクに登録されているマウス精巣特異的ESTの配列情報を参考に設計した)。妊娠子宮と胎盤のESTmRNA量は妊娠週数が進むにつれて増加し酵素活性の増加と類似していたことから、両組織におけるESTの発現は転写レベルで調節されていることが示された。

続いて、妊娠18日目の胎盤からPCR法によりマウス胎盤EST (murine placental EST ; mpEST) のcDNA全長をクローニングした。得られた核酸配列はマウス精巣特異的EST遺伝子と99.7%、ウシ胎盤EST遺伝子と74.7%、ヒト胎盤EST遺伝子と56.5%、ヒト内膜EST遺伝子と80.1%の相同性を示した。mp-ESTはマウス精巣特異的EST遺伝子と1%以下の違いを持つイソ酵素であり、296個のアミノ酸をコードしている推定分子量は35.5Kdaであった。次にmp-ESTの酵素学的性質を調べるためにCOS-7細胞にmp-ESTをトランスフェクトし種々の基質を用いてST活性の測定を行った。ステロイドと合成基質のうちフェノール性水酸基を持つ構造に対してST活性を示し、なかでもエストロゲンに対する親和性が最も高いことが明らかとなった。

論文審査の要旨

ステロイドの硫酸化反応はステロイドの活性を調節する重要な反応である。この反応を触媒する硫酸基転移酵素 (Sulfotransferase ; ST) は複数の基質を硫酸化することができるために各組織に発現されているSTの種類と性質および遺伝子の転写調節には不明な点が多く、妊娠子宮や胎盤におけるSTの発現調節に関する研究は行われていない。本研究ではエストロゲンとその硫酸化反応を担っているエストロゲン硫酸基転移酵素 (Estrogen ST ; EST) に着目し、子宮内膜や胎盤におけるESTの発現変化と酵素学的性質について検討した。その結果、マウス子宮と胎盤におけるEST活性は非妊娠時には低い妊娠週数が進むにつれて子宮と胎盤で増加することが明らかとなり、またESTmRNA量は酵素活性の増加と類似していたことから、ESTの発現は転写レベルで調節されていることが示された。さらにマウス胎盤EST (murine placental EST ; mpEST) のcDNA全長をクローニングした。mpESTはマウス精巣特異的EST遺伝子と1%以下の違いを持つイソ酵素であった。mpESTはフェノール性水酸基を硫酸化し、水酸基が結合した構造の違いを区別する基質特異性をもっていることが明らかにされた。

審査ではまず、ステロイドの構造とmpESTの基質特異性について質問があり、基質の構造図を示しシクロペンタン環やシクロヘキサン環に結合した水酸基には反応せずフェノール性水酸基を認識していると説明された。続いて、精巣のLeydig cellにESTが多く発現されている理由についての質問があり、オスでは性成熟期以降に発現されることから精子形成に関わっている可能性を指摘した。また、高濃度のエストロゲンに暴露されると生殖器にダメージを与えることが確認されていることから、ESTはエストロゲンから精巣を保護していると考えられていると回答された。妊娠中に増加するESTの役割についての質問に対しては、エストロゲンの不活性化というよりは胎児へのステロイド供給など運輸に関わっていると考えられると回答された。最後にmpESTの核酸配列と基質特異性との関連についての質問があった。ESTに限らずクローニングされているSTはすべて硫酸供与体の結合部位が明らかにされているが、基質の結合部位については明らかにされていないと回答された。今後は精巣と胎盤におけるEST遺伝子のわずかな違いが基質特異性の違いに関与するかについての検討をすべきであるとの助言がなされた。

以上、本研究は今後検討すべき課題はあるものの、妊娠経過時の子宮と胎盤におけるESTの発現変化を明らかにし、新たに遺伝子をクローニングし、遺伝子組み換え酵素を用いて基質特異性を明らかにしており、今後ESTの機能解明の一端に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 産婦人科学 吉村 泰典
発生・分化生物学 須田 年生 医化学 末松 誠
泌尿器科学 村井 勝
学力確認担当者：北島 政樹、須田 年生
審査委員長：須田 年生
研究指導者：野澤 志朗 (産婦人科学)

試問日：平成17年 1月 8日

Interactions of HLA-DRB4 and CTLA-4 genes influence thyroid function in Hashimoto's thyroiditis in Japanese population.

(日本人橋本病患者の甲状腺機能に及ぼすHLA-DRB4とCTLA-4遺伝子の相互作用の研究)

寺内 正子

内容の要旨

橋本病は、自己免疫性甲状腺疾患であり、抗TPO抗体等の甲状腺の抗原に対する自己抗体と慢性甲状腺腫により定義づけられる。その発症遺伝要因として、HLA (Human Leukocyte Antigen)、CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) 遺伝子との関連が報告されているが、両遺伝子の相互作用、および橋本病との臨床像との関連は十分に検討されていない。そこで我々は、日本人橋本病と対照群のCTLA-4遺伝子エクソン1 A/G遺伝子多型とHLA-DRB4*0101の遺伝子分布を検討し、甲状腺機能と両遺伝子との関連を検討した。

(対象と方法)

抗TPO抗体陽性の慢性甲状腺腫を有する日本人橋本病70名と健康人105名を対象としたcase control studyを行った。CTLA-4遺伝子のエクソン1 A/G遺伝子多型はPCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 法、HLA-DRB4タイプはPCR-SSO (sequence specific oligonucleotide) 法にて検出した。次に、橋本病診断時の患者血清TSH値をCTLA-4遺伝子型間、HLA-DRB4*0101陽性群と陰性群と比較した。さらに、CTLA-4、HLA-DRB4の両遺伝子型の組み合わせによる4群で比較した。

(結果と考察)

CTLA-4遺伝子分布は、橋本病と対照群で有意差を認めた。橋本病では、CTLA-4遺伝子GGまたはAG型をより多く認め、Alleleの頻度が有意に高かった ($P=0.01$, オッズ比=4.95)。HLA-DRB4*0101陽性率は橋本病患者で有意に高かった ($P=0.02$, オッズ比=2.17)。橋本病診断時の患者の血清TSH値を比較したところ、CTLA-4遺伝子AG型ではGG型と比較して高値の傾向 ($P=0.16$) であり、HLA-DRB4*0101陽性群では陰性群に比べて有意に高値であった ($P<0.01$)。さらに、血清TSH値は、CTLA-4遺伝子AG型かつDRB4*0101陽性群が他の3群に比べて有意に高値を示した。 ($F=5.75$, 3 degrees of freedom, $P<0.01$)。まとめると、橋本病において、1) HLA, CTLA-4遺伝子が疾患感受性を規定することが再確認された。2) HLA-DRB4*0101陽性が甲状腺機能を規定する最も重要な因子である。3) HLA-DRB4*0101陽性かつCTLA-4 AG群で甲状腺機能障害が最も強い。以上の結果から、HLA-DRB4とCTLA-4遺伝子は相互作用により、抗TPO抗体陽性で慢性甲状腺腫を有する日本人橋本病の甲状腺機能に影響を及ぼすことが示唆された。

論文審査の要旨

橋本病は代表的な自己免疫疾患であり、甲状腺に対する自己抗体 (抗TPO抗体) がその発症にきわめて重要な役割を果たしており、遺伝的要因の関与も示唆されている。発症に関与する遺伝的要因として、human leukocyte antigen (HLA) やcytotoxic T lymphocyte antigen A; CTLA-4遺伝子との関連が報告されているが、未だその詳細は明らかでなく、このような両遺伝子が橋本病の発症や病態の進展にどのように相互に関連しあっているのかも明らかでない。そこで本研究では90名の橋本病患者と105名の健康者において、CTLA-4遺伝子Exon 1 A/G遺伝子多型とHLA-DRB4*0101の遺伝子分布とを検討し、橋本病の病態とこれら遺伝子の相互の関係を検討した。その結果、橋本病では、CTLA-4遺伝子GGまたはAGをより多く認め、Alleleの頻度が有意に高いこと、さらにHLA-DRB4*0101陽性率は、橋本病で有意に高いことを認めた。また血清TSHは、CTLA-4遺伝子AG型かつHLA-DRB4*0101陽性群で有意に高いことも認めた。これらの結果から、当研究者は、HLA, CTLA-4遺伝子が橋本病の病態感受性を規定することを再確認するとともに、HLA-DRB4*0101陽性が甲状腺機能を規定するきわめて重要な因子であり、HLA-DRB4*0101陽性かつCTLA-4 AG群で甲状腺機能障害が最も強いことを明らかにし、HLA-DRB4とCTLA-4遺伝子は相互作用により日本人の橋本病の甲状腺機能に影響すると結論した。

このような研究に対して、対象とされた橋本病患者の診断法が問題とされた。甲状腺の触診状態、血清TSH、T3およびT4値と、抗TPO抗体陽性を診断の根拠としたが、各症例でTSH値に著しい差があること、橋本病に限らず甲状腺機能亢進を呈するバセドウ病でも抗TPO抗体陽性がかなり高率であることから、診断が正確であったか議論となったが、触診所見、甲状腺機能状態および抗TPO抗体陽性所見とからほぼ確実に診断できたとされた。

次にCTLA-4遺伝子多型の検討において、Exon 1のA/G遺伝子多型に注目した理由が問われた。当研究者は、これまでの橋本病の遺伝的検討で、CTLA-4に関してはExon 1の異常が報告されていることから、本研究ではExon 1のA/G遺伝子多型に注目したとされたが、他の部位の検討も考慮されるべきであったとされた。

本研究で、CTLA-4遺伝子AG型かつDRB4*0101陽性群で血清TSHが有意に高値であったことから、HLA-DRB4とCTLA-4遺伝子とのinteractionが甲状腺機能に影響すると結論したが、論文中でinteractionとassociationの両方が用いられているのは問題であり、統一すべきとされた。また本来の意味はassociationであろうとされた。

以上のほか、本研究の結果を日常臨床にどうか明瞭に示すべきとの助言もあった。

このように本研究では、橋本病の成因、病態との関連において注目した遺伝子が限られたものであったことから、さらに多くの遺伝子の検討が必要とされたが、橋本病の発症・進展における遺伝要因を明らかにした点で、価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 亨男

分子生物学 清水 信義 微生物学・免疫学 小安 重夫

内科学 池田 康夫

学力確認担当者: 北島 政樹、清水 信義

審査委員長: 清水 信義

試問日: 平成17年 1月31日

Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone.

(C型肝炎ウィルスの感染性クローンを用いたヒト肝組織移植マウスへの感染実験)

前 田 憲 男

内容の要旨

C型肝炎ウイルス (HCV) は持続感染し、肝硬変から高率に肝癌を合併することが社会問題となっている。近年、ゲノム解析とクローニング技術の進歩により、HCVの感染性クローンが実験的研究において利用可能となった。しかし、感染性クローンを用いたこれまでの感染実験は、チンパンジーまたは単離したヒト肝細胞モデルでの報告に限られてきた。本研究では、ヒト肝組織片を免疫不全マウスに移植し、C型肝炎患者血清と感染性クローンを用いてHCVの感染を追究した。nested RT-PCR, real-time detection PCRおよび*in situ* PCRを用いてHCV RNAを評価し、さらに組織学的・免疫組織学的検討を加えた。

ヒト正常肝(非HCV感染)組織片をnon-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) マウスの腎被膜下へ移植することにより、growth supportなしに、ヒト肝組織が形態を良好に保ったまま、約60%のマウスに4週間生着した。albumin, α -1-antitrypsin, cytokeratin 8, cytokeratin 19といった種々の肝組織に関連するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学から、移植片がヒト由来であり、機能も保たれていることが示された。慢性肝炎患者より得たHCV感染肝組織片も同様にNOD/SCIDマウスに良好に生着した。

次にヒト正常肝組織を移植後、C型肝炎患者血清または感染性クローンをマウスに静注にて接種し、マウス血清中のHCV RNAをnested RT-PCR法とreal-time detection PCR法により検討した。患者血清接種後、positive strand HCV RNAは4週間検出され、ウイルス量は450~910copies/mlであった。またHCVのnon-structural protein 3に特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学でも、肝細胞の細胞質にHCVのシグナルが検出された。さらに、感染性クローン接種1週間後に回収したヒト肝組織片の*in situ* PCR法による検討でも、10~20%の肝細胞の細胞質に明瞭なHCVのシグナルが検出され、マウス血清中のウイルス量は440copies/mlであった。一方、組織学的検討では感染した肝細胞に明らかな形態変化を認めなかった。

以上より、HCVの感染性クローンが、NOD/SCIDマウスに移植したヒト肝組織に対して、患者血清と同様に肝細胞に感染しうることを明確に示すことができた。今後さらにこの手法を改良し、種々の感染性クローンを用いることで、HCVの感染、増殖および肝障害の病態解明に向けたアプローチが可能になるものと期待される。

論文審査の要旨

C型肝炎ウイルス (以下HCV) には*in vitro*での効率良いウイルスの複製系や適切な小動物モデルがないため、HCV疾患研究の障壁となってきた。近年、HCVの感染性クローンが実験的研究に応用可能となったが、感染性クローンを用いたこれまでの感染実験は、チンパンジーまたは培養細胞系での報告に限られており、ヒト“肝組織”を用いた実験系の確立が課題であった。本研究では、HCVの感染性クローンがNOD/SCIDマウスに移植したヒト肝組織に、患者血清と同様に感染しうることを免疫組織化学と*in situ* PCR法により明確に示した。

審査ではまずNOD/SCIDマウスに移植されたヒト肝組織について質疑がなされた。免疫組織化学により移植片からcapillaryの血管新生が認められ生着に寄与することが示唆されており、今後VEGFといったgrowth supportにより生着率が改善する可能性もあると回答された。また、単離した肝細胞を移植する方法論との比較についても質疑がなされた。単離肝細胞をマウスに効率良くキメラ移植するためには、HGF受容体抗体投与や肝障害を惹起するtransgenic mouseを用いるなどのgrowth supportが重要であったが、本手法はシンプルな移植のみで肝組織全体を検討可能なモデルとして有用と考えられると回答された。また、最近新たに開発されたNOD/SCID/ γ c^{-/-} (NOG) マウスでは移植片の拒絶反応がNOD/SCIDマウスよりも更に乏しく、肝組織および肝細胞の生着率の改善が期待されており、今後の検討課題であろうとの助言があった。

次に感染性クローンおよび患者血清を用いたHCVの感染実験について質疑がなされた。肝組織を移植しないコントロールマウスへのHCV接種においてはウイルスが速やかに消失しnested RT-PCR法にてウイルス血症がみられなかったこと、一方ヒト肝組織移植マウスにおいてHCV感染性クローン接種後の*in situ* PCR法による検討ではコントロールのマウス肝臓にHCVのシグナルは検出されなかったことが述べられ了解された。またマウス血清中のウイルスtiterが低かったことについては、血清中に放出されるウイルス粒子は肝組織の 10^2 程度と少ないことや、血清中でのクリアランスが数時間から一日のオーダーと早いことなどが原因と考えられると回答された。

最後に、現在C型肝炎の肝移植症例が増えていることから、本実験を臨床にどのように活かすことができるのが今後の最も重要な課題であり、再感染を早期に予測し抗ウイルス薬を効率よく投与してゆくための臨床応用が望まれるとの指摘があった。

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、種々の感染性クローンに応用することで、HCVの感染、増殖および肝組織障害の病態解明に向けたアプローチを可能とするものと考えられ、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 日比 紀文
外科学 北島 政樹 微生物学・免疫学 小安 重夫
微生物学・免疫学 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16年12月29日

Autologous Serum Application in the Treatment of Neurotrophic Keratopathy.

(神経麻痺性角膜症に対する自己血清点眼の有効性)

松本 幸裕

内容の要旨

(序) 神経麻痺性角膜症 (neurotrophic keratopathy) は、支配神経である三叉神経の何らかの異常によって引き起こされる難治性の角膜上皮障害である。病態としては、点状表層角膜症、角膜上皮欠損、角膜潰瘍、角膜穿孔まで様々である。これまでに、ソフトコンタクトレンズ、人工涙液点眼、ヒアルロン酸点眼、フィブロンectin点眼、サブスタンスP (SP) 点眼、インスリン様成長因子 (IGF-1) 点眼、神経成長因子 (NGF) 点眼などの保存的治療と、シアノアクリル酸接着剤、結膜弁移植術、眼瞼縫合、羊膜移植術などの外科的治療が報告されているが、治療法として確立されたものはいまだにない状況である。近年、血清中に存在する表皮成長因子 (EGF) やビタミンAなどが着目され、シェーグレン症候群や遅延性角膜上皮欠損に対して、血清点眼治療が有効であることが報告されてきた。今回我々は、神経麻痺性角膜症の新たな治療法として、その研究を試みた。

(目的) 血清中のSP、IGF-1、NGFレベルを測定するとともに、神経麻痺性角膜症に対する自己血清点眼治療の有効性について検討する。

(方法) 対象は、神経麻痺性角膜症患者11例14眼である。対象に対して、20%自己血清点眼を1日5~10回、角膜上皮障害が改善するまで点眼した。投与前後において、ランドルト環による最高矯正視力検査、細隙燈顕微鏡によるフルオレセイン生体染色検査を含む前眼部検査、Cochet-Bonnet角膜知覚計による角膜知覚検査が測定された。また、健常成人における、血清中のSP、IGF-1、NGFの濃度をradioimmunoassay (RIA) およびenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。涙液中のIGF-1、NGFレベルについても同様に測定した。

(結果) 自己血清点眼治療によって、角膜上皮障害は、平均17.1±8.0日(6-32日)にて全例改善を認めた。角膜知覚検査においては、投与前が平均11.8±11.6mmであり、投与後が平均29.0±22.9mmであった($p<0.005$)。最高矯正視力検査では、投与前に比べて投与後には有意に改善が認められた($p<0.005$)。健常成人の血清中のSPの平均濃度は、157.0±42.1pg/mlであり、IGF-1の平均濃度は、157.0±73.9ng/mlであった。血清中のNGFの平均濃度は、468.3±317.4pg/mlであった。涙液中のNGF濃度は1例でのみ測定され、54pg/mlであった。涙液中のIGF-1濃度は今回の研究では検出されなかった。

(結論) 自己血清点眼は、神経麻痺性角膜症において、角膜上皮細胞を伸展・増殖させ、眼表面を修復するとともに、その健常性の維持にも働きかけていると考えられるために、神経麻痺性角膜症の治療に有効であると考えられた。

論文審査の要旨

神経麻痺性角膜症は、三叉神経の異常によって引き起こされる難治性の角膜上皮障害であり、治療法としていまだに確立されたものはない。一方で、シェーグレン症候群や遅延性角膜上皮欠損などの角膜上皮障害に対しては、自己血清点眼が有効であったとの報告がある。本研究では、神経麻痺性角膜症に対して、自己血清点眼が有効であるか否かについて検討した。また、サブスタンスP (SP)、インスリン様成長因子 (IGF-1)、神経成長因子 (NGF) という神経栄養因子について、血清中および涙液中の濃度をradioimmunoassay (RIA) またはenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。その結果、神経麻痺性角膜症の角膜上皮障害は、自己血清点眼によって速やかに改善することが示された。その他、最高矯正視力の有意な改善と角膜知覚の有意な改善が示された。また、神経栄養因子の解析においては、血清中のSP、IGF-1、NGFの各々の濃度が、涙液中の濃度と同等またはそれ以上の濃度で存在することが示された。以上のことより、自己血清点眼が神経麻痺性角膜症の治療に有効である可能性が示唆された。

審査では、まず、神経麻痺性角膜症について、その原因疾患や頻度や病態について基本的な質問があり、申請者から明確な回答があった。次に、自己血清点眼の治療をする際の長所と短所に関して質問があり、これについても申請者から明確な回答があった。更に、今回、自己血清点眼がどのような作用機序で角膜上皮の創傷治療に関与したと考えられるかという質問に対して、基本的には、血清中のSP、IGF-1、NGFが角膜上皮細胞レベルで、直接的あるいは間接的に作用したものと考えられる、具体的には、過去の知見により、SPとIGF-1は、その相乗作用で、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の発現をさせることにより細胞外成分(フィブロンectin)との接着を増強して角膜上皮細胞の伸展を促進させ、また、NGFは、角膜上皮細胞に存在する特異的受容体(トロポミオシン関連キナーゼA; TrkA)に作用してその増殖を促進していると考えられる、しかし、それとは別に、血清中の他の因子、表皮成長因子(EGF)、ビタミンA、形質転換成長因子(TGF- β)などが非特異的に角膜上皮細胞に作用している可能性もある、との説明がなされた。また、症例写真で、治療の過程において新生血管が消退していった機序についての質問を受けて、新生血管の消退は、自己血清点眼の直接的な作用によるものではなく、角膜上皮欠損(潰瘍)が消失したことによる二次的な反応によるものとの回答がなされ、了承された。また、神経麻痺性角膜症を引き起こす前段階の症例に対して、予防的に自己血清点眼を投与することの有効性について質問がなされ、その予防効果については期待できるのではないかとという見解が述べられた。最後に、今後は、疾患ごとに病態と作用機序の違いを検討した上で、作用する因子を個々に独立して研究することが望まれるとの助言がなされた。

以上、本研究にはいくつか検討すべき課題が残されてはいるものの、自己血清点眼の神経麻痺性角膜症に対する有効性を明らかにした点において、神経麻痺性角膜症の治療を考える上で価値ある論文であると評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 坪田 一男
内科学 鈴木 則宏 病理学 岡田 保典
皮膚科学 西川 武二
学力確認担当者: 北島 政樹、鈴木 則宏
審査委員長: 鈴木 則宏

試問日: 平成17年 1月22日

Effect of walking exercise on bone metabolism in postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis.

(閉経後骨量減少および骨粗鬆症女性における歩行運動が骨代謝に及ぼす影響)

山 崎 智

内容の要旨

閉経後骨粗鬆症の予防や治療に対して運動療法は従来から重要視されているが、骨組織への作用については必ずしも一定した見解が得られていない。本研究の目的は、閉経後女性に対する中強度の歩行運動が骨代謝動態におよぼす影響を明らかにし、かつ骨代謝動態の変化が腰椎骨密度に与える効果について検討することである。

対象は、特に運動習慣がなく、骨関節疾患や心肺機能障害、喫煙習慣および骨粗鬆症治療歴の無い、49才から75才までの閉経後骨量減少あるいは骨粗鬆症女性50名である。これを運動療法を施行する運動療法群32名とコントロール群18名に分けて比較検討した。治療は運動療法のみを行い、薬物は投与しなかった。運動療法は、outdoor walkingから成り、最大酸素摂取量の50%になるように目標心拍数を設定した。この心拍数に相当する速度で1日30分以上、1日総歩数8000歩以上、1週間に4日以上歩行するように指導し、これを12ヵ月間継続した。コントロール群は特に運動せず、通常の日常生活動作のみとした。骨形成マーカーとして血清骨型アルカリホスファターゼ (BAP)、骨吸収マーカーとして早朝第2尿のI型コラーゲン架橋N末端テロペプチド (NTX) を測定した。骨密度はNorland XR36を用いて腰椎骨密度を測定した。

Baselineでの運動療法群とコントロール群間の年齢、身長、体重、体格指数、閉経後年数、尿中NTXおよび腰椎骨密度に有意差はなかった。運動療法群の目標心拍数は108回/分、歩行速度は平均4.2km/hであった。また、12ヵ月間の1日あたりの平均歩数は8185歩であり、1週間の平均運動療法施行日数は4.2日であった。コントロール群においては12ヵ月間で尿中NTXおよび腰椎骨密度の有意な変化は認められなかった。運動療法群ではBAPは、運動療法開始6ヵ月以降減少傾向を示し12ヵ月後において14%の有意な減少を示した。尿中NTXは3ヵ月以降有意に減少を示し、12ヵ月後で28%減少した。腰椎骨密度は12ヵ月後で、運動療法群においてbaselineより2%上昇しており、baselineとは有意差がないものの、これは2%減少したコントロール群に対しては有意な増加であった。また、運動療法開始後3ヵ月間及び12ヵ月間の尿中NTXの変化率と腰椎骨密度の12ヵ月間の変化率との間に有意な負の相関関係が認められた。

この研究結果より、閉経後骨量減少あるいは骨粗鬆症女性における中強度の歩行運動は、主に骨代謝回転を抑制することにより、腰椎骨密度の維持・増加に寄与することが判明した。また、運動療法開始早期の尿中NTXの変化率が、その後の腰椎骨密度の変化に対する重要な予想因子となり得ることが示唆された。

以上より、閉経後女性における中強度の歩行運動は、骨量減少および骨粗鬆症に対して、効果的に働くことが示された。

論文審査の要旨

本研究では、閉経後女性における歩行運動が骨代謝動態におよぼす影響を明らかにし、かつその変化が腰椎骨密度に与える効果について検討することを目的とした。対象は、運動習慣の無い、閉経後骨量減少あるいは骨粗鬆症女性50名である。これを運動療法群32名とコントロール群18名に分けて比較検討した。運動療法は、outdoor walkingから成り、最大酸素摂取量の50%になるように目標心拍数を設定した。この心拍数に相当する速度で1日30分以上、1日総歩数8000歩以上、1週間に4日以上歩行するように指導し、これを12ヵ月間継続した。検討項目は早朝第2尿のI型コラーゲン架橋N末端テロペプチド (NTX)、血清骨型アルカリホスファターゼ (BAP)、および腰椎骨密度とした。Baselineでの各測定値は両群間において有意差はなかった。運動療法群では尿中NTXは3ヵ月以後有意に減少を示し、12ヵ月後で28%減少した。BAPは12ヵ月後において14%の有意な減少を示した。腰椎骨密度は12ヵ月後でコントロール群に対して有意な増加が認められた。また、運動療法開始3ヵ月間の尿中NTXの変化率と腰椎骨密度の12ヵ月間の変化率との間に有意な負の相関関係が認められた。以上の結果から、閉経後骨量減少あるいは骨粗鬆症女性における歩行運動は、主に骨代謝回転を抑制することにより、腰椎骨密度の維持に寄与することが判明した。また、運動療法開始早期の尿中NTXの変化率が、その後の腰椎骨密度の予想因子となり得ることが示唆され、閉経後女性における歩行運動が骨に対して効果的であることが示された。

審査では、対象患者の群分けが適切であったかについて質問がなされた。これに対し、事前に対象患者の運動療法プログラムへの参加意思の有無を確認したためprospective case control studyにならなかったが、at randomな群分けをするべきであったと回答された。また対象患者数が少ないのではないかとという質問がなされた。これに対して、厳しいサンプリングを行った結果として対象患者数が減少したが、これは過去の報告と比較しても決して少ない数でないとの回答がなされた。さらに、コントロール群の運動チェックを厳密にすべきであったこと、運動療法中止による影響も記載するべきであったこと、およびデータの統計解析法などについて助言された。

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はいるが、閉経後骨量減少あるいは骨粗鬆症女性における歩行運動が骨代謝におよぼす影響を明らかにし、今後の骨粗鬆症治療における運動療法の有効性を示した点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭

リハビリテーション医学 里宇 明元 産婦人科学 吉村 泰典
病理学 岡田 保典

学力確認担当者: 北島 政樹、里宇 明元

審査委員長: 里宇 明元

試問日: 平成17年 1月 6日

- 前立腺・尿道平滑筋に選択的な α_1 ブロッカーです。
- 処方しやすい1日1回1カプセル。
(イヌ、*in vitro*)
- 前立腺肥大症に伴う尿勢低下、夜間頻尿、残尿感などに優れた改善効果があります。
- 副作用発現率は2.2% (104/4724例)で、主なものはめまい、胃不快感等です。(再審査終了時)なお、重大な副作用として、失神・意識喪失、肝機能障害、黄疸が認められています。



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

【禁忌(次の患者には投与しないこと)】

- (1) 本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者
- (2) 塩酸バルデナフィル水和物を投与中の患者〔「相互作用」の項参照〕

【効能・効果】前立腺肥大症に伴う排尿障害

【用法・用量】通常、成人には塩酸タムスロシンとして0.2mgを1日1回食後に経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減する。

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

	0.1~5%未満	0.1%未満	頻度不明
精神神経系	めまい、ふらふら感	立ちくらみ、頭痛、眼気	いらいら感
循環器		血圧低下、起立性低血圧、頻脈、動悸	不整脈
過敏症 ^①		痒痒感、発疹等	尋麻疹
消化器	胃不快感	嘔気、嘔吐、口渇、便秘、胃痛感、胃痛、食欲不振、下痢、嘔下障害	
その他		鼻閉、浮腫、尿失禁、咽頭灼熱感、全身倦怠感	味覚異常、女性化乳房、持続勃起症

注) 投与を中止すること。

■ その他の使用上の注意等については、製品添付文書をご参照ください。

前立腺肥大症の排尿障害改善剤(α_1 受容体速断剤)

指定医薬品、要指示医薬品(注意-医師等の処方せん・指示により使用すること)

ハルナール[®] 0.1mg
0.2mg カプセル

塩酸タムスロシン製剤 薬価収載

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

04/12作成 A4.C.01