

第82巻第2号

平成17年

6月

慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

- 綜 説
- 食道癌治療のパラダイムシフト 安藤 暢敏(47)
- 原 著 論 文
- 2型糖尿病患者における血管合併症に与える酸化ストレスの影響 大橋 徳巳(55)
 - 日常身体活動が閉経後骨粗鬆症の薬物治療患者の骨密度に及ぼす影響について 冬城 高久(65)
- 話 題
- 小児のリハビリテーションにおける運動制御理論の応用 間川 博之(73)
 - 東京歯科大学市川総合病院心臓病センター開設への道のり 大木 貴博(73)
 - 髪の毛の中の発がん性物質 花岡 知之(74)
 - ^{13}C -MRS によるサルの脳グルコース代謝 清水 克悦(75)
 - 伊豆にてリハビリ工学の研究生活をおくって 村岡 慶裕(77)
 - 嚥下障害と遺伝子異常 相馬 啓子(78)
- 学 会 展 望
- 第28回慶應外科フォーラム総会(80)
 - 第10回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会(93)
- 慶應医学会平成16年度庶務・会計報告(99)
- 学 位 論 文
- 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(T39)
 - 卵管内胚移植のための子宮鏡用カテーテルの開発
— 組織学的評価とその臨床応用 — 北村 誠司(T55)
 - 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(T67)
 - 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(T81)
 - 肥満2型糖尿病モデル動物 db/db マウスにおける PPAR γ アゴニストおよび PPAR α アゴニストの影響 矢島 賢(T95)
 - 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 山本 幸宏(T107)
 - 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(T127)
 - 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(T139)
 - インスリン非依存糖尿病と自己免疫
— 脾臓関連自己抗体陽性者における細胞性免疫異常 — 鈴木 竜司(T155)
 - HDL コレステロールに関する遺伝因子の研究—日本人女性における CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 MspI 多型の意義— 中村 佳子(T169)
 - 若年成人肥満者の metabolic syndrome におよぼす年齢、肥満度、身体的フィットネスの影響、生活習慣修正による減量の効用 勝川 史憲(T181)
 - アンジオテンシン II 受容体遮断薬および Ca 拮抗薬の慢性経口投与による、高血圧ラットの循環調節の線形性の低下と、非線形性の亢進 大波 敏子(T197)
- 号 外
- 博士 (医学) 学位論文—内容および審査要旨— (第176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 HHD with
A-II Antagonist Losartan

2002 LIFE
The Losartan Intervention For Endpoint
Reduction in Hypertension Study

2002 OPTIMAL
Optimal Therapy in 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過剰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）を経験するおそれがあるので、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
 - (5) 降圧作用に基づくめまい、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。
 - (6) 手術前24時間は投与しないことが望ましい。
 - (7) 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：スピロラクトン、トリウムテレン等
カリウム補剤：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%）、ぼたぼた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4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、蕁麻疹、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) 血象異常：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) 急性肝炎または劇症肝炎
 - 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）〈薬価基準記載〉

指定医薬品・要指示医薬品：注意 一 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

慶應医学会における個人情報の取扱いについて

慶應医学会では会誌の発送、組織運営の改善や円滑な管理を行うために、会員の皆さまから取得いたしました個人情報(特定の個人を識別できるもの、以下同様)を利用しています。その取扱いに際しましては、個人情報の保護に関する法律をはじめ個人情報保護に関する諸法令、およびガイドラインに定められた義務を遵守し、適正かつ安全に管理しています。以下慶應医学会における個人情報の取扱いについて基本方針を説明いたします。

1.個人情報の利用目的

慶應医学会では、(1)会誌の発送、(2)これに関する会員の皆様への連絡、(3)学会運営の改善や管理を目的として会員の皆さまから取得いたしました個人情報を利用し、これらの目的以外に利用することはありません。万一これらの目的以外に個人情報を取得することが必要となった場合には、その都度、利用目的を明示いたします。

2.個人情報の取得方法

慶應医学会では、以下の方法で会員の皆さまの個人情報を取得しております。

- (1) 入会、退会、登録内容の変更などの申請やお問合わせなどによる直接的な取得
- (2) 慶應義塾からの間接的な取得

3.個人情報の第三者への提供

- (1) 慶應医学会では会員本人に連絡が取れない時に、会員本人の所属先の関係者へ連絡する場合を除き、取得しました個人情報を第三者に提供することはありません。
- (2) 慶應医学会では活動の年次報告などの中で、統計的な資料を公表する場合がありますが、この場合特に事前の同意をいただいていない限り個々の会員を特定できる情報は公表いたしません。

4.個人情報の適切な管理

取得した個人情報を利用範囲内で正確・最新の内容に保つよう努め、不正アクセス、個人情報の紛失・破壊・改ざん・漏洩等を防止するために必要かつ適切な安全管理措置を講じます。

以上

綜 説

食道癌治療のパラダイムシフト

東京歯科大学市川総合病院外科

安 藤 暢 敏

ABSTRACT

Paradigm shift in treatment for esophageal cancer

Nobutoshi Ando

Department of Surgery, Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital

Surgery has been taking the lead of treatment for esophageal cancer in Japan. Since the later of 1990's chemoradiotherapy for esophageal cancer patients has become popular as a non-surgical modality. First of all, chemoradiotherapy was applied to patients with highly advanced stage (T4, M1lym), who cannot be cured by surgery, and became the standard treatment modality for this stage. Then chemoradiotherapy has been applied to patients with early stage as a trial based on the remarkable results in highly advanced stage. The result of the JCOG clinical trial showed the excellent survival equal to the result by surgery for the same stage. Therefore a randomized controlled trial comparing chemoradiotherapy and surgery for this stage is ready to start. Recently the group of active medical oncologists has been applying chemoradiotherapy to the middle stage patients (Stage II & III) , for which surgery is recognized internationally as the standard modality for esophageal cancer patients. The paradigm shift from surgery to non-surgery in treatment for esophageal cancer induce a new surgical item, salvage surgery following the failure of chemoradiotherapy or the cancer recurrence.

Key Words : Esophageal cancer, Surgery, Chemoradiotherapy

本邦におけるこれまでの固形がん治療、とくに消化器がん治療の多くは、外科手術が第一選択とされ圧倒的に外科主導で行われてきた。難治がんの一つである食道癌治療の領域でも、40 有余年にわたり、開胸開腹という大きな侵襲を伴う根治手術を標準とする外科的治療を中心に展開されてきた。最近、化学放射線併用療法などの非外科的治療の発達、普及に伴い、食道癌治療は著しく多様化し治療選択肢も増え、治療の個別化が急速に進んでいる。さらに治療内容そのものだけでなく、病名告知、インフォームドコンセントなどの診療態勢の変化や、一般向け医療情報誌、インターネットなどを介した患者サイドへの情報量増加など医療を取り巻く情勢の変化により、「食道癌は切って治す」という概念が大幅に変化しようとしている。すなわち従来の外科手術一辺倒では

なく、多くの有効な治療選択肢の組合せを駆使する集学的治療体系にシフトしつつある。

本稿では現在進行型の食道癌治療のパラダイムシフト¹⁾について、その近未来についても臨床試験の成績などをふまえ述べる。

1. これまでの食道癌治療の変遷

歴史的に見て胸部食道癌に対する最初の切除手術成功例は、1913年に Torek により報告されているが、本邦での食道癌治療に関するまとまった報告は、昭和7年(1932年)の第32回日本外科学会における大沢助教授(京都大学)による宿題報告が嚆矢とされる。1960年代前半までは、食道癌切除手術は限られた特定の施設においてのみ挑戦的に行われたが、御三家といわれた3施

設での治療成績は²⁾千葉大第2外科(中山); 切除例数2053例, 手術死亡率4.9%, 5年生存率11.9%, 東北大第2外科(桂, 葛西); 510例, 15.5%, 12.0%, 慶應義塾大外科(赤倉); 209例, 16.2%, 18.9%と極めて不良であった。当時の切除率は40~50%と低率で, 術後早期死亡例の多くは局所再発が原因であったので, 切除率の向上と局所再発の予防目的で術前放射線療法が広く採用され, 慶大外科³⁾でもいち早く1962年から行われるようになった。手術死亡の大きな原因であった肺合併症と縫合不全という食道癌手術に特異的な二大合併症を減らすための対策に, 長い年月にわたり工夫と努力が向けられてきた⁴⁾。その結果, 70年代後半からは術中・術後の呼吸・循環管理, 代謝栄養管理, 吻合技術が飛躍的に向上した。

1980年代に入り食道癌治療には二つの大きなインパクトが加わった。一つは頸胸腹の3領域リンパ節郭清⁵⁾であり, 一つはシスプラチンの登場である。がんに対する根治手術は, 云うまでもなく癌腫の完全切除と系統的リンパ節郭清により治癒を目指すものであり, そのrationaleは転移, 再発頻度が高い部位のリンパ節郭清により, リンパ節再発の危険性を軽減できるという考え方である。胸部食道癌領域ではこのrationaleは最終的に頸部・上縦隔リンパ節に適用され, 術中・術後管理の進歩にサポートされて, 拡大根治手術である頸胸腹の3領域リンパ節郭清に到達した。80年代後半からは3領域郭清が普及し, 本邦における胸部食道癌手術のState of the artという位置づけになった。一方のシスプラチンの出現により食道癌手術補助療法などの集学的治療は次章で詳述するように大きく発展し, 治療のパラダイムシフトを来す大きな要因の一つとなった。

このような変遷の中で著者が慶應義塾大学外科で食道外科を担当した期間中の15年間(1981~95年)の切除総数は469例(切除率:73.5%)で, うち胸部食道癌は419例であった。この胸部食道癌切除例を81~87年の前期7年間と, 3領域郭清が確立した88年以降の後期8年間で比較すると, 5年生存率は前期(162例)26%, 後期(257例)49%($p < 0.001$)で, 早期食道癌(Stage 0 & I)を除いた進行食道癌(Stage II~IV)では前期(140例)18%, 後期(201例)38%($p < 0.001$)で, 80年代後半以降治療成績の大幅な向上が認められた(図1)。前期から後期への生存率改善に寄与した因子を多変量解析にて検討した結果, 術後合併症の重症度, 癌遺残度およびリンパ節郭清個数などのいずれも外科的治療手技に関与する因子が深く関わっていた⁶⁾。

'81-87/'88-95

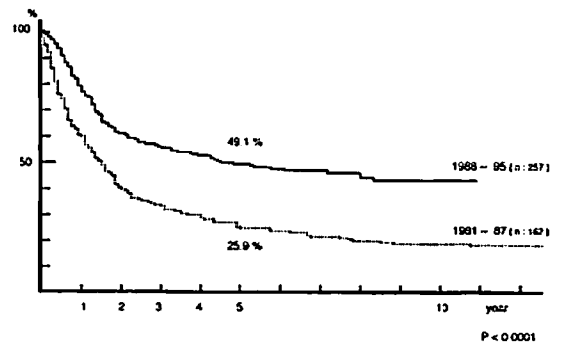


図1 慶大外科における胸部食道癌切除例の5年全生存率(前期81-87年/後期88-95年)

臓器により, 時代により根治性を追求した結果として行き着くところが拡大根治手術であり, それに対するretrospectiveな検討から, 根治性を損わずに手術侵襲を小さくする縮小手術が工夫されて来た。近年そのような分野として内視鏡下食道手術⁷⁾やSentinel Node Navigation Surgery⁸⁾などが展開中である。

2. 非外科的治療の変遷

前述したように70年代に広く行われていた術前照射は, 80年代に入り術後予防照射とのランダム化比較試(RCT)⁹⁾によりその有効性に有意差が見出されなかった結果, 急速に行われなくなった。術後予防照射もその後のRCT¹⁰⁾により術後補助化学療法との比較で有効性に有意差が見出されず, 次第に化学療法にとって代わられた。食道癌に対する放射線単独治療は, 前述してきた外科手術第一選択というような状況の中で, 年齢的条件や局所進行度条件などの理由による切除不能例を主な対象として行われてきた。したがって対象症例は高齢者や全身状態不良例が多く, その成績は全国集計の結果¹¹⁾5年局所制御率20%, 5年生存率9.8%というように極めて不良であった。他のまとまった報告¹²⁾でも成績は同様に, 5生率9.0%, Stage IIで9.9%, Stage IIIでは2.6%と不良であった。

食道癌は他の消化器癌に比べ化学療法感受性が比較的良好であり, 化学療法はこれまで進行食道癌に対し積極的に行われてきた。食道癌治療のなかで化学療法の位置づけは化療単独治療, 手術補助化療, 化学放射線併用療法の3者である。化療単独治療が適応となるのは遠隔臓器転移例(M1), あるいはM1を含む術後再発例であ

る。食道癌に対しアクティブな薬剤は cisplatin, 5-fluorouracil, bleomycin, paclitaxel, mitomycinC, vinorelbine, vindesine, methotrexate である。これら単剤による局所制御能には限界があり, cisplatin を key drug とした多剤併用化学療法が主流で, なかでも CDDP/5-FU はその奏効率が局所進行食道癌で 50%, 遠隔転移例で 35%と比較的高く¹³⁾, 標準治療となっている。CDDP/5-FU の投与法の工夫も各種試みられ¹⁴⁾, 最近では paclitaxel, docetaxel を用いた併用化学療法が注目されている。術前補助化学療法の意義は, CDDP/5-FU と手術単独との欧米での大規模なランダム化比較試験の結果, 術前化療が有効という成績¹⁵⁾と有効ではないという成績¹⁶⁾とがあり未だ controversial である。筆者らは手術補助療法の意義や有効な施行時期を科学的に検証するために, Japan Clinical Oncology Group (JCOG)¹⁷⁾の食道がんグループにおいて多施設共同で RCT を継続して行ってきた。その一環として行った術後補助化療と手術単独との RCT¹⁸⁾の結果, CDDP/5-FU を用いた術後補助化療により無再発生存期間が延長し, 再発予防効果が認められた。

食道癌に対する非外科的治療として, 1980 年代より欧米では放射線と化学療法を同時併用する化学放射線療法の臨床試験が積極的に行われて来た。Al-Sarraf ら¹⁹⁾は, 食道扁平上皮癌に対する化学放射線療法と放射線治療単独との RCT を行い, 放射線単独群に対して化学放射線療法群が生存期間中央値および 5 生率で有意に優れているとの結果を 1997 年に報告した。これらの科学的エビデンスを基に米国での実地医療の Pattern of Care Study (PCS)²⁰⁾においても, 食道癌治療として根治目的の化学放射線療法が最も多く行われ, 非外科的治療の標準治療となっている。

3. 食道癌に対する Stage 別の標準治療とその推移

前述したように本邦での食道癌治療は, 他の消化器がん同様に外科手術第一選択という土壌があったため, 「外科手術によりどの程度進んだ癌をどこまで治せるか」が比較的明確になって来た。日本食道癌研究会(現日本食道学会)では現時点でもっとも妥当と考えられる食道癌の標準的な治療法を推奨するために, “食道癌の治療ガイドライン²¹⁾”を作成し, 2002 年 12 月に出版した。そこに示された食道癌根治術(食道切除・再建, リンパ節郭清)の適応となる進行度は, 壁深達度 T1, T2, T3 であり, T1 の中で T1a(深達度が粘膜筋板まで=粘膜がん, m がん)の粘膜固有層までに留まるものは, 食道切除ではなく内視鏡的粘膜切除術 EMR が絶対的適

応となる。T4(気管, 気管支, 大動脈などの隣接周囲臓器へ直接浸潤する深達度)あるいは N4(頸部リンパ節の一部や腹腔動脈周囲などの遠隔リンパ節転移例), M1(遠隔臓器転移例)は根治術の適応とはならない。

(1) T4 食道癌に対する標準治療とその推移

全国食道がん登録調査報告(1988~1997 年症例, 2002 年発行)²²⁾によれば, 外科的切除例の治療成績は 5 年生存率で 35%を越えるまでに向上してきている。しかし T4, N4 などの局所進行食道癌では腫瘍の完全切除が不可能であり, いわゆる姑息切除となる不完全切除例の予後は生存期間中央値は約 6 か月, 5 年生存率は 5~8%と極めて不良である。数%の治癒しか得られないにもかかわらず開胸開腹という過大な侵襲を加える外科手術は, 遠隔成績と術後 QOL を考慮すれば不完全切除に終わる症例に対する妥当な治療法とは言い難く, 忌避しなければならない。しかしこれら姑息切除例の実態は, 前記報告によれば全切除例のおよそ 20%を占めていた。

これら T4, N4 などの局所進行食道癌に対する姑息切除, 姑息的放射線治療の代替治療法として, 非外科的治療の標準治療となりつつあった化学放射線療法が注目され, 臨床試験が精力的に行われた。1992~94 年にがん集学的治療財団の共同研究として, 切除不能・再発食道がんを対象として放射線療法 30Gy に sequential に Cisplatin/5-FU を併用し 2 コース施行する化学放射線療法の第 II 相試験²³⁾が行なわれ, その結果 CR (Complete response) 率 11%, PR (Partial response) を含む奏効率は 64%であった。JCOG 食道がんグループでは, 同様な stage を対象に放射線療法 60Gy と Cisplatin/5-FU を同時併用する根治的放射線療法 Definitive chemoradiotherapy の第 II 相試験 (JCOG9516)²⁴⁾を, また Ohtsu ら²⁵⁾は放射線療法 60Gy と Cisplatin/5-FU を同時併用 2cycle 分割投与した化学放射線療法の第 II 相試験を行い, CR 率は評価法は異なるもののそれぞれ 15%, 30%, 生存率は 31.5% (2 生率) と 23% (3 生率)であった。治療による毒性も対象の進行度を考慮すれば許容範囲内で, 耐容可能と考えられた。大津らの成績は同一施設内の同様な stage 症例に対する過去の外科手術の成績に匹敵するものであった。²⁶⁾

局所進行食道癌に対する化学放射線療法により CR には至らなくとも, 気管・気管支, 大動脈など隣接周囲臓器への直接浸潤部に対する顕著な局所制御効果により, 癌遺残を伴う姑息切除を回避でき根治手術が可能となる症例が増え, 新しい治療戦略²⁷⁾となりつつある。このよ

うな downstaging 後の手術療法も含め、根治的放射線療法がこの stage に対する標準治療となった。現在の検討課題は放射線と併用する化学療法の投与方法、投与量などであり、JCOG 食道がんグループでは通常用量 Cisplatin/5-FU・放射線併用療法と低用量 Cisplatin/5-FU・放射線併用療法とのランダム化第 II/III 相試験を現在遂行中である。

自験例を供覧する。症例は 68 歳、男性で、腎盂癌の診断で当院泌尿器科入院中に嚥下困難を訴え、上部消化管 X 線造影では胸部上部から頸部食道にまたがる頸胸境界部に長径 5 cm、3 型の陰影欠損像を認めた。上部消化管内視鏡検査の結果 21 cm から全周生の狭窄を認め、生検の結果中分化扁平上皮癌と診断した。頸胸部 CT 検査では気管膜様部への直接浸潤 T4 が疑われ、左鎖骨上リンパ節が周囲との癒着を伴い大きく腫大していた。腎盂癌との同時性重複癌で一期的手術は過大な侵襲になり、主病巣の局在のために喉頭合併切除の必要性も高いこと、胃切除術の既往歴のために食道再建術による侵襲がさらに高いこと、なによりも局所の完全切除の困難性が高いことなどを考慮し、切除手術は極力回避しなければならず化学放射線療法を選択した。低用量 Cisplatin/5-FU・放射線併用療法 50Gy 後の内視鏡所見では、軽度狭窄

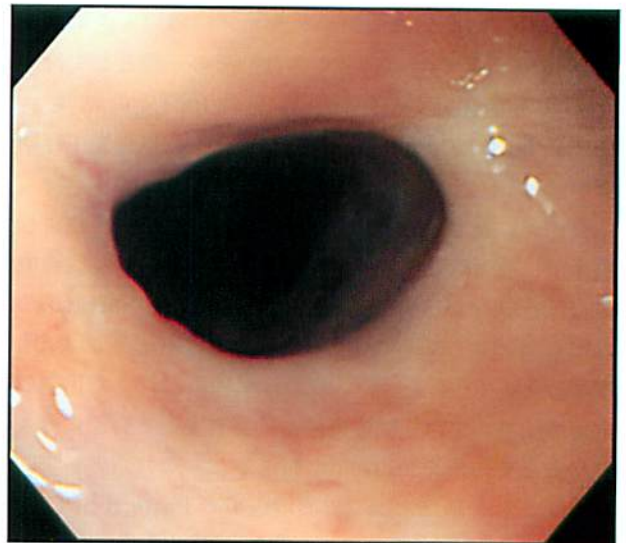
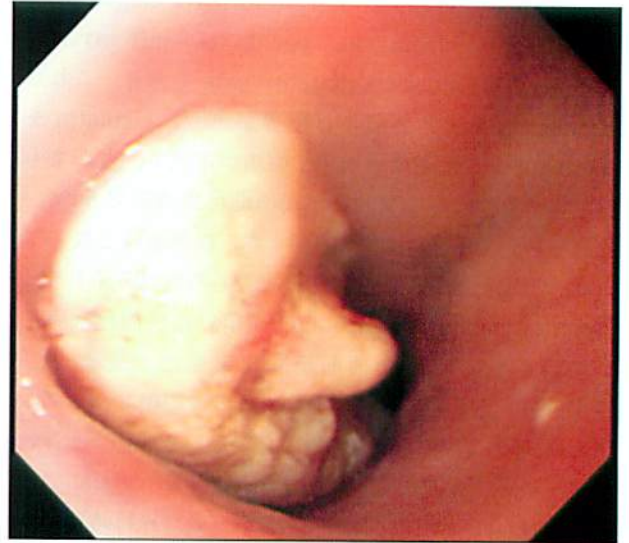


図3 食道内視鏡所見 上：化学放射線療法前 下：後



図2 食道 X 線造影 左：化学放射線療法前 右：後

は残存するが潰瘍病変は消失、瘢痕化し、生検により癌細胞は検出されず、主病巣に対する効果は CR と判定した。左鎖骨上リンパ節腫大は 25% の縮小は認められたが、消失には至らなかった。以上の所見より食道切除は行わずに、左鎖骨上リンパ節のみ摘出した。病理組織学的検索の結果、リンパ節には viable cancer cell を認めなかった。化学放射線療法終了後 13 か月の現在、食道、喉頭の臓器犠牲がない状態で無再発生存中である。(図 2, 3, 4)

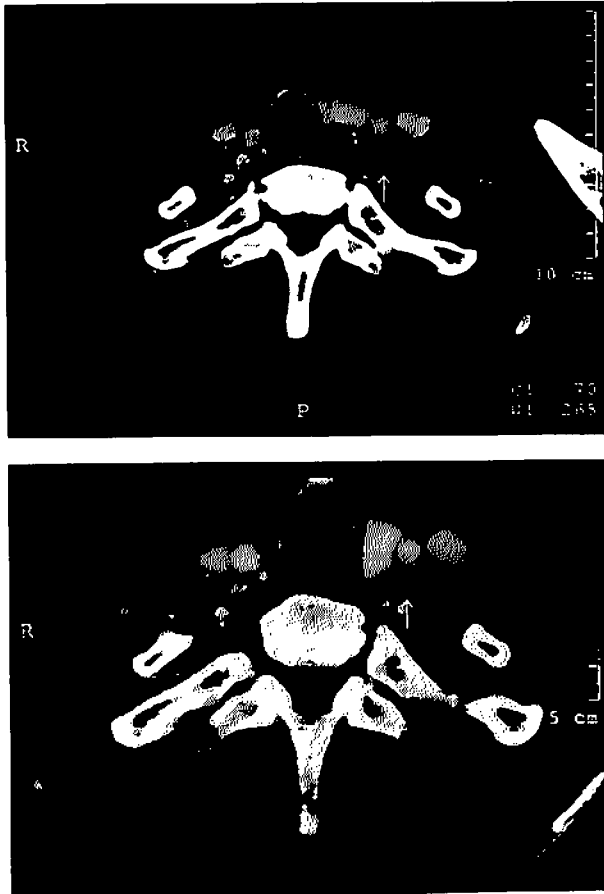


図4 胸部CT 上：化学放射線療法前 下：後
↓：左鎖骨上リンパ節

(2) Stage I (T1N0) 食道癌に対する標準治療とその推移
食道表在癌（壁深達度 T1）に対する治療は、近年では T1a（m がん）には、そのリンパ節転移陽性率が極めて低いことより、原発腫瘍のみの切除となる内視鏡的粘膜切除術 EMR でも十分根治性があると認知されている。前述したように食道癌治療ガイドラインでは、T1a のうち深達度亜分類の m1, m2（粘膜固有層までに留まるもの）を EMR の絶対的適応としているが、m3（粘膜筋板にまで達するもの）および T1b（粘膜下層がん）の中の sm1 は、患者が外科手術を望まない場合や全身状態から根治手術不能と判断された症例では EMR の相対的適応としている。しかし T1b でより深部の sm に浸潤した食道癌（sm2, sm3）のリンパ節転率は 40～50% と高率で、しかもその転移部位は、進行癌と同様に頸部を含めた広い範囲に及んでいる。さらに画像診断を用いたリンパ節転移の陽性予測率は 70%、陰性予測率 60% と決して精度は高くはなく²⁸⁾、臨床的にリンパ

節転移が無いと診断される症例においても、組織学的に転移を有する可能性があるため、標準的な広範囲リンパ節郭清が行われているのが現況である。したがって本邦では、表在癌といえども臨床的に T1b と診断される食道癌の標準的治療は、リンパ節郭清を伴う食道切除術である。

このリンパ節郭清を伴う食道切除術は Stage I (T1N0) 食道癌に対する標準的治療と認識されているものの、Stage II 以上と同様の開胸開腹による手術が過大侵襲ではないかという疑問と、最近の進行食道癌に対する化学放射線療法の良い成績を勘案して、非外科的治療の化学放射線療法で治療を試行することが計画された。

JCOG 食道がんグループでは、比較的早期の進行度でありながら EMR の適応外で、外科手術が根治的治療と考えられている臨床病期 I 期食道扁平上皮癌を対象として、放射線と CDDP/5-FU 同時併用療法の第 II 相臨床試験 (JCOG 9708)²⁹⁾ を行った。1997 年 12 月～2000 年 7 月に 72 例の症例登録を行い、長期成績解析のため現在も症例追跡中である。CR は 63 例 (CR 率 88%) で、腫瘍遺残例のうち 3 例には外科的切除術が行われた。登録終了後 2 年の時点で CR 後の再発、新病変出現は 30 例と比較的多数に認められたが、21 例は切除可能病変であった (EMR やアルゴンプラズマ凝固術：13 例、外科的切除術 Salvage surgery：6 例)。対象病変が小さいので放射線照射野も比較的狭く、したがって有害事象は軽微であった。ただし放射線肺臓炎、胸水貯留、心嚢液貯留などの悔りがたい晩期毒性³⁰⁾ は軽視できない。登録終了後 4 年の時点での 2 年生存率は 93%、4 年生存率は 80% で、この生存成績は同じ臨床病期を対象としたこれまでの外科手術成績³¹⁾ とほぼ同等である。

以上より、Stage I (T1N0) 食道癌に対する化学放射線療法は、CR 率が高く、短期的な生存成績では歴史的対照である外科手術とほぼ同等であった。再発・新病変も決して少なくはないが、適切な二次治療により多くの症例は治癒可能であり、このステージに対する化学放射線療法の生存成績や低侵襲性は極めて有望であり、何よりも切除手術に伴う臓器犠牲がなく食道を温存できることは大きな魅力である。しかしこの第 II 相臨床試験 (JCOG 9708) の結果により、このステージに対する標準治療がこれまでのリンパ節郭清を伴う食道切除術から化学放射線療法へは変わり得ない。化学放射線療法が真に外科的切除術にとって代わることができるか否かは、ランダム化比較試験 (RCT) による科学的な検証が必要である。JCOG 食道がんグループでは、Stage I

(T1N0) 食道がんに対する外科手術 vs. 化学放射線療法の RCT を現在計画中で、プロトコール案作成作業が終了した。

(3) Stage II, III 食道癌に対する標準治療とその推移

Stage II, III, すなわち多くはリンパ節転移を有する中期進行癌に対する標準治療は、リンパ節郭清を伴う食道切除術であることに異論はない。しかし前述して来たような化学放射線療法により得られる目覚ましい治療効果の体験から、本邦では一部の積極的な腫瘍内科医 Medial oncologist らは、Stage II, III 食道癌に対する根治的放射線療法を精力的に施行している。JCOG 消化器がん内科グループでは clinical Stage II, III 進行食道癌を対象に、主病巣のみならずリンパ節好発部位をも照射野に含めた化学放射線療法の第 II 相試験を 2000~2002 年に行った。登録例 74 例中 CR 例は 50 例 (68%) で、3 生率は 45% であった。これは Stage III が対象例の過半数を占めていた背景を考慮すれば、外科手術には決して劣らない成績ではあるが、国立がんセンター中央病院の成績では CR 持続は半数のみで、全体の 2/3 の症例には遺残・再発が認められた。したがって癌の非外科的治療が標準治療の一つになるためには、非外科的治療により CR に至らなかった症例および CR 後再発例に対する救済手術 Salvage surgery が必要である。この Salvage surgery という新しい外科手術の概念が生まれ、最近では検討課題となり、定義、適応および成績が議論されている。

おわりに

これまでの切って治す外科的治療から、化学放射線療法を中心とした非外科的治療への食道癌治療のパラダイムシフトについて述べた。それはまず T4 などの高度進行癌例に対して行われ、次に Stage I の早期癌例に対して現在進行中であり、さらに Stage II, III の中期進行癌例に対しても近未来の展開が予想される。がんの非外科的治療が標準治療の一つとして認知されると、それによる非完治例、あるいは再発例に対する救済手術 Salvage surgery という新しい外科手術の概念が生じてきた。

文 献

1) 安藤暢敏：癌治療適応のパラダイムシフト—手術から非手術へ—。日医雑誌 103 : 359-363, 2002
 2) 赤倉一郎, 中村嘉三：食道癌の治療について。慶應医学 44 : 665-674, 1967

3) Akakura I, Nakamura Y, Kakegawa T, Nakayama R, Watanabe H, Yamashita H : Surgery of carcinoma of the esophagus with preoperative radiation. Chest 57 : 47-57, 1970
 4) Kakegawa T : Forty years' experience in surgical treatment for esophageal cancer. Int J Clin Oncol 8 : 277-288, 2003
 5) 安藤暢敏, 佐藤道夫：胸部食道癌に対する 3 領域郭清術。外科治療 90 : 389-394, 2004.
 6) Ando N, Ozawa S, Kitagawa Y, Shinozawa Y, Kitajima M : Improvement in the results of surgical treatment of advanced squamous esophageal carcinoma during 15 consecutive years. Ann Surg, 232 : 225-232, 2000
 7) 小澤壯治, 安藤暢敏, 大上正裕, 北川雄光, 北島政樹：食道癌の内視鏡下手術 腹腔鏡下胃管作製術。臨外 55 : 1497-1501, 2000
 8) Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Ozawa S, Ohtani Y, Furukawa T, Yoshida M, Nakamura E, Matsuda J, Shimizu Y, Nakamura K, Kumai K, Kubo A, Kitajima M : Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node sampling in esophageal and gastric cancer. Surg Oncol Clin N Am 11 : 293-304, 2002
 9) Iizuka T, Ide H, Kakegawa T, Sasaki K, Takagi I, Ando N, Mori S, Arimori M, Tsugane S : Preoperative radioactive therapy for esophageal carcinoma Randomized evaluation trial in eight institutions. Chest 93 : 1054-1058, 1988
 10) Japanese Esophageal Oncology Group : A comparison of chemotherapy and radiotherapy as adjuvant treatment to surgery for esophageal carcinoma. Chest 104 : 203-207, 1993
 11) 西尾正道, 森田皓三, 山田哲也, 他 34 名：食道癌 M0 症例の放射線治療成績の全国集計。日癌治 27 : 912-924, 1992
 12) Okawa T, Kita M, Tanaka M, Ikeda M : Results of radiotherapy for inoperable locally advanced esophageal cancer. Int J Radiation Oncology Biol. Phys. 17 : 49-54, 1989
 13) Ilson DH, Kelsen DP : Combined modality therapy in the treatment of esophageal cancer. Semin Oncol 21 : 493-507, 1994
 14) Hayashi K, Ando N, Watanabe H, Ide H, Nagai K, Aoyama N, Takiyama W, Ishida K, Isono K, Makuuchi H, Imamura M, Shinoda M, Ikeuchi S, Kabuto T, Yamana H, Fukuda H : Phase II evaluation of protracted infusion of cisplatin and 5-fluorouracil in advanced squamous cell carcinoma of the esophagus : a Japan Esophageal Oncology Group (JEOG) trial (JCOG9407). Jpn J Clin Oncol 31 : 419-423, 2001
 15) Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Party : Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer : a randomised controlled trial. Lancet, 359 : 1727-

- 1733, 2002
- 16) Kelsen DP, Ginsberg R, Pajak TF, Shehan DG, Gunderson L, Mortimer J, Estes N, Haller DG, Ajani J, Kocha W, Minsky B, Roth JA : Chemotherapy followed by surgery compared with surgery alone for localized esophageal cancer. *N Engl J Med* 339 : 1979-1984, 1998
 - 17) Shimoyama M, Fukuda H, Saijo N, Yamaguchi N, members of the committees for the Japan Clinical Oncology Group (JCOG) : Japan Clinical Oncology Group (JCOG). *Jpn J Clin Oncol* 28 : 158-162, 1998
 - 18) Ando N, Iizuka T, Ide H, Ishida K, Shinoda M, Nishimaki T, Takiyama W, Watanabe H, Isono K, Aoyama N, Makuuchi H, Tanaka O, Yamana H, Ikeuchi S, Kabuto T, Nagai K, Shimada Y, Kinjo Y, Fukuda H : Surgery plus chemotherapy compared with surgery alone for localized squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus : a Japan Clinical Oncology Group Study -JCOG 9204. *J Clin Oncol* 24 : 4592-4596, 2003
 - 19) Al-Sarraf M, Martz K, Herskovic A, Leichman L, Brindle JS, Vaitkevicius VK, Cooper J, Byhardt R, Davis L, Emami B : Progress report of combined chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in patients with esophageal cancer : An intergroup study. *J Clin Oncol* 15 : 277-284, 1997
 - 20) Coia LR, Minsky BD, Berkey BA, John MJ, Haller D, Landry J, Pisansky TM, Willett CG, Hoffman JP, Owen JB, Hanks GE : Outcomes of patients receiving radiation for cancer of the esophagus : results of the 1992-1994 pattern of care study. *J Clin Oncol* 18 : 455-462, 2000
 - 21) 食道癌治療ガイドライン (食道疾患研究会編). 金原出版, p., 2002
 - 22) The Japanese Society for Esophageal Diseases : Comprehensive registry of esophageal cancer in Japan (1998, 1999) & Long-term results of esophagectomy in Japan (1988-1997) 3rd edition p. 99-109, 2002
 - 23) Ishida K, Iizuka T, Ando N, Ide H : Phase II Study of chemoradiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus : Nine Japanese Institute Trial. *Jpn J Clin Oncol* 26 : 310-315, 1996
 - 24) Ishida K., Ando N, Yamamoto S, Ide H, Shinoda M : Phase II Study of cisplatin and 5-fluorouracil with concurrent radiotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the esophagus : a Japan Esophageal Oncology Group (JEOG)/Japan Clinical Oncology Group Trial (JCOG9516). *Jpn J Clin Oncol* 34 : 615-619, 2004
 - 25) Ohtsu A, Boku N, Muro K, Chin K, Muto M, Yoshida S, Satake M, Ishikura S, Ogino T, Miyata Y, Seki S, Kaneko K, Nakamura A : Definitive chemoradiotherapy for T4 and/or M1 lymph node squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol* 17 : 2915-2921, 1999
 - 26) Hironaka S, Ohtsu A, Boku N, Muto M, Nagashima F, Saito H, Yoshida S, Nishimura M, Haruno M, Ishikura S, Ogino T, Yamamoto S, Ochiai A : Nonrandomized comparison between definitive chemoradiotherapy and radical surgery in patients with T2-3NanyM0 squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57 : 425-433, 2003
 - 27) 安藤暢敏, 小澤壮治, 北川雄光, 竹内裕也, 北島政樹 : T4 食道癌に対する化学・放射線療法後の根治手術. *日外会誌*, 98 : 767-772, 199
 - 28) Nishimaki T, Tanaka O, Ando N, Ide H, Watanabe H, Shinoda M, Takiyama W, Yamana H, Ishida K, Isono K, Endo M, Ikeuchi S, Mitomi T, Koizumi H, Imamura M, Iizuka T : Evaluation of the accuracy of preoperative staging in thoracic esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 68 : 2059-2064, 1999
 - 29) Kato H, Udagawa H, Togo A, Ando N, Tanaka O, Shinoda M, Aogi K, Yamana H, Shimizu H, Fukuda H for the Japan Clinical Oncology Group : A phase II trial of chemo-radiotherapy in patients with stage I esophageal squamous cell carcinoma : Japan Clinical Oncology Group study (JCOG 9708). *Proc Am Soc Clin Oncol* 22 : 286, 2003
 - 30) Ishikura S, Nihei K, Ohtsu A, Boku N, Hironaka S, Mera K, Muto M, Ogino T, Yoshida S : Long-term toxicity after definitive chemoradiotherapy for squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus. *J Clin Oncol* 21 : 2697-2702, 2003
 - 31) Igaki H, Kato H, Tachimori Y, Sato H, Daiko H, Nakanishi Y : Clinicopathologic characteristics and survival of patients with clinical Stage I squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus treated with three-field lymph node dissection. *Eur J Cardiothorac Surg* 20 : 1089-1094, 2000

原 著

2型糖尿病患者における血管合併症に与える酸化ストレスの影響

慶應義塾大学医学部内科学教室

おお はし のり み
大 橋 徳 巳

ABSTRACT

Effect of oxidative stress on vascular complications in type 2 diabetes

Norimi Ohashi

Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine

To investigate the relationship between oxidative stress and the development of diabetic angiopathy, 194 type 2 diabetic subjects were enrolled, and divided into three groups ; Group I without diabetic angiopathy, Group II with microangiopathy, and Group III with macroangiopathy. We determined the ratio of oxidized albumin (ROA), and other oxidative stress markers, inflammation markers, PAI-1 and some growth factors. We then analyzed the relationship between the levels of oxidative stress markers and the other markers. It was found that the ROA and SOD were increased relative to the control group in all the groups. A negative correlation between the ROA and PDGF and positive correlations between both glutathione peroxidase and lipid peroxide and PAI-1 were found in Group I. In Group II, positive correlations were found between catalase and CRP, and lipid peroxide and PAI-1, and a negative correlation was found between the ROA and PDGF. In Group III, a positive correlation between SOD and PAI-1 was observed. These findings suggest that the onset of microangiopathy in diabetes mellitus may be attributable to the effect of oxidative stresses on PDGF, PAI-1, and CRP, and that the onset of macroangiopathy may be attributable to the effect of oxidative stresses on PAI-1.

Key Words : oxidative stress, ratio of oxidized albumin, high sensitive C reactive protein, plasminogen activator inhibitor 1, platelet -derived growth factor

糖尿病患者にとって血管合併症の存在は重要な予後規定因子であることは、議論の余地のないところである。したがって、その病因、病態の解明は重要な課題となっている。糖尿病患者の単球 DNA においてその酸化変性の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine が増加していることが Dandona¹⁾らにより報告されると、糖尿病患者や糖尿病モデル動物における血液、組織中で酸化ストレスが亢進していることが次々に報告された^{2, 3)}。そしてこの酸化ストレスの亢進が、これら糖尿病血管合併症の進展に強くかかわっている可能性が最近の研究で明らかにされつつある^{4, 6)}。Tilton^{7, 8)}らは新生血管の豊富な皮膚肉芽組織を用い、高血糖あるいはスーパーオキシ

ドアニオンによって血管の透過性亢進や血流増加が誘導される現象を、また vascular endothelial growth factor (VEGF) の中和抗体で肉芽組織を処置することによりそれを正常化しうることを示した。さらに、この現象は肉芽組織を一酸化窒素合成酵素 (NOS) の阻害薬で処置しても同様の改善効果が得られることを示し、高血糖の状態、もしくは高血糖により誘導された酸化ストレスの亢進した状態により、VEGF の発現亢進、NOS の誘導による一酸化窒素 (NO) の過剰産生が細胞障害をきたすという仮説を提唱している。一方、ヘキソサミン経路は解糖系の側副路であり、高血糖状態でその活性が亢進するが、この経路を介して過酸化水素 (H₂O₂) が

産生され、細胞内酸化ストレスの増強に関与していることが報告されている。さらに細胞内培養糸球体メサンギウム細胞にヘキサミンを添加すると、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 発現が増強することが示され⁹⁾、PAI-1 がマトリックス蛋白分解酵素の作用を阻害することから、糸球体へのマトリックス蛋白の蓄積をひき起こすのではないかと考えられている。また transforming growth factor (TGF- β) は血管壁構成細胞(血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、周皮細胞)や血小板、マクロファージなど血液細胞から分泌され、血管壁構成細胞の機能を制御することが明らかになっており、糖尿病性網膜症の眼内新生血管、眼内出血過程でのその関与が示唆されている¹⁰⁾。

また大血管障害、一般的に粥状動脈硬化症の発症機序に関しては、近年急速に明らかになりつつある。現在その最も受け入れられている仮説として、Ross^{11, 12)}の傷害反応仮説 (response-to-injury hypothesis) がある。すなわち粥状硬化の発端に血管内皮傷害と内皮機能の障害が存在し、その傷害に対して血中単球が内皮細胞表面に接着因子との結合を介して接着し、内皮組織下へ進入する。そして脂質を貪食して泡沫細胞となり、初期病変である脂肪線条を形成する。また中膜の平滑筋細胞が内皮下へ進入して増殖し、細胞の壊死も加わり粥腫が形成される。さらにこの過程において血小板やTリンパ球が関与しているというものである。この仮説で考えられるように、動脈硬化形成過程における血管細胞や血中細胞の相互反応はよく理解されるようになった。しかし、その反応を最初に生じる、あるいは一連の反応の進行機序等に関する説明は不十分である。高血圧症においては血圧という機械的ストレス (sheer stress) の関与は内皮傷害の機序として重要と考えられる。これまでに酸化LDLをはじめとした変性脂質、活性酸素などの酸化ストレスの関与や、血漿中ホモシステインやあるいは感染・炎症の関与も血管障害の発症機序として示唆されている¹³⁾。特に酸化LDLに関しては、マクロファージが泡沫細胞化する際に大量の酸化LDLを取り込み、細胞内にエステル化コレステロールを蓄積することが示されており、動脈硬化の進展因子として重要な役割を果たすと考えられている。実際、酸化LDLに特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学により、ヒト及びモデル動物の粥状硬化病変部位に酸化LDLが検出されることも報告されており、その仮説を支持する結果といえる。また、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) はリコンビナントPDGFの持続投与、あるいは動脈のバルーンによる内膜細胞擦過後

のPDGF遺伝子導入により内膜肥厚病変形成が著明に促進¹³⁾されることから、傷害を受けた血管内膜に集まった血小板やマクロファージなどから分泌されたPDGFは、中膜平滑筋細胞の内膜側への遊走ならびに内膜での増殖を惹起する重要な因子と考えられている。

このように、血管障害と酸化ストレスの関係について多くの報告がなされてきたが、これまでに糖尿病性細小血管障害と大血管障害との病因・病態における酸化ストレスの役割、およびこれらの病態におけるその役割の差異に関しては、報告が少ない。酸化ストレスが advanced glycated endoprotein (AGE) 依存性のNF κ B活性化を介してTGF- β の発現亢進を生じたという動物実験の結果¹⁴⁾や、冠動脈病変をともなう症例で、TGF- β が有意に高値であったという臨床成績、それに反して有意に低値であったという報告^{15, 16, 17)}などが散見されるのみであり、酸化ストレスの役割に関しても、一致した結果は得られていない。

そこで今回糖尿病性血管合併症の発症過程における酸化ストレスの影響の差異について、細小血管障害と大血管障害において検討を加えた。本研究において糖尿病性血管障害における病因病態、特に酸化ストレスの各血管障害発症における影響の相違を検討するため、2型糖尿病患者を対象に、酸化ストレスマーカーとして、酸化アルブミン、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)、過酸化脂質を、炎症マーカーとして高感度C reactive protein (CRP)、インターロイキン-6 (IL-6) を、内皮細胞機能のマーカーとして plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、形質転換成長因子- β (TGF- β)、血小板由来成長因子 (PDGF) を、各々測定した。検討症例は血管合併症の無い群、細小血管障害群、虚血性心疾患、脳卒中が合併した大血管障害群の3群に分け、各マーカーの測定値をもとに、全体そして3群別にそれぞれの因子間の関連性を統計解析し糖尿病患者における酸化ストレスマーカーと各パラメーターの関連性を各糖尿病性血管障害の有無により検討し、酸化ストレスの各血管障害の発現における役割を考察した。

材料・対象と方法

1. 対象症例

対象症例はインフォームドコンセントを得た当院内科外来に通院中の2型糖尿病患者120例である(平均年齢61 \pm 8.1歳)。糖尿病の診断は1985年のWHOの診断基準に従った。すなわち空腹時血糖140 mg/dl以上、

随時血糖 200 mg/dl 以上あるいは経口 75 g ブドウ糖負荷試験にて 2 時間後血糖 200 mg/dl 以上を満たすものとした。このうち糖尿病性血管合併症を有さない 59 例を I 群とした。また、糖尿病性細小血管障害（網膜症、腎症、神経症のいずれか）のみを有し、大血管障害（虚血性心疾患、脳卒中、閉塞性動脈硬化症のいずれか）を有さない 30 例を II 群とした。糖尿病性細小血管障害を有さず、大血管障害のみを有す 31 例を III 群とした。患者背景の詳細は第 1 表に示した。また、年齢をマッチさせた糖尿病、高脂血症、高血圧症、腎疾患、心疾患、脳卒中の既往なく、職員健診で異常値を指摘されていない 26 名の健常人と比較した。

2. 血管合併症の評価

合併症の評価は以下のとおり行った。細小血管障害は神経障害もしくは糖尿病性網膜症のいずれかを有するものとした。神経障害は四肢の異常冷感、痛み、痺れ、感覚障害を認め、糖尿病性末梢神経障害が最も疑われる症例と、安静時心電図 RR 幅変動係数 (CVrr) を Cardimax FX-3301 (Fukuda Denshi Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用い測定し、1.66%以下 (40 歳代の正常下限値) および深呼吸負荷心拍変動が 9 拍/分以下を満たす症例とした。なお CVrr 測定は測定 10 分前にベッド上安静の後測定を行った。網膜症は採血採尿時に当院の熟練した 1 人の眼科医に協力してもらい網膜症なし、ありの 2 段階に分類した。大血管障害は虚血性心疾患、もしくは脳卒中の既往をもつものとしその判定は以下のように評価した。虚血性心疾患は、心筋梗塞の既往、トレッドミル運動負荷試験と負荷 Thallium 心筋シンチグラムにより陽性のもの、冠動脈造影にて 75%以上の有意狭窄を認めるものを、また脳卒中の既往は神経学的異常があり頭部 CT、MRI で脳出血、脳梗塞の診断をされているもの、また MRI により糖尿病患者で多い無症候性脳梗塞の既往のあるものを陽性とした。

3. 各種マーカーの測定法

早朝空腹時に採血し、各種マーカーの測定に供した。空腹時血糖 (FPG)、HbA1c、総コレステロール (TC)、中性脂肪 (TG)、HDL の測定は、自動分析機にて行った。

酸化アルブミン

中性 pH (6.87) の Asahipak GS-520H カラム (旭化成、東京、日本) を用いた HPLC 法により Suzuki らの方法¹⁰⁾に従って mercaptalbumin (HMA) および non mercaptalbumin (HNA) に分離した。酸化アルブミン

の評価は酸化アルブミン比=HNA/HMA+HNA にておこなった。

カタラーゼ

カタラーゼ活性を 240 nm の紫外部モニター速度法にて、基質である過酸化水素濃度の減少速度を測定し、国際単位で表現した。

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)

テトラゾリウム塩還元法に準拠した測定試薬キット SOD Activity Detection Kit (和光純薬工業、大阪、日本) を用い、マイクロプレートリーダー (東ソー・テクノシステム、神奈川、日本) にて測定した。

グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)

遠心方式自動分析装置 COBAS FARA (Roche 社) を用いて、1 分間に 1 μmol の NADPH を酸化する酵素活性を 1 単位 (U) とし、ブランクにはサンプルの代わりに、精製水 (DW) を使用し、上記と同様に操作したものをを用いた。活性値算出は、試料での 1 分間あたりの吸光度変化量からブランク (DW) 測定の変化量を差し引き、これにファクターを乗じ活性測定値 (U/L) とした。

過酸化脂質

TBA チオバルビツール酸法に準拠した測定試薬キット過酸化脂質テスト・ワコー (和光純薬工業、大阪、日本) を用いて測定した。分光蛍光光度計は、RF-5000 (島津製作所、東京、日本) を使用した。

C reactive protein (CRP)

ラテックス凝集法を用いた測定試薬キット、N-ラテックス CRPII を使用しレーザーネフロメーター BNI11 にて測定した。

Interleukin-6 (IL-6)

2 ステップサンドウィッチを用いた高感度試薬キット IL-6CLIA (富士レビオ、神奈川、日本) を使用し、専用機器 LP1200 にて測定した。

Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1)

ラテックス凝集法を用いた PAI-1 測定試薬キット、LPIA.Tpai テスト (ダイヤトロン、東京、日本) を使用し、全自動免疫血清検査装置の LPIA-A700 (ダイヤトロン、東京、日本) にて測定した。

形質転換成長因子 (TGF-β)、血小板由来成長因子 (PDGF)

形質転換成長因子 (TGF-β)、血小板由来成長因子 (PDGF) は RDSYSTEMS 社製の各マーカーに対応した ELISA キットを使用し、マイクロプレートリーダー (東ソー・テクノシステム、神奈川、日本) にて測定した。

第1表 臨床背景

	I群 (n=59)	II群 (n=30)	III群 (n=31)	コントロール群 (n=26)
罹病期間(年)	12.3±4.0	13.1±3.3	12.1±3.8	
年齢(歳)	59±8	61±9	64±5 [†]	60±10
性別(男/女)	37/22	20/10	22/9	14/10
喫煙者(%)	27	16	28	39
BMI(kg/m ²)	22.5±2.9	22.3±2.5	23.2±2.7	22.6±2.3
FPG(mg/dl)	151±42*	156±43*	152±35*	102±14
HbA1c(%)	7.2±1.0*	7.3±1.0*	7.1±1.2*	5.0±0.3
TC(mg/dl)	194±37	199±38	203±34	193±32
TG(mg/dl)	115±70	102±79	113±47	101±71
HDL(mg/dl)	53±18	55±13	54±14	55±17
BP(mmHg)	134±14/79±12	132±17/79±8	147±5/83±8 [†]	132±19/78±10
M-Alb/Cr(mg/g Cr)	14.2±2.3	182.2±84.8 [†]	31.9±13.6	13.9±7.6
網膜症		単純性	前増殖性	増殖性
(n)	0	14	6	10
大血管障害			虚血性心疾患	脳卒中
(n)			11	28

I群：血管合併症なし，II群：細小血管障害のみ合併，III群：大血管障害のみ合併
 数値は平均値・標準偏差で表示した。

+P<0.0001 vs コントロール群，[†]P<0.003 vs 他群

BMI：body mass index，FPG：空腹時血糖，HbA1c：ヘモグロビン A1c，TC：総コレステロール，TG：中性脂肪

4. 統計

各群間の差の検定は一元配置分散分析法にて解析した。各マーカーの相関関係を simple linear regression 分析を用い解析した。各解析で p 値 0.05 以下を有意とした。すべての統計解析は Stat View Version 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC) を用い実施した。

結 果

1. 臨床背景

III 群の患者は、他群に比較して年齢、血圧が有意に高値であった。Body mass index (BMI) は III 群の患者で若干高値傾向であったが、有意ではなかった。罹病期間、性差、喫煙、TC、TG、HDL は、コントロール群も含めた全群で差は認めなかった。FPG、HbA1c は糖尿病群内では有意な差は認めなかった。(第1表)

2. 酸化ストレスマーカーの測定値分布(第1図)

各群での各々の酸化ストレスマーカーの測定値分布をコントロール群と比較し、また群間の差を検定した。コントロール群との比較では、酸化アルブミン比、SOD が全群でコントロール群に比し高値を示した。過酸化脂質は III 群においてのみコントロール群に比し有意に低値であったが、I、II 群では低値傾向ではあるも有意で

はなかった。カタラーゼ、GPox は、全群でコントロール群と有意な差は認めなかった。

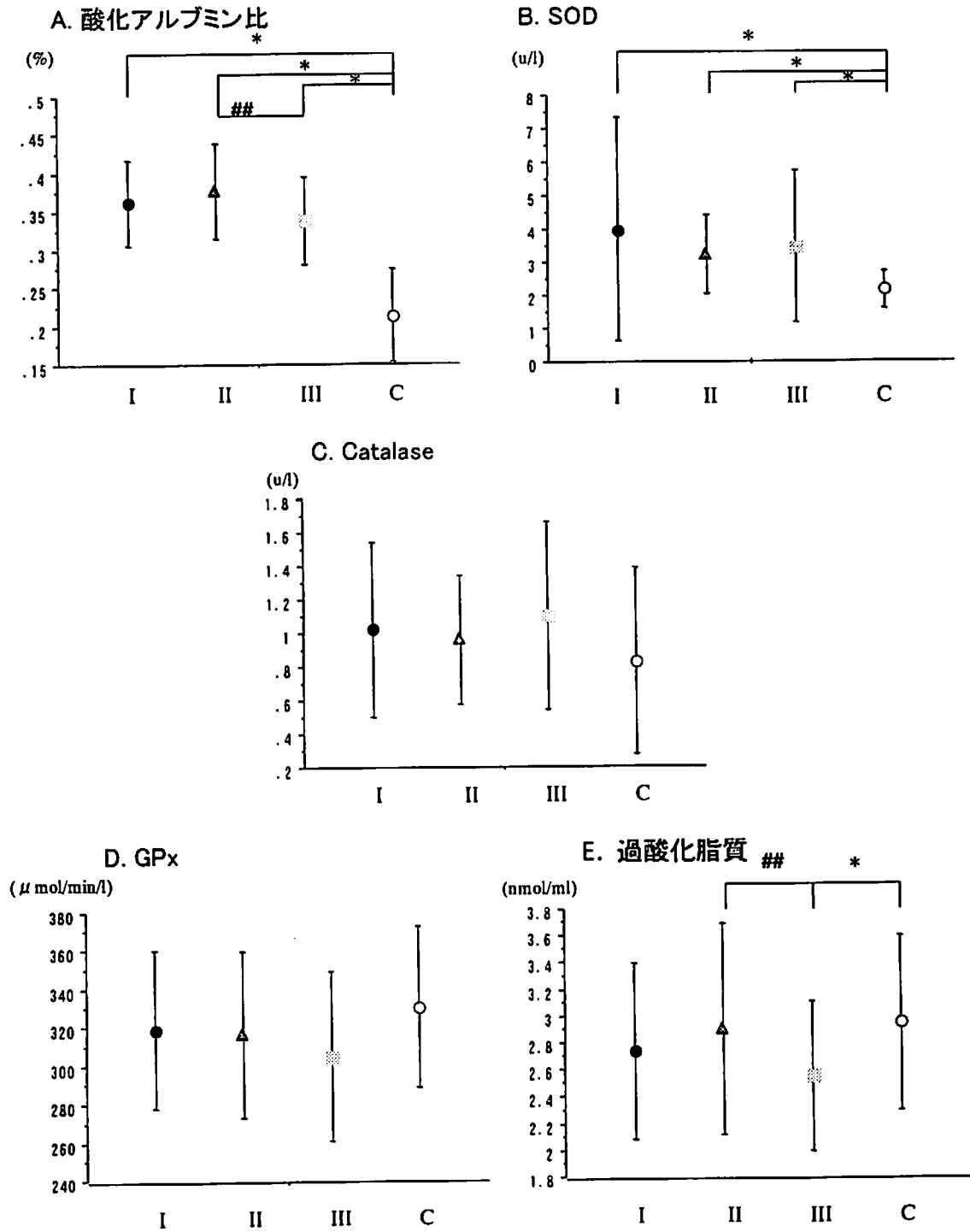
糖尿病群内で群間比較すると酸化アルブミン比、過酸化脂質は III 群に比し II 群で有意に高値であった。カタラーゼ、SOD、GPox は糖尿病群内いずれの群間にも差はなかった。なお過酸化脂質は喫煙者で有意な高値を示したが、各群で喫煙者の割合に差はなかった。

3. その他の病態マーカーの測定値分布(第2図)

CRP は糖尿病群内での群間差は認めなかったが、各群ともコントロール群より高値傾向を示し、III 群では有意であった。IL-6 は各群ともコントロール群より高値傾向ではあったが有意差は認めなかった。PAI-1 はコントロール群、または各糖尿病群における群間の差は有意でなかった。TGF-β、PDGF は糖尿病群でコントロール群より有意に高値を示した。各糖尿病群における群間の差は有意でなかった。

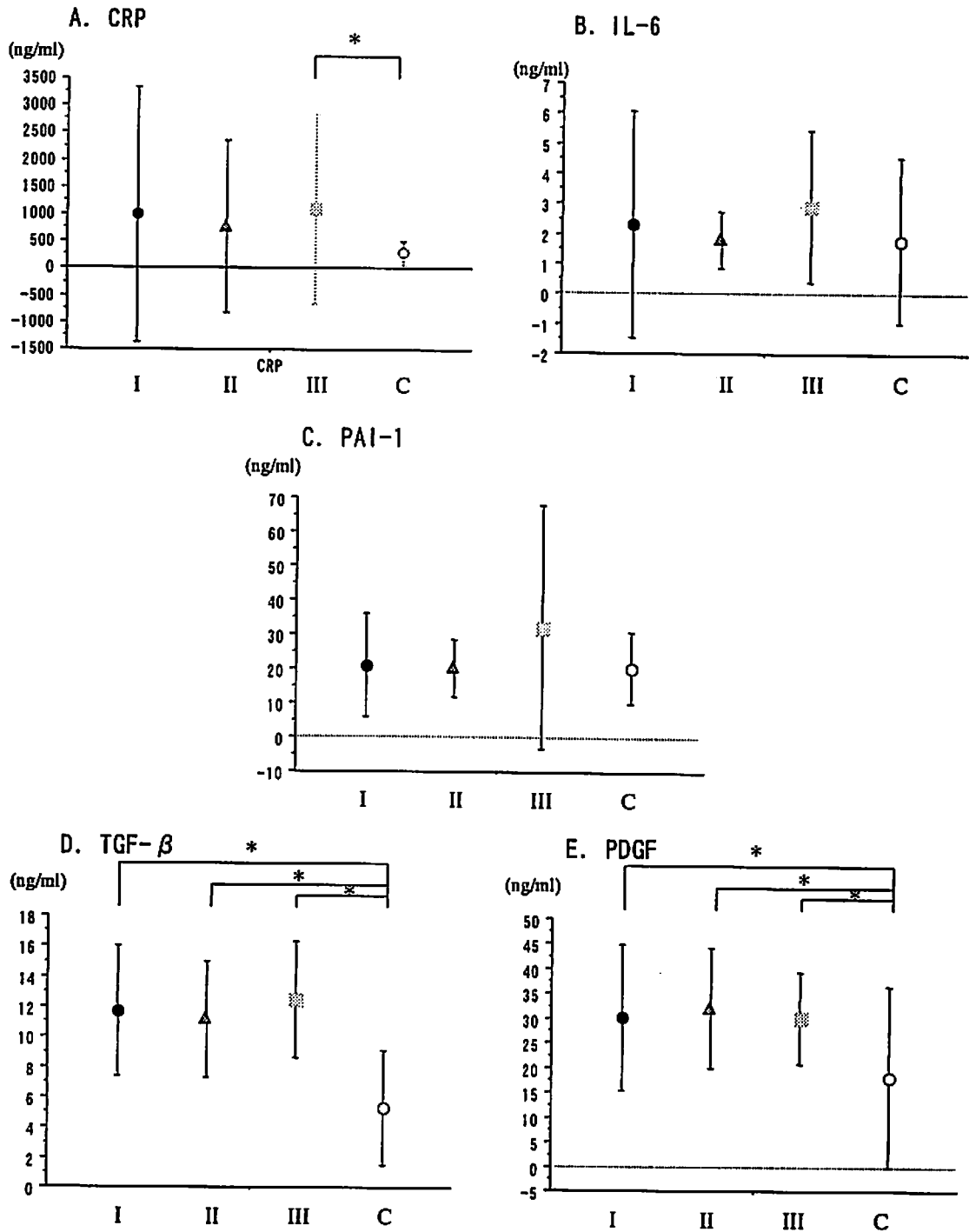
4. 酸化ストレスマーカーと他の病態マーカーの各群での相関関係

以上の結果より、酸化ストレスマーカーである SOD、酸化アルブミン比、過酸化脂質、CRP、TGF-β、PDGF の各マーカーで有意の変化を認めたことから、これらマーカー間の相関関係を糖尿病各群において検討した。血管



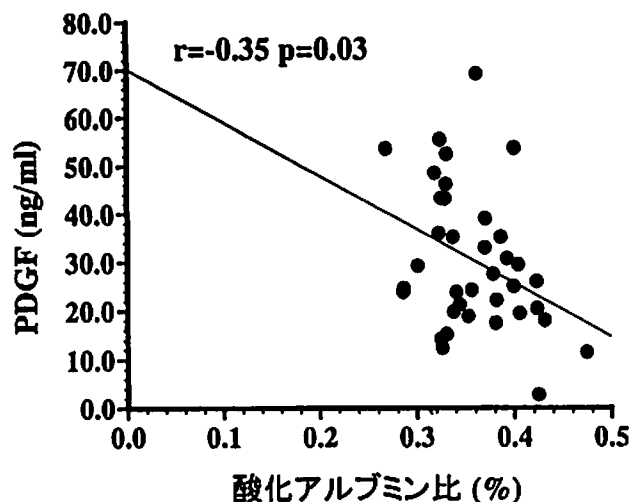
第1図 酸化ストレスマーカーの測定値分布

糖尿病患者を血管合併症の有無により群を分け、血中の各酸化ストレスマーカーの測定値を示し、群間比較した。I：血管合併症を有さない糖尿病患者群 (n=59)，II：細小血管障害のみを有する糖尿病患者群 (n=30)，III：大血管障害のみを有する (n=31)。C：対照群 (n=24)。*p<0.05 対照群，**p<0.05 II vs III，グラフは平均値 および 標準偏差を表示した。

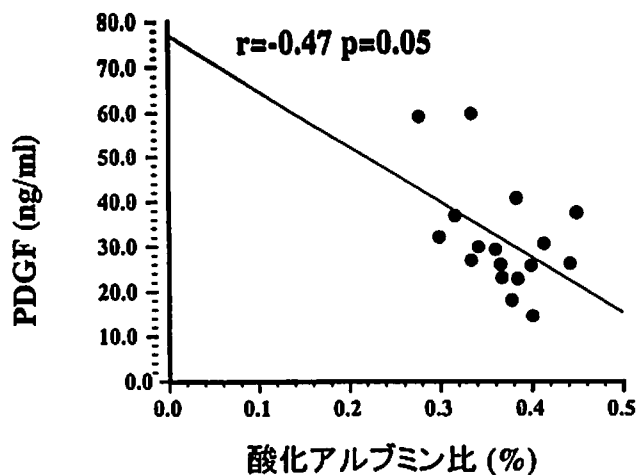


第2図 その他の病態マーカーの測定値分布

糖尿病患者を血管合併症の存在の有無により群を分け、血中のその他の病態マーカーの測定値を示し、群間比較した。I：血管合併症を有さない糖尿病患者群 (n=59)、II：細小血管障害のみを有する糖尿病患者群 (n=30)、III：大血管障害のみを有する (n=31)、C：対照群 (n=24)。*p<0.05 対照群、グラフは平均値 および 標準偏差を表示した。



第3図 I群での酸化アルブミン比とPDGFの相関関係
I群における酸化アルブミン比とPDGFの相関関係を検討した。I群(n=59)では酸化アルブミン比とPDGFは負の相関関係を示した($r=-0.35$, $p=0.03$)。



第4図 II群での酸化アルブミン比と他のPDGFの相関関係
II群における酸化アルブミン比とPDGFの相関関係を検討した。II群(n=30)では酸化アルブミン比とPDGFは負の相関関係を示した($r=-0.47$, $p=0.05$)。

合併症を有さないI群では酸化アルブミン比とPDGFに負の相関関係を認めた(第3図)。細小血管合併症を有するII群でも同様に、酸化アルブミン比とPDGFに負の相関関係を認めた(第4図)。一方、SOD、酸化アルブミン比とTGF- β の間にはI、II群ともに有意の相関関係を認めなかった。大血管合併症を有するIII群ではSOD、酸化アルブミン比、過酸化脂質の酸化ストレスマーカーと、CRP、TGF- β 、PDGFにコントロール群と比べ、有意の変化を認めたが、酸化ストレスマーカーと各マーカー間では有意の相関関係を認めなかった。

考 察

糖尿病において酸化ストレスは、その発症から血管合併症の進展に至るまで大きな役割を果たしていると考えられている^{19, 20}。実際糖尿病モデル動物や糖尿病患者の血液中、もしくは組織中での酸化ストレスの亢進が報告されている¹¹。特に2型糖尿病患者での報告は、DNA酸化障害の指標である8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) 含量の増加が尿中²¹や血中²²において示されている。この研究においても血中での酸化ストレスの亢進状態を認めた。血中タンパク質のうち量的に最も豊富に存在するアルブミンは mercaptalbumin (HMA 還元型) と non mercaptalbumin (HNA 酸化型) に大別される。そしてHMAからHNAへの変換は生体内での酸化産物のスカベンジャーとして重要な酸化ストレス作用の役割を担っていることが明らかになっており^{23, 25}、これまでも糖尿病患者において酸化アルブミンの増加が報告されている²⁶。

今回の検討でも過去の報告と一致して、各群の糖尿病患者において酸化アルブミンが対照群と比べ有意の増加を示したが、増加した酸化ストレスに対してアルブミンが抗酸化作用を示した結果である可能性が示唆された。さらに、酸化ストレスの消去に重要な役割を果たすSODがコントロール群に比し有意に高値を示したことも高血糖による酸化ストレスの亢進が酸化ストレス消去系酵素を誘導した結果であるという可能性が考慮された。実際、内皮細胞ミトコンドリアでのsuperoxideの産生が高血糖により誘導されることが示されているが²⁷、今回の検討はsuperoxideそのものの測定ではなく、その消去系であるSODの血中での検討であり、今後さらに検討を要すると考えられた。

これまでに、糖尿病患者の血中のSODに関する報告は、Adachiら²⁸の2型糖尿病患者における血中SODレベルとインスリン抵抗性との関連についての検討を加

えた報告のみである。彼らは空腹時の血糖値、BMI、インスリン抵抗性と血中SODレベルが有意に逆相関したことを報告している。今回の検討では糖尿病群において空腹時の血糖値、BMIと血中SODの間には相関関係は見られなかった。Adachiらの報告は、肥満者も含めて検討されているのに対し、今回の検討は平均BMI22前後の肥満のない患者での検討であることにより差異を生じた可能性が考えられた。また、今回の検討では、血管障害の明らかとなった比較的病期の進んだ症例が多く含まれていることも要因となっている可能性が考慮された。

一方、GPx、カタラーゼもH₂O₂の消去系であるが、Atli Tら²⁹⁾の糖尿病患者での血中GPxの結果と同様に今回の研究においてもGPx、さらにカタラーゼも対照群に比して有意な差を認めなかった。

過酸化脂質が大血管障害合併群であるIII群でのみ有意に対照群に比し低値であったのは興味深い結果といえる。すなわち、過酸化脂質は動脈硬化病変部位に取り込まれ、LDLを酸化し、マクロファージの泡沫細胞化に寄与することを通して動脈硬化を促進することから、動脈硬化を発症している群においては、病変部位に過酸化脂質が取り込まれ、結果として血中濃度が低値となった可能性が考えられた。実際に、過酸化脂質は、ヒトの動脈硬化巣に沈着した酸化LDLとともに局在することが報告されている^{30, 31)}。以上のように酸化ストレスマーカー間で差異はあるものの、今回の検討で得られた結果は、2型糖尿病患者において酸化ストレスが亢進している可能性を支持する結果といえるであろう。

今回の研究のもうひとつの目的は、この亢進した酸化ストレスが血管合併症を発症するに当たり、その後の反応において細小血管障害と大血管障害で差異があるか否かを検討することであった。

動脈硬化症の発症、進展において感染・炎症の関与が示唆されている¹²⁾が、IL-6は、血管平滑筋細胞に作用し、PDGFを誘導することによりその増殖を促進することが明らかになっている³²⁾。また、Paul M. RidkerらのCARE (the Cholesterol and Recurrent Events) trialのサブ解析³³⁾によれば、心筋梗塞再発例、冠疾患による死亡例について、5年間の試験期間中に心血管イベントを発生しなかった年齢性別が同等の対照群とCRP値を比較したところ、CRP値が0.66以上を示す群ではCRP値0.12以下の群に比べて、心血管イベント発生の相対リスクが約2倍高まることが明らかになっている。Saitoらは糖尿病患者のCRPは正常対照群に比べ有意に高値を示し、正常対照群において空腹時血糖値とCRPが有意に相関したと報告している³⁴⁾。今回の検討

ではIII群のみ対照群に比しCRPが高値であった。Saitoらの報告は糖尿病患者の血管合併症の状態まで検討しておらず、今回の検討で糖尿病細小血管障害と大血管障害で差異が存在することが初めて示されたといえる。すなわち、糖尿病患者において何らかの因子(たとえば喫煙、肥満、高血圧など)により炎症を生じてCRP高値となり、大血管障害を伴うという可能性が示唆された。

糖尿病性細小血管症の発症要因として、血管の異常な収縮、拡張、またそれによる血流異常、血管透過性亢進、血管細胞外基質の過剰蓄積などの可能性があげられる。また、これらの異常の原因として、血管構成細胞の機能や増殖活性に強力に作用する因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF)、PDGFやTGF-βなどの血管局所での過剰発現が強く関与していると考えられている。つまりPDGFは血小板、マクロファージ、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞より分泌される動脈硬化病変にかかわる生理活性物質であり、かつ細小血管症発症の要因でもあるため、糖尿病血管合併症の発症、進展には重要な役割を果たすことが推察されている。しかしこれまで血中PDGFについてはほとんど検討されておらず、対照に比べ減少していたとの報告³⁵⁾や増加していたとの報告³⁶⁾があり一定ではない。

今回の検討では、PDGFは、対照群と比べ、いずれの糖尿病群においても有意の高値を示した。血管障害を伴わないI群においても高値を示した結果については、I群の患者ではPDGFに拮抗する他の因子が存在する、あるいは反対に、既に血管障害は始まっているものの顕症化していないといった可能性が考慮される。この可能性を検証するためには、I群症例の長期経過観察を行い、PDGFと血管障害発症の関連を検討する必要がある。さらに今回の検討では酸化アルブミン比がI、II群においてのみPDGFと負の相関を示し、III群においてその相関関係を認めなかったこと、また酸化アルブミン比はIII群でII群に比し有意に低値であったことから、大血管障害の発症にはアルブミンを中心とした酸化ストレスの消去系の作用が破綻をきたし、血管内皮細胞をはじめとしてPDGFの発現が亢進することにより、酸化ストレスが大血管障害発症進展に寄与している可能性も考えられた。

以上のように、本研究より、糖尿病患者で、酸化ストレスの亢進が確認され、その酸化ストレスによる血管障害機序は、細小血管障害と大血管障害で異なる可能性が示唆されたが、今後、さらに症例を増やして前向き研究などを行い、この可能性を確認する必要があると考えられた。

総 括

糖尿病患者における酸化アルブミンを中心とした酸化ストレスマーカーと各パラメーターの関連性から各糖尿病性血管障害の発現における役割を考察し、各血管障害の病因病態の違いを検討した。糖尿病患者において酸化ストレスが亢進していることを示した。また細小血管障害と、大血管障害の病態の差は、大血管障害でのCRP高値、過酸化脂質の低値である可能性が示唆された。

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。本研究に際し直接御指導頂いた同中央臨床検査部武井泉講師に深謝いたします。さらに多大なる貴重な御助言を頂きました先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T : Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347 : 444-445, 1996
- 2) Takahara N, Kashiwagi A, Nishio Y, Harada N, Kojima H, Maegawa H, Hidaka H, Kikkawa R : Oxidized lipoproteins found in patients with NIDDM stimulate radical-induced monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. *Diabetologia* 40 : 662-670, 1997
- 3) Nishio Y, Kashiwagi A, Taki H, Shinozaki K, Maeno Y, Kojima H, Maegawa H, Haneda M, Hidaka H, Yasuda H, *et al* : Altered activities of transcription factors and their related gene expression in cardiac tissues of diabetic rats. *Diabetes* 47 : 1318-1325, 1998
- 4) Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H, Ito T, Nakagawa A, Kigoshi T, Ishibashi T, Nishio M, *et al* : Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetic subjects. Relationship to microvascular complications. *J Diabetes Complications* 15 : 135-143, 2001
- 5) Tooke JE : Possible pathophysiological mechanisms for diabetic angiopathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 14 : 197-200, 2000
- 6) Ceriello A, Motz E, Cavarape A, Lizzio S, Russo A, Quatraro A, Giugliano D : Hyperglycemia counterbalances the antihypertensive effect of glutathione in diabetic patients : evidence linking hypertension and glycemia through the oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 11 : 250-255, 1997
- 7) Tilton RG, Kawamura T, Chang KC, Ido Y, Bjerkce RJ, Stephan CC, Brock TA, Williamson JR : Vascula-

- r dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 99 : 2192-2202, 1997
- 8) Tilton RG : Diabetic vascular dysfunction : links to glucose-induced reductive stress and VEGF. *Microsc Res Tech*. 57 : 390-407, 2002
- 9) James LR, Fantus IG, Goldberg H, Ly H, Scholey JW : Overexpression of GFAT activates PAI-1 promoter in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 279 : F718-727, 2000
- 10) Ideta R, Yamashita H, Tanaka Y, Kato S, Kitano S, Hori S : Roles of cytokines in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 117 : 700-701, 1999
- 11) Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E : The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation* 70 : III77-82, 1984
- 12) Ross R : Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 : 115-126, 1999
- 13) Waltenberger J : Modulation of growth factor action : implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation* 96 : 4083-4094 1997
- 14) 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
- 15) Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schofield PM, Chauhan A : The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1 : 74-79, 1995
- 16) Grainger DJ, Wakefield L, Bethell HW, Farndale RW, Metcalfe JC : Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. *Nat Med* 1 : 932-937, 1995
- 17) Wang XL, Liu SX, Wilcken DE : Circulating transforming growth factor beta 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 34 : 404-410, 1997
- 18) Suzuki E, Yasuda K, Takeda N, Sakata S, Era S, Kuwata K, Sogami M, Miura K : Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 18 : 153-158, 1992
- 19) Bambolkar S, Sainani GS : Evaluation of oxidative stress in diabetics with or without vascular complications. *J Assoc Physicians India* 43 : 10-12, 1995
- 20) Wohaieb SA, Godin DV : Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 36 : 1014-1018 1987
- 21) Leinonen J, Lehtimaki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O, *et al* : New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 417 : 150-152, 1997
- 22) Shin CS, Moon BS, Park KS, Kim SY, Park SJ, Chung MH, Lee HK : Serum 8-hydroxy-guanine levels are

- increased in diabetic patients. *Diabetes Care* 24 : 733-737, 2001
- 23) Sogami M, Era S, Nagaoka S, Kuwata K, Kida K, Shigemi J, Miura K, Suzuki E, Muto Y, Tomita E, *et al* : High-performance liquid chromatographic studies on non-mercapt in equilibrium with mercapt conversion of human serum albumin. II. *J Chromatogr* 332 : 19-27, 1985
 - 24) Sogami M, Era S, Nagaoka S, Kuwata K, Kida K, Miura K, Inouye H, Suzuki E, Hayano S, Sawada S : HPLC-studies on nonmercapt-mercapt conversion of human serum albumin. *Int J Pept Protein Res* 25 : 398-402, 1985
 - 25) Sogami M, Nagoka S, Era S, Honda M, Noguchi K : Resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography. *Int J Pept Protein Res* 24 : 96-103, 1984
 - 26) Bourdon E, Loreau N, Blache D : Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 13 : 233-244, 1999
 - 27) Brownlee M : Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414 : 813-820, 2001
 - 28) Adachi T, Inoue M, Hara H, Maehata E, Suzuki S : Relationship of plasma extracellular-superoxide dismutase level with insulin resistance in type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 181 : 413-417, 2004
 - 29) Atli T, Keven K, Avci A, Kutlay S, Turkcapar N, Varli M, Aras S, Ertug E, Canbolat O : Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients. *Arch Gerontol Geriatr* 39 : 269-275, 2004
 - 30) Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Glass CK, Sigal E, Witztum JL, Steinberg D : Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 6959-6963, 1990
 - 31) Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Sigal E, Sarkioja T, Witztum JL, Steinberg D : Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* 87 : 1146-1152, 1991
 - 32) Klouche M, Bhakdi S, Hemmes M, Rose-John S : Novel path to activation of vascular smooth muscle cells : up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor. *J Immunol* 163 : 4583-4589, 1999
 - 33) Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E : The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 335 : 1001-1009, 1996
 - 34) Saito M, Ishimitsu T, Minami J, Ono H, Ohru M, Matsuoka H : Relations of plasma high-sensitivity C-reactive protein to traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 167 : 73-79, 2003
 - 35) Nakashima N, Umeda F, Yamauchi T, Ishii H, Hisatomi A, Nawata H, Masuko H, Nakayama K, Tatematsu A : Platelet-derived growth factor and growth-promoting activity in the serum samples and platelets of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Lab Clin Med* 120 : 78-85, 1992
 - 36) Lev-Ran A, Hwang DL : Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor in blood in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 123 : 326-330, 1990

原 著

日常身体活動が閉経後骨粗鬆症の薬物治療患者の 骨密度に及ぼす影響について

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

ふゆ き たか ひさ
冬 城 高 久

ABSTRACT

Influence of Daily Physical Activities on Bone Mineral Density
during Treatment for Postmenopausal Osteoporosis

Takahisa Fuyuki

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keio University

Objective To examine the influence of daily physical activities, especially exercise, on bone mineral density in women receiving treatment for postmenopausal osteoporosis.

Methods Physical strength (exercise tolerance, aerobic capacity, and muscle strength) and daily physical activity levels (energy consumption per day, kcal/day) were evaluated in 39 middle-aged women with postmenopausal osteoporosis or osteopenia who were receiving hormone replacement therapy (HRT). The subjects were divided into three groups on the basis of the percent change in the bone mineral density of the second to fourth lumbar vertebrae (%BMD) during 6 months of HRT : the responder group, in which the bone mineral density increased by more than 2% ; the unchanged group, in which the change in bone mineral density was within $\pm 2\%$; and the non-responder group, in which the bone mineral density decreased by more than 2%.

Results Physical strength did not differ significantly among the three groups. Physical activity levels in terms of daily energy consumption and weight-corrected energy consumption were significantly higher in the responder group than in the unchanged group and non-responder group.

Conclusions Maintaining moderate or higher levels of physical activity helps to increase bone mineral density in women receiving HRT.

Key Words : postmenopausal osteoporosis, physical activity, bone mineral density hormone replacement therapy

閉経後や両側卵巣摘出術後に認められる骨量減少および骨粗鬆症は、女性ホルモンの分泌低下を主因とすることから、その治療法としてホルモン補充療法 (hormone replacement therapy ; HRT) がこれまで婦人科領域を中心に広く行われてきた。しかし、2002年のWomen's Health Initiative (WHI) の中間報告¹⁾や2003

年の Million Women's Study の報告²⁾から、HRT を長期間施行することにより乳癌、冠動脈疾患、脳卒中などのリスクが増大することが明らかとなり、また一方で欧米を中心とした大規模臨床試験から閉経後骨粗鬆症患者における著明な骨折予防効果が証明されている Alendronate^{3), 4)}や Risedronate^{5), 6)}が、わが国でも処

方可能となったこともあり、HRT は今日の骨粗鬆症治療の gold standard ではなくなっている。しかし、WHI の中間報告¹⁾においても、HRT を施行することによる大腿骨頸部骨折に対する骨折予防効果は証明されており、それらの点からは HRT の骨粗鬆症治療における全ての役割が否定された訳ではない。

元来骨密度を規定する因子としては、エストロゲン・レセプター遺伝子多型などの先天的因子^{8), 9)}とともに、食事や運動などの生活習慣をはじめとする後天的因子も重要であるといわれている。その中では特にプログラム化された運動負荷が骨代謝に及ぼす影響についてはこれまでも多くの報告^{10) 16)}がなされているが、運動以外の日常生活の中での身体活動がトータルとして骨粗鬆症治療に及ぼす効果について検討した報告は少ない。

そこで、今回骨粗鬆症に対する薬物療法施行時に、日常的な身体活動がその骨密度 (Bone Mineral Density : BMD) 変化に及ぼす効果を、強力な骨吸収抑制効果を有し有意な BMD 増加が期待出来る HRT 施行者を対象として検討したので報告する。

対象および方法

今回の研究対象者は全て、慶應義塾大学病院産婦人科に併設されている更年期専門外来受診者で、本研究の主旨を説明し同意の得られた者とした。すなわち当外来初診時ないし6カ月毎の定期的な検査として、Dual energy X-ray absorptionmetry の XR-36, (Norland 社, USA) にて測定している第2から第4腰椎骨密度の平均値 (L2-4BMD) から日本骨代謝学会原発性骨粗鬆症診断基準 (1996年改訂版)¹⁷⁾に準じて骨量減少および骨粗鬆症と診断され、その治療目的のため結合型エスト

ロゲン (Premarin®) 0.625 mg/日および酢酸メドロキシプロゲステロン (Provera®) 2.5 mg/日の持続併用投与方法にて HRT を施行中の 39 例 (HRT 群 : HRT 開始前の平均年齢 ; 53.3 ± 8.4 歳, HRT 施行期間 ; 3.1 ± 1.0 年 (mean ± SD)) と、その対照例として薬物治療を希望せず骨密度測定のための経過観察を行った 22 例 (経過観察群 : 経過観察前の平均年齢 ; 45.8 ± 7.3 歳) を研究対象とした。表1にこれら2群の背景を示すが、年齢、体格因子に2群間で有意差を認めなかった。

そしてこれら全対象例に対して、1996年4月から2000年3月までの間で6カ月毎の定期的な検査として腰椎骨密度を測定したある一時点で、日常身体活動と体力の評価を行った。まず日常身体活動については、症例毎に調査時点より前6カ月の間に長期臥床などの日常身体活動に大きな影響を及ぼすイベントを認めていないことを確認の上で、調査時点から2週間以内の日常身体活動についての問診およびアンケート調査を施行した。そして、得られた結果を基に具体的な活動内容についてのエネルギー消費量を Ainsworth ら¹⁸⁾による「身体活動の概算エネルギー消費量」を参考にしてそれぞれ算出し、体重 (kg) および活動時間 (分) を乗じた総和を1日あたりの平均消費エネルギー (kcal/日) に換算した上で、それを日常身体活動量として評価した。次いで体力に関しては、「運動耐容能」、「有酸素能」、「筋力」の3項目で評価することとし、以下のような測定と解析を行った。運動耐容能は、トレッドミルを用いて自覚的疲労を end point として得られる運動継続時間 (分) として評価を行った。有酸素能は、トレッドミルを用いて得られた最大酸素摂取量 (ml/分) を体重補正 (ml/分/kg21) の上、評価した。筋力は、MedX lumbar extension machine (MedX 社, USA)²⁰⁾を用いて得られた等尺的な背筋力 (strength index ; SI) で評価した。

その上で HRT 群を、日常身体活動の評価を行った時点までの半年間の L2-4BMD 値の変化率 (%BMD) が、DXA の再現性の指標である変動係数 (coefficient of variation) 約 1%¹⁹⁾を考慮して、2%以上増加していた 10 例を responder (R) 群、± 2%以内の変化にとどまった 17 例を unchanged (U) 群、2%を越えて減少していた 12 例を non-responder (N) 群として、この3群間の日常身体活動量および体力について比較検討を行った²⁰⁾。その際の統計学的解析は、Student's non-pair t-test を用いて、その分散に有意差がある場合には Welch の補正を行った。そして有意水準 5%をもって有意な差とみなした。

さらに HRT 群および経過観察群いずれの対象者に対

第1表 HRT 群と経過観察群の背景

HRT 群と経過観察群の背景。今回の研究対象とした HRT 群 (hormone replacement therapy 群) と経過観察群の 2 群の調査時の年齢、身長、体重、Body Mass Index (BMI) に有意差を認めなかった。

	mean ± SD		
	HRT 群 n=39	経過観察群 n=22	P value
調査時年齢 (歳)	53.3 ± 8.4	45.8 ± 7.3	NS
身長 (cm)	155.6 ± 8.4	157.0 ± 3.1	NS
体重 (kg)	49.6 ± 6.3	51.9 ± 6.7	NS
BMI	20.4 ± 2.5	21.2 ± 2.5	NS

HRT 群 ; hormone replacement therapy 群
BMI ; body mass index

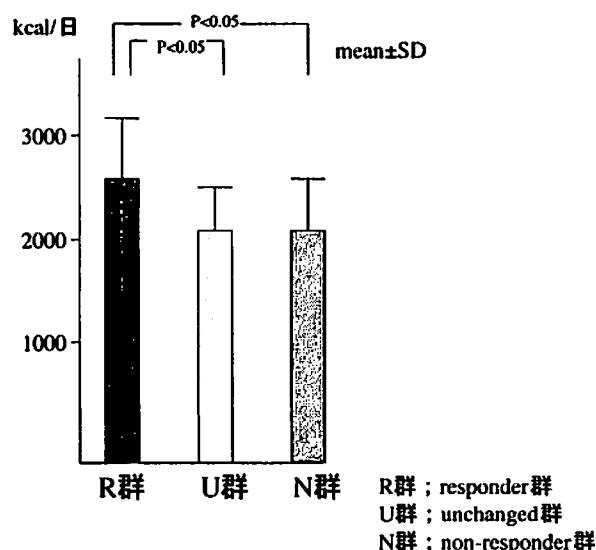
しても、日常身体活動量の差から walking や jogging などの中等度以上の運動習慣を1日平均2時間以上行っている日常身体活動高度群 (H 群)、1時間以上2時間未満の運動習慣のある日常身体活動中等度群 (M 群)、1時間未満の日常身体活動軽度群 (L 群) の3群に分類し、これら3群間の検査施行前6ヵ月間の%BMDについても比較検討を行った。この時の検定方法としては Kruskal-Wallis test を用い、有意水準5%をもって有意な差とみなした。

研究成績

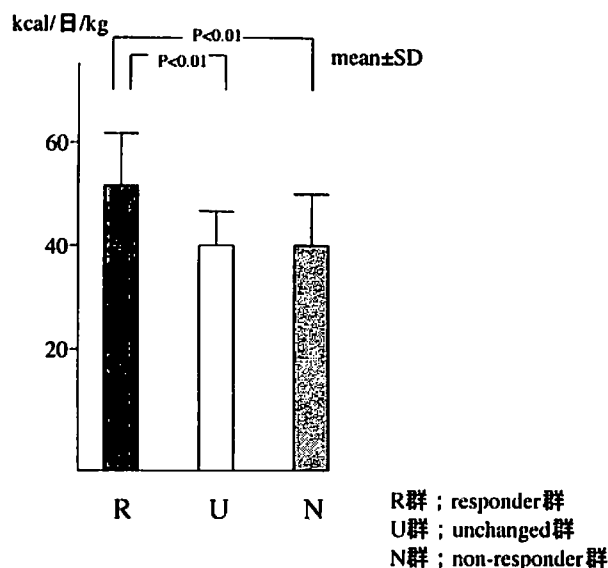
(1)HRT 施行時の日常身体活動量が骨密度に及ぼす影響

図1-1に示すように、responder (R) 群における日常身体活動量すなわち1日あたりの消費エネルギーは、2598.5±612.9kcal/日であり、unchanged (U) 群の2061.2±447.1kcal/日および non-responder (N) 群の2060.3±540.0kcal/日に比し、有意に (p<0.05) 高値を示した。

これは体重補正を行った R 群の消費エネルギー 53.5±9.2kcal/日/kg においても同様で、U 群の 40.9±6.5kcal/日/kg および N 群の 41.9±8.8kcal/日/kg に比し、有意に (p<0.05) 高値を示した (図1-2)。



第1-1図 日常身体活動量の評価。responder 群 (R 群) における1日あたりの消費エネルギーは、unchanged 群 (U 群) および non-responder 群 (N 群) に比し、有意に (p<0.05) 高値を示した。



第1-2図 日常身体活動量の評価 (体重補正後)。体重補正を行った消費エネルギーにおいても同様に、R 群は U 群および N 群に比し、有意に (p<0.05) 高値を示した。

(2)日常身体活動量の差異が HRT による骨密度の変化率に及ぼす影響

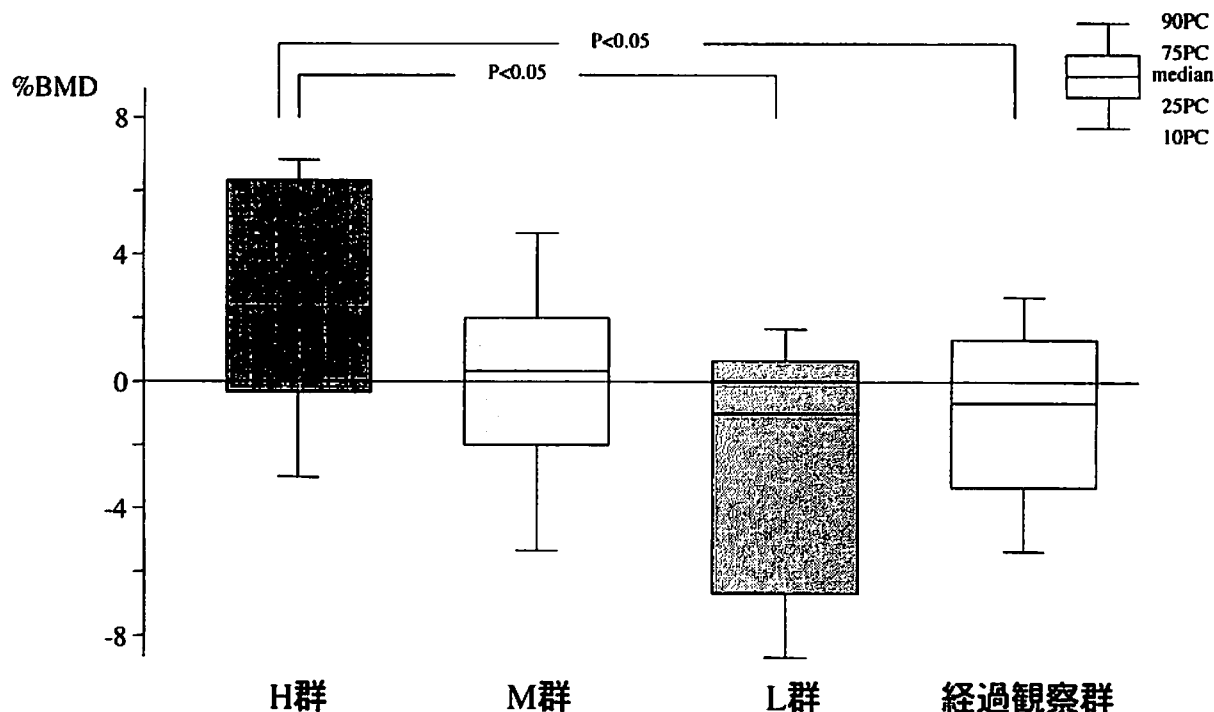
図2に示すように、HRT 群の中で日常身体活動が高度であった HRT-H 群 (中央値: 2.22%) は、HRT 群の中で日常身体活動が軽度な HRT-L 群 (中央値: -1.13%) や経過観察群全体 (中央値: -0.87%) に比し、6ヵ月間における L2-4BMD 変化率は有意に (p<0.05) 高値を示した。

(3)日常身体活動量の差異が経過観察例における骨密度の変化率に及ぼす影響

図3に示すように、経過観察群の中で日常身体活動が高度であった H 群 (平均値: 0±3.7%)、日常身体活動が中等度であった M 群 (平均値: -1.9±3.3%)、日常身体活動が軽度な L 群 (平均値: -0.5±3.8%) の3群間においては、L2-4BMD 変化率に有意な差を認めなかった。

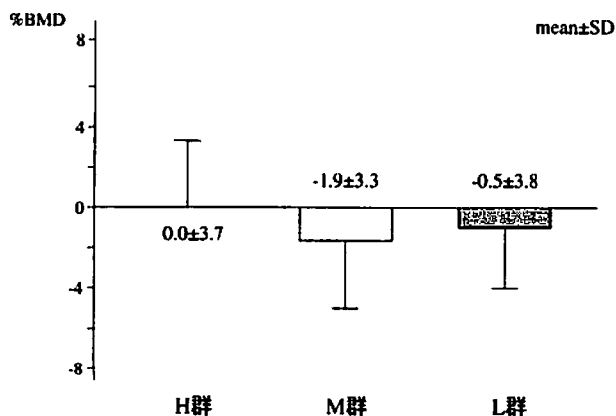
(4)骨密度変化率と BMI および体脂肪率との関連

表2には HRT 群における R 群、U 群、N 群の3群における体格指標および水中体重秤量法により測定した体脂肪率を示す。身長、体重を含めて体格の指標となる Body Mass Index (BMI) および体脂肪率いずれにおいても3群間に有意な差は認められず、HRT 施行全症例の平均値は、BMI が 20.8±2.63、体脂肪率が 31.4±7.0% (mean±SD) であった。



H群；日常身体活動高度群，M群；日常身体活動中等度群，L群；日常身体活動軽度群

第2図 日常身体活動量と6カ月間のBMD変化率。日常身体活動が高度であったHRT-H群は、日常身体活動が軽度なHRT-L群や経過観察群全体に比し、6カ月間におけるL2-4BMD変化率は有意に(p<0.05)高値を示した。



H群；日常身体活動高度群，M群；日常身体活動中等度群，L群；日常身体活動軽度群

第3図 経過観察群の日常身体活動量別BMD変化率。経過観察群においては日常身体活動の差異により、6カ月間におけるL2-4BMD変化率に有意差を認めなかった。

第2表 HRT群の背景
HRT群の背景。今回の研究対象としたHRTを施行した3群では、身長、体重、BMI、体脂肪率に有意差を認めなかった。

n=39	mean±SD		
	R群 n=10	U群 n=17	N群 n=12
身長(cm)	153.3±5.3	156.6±4.7	153.9±5.4
体重(kg)	48.1±5.1	51.4±8.1	48.6±4.7
BMI	20.2±1.6	21.0±3.6	20.9±1.3
体脂肪率(%)	31.0±7.9	31.2±7.8	32.3±5.1

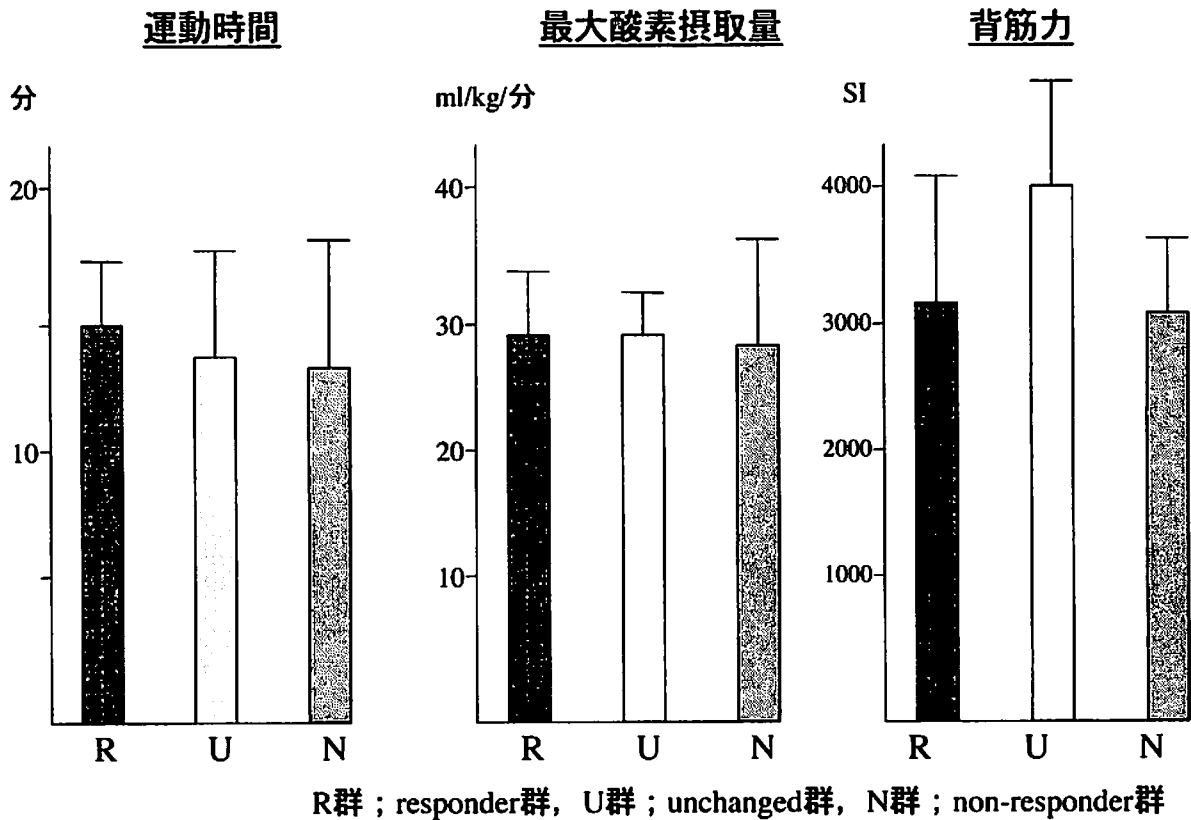
R群；responder群，U群；unchanged群，N群；non-responder群

第3表 HRT 群の1日あたりの各種栄養摂取量

HRT 群の1日あたりの各種栄養摂取量。任意の3日間の食事調査から得られたエネルギー摂取量およびカルシウム、ビタミンDなどの栄養摂取量については、3群間に有意差を認めなかった。

	mean ± SD		
n=39	R 群 n=10	U 群 n=17	N 群 N=12
エネルギー (kcal)	1941.7 ± 338.6	2034.1 ± 367.1	1936.8 ± 121.5
蛋白 (g)	75.0 ± 19.2	80.8 ± 16.9	73.7 ± 9.9
リン (mg)	1090.2 ± 231.5	1151.5 ± 254.5	1080.8 ± 195.1
カルシウム (mg)	645.9 ± 133.9	668.8 ± 162.7	628.9 ± 216.9
ビタミンD (IU)	180.0 ± 129.7	417.0 ± 312.4	289.2 ± 221.2

R 群； responder 群, U 群； unchanged 群, N 群； non-responder 群



第4図 体力の評価。体力に関する評価項目である、走行時間、最大酸素摂取量、背筋力ともにHRTを施行した3群間に有意差を認めなかった。

(5)骨密度変化率と1日あたりの各種栄養摂取量との関連
表3には、任意の3日間の食事調査から得られたHRT群における1日あたりのエネルギーおよび各種栄養摂取量を示すが、エネルギー摂取量および蛋白、リン、カルシウム、ビタミンDなどの栄養摂取量についても、3群間に有意差を認めなかった。

(6)HRT施行時の骨密度変化に及ぼす体力の影響

図4にHRTを施行した3群の体力に関する調査結果を示すが、運動時間、最大酸素摂取量、背筋力ともに3群間で有意差は認められなかった。

考 察

一般的に骨粗鬆症の一次予防や非薬物療法の代表として、カルシウム、ビタミンD、ビタミンKなどを多く含む食事の摂取を主体とした食事療法とwalkingからスポーツジム等における有酸素運動を主体とした運動療法が挙げられている。これまでも運動療法と薬物療法の骨密度増加効果の比較や薬物療法に運動療法を併用した場合の骨密度に対する効果などについていくつかの報告がなされている。

Iwamotoら²²⁾は、屋外での歩行運動や屋内トレーニングとともに乳酸カルシウム2.0g/日とビタミンD3 1.0μg/日の内服が、閉経後骨粗鬆症患者の腰椎骨密度増加に役立つとし、Oweckiら²³⁾は1日500mg以上のカルシウム摂取と1日45分以上の運動を行うことでHRTなどの薬物療法を単独で施行するよりも有意な骨密度増加を来したと報告している。またPrinceら²⁴⁾は、walkingなどの有酸素運動を施行した運動群、運動にカルシウム(1g/日)を投与した群、運動とエストロゲンを投与した群の3群で骨密度に及ぼす効果についてコントロール群との間で比較検討を行い、運動群では前腕骨密度に有意な増加は認められなかったが、エストロゲンを加えることにより骨密度の有意な増加を認めたと報告し、Kohrtら²⁵⁾は、walkingやjoggingなどの有酸素運動を施行する運動群、HRT群、運動とHRTの併用群の3群とコントロール群での比較検討の結果から、運動およびHRTはそれぞれ単独でもそれ相応の効果はあるが、HRTに運動療法を併用すると全身骨および腰椎骨のいずれにおいても有意(p<0.01)に骨密度が増加したとしている。

このように多くの報告が、運動療法とカルシウム、ビタミンD、HRTなどの併用が単独療法よりも効果が高いとしている一方で、Heikkinenら²⁶⁾は、HRT群とプラセボ群および各群に運動負荷をかけた運動群と非運動

群の4群での比較検討から、プラセボ群では運動による骨密度増加効果を認めたが、HRT群では腰椎骨密度に関しての運動の効果は認められなかったとし、Hagbergら²⁷⁾も、HRTは体全体の骨密度増加には貢献するが、腰椎骨密度や大腿骨密度の増加に最も貢献するのは軽度から中等度の運動を毎日続けることであると報告している。

以上のことから、薬物療法に運動療法を組み合わせた方が必ずしも骨密度増加効果が高いとまでは言えない状況と考えられる。その理由として、身体活動を構成する因子には、いわゆるスポーツとしてとらえられる運動のみならず、日常生活の中での様々な身体活動も含まれており、あくまで運動自体が1日の中で占める割合が必ずしも多くはないことが挙げられる。むしろ毎日の日常生活の中でトータルとしての身体活動量を高めることが、骨密度へどのような影響を及ぼしているかを検討する方がより実用であると考えられる。これまでも日常身体活動量という概念は、主に心血管系疾患や呼吸器疾患の予防および治療上重要視^{28), 29)}されてきた経緯があり、これを骨代謝に対する日常身体活動の影響について日常身体活動量と前腕骨骨密度^{24), 30)}ないし日常身体活動量と腰椎骨密度³¹⁾との相関をみた報告は散見されるが、骨粗鬆症に対する薬物療法施行例における日常身体活動量の差異について検討した報告は皆無である。

そこで本研究では、HRTを施行している中高年女性を主な対象としてHRTによる骨密度変化率に対する日常身体活動の影響について検討を加えた。その結果、HRTに対するBMD変化率から群分けしたR群、U群、N群の3群間で、R群はU群およびN群と比較して、日常身体活動量が有意に(p<0.05)高値であり、さらにはwalkingやjoggingなど中等度以上の運動習慣を1日平均2時間以上行っている日常身体活動高度群が、運動習慣が1時間未満の日常身体活動軽度群や経過観察群全体と比べて有意に(p<0.05)BMD変化率が高値であったことから、HRT施行時の骨密度に影響を及ぼす生活習慣としてトータルの日常身体活動量が重要である可能性が示された。しかし経過観察群においては、日常身体活動量の差異による骨密度変化に有意差を認めなかったことから、骨密度を有意に増加させるためには薬物治療を行わない状態で日常身体活動を高めるよりも薬物療法との併用が望ましいものと考えられた。

一方でHRTを施行したR群、U群、N群の3群間で各症例が有しているかあるいは獲得している運動耐容能、有酸素能、筋力といった体力因子には有意差を認めなかったことから、体力はHRT施行時の骨密度増加に

対して直接的に影響を及ぼす因子ではない可能性が考えられるが、各群の対象者の数を考慮すればこの点に関してはさらに症例数を増やして検討する必要があると思われる。

したがって今回の検討結果から、HRTのみならず骨粗鬆症の薬物療法を最も効果的に遂行させるためには、中等度以上の身体活動量を維持していくこと、すなわち日常生活の中で1日少なくとも2時間以上の運動習慣を持続させることを奨励することは重要な要素であるものと考えられた。今後このような検討をHRTのみならず、ビスフォスフォネート製剤など他の薬物療法に対しても検討していくことで、これまで1剤の薬物治療で有効な成績が得られない場合には薬物の変更ないし併用療法のみが議論されてきた骨粗鬆症治療のあり方を再考する一助となることが期待される。

総 括

骨粗鬆症の薬物療法施行時の日常身体活動がその骨密度に及ぼす効果を検討することを目的として、慶應義塾大学病院産婦人科外来に併設されている更年期専門外来にてホルモン補充療法施行中の中高年女性39例と薬物治療を希望せず骨密度測定のみを経過観察を行った22例を対象とし、日常身体活動量（1日あたりの平均消費エネルギーに換算）および体力（運動耐容能、有酸素能、筋力）の評価を行い、以下の事実を明らかにした。

1. 日常身体活動量は、HRTを施行し6カ月間で2%以上の骨密度増加を認めたresponder群が、±2%以内の変動であったunchanged群および2%以上骨密度が減少したnon-responder群に比し、有意に($p < 0.05$)高値を示した。

2. HRT群の中でwalkingやjoggingなど中等度以上の運動習慣を1日平均2時間以上行っている日常身体活動高度群は、運動習慣が1時間未満の日常身体活動軽度群や経過観察群に比し、有意に($p < 0.05$)骨密度変化率が高値であった。しかし経過観察群では日常身体活動の差異は骨密度に何ら影響を及ぼさなかった。

3. 体力に関する評価項目である走行時間、最大酸素摂取量、背筋力のいずれもがHRTによる骨密度増加効果に影響を及ぼさなかった。

以上の結果により、骨粗鬆症の薬物療法を最も効果的に遂行させるためには、中等度以上の身体活動を維持していくことが重要であることを明らかにした。したがって、本研究結果が今後の閉経後骨粗鬆症の併用療法を考える上で重要な示唆を与えるものと思われる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深甚の謝辞をささげます。また、本研究に際しご協力いただいた慶應義塾大学医学部スポーツ医学研究センター山崎元教授、貴重なご助言をいただいた慶應義塾大学医学部産婦人科学教室牧田和也助手に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Writing Group for Women's Health Initiative Investigators : Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results from the Women's Health Initiative randomized trial. JAMA 288 : 321-333, 2002
- 2) Million Women Study Collaborators : Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. Lancet 362 : 419-427, 2003
- 3) The Fracture Intervention Trial Research Group : Randomized trial of effect of alendronate on risk of fracture in women existing vertebral fracture. Lancet 348 : 1535-1541, 1996
- 4) The Fracture Intervention Trial Research Group : Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fracture. JAMA 280 : 2077-2082, 1998
- 5) The Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group : Effects of isedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis. JAMA 282 : 1344-1352, 1999
- 6) The Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group : Randomized trial of the effect of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Osteoporosis Int 11 : 83-91, 2000
- 7) 太田博明：本邦婦人におけるホルモン補充療法の骨代謝上のgood responderは？日骨代謝誌, 13 : 85, 1995
- 8) Kobayashi S, Inoue S, Hoshino T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H : Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. J Bone Miner Res 11 : 306-311, 1996
- 9) 太田博明, 高松 潔, 杉本 到, 冬城高久：骨代謝に対するエストロゲンの作用に関する研究—造血系単核細胞におけるエストロゲンレセプターの発現とそのvariantの解析—。小野スポーツ科学 4 : 37-49, 1996
- 10) Sinaki M, Wahner HW, Offord KP, and Hodgson SF : Efficacy of nonloading exercises in prevention of vertebral bone loss in postmenopausal women : a controlled trial. Mayo Clin Proc 64 : 762-769, 1989
- 11) Nelson ME, Fiatarone MA, Morgani CM, Trice I,

- Greenberg RA, and Evans WJ : Effect of high-intensity strength training on multiple risk factors for osteoporotic fractures. A randomized controlled trial. *JAMA* 272 : 1909-1914, 1994
- 12) Preisinger E, Alcamlioglu Y, Pils K, Saradeth T, and Schneider B : Therapeutic exercise in the prevention of bone loss. A controlled trial with women after menopause. *Am J Phys Med Rehabil* 74 : 120-123, 1995
- 13) Bassey EJ and Ramsdale SJ : Weight-bearing exercise and ground reaction forces : a 12-months randomized controlled trial of effects on bone mineral density in healthy postmenopausal women. *Bone* 16 : 469-476, 1995
- 14) Kerr D, Morton A, Dick I, and Prince R : Exercise effects on bone mass in postmenopausal women are site-specific and load-dependent. *J Bone Miner Res* 11 : 218-225, 1996
- 15) Cavanaugh DJ and Cann CE : Brisk walking does not stop bone loss in postmenopausal women. *Bone* 9 : 201-204, 1998
- 16) Yamazaki S, Ichimura S, Iwamoto J, Takeda T, and Toyama Y : Effect of walking exercise on bone metabolism in postmenopausal women with osteopenia/osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 22 : 500-508, 2004
- 17) 折茂 肇, 杉浦洋一, 福永仁夫 : 原発性骨粗鬆症の診断基準 (1996年改訂版). *日骨代謝誌* 14 : 219-233, 1997
- 18) Ainsworth BA, Haskell WL, Leon AS, Jacobs DR, Montoye HJ, Sallis JF, Paffenbarger RS : Compendium of physical activities : classification of energy costs of human physical Activities. *Med Sci Sports Exerc* 25 : 71-80, 1993
- 19) Kin K, Kushida K, Yamazaki K, Okamoto S, Inoue T : Bone mineral density of the spine in normal Japanese subjects using dual-energy X-ray absorptiometry : effect of obesity and menopausal status. *Calcif Tissue Int* 49 : 101-106, 1991
- 20) 牧田和也, 太田博明, 小川真里子, 柳本茂久, 弟子丸亮太, 岡本雅嗣, 春日美智子, 冬城高久, 小武海成之, 高松 潔, 堀口 文, 野沢志朗 : 5年間ホルモン補充療法を施行し得た症例における骨量に対する効果について. *日骨代謝誌* 17 : 107-109, 2000
- 21) 辻 秀一, 勝川史憲, 大西洋平, 山崎 元 : 若年アスリーの腰椎骨塩量と背筋力—新しい背筋力測定器 MedX を用いて—. *臨床スポーツ医学* 10 : 707-711, 1993
- 22) Iwamoto J, Takeda T, Otani T and Yabe Y : Effect of increased physical activity on bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women. *Keio J Med* 47 : 157-161, 1998
- 23) Owecki M, Horst-Sikorska W, Baszko-Blaszyk D, Sowinski J : Influence of diet and physical activity on the course and therapy of. *Pol Merkuriusz Lek* 13 : 473-476, 2002.
- 24) Prince RL, Smith M, Dick IM, Prince RI, Webb PG, Henderson NK, and Harris MM : Prevention of postmenopausal osteoporosis. A comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone replacement therapy. *N Engl J Med* 325 : 1189-1195, 1991
- 25) Kohrt WM, Snead DB, Slatopolsky E, and Birge SJ Jr. Additive effects of weight-bearing exercise and estrogen on bone mineral density in older women. *J Bone Miner Res* 10 : 1303-1311, 1995
- 26) Heikkinen J, Kyllonen E, Kurttila-Matero E, Wilen-Rosenqvist G, Lankinen KS, Rita H, and Kalervo Vaananen H : HRT and exercise : effects on bone density, muscle strength and lipid metabolism. A placebo controlled 2-year progestin regimens in healthy postmenopausal women. *Maturitas* 26 : 139-149, 1997
- 27) Hagberg JM, Zumuda JM, McCole SD, Rodgers KS, Ferrell RE, Wilund KR, Moore GE : Moderate physical activity is associated with higher bone mineral density in postmenopausal. *J Am Geriatr Soc* 49 : 1411-1417, 2001
- 28) Lawrence HK, Rebecca MF, Aaron RF, Pamela JM, Kristin EA, and Thomas AS : Physical activity and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 277 : 1287-1292, 1997
- 29) Leon AS, Connett J, Jacobs DR Jr., and Rauramaa R. Leisure-time physical activity levels and risk of coronary heart disease and death : the multiple risk factor intervention trial. *J Am Med Assoc* 258 : 2388-2395, 1987
- 30) Augestad LB, Schei B, Fosmo S, Laughhammer A, Flanders WD : The association between physical activity and forearm bone mineral density in healthy premenopausal women. *J Womens Health* 13 : 301-313, 2004
- 31) Sinaki M, and Kenneth P : Physical activity in postmenopausal women : Effect on back muscle strength and bone mineral density of the spine : *Arch Phys Med Rehabil* 69 : 277-280, 1988

小児のリハビリテーションにおける 運動制御理論の応用

小児の(リ)ハビリテーションにおける目標の一つは、日常の機能的課題を遂行する能力の獲得にある。遂行能力の獲得を目的とした治療的介入では、運動発達と運動制御 (motor control) に関する理論が応用される¹⁾。

乳幼児の姿勢・運動発達における中枢神経系の役割は、伝統的に反射階層モデル (reflex-hierarchical model) によって説明されてきた。このモデルでは、乳児期の運動発達をもつばら階層的に進む中枢神経系の成熟に基づくものであると考える。上位中枢の成熟によって下位中枢レベルの反射が抑制ないしは修飾されて、新たな運動パターンが発現する。言うまでもなく、反射階層モデルはこれまで脳性麻痺児に盛んに用いられてきた神経発達の治療 (Neurodevelopmental treatment: NDT) の理論的基盤を形成してきた。しかしながら、神経系の成熟と反射に注目した理論だけでは、個々の運動発達における多様性や、変化する環境に適応する運動行動の性質を十分に説明できないと批判的になっている。

近年、“システム理論 (systems approach)” と呼ばれる新たな運動制御モデルが提唱されている。システム理論を最初に提案した Bernstein は、身体を重力や内力 (慣性力や運動依存性の力) が作用する質量をもった機械的システムとみなし、運動に対して神経系だけではなく、筋骨格系とそれ自体がもつ力学的特性の影響も考慮に入れたモデルを提唱した。今日、このモデルでは個体と運動課題、課題が遂行される環境との相互作用が強調され、運動は特定の課題と環境に対して神経系、筋骨格系、感覚系、認知系などの複数のシステムが流動的かつ協調的に作用した結果であるとされている。したがって、発達における新たな運動技能の獲得には、神経系・筋骨格系などの要素がその発現に必要なレベルまで成熟していることが必要であると考えられる。

現在、脳性麻痺児の治療においても、システム理論を臨床応用した新たな治療モデルが模索されている。“機能的アプローチ” と呼ばれる治療モデル²⁾では、機能性に焦点を当てた評価・介入と、機能的活動において環境と課題がもつ役割を重視している。新しい課題を解決するための運動の探索と選択、そして環境の変化に対する適応は、運動学習においてきわめて重要な部分であるとされる。それゆえにこのモデルでは、運動学習を受動的な視点ではなく、能動的な視点から捉えることが強調さ

れている。欧米では既にこのような治療アプローチの有効性についても報告されているが、今後わが国においても、課題の選択とそれを遂行する環境の設定に配慮した機能改善プログラムの確立が不可欠であろうと考える。

文 献

- 1) Shumway-Cook A, Woollacott MH. Motor Control: Theory and Practical Applications. Williams & Wilkins, Baltimore, 1995
- 2) Ketelaar M, Vermeer A, Hart H, et al. Effects of a functional therapy program on motor abilities of children with cerebral palsy. Phys Ther 2001; 81: 1534-1545

問川博之 (リハビリテーション医学教室)

東京歯科大学市川総合病院 心臓病センター開設への道のり

東京歯科大学市川総合病院 (以下市川総合病院) は千葉県市川市の救急拠点病院の一つであると共に急性疾患のみならずあらゆる疾患に対する地域の中核病院で、病床数 570 床を有する。その中で循環器科は平成 9 年それまで内科の一部門であったものが分離独立して開設された。以後順調に実績を積み、平成 11 年に私が赴任した。私はそれまで冠動脈疾患を中心に臨床に携わってきたこともあり、市川総合病院に赴任して先ず始めたことが冠動脈疾患に対するカテーテル治療 (PCI) であった。当時人口 45 万人を抱える市川市内に PCI を行っている病院は皆無であり、地域の中核病院として PCI は必要不可欠な医療技術と考えた。

PCI を市川総合病院で施行するために、自ら千葉県庁に赴き保健課に掛け合い施設認定を申請した。その際 PCI を施行する病院には原則として心臓血管外科が併設されていることが求められたが、慶應義塾大学病院心臓血管外科との密接な連携があることを前提に施設認定された。この時私は循環器系外科部門の必要性を実感させられたが、新たに心臓血管外科を開設することなど到底不可能なことと思えた。その後 PCI を実際に行うようになり、間もなく CCU を改築した。患者観察を一目で行えるようにカウンターを設置しセントラルモニターを置いたが、面積は狭く CCU としては未だ未だ不備なものであった。

急性心筋梗塞の発生は人口 10 万対約 100 と推察され、人口 45 万人の市川市内では年間 450 人程の急性心筋梗

塞が発症することになる。狭心症、不整脈、および心不全などを含めると市川市には臨床を行うにあたり十分な素地があると考えられたが、周辺の医療機関の状態は勿論、その時点での市川総合病院自体の診療規模も確認しなければその後の具体的目標が立てられなかった。そのため私は次に市川市消防本部を訪れた。消防本部は突然の私の訪問をいたく歓迎してくれ、市川市内で発生する救急出動件数、その中で循環器系疾患の占める割合、それに市川総合病院への搬送数など、年度毎に表にまとめて頂けた。本部長を交えた会談の中で、市川総合病院の救急医療への参加が強く求められた。すなわち私が赴任した前年の平成10年市川市救急搬送件数約15000件のうち、市川総合病院に搬送された患者数は1073名7%と非常に少なく、循環器系疾患に限ればわずか5%しか搬送されていなかった。しかもその状態が5年以上続いていた。これでは年間およそ20例の急性心筋梗塞しか診られない換算になる、と非常に危機感を覚えた。残る循環器症例はどこへ行っているのか調べてみると市川市外の大学病院や3次救急病院へ搬送されるものが多く、市内のPCIを行っていない施設に搬送されるものも少なくなかった。市川市で発生する救急患者のうち市川総合病院が占める割合を拡大し、極力市外への流出を減少させ、少なくとも20万人の人口の心臓病をカバーしたいと目標を掲げた。こうして市川総合病院の循環器科実績を向上させるために必然的に救急診療に力を注がなければならなかった。

平成13年、私は救急外来において独りで救急診療を始めた。この時慶應義塾大学大学院修了後1年間慶應義塾大学病院救急部に専修医として出向した経験が非常に役に立った。循環器疾患のみならず、呼吸器、消化器、脳神経、耳鼻科、眼科、泌尿器科疾患、および交通外傷等々、なんでも初期診断・処置を行い、救急トリアージを行った。循環器科の本業もあったため週1回のみ、しかも日中だけの開業であったが、細々と救急診療を続けながら問題点を洗い出し、漸次改善させていった。救急外来に救急隊とのホットラインを設置し搬送しやすい状態を作った。また翌年には救急外来にナースステーションを新設して診察ブースをステーションの回りを囲むように配置させ、セントラルモニターを設置して急変に迅速に対応できるように改築した。看護師に対しての勉強会、救急隊の講習会への参加なども繰り返し行い、徐々に市川総合病院への救急搬送件数は増加して行った。その後他科の医師で救急医療に協力して頂ける方々も次々に登場し、救急日と称する救急外来開業日も週1日から2日へ、更に3日へと増えた。平成16年には月曜から金曜まで平日は毎日開業することとなり、市川市内で発生し

た救急搬送の約25%をも占めるようになった。それに伴い当初の目的であった循環器科患者数の激増も見られた。外科的治療を要する重症例もしばしば経験するようになったが、心臓血管外科がないため慶應義塾大学病院へ転院搬送させることも多かった。そんな中、市川総合病院の新棟建設・100床増床の話が持ち上がった。私としては心臓血管外科開設を願い出て、心臓病センターを立ち上げ、循環器科実績を更に向上させる絶好の機会と思われた。

そしてこの度慶應義塾大学外科学教室の絶大なるご高配により、市川総合病院に心臓血管外科が開設されることとなった。平成17年4月新棟が竣工し、循環器科と心臓血管外科の協力のもと、新しいICU・CCUを備えた市川総合病院心臓病センターが開業した。市川市の循環器系拠点病院としての役割を確固たるものとすると同時に、市川市以外の市や東京都区にまで進出して行きたいと考えている。これまでの道りは決して平坦なものではなかったが、東京歯科大学の方々、市川総合病院の多くの先生、慶應義塾大学病院の諸先輩、看護師、事務部、市川市医師会、市川救急本部、それに救急隊員の方々など、数え切れないほどの人々のお蔭で達成されたことであり、感謝の念が絶えない。今後心臓病センターとして鋭意努力していくことが東京歯科大学の発展に結びつき、同時に慶應義塾の医学を上げていくこととなり、恩返しになると信じている。

何かをしようとするとき、まず先人の行ってきた足跡とその意志をよく理解し、自分自身の立場と時間経過の中での存在位置を客観的に分析することがこれからどのような方向に、どのように事を成せば良いか、自ずと答えを与えてくれる。このことは医師である私達にとって研究・臨床・教育のすべてに当てはまることと、若き後輩達に伝えたい。

大木 貴博 (69回・平成2年卒)

髪の毛の中の発がん性物質

私たちはさまざまな化学物質を、好む好まざるに係わりなく、毎日体内に取り込んでいます。それら取り込まれた物質は、多くの場合、代謝を受けて排泄される訳ですが、尿や汗などから排泄されるほか、爪や髪の毛を介しても排泄されます。髪の毛は比較的多量に採取できますので、髪の毛の中の化学物質を検出することによって、その人の体内にどのぐらいその化学物質が摂取されたかを知ることができます。

髪の毛をこのような目的で利用することについては、覚せい剤などの薬物中毒に関する研究によって多くのこ

とが調べられています。興味深いところでは、髪の毛の1センチメートルがきれいに1ヶ月の出来事を反映しているということもわかっています。つまり髪の毛の根元から何センチ目に薬物を検出したかでいつ薬物を摂取したかがわかってしまうという訳です。

がん疫学研究では、発がん要因を明らかにする、あるいは発がんを抑制するような要因を見いだすために、摂取した物質とがんの罹患との関連を調べます。多くの場合、質問票によって摂取した物質の量を評価する訳ですが、いくら質問票が進歩して詳細になってきたとはいえ、特定の物質についての正確な曝露評価には限界があります。私たちは肉や魚の焦げに含まれる発がん性物質のヘテロサイクリックアミンが大腸がんなどの原因になるのかどうかを疫学的に調べようと考えました。質問票に掲載されている肉や魚の種類について、まず実際に焼いてみてそれらに含まれるグラム当たりのヘテロサイクリックアミンを測定しました。次に、質問票に答えた人ごとに、例えばサンマの「摂取頻度×1回の摂取量×皮を食べるかどうか×焦げた部分を食べるかどうか」を計算し、それを掲載されている全ての肉と魚について計算し総和を出して、その人の日常の1日当たりのヘテロサイクリックアミン摂取量を推量しました。実際はもっと複雑な計算式なのですが、いかんせん勝手に考えた推定式ですので、それによって得られた値が正確かどうか、妥当性があるのかどうかを調べる必要があります。

そこで、髪の毛の中のヘテロサイクリックアミンを測定することにしました。ボランティアに1ヶ月の間隔で2回髪の毛をもらい、上記の質問票を書いてもらうとともに、髪の毛をもらった1ヶ月の間の毎日に肉と魚の摂取量、調理方法などを詳細に記録してもらいました。興味深いことに、同一の対象者から提供された1ヶ月間隔の2時点の毛髪中ヘテロサイクリックアミン量は良い相関を示しました。つまり、その人の日常的なヘテロサイクリックアミン曝露の指標になりそうだということがわかりました。根元から髪の毛をもらう訳にはいきませんでしたので、理髪店などで普通に切ってもらった髪の毛をもらってきたのですが、そのような比較的ラフな採取方法でもうまくいくのだなと感心したものです。毛髪中のヘテロサイクリックアミン量は、食事記録による焼いた肉と魚の摂取量とも良い相関がありました。

そこで次に、質問票から推定式を使って算出したヘテロサイクリックアミン推定曝露量が妥当であるかどうかを調べるために、毛髪中ヘテロサイクリックアミンと推定曝露量を比較してみました。その結果、質問票からの推定曝露量と、毛髪中ヘテロサイクリックアミンは比較的良好な相関を示しました。これでこの質問票を使ったヘ

テロサイクリックアミン推定曝露量と大腸がんなどとの関連を調べる準備が出来ました。近い将来、その結果が発表できると思います。

これまでは髪の毛を意識することなどありませんでしたが、最近では街で人の髪の毛を見るたびに、おそらく多くの化学物質があの中に含まれているのだろうと思うようになりました。

花岡知之（国立がんセンターがん予防・
検診研究センター予防研究部）

¹³C-MRS によるサルの脳グルコース代謝

わたしたちは常に外界の刺激に対して反応したり、身の回りの出来事について思い悩んだり、無意識のうちに脳を働かせています。脳の働きとは何なのか、脳の機能を科学的に捕らえるにはどうすればよいのかと言うテーマで絶え間なく研究が繰り返されてきました。神経細胞が正常な活動を営むためには、正常な代謝が行われていなければなりません。いくら神経細胞を形態的に再生させることができて、神経細胞として機能しなければ何の意味もありません。その意味で神経細胞の代謝機能の解明も重要な研究テーマの一つです。

「脳のエネルギー源はグルコースのみである。」という定義は学生のころからの常識でした。しかし同時にグルコースの炭素鎖はTCA回路（tricarboxylic acid cycle）をへて神経伝達物質であるグルタミン酸、アスパラギン酸やGABA、さらにグルタミンへと組み込まれていくのです。神経細胞の活動をマイクロで捉えるとシナプスでの神経伝達物質のやり取りになります。興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の神経終末からの放出というシグナルが神経回路を駆け巡ることにより脳の活動がおこなわれるのです。したがって、脳の活動を代謝の面から考えるとき、神経伝達の中心的物質であるグルタミン酸の代謝を考えるということにつながってきます。これらの物質の代謝が脳の代謝ひいては脳の機能を反映していると言えます。

今回お話する¹³C-MRS (magnetic resonance spectroscopy) は、1位の炭素をほぼ100% ¹³Cで置換したグルコースを用いて、このグルコース—グルタミン酸—グルタミンの代謝を測定する方法なのです。MRSは1980年代初頭にCT (computed tomography) に変わる画像診断法として、臨床応用が急速に普及したMRI (magnetic resonance imaging) と原理は同じです。SPECT (single photon emission CT), PET (positron emission CT) は放射性同位元素が放出するエネルギーを脳循環代謝の計測に利用した手法ですが、MRSは安

定非放射性同位体元素の磁場内での信号変化を捉えることから、安全かつ非侵襲的手法であります。現在使われている生体計測に有用な核種は¹H, ³¹P, ¹⁹F, ¹³C があります。グルコース-グルタミン酸-グルタミン代謝をみるために使われるのは¹³Cです。¹Hや³¹Pが天然存在比100%であるのに対し¹³Cは1.1%と低いのが特徴です。このことは、天然存在の¹³Cではほとんど情報が得られないものの、ほぼ100%¹³Cで置換されたグルコースを利用することにより、その炭素をトレーサーとして利用できることを意味します。その反面、感度が低く微妙な変化の計測には難点があったのですが、技術的改良、高磁場の確保などの工夫により現在ではMRI検査同様に、¹³Cでラベルされたグルコースを静脈内注射あるいは経口投与し、ガントリーに入ることにより非侵襲的に測定が可能です。さらに¹³C-MRSは生体内の物質濃度を計測する¹Hあるいは³¹P-MRSと異なり、脳でのグルコース-グルタミン酸-グルタミンの代謝動態と速度を知ることができる方法なのです。

生体に投与された [^{1-¹³C}] グルコースは解糖系、TCA回路を経てピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、グルタミン酸へと代謝され、さらにグリア細胞においてグルタミンへと代謝されて行きますが、この過程でグルコースの1位にラベルされた¹³Cはグルタミン酸、グルタミンの4位へ移動します。さらにTCA回路を二巡することにより、それらのアミノ酸の2, 3位へ移動します。したがって [^{1-¹³C}] グルコースの投与によってグルタミン酸、グルタミンの2, 3, 4位のピークが検出されることとなります。

このMRSによってどのようなことがこれまでに解明されたのか、少しご紹介しましょう。神経科学の分野では、当然神経細胞がその主役です。脳の活動、脳の代謝などと言う時の「脳」という言葉は主に神経細胞をさします。つい最近まで脳を構成するもう一つの細胞群であるグリア細胞は神経細胞のようなactiveな活動はせず、神経を取り巻き、それらを支持し形態を保つ膠のような細胞であると思われてきました。神経伝達物質のやりとりにおいても受動的な働きしか果たしていないと考えられてきました。しかし近年シナプスでの神経活動においてグリア細胞が重要な働きをしている事が明らかになりました。神経終末から放出されるグルタミン酸は細胞外に多量に存在すると神経毒性を示します。シナプス近傍のグリア細胞はこの放出されたグルタミン酸を能動的に速やかに細胞内に取込み、グルタミン合成酵素により無毒のグルタミンに変換します。そしてグルタミンはグリア細胞から神経終末に移行し、そこでグルタミンナーゼによりグルタミン酸となり、神経伝達物質として再びブー

ルされます。このグルタミン酸-グルタミンサイクルの概念によりグリア細胞の働きに注目が集まるようになりました。実は細胞の数でいえばグリア細胞は神経細胞の10倍近くもあり、脳の体積の約二分の一を占めています。したがってこの細胞群の働きを無視できないのは当然のことなのです。さらにグルタミン合成酵素はグリア細胞にしか存在しないのです。したがって、高磁場¹³C-MRSを用いた計測では神経細胞の代謝はグルタミン酸プールの、グリア細胞の代謝はグルタミンプールの信号変化とてcompartmentalizeされたかたちで非侵襲的かつ経時的に見てゆく事ができます。グルタミン酸代謝はエネルギー代謝の重要な経路であるTCA回路ともリンクしており、グルコースの消費とグルタミン酸-グルタミンサイクルが物理量子的に1:1の対応をしていること、また、グルタミン酸-グルタミン代謝に関連してグリア細胞でもoxygen metabolismによりATPが産生されている可能性なども近年示唆されています。さらに、グリア細胞のグルタミン酸のuptakeが盛んになると脳内グルコース代謝が刺激されることなどから脳のエネルギー代謝の観点からもグリア細胞が重要な役割をしている可能性も示唆されています。また、ラットの前足刺激による好氣的エネルギー代謝の活性化が脳の血流増加によるグルコースの供給を超えること、人後頭葉の視覚刺激で酸素消費の増加が脳血流の増加の半分程度でしかないことなど、グルコース代謝とエネルギー代謝のuncouplingといったdiscrepancyも新たにわかってきました。

現在、私がお邪魔している創価大学、生命科学研究所の金松教授の研究室では、2.0テスラのガントリーを有する¹³C-MRSによる実験が行われています。すでに、ラットを使ったex vivoの実験、サルを使ったin vivoの実験系において、高アンモニア血症の脳代謝（グルタミン酸-グルタミン代謝）に及ぼす影響を検討し、高アンモニア血症では障害されたTCA回路にかかわってグリア細胞内のanaplerotic pathwayを介してグルタミンが合成されている事が明らかとなりました。さらにパーキンソン病の治療法の一つである非痙攣性通電療法によってグリア細胞のグルタミン合成が抑制されている事もラットのex vivoでの計測によりあきらかとなっています。またボランティアによる人においても、¹³C-MRSによって非侵襲的に脳代謝の測定が可能であることが証明されています。現在、同研究室では傷害モデルとして、カニクイザルでバルーンカテーテルを用いた中大脳動脈閉塞モデルを開発し、脳虚血-再灌流時の脳代謝の変化の測定を行っています。このプロジェクトはまだ始まったばかりですが、虚血側で再灌流後もグルタミン酸代謝が傷

害されていること、非致死的な虚血負荷であれば再灌流後グルタミン酸代謝は徐々に健側レベルまで改善することなど、虚血モデルにおいても非侵襲的にグルタミン酸代謝の計測が可能であることが明らかになりました。今後はさらに実験モデルの確立と更なる高磁場の確保により、虚血負荷による脳のグルコース-グルタミン酸-グルタミン代謝の変化を経時的に部位別に計測することができればと考えています。サルという人に近い動物を使ったこれらの研究によって神経、グリア細胞の代謝に虚血時、どのような変化が起こっているかが垣間見られれば、脳梗塞の病態解明にもつながってゆくのではないのでしょうか。

文 献

- Watanabe H, Umeda M, Ishihara Y, Okamoto K, Oshio K, Kanamatsu T, Tsukada Y. Human brain glucose metabolism mapping using multislice 2D 1H-¹³C correlation HSQC spectroscopy. *Magn Reson Med* 43 : 525-533, 2000
- Kanamatsu T, Tsukada Y. Effect of ammonia on the anaplerotic pathway and amino acid metabolism in the brain : an ex vivo ¹³C NMR spectroscopic study of rats after administering [2-¹³C] glucose with or without ammonium acetate *Brain Res* 841 : 11-19, 1999
- Gruetter R. In vivo ¹³C NMR studies of compartmentalized cerebral carbohydrate metabolism *Neurochem Intern* 41 : 143-154, 2002
- Tsukada Y, Kanamatsu T, Watanabe H, Okamoto K. In vivo investigation of glutamate-glutamine metabolism in hyperammonemic monkey brain using ¹³C-magnetic resonance spectroscopy *Dev Neurosci* 20 : 427-433, 1998
- 金松知幸, 湯浅龍彦 電気刺激による脳内代謝の変化。- ¹³C-MR スペクトロスコピー法 (¹³C-MRS) による研究- *神経内科*, 51 : 405-412, 1999

清水 克悦 (国家公務員共済組合連合会
立川病院 脳神経外科)

伊豆にてリハビリ工学の研究生生活をおくって

筆者は、反復性肩関節脱臼の手術のために、慶應義塾大学病院に10日程入院したことがある。その際に主治医の先生が、当時同大学理工学部の学生であった筆者を整形外科教室の研究設備などに案内し、「操作できる者がいないため、お蔵入りになってしまう高価な機器もある。医療の発展には、エンジニアの力が必要である」と話して下さった。以来、医用工学に興味を持ち、大学院では、生体医工学を専攻した。その後、慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンター (KTRC) での8年間を含めて現在に至るまで、リハビリテーションに関わる研究を続けている。多忙な中、たった一人の学生患者

のために、時間を割いてくださった先生方に、今でも感謝している。

リハビリとは、障害を持つ方や事故・疾病で後遺症の残った方が、身体的・心理的・社会的に最大限にその能力を回復させるために行う訓練・療法や援助のことを指す。脳卒中からスポーツなどによる怪我まで多くの疾患や病態が含まれるため、リハビリに関係する診療科も多様であり、社会復帰を目的としていることから、治療だけにとどまらず、対象患者を取り巻く社会環境までも念頭におかなければならない。このような性質から、リハビリ医療には、リハビリや各診療科の医師をはじめ、理学療法士、作業療法士、言語療法士、義肢装具士、社会福祉士、看護師、などの多くのスタッフに関わり、チーム医療として、治療・研究がすすめられている。リハビリ場面において、患者に即した福祉機器の製作や、リハビリ方法や効果の工学的検討が必要になることがしばしばある。このような状況では、医学的な知識に加えて、電子工学、物理学、機械工学等の工学的な知識と経験なしには解決が困難な問題が多い。そこで、最近では、リハビリ施設にエンジニアが常駐するところも現れてきている。

リハビリ工学の関与する範囲は、福祉機器・福祉ロボット・治療機器・補装具や各患者に対応した特殊スイッチの開発、開発装置の臨床評価、動作解析、臨床研究のデータ解析、神経生理研究の測定手法・解析手法の開発などのほか、入院患者と家族がコミュニケーションをはかるためのネットワークの構築や、障害者が在宅復帰して自立して生活できるようにするための住宅設備の改修など、非常に多岐にわたる。筆者は、電気系学科出身であったので、主に、脳卒中患者を対象とした随意筋電制御型電気刺激装置の開発と、その装置の臨床評価、およびその効果の神経生理学的な検討を主な研究テーマとしてきたが、それに加え、上記のような実に多様な研究に参加する必要性に迫られた。専門外のことが多く、十分に対応しきれっていないのが現状であり、工学系の各専門分野の研究者の参加が望まれる。

リハビリのような境界領域の研究をしていると、自分の進めている学問が、どの領域に属するのか不明確になることがよくある。辞書で医学、工学、理学について調べてみると、医学とは、「生体の機構を調べ、生体の保健や疾病・傷害の診断・治療・予防などについての方法を研究する学問。大きく基礎医学・臨床医学・社会医学に分かれる。」と記述されている。一方、工学とは、「科学知識を応用して、大規模に物品を生産するための方法を研究する学問。広義には、ある物を作り出したり、ある事を実現させたりするための方法・システムなどを研

究する学問の総称。」さらに、理学とは、「物理学・化学・天文学などの総称、自然科学。」と掲載されていた。したがって、医学は、生体の機構を調べるという意味では、理学であり、疾病・障害の診断・治療・予防などについて方法を研究するという意味は、広義の意味での工学ということになるのではないかと、また、生体機能を調べるためには、工学を用いる必要があることと、得られた科学知識を利用して、最終的に治療方法の実用化を目指しているという意味で、医学は、工学の一部といえるのではないかと筆者は考える。少し余談になってしまったが、このように考えてみると、特許出願に医学関連が多いことや、学際領域のリハビリの研究が、医学のみならず、工学にまで及ぶのは、当然のことであると思われる。

筆者は論文のデータ取得のために夏季休暇中の1週間の予定で、KTRCに訪問したところ、結局、そのまま8年間リハ工学士として、常駐することになった。1週間で帰らなかった理由はいくつかあるが、自分で想像していた患者の症状が実際は全く異なり、開発し試そうとした装置が全く使い物にならなかったことが、大きな理由であった。この時、臨床に携わらずに研究を進めると、使い物にならない機器を開発し徒労に終わる危険性があることを痛感し、KTRCに常駐することを希望した。

KTRCは、川端康成や井上靖をはじめ、多くの文豪が、執筆に勤しんだ地でもある伊豆の中心に位置し、すぐ近くには、鮎つりで有名な狩野川が流れ、少し足をのばすと、駿河湾越しに絶景の富士を望むことができる。また、海の幸、山の幸にも恵まれ、周囲には、テニスコート、ゴルフ場、温泉、つり、ダイビング、ハイキングコースなどレジャー施設も多くある。筆者も、この地で、8年間じっくりと研究に打ち込むことができ、美しい自然を満喫しながら、学位論文を仕上げさせて頂いた。筆者にとっては、1時間半程で秋葉原にでることもでき、学術論文もオンラインで瞬時に入手できるので、研究生活を送るには、絶好の地であった。患者にとっても、リハビリに専念するには、適している地であると思われるが、最近では、都市部に新しい設計のリハビリ施設が建設され、古い設計で、建物の老朽化が否めないKTRCは、苦戦を強いられているようである。最近のリハビリ施設は、訓練室と病棟が同じフロアに一体化し、起床から就寝まで、生活そのものがリハビリとなるように工夫されていたり、ホスピタリティをホテル並みにしたりしているという。古い設計では、病棟から訓練室に患者の送迎に時間をとられ、実質的な訓練時間が短くなってしまいうという非効率が生じてしまう。また建物の老朽化は、患者の散歩コースにひび割れを作るなどして患者を危険に

さらしたり、入院患者にとっては精神的にもマイナスになる可能性がある。医療は、患者に対するサービスでもあるのだから、患者の精神的・身体的なことも考慮して、美しい自然を生かした効率的な設計の新しい施設が必要であると思われる。

KTRCは、リハビリ病院と謳っていないことから、大学は、病院と研究の両機能をもった機関として設置したと考えられる。都心からほどよい距離にあるこの伊豆の地は、患者にとっても、研究者にとっても、都会の喧騒から離れ、じっくりリハビリや、研究に打ち込むには、最適な場所と思われる。リハビリは、学際的医療であるから、きっと筆者のように自分の専門分野がリハビリに関連している方もいらっしゃると思われる。一定期間だけでも伊豆を訪れ、研究に専念してみるのも良いのではないのでしょうか。

村岡慶裕 (藤田保健衛生大学リハビリ学科)

嚥下障害と遺伝子異常

最近社会の高齢化が進むにつれ、基礎疾患にともなう嚥下障害の患者さんが多くなっている。嚥下は反射といわれているが、実際は嚥下反射の経路が直接障害されている症例は少ない。高齢者の多発性脳梗塞による仮性球麻痺が圧倒的に多い。耳鼻科医は、他科から嚥下障害の評価を依頼される機会がふえてきた。

そんな中で、たまたま多発性ラクナ梗塞による嚥下障害と内科で診断されていた患者さんを診察する機会があった。耳鼻科のカルテをみると、13年前にも嚥下障害の症状を訴えており、その後も4、5回同様の症状で耳鼻科を受診され、食道造影やMRIなどを施行し異常なしと診断されている。そのころには多発性ラクナは無かったはずだ。診察してわかったことは、仮性球麻痺でおこるような、嚥下反射の誘発が遅いことによる嚥下障害ではない。音声障害を伴う鼻咽腔閉鎖不全を認めた。一見、先天性の鼻咽腔閉鎖不全に似た様相であるが、患者さんによると50代くらいから徐々に進んできたという。神経筋疾患や変性疾患を疑ったが、重症筋無力症の様な日内変動もなければ、手足の筋力低下も無いようだ。不思議に思ったが、患者さんの風貌から、眼咽頭筋ジストロフィーを疑ってみた。この疾患は常染色体優性遺伝である。文献に載っているような出身地や家族歴などを患者さんに尋ねてみたが、まったくあてはまらなかった。

ただもしやと思い遺伝子検査をお願いしたところ、まだ疾患としては本邦で3例のみで確定されていないが、従来の眼咽頭筋ジストロフィーの亜型で、常染色体劣性遺伝の形式をとるホモである可能性があるとのことであっ

た。この遺伝子は、日本人の健常者 100 人に 1 人が保因者というデータがあり、それが事実だとすると、1 万人に 1 人の割合で、同様の患者さんが存在する計算になる。垂型の場合は、症状も軽く家族歴も明らかにならないため、今までは年齢によるものとされてきたようだ。今回遺伝子検査が可能になり、ようやく 13 年目にして嚥下障害の原因がわかった。

このことを考えると、昔、神経学的所見をとって診断した疾患が、今 MRI などの画像検査ですぐわかるようになったのと同じように、原因不明の疾患も遺伝子検査ですぐに診断がつくようになるかもしれない。先の遺伝子はヘテロであっても高齢になれば、嚥下障害を来しやすくなる可能性もあるようだ。常染色体劣性の遺伝子で、

比較的高齢になって発症する疾患がこれからたくさん解明される可能性がある。

結婚相談所なども、コンピューターで相性をあわせたカップルを引き合わせるのではなく、各種劣性遺伝子の疾患が発症しない組み合わせのカップルを紹介する、「あなたの遺伝子にぴったりの結婚を」などというシステムができるかもしれない。いったい人間は、遺伝子のレベルでは似たもの同士が惹かれ合うのか、違ったもの同士が惹かれ合うのか。いずれにしても本当は、嚥下障害の発症も遺伝子で決められているなんて、知りたくない事かもしれない。

相馬 啓子 (日本鋼管病院耳鼻咽喉科)

学会展望

第 28 回慶應外科フォーラム総会

日 時：2005 年 1 月 22 日（土）13：00～18：30

場 所：東京コンファレンスセンター

主 催：慶應外科フォーラム

事務局：慶應義塾大学医学部一般消化器外科内

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

13：00	開会の辞	会 長 北 島 政 樹
13：05～13：54	学術講演 (I) 1～7	座 長 正 村 滋
13：54～14：43	学術講演 (II) 8～14	座 長 山 本 貴 章
14：43～15：00	－休 憩－	
15：00～16：03	学術講演 (III) 15～23	座 長 捨 田 利 外 茂 夫
16：03～16：59	学術講演 (IV) 24～31	座 長 飯 尾 宏
16：49～17：10	－休 憩－	
17：10～18：10	特別講演 『難治性肝門部胆管癌の外科治療とその安全対策』 名古屋大学大学院医学系研究科 器官調節外科学 教 授 二 村 雄 次	司 会 北 島 政 樹
18：15～18：25	前田賞授与式	
18：25	閉会の辞	会 長 北 島 政 樹

1. 保存的治療にて軽快した Paget-Schroetter 症候群の一例

北里研究所病院外科

末廣有希子, 金田宗久, 首村智久
大作昌義, 浅沼史樹, 上里一雄
宮川 健, 山田好則

症例は 47 歳男性。気管支喘息, II 型糖尿病のため当院内科にてフォローアップされていた。2004 年 9 月 26 日, 体操をしている際, 上肢外転後に突然右上肢に疼痛, 腫脹が出現し, 当院来院した。上肢 MRvenography, 超音波検査にて, 右鎖骨下静脈の完全閉塞を認めたため, 臨床症状及び経過より原発性鎖骨下静脈血栓症 (Paget-Schroetter 症候群) と診断した。ウロキナーゼ, ヘパリンによる抗凝固及び血栓溶解療法にて症状は徐々に軽快し, その後の上肢 MRvenography にて右鎖骨下静脈の再開通を認め, 現在抗血小板剤内服にて外来経過観察中である。本症例では, 重度の気管支喘息を合併しており造影剤の使用にリスクを伴うため静脈造影を実施できず, また同様の理由でウロキナーゼのカテーテルによる局所投与も施行できず, 全身投与を施行した。予後は良好であるが, 今後症状再発の可能性は高く, 場合によっては, バイパス術や血管内ステント, 胸郭出口の減圧手術 (第 1 肋骨切除, 鎖骨切除) 等を考慮する必要がある。

2. 嚢状を呈した非特異的炎症性腹部大動脈瘤の 1 例

慶應義塾大学医学部外科

新谷恒弘, 松本賢治, 服部俊昭
松原健太郎, 和多田晋, 秋好沢林
井上史彦, 北島政樹

症例: 67 歳, 男性。腹痛, 腰痛のため近医受診。腹部 CT 検査にて腎下部大動脈に後方に突出する約 4 cm の嚢状動脈瘤を認め, また白血球値の上昇並びに CRP の高値を認めたため入院となった。入院後, 抗生剤の投与にて白血球, CRP 値が安定化した時点で当科へ紹介, 精査目的にて入院となった。術前の血液培養は陰性で, 細菌性心内膜炎の所見はなく, 非特異的炎症性動脈瘤を疑い手術となった。瘤と後方の周囲組織との癒着を認め, 剥離に難渋した。瘤を開放したところ感染の所見はなかったため, 術式は 14 mm ePTFE による直型人工血管置換術とし, 中樞側吻合部を大網にてラッピングした。術後経過は良好にて軽快退院した。

考察と結語: 非特異的炎症性腹部動脈瘤は 1972 年に Walker らによって初めて報告され, 通常の動脈硬化性の腹部大動脈瘤と比し壁の肥厚が著明で, CT 検査ではいわゆるマントルサインを呈するといわれている。本症例では壁の肥厚は認めなかったが, 腹部大動脈に非特異的に限局性の炎症を認め嚢状動脈瘤を形成しており, 非特異的炎症性動脈瘤の 1 亜型と考えられた。炎症性動脈瘤の術後には, 高率に吻合部動脈瘤が発生することが知られており, 長期的な画像検査での経過観察が重要と思われた。

3. ロール状メッシュプラグを用いて, 腹腔鏡下修復術を施行した閉鎖孔ヘルニアの 1 例

日本鋼管病院外科

渋谷慎太郎, 菅 重尚, 清水壮一
中村修三, 高橋 伸

症例は 58 歳, 女性。約 10 年前よりときどき認めていた, 右下腹部から大腿部にかけての疼痛が出現し, 改善しないため当院救急外来を受診した。腹部 CT 検査を施行したところ, 右閉鎖孔に小腸が嵌頓しており, 右閉鎖孔ヘルニアと診断した。診察中, 自然に嵌頓が解除されたため, 待機的に腹腔鏡下修復術を予定した。手術は, 腹腔鏡下にヘルニア嚢を切除した後, メッシュシートをロール状に巻いたプラグを作製し, 閉鎖孔に挿入し固定した。手術所見をビデオにて供覧する。

4. 若年性線維腺腫の 1 例

独立行政法人国立病院機構 浦医療センター外科

高橋洋子, 戸泉 篤, 壁島康郎
亀山哲章, 田村洋一郎, 影山隆久

目的: 若年性線維腺腫は 20 歳以下にみられる比較的稀な疾患である。今回我々は, 11 歳という若年者に対して乳輪切開で摘出することにより良好な経過をたどった 1 例を経験したので報告する。

対象・方法: 症例は 11 歳女児。平成 16 年 3 月頃より左乳房のしこりに気づき母に相談。腫瘤が増大傾向を示し心配になり, 平成 16 年 7 月母と当初初診した。受診時, 腫瘍径は 4 cm 大であった。術前検査により若年性線維腺腫と診断。悪性の可能性と本人・家族の希望により, 平成 16 年 7 月 21 日腫瘍核出術を施行した。美容的要素を考慮し, 皮切は乳輪切開とした。

結果・考察: 摘出標本を分割したところ, 腫瘍の中心は壊死に陥っており, 病理組織診断では, 葉状腫瘍か線維腺腫か判定困難なものであった。

良性乳腺腫瘍は経過観察でみる事が多く, 急速増大傾向を示し悪性が否定できない場合は手術が検討される。また, 良性乳腺腫瘍は若年女性が多いため手術には整容性も求められる。手術は, 腫瘍核出術が行われるが, 近年では内視鏡補助下乳腺腫瘍切除術が施行されている。当院では乳輪切開で核出術を施行しており, 十分な視野が得られ, 全摘出が可能であり, 整容性にも優れている。本症例も治療面・精神面で患者と家族の高い満足度が得られ, 推奨すべき手術法の一つと考える。

5. 突発性食道壁内血腫の 1 例

永寿総合病院外科

岡村 淳, 松井英男, 五十嵐直喜
小山恭正, 宮北 誠

突発性食道壁内血腫は, 嘔吐などが誘引となって食道の壁

内に比較的広範囲の血腫をきたすことにより、上腹痛、嚥下困難などの症状を呈するため、心筋梗塞、胸部大動脈瘤破裂のみならず突発性食道破裂 (Boerhaave's syndrome) などの疾患と鑑別を要するとされる。われわれは、保存的治療により軽快した突発性食道壁内血腫の1例を経験したので報告する。症例は、84歳男性、脳梗塞、心房細動の既往があり、アスピリン (100 mg/day) を内服していた。今回、頻回の嘔吐の後に突然の上腹痛、嚥下困難を自覚したため来院した。来院時の身体所見では、血圧 128/80 mmHg、体温 36.3 度、皮下気腫を認めず、上腹部に圧痛あるが、腹膜刺激症状は明らかではなかった。血液検査所見では、白血球増多は認めなかったが、CK が 652 IU/l と上昇していた。胸腹部 X 線写真ではとくに異常を認めず、心電図では心房細動を認めた。患者は消化性潰瘍の診断で、入院となった。翌日施行された上部消化管内視鏡検査では、25 cm 以降の食道後壁側約半周が膨隆し、暗赤色を呈していたが明らかな出血を認めなかった。直ちに内視鏡検査を中止し、胸部 CT 検査を施行したところ、中下部食道壁の肥厚と少量の左胸水の貯留を認めたが、縦隔気腫などの所見は認めなかった。以上より、食道壁内血腫と診断し、絶飲食、抗生剤、H₂ blocker、高カロリー輸液による保存的治療を開始した。軽度の白血球上昇を認めたが、発熱等なく、上腹痛も次第に軽快した。発症5日目の食道造影では食道の左側への圧排所見を認めた。2週目に施行した内視鏡検査では血腫は消失し、中下部食道粘膜は後壁を中心に軽度の敷石状変化を伴っていた。その後経口摂取を開始したがとくに問題なく経過し、入院後25日で軽快退院となった。突発性食道壁内血腫の治療は基本的には保存的であるが、治療中に死亡したとの報告もあることから、注意深い経過観察が必要と思われる。

6. 術前内分泌療法の見直し

慶應義塾大学医学部外科一般・消化器外科

菅家大介, 神野浩光, 嶋田俊之
高橋麻衣子, 和田真弘, 高山 伸
池田 正, 北島政樹

目的: 現在乳癌治療として術前化学療法が非常に有効とされている。しかし一方で強い副作用により定められたスケジュールを完遂できない症例も少なくない。また閉経後では他の疾患を既往に持つケースも多く、閉経前の症例よりも QOL を重視した治療が必要である。そこで今回閉経後乳癌に対する術前内分泌療法の有用性につき検討した。

対象および方法: 65歳以上、腫瘍径3cm以上かつER及びPgR陽性症例7例に対し術前内分泌療法としてアロマターゼ阻害薬 (アナストロゾールまたはエクセメスタン) を3ヶ月間投与し手術を施行、奏効率、副作用及び病理学的効果を検討した。

結果: 7例中5例でPR、2例でNC、奏効率は71.4%であった。組織学的効果はGrade 1aが1例、Grade 1bが1例、Grade 2が5例認められた。Grade 2以上の副作用は

認めなかった。

結論: 有効率と副作用の点から、術前内分泌療法は閉経後乳癌症例に対する有用な術前治療である可能性が示唆された。

7. Sentinel node を標的とした新しい微小転移制御法の開発

慶應義塾大学医学部外科

大山隆史, 北川雄光, 小澤壯治
才川義朗, 矢野和仁, 小熊潤也
須田康一, 田淵 悟, 安藤崇史
上田政和, 北島政樹

目的: 近年、消化器癌においても Sentinel node (SN) 理論の妥当性の検証が進み、将来的には SN 転移陰性例において広範囲リンパ節 (LN) 郭清の省略、切除範囲縮小等の低侵襲治療導入の可能性が期待されている。一方、臨床的 N0 症例では微小リンパ節転移は SN に限局している頻度が高いことも報告されている。しかしながら SN が広範囲に分布している食道癌等では SN 生検を低侵襲に施行することが困難である。そこで SN 理論を従来着目されなかった治療面において応用し、SN 流域を標的とした新しい微小転移制御法の開発を目的として動物実験モデルを用いた基礎的検討を行った。

方法: 細胞膜構造に類似した特殊なポリマーに難水溶性抗癌剤であるパクリタキセル (PTX) を内包し、ラット盲腸粘膜下層に局所注入した群 (SM 群) 及び尾静脈から静注した群 (IV 群) の2群間で SN を含む盲腸間膜 LN における PTX 濃度を経時的に比較した (n=3~5)。またラット盲腸間膜 SN 転移モデル (ラット腹水浮遊肝細胞癌 AH130 を盲腸粘膜下層に注入して作成) に対し PTX 内包ポリマーを腫瘍直下粘膜下層に投与し、1週間後の SN を含む流域 LN 重量を比較し、抗腫瘍効果を検討した (SM 群, IV 群, 非投与 Control 群 n=6)。また投与4週後における生存率を比較検討した。

結果: SM 群の SN 内 PTX 濃度は投与6時間後において IV 群の約9倍と有意に高値を示した (p<0.05)。さらに SM 群では投与24時間後においても SN 内 PTX 濃度は保持され、その濃度はヒト癌細胞株 A431 における IC50 を上回っていた。抗腫瘍効果の検討では SM 群では IV 群、Control 群より有意に SN およびその他の流域 LN 重量が低値を示した (p<0.05)。また投与4週後において SM 群では他群より有意に高い生存率を示した (p<0.05)。

考察: 難水溶性抗癌剤を高濃度内包可能な本ポリマーは局所注入群において SN への移行性・停滞性に優れており、経静脈的全身投与群に比して高い SN 集積性が観察された。さらに SN 及び同リンパ流域 LN における有意な腫瘍発育抑制効果が認められ、今後 SN を標的とした局所化学療法への応用が期待される。

座長まとめ—学術講演 (I) (1~7)

東京歯科大学市川総合病院外科 正村 滋

乳腺, 血管, 一般外科領域から7つの演題を担当した。

比較的まれな症例経験の報告4題のうち, 上肢深部静脈血栓症である Paget-Schoetter 症候群の1例(演題1)は, 血栓溶解剤による保存的治療が奏効したが, 重度の気管支喘息の合併例でもあり, 今後再発の際に造影剤使用を要するカテーテル処置が必要になった場合には, 高いリスクを伴うことになる厄介な症例であった。

その臓器を専門にしても一生を通して多くの症例を経験するわけではない非特異的炎症性腹部大動脈瘤(演題2), 若年性線維腺腫(演題4), 突発性食道壁内血腫(演題5)の症例報告においても適切な紹介がなされ informative であった。

待期的に手術できた閉鎖孔ヘルニア症例のヘルニア門閉鎖にロール状のメッシュシートを流用した方法(ビデオでの紹介; 演題3)は簡便で合目的であり, 別のセッションで紹介された水圧法による嵌頓整復とうまく組み合わせることが可能であれば, 非常に有用性の高い工夫と考えられた。乳癌の術前内分泌治療(演題6)は, まだ一般化していないが, 高齢者においては術式の縮小が, 局麻下での外来手術, 入院の省略等にもつながり社会的な期待度も大きいため症例を重ねての報告が期待される。消化管癌粘膜下層に paclitaxel 内包ポリマーを局所注入しての sentinel node を標的とした治療法では, 動物実験の系ではあるが, 通常の全身投与より生存率が高く, 場合によってはこれまでのパラダイムの刷新が期待される注目すべき内容であった。

8. 胃腺扁平上皮癌の2例

けいゆう病院外科

岡村 誉, 石川廣記, 遠藤安希子
久保田伊哉, 矢澤直樹, 関 博章
森 光生, 松本秀年, 嶋田昌彦

胃腺扁平上皮癌は比較的稀な組織型の癌である。また, 通常型の胃癌と比較して進行例が多く予後不良であるとの報告が多い。今回我々は胃腺扁平上皮癌を2例経験したので報告する。

症例1: 53歳男性 腹痛の精査にて胃癌(胃角部3型)と診断され, TS-1 100 mg CDDP10 mg を5日間3クール行った後, 2002年5月29日幽門側胃切除・肝部分切除術を施行された。病理組織学的所見は腺扁平上皮癌で肝浸潤, #4d, #7 リンパ節転移および腹膜転移を認めた。術後化学療法施行として TS-1 100 mg/day, →5-FU750 mg/day × 5日間 + CDDP75 mg × 1日間 → TXL310 mg 4クール施行されるも, 肝転移と癌性腹膜炎によって術後約6ヶ月にて死亡した。

症例2: 66歳男性 心窩部痛にて受診し, 噴門部前壁に

胃癌を指摘され2003年1月16日胃全摘術, 脾尾脾合併切除施行された。病理組織学的所見は腺扁平上皮癌で壁深達度はssで#1, #3 リンパ節転移を認めた。術後 TS-1 80 mg 内服しており2004年11月現在生存中である。

以上稀な胃腺扁平上皮癌を経験したので若干の文献的考察を加え報告する。

9. 腹腔鏡下胃局所切除後に多発性腹壁転移で再発した早期胃癌の1例

伊勢原協同病院外科

飯尾 宏, 篠田政幸, 中安邦夫
横山剛義, 西岡道人, 高橋祐介
別所 隆

早期胃癌に対する縮小手術が胃癌治療ガイドラインに示されている。このなかで腹腔鏡下胃局所切除術は T1 (SM) N0 Stage 1A に対する臨床研究的治療とされている。われわれは1996年10月に行った lesion lifting 法による腹腔鏡下胃局所切除例で, 術後4年5ヶ月後に多発性腹壁転移で再発し, 後に死亡した症例を経験した。患者は68歳の男性。胃体下部前壁の直径12 mm 大の陥凹型(IIc)で術前診断は低分化腺癌であり, 深達度診断はm癌であった。低分化・陥凹型であることから手術目的に外科に紹介された。幽門側胃切除とともに腹腔鏡下胃局所切除術の可能性を紹介された患者は後者を希望した。術後の病理診において sm1 でリンパ管侵襲陽性と判定されたため, 再手術を勧めたがこれを拒否された。術後は半年ごとに胃内視鏡検査を行い, 胃内再発は無かった。術後4年5ヶ月目に上腹部に小さな硬結が出現し, 左腹直筋層内に数個の小腫瘍を確認して転移を疑った。T-bar 刺入部での再発の可能性も考えられた。残胃に再発は認められず, 画像診断上胃の周囲にも再発所見はなかった。再手術で腹壁を部分切除し, 病理診で転移と確診した。2ヶ月後には多発性脊椎転移と鎖骨転移とが出現した。腹壁転移も再燃し, 癌性胸膜炎を併発して再発後9ヶ月で死亡した。剖検では残胃に再発病巣はなく, その周囲にもリンパ節転移は見られなかった。現在のガイドラインに沿えば縮小手術Bの対象である。当時, われわれは再手術を勧めたが, 患者は経過観察を希望された。剖検でも明瞭な再発の源は同定できなかった。未分化型胃癌の恐さを思い知らされた症例であるので若干の文献的考察を加えて報告する。

10. 特異な肉眼型を呈した胃 Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) の1例

済生会神奈川病院外科

金子剛士, 江川智久, 長島 敦
北野光秀, 土居正和, 林 忍
吉井 宏

症例は56歳, 女性。腹部腫瘤と肝機能障害を主訴に来院した。腹部エコー・CTで, 上腹部から骨盤にまで至る原発

不明の占拠病変で一部 cystic な部位を認めた。血管造影では、右胃大網動脈を feeder とする hypervascular な腫瘍であった。術前診断として腹膜中皮腫、腹膜偽粘液腫や、大網由来の肉腫あるいは、転移性腫瘍 (omental cake) などが考えられた。診断と治療をかねて、手術を施行した。術中所見で、腫瘍は腹膜には浸潤がなく、大網を巻き込むような形で存在した。また、脾臓と胆嚢に浸潤を認めた。腫瘍は、胃との連続性を認め、胃原発の腫瘍と術中診断した。腫瘍切除術・胃部分切除術・胆嚢切除術・脾臓摘出術を施行した。摘出標本の検討で、免疫組織化学染色で c-kit, vimentin, CD 34 は陽性で、胃原発の GIST と診断した。術後、8ヶ月が経過した現在のところ再発を認めない。今回、特異な肉眼型を呈した胃 GIST の1例を経験したので若干の文献的考察を加えて報告する。

11. 胃潰瘍の性差と *Helicobacter pylori* 感染 臨床と基礎
東京電力病院外科

栗原直人, 隈元雄介, 菊池 潔
露木 晃, 藤城保男

慶應義塾大学医学部外科

久保田哲朗, 吉田 昌, 才川義朗
大谷吉秀, 熊井浩一郎, 北島政樹

目的: 1999年から2003年までに東京電力病院における活動性胃潰瘍患者は253例(男性223例, 女性30例)に認められた。平均年齢は男性54.5±11.6歳, 女性62.3±11.6歳と男性が有意に若年であり(P<0.001, Welch's t-test)。50歳未満の患者数は男性76例に対して女性3例であった。このことから、潰瘍発症に性ホルモンの関与が推定される。今回、*Helicobacter pylori* (HP) 感染モデルにおけるエストロゲンの影響について検討した。

方法: 6-7週齢のスナネズミに卵巣摘出術(n=5)およびSham手術(n=5)を行い、術後7日および14日目にHP(ATCC43504)を経口感染させた。HP投与後13週目に子宮重量および胃病変について2群間で比較した。細胞増殖活性はMorphometryおよびBrdU labeling indexにより検討した。

結果: 卵巣摘出群はSham群と比較して有意に子宮の萎縮が認められた(19.8±1.4 VS 132±11.8, p<0.001)。両群ともHP感染率は80%であり、感染率に差は認められなかった。潰瘍や糜爛などの胃病変数の比較では卵巣摘出群はSham群より有意に多く(3.75 vs 9.5, p<0.05)。組織学的に高度のリンパ球浸潤を伴う炎症性変化が認められた。細胞増殖活性は卵巣摘出群で有意に高値を示した。

結語: エストロゲンはHP感染に伴う胃病変に対して防御因子として作用している可能性が示唆された。

12. TS-1 少量 CDDP 併用療法により PR を維持している多発肝転移を伴う初発胃癌の1例

足利赤十字病院外科

井澤菜緒子, 高橋孝行, 藤崎真人
平畑 忍, 前田 大, 亀井秀策
戸倉英之, 川嶋八也, 保坂靖子
安形俊久, 佐野真規

当科では進行・再発胃癌に対してTS-1少量CDDP併用療法を行い、良好な成績を得ている。今回本療法によりQOLの改善が得られ、肝転移巣、原発巣、転移リンパ節も著明に縮小し、約半年間PRを維持している多発肝転移を伴う初発胃癌症例を経験したので報告する。症例は74歳、男性。平成16年5月、食欲不振と歩行時のふらつきを主訴として当院内科を受診。上部消化管内視鏡検査にてM領域前壁に径5cm大の3型腫瘍を認め、生検はGroup V: adenocarcinomaのため当科紹介となった。腹部CT上、多発肝転移(最大腫瘍径10cm, 10個)を認めた。腫瘍マーカーはCEA: 716.9 (ng/ml), CA19-9: 57.2 (U/ml)で、ALP, LDHも異常高値を示した。5月25日よりTS-1 100mgの内服を開始し、4週間内服、2週間休薬を1クールとした。5月31日よりCDDP 10mgを週5日×1週、6月7日からは週3日隔日×1週で併用を開始し、その後はTS-1内服期間中に週1回外来投与とした。治療開始まもなく食欲が増し、ふらつきも消失した。2クール終了時、血小板数が87000/mm³に減少したため、TS-1を隔日連続投与とした。治療開始1か月後の腹部CTで胃壁肥厚は軽減し、肝転移巣は64%縮小し、胃小彎側、臍頭部周囲、肝門部リンパ節腫大も縮小した。その後も肝転移巣は縮小を続け、治療開始5か月後の腫瘍縮小率は91%であった。治療開始5ヶ月後の上部消化管内視鏡検査で原発巣は0-IIc様に縮小平坦化し、生検は全てGroup IIであった。腫瘍マーカーはCEA: 3.0, CA19-9: 9.2と正常値となり、他の検査データも正常化した。11月22日現在、外来通院中である。

13. 進行・再発胃癌に対する化学放射線療法の有効性
済生会中央病院外科

秋月玲子, 烏海史樹, 今津嘉宏
村山剛也, 越田佳明, 米山公康
戸枝弘之, 茂木克彦, 大山廉平

目的: 近年、手術による根治不能な進行・再発胃癌に対し様々な抗癌剤併用療法が試みられ、有効な治療手段の一つとして確立されつつある。当科では昨年より抗癌剤併用療法に放射線照射を加えた化学放射線療法を施行し、良好な成績を収めているため報告する。

対象: 臨床診断Stage IVあるいは手術不能例、術後再発例の9例を対象とした。年齢は60~68歳で、すべて男性であった。内訳としては、臨床診断Stage IVが7例、手術不能症例が1例(腹腔動脈周囲のリンパ節腫大)、術後再発例

が1例(吻合部再発, 肝転移, 左副腎転移)であった。臨床診断 StageIV の要因としては, 肝転移5例, 傍大動脈リンパ節腫大1例, 膵浸潤・リンパ節転移1例であった。

方法: 基本投与方法は TS-1 80 mg/m²を3週間投与, CDDP 5 mg/m²を5投2休で3週間投与, 放射線照射は2 Gy/日で合計40 Gyを照射しこれを1クールとした。

結果: 1クール終了後の治療効果は PR 7例, NC 1例, PD 1例であり奏効率は77.8%であった。腫瘍マーカー(CEA/CA19-9)の推移は, 治療前が14.0/151.0で治療後は5.3/29.1といずれも有意な減少を認めた。Grade 3 (NCI-CTC)以上の有害事象としては, 白血球減少4例, 血小板減少2例, ヘモグロビン減少2例, 食思不振2例であった。

考察: 今回 CR は得られなかったが, 77.8%と高い奏効率を得ることができ, 原発巣, 転移巣ともに良くコントロールされ有効な治療法であると考えた。血液毒性についてはいずれも G-CSF 製剤や輸血などで改善を認めたが, Grade 4の白血球減少, Grade 3の血小板減少を合併した症例もあり, 投与量の検討が必要であると考えた。引き続き治療を継続し, PDとなった場合の2nd lineのresimen, 長期的な予後については今後の検討すべき課題である。

14. 高度進行胃癌に対する化学放射線療法の検討

慶應義塾大学医学部外科

清田 毅, 才川義朗, 久保田哲朗
中村理恵子, 中村哲也, 赤津友佳子
高橋常浩, 吉田 昌, 大谷吉秀
熊井浩一郎, 北島政樹

はじめに: 未だ Stage IV 胃癌の予後は不良である。高度進行胃癌の切除による治療の限界を認識し, われわれは, 2001年より, 初回治療での化学療法/化学放射線療法を行ってきた。

目的: 高度進行胃癌に対する化学放射線療法の治療成績を報告する。〈TS-1+low dose cisplatin; TSLD〉当院では2001年より根治切除不能と判断された胃癌患者21人に対し, TS-1 (80 mg/m²/day) 3週投与と low dose cisplatin (6 mg/m²/day) 週5日3週投与を併用した TSLDにより, 奏効率52.4%・中間生存期間17.5ヶ月と良好な治療効果を得た。しかし, 中間生存期間の改善はみるものの, ほとんどの症例が初回治療2年以内での腹膜再発・癌死に至り, TS LD→手術が根治治療となり得ないことが示された。〈TSLD+Radiation: TSLDR〉さらなる治療成績の向上を目的に2002年より TSLD に放射線治療を併用した治療を検討した。(Pilot study)

対象: 根治切除不能胃癌8例。

結果: 奏効率62.5% (原発巣50%・リンパ節62.5%), 平均生存期間は10か月・2年生存率40%, さらに当院において初めての組織学的癌細胞消失例2例を含め, 良好な治療成績を得た。(Phase I study)

対象: 根治切除不能胃癌9例。

方法: CDDP 6/9/12 mg/m²にて Level1/2/3 dose を設定し, 有害事象を観察し安全な投与量を検討した。

結果: MTDは9 mg/m², DLTは血小板減少であり, 推奨用量は6 mg/m², 奏効率は88.9%, 1.5年生存率90%であった。(Phase II)

根治切除不能胃癌に対し, 現在推奨用量にて phase II study を進行中である。

結論: 根治切除不能胃癌に対する根治治療としての化学放射線療法 (TSLD+Radiation) の可能性が示唆された。

座長まとめ-学術講演 (II) (8~14)

川崎市立井田病院外科 山本貴章

本セッションは胃に関する発表が7題ありました。

「8: 胃腺扁平上皮癌の2例」は胃癌の0.2~0.4%といわれる特殊型である胃腺扁平上皮癌2例の症例提示, 「9: 腹腔鏡下胃局所切除後に多発性腹壁転移で再発した早期胃癌の1例」は局所切除で進達度sm1, 脈管浸潤(+)であった症例に4年5ヶ月も経過してから発生した腹壁転移についての報告, 「10: 特異な肉眼型を呈した胃 Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) 1例」は胃から骨盤内に及ぶ巨大腫瘍を根治切除して病理の結果 GIST が判明した症例報告でした。

いずれも比較的遭遇する頻度の低い病態に対する治療報告であり, 発生原因・治療方法・予後などについて文献的考察がおこなわれていました。

「11: 胃潰瘍の性差と Helicobacter pylori 感染 臨床と基礎」は, 胃潰瘍患者は圧倒的に男性に多く, 女性に比べると罹患年齢も若年であるというデータをもとに「潰瘍発症に性ホルモンの関与が推定される」という仮説をたて, スナネズミを用いた Helicobacter Pylori (HP) 感染モデルで潰瘍発生に対するエストロゲンの影響を検討したものでした。結果はエストロゲンが HP 感染に伴う胃病変に対して防御因子として作用している可能性を示唆するものであり, ホルモンレセプターとの関連を含めた今後の研究方向についても述べられていました。この研究はまだ開始されたばかりのものはありますが, 実際の臨床データから仮説をたてて基礎研究で証明していくという基本的かつ重要な研究姿勢をしめしたものであり, 今後の研究成果が期待されます。

「12: TS-1 少量 CDDP 併用療法により PR を維持している多発肝転移を伴う初発胃癌の1例」「13: 進行・再発胃癌に対する化学放射線療法の有効性」「14: 高度進行胃癌に対する化学放射線療法の検討」の3題は, 高い奏効率を示す TS-1 少量 CDDP 併用療法の奏効例や治療成績に加えて近年注目されている化学放射線療法の治療成績が報告されました。今までにない効果をあらわすレジメが出現したことにより化学療法の継続・維持など新たな課題も生じており, 今後のさらなる検討が期待されるものでした。

15. 右下腹部腫瘍の一例

独立行政法人国立病院機構埼玉病院外科

石川真未, 石塚裕人, 新倉直樹
柳 在典, 牛田知宏, 早津成夫
原 彰男, 牛島康榮

症例は55歳女性、一年前、熱発・腹痛を主訴に近医受診。CT上、子宮の頭側に膿瘍形成が疑われる腫瘍を認め、また、子宮筋腫も認めため、婦人科的疾患の精査のため当院婦人科紹介受診となった。受診時、当初の痛み及び炎症所見も改善していた。また、超音波、内診において婦人科的疾患は否定的であったため、その後、外来にて経過観察していた。半年後の再診では異常なかったが、一年後、増大傾向を認めたため、CT、MRI施行し、回腸から壁外性に突出する7cm大の腫瘍を認め、外科受診となった。各種画像診断の結果、GIST・平滑筋腫・平滑筋肉腫などが疑われ、手術を施行した。開腹時、回腸、盲腸、右卵巣が一塊となった腫瘍を認め、原発部位は明らかでなかった。腸間膜リンパ節は硬く腫大しており、転移が疑われたため、右半結腸切除(D3郭清)及び、右付属器切除を施行した。また、子宮筋腫に対して、子宮全摘、左付属器切除を施行した。切除標本では、虫垂と思われる部位に腫瘍を認め、回腸に浸潤していた。盲腸の内空からみると、虫垂根部と思われる部位が開大し、回腸と交通していたため、虫垂腫瘍の穿通が疑われた。病理組織診断は虫垂原発の腺癌、8.5cm×6.5cm, si, ly1, v1, n2(+),であった。今回、比較的可成り虫垂原発の癌を経験したので、若干の文献的考察を加えて報告する。

16. 腸腰筋膿瘍の3例

東京歯科大学市川総合病院外科

小野滋司, 青木成史, 正村 滋
佐藤道夫, 小川信二, 原田裕久
安藤暢敏

腸腰筋膿瘍の3例を経験したので報告する。

症例1: 75歳、男性、腹痛、発熱を主訴に来院された。腹部は著明に膨満し、圧痛と反跳痛を認めた。血液検査所見でも高度の炎症反応を認めた。腹部CT検査で腸腰筋膿瘍と診断した。抗生剤による保存的加療で症状の改善を認めなかったため、ドレナージ術を施行した。術後は順調に症状の改善を認めた。原因精査目的に大腸内視鏡検査を施行したところ、大腸全体にわたり憩室が多発しており、憩室炎が原因となっていたと思われる。また、盲腸に2型の腺癌を認めた。症例2: 72歳、男性、右下腹部の違和感と発熱を主訴に近医を受診された。腹部CT検査にて、右下腹部に腫瘍を指摘されたため当院紹介となった。右下腹部に弾性硬な腫瘍を触知し、同部に圧痛を認めた。腹膜刺激症状は軽度であった。また、両鼠径部のリンパ節の腫脹を認めた。血液検査所見では炎症反応を認めた。腸腰筋膿瘍の診断で抗生剤による保存的加療を行なったが改善せず、ドレナージ術を施行した。術

後経過は良好であった。原因精査目的の大腸内視鏡検査では穿孔の所見など、膿瘍の原因と考えられる所見は認めなかった。

症例3: 32歳、男性、右下腹部痛を主訴に受診された。右下腹部、右背部に圧痛を認めたが、腹膜刺激症状は軽度であった。20歳時に急性虫垂炎の既往があり、虫垂切除後であった。血液検査所見では炎症反応を認めた。腹部CT検査にて腸腰筋膿瘍と診断した。膿瘍と腸管との連続性は明らかでなかったが、憩室炎穿孔による膿瘍形成を否定できなかった。ドレナージ術を施行し、順調に改善した。原因精査の大腸内視鏡検査では、粗大病変を認めなかった。

以上3例、全例にドレナージ術を施行し良好な経過をたどった。3例中2例は膿瘍形成の原因を同定することができなかった。腸腰筋膿瘍の原因、起因菌、治療方針などにつき、若干の文献的考察を加えて報告する。

17. 関節炎を契機に診断された消化器癌の2例

国立病院機構東京医療センター外科

高橋辰郎, 和田則仁, 叶多寿史
鏡 哲, 宮崎 進, 二俣 健
川口義樹, 金 史英, 岸 真也
大住幸司, 徳山 丞, 北條 隆
竹内裕也, 島田 敦, 大石 崇
磯部 陽, 池内駿之, 窪地 淳
西海正彦

目的: Carcinoma polyarthritits および remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema (RS3PE) 症候群の発症を契機に診断された消化器癌を経験したので文献的考察を加え報告する。

症例1: 65歳女性。主訴: 関節痛。平成14年3月、両側の肩・股・膝関節の激痛が突然出現し、消炎鎮痛剤内服で改善しなかった。4月総合病院に入院し、ヒドロコルチゾン(200mg×7日間)全身投与により軽快した。退院の数日後、発熱、関節痛が出現したため当院紹介受診となった。Carcinoma polyarthritits を念頭に置き悪性腫瘍の検索を行い、直腸癌と診断した。5月直腸癌(Ra 1/3circ 2 MP N(-) H0 P0 M(-))に対して低位前方切除術(D2)を施行した。術後5日目には関節痛はほぼ消失し入院時不能であった歩行、上肢挙上が可能となった。

症例2: 78歳男性。主訴: 関節痛。平成16年8月上旬より突然両手背足背関節の浮腫および疼痛が出現した。同時期より腰、両膝関節、足関節にも疼痛を認めた。症状が持続したため当院受診し、RS3PE症候群の疑いで入院となった。PLS 10mg/日内服を開始し、翌日より症状は軽快した。高率に悪性疾患を合併するとされるため全身検索を行い、胃癌と診断した。胃体上部前壁の肉眼的M癌に対し内視鏡的粘膜切除術を、前庭部小弯の肉眼的SM癌に対し幽門側胃切除術を施行した。術後、ステロイドの減量を行ったが、関節症状を認めなかった。

結論：Paraneoplastic syndrome と考えられる関節炎を伴い、癌根治手術とともに症状の軽快を認めた極めて稀な2例を経験したので報告した。

18. 大動脈閉塞に合併したS状結腸癌の1例

浜松赤十字病院外科

平岩訓彦, 奥田康一, 西脇 眞
清野徳彦, 橋口尚子, 野呂智仁
安藤幸史

症例は79歳, 男性。2004年7月より便通の異常を認め、近医にて下部消化管内視鏡検査を施行したところS状結腸癌と診断され、当院に紹介入院となった。1995年に大動脈閉塞を指摘されており、近医にてチクロピジンを投与中であった。手術に先立ち血管造影を行ったところ、大動脈・下腸間膜動脈は完全に閉塞しており、左結腸動脈および上直腸動脈が下肢への側副血行路となっていた。8月18日、これら側副血行路を温存しつつS状結腸切除を施行した。腫瘍は亜全周性(45×65mm)の2型であった。病理組織学的所見は、moderately differentiated adenocarcinoma, ow(-), aw(-), ew(-), ss(a1), ly(1), v(1), INFβ リンパ節転移なし、であった。術後経過は良好で、下肢虚血などの合併症なく軽快退院となった。左側結腸・直腸の手術では側副血行路を遮断する可能性があるため、大動脈～総腸骨動脈での閉塞を合併する場合には術前に血管造影を行って側副血行路を確認し、側副血行路を温存するか切離するかを決定し、後者ならば血行再建を行う必要がある。今回われわれは術前の血管造影が非常に有用であった大動脈閉塞にS状結腸癌を合併した1例を経験したので、若干の文献的考察を加え報告する。

19. 悪性腫瘍との鑑別が困難であった虫垂放線菌症の一切除例

水戸赤十字病院外科

宮木靖子, 諏訪達志, 佐々木貴浩
星川竜彦, 捨田利外茂夫, 内田智夫
佐藤宏喜, 古内孝幸, 竹中能文
佐久間正祥
同病理 堀眞佐男

放線菌症は主に嫌気性グラム陽性桿菌である *Actinomyces israelii* の感染による慢性化膿性の肉芽腫性炎症性疾患であるが、ペニシリンや口腔衛生知識の普及に伴って減少しており、現在では比較的にまれな疾患となっている。われわれは術前に悪性腫瘍との鑑別が困難であった虫垂放線菌症の1例を経験した。

症例と経過：症例は58歳男性。回盲部痛を主訴に近医を受診し、触診で回盲部腫瘤を指摘されて大腸内視鏡施行したところ虫垂基部粘膜下に隆起性病変を認めた。当院紹介受診。右下腹部の腫瘤と同部の圧痛及び軽度の発熱を認め、血液学的検査所見では、白血球数増加とCRP高値を認めた。腹部

CT検査では回盲部から腹壁に及ぶ腫瘤を認めた。入院精査後、虫垂癌の疑いにて手術を施行した。開腹所見では、腫瘍は虫垂を中心として盲腸に及び、腹壁に強固に癒着していた。手術診断は虫垂腫瘍 T4(腹壁) N1(No.201)であり、回盲部切除(D3郭清)を施行した。病理所見では、虫垂の筋層から漿膜にかけて組織球・好中球の浸潤を認め、同部を主体とした膿瘍を形成していた。膿瘍の中に actinomycosis の菌糸塊が散見され、腹部放線菌症と診断された。リンパ節はいずれも反応性腫大であった。術後経過は順調で第17病日に退院した。現在まで術後約6ヶ月経過しているが actinomycosis の再発を認めていない。

考察：腹部放線菌症は放線菌症の中で20%程度と報告されており、そのうち回盲部病変は60%で最多であると報告されている。多くの場合において腫瘤形成を認めるが、周囲の臓器に浸潤性に腫瘤が増大することが多い。虫垂放線菌症は、画像診断でも特異的な所見がなく悪性腫瘍との鑑別は困難であるとされているが、腹痛、発熱などの炎症症状を伴い、虫垂に腫瘤形成所見が得られた場合には、本疾患も鑑別疾患の一つとして念頭において対処することも必要と考えられた。

20. 閉鎖孔ヘルニア手術における水圧法による嵌頓腸管整復の経験

平塚市民病院外科

宮崎真一郎, 中川基人, 金井歳雄
高林 司, 坂田道生, 関みな子
松本圭五, 中村 威, 三浦啓壽
河村岳晴

目的：閉鎖孔ヘルニアは比較的稀な疾患であるが、嵌頓を起こして緊急手術を要することが多いとされ、手術に際しては嵌頓腸管を温存し、術野汚染を予防できることが理想である。当院では、2002年より閉鎖孔ヘルニアの手術において、閉鎖孔内に生理食塩水を注入して嵌頓を整復する方法(水圧法)を行っている。本研究は、水圧法が閉鎖孔ヘルニア手術におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

対象と方法：1995年1月から2004年12月までに当院で施行した閉鎖孔ヘルニア手術8例を、水圧法の導入前の5例と導入後の3例にわけ、腸切除の要否、腸管内容による術野の汚染、および術後創感染の発生を調べた。水圧法は光岡らの方法(臨床外科57, 1717, 2002)に準じ、7Frネラトンの先端を嵌頓した腸管に沿わせて閉鎖孔内に挿入し、20ml注射器で生理食塩水を注入して嵌頓腸管を押し出す方法で行った。

結果：水圧法導入前5例のうち、4例が腸切除を必要とした。その内訳は2例が嵌頓壊死による小腸穿孔のため、2例は嵌頓整復時の牽引による腸管損傷のためであった。水圧法導入後の3例には小腸穿孔例は無く、嵌頓整復時の腸管損傷もなかった。1例においては漿膜の損傷が認められ腸切除を行ったが、腸管内容による術野の汚染は無く、他の2例は腸切除を必要としなかった。術後創感染は水圧法導入前5例中

3例に認められたが、導入後は認めなかった。水圧法に伴う合併症は無かった。

考察：閉鎖孔ヘルニアの嵌頓整復では、牽引に伴う腸管損傷から術野汚染をきたすことがある。水圧法は、腸切除および術野汚染を回避して手術侵襲を軽減できる可能性を持つと考えられ、高齢者に発生しやすい本疾患の手術においては意義のあることである。今後もこの方法を追試して、治療成績の向上につながるか否かを見極めていきたい。

21. 有茎薄筋弁による肛門機能再建の臨床的有用性

水戸赤十字病院外科

捨田利外茂夫, 佐久間正祥, 竹中能文
古内孝幸, 佐藤宏喜, 内田智夫
諏訪達志, 星川竜彦, 佐々木貴浩
宮木靖子

緒言：Miles 術後や肛門機能が全く廃絶した症例において永久人工肛門を避けるために、会陰部造設した人工肛門に薄筋を移植し肛門機能を持たせる方法が考えられる。歴史的には、1952年に薄筋を肛門周囲に巻くだけの Pickrell 手術が報告され、1991年には Dynamic Graciloplasty (肛門部に移植した有茎薄筋弁を電気刺激する方法)が報告された。現実には術後の肛門機能評価は定まらず、外科医の関心は低く、未だ標準的手術とは言い難い。しかし、永久人工肛門による精神的苦痛が高度な患者も多く存在するため、選択肢としての肛門機能再建手術は必要である。本法の実際を独自の工夫も含めて供覧する。

方法：完全便失禁4例、マイルズ術後8例を対象とした。Dynamic Graciloplasty (DG群) 10例、Pickrell (P群) 2例である。

結果：DG群10例全例において、薄筋は術後から良好な収縮を認めた。肛門内圧は非刺激時 21 ± 13.3 cmH₂O (mean \pm s.d.)にに対し刺激時は 82.8 ± 26.3 cmH₂Oであり、良好な肛門内圧の上昇が得られた。臨床評価可能な9例での術後2.5年から8年の状態は、2例が洗腸、自然排便は7例、日常生活の制限は、無が5例、軽度が2例であった。5例では移植薄筋を自発的に“締める”ことができる。評価可能なDG群7例の中で、3例は電気刺激をし続けているが、4例では電気刺激は不要となり止めている。人工肛門への回帰の希望は全例で無かった。

考察および結論：移植薄筋には自動機能が期待できる。電気刺激は必ずしも必要ではない。本法術後患者の多くは良好な肛門機能を得ており、機能が不良な症例でも洗腸により、日常生活の制限もなく、精神的な満足を得ている。本法は肛門切除術後あるいは完全便失禁の治療の選択肢となり得る。

22. 慶應義塾大学病院関連施設における大腸癌に対する腹腔鏡下大腸切除術の現況

慶應義塾大学医学部外科

迫田哲平, 長谷川博俊, 西堀英樹
石井良幸, 山内健義, 高野正太
似鳥修弘, 岡林剛史, 浅原史卓
鶴田雅士, 今井 俊, 北島政樹

緒言：大腸癌に対して腹腔鏡補助下大腸切除術が導入され、開腹手術と比較した RCT による成績が報告されてきているが、その適応に関してはいまだ議論の多いところである。今回、慶應関連施設における大腸癌に対する腹腔鏡補助下大腸切除術の現況につきアンケート調査を行ったのでその結果を報告する。

方法：慶應関連施設 38 施設にアンケート用紙を送り、大腸癌に対する腹腔鏡補助下大腸切除術（以下、本術式）の導入状況、適応、および問題点などにつき調査を行った。

結果：17 施設より回答を得られた。そのうち、現在本術式を実施しているのは 15 施設であった。適応に関しては、深達度は T2 以下としている施設が多く、T3 以上に適応を広げている施設は 2 施設あった。占居部位では、Rb を適応としている施設は 9 施設と少なかった。リンパ節郭清に関しては、D3 まで施行しているのは、9 施設であり、直腸癌に対する側方郭清を腹腔鏡下で行っている施設も認めた。手技上の問題点として多かったのが、症例数が少ないことによる技術上の限界、視野展開の難しさ（肥満症例、直腸領域）であった。コスト上の問題点としては、保険点数が低く手術器械との採算が釣り合わないといった問題が挙げられた。

結論：腹腔鏡下大腸切除術は多くの施設で早期癌を対象として行われているが、手技上コスト上の面から改善しなければならない点も多い。T3 以上の進行癌に関しては、現在 RCT が進められており、長期成績が開腹手術と同等であると証明されるまでは、臨床研究として行われるべきと考えられた。

23. 大腸癌における腹腔鏡下手術の治療成績

慶應義塾大学医学部外科

今井 俊, 長谷川博俊, 西堀英樹
石井良幸, 山内健義, 高野正太
似鳥修弘, 岡林剛史, 浅原史卓
鶴田雅士, 迫田哲平, 北島政樹

目的：大腸癌症例に腹腔鏡下手術を導入して以来、これまでに本術式を施行した大腸癌症例の治療成績を評価し、適応と問題点を明らかにする。

対象および方法：1992年6月より2003年12月までに本術式を施行した大腸癌患者 589 例を対象とした。それらを結腸癌 468 例と直腸癌 121 例に群別し、治療成績を評価した。

結果：結腸癌は C 68 例, A 96 例, T 84 例, D 37 例, S

183例、深達度はm 136例、sm 146例、mp 62例、ss 103例、se 18例、si 3例であった。術後入院期間は中央値で7日、術後合併症は69例(14.7%)、再発は24例(7.4%)に認めた。深達度別の5年無再発生存率は、m 100%、sm 98.6%、mp 94.6%、ss 85.6%、se 40.1%、si 66.7%であった。直腸癌はRs 53例、Ra 34例、Rb 34例、深達度はm 13例、sm 48例、mp 33例、ss/a1 25例、se/a2 2例であった。術後入院期間は中央値で8.5日、術後合併症は27例(22.3%)、再発は8例(7.5%)に認めた。深達度別の5年無再発生存率はm 100%、sm 93.8%、mp 90.0%、ss/a1 85.9%、se/a2 100%であった。

結語：現状では、結腸癌はSS以浅、直腸癌はMP以浅が本術式の良い適応と考えられた。

座長まとめ—学術講演(III)(15~23)

水戸赤十字病院外科 捨田利外茂夫

私が担当させていただいたのは、腸疾患に関わる演題が集まっているセッションでした。最初に、国立埼玉病院の石川真未先生が右下腹部腫瘍として発症した比較的まれな虫垂原発癌の一例を報告されました。東京歯科大学市川総合病院の小野滋司先生は腸腰筋膿瘍を3例集めて発表されて早期にドレナージを行うべきだと報告されました。国立病院機能東京医療センターの高橋辰郎先生は関節炎を契機に診断された直腸癌と胃癌の2症例を提示され、総合診療科を持つ東京医療センターの総合力を示されました。浜松赤十字病院の平岩訓彦先生は大動脈閉塞に合併したS状結腸癌の症例から術前の足背動脈の触診の重要性を示されました。水戸赤十字病院の宮木靖子先生は虫垂放線菌症が腫瘍を形成し悪性腫瘍との鑑別が困難であった症例を報告されました。この演題に関しましては森川教授からろう孔の形成に注意すべきであるとのコメントをいただきました。平塚市民病院の宮崎真一郎先生は閉鎖孔ヘルニアかんとんの整復にネラトンチューブと生理的食塩水を用いるという水圧法の豊富な経験をご報告いただきました。この後、有茎筋弁による肛門機能再建手術の改善点について、私なりの経験を発表させていただきました。慶応義塾大学外科からは迫田哲平先生は慶応義塾病院関連施設に腹腔鏡下大腸切除術の現況についてのアンケートを行った結果を集計されて、多くの施設では早期がんを対象として行っており、進行がんに対しては長期成績によるコンセンサスが得られるまでは臨床研究として行われるべきという結果を報告されました。同じく慶応義塾大学外科から今井俊先生は慶応義塾大学病院における腹腔鏡下手術の治療成績を集計され、結腸癌SS以浅、直腸がんはMP以浅が腹腔鏡下手術の良い適応と結論されました。皆様のご協力によりまして時間通りに、かつ、有意義なディスカッションができましたことを、御礼申し上げます。

24. 術前診断に難渋した慢性膵炎による十二指腸狭窄の一例

独立行政法人国立病院機構神奈川病院外科
山田洋平、徳原秀典、櫻井嘉彦
柿崎徹、加勢田静

症例は30年の飲酒歴のある55歳男性。H15年10月頃より、体重減少が出現し食直後に腹痛、嘔吐を認めるようになった。上部消化管内視鏡にて十二指腸球部と2nd portionにかけて不正な多発性潰瘍と全周性の狭窄を認めたが、生検の結果、悪性所見は認められなかった。腹部CTにおいては膵頭部の石灰化を伴う腫大、主膵管の拡張、総胆管の拡張を認め、胆石、膵石も散見され、腫大した膵頭部によって十二指腸が圧排されていた。血管造影、MRIにおいても悪性疾患を完全に否定することは困難であったが、術前の喀痰検査においてガフキー1号が検出されたため結核の治療を先行し、その間、膵炎に対して蛋白分解酵素阻害剤と高カロリー輸液による保存的治療を試みた。しかし2ヶ月間の保存的治療にもかかわらず、十二指腸の狭窄は改善せず、また悪性疾患も完全に否定できないためH16年2月23日膵頭十二指腸切除術、child再建を行った。切除標本において膵臓は著明に硬化し、膵頭部表面には表面平滑な径5センチ大の弾性軟な腫瘍を認めた。十二指腸の2nd portionは8センチにわたる多発性の潰瘍を伴う全周性の狭窄が認められた。病理組織学的所見において膵臓は慢性膵炎に特徴的な所見を呈し、一部急性の炎症を伴っていた。膵頭部の腫瘍はリンパ組織に取り囲まれた膿瘍であり、好中球を主体とする炎症性細胞を多数認めた。十二指腸狭窄部の壁は高度の線維化を伴ったU1 IIIの潰瘍と診断され、慢性膵炎による膵頭部の炎症が狭窄の原因と考えられた。慢性膵炎による十二指腸狭窄の頻度は比較的稀であり、悪性疾患を否定することに難渋することが多い。自験例においても膵癌、十二指腸腫瘍、十二指腸結核等の鑑別診断が考えられ、最終的な診断は病理診断に頼るところが大きかった。治療法は保存的治療がまず推奨され、保存的治療が奏効しない場合は外科的処置が必要となる。術式として、自験例においては、膵頭部の炎症が強く、疼痛を訴えていたこと、病理組織学的検索の必要性から膵頭十二指腸切除術を選択した。

25. 脾臓を原発とした悪性リンパ腫の1例

公立福生病院外科

大西達也、三好 玲、仲丸 誠
古川秋生、五月女恵一、宮崎洋史
諸角強英

脾臓を原発とする悪性腫瘍は比較的まれである。今回われわれは脾臓原発悪性リンパ腫の1例を経験したので報告する。症例：72歳、男性。近医にて肝硬変(HCV+)経過観察中。平成16年8月より左側腹部痛を認めた。近医のMDLにて異常陰影を指摘され、8月24日当院紹介受診となった。

受診時左季肋部に自発痛を認めた。GIF 施行したところ異常所見は認めず、CF では下行結腸に過形成性ポリープを認めるのみであった。肝硬変の精査をかねてエコーを行ったところ、内部が不均一な脾腫瘍を認めた。さらにCTでは内部にLDAを伴う15×13×8 cm大の脾腫瘍を認め、MRIでは、脾内部に不純な液状成分を含む腫瘍性病変を認めた。血液検査ではLDHが915IU/lと高値を示し、可溶性IL-2Rは2230U/mlと異常高値であった。脾悪性リンパ腫を疑い、10月19日精査加療目的で入院となった。入院時血液検査では可溶性IL-2Rは3050 U/mlと上昇していた。ガリウムシンチでは左上腹部に異常陽性像を認め、腹部血管造影では腫瘍によると思われる脾内動脈の圧排、伸展像を認めたが動脈相、門脈相ともに腫瘍浸潤はなかった。11月8日脾悪性リンパ腫を疑い脾臓摘出術を施行した。脾臓は15 cm大に腫大し、被膜への浸潤が認められた。脾尾部および左横隔膜への腫瘍浸潤が疑われたため合併切除した。明らかなリンパ節腫脹はなかった。術後血液検査では可溶性IL-2Rは1740 U/mlと低下した。病理診断では脾悪性リンパ腫、diffuse, large B-cell typeであり、内部に出血と壊死を伴い、また脾被膜への浸潤を認めた。横隔膜、脾尾部への腫瘍浸潤はなかったが、脾脈管の腫瘍塞栓を認めた。本症例は今後外来にて化学療法施行を予定している。

考察：本症例は左上腹部痛を契機に見つかった脾原発の悪性リンパ腫の一例である。脾原発の悪性腫瘍は比較的まれであるが、その中では悪性リンパ腫が最も多い。

26. 胆石症と腎臓疾患の重複病変に対して腹腔鏡下手術を施行した2治験例

静岡市立清水病院外科

熊谷厚志, 川口正春, 間 浩之
砂山健一, 山崎将典, 谷口正美
松田 巖, 米川 甫

同泌尿器科

小方康生, 恩田 一, 稲土博右
東海大学医学部泌尿器科
寺地敏郎

はじめに：今回我々は、胆石症に腎疾患を合併した症例に対して腹腔鏡下手術を施行した2症例を経験したので報告する。

症例1：67歳、女性、平成14年11月に上腹部痛、発熱で当院に入院した。精査の結果、胆石症と左腎下極の腎血管筋脂肪腫と診断された。胆石症に対しては平成14年12月に腹腔鏡下胆嚢摘出術を施行した。術中特に問題なく、1時間10分で手術は終了した。摘出胆嚢には径1.0~1.5 cmのコレステロール結石4個を認めたが、悪性所見は認めなかった。術後第4病日に軽快退院した。腎血管筋脂肪腫に対しては平成15年1月に腹腔鏡下腎部分切除術を施行した。術中所見では、前回の胆嚢摘出術の影響は軽度の癒着を認めたのみで、手術に支障なく3時間で終了した。病理学的所見では

腎血管筋脂肪腫と診断され悪性所見を認めなかった。術後第10日目に軽快退院した。

症例2：75歳、男性、平成16年8月に黄疸、肝機能障害で入院となった。翌日、急性胆嚢炎に対してPTGBDを施行し、精査の結果、胆石症、右腎細胞癌と診断された。平成16年9月に両疾患に対して一期的に腹腔鏡下右腎摘出術+胆嚢摘出術を施行した。術中問題なく、3時間40分で手術は終了した。摘出胆嚢には微細な黒色石を多数認めたが、悪性所見は認めなかった。腎臓は腎細胞癌 (clear cell type) でmargin freeであった。術後第16病日に軽快退院した。

結語：腹腔鏡手術の普及に伴って領域の異なる複合疾患に遭遇することが今後多くなると思われ、こうした場合にも連係をとり積極的に腹腔鏡手術を考慮するべきと思われた。

27. 粘液産生性胆管癌の一例

荻窪病院外科

高野公徳, 阿部雄太, 村井信二
半田真一

慶應義塾大学医学部外科
島津元秀

症例は68歳の女性、皮膚掻痒感にて近医受診し肝機能障害と肝内胆管拡張を指摘され当院紹介受診となった。来院時GOT166 GPT181 AL-P1397 γ GTP872 T-Bil2.94と肝機能障害を認めた。腹部超音波検査にて肝左葉の高度萎縮と肝内胆管の著明な拡張、および右肝葉の肝内胆管の軽度拡張を認めた。腹部CTにて左葉肝内胆管から肝門部及び総肝管上部にかけて胆管に沿った腫瘍形成による内腔閉塞を認めた。ERCPでは左胆管の描出なく右葉のみ描出され、総肝管よりBscの位置が完全閉塞像を呈し、右葉肝側はBrから前・後区域枝までの浸潤が疑われた。IDUSでは右肝動脈、門脈への浸潤を認めなかった。腹部血管造影検査では、右肝動脈、門脈本幹に浸潤所見を認めなかったが、門脈左枝は起始部に完全閉塞が疑われた。以上より左肝管より発生し、肝門部および右肝管2次分枝まで浸潤を認める肝内胆管癌肝門部浸潤 (肝門部領域癌) と診断し、肝左葉+尾状葉切除 (D2+ α)、肝管空腸吻合を施行した。術中迅速病理診断にて肝側断端陰性を確認し5本の胆管を2穴に形成し肝管空腸吻合を施行した。切除標本は左肝管中心の結節型腫瘍を認めたが、術前の診断に反し明らかな胆管閉塞を認めず胆管内は粘調度の強い粘液にて満たされていた。また、血管造影では浸潤を疑われた門脈左枝には浸潤所見を認めなかった。術後の病理診断では左肝管1~2次分枝中心の高分化型粘液癌で、胆管癌取り扱い規約ではBlsr So (fm) Hinf2 H0 Ginf0 Panc0 Du0 PV0 A0 P0 N0 DM (-) HM (-) EM (-) T4N0M0 Stage IVaであった。術後30日にて退院し、現在術後6ヶ月無再発生存中である。本症例は肝外胆管の漿膜進展を認めないにもかかわらず粘液により胆汁うっ滞を起こし肝機能障害を呈したことで発見された比較的珍しい症例であった。胆管に発生する粘液癌について若干文献を加えて報告する。

28. 膵体部進行癌に対する全胃温存・腹腔動脈合併膵体尾部切除術

栃木県立がんセンター外科

富川盛啓, 菱沼正一, 尾澤 巖
麻賀創太, 中村光一, 松井孝至
安藤二郎, 稲田高男, 清水秀昭
岡武健二郎, 尾形佳郎

大田原赤十字病院外科

松井淳一

済生会宇都宮病院外科

玉川英史

膵癌では周囲の主要な血管へ浸潤する症例が多いが、このような症例の予後は非常に不良である。我々は、進行膵癌に対しても適応を定めて積極的に血管合併切除を含めた膵切除術を行い、術中照射と術後に予防的全肝照射を施行することで予後の向上を目指している。なかでも、膵体尾部の進行癌で腹腔動脈へ浸潤する症例に対して、術後のQOL向上を目的に腹腔動脈を大動脈起始部で切断後、全胃を温存し、膵体尾部・脾を切除するという術式を考案し、1987年6月から2004年12月までの間に当センターおよび関連施設において、同術式を9症例に対して施行してきた。

この術式では上腸間膜動脈から膵頭アーケードを経て胃十二指腸動脈へ至る血管を確実に温存して血流を確保することが最も重要であるため、適応については遠隔転移がないこと、上腸間膜動脈や胃十二指腸動脈近傍への浸潤がないこと、リンパ節転移や後腹膜浸潤に外科的に対処できることが必須条件であるため、術前にはこれらの要因について十分に検討する必要がある。

術後合併症：下痢：2例、十二指腸通過障害、膵液瘻：各1例、いずれも重篤なものはなく、肝や胃の血流障害に関連する合併症は認められなかった。

予後：6例にR0、3例にR1の切除が得られた。2004年12月末現在、1例のみが67か月生存中であるが、8例が1年以上生存し、MSTは18か月であった。同期間内に当センターで施行した通常の膵体尾部切除術症例と比較しても治療成績は良好である。またこの9例では臍断端陽性の1例を除き、局所再発は認められていない。

結語：腹腔動脈周囲まで浸潤が及ぶ進行膵体尾部癌症例は、切除不能として扱われることも多いが、この術式を施行することにより予後とQOLの改善を期待でき、標準術式になりうると考える。

29. 腹腔鏡下胆道再建術の経験

多摩丘陵病院外科

清水芳政, 白部多可史, 藤村直樹
今井達郎

症例は62歳の男性、2000年9月26日の夜、急性腹痛で当科に緊急入院した。翌日、ERCPを施行し胆嚢頸部に結

石が嵌頓した急性胆嚢炎と総胆管結石（1個）が判明したため緊急でEST・バスケット採石を行った。胆嚢炎に対しては保存的治療で経過を見ていたが、39℃台の発熱が続くため10月2日PTGBDを施行して炎症を改善させた後、予定手術で腹腔鏡下胆嚢摘出術を行い軽快退院した。その後、特に問題なく社会復帰していたが、2001年2月15日肝機能障害で再入院となった。原因は総胆管結石の再発で今度は2個の結石が確認されたためESBDを行って結石を摘出した。その後約3年半は全く問題なく経過していたが、2004/9/12再び肝機能障害で再々入院となった。今回も原因は総胆管結石の再発で1個の小さい結石と胆泥が総胆管内に充満しているのが確認された。前回同様、ESBDを行って結石を摘出したが、今後も再発する可能性が高いと思われたため、胆道再建の適応と判断し、2004/9/24手術を施行した。手術は完全腹腔鏡下に総胆管を下腹部で結紮切断し、中樞側と十二指腸球部を端側吻合した。胆管が拡張していたので胆管ステントなどは挿入しなかったが、胆汁漏などはなく3PODより経口摂取を開始し7PODに退院した。腹腔鏡下での総胆管-十二指腸吻合は結節縫合と連続縫合を組み合わせて行ったが、胆管拡張例ではある程度縫合手技に慣れていれば比較的容易に行えるものと思われた。第1例であるため、手技に改善すべき点を多数認めるが、開腹手術に比較し格段に低侵襲な完全腹腔鏡下の総胆管十二指腸吻合術は安全・確実な標準的術式に成り得ると思われたので、その手技の実際をビデオで供覧する。

30. 下大静脈浸潤肝癌の外科治療

慶応義塾大学医学部外科

宮田量平, 島津元秀, 若林 剛
田辺 稔, 河地茂行, 上田政和
北島政樹

目的：肝部下大静脈に浸潤する肝悪性腫瘍に対して肝切除とともに下大静脈を合併切除した15例を対象として術式、合併症、遠隔成績などにつき検討した。

対象および方法：疾患の内訳は大腸癌肝転移6例、肝細胞癌3例、胆管細胞癌3例、肝嚢胞腺癌1例、腎癌肝転移1例、悪性中皮腫1例であった。肝切除術式は全例尾状葉を含む切除が行われ右3区域1例、左3区域2例、拡大右葉2例、拡大左葉1例、右葉1例、左葉2例、後区域3例、内側区域1例、尾状葉単独2例であった。

結果：下大静脈の再建は縦縫合9例、静脈パッチグラフト4例、ゴアテックス間置1例、再建なし1例であった。阻血法は8例がside clamp、5例はhepatic vascular exclusion (以下HVE)、1例は肝静脈より尾側でのcross clampで行った。HVEの際、肝虚血、再灌流障害および門脈・下大静脈うっ血に伴う循環不全、腎障害などが問題となるため、門脈血・下大静脈血バイパスならびに肝低体温灌流を一期的に施行できるbypass-isolation-perfusion catheterを用いた。在院死亡率は7%（15例中1例）であり、Kaplan-Meier

法による累積生存率は1年生存率52%、3年生存率26%であった。6例は術後1年以内、3例が術後3年以内に死亡したが、他の6例は生存中であり、最長生存は6年8ヶ月であった(平均観察期間3.3年)。また2年以上生存者の平均年齢は53才、2年以内死亡者は同66才で有意差を認めた(p<0.05)。術後の主合併症は肝不全3例、播種性血管内凝固症候群2例、ARDS1例、出血性ショック1例などであった。

考察および結論：以上より肝部下大静脈合併切除を伴う肝切除はHVEを初めとした阻血法の工夫で近年はより安全に施行でき、特に若年者に対しては遠隔成績の向上に寄与し得ると考えられた。

31. 副腎癌肝転移に対する世界初の生体肝移植

北里研究所病院外科

金田宗久

慶應義塾大学医学部外科

島津元秀, 若林 剛, 田辺 稔

河地茂行

同小児科

井ノ口美香子, 長谷川奉延

高橋孝雄

同病理

亀山香織, 坂元亨宇

同外科

北島政樹

症例は21歳、女性。1989年に他院にてクッシング症候群と診断され、左副腎に5cm大の腫瘍を認め、左副腎全摘出術施行。病理学的に良悪性の判断困難であったが、半年間のホルモン補充療法後、経過観察となった。2000年2月、腹部超音波にて肝S7に2cm大の腫瘤を指摘され、2003年2月、同腫瘤は3.5cmに増大し、腫瘍針生検にて副腎腫瘍の肝転移と診断された。2003年5月、当院外科初診。精査にて主腫瘍のほか肝両葉に多数の小腫瘍を認めたが、PETを含む諸検査にて肝外転移巣は認めなかった。約半年間の観察期間で腫瘍は増大傾向を認めたが、肝外転移巣は出現せず。2004年2月、母親の左葉+尾状葉をグラフトとする生体肝移植を施行した。術前高値であったDHEA-Sは正常化し、腫瘍の完全摘除がえられたものと判断し、40病日目に経過

良好にて退院した。一般に副腎皮質癌は悪性度が高く肝転移症例の予後は不良である。本症例は副腎腫瘍が術後11年を経過して再発肝転移した極めて稀な症例であり、自然経過は不明であるが、腫瘍の進行傾向と内分泌異常の存在から放置すればsymptomatic and fatal diseaseになると考えられた。これまで同様な症例に対する肝移植の報告例は国内、海外ともなく、他のslow glowing neuroendocrine tumorの移植成績から類推して、根治という観点から肝移植の適応はあると判断した。肝移植の意義については今後、長期間の経過観察が必要である。

座長まとめ-学術講演(IV)(24~31)

伊勢原協同病院外科 飯尾 宏

肝・胆・膵関連の演題は八題であった。国立病院機構神奈川病院の山田らは結核を合併し、術前診断に難渋した慢性膵炎による十二指腸狭窄の一例を報告した。結核を治め、保存的治療が効果しないことを確認したうえで膵頭十二指腸切除で治癒せしめた。公立福生病院の大西らは脾臓原発の悪性リンパ腫の一例を報告した。外科的に脾臓を切除したが、依然可溶性IL-2Rは1500U/mlと高値であり、今後の化学放射線治療に期待するものである。静岡市立清水病院の熊谷らは泌尿器科との連携による胆嚢および腎の2病変に対する腹腔鏡下手術について報告した。今後、他科との連携が期待される。栃木県立がんセンターの富川らは、腹腔動脈へ浸潤する膵体尾部癌に対する全胃温存腹腔動脈合併膵体尾部切除で22%の3生率を得たことを報告し、動脈合併切除の有効性を示した。多摩丘陵病院の清水らは繰り返す総胆管結石症例に対する腹腔鏡下胆道再建を報告した。慶応大学からは宮田らが下大静脈浸潤肝癌に対する静脈合併切除を伴う肝切除で21%の5生率を得ていることを報告し、阻血法の工夫による拡大手術の有効性を示した。最後に北里研究所病院の金田は慶応大学で行われた副腎内分泌癌の肝転移に対する世界初の生体肝移植について詳しく報告し、転移性肝癌の治療法の広がりが見された。このように、市中病院、がんセンター、大学病院とそれぞれの特徴を持ったさまざまな演題が提示されて、有意義なセッションであった。

学会展望

第 10 回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会

日 時：平成 17 年 2 月 5 日（土）午後 2 時 00 分～5 時 30 分

場 所：慶應義塾大学 新棟 11 階 大会議室

主 催：慶應義塾大学医学部形成外科学教室同窓会

事務局：慶應義塾大学医学部形成外科学教室内

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

14：00～14：40	解析	座 長 土 屋 裕 一
14：40～15：20	手術手技 I	座 長 曾 根 清 昭
15：20～15：30	－休憩－	
15：30～16：30	特別講演「先天異常の遺伝相談と遺伝子診断」	座 長 金 子 剛
16：30～17：00	手術手技 II	座 長 佐 藤 博 子
17：00～17：30	基礎	座 長 三 鍋 俊 春

14:00~14:40 解析

座長：済生会中央病院 形成外科 土屋裕一

1. 下顎再建プレートの固定方法に関する構造力学解析

慶應義塾大学形成外科

木村章子, 永竿智久, 中島龍夫

国立成育医療センター形成外科

金子 剛

日本工業大学機械工学科

玉木 保

清瀬小児病院外科

宮本純平

内容：下顎部分切除後のプレート再建においては、術後の咀嚼機能リハビリテーションの過程において、プレートの露出、破損、ねじの弛み等の合併症を生じる場合がある。これらの合併症の多くは、咀嚼荷が増すことで発生する特定部位への応力の集中を原因とする。ゆえに、これら合併症の発生を抑えるには、応力を分散させることが必要である。しかし、どのようにすれば応力集中をさけることができるかに関しては、いままで明確な基準がなく臨床経験に頼ることが多かった。そこで、金属プレート再建下顎のコンピューターモデルを作成し、咀嚼時にかかる応力の解析を行った。ヒト乾燥頭蓋骨のCT前頭断面画像から48個の3次元無歯下顎モデルを構築した。続いて、Boydの分類に準じてオトガイ部欠損（central=C欠損）、片側体部欠損（Lateral=L欠損）を作成し、プレートを固定するねじの数および位置を変えた再建下顎を設定した。左臼歯相当部に12Mpaの垂直荷重をかけ、ねじ周囲に発生する最大応力を3次元有限要素解析し、統計的に比較検討した。いずれのモデルにおいても最大応力は、負荷側骨断端縁のねじ周辺に発生した。片側2本で固定しC欠損とL欠損を比較すると、最大発生応力は有意にL欠損よりC欠損で高かった。しかし、3本目を追加すると有意差を認めなくなった。C欠損では、位置に関係なく3本目を打つと最大発生応力は有意に減少した。一方L欠損では3本目を打つことにより最大応力はかえって増加した。ゆえに単純に垂直方向咬合力負荷のみを考慮すると、L欠損ではねじ3本より2本の方がプレート関連の合併症のリスク軽減という観点から望ましいと考えられる。

(質疑応答)

Q 田中 (宝)：プレートの破損がどの部分でおこりやすいのか予測はできるのか。

A 永竿：研究の焦点は咬合時に発生する負荷であり、プレートが破断するような強力な外力負荷ではない。そのような解析も容易に行うことができるが、今回の問題点の所在は長期咬合負荷のプレート周辺の骨に与える影響である。

2. 打撃角度の相違は blowout fracture の骨折面積に影響しうるか

慶應義塾大学形成外科

永竿智久, 木村章子, 緒方寿夫,

小林正弘, 中島龍夫

清瀬小児病院外科

宮本純平

国立成育医療センター形成外科

金子 剛

日本工業大学機械工学科

玉木 保, 金 紅梅

Blow out fracture は形成外科の日常診療において最もよく遭遇する疾患のひとつであり、その発生メカニズムに関しては過去数多くの研究がなされてきた。現在広く受け入れられている説は、眼窩内圧の上昇により壁の薄い部分に骨折が生じるとする hydraulic theory と、外力の眼窩底への直接介達骨折を引き起こすとする buckling theory に大別される。従来の研究においては、それらのメカニズムのいずれが主たる役割を果たすのかに研究の主眼がおかれていたようである。しかし現在においてはそれらのメカニズムが二者択一に作用するのではなく、打撲を受ける部位・眼窩の形態・外力の強さ・患者の骨強度などの複合的要素が絡み合って初めて骨折が発生するのであり、個々の状況によって両者のメカニズムが寄与する割合も変化するという認識が広く持たれている。したがって今後の blowout fracture の病因論研究としては、それらの因子が変化した場合骨折パターンなどのような差異が生じるのか、といったことが主流になって来るであろう。

その第一歩として今回われわれは、打撃角度が骨折パターンに及ぼす影響について buckling theory の視点から検討を行った。乾燥頭蓋骨から3D頭蓋骨シミュレーションモデルを作成し、異なる3つの角度（水平・上向き15度・上向き30度）から、それらの眼窩縁の上に打撃力を加えるシミュレーションを行った。そしてそれぞれの条件下において、骨折の生じると予測される部分の面積を、動解析プログラムを用いて計算した。計算された予測骨折面積は、打撃力が下から30度の角度で作用した際に最も大きかった。本実験から以下の2つのことが結論される。まず第1に、BOFのメカニズムの実験研究を行うに当たっては打撃の加わる角度も考慮に入れる必要がある。第2に、外科医がBOFの患者を診察するにあたっては、打撃力の方向を問診に含めるべきである。なぜならその情報は骨折の程度を予測する助けになりうるからである。

(質疑応答)

Q 土屋：眼窩要素は何を使用しているのか。

A 永竿：3層 SHELL 要素を使用している。

Q 宮本：内側壁に発生する骨折は水圧説による寄与が大きいのか。

A 永竿：そう推測している。2000年BJPSに関連した論文がある。

3. Cone Beam CTの頭蓋顎顔面領域における有用性

慶應義塾大学形成外科

玉田一敬, 中島龍夫, 緒方寿夫,
永竿智久, 木村章子

Cone Beam CTは比較的最近開発されたX線CT撮影装置であり、被験者の周りをX線照射端子が回転し、一度の回転で多くの画像情報を取得し、短時間で3次元画像を作成することが可能な、簡便な撮影装置である。Cone Beam CTの歯科口腔外科領域における使用に関してはこれまでにいくつかの報告がなされているが、形成外科領域においてもCone Beam CTが有用となる対象疾患は少なくない。今回我々は慶應義塾大学医学部形成外科学教室（以下、当教室）において撮影を行った疾患の内訳を調査し、Cone Beam CTの有用性に関して検討を行ったので報告する。

(質疑応答)

Q 金子：コンビームCTが自費である理由は？

A 玉田：歯科で本来使用されたことが原因であろう。

Q 谷野：具体的に言うとのどの程度の要領があるのか。電子カルテとの関係よりお聞きしたい。

A 玉田：正確には把握していないがCD1枚に十分収納可能な容量である。

4. 上顎再建および修正術を行った5症例の検討

独立行政法人国立病院機構東京医療センター
形成外科

佐藤博子

独立行政法人国立病院機構東京医療センター
耳鼻咽喉科

藤井正人

国立成育医療センター形成外科

金子 剛, 小山太郎

慶應義塾大学形成外科

永竿智久

現在上顎切除後の再建に対して遊離肩甲骨皮弁が多く用いられているが、骨性再建方法や、肩甲骨皮弁や広背筋皮弁との組み合わせにバリエーションがあり、症例に応じた使い分けが必要である。当施設では上顎再建症例を5例（修正1例）経験したが、それぞれの再建方法は異なっており、結果を比較検討したので報告する。

(コメント)

三鍋：杏林大学では骨性再建に脂肪筋膜弁を使用している。

(質疑応答)

Q 福嶺：涙道再建の具体的方法は？

A 佐藤：涙嚢を牽引してその部分に穴を開けた。炭酸ガスレーザーを使用すると効果的かも知れない。ブジーは5ヶ月間留置した。

14:40~15:20 手術手技I

座長 済生会宇都宮病院形成外科医長 曾根清昭

5. 大胸筋“Marionette Suture”によるExpanderの被覆

杏林大学形成外科・美容外科

三鍋俊春 飯田拓也 坂いづみ

波利井清紀

Expanderによる乳房再建では、人工物であるexpanderを血行良好で厚みのある組織で被覆することが推奨されている。それは、外科医による乳房切除の結果として残った胸部皮弁は術中の損傷により血行不全→皮弁壊死→expander露出が懸念されるからである。したがって、大胸筋下にポケットを作り直してexpanderを挿入するが、外下方が大胸筋からはみ出してしまい、他の筋弁や筋膜弁を挙上する必要があった。これに対して、2001年Spearらは大胸筋外下縁に牽引糸をかけて皮膚面に出し、大胸筋をあやつり人形=マリオネットmarionetteのように外下方に牽引することで筋肉下にexpanderを被覆する方法を報告した。我々は、2003年からSpearの方法に若干の工夫を加えて12例に本法を適応し、良好な結果を得ている。術式の詳細を代表例とともに報告する。

(質疑応答)

Q 貴志：マリオネット縫合は2期再建では行わないのか。

A 三鍋：大胸筋が薄くなっているので困難だと思う。

Q 田中：ある程度乳腺組織が残っている場合には。

A 三鍋：やや再建は困難になる。

Q 谷野：永久型エキスパンダーとしてBecker型が導入される予定になっており推奨される。

Q 緒方：エキスパンダーのすべてが筋弁で覆われる必要はないのか？

A 三鍋：実際には皮膚で被覆されていない場合が多いように思うが、すべて筋弁で被覆されるべきと主張する意見もある。そのような場合には広背筋皮弁が使用される。

6. 局所皮弁法 purse string techniqueによる乳頭形成術

杏林大学形成外科・美容外科

三鍋俊春 飯田拓也 坂いづみ

波利井清紀

局所皮弁による乳頭形成術は多数の方法があるが、皮弁形成後の乳房マウンド頂点の平低化が問題であった。慶應大の中嶋らは、対策の一法としてスケートフラップ基部にV-Y前進皮弁を用いる方法を報告した。一方、南カリフォルニア大のSharmanらは、乳輪外周部のpurse string（巾着）縫

合を行う mastopexy に着目し、局所皮弁と purse string 縫合を組み合わせた乳頭再建法を開発して2003年IPRAS、ASPSにおいてpurse string techniqueとして発表した。本法では、中嶋らと同様に乳頭となる皮弁基部に周辺の別の皮弁を前進させるのみでなく、さらにその外周にpurse string糸をかけて乳頭がマウンドの頂点となるように盛り上げている。4症例の自験例を紹介する。

7. 陰圧閉鎖療法が著効した小児褥瘡の1例

東京都立清瀬小児病院形成外科

大西文夫、宮本純平

小児領域においてもしばしば褥瘡が発生し治療に難渋するケースは少なくない。今回我々は、小児褥瘡に対し陰圧閉鎖療法を行い、著効した症例を経験したので報告する。症例は10歳男児、若年性ネフロン癆にて腎移植を行った患児である。脊髄炎にて下半身の麻痺が出現し、長時間臥床にて仙骨部褥瘡を生じた。初診時仙骨部に約8×5cmの褥瘡を認め、悪臭を伴う壊死組織に対し外科的デブリードマンを行い潰瘍底部に骨露出を呈する状態となった。連日、洗浄・アルギン酸塩被覆剤による創傷処置を行ったが、骨露出部の肉芽形成が乏しく、進展が得られなかったため陰圧閉鎖療法に切り替えた。本法に切り替えて約3週間の経過で急速に肉芽の増生がみられ、1ヶ月でほぼ上皮化が完了した。

本法は創傷治癒を促進するばかりでなく特殊な資材を必要としないため簡便で、患児の安静度を制限することなく行えるため小児領域の難治性潰瘍において非常に有用と思われた。

(質疑応答)

Q 金子：ネフローゼということであるが、ステロイドの使用量は減らしたのか、浸出液の量は？

A 大西：ステロイドは基本的には減らしていない。2日に一度程度の取替えが必要であった。

Q 福積：腎裂の密閉はどのように工夫したか。

A 大西：ダーマボンドを使用した。

8. 国立成育医療センターにおける褥瘡対策チームの現況

国立成育医療センター形成外科

松田就人、金子 剛、小山 太郎

大田原赤十字病院形成外科

佐久間 恒

慶應義塾大学形成外科

木村章子

2002年10月に始まった入院基本料からの褥瘡対策未実施減算に対応して、当院でも褥瘡対策チームが発足した。院内に、形成外科医長を専任医師、副看護師長を専任看護師として褥瘡対策小委員長が設置され、看護部では専任看護師を委員長にWOC委員会が設置されて活動を行っている。成育医療は主として成人女性と小児を対象とするため、一般的

荷重部位の褥瘡はほとんど見られず、点滴もれ、テープや各種チューブなどによる皮膚の創傷、ストーマ管理などが中心であることに特徴がある。発足以来今日までの活動内容を報告し、今後の課題について述べる。

(質疑応答)

Q 福積：どのようなタイプの体圧分散マットを使用しているか。

A 金子：ウレタンタイプを使用している。

15:20~15:30 【休憩】

15:30~16:30

特別講演「先天異常の遺伝相談と遺伝子診断」

座長：国立病院成育医療センター形成外科

金子 剛

慶應義塾大学小児科助教授 小崎健次郎

特別講演(質疑応答)

Q 谷野：妊娠中の臨界期に関してはどのように捉えたらよいのか。

A 小崎：薬剤の種類による。かぜ薬などではあまり関係がない可能性が高い。

Q 谷野：保険適応になるか。

A 小崎：病院の決定した額によっている。

Q 中島：“多因子遺伝”という言葉を使用して説明しているが。

A 小崎：誤りではないと思う。

Q 金子：予防との関連は？

A 小崎：葉酸の内服が有効とう報告がある。

Q 金子：ピエールロバン症候群の顎発育には2種類に分かれるが、それらを遺伝子の点から区別できないか？

A 小崎：一部の同疾患はsequence(原因がありそれに続発して発生する一連の症候。Syndromeとは区別される)と考えられる。両者の鑑別は遺伝学的に可能かも知れない。

16:30~17:00 手術手技II

座長：独立行政法人国立病院機構

東京医療センター形成外科 佐藤博子

9. 唇裂術後の「だんご鼻」変形に対する皮下茎皮弁を利用した鼻翼溝形成術

慶應義塾大学形成外科

大原博敏、中島龍夫、石井直弘、

清水雄介、玉田一敬

唇裂術後の外鼻変形に対し多くの手術法が報告されている。しかし外鼻に過度な皮下剥離を加えると死腔を形成し、鼻翼溝の消失と癭痕形成による「だんご鼻」変形を来す場合を見かける。我々はこの変形の修正法として、皮下茎皮弁を利用

した新しい鼻翼溝形成術を考案した。

まず open rhino approach を用い、鼻翼、鼻背、鼻中隔を軟骨上で剥離し、次に作成予定の鼻翼溝の皮下組織を鉗子等で牽引し、位置を確認する。位置を決定したらその皮下組織を円柱状に周囲より剥離し、鼻背側を茎とする皮下茎皮弁として、これを鼻中隔軟骨に固定する。これにより鼻翼から鼻背への移行部が陥凹し自然な鼻翼溝が形成され、だんご鼻変形は改善する。

だんご鼻の治療法としてまず皮下組織の切除、defatting があるが、これには皮膚壊死のリスクが伴う。また真皮も肥厚しているため伸展性が悪く皮下組織の切除のみでは効果はあまり期待できない。それに替わって、軟骨移植やし字型骨移植、インプラント移植など、鼻尖支持組織の追加による鼻尖形成術があるが、異物反応、吸収といったリスクある。

我々の手術手技は、簡便で他の術式と併用することも可能であり、有用な方法であると考え、症例写真を供覧すると共にその手法につき報告する。

(質疑応答)

Q 谷野：皮弁の移動によってかえって鼻尖が丸くなることはないか？

A 大原：そのような場合には他の手技を併用して変形を予防している。

Q 佐藤：いわゆる“だんご鼻”の割合は、

A 大原：正確には計上していない。

Q 原科：10歳代に鼻変形の矯正手術を行うと閉子鼻になる傾向があると思うが、

A 中島：鼻尖部の剥離を最小限にすれば変形は起こりにくい。

10. 下顎枝垂直骨切り術を施行した Hemifacial microsomia (Type I) 症例

東京歯科大学歯科矯正学講座

坂本輝雄、一色泰成

慶應義塾大学形成外科

緒方寿夫、中島龍夫

藤田保健衛生大学形成外科

奥本隆行

Hemifacial microsomia (HFM) は、第1・第2鰓弓に起因する先天奇形で、小耳症と顔面非対称、歯科矯正学的には交叉咬合および咬合平面の傾斜を呈する疾患である。この症例に対して我々は、Murray の分類 Type I の症例には下顎枝垂直骨切り術、Type II には下顎枝単独または上下顎骨同時骨延長術、Type III には肋軟骨付肋骨移植にて対応している。手術時期は、下顎骨の形態異常により二次的におこる上顎骨の変形の抑制および早期の顔面の審美性の獲得を目的として、学童期初期に施行している。今回、下顎枝垂直骨切り術と矯正治療を行った症例についてその概要を報告する。

症例1：初診時年齢6歳4ヶ月の右側 HFM (Type I)

の女児。6歳6ヶ月時に右側の下顎枝垂直骨切り術を施行し、右側の下顎枝を14mm延長し、骨切りによって生じた上下歯列間の空隙を閉鎖すべく上顎大臼歯の挺出をはかった。永久歯交換後、マルチブラケット法にて矯正治療を行い、14歳11ヶ月時に個性正常咬合が得られた。

症例2：初診時年齢6歳10ヶ月の左側 HFM (Type I) の男児。6歳11ヶ月時に左側の下顎枝垂直骨切り術を施行し、左側の下顎枝を12mm延長した。永久歯交換後、マルチブラケット法にて矯正治療を行い、16歳0ヶ月時に個性正常咬合が得られた。

(コメント)

谷野：私たちは健側は垂直骨切を、患側では矢状分割を使用している。患側の垂直骨切のみでは GONION のへこみが矯正できないように思う。

11. 母斑性基底細胞癌症候群の1例

済生会宇都宮病院形成外科

小松星児、曾根清昭

母斑性基底細胞癌症候群 (NBCCS: Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome) は外胚葉および中胚葉に多発性に異常を来し、多彩な腫瘍および形態異常がみられる稀な疾患である。われわれは NBCCS の1例を経験したため、文献的考察を加え報告する。

症例：54歳の男性。

現病歴：約40年前より左大腿部、4～5年前より頭部、6ヶ月前より左内眼角部の皮膚病変を自覚していた。平成16年7月28日、近医より紹介され当院皮膚科を受診した。生検を行い基底細胞癌と診断された。

既往歴：唇裂形成術

家族歴：胃癌(母)

9月2日に全身麻酔下で腫瘍単純切除および皮弁術を施行した。

基底細胞癌の多発、掌蹼の小陥凹、唇裂口蓋裂などから NBCCS を疑い、9月9日に頭部 CT を施行した。その結果、大脳鎌の石灰化および顎骨嚢胞を認め、診断確定に至った。また、小脳橋角部に腫瘍を発見した。MRI で髄膜腫が疑われ、現在は当院脳神経外科で経過観察中である。

NBCCS は、責任遺伝子が 9q22.3-q31 の PTCH1 遺伝子とされている。常染色体優性遺伝性疾患である。しかし、孤発例も半数以上にみられ、多彩な異常を認めるが自覚症状に乏しく、診断確定が遅れることがある。基底細胞癌の患者を診療する際は、NBCCS を念頭に置く必要がある。

(質疑応答)

Q 貴志：Sonic-Hedgehog 遺伝子の異常ということであるが、創傷治癒に特徴的な点はなかったか。

A 小松：臨床上特徴的な点は認めなかった。

17:00~17:30 基礎

座長:杏林大学形成外科・美容外科 三鍋俊春

12. マウス胎仔創傷治癒における皮膚肉様筋の再生とそのメカニズム

慶應義塾大学形成外科

貴志和生, 中嶋英雄, 中島龍夫

東京医科歯科大学口腔病理

勝部憲一

マウスは胎生13日までの胎仔に傷をつけても完全に再生する。この際、皮膚肉様筋も完全に再生するが、胎生14日以降は皮膚肉様筋は再生しない。私たちはこのメカニズムとして、all trans-retinoic acidの関与を報告してきた。しかし実際に創傷治癒過程で内因性のレチノイン酸が発現しているか否かについては調べられていない。私たちは今回、胎生13日と14日の創傷部位から組織を採取しレチノイン酸産生酵素の発現をreal time RTPCRを用いて調べたので報告する。

13. MMP-13 ノックアウトマウスにおける創傷治癒過程の解析

慶應義塾大学形成外科教室

服部典子, 中島龍夫

同整形外科教室

高石官成

同病理学教室

岡田保典

マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)は主として細胞外マトリックスを基質とする一群のメタロプロテアーゼからなる遺伝子ファミリーである。そのうちのMMP-13は骨の発生に重要であるとともに創傷治癒における血管新生において重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。最近VEGF₁₆₅とCTGF(connective tissue growth factor)の複合体をMMP-13が選択的に分解することでVEGF₁₆₅の血管新生活性が賦活化されることが発表された。MMP-13ノックアウトマウスを用いて、創傷治癒過程を比較検討することによって、VEGF₁₆₅/CTGF/MMP-13系を主体に、MMP-13の創傷治癒過程における役割を解析している。解析の途中段階であるが、現時点での研究成果を報告する。

(質疑応答)

Q 三鍋: 他のタイプのMMPはどうか。

A 服部: 発表された順番で番号がつけられている。13番が最も活性が高いとされている。

14. 骨髄由来間葉系幹細胞がブタ皮膚創傷治癒に与える影響

独立行政法人国立病院機構東京医療センター
形成外科

佐藤博子

慶應義塾大学形成外科

貴志和生, 中島龍夫

国立成育医療センター研究所 生殖医療部

梅澤明弘

【目的】私たちはラットの皮膚切開創に骨髄由来間葉系幹細胞を移植すると、瘻痕形成が抑制されることを報告してきたが、よりヒトと皮膚構造が似ているとされるブタ皮膚においても同様に瘻痕形成が抑制されるか検討を行った。

【方法】生後4週の子豚L.W.D.種を2匹使用した。骨髄血を採取し、プラスチックディッシュに接着する細胞を3-4継代培養した。まず、この細胞を骨細胞、脂肪細胞へ分化誘導し、間葉系幹細胞であることを確認した。次に、ブタ背部皮内に1ヶ所あたり 1.5×10^7 個の骨髄由来間葉系幹細胞を局注(自家移植)し、直後に2cm長さの皮膚全層切開を加えた(n=17)。術後4週間目に創を採取し、肉眼的および組織学的評価を行った。

【結果】ブタ骨髄由来間葉系幹細胞を皮膚全層切開創に移植すると肉眼的に細胞移植群は創治癒が早く、瘻痕形成が抑制された。組織学的には細胞移植群では膠原線維の形成および配列が良好であった。

【考察】ブタ皮膚においても局所投与により骨髄由来間葉系幹細胞は瘻痕抑制効果を有することが確認された。以上の結果より私たちはscarless wound healingを目的としてヒトに臨床応用することを考えている。

(質疑応答)

Q 三鍋: 具体的にはどのような症例に対してこの療法を適応して行こうかと考えているか。

A 佐藤: 良性腫瘍の切除後に使用しようと考えている。

慶應医学会平成 16 年度庶務・会計報告

平成 17 年 2 月 14 日（月）第 5 会議室において午後 3 時より理事会・評議員会が開かれ、平成 16 年度庶務・会計決算報告ならびに平成 17 年度予算が承認された。

承認事項は下記の通りである。

○会費：年額 5,000 円（ただし、無給教員と大学院生は 3,000 円）

○平成 16 年度庶務報告（平成 16 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

会 員：2,711 名（学内 917 名、学外 1,794 名）

物故会員：計 9 名

総 会：（第 84 回）平成 16 年 11 月 12 日（金）午後 3 時開会

シンポジウム『ベンチからビジネスへ』（慶應ライフフォーラムと合同開催）を開催した。

例 会：57 回（平成 16 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

理事会・評議員会：平成 16 年 2 月 9 日（月）＜平成 15 年度決算報告＞

平成 16 年 11 月 1 日（月）＜平成 16 年度中間報告＞

編集会議：年 5 回開催

雑 誌：『慶應医学』第 81 巻 1 号～4 号まで発刊

○平成 17 年度事業計画（平成 17 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

1) 学術雑誌『慶應医学』編集発行

2) 慶應医学会総会（平成 17 年 11 月 11 日予定）

3) 慶應医学会例会、年約 50 回開催（慶應医師会・THE KEIO JOURNAL OF MEDICINE と共催）

4) 理事会・評議員会、毎年 2 回（中間報告・決算報告）開催

5) 定例編集会議、必要に応じて開催

○平成 16 年度会計決算報告（平成 16 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

収入の部				支出の部			
勘定科目	予算(A)	実績(B)	差額(B)-(A)	勘定科目	予算(A')	実績(B')	差額(B')-(A')
補助金収入*1	3,100,000	3,100,000	0	原稿費	800,000	933,324	133,324
会費収入*2	10,000,000	10,474,000	474,000	査読費	225,000	211,106	△ 13,894
広告料収入	600,000	350,960	△ 249,040	論文掲載補助費	750,000	690,000	△ 60,000
掲載料収入	3,850,000	4,847,644	997,644	業務委託費	1,280,000	1,507,381	227,381
雑収入	50,000	48,971	△ 1,029	印刷費	9,000,000	9,881,067	881,067
				発送費	940,000	1,031,270	91,270
				会議費	30,000	31,769	1,769
				学会費	2,150,000	2,207,558	57,558
				事務費	1,000,000	876,227	△ 123,773
				備品費	50,000	21,774	△ 28,226
				予備費	1,500,000	0	△ 1,500,000
当期収入合計	17,600,000	18,821,575	1,221,575	当期支出合計	17,725,000	17,391,476	△333,524
前期繰越額	24,137,595	24,137,595	0	当期収支差額	△125,000	1,430,099	1,555,099
収入合計	41,737,595	42,959,170	1,221,575	次期繰越収支差額	24,012,595	25,567,694	1,555,099

* 1 医学部からの補助金（150 万円）が平成 15、16 年度分 2 回入金されている

○平成 17 年度予算（平成 17 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

収入の部			支出の部		
勘定科目	平成 16 年度予算	平成 17 年度予算	勘定科目	平成 16 年度予算	平成 17 年度予算
補助金	3,100,000	1,600,000	原稿費	800,000	900,000
会費収入	10,000,000	10,500,000	査読費	225,000	250,000
広告料収入	600,000	600,000	論文掲載補助費	750,000	840,000
掲載料収入	3,850,000	5,000,000	業務委託費	1,280,000	1,535,000
雑収入	50,000	50,000	印刷費	9,000,000	9,000,000
			発送費	940,000	940,000
			会議費	30,000	35,000
			学会費	2,150,000	2,300,000
			事務費	1,000,000	900,000
			備品費	50,000	50,000
			予備費	1,500,000	1,000,000
当期収入計	17,600,000	17,750,000	当期支出計	17,725,000	17,750,000
前期繰越収支差額	24,137,595	26,104,446	次期繰越収支差額	24,012,595	26,104,446
合計	41,737,595	43,854,446	合計	41,737,595	43,854,446

* 平成 17 年度収入の部の前期繰越収支差額は決算見込み数字とする。

○慶應医学会役員

(任期：平成17年1月1日～平成18年12月31日)

会 長 北島 政樹
理 事 相磯 貞和 (副会長)
岡田 保典 (会計担当)
末松 誠 (渉外担当)
戸山 芳昭 (総務担当)
監 事 池田 康夫
村井 勝
編集委員 林 松彦 (編集委員長)
上田 政和
梅澤 明弘
鹿島 晴雄
斎藤 英胤
村田 満
村松 太郎
饗庭 了

○評議員

(任期：平成17年1月1日～平成18年12月31日)

小川 聡
小林 紘一
末舛 恵一
武田 純三
比企 能樹
矢部 裕

○慶應医学会会則 (昭和59年11月改訂)

第1条：本会は慶應医学会と称する。

第2条：本会の目的は医学の進歩と啓発を図るにある。

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

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

第5条：本会に監事2名を置く。監事は会長が指名し、任期は2年とする。

第6条：本会に評議員若干名を置く。評議員は会長が委嘱し、任期は2年とする。

第7条：本会の事務所は慶應義塾大学医学部内に置く。

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

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

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

第11条：本会の会計年度は毎年1月1日から始まり、同年12月31日に終る。

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

第13条：本会則は総会の決議を経なければ変更することが出来ない。

雜 報

慶應医学会例会第 1409 回

日 時 平成 17 年 3 月 10 日 (木) 午後 6 時
場 所 リサーチパーク 5 階会議室
演 題 Current Perspectives in the Treatment of Early Stage NSCLC
演 者 Gary M Strauss, MD, MPH
Professor of Medicine, Rhode Island Hospital,
Brown Medical School, Providence, RI, USA
担 当 外科学教室

慶應医学会例会第 1410 回

日 時 平成 17 年 3 月 22 日 (火) 午後 5 時
場 所 皮膚科外来
演 題 Mechanisms of UV-induced immunosuppression
演 者 Thomas Schwarz, MD
Professor and Chairman, Department of
Dermatology and Allergology, University of
Kiel, Kiel, Germany
担 当 皮膚科学教室

慶應医学会例会第 1411 回 (開催延期)

日 時 平成 17 年 3 月 22 日 (火) 午後 7 時
場 所 総合医科学研究棟 8 階会議室
演 題 Evidence of Cardiac Differentiation of Bone Marrow Derived Side Population Cells
演 者 Do-Sun Lim, MD, PhD
Associate Professor, Cardiology Division, Korea
University Medical Center, Seoul, Korea
担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1412 回

日 時 平成 17 年 4 月 11 日 (月) 午後 6 時
場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ
演 題 The Role of Apoptosis in Acute Lung Injury
演 者 Sharon Rounds
ATS president, Professor of Medicine,
Providence VA Medical Center, Brown
University School of Medicine, RI, USA
担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1413 回

日 時 平成 17 年 4 月 13 日 (水) 午後 6 時 30 分
場 所 新棟中会議室
演 題 "Management of Displaced Radial Head Fractures" focused on Radical Head Arthroplasty, case report, long results, pitfall of surgical technique & biomechanics
演 者 Graham JW King, MSc, MD, FRCSC
Hand and Upper Limb Centre, St. Joseph's
Health Centre, Department of Orthopaedic
Surgery, Ontario, CA
担 当 整形外科学教室

慶應医学会例会第 1414 回

日 時 平成 17 年 4 月 14 日 (木) 午後 6 時
場 所 本館臨床講堂
演 題 US Practice for Colon Cancer Screening
演 者 Jack A Dipalma, MD
Professor, Gastroenterology Academic Offices,
University of South Alabama, Knollwood, AL,
USA
担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1415 回

日 時 平成 17 年 4 月 5 日 (火) 午後 5 時
場 所 東校舎講堂
演 題 Maturation of Glutamatergic Synapse and its Implication to Pediatric Neurological Disorders
演 者 Akira Yoshii, MD
Research Scientist, Constantine-Paton Lab,
Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA
Research Fellow, Pediatric Neurology Unit,
Department of Neurology, Massachusetts
General Hospital, Boston, MA, USA
担 当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1416 回

日 時 平成 17 年 4 月 22 日 (金) 午後 5 時
場 所 総合医科学研究棟 5 階 会議室 5
演 題 グルタミン酸作動性シナプスにおけるニューロン・グリア機能連関
演 者 小澤 滯司
群馬大学大学院医学系研究科神経生理学・群馬大学副学長
担 当 生理学教室

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

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

論文の受付

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

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9：00～午後 5：00

(土曜日は受付をしません)

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

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

論文原稿の作成上の注意

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

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

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT） 英語での表示とする。

1) 読者が一読して論文の主旨が明確にわかるもの。

2) 150 語ないし 200 語以内にまとめる。

3) ダブルスペースで A4 判の用紙にタイプする。

4) 題名にすでに表記されているものを最初の文章で繰り返さないこと。

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

6) 数字が文頭にある場合はスペルアウトし、文中ではアラビア数字を用いる。

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

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

略語は各分野を通じて周知のもの以外は使わない。

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

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

9. 見出しの振り方（参照例）

研究成績

1. 臨床的事項

1) 頻度

a) ……………

(1)……………

(i)……………

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

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

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

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

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

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

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

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

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

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

20. その他 詳細に関しては事務局に問い合わせ下さい。(2003年1月)

「学位申請論文」投稿の手引き

「学位申請論文」について

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

1. 学位取得の十分条件ではない。

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

2. 二重投稿が回避できる。

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

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

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

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

3. プライオリティーを主張することはできない。

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

論文作成上の注意

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

ある。

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT）は不要である。

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

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

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

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

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

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

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

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

なお、ご不明の点については事務局にお問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

編集後記

今こそ変革の時代あるいは変革を迫られている時代とは、どの時代の人も等しく口にする言葉のようですが、新研修制度の導入で否応なしに臨床業務が変革し、個人情報保護法の施行で臨床のみならず研究にも変革が迫られ、前例にもれず今という時代こそは特別と言いたくなりますが、変革に見えるものの真偽はおそらく retrospective にしか判定できないのでしょうか。いずれにせよ日常は続き慶應医学の発行も続きます。（村松太郎）

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 6 月 18 日 印刷

平成 17 年 6 月 25 日 発行

編 集 者 北 島 政 樹

発 行 者

印 刷 所 学術図書出版株式会社
電話 (3948) 7516 番

印 刷 者 富 田 進

発 行 所 慶 應 医 学 会

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地
慶應義塾大学医学部企画室
電話(3353)1211(大代)内線62766
振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

複写される方へ

本法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

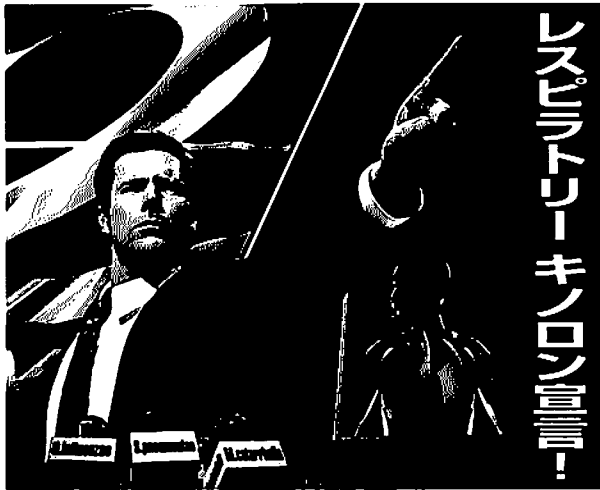
In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copy right owner of this publication.

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)

【薬価協会の取組】

*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(ブランハメラ)・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、シトロバクター属、クレブシエラ属、エンテロバクター属、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、アシネトバクター属、ブルセラ属、野兔病菌、カンピロバクター属、ヘブストレプトコッカス属、アクネ菌、Q熱リケッチア(コクシエラ・ブルネティ)、トラコーマクラミジア(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(副睾丸炎)、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、バルトロ腺炎、子宮内感染、子宮付属器炎、涙嚢炎、麦粒腫、睑板腺炎、外耳炎、中耳炎、副鼻腔炎、化膿性唾液腺炎、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*)
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、嚔痒等)
- (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、腎障害患者であられやすい)
 - (14) アキレス腱炎、腱断裂等の腱障害
(症状: 腱周辺の痛み、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*
過敏症	発疹等	浮腫、じん麻疹、熱感、光線過敏症、嚔痒等	
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、眠気、意識障害
腎臓	BUN上昇等	クレアチニン上昇	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、口渇、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/>

慶應医学 第82巻第2号別頁
平成17年6月25日

学位論文

慶應医学会

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

あづま 東 こういちろう 宏一郎

(平成 16 年 5 月 13 日受付)

Key Words : resistin, obesity, insulin resistance, body composition, single nucleotide polymorphism

背景

インスリンは血糖降下に働く唯一のホルモンである。血糖に応じた膵臓からのインスリン分泌と、インスリン作用臓器である筋肉・肝臓などでのインスリン感受性がバランスされることによって、血糖値は正常に維持される。インスリン分泌またはインスリン感受性の低下により両者のバランスがくずれると、高血糖となり糖尿病を発症する。最近の急激な糖尿病患者の増加の原因の一部は、肥満人口の増加で説明される¹⁾。肥満によりインスリン抵抗性が増大し、相対的なインスリン作用不足を生ずるためと考えられているのである。

肥満とインスリン抵抗性が関連する機序として、脂肪組織から分泌されるサイトカインが注目されている。従来、脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵庫と考えられていた。しかし、遺伝子解析から実際にはその発現蛋白の約 20-30% が分泌蛋白であり²⁾、摂食抑制に働く leptin、インスリン抵抗性改善、抗動脈硬化に働く adiponectin、逆にインスリン抵抗性を惹起する tumor necrosis factor- α (以下 TNF- α と略す)、interleukin-6 (以下 IL-6 と略す)、血栓形成に関係する plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) などを分泌する生体最大のホ

ルモン臓器であることが明らかになった。これら脂肪組織由来のサイトカインは総称して adipocytokine と呼ばれ、肥満により脂肪組織が増大した結果、adipocytokine の発現が変化することが、インスリン抵抗性につながると考えられている³⁾。

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のクローニングにより発見された adipocytokine である⁴⁾。脂肪細胞の成熟や、マウスの肥満化で発現が増大し、リコンビナント投与でインスリン抵抗性を惹起し、抗体投与でインスリン抵抗性を改善することも同時に示され⁴⁾、肥満とインスリン抵抗性を結び付けるホルモンと考えられている。当初は、肥満モデルマウスで resistin messenger RNA (以下 mRNA と略す) 発現が低下することや⁵⁾、マウス白色脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞でみたインスリン、糖、ステロイドの投与に対する resistin 発現の変化は報告により異なることから、その意義には不明の部分が多かった⁶⁾。しかし最近になり、resistin がインスリンによる肝臓の糖新生の抑制を阻害する⁷⁾、骨格筋における glucose transporter-4 (GLUT-4) 非依存性の糖とりこみを阻害する⁸⁾など、インスリン抵抗性改善の機序に関する報告がなされ、また生理的な血糖調

本論文は Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 11 : 997-1001, 2003 の一部, Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y, Mamizuka T, Murata M, Kikuchi H, Watanabe K, Katsukawa F, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Novel resistin promoter polymorphisms : association with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res* 36 : 564-570, 2004 の一部, 東宏一郎, 勝川史恵, 小口修司, 佐々木誠一, 小熊祐子, 成田和穂, 木下訓光, 石田浩之, 大西洋平, 山崎元, 島田朗, 猿田享男 : 肥満者におけるレジスチンと運動耐容能の検討. *日本臨床スポーツ医学会誌* 12 : 260-265, 2004 の一部および NCBI SNP database rs3219175-3219178 (ss4480589-4480592) を含む。

節への関与も示され⁹⁾, Steppan らの報告⁴⁾の裏付けがなされつつある。

一方, ヒトでの resistin の意義には不明な点が多い。ヒトでも, 脂肪組織中の resistin mRNA がインスリン抵抗性指数と関連する報告や¹⁰⁾, resistin mRNA が大腿脂肪に比べ腹部脂肪に多く含まれ, resistin と中心型肥満やインスリン抵抗性との関連を示唆する報告^{11), 12)}がある。しかし, 遺伝子および蛋白レベルでヒト resistin とマウス resistin の相同性は60%にすぎず¹³⁾, その機能, 発現部位が大きく異なる可能性も指摘されている¹⁴⁾, またヒトでの resistin のインスリン抵抗性改善メカニズムの報告はなく, resistin と肥満, インスリン抵抗性との関連を否定する報告や^{15), 16)}, ヒトでは resistin は脂肪細胞より単球系細胞で主に発現しているとする報告もある^{15), 16), 17), 18), 19)}。

Resistin 遺伝子多型については, 糖尿病患者と非糖尿病患者の間での多型頻度の比較が行われており, 差があるとする報告^{20), 21)}, ないとする報告^{22), 23), 24)}がある。また遺伝子多型と, 空腹時血糖・インスリンより求められるインスリン抵抗性指標との関連^{22), 25)}, body mass index (以下 BMI と略す) との関連²⁶⁾も報告されている。

本研究では, インスリン抵抗性に関して75g糖負荷試験による食後血糖・インスリンの評価, 体組成に関して水中体重秤量法を用いた体脂肪率・体脂肪量の評価, および腹部CTスキャンを用いた体脂肪分布の評価など, 対象の表現型をより詳細に検討したうえで, 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。上記 resistin 遺伝子多型と表現型の関連は, 非糖尿病患者で関連が強いこと^{22), 26)}, 肥満者で関連が強いこと^{20), 22)}が示唆されており, 本研究では非糖尿病肥満患者を対象とした。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

対象は当院肥満外来通院中の日本人男女70名(男36/女34)である。全例, 無投薬の症例で, 75g糖負荷試験を施行して糖尿病でないことを確認した。また, 事前に十分な説明と同意によるインフォームドコンセントを得た。

1. Resistin 血中濃度の臨床的検討は, 再診患者を除いた64名(男31/女33)を対象とし, 非肥満者15名とも比較した。64名中35名(男17/女18)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(男13/女25)で, 運動耐容能との関連を検討した。

2. Resistin 遺伝子の解析を, 70名中60名(男30/女30)で行い, 対象をインスリン抵抗性指数をもとにインスリン感受性群とインスリン抵抗性群各30名にわけて比較した。遺伝子解析研究は慶應義塾大学医学部倫理審査委員会で承認を得た。

方 法

1. Resistin 血中濃度の臨床的検討

体組成および体脂肪分布

体組成は, 水中体重秤量法(AD-6204; A&D社, 東京)を用いて評価した。すなわち, 水中体重より体密度を求め, 下記に示す Brozek の式より体脂肪を算出した。

$$\text{体脂肪率 (\%)} = (4.570/\text{体密度} - 4.142) \times 100$$

腹部体脂肪分布は, 臍部レベルでの腹部CTスキャンを用いて評価した。すなわち, 臍高部レベルの断面の脂肪面積(-150~-50 Hounsfield units)を内臓脂肪と皮下脂肪にわけて求めた。

インスリン感受性の評価および各種血液指標

180分の75g糖負荷試験を全例に行い, 血糖, 血中インスリン(IRI)をそれぞれ0, 30, 60, 90, 120, 180分, 0, 30, 60, 120, 180分に測定し, インスリン感受性を評価した。平均血糖と平均IRIは, それぞれ180分間の糖負荷試験中の血糖, IRI曲線面積を180(分)で割って算出したもので, 負荷試験中のそれぞれの平均を表し, 平均IRIはインスリン抵抗性の指標の一つである²⁷⁾。Homeostasis model assessmentを用いたインスリン抵抗性指標(以下HOMA-IRと略す)²⁸⁾も下記の式より算出した。

$$\text{HOMA-IR} = \text{空腹時血糖 (mg/dl)} \times$$

$$\text{空腹時 IRI (\mu U/ml)} / 405$$

各種血液サンプルは空腹時に採血を行った。血糖は glucose oxidase 法を, IRIは enzyme immunoassay (EIA) kit (東ソー社, 東京)を用いて測定した。

Resistin 血中濃度は, enzyme-linked immunosorbent assay (以下ELISAと略す) kit (Biovendor社, Czech Republic)を用いて測定した。TNF- α , IL-6 血中濃度も ELISA kit (Golden Bridge社, USA)を用いて測定した。

運動負荷試験

症候限界性運動負荷試験は独自に作成したプロトコル

ルで行った^{29), 30)}。すなわち 3.2 km/hr, 0%の傾斜より開始し, 2分間毎に傾斜を3%ずつ増加させ, Stage5にて12%の傾斜となった後, Stage6以降は速度を0.8 km/hrずつ増加させた。本プロトコルは, 初期負荷量および負荷量の増加を最初小さく設定しており, 生活習慣病の予防・治療の対象となる幅広いフィットネスレベルの患者で評価が可能なプロトコルである³¹⁾。

運動後60分以上休憩し, 安静時心拍数に戻ったのを確認したのち, 1.5%の傾斜でトレッドミルで歩行させ, 50%心拍予備能の速度を確認した。50%心拍予備能は1998年のアメリカスポーツ医学会のガイドライン³²⁾に照らして肥満者における運動処方として適した強度と考えられ, 以下の式で計算される。

$$50\% \text{心拍予備能} = \text{安静時心拍数} + (\text{最大心拍数} - \text{安静時心拍数}) \times 0.5$$

運動耐容能の指標として, 最大負荷時までの走行時間は身体的フィットネスの最も一般的な指標である最大酸素摂取量と強い正の相関があることが報告されており³³⁾, このプロトコルでの運動継続時間および50%心拍予備能での歩行速度を, 運動耐容能の指標とした³⁴⁾。

1.5年後の再評価

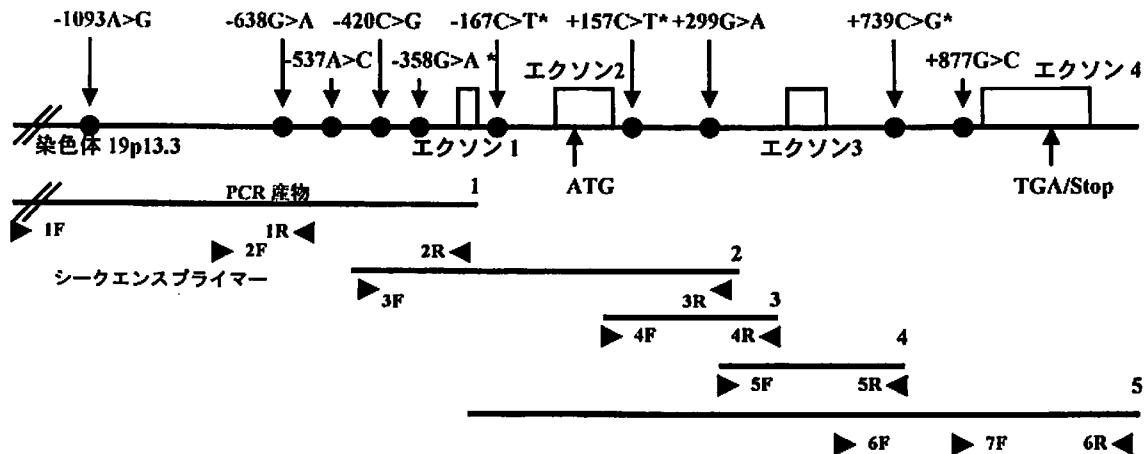
35名で, 1.5年間の食事と運動による介入後に上記

指標を再評価した。介入方法は, 食事は摂取エネルギー量を現在より500-1000 kcal減らすこと, 脂肪のエネルギー比率を20%にすることを指導した。運動は週に2-3回, 30分間, 50%心拍予備能の強度でウォーキングすることと, ほぼ毎日, 合計で30分以上身体活動を増やすことを指導した。1ヶ月毎の診察時に食事日記, 運動日記も用いて評価した。

2. Resistin 遺伝子の解析

Resistin-塩基遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism, 以下 SNP と略す) の同定

第1図, 第1表に示すように5対の polymerase chain reaction (以下 PCR と略す) 用のプライマーと13個のシーケンスプライマーを用いて resistin 遺伝子全体をシーケンスし, resistin SNPs の探索を行った。resistin エクソン1, 2, 3およびイントロン1, 2は, GenBank #AF325730のデータよりPCRプライマー2, 3, 4(第1表参照)を作成しPCR産物を得た。反応組成は0.5 μlの全血, 25 pmolの forward/reverse プライマー, 10 nmol/lの deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 10 μlの 5 × Ampdirect (島津製作所, 大阪), 10 μlの 5 × Ampaddition-1, 1.25 Uの Taq polymerase (東洋紡, 大阪)で, 蒸留水を加えて全量を50 μlとした。PCRはGene Amp PCR sys-



第1図 Resistin 遺伝子の構造と遺伝子多型の部位。

5'末端部位は翻訳開始部位を+1として定義した。Resistin 遺伝子は19番染色体に位置し, 3つの翻訳領域のエクソンと5'末端川の非翻訳領域の1つのエクソンよりなる (GenBank accession no. AF 325730)。黒線はPCR産物1-5を, 黒三角はシーケンスプライマー1F-7F, 1R-6F(第1表参照)の位置を, それぞれ表している。黒丸同定した遺伝子多型の部位を示し, そのうち*印のついた多型はNCBI SNP databaseに以前報告している (Reference SNP ID: rs3219175-3219178, NCBI Assay ID: ss4480589-448059s)。 (Azuma K, et al: Horm Metab Res (in press) の Figure 1 を許可を得て転載)

第1表 PCRプライマーとシーケンスプライマー塩基配列3

PCRプライマー		塩基数
プライマー1 (プロモーター)	Forward 5' GGCAGTGGTGGCTACATAACA 3' (-2134/-2114) Reverse 5' CGCAGGAGCAGCTGTCACCTAC 3' (-184/-205)	1951
プライマー2 (エクソン1, 2)	Forward 5' ACTCTGCTTGTCTACCTGTT 3' (-507/-488) Reverse 5' TGTCTTGAGTTGGGTGTTTT 3' (365/346)	872
プライマー3 (イントロン2)	Forward 5' GAGAGGATCCAGGAGGTCG 3' (88/106) Reverse 5' GTGAGACCAAACGGTCCCT 3' (460/442)	373
プライマー4 (エクソン3)	Forward 5' CCCGCTCTCACTCCAAACCT 3' (315/334) Reverse 5' GAGGCTCCAACCACTGAATG 3' (774/755)	460
プライマー5 (エクソン2, 3, 4)	Forward 5' GGAATTCGTGTGCCGGATTTT 3' (-248/-229) Reverse 5' CCATAGGAGGAAGGGCGATG 3' (1259/1278)	1526
シーケンスプライマー		
プライマー1F	Forward 5' AAAGGCCCGTTGTACTGGAA 3' (-1271/-1252)	プロモーター
プライマー1R	Reverse 5' TTGCTAGGCATGGTGC GGAC 3' (-555/-574)	
プライマー2F	Forward 5' GCTCATGGGCATTTGGGTAT 3' (-776/-757)	プロモーター
プライマー2R	Reverse 5' CCTCTCGGTGGGCTCAGCTA 3' (-206/-225)	
プライマー3F	Forward 5' GGGCACCACCTCTGACCAG 3' (-456/-437)	エクソン1, 2
プライマー3R	Reverse 5' TTGGGTTTGGAGCCGTGGAT 3' (312/293)	
プライマー4F	Forward 5' GAGAGGATCCAGGAGGTCG 3' (88/106)	イントロン2
プライマー4R	Reverse 5' GTGAGACCAAACGGTCCCT 3' (460/442)	
プライマー5F	Forward 5' CCCGCTCTCACTCCAAACCT 3' (315/334)	エクソン3
プライマー5R	Reverse 5' GAGGCTCCAACCACTGAATG 3' (774/755)	
プライマー6F	Forward 5' CGCCCATTTCTGTTCCAAGT 3' (599/618)	エクソン4
プライマー7F	Forward 5' TGTGTTCCGGGCTGCAGGCT 3' (876/894)	
プライマー6R	Reverse 5' GTAGAAAGTCGCGGTGTCCC 3' (1253/1234)	
SNuPeプライマー		
-1093	Reverse 5' GCACCATAGCAAGACTCCA 3' (-1074/-1092)	プロモーター
-638	Forward 5' TGTGATCATAAGTCACTGTAGCTTC 3' (-663/-639)	プロモーター
-420	Forward 5' CCTGACCAGTCTCTGGACATGAAGA 3' (-445/-421)	プロモーター
-358	Reverse 5' CCCACATCCGGGGCCAAGAGGAAGC 3' (-333/-357)	プロモーター
-167	Forward 5' GCGCTTGCCATGGCACCAG 3' (-186/-168)	イントロン1
157	Forward 5' GGCAAGCTCCCAAGGGTCT 3' (137/156)	イントロン2
739	Forward 5' CTGGACACTGGTGTCCACCCTCACT 3' (714/738)	イントロン3
877	Forward 5' CCCAGCTCAGAGTCCACGCTCCT 3' (854/876)	イントロン3

(Azuma K, et al : Horm Metab Res (in press) の Table 2 を許可を得て転載)

tem 2400 (Perkin Elmer 社, USA) を用いて, 80°C 15分1サイクル, 94°C4.5分1サイクル, 94°C0.5分/56°C1分 (プライマー2, 3) もしくは60°C1分 (プライマー1)/72°C1分を40サイクル, 72°C7分を1サイクルで行った. プロモーター領域およびエクソン4は上述の方法でPCR増幅できなかったため, ゲノムDNAを末梢血より抽出・精製の上, 前者はEx Taq polymerase (タカラ酒造, 東京), 後者はKOD plus (東洋紡)+5%dimethyl sulphoxide (DMSO) をpolymeraseとして用いた. 前者の反応プロトコールは94°C4.5分1サイクル, 94°C0.5分/65°C1分/72°C1分を35サイクル, 72°C4分1サイクルで, 後者は94°C

2分1サイクル, 94°C0.25分/60°C0.5分/68°C2分を35サイクルとした. PCR産物を精製後, DYEnamic ET dye terminator kit (Amersham Pharmacia Biotech 社, USA) を用いてMegaBACE1000 (Amersham Pharmacia Biotech 社) でダイレクトシーケンスを行い, 塩基の決定を行った. 見出されたSNPs候補につき, MegaBACE SNuPe Genotyping kit (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて第1表に示すSNuPeプライマーでSNPsタイピングを行った. なお, -537A>C, +299G>A多型に関してはこの方法でタイピングは行っておらず, ダイレクトシーケンスによる確認のみである.

Resistin プロモーター領域の SNPs による転写調節

900 塩基対の DNA 断片 (-1094/-194 塩基) を PCR で増幅した後、TA cloning kit (Invitrogen 社, USA) を用いてプラスミドを作成し、Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE 社, USA) を用いて-638G 塩基から-638A 塩基、-420C 塩基から-420G 塩基への点突然変異を有するプラスミドを作成した。-638G>A、-420C>G 塩基のみ異なる 4 種類のプラスミドをそれぞれ、ホタル由来の発光物質 (firefly luciferase) を発現するレポータープラスミドでプロモーターやエンハンサーをもたない pGL3-Basic (Promega 社, USA) と、制限酵素断端 (MluI および XhoI, 東洋紡) を用いてライゲーションし、4 種類のレポータープラスミド、すなわち pGL3 (-638G/-420C), pGL3 (-638A/-420C), pGL3 (-638G/-420G), pGL3 (-638A/-420G) を作成した。ダイレクトシーケンスで-638G>A および-420C>G 以外に変異のないことも確認した。

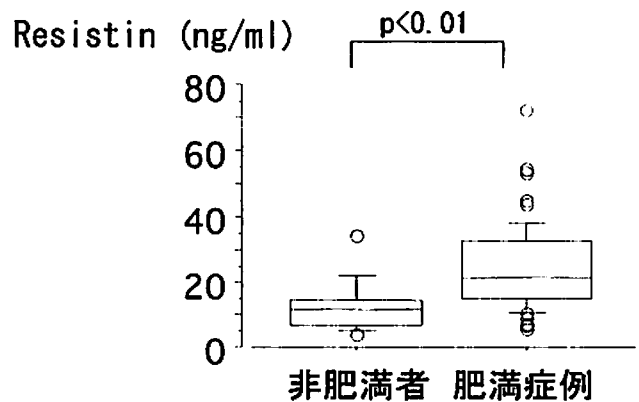
ヒトでは、resistin はマウスとちがいで、脂肪細胞よりむしろ単球系細胞から発現されていると報告されている^{14), 17), 18), 19)}。そこで 3T3-L1 細胞 (American Type Culture Collection CCL92.1; ATCC, USA) だけでなく、ヒト単球系細胞由来の THP-1 細胞 (American Type Culture Collection TIB202; ATCC) およびヒト脂肪細胞 (F-SP-F; Zen-Bio 社, USA) へ FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics 社, USA) を用いてトランスフェクション法により遺伝子導入を行った。Luciferase 活性の測定は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いてマニュアルにそって行った。4 種類の pGL3 プラスミドのほかに、pGL3-Basic と、エンハンサーおよびプロモーターをもつ pGL3-Control を luciferase 活性比をみるために用い、さらに、ウミシイタケ由来の発光物質 (renilla luciferase) を発現するレポータープラスミドを pGL3 プラスミドと共にトランスフェクションさせることで、トランスフェクション効率の補正を行った。トランスフェクション 48 時間後にホタルおよびウミシイタケの発光度 (luciferase 活性) を測定し、4 種類の pGL3 プラスミドに対応した resistin プロモーターの転写活性を下記のように計算した; luciferase 活性 (relative luciferase activity, %) = $\frac{\{(pGL3 \text{ プラスミド}) - (pGL3\text{-Basic})\} \times 100}{\{(pGL3\text{-Control}) - (pGL3\text{-Basic})\}}$ 。THP-1 細胞, 3T3-L1 細胞の両者で、予備実験において、pGL3 (-638A/-420G) の luciferase 活性はその他 3 種類の pGL3 プラスミドの活性より高い

ことを確認した上で、pGL3 (-638A/-420G) と pGL3 (-638G/-420C) の luciferase 活性をくり返し測定した。pGL3 (-638A/-420G) は変異 P、pGL3 (-638G/-420C) は正常 P と定義した。

統計

統計解析は Macintosh 用の Stat View プログラム (version 5.0-J; SAS Institute 社, USA) で行った。すべてのデータは平均値±標準偏差として表し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と解釈した。

(対応のない) 2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を、対応のある 2 群間の比較 (介入前後での比較) には Wilcoxon 検定を、(対応のない) 3 群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。2 変量の相関の検討は Spearman's correlation coefficient を用いた。年齢や性での補正など、Stepwise 回帰分析を行う際には、データを対数化して、Shapiro-Wilk's W 検定で正規性を確認したのち、解析を行った。比率の比較には χ^2 検定を用いた。連鎖不平衡 (D) は文献^{35), 36)}に従い求めた。Luciferase 活性は正常 P と変異 P の間で、トランスフェクションした日時による変動を除くためこれを共変量として共変量分散分析で比較した。



第2図 Resistin 血中濃度の比較。

Resistin 血中濃度 (平均±標準偏差) は肥満症例で 24.6 ± 12.9 ng/ml (5.6~72.4) と、非肥満者 12.8 ± 8.3 ng/ml (3.7~34.6) と比較して有意に高値であった。(Azuma K, et al: *Obes res* 11: 997-1001, 2003 の Figure 1 を許可を得て転載)

第2表 患者背景ならびに血中濃度との相関

	平均±標準偏差	範囲	p	p
性別 (男/女)	31/33		-	-
年齢 (歳)	32±10	20~53	-0.14	0.27
BMI	32.9±5.6	24.9~56.2	0.14	0.26
体脂肪率 (%)	36.6±8.1	17.8~55.3	0.24	0.06
体脂肪量 (kg)	33.6±11.6	13.9~79.8	0.17	0.18
除脂肪体重 (kg)	57.2±11.9	34.5~89.3	-0.11	0.41
内蔵脂肪面積 (cm ²)	145±54	65~272	0.08	0.55
皮下脂肪面積 (cm ²)	365±135	151~655	0.19	0.14
空腹時血糖 (mg/dl)	93±9	62~113	-0.01	0.95
空腹時 IRI (μU/ml)	14±7	3~33	0.12	0.36
HOMA-IR	3.2±1.8	0.6~7.8	0.12	0.36
平均血糖 (mg/dl)	127±19	88~172	0.11	0.39
平均 IRI (μU/ml)	75±39	27~176	0.14	0.26
TNFα (pg/ml)	2.23±2.57	0.76~21.2	0.04	0.77
IL-6 (pg/ml)	0.81±1.37	<0.15~7.54	0.17	0.18
Resistin (ng/ml)	24.6±12.9	5.6~72.4	-	-
(非肥満者)				
性別 (男/女)	10/5			
年齢 (歳)	36±10	24~52		
BMI	21.1±1.3	18.8~23.7		
Resistin (ng/ml)	12.8±8.3	3.7~34.6		

(Azuma K, et al : Obes res 11 : 997-1001, 2003 の Table 1 の一部を許可を得て転載)

第3表 介入前後の臨床的特徴の変化 (35名, 男17/女18)

	前値	介入後	変化率 (%)	
			平均±標準偏差	範囲
BMI	33.1±6.2	31.6±5.8*	-4.0±9.8	-22.7~16.8
体脂肪率 (%)	36.3±9.1	34.4±7.7*	-5.4±13.8	-34.5~24.5
体脂肪量 (kg)	33.4±13.7	30.0±10.9*	-6.5±21.2	-35.2~40.8
除脂肪体重 (kg)	57.0±11.7	56.3±11.7	-1.2±5.5	-17.5~6.6
内蔵脂肪面積 (cm ²)	144±55	130±60	-4.3±39.7	-65.6~90.7
皮下脂肪面積 (cm ²)	353±137	327±131*	-4.5±22.2	-46.5~49.5
空腹時血糖 (mg/dl)	97±9	92±12*	-4.0±11.8	-26.7~48.4
空腹時 IRI (μU/ml)	15±8	12±7*	-10.4±42.1	-70~100
HOMA-IR	3.40±1.94	2.24±1.19*	-11.1±50.5	-75~129.3
平均血糖 (mg/dl)	135±21	126±22	-9.2±18.6	-67~15.4
平均 IRI (μU/ml)	86±44	68±41*	-16.8±30.4	-65~42.6
TNFα (pg/ml)	2.6±3.4	2.1±2.9*	-16.3±35.2	-77.4~78.0
IL-6 (pg/ml)	1.1±1.7	1.5±2.5	91.0±372.7	-100~2000
Resistin (ng/ml)	24.06±15.64	22.74±15.00	-1.4±40.5	-49.5~162.6

*印は介入前後の値を Wilcoxon 検定を用いて比較し有意差を認めたものを示した (p<0.05).
(Azuma K, et al : Obes res 11 : 997-1001, 2003 の Table 2 の一部を許可を得て転載)

結 果

1. Resistin 血中濃度の臨床的検討

肥満症例の resistin 血中濃度は非肥満者に比し高値であった (24.58 ± 12.93 ng/ml ; n=64 vs. 12.83 ± 8.30 ng/ml ; n=15 ; $p < 0.01$, 第2図)。非肥満者と肥満症例を合わせた検討でも resistin 血中濃度は BMI と正相関し、年齢と性で補正してもなお有意であった ($p < 0.01$)。

しかし、肥満症例に限った断面的検討では resistin 血中濃度は年齢、性、BMI、体組成、体脂肪分布、HOMA-IR、75 g OGTT 中の平均血糖・平均 IRI、TNF- α 、IL-6 のいずれとも相関しなかった (第2表)。ただし、resistin 血中濃度は体脂肪率とは弱い正の相関が示唆された ($p = 0.06$)。

このうち 35 名で 1.5 年の食事と運動による減量介入を行った。平均 4 % の体重減少があり、全体として体組成やインスリン抵抗性の著明な改善を認めた (第3表)。減量プログラム後に体重増加を認めるものもあり、体脂肪量が 1 kg 以上減少したものを改善群 (21 名)、減少しなかったもしくは増加したものを非改善群 (14 名) として 2 群にわけると、改善群では体重は平均 10% 減少しており、非改善群では平均 5 % 体重増加を認めた。Resistin 血中濃度は介入の前後で、全体として変化しなかったが、改善群では有意に低下し ($-17 \pm 19\%$, $p < 0.01$)、非改善群では増加した ($23 \pm 52\%$, 第3図)。そして、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、平均血糖、平均 IRI のそれぞれの変化率と正相関し、年齢、性および介入前の体重で補正してもなお有意であった (第4表)。Stepwise 回帰分析を行うと resistin 血中濃度の変化率は体脂肪量の変化率とのみ有意に相関した ($R^2 = 0.286$)。

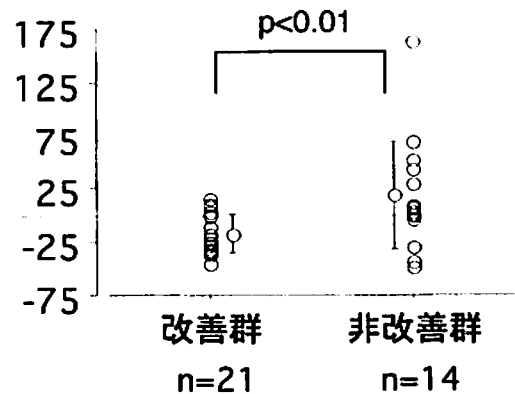
第5表に示した 38 名で、前述のプロトコルでの運動継続時間は平均 16.4 分で、50%心拍予備能での歩行速度は 4.9 km/hr であり、両者には有意な正相関があった ($r = 0.65$, $p < 0.01$)。運動継続時間、歩行速度ともに、体組成の指標である BMI、体脂肪率、体脂肪量、および皮下脂肪面積と負の相関があった (第6表)。また、歩行速度は身長および除脂肪体重と正相関し、一方運動継続時間は体重と弱い負の相関があった (第6表)。インスリン抵抗性の指標である空腹時 IRI、HOMA-IR、平均 IRI と、運動耐容能との関連をみると、歩行速度が空腹時 IRI と弱い負の相関を示したほかは、相関がなかった (第6表)。Resistin 血中濃度も運動継続時間、歩行速度と相関しなかった (第6表)。

2. Resistin 遺伝子の解析

Resistin SNPs の同定

対象は若年 (平均年齢 32 ± 10 才)、非糖尿病かつ肥満 (平均 BMI 33 ± 5) の 60 名であった (第7表参照)。全例での resistin 遺伝子全体のシーケンススクリーニングおよび SNP タイピングの結果、プロモーター領域に 5 個、イントロン領域に 5 個、計 10 個の non-coding resistin SNPs を同定した (第1図)。このうち、

Resistin 変化率 (%)



第3図 改善群と非改善群

1.5 年の食事と運動による介入後、体脂肪量が 1 kg 以上減少した場合を改善、減少しなかったもしくは増加した場合を非改善とすると、改善群では resistin 血中濃度は有意に低下し ($-17 \pm 19\%$, $p < 0.01$)、非改善群では増加した ($23 \pm 52\%$)。

第4表 Resistin の変化率と各種パラメータの変化率との相関

	ρ	p	p^*
BMI	0.39	0.02	<0.01
体脂肪率	0.4	0.03	<0.01
体脂肪量	0.44	0.02	<0.01
除脂肪体重	0.2	0.26	
内臓脂肪面積	0.5	<0.01	0.01
皮下脂肪面積	0.32	0.06	
空腹時血糖	0.29	0.08	
空腹時 IRI	0.26	0.12	
HOMA-IR	0.27	0.11	
平均血糖	0.4	0.02	0.03
平均 IRI	0.5	<0.01	0.01
TNF α	0.25	0.14	
IL-6	0.13	0.45	

p^* は stepwise 回帰分析を用いて性、年齢、BMI で補正した値を示した。(Azuma K, et al : Obes res 11 : 997-1001, 2003 の Table 3 の一部を許可を得て転載)

第5表 運動耐容能検討症例

	平均±標準偏差
性別 (男/女)	13/25
年齢 (歳)	33±9
BMI	33.1±4.8
体脂肪率 (%)	38.2±6.9
体脂肪量 (kg)	33.5±8.9
除脂肪体重 (kg)	53.7±9.9
内蔵脂肪面積 (cm ²)	147±48
皮下脂肪面積 (cm ²)	375±139
運動継続時間 (分)	16.4±3.1
歩行速度 (km/hr)	4.9±0.6
空腹時血糖 (mg/dl)	94±10
空腹時 IRI (μU/ml)	15±7
HOMA-IR	3.5±1.6
平均血糖 (mg/dl)	132±21
平均 IRI (μU/ml)	80±41
Resistin (ng/ml)	24.3±14.4

(東宏一郎, 他: 日本臨床スポーツ医学会誌 12: 260-265, 2004 の表2の一部を許可を得て転載)

第6表 運動耐容能と各種パラメータとの相関

	継続時間		歩行速度	
	ρ	p	ρ	p
年齢	0.03	0.85	0.16	0.34
身長	0.27	0.11	0.62	<0.01
体重	-0.35	0.04	-0.22	0.18
BMI	-0.57	<0.01	-0.67	<0.01
体脂肪率	-0.56	<0.01	-0.79	<0.01
体脂肪量	-0.61	<0.01	-0.70	<0.01
除脂肪体重	0.02	0.92	0.35	0.04
内蔵脂肪面積	-0.10	0.54	-0.05	0.76
皮下脂肪面積	-0.56	<0.01	-0.71	<0.01
空腹時血糖	0.06	0.71	0.14	0.40
空腹時 IRI	-0.22	0.20	-0.38	0.03
HOMA-IR	-0.19	0.26	-0.26	0.12
平均血糖	0.11	0.72	-0.11	0.35
平均 IRI	-0.24	0.73	-0.12	0.33
Resistin	<-0.01	0.99	-0.11	0.52

(東宏一郎, 他: 日本臨床スポーツ医学会誌 12: 260-265, 2004 の表3の一部を許可を得て転載)

第7表 Resistin 遺伝子検討症例

	インスリン感受性群	インスリン抵抗性群	p
年齢 (歳)	31.9±9.7	32.3±9.6	NS
性別 (男/女)	15/15	15/15	
BMI	32.6±4.9	32.8±4.6	NS
体脂肪率 (%)	36.2±7.8	36.7±6.9	NS
体脂肪量 (kg)	32.9±9.2	33.0±9.1	NS
除脂肪体重 (kg)	58.0±12.9	56.5±10.6	NS
内蔵脂肪面積 (cm ²)	156.5±51.9	138.3±50.2	NS
皮下脂肪面積 (cm ²)	353.4±130.2	363.8±131.9	NS
空腹時血糖 (mg/dl)	89.7±7.5	96.6±7.9	p<0.001
空腹時 IRI (μU/ml)	10.1±4.3	17.8±6.0	p<0.001
HOMA-IR	2.22±0.98	4.22±1.40	p<0.001
平均血糖 (mg/dl)	119.5±15.4	132.4±18.2	p<0.001
平均 IRI (μU/ml)	56.6±24.5	90.1±38.8	p<0.001
総コレステロール (mg/dl)	202.4±41.8	203.8±34.2	NS
中性脂肪 (mg/dl)	116.1±53.4	127.1±62.0	NS
HDL コレステロール (mg/dl)	47.2±2.1	47.6±2.2	NS
LDL コレステロール (mg/dl)	130.2±27.9	132.0±37.0	NS
TNFα (pg/ml)	1.80±0.79	1.88±0.83	NS
IL-6 (pg/ml)	1.00±1.94	0.56±0.55	NS
Resistin (ng/ml)	23.8±9.1	24.0±15.1	NS

第8表 SNPとインスリン感受性

		Genotypes, n			p 値	Alleles, n		p 値
-1093A>G		AA	AG	GG	0.18	A	G	0.2
	IR	27	3	0		57	3	
	IS	22	8	0	52	8		
-638G>A		GG	GA	AA	0.86	G	A	0.82
	IR	18	11	1		47	13	
	IS	20	9	1	49	11		
-537A>C		AA	AC	CC	>0.99	A	C	>0.99
	IR	28	2	0		58	2	
	IS	28	2	0	58	2		
-420C>G		CC	CG	GG	0.78	C	G	>0.99
	IR	11	18	1		40	20	
	IS	12	16	2	40	20		
-358G>A		GG	GA	AA	0.86	G	A	0.82
	IR	18	11	1		47	13	
	IS	20	9	1	49	11		
-167C>T		CC	CT	TT	0.49	C	T	0.49
	IR	30	0	0		60	0	
	IS	29	1	0	59	1		
157C>T		CC	CT	TT	0.3	C	T	0.32
	IR	27	3	0		57	3	
	IS	24	6	0	54	6		
299G>A		GG	GA	AA	0.29	G	A	0.25
	IR	9	18	3		36	24	
	IS	15	13	2	43	17		
739C>G		CC	CG	GG	0.7	C	G	0.58
	IR	10	9	11		29	31	
	IS	11	11	8	33	27		
877C>G		CC	CG	GG	0.39	C	G	0.21
	IR	20	8	2		48	12	
	IS	15	11	4	41	19		

IR：インスリン抵抗性群

IS：インスリン感受性群

-358G>A 多型, -167C>T 多型, +157C>T 多型, +739C>G 多型の4つのSNPsは, National Center for Biotechnology Information (以下NCBIと略す) SNP databaseへ新しいSNPsとして登録を行った (Reference SNP ID: rs3219175-3219178, NCBI Assay ID: ss4480589-4480592).

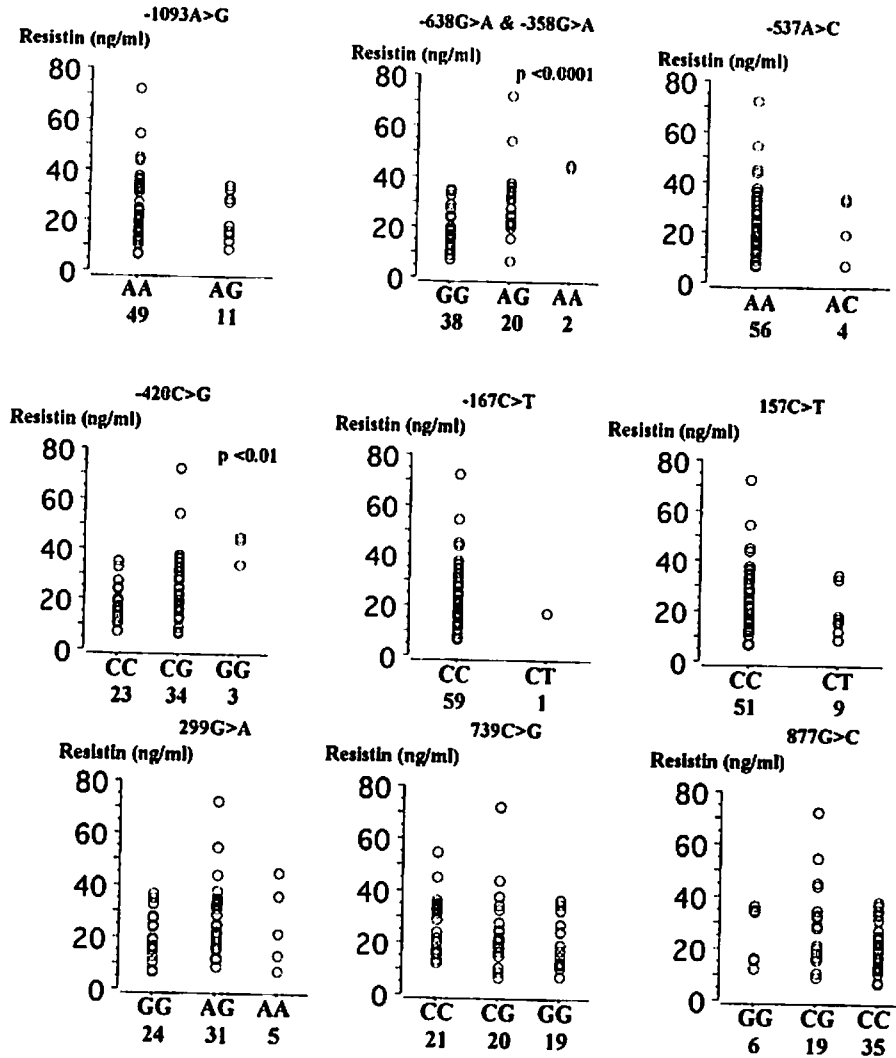
なお, 本症例での-638G>A多型, -358G>A多型のallele頻度(0.20)は, 白人での報告に比べ(0.01以下)極めて高かったが, 白人での報告同様に両多型は100%連鎖不平衡した。299G>A, 877G>Cのallele頻度も白人での報告に比して高かった(0.34, 0.74)。

Resistin SNPsとインスリン抵抗性, 体組成との関連

インスリン感受性群とインスリン抵抗性群の比較では, インスリン抵抗性指標をのぞき年齢, 性別, 体組成, 体脂肪分布にほとんど差を認めなかった(第7表)。両群間でこれら10個のSNPsの頻度の違いを検討したが, いずれのSNPsもgenotype/allele頻度に両群間で差がなかった(第8表)。さらに, それぞれのSNPでgenotype毎に各種指標の群間比較を行ったが, 各SNPと各種指標の間に明らかな関連は認められなかった。

Resistin SNPsとresistin血中濃度の関連

プロモーター領域の多型である-638G>A/-358G>



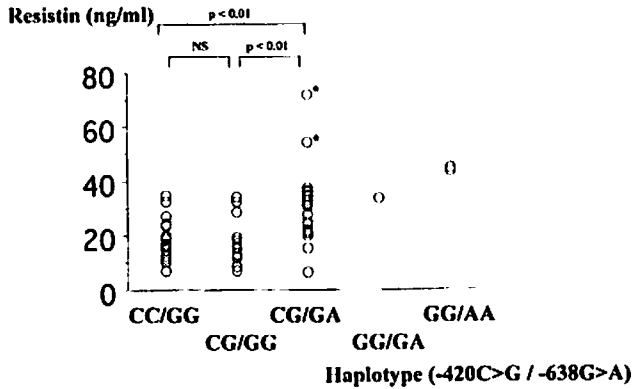
第4図 Resistin 遺伝子多型と血中濃度の関連。

各々の遺伝子型の下に数字はそれぞれの人数を表す。Mann Whitney U 検定もしくは Kruskal-Wallis 検定を行い、p 値を求めた。-638G>A 多型、-420C>G 多型、および-358G>A 多型と resistin 血中濃度の間に有意な相関があった。-638G>A 多型と-358G>A 多型は 100%連鎖していた。(Azuma K, et al : Horm Metab Res 36 : 564-570, 2004 の Figure 2 を許可を得て転載)

A 多型および-420C>G 多型と resistin 血中濃度との間に有意な関連が認められた (第4図)。これをさらに詳しくみると、-638G>A/-358G>A 多型は-420C>G 多型と強い連鎖不平衡があり ($\delta=0.71$)、-420C>G 多型単独では resistin 血中濃度と相関せず、-638G>A/-358G>A 多型との組み合わせで血中濃度と相関した (第5図)。

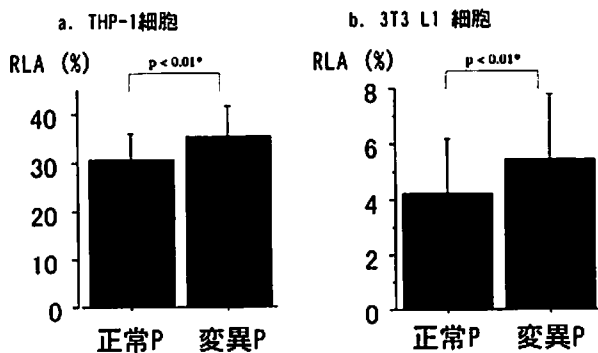
-638G>A 多型と-420C>G 多型の組み合わせが resistin 転写活性におよぼす影響: *in vitro* での検討

まず、100%連鎖不平衡している-638G>A 多型と-358G>A 多型について、転写因子結合部位予測ソフトの TF search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) を用いて検討すると、-638G から-638A への変異は2箇所の heat shock transcription factor (HSF) の認識部位の消失をもたらすのに対して、-358G から-358A への変異は転写因子結合部位の増加、



第5図 Haplotype (-420C>G/-638G>A) と resistin 血中濃度。

-420C>G 多型と-638G>A 多型は連鎖しており ($\delta = 0.71$)、両者を組み合わせて血中濃度との関連をみると、両多型ともに変異のある-420CG/-638GA 群は-638G>A 多型に変異のない-420CC/-638GG 群もしくは-420CG/-638GA 群と比較して血中濃度が高値であった。この違いは*印で示した血中濃度高値の2例を除いて検討しても優位であった。一方で、-420C>G 多型にのみ変異を認める-420CG/-638GG 群は両多型に変異のない-420CC/-638GG 群と血中濃度に差を認めなかった。



第6図 -420C>G 多型と-638G>A 多型のプロモーター解析

THP-1 細胞 (a) と 3T3 L1 細胞 (b) において luciferase アッセイを用いて転写活性を測定した。PGL3 (-638G/-420C) は正常 P, pGL3 (-638A/-420G) は変異 P と定義した。Luciferase 活性は、RLA (relative luciferase activity) = $\frac{(\text{正常 P もしくは変異 P}) - (\text{pGL3-Basic})}{(\text{pGL3-Control}) - (\text{pGL3-Basic})} \times 100$ として求めた。統計は、トランスフェクションを行った日時を共変量として共変量分散分析を用いた。P 値は Fisher's PLSD より求めた。(Azuma K, et al: Horm Metab Res 36: 564-570, 2004 の Figure 3 を許可を得て転載)

消失を引き起こさなかった。ゆえに、プロモーター解析は-638G>A に限って行った。

そして、luciferase アッセイの結果、変異 P の luciferase 活性は、THP-1 細胞、3T3-L1 細胞のいずれにおいても正常 P の活性に比べて高く (第6図 a, b)、*in vitro* でも-638G>A 多型と-420C>G 多型の組み合わせが resistin 転写活性に影響をおよぼすと考えられた。ヒト白色脂肪細胞を用いた場合には、pGL3-Control の活性も低く、両プラスミド間で luciferase 活性の差はなかった。

考 察

本研究では、肥満およびインスリン抵抗性との関連が示唆されている肥満・糖尿病関連遺伝子 resistin について、若年非糖尿病肥満者を対象としてその表現型を詳細に検討した上で、resistin 血中濃度、resistin SNPs との関連を検討した。

非肥満者をふくめた断面的検討で resistin 血中濃度は BMI と正相関し、肥満症例の長軸的検討で、resistin 血中濃度の変化率は BMI の変化率だけでなく、体脂肪量の変化率ともしっかり正相関する結果が得られた。肥満症例に限った断面的検討で、resistin 血中濃度と体組成、体脂肪分布との間に相関がなかったのは、症例がすべて肥満で、体組成がかなり均一な集団であったためと考えられた。

長軸的検討で、resistin 血中濃度の変化率と平均 IRI の変化率も正相関した。インスリン抵抗性の指標として HOMA-IR がより一般的であるが、食後高インスリン血症も反映する平均 IRI は本症例のように正常耐糖能ないし軽度耐糖能異常の症例ではインスリン抵抗性を表す指数として最も優れた指標の1つであると考えられている²⁷⁾。本症例では空腹時血糖が正常にもかかわらず食後高血糖を示す症例が 30%にも達しており、空腹時 IRI に比べ、平均 IRI がきわめて高値で、食後高血糖による食後高インスリン血症がみられた。さらに、1.5 年間の食事と運動による減量介入の前後で、平均 IRI の変化率 (改善率) は HOMA-IR の変化率より大きく (17%, 11%)。減量にとまなうインスリン感受性の変化をより敏感に反映していた。なお断面的検討で resistin 血中濃度と平均 IRI が相関しなかった理由として考えられるのは、インスリン抵抗性にはさまざまな要因が関係し個人差が大きいことである。実際に肥満とインスリン抵抗性の関連について個人の長軸的な体重変化にともなって認められるインスリン抵抗性の変化は、集団の断面的検討で認

められる両者の関連の2.4~4.5倍大きいことが報告されている^{37), 38)}。

Resistin 血中濃度については、我々の報告³⁹⁾と同様に体組成やインスリン抵抗性と関連があるとする報告^{40), 41), 42), 43), 44), 45), 46)}がある一方、ないとする報告^{47), 48), 49), 50), 51), 52)}もあり、一定の見解を得ていない。少数例の検討が多いこと、断片的検討が多いことなどがその原因として考えられる。

運動耐容能と resistin の関連はこれまで検討されておらず、本研究では、運動耐容能の指標として運動継続時間、歩行速度を用いて行った。運動継続時間、歩行速度は、全身的な体脂肪蓄積の指標(BMI, 体脂肪率, 体脂肪量, 皮下脂肪面積)と負の相関があったが、インスリン感受性とは関連を認めなかった。対象者数が少なく体組成やインスリン感受性に関して比較的均一な集団であること、男女別の検討を行っていないことなどがその理由としてあげられる。Resistin 血中濃度も、運動継続時間、歩行速度と相関せず、体組成、体脂肪分布、インスリン抵抗性の指標とも相関しなかった。Adiponectin についても運動によるインスリン抵抗性改善機序との関連は明らかでなく^{53), 54)}、運動とインスリン抵抗性との関連は adipocytokine 以外の因子を介したものと推察された。今後、正常体重者を含め症例数を増やし、かつ縦断的な検討を行うことが必要と考えた。

Resistin SNPs と表現型との関連では、同一の SNPs (-420C>G, +299G>A) の解析でも、体組成や糖尿病のリスクと関連する報告^{26), 20)}、しない報告^{10), 23)}があり、一定の見解を得ていない。我々の検討では、10個の resistin SNPs を同定したが、いずれも、表現型との間に明らかな関連がなかった。同定した SNPs はいずれも non-coding region の SNPs で、蛋白の機能に直接影響を与える変異ではなかったこと、対象が体組成などに関して比較的均一で、60名という少数例での検討であり、検出力が十分でなかったことが影響している可能性が考えられた。

Resistin SNPs と resistin 血中濃度の関連では、発現量に影響を与えるプロモーター領域で同定された -638G>A 多型および -420C>G 多型と resistin 血中濃度との間に有意な関連があった。-420C>G 多型が脂肪組織中の mRNA 発現量と関連するとの報告があるが¹⁰⁾、我々の検討では -420C>G 多型単独ではなく、-420C>G 多型と -638G>A 多型の組み合わせが重要であることが、luciferase アッセイを用いた *in vitro* の検討でも示された⁵⁵⁾。-638G>A 多型が白人ではきわめてまれであることが相違の原因として考えられた。

Resistin はマウスでインスリン抵抗性をひきおこす adipocytokine として同定されたものの、マウスとヒトでは相同性が低く¹³⁾、ヒト resistin は、19番染色体の炎症関連遺伝子座にあること¹³⁾、マウスと異なり脂肪細胞でなく単球からの発現が多いこと^{17), 18), 19)}、などからインスリン抵抗性よりむしろ炎症との関連が指摘されている。しかし、最近になり炎症とインスリン抵抗性や肥満は相互に非常に強く結びついていることも明らかになってきている。たとえば脂肪組織中の単球は、BMI や脂肪細胞の大きさに比例して増加し⁵⁶⁾、TNF- α 、IL-6 といったインスリン抵抗性を惹起する adipocytokine を分泌することが報告されている^{17), 56)}。脂肪前駆細胞が一定の条件下で単球になるとする報告もある⁵⁷⁾。さらに、チアゾリジン系薬剤によるインスリン抵抗性改善作用の一部は単球由来の TNF- α 、IL-6 の発現が抑制されることによる可能性も報告されている⁵⁸⁾。また肥満に伴う炎症が、インスリン抵抗性に先だてて生じることや⁵⁹⁾、ヒト resistin は炎症に関連したインスリン抵抗性と関連があるとする報告もなされている⁶⁰⁾。本研究では、TNF- α 、IL-6 血中濃度の検討をあわせて行ったが、後者の血中濃度は測定感度以下という症例も多く、resistin 血中濃度、遺伝子多型との関連は明らかでなかった。今後脂肪組織局所での発現の評価も行う必要があると思われた。最近では、resistin は血管内皮細胞に作用して血管の炎症に関連するとの報告もあり^{61), 62)}、ヒト resistin が、TNF- α や IL-6 と同様、炎症を介して体組成、インスリン抵抗性ひいては糖尿病・動脈硬化と関連する可能性が示唆されている。今後、正常者を含めた症例数を増やすとともに、長軸的検討を行い、炎症、酸化ストレス関連、動脈硬化関連の指標との関連も明らかにしていく必要があると考えられた。

総 括

肥満・糖尿病関連遺伝子 resistin に注目し、若年非糖尿病肥満患者 70 名を対象として、水中体重秤量法を用いた体脂肪率・体脂肪量、腹部 CT スキャンを用いた体脂肪分布、75 g 糖負荷試験による血糖・インスリンなどの測定を行い、表現型と、resistin 血中濃度との関連を 70 名中 64 名で検討した。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(35 名)や運動耐容能の検討(38 名)もあわせて行った。また 70 名中 60 名で resistin 遺伝子多型の探索を行い、表現型および resistin 血中濃度との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. 肥満症例の resistin 血中濃度は非肥満者に比し高値であり、非肥満者を含めると resistin 血中濃度は BMI と正相関した。

2. 断面的検討では、resistin 血中濃度は体組成やインスリン抵抗性の指標と相関しなかったが、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、平均血糖、平均 IRI のそれぞれの変化率と正相関し、stepwise 回帰分析を行うと体脂肪量の変化率とのみ相関がみられた。

3. Resistin 血中濃度は、運動耐容能の指標である運動継続時間、歩行速度と相関しなかった。

4. Resistin 遺伝子全体のシーケンススクリーニングおよび SNP タイピングを行い、プロモーター領域に 5 個、イントロン領域に 5 個、計 10 個の non-coding resistin SNPs を同定した。

5. Resistin SNPs と体組成、インスリン抵抗性との関連は明らかでなかったが、プロモーター領域の多型である -638G>A/-358G>A 多型および -420C>G 多型と resistin 血中濃度との間に有意な関連が認められ、いずれも変異型で resistin 血中濃度が有意に高値であった。ただし、-420C>G 多型の変異のみでは、血中濃度に変化はなかった。

6. Luciferase アッセイにおいても、-638G>A 多型と -420C>G 多型の変異型同士の組み合わせ (-638A/-420G) で luciferase 活性が高く、-638G>A 多型と -420C>G 多型の組み合わせが resistin 転写活性に影響をおよぼすと考えられた。

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。

本稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御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謝いたします。また、直接御指導くださり、論文の御高関をいただきました慶應義塾大学スポーツ医学研究センター山崎元教授、勝川史憲講師、研究を御指導いただきました慶應義塾大学医学部内科学教室村田満講師、松原由美子先生、慶應義塾大学医学部中央臨床検査部小口修司先生、多くの御助言をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室島田朗講師、研究に御協力いただいた教室、中央臨床検査部、スポーツ医学研究センターの諸先生に感謝いたします。

本研究の一部は、第 23, 24 回日本肥満学会、第 13 回日本臨床スポーツ医学会学術集会において報告した。

文 献

- 1) 吉池信男, 西信雄, 松島松翠, 伊藤千賀子, 池田義雄, 樫原英俊, 吉永英世, 小倉浩, 小峰慎吾, 佐藤祐造, 佐藤則之, 佐々木陽, 藤岡滋典, 奥淳治, 雨宮慎子, 坂田利家, 井上修二: Body Mass Index に基づく肥満の程度と糖尿病, 高血圧, 高脂血症の危険因子との関連—多施設共同研究による疫学的検討. 肥満研究 6: 4-17, 2000
- 2) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K: Analysis of an expression profile of human adipose tissue. *Gene* 190: 227-235, 1997
- 3) Bays H, Mandarino L, DeFronzo R: Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 463-478, 2004
- 4) Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312, 2001
- 5) Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR Jr, Willson TM, Klier SA, Hotamisligil GS: Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 276: 22651-22653, 2001
- 6) Banerjee RR, Lazar MA: Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med* 81: 218-226, 2003
- 7) Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Adipose e-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111: 225-230, 2003
- 8) Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Begum N: Resistin inhibits glucose uptake in L6 skeletal muscle cells independent of changes in insulin signaling components and Glut-4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E105-115, 2003
- 9) Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA: Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195-1198, 2004
- 10) Smith SR, Bai F, Charbonneau C, Janderova L, Argyropoulos G: A promoter genotype and oxidative stress potentially link resistin to human insulin resistance. *Diabetes* 52: 1611-1618, 2003
- 11) McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S: Resistin, central obesity, and

- type 2 diabetes. *Lancet* 359 : 46-47, 2002
- 12) McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S : Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 2407-2410, 2002
 - 13) Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA : A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 502-506, 2001
 - 14) Yang RZ, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eison JA, Shuldiner AR, Alkan S, Gong DW : Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 310 : 927-935, 2003
 - 15) Nagaev I, Smith U : Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 285 : 561-564, 2001
 - 16) Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM : Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 10 : 1-5, 2002
 - 17) Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW, Lloyd HM : Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 300 : 674-678, 2003
 - 18) Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S : Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50 : 2199-2202, 2001
 - 19) Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA : Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300 : 472-476, 2003
 - 20) Ma X, Warram J, Trischitta V, Doria A : Genetic variants at the resistin locus and risk of type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 4407-4410, 2002
 - 21) Tan MS, Chang SY, Chang DM, Tsai JC, Lee YJ : Association of resistin gene 3'-untranslated region +62G>A polymorphism with type 2 diabetes and hypertension in a Chinese population. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 1258-1263, 2003
 - 22) Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC : Human resistin gene : molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 2520-2524, 2002
 - 23) Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T, Kato K, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Makino H : Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene : the absence of evidence for the association of three identified single nucleotide polymorphisms with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes* 51 : 863-866, 2002
 - 24) Sentinelli F, Romeo S, Arca M, Filippi E, Leonetti F, Banchieri M, Di Mario U, Baroni MG : Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes : mutation analysis and population study. *Diabetes* 51 : 860-862, 2002
 - 25) Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R, Baratta R, Raueo A, Bozzali M, Vigneri R, Dallapiccola B, Trischitta V, Frittitta L : An ATG repeat in the 3'-untranslated region of the human resistin gene is associated with a decreased risk of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 4403-4406, 2002
 - 26) Engert JC, Vohl MC, Williams SM, Lepage P, Lored-Osti JC, Faith J, Dore C, Renaud Y, Burt NP, Villeneuve A, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC, Despres JP, Gaudet D, Hudson TJ : 5' flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes* 51 : 1629-1634, 2002
 - 27) Yeni-Komshian H, Abbasi F, Carantoni M, Reaven GM : Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy nondiabetic volunteers. *Diabetes Care* 23 : 171-175, 2000
 - 28) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC : Homeostasis model assessment : insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28 : 412-419, 1985
 - 29) 石田浩之, 中村芳郎 : 循環器疾患患者の生活指導. *現代医療* 25 : 2386-2391, 1993
 - 30) 小熊祐子, 石田浩之, 勝川史憲, 木下訓光, 大西祥平, 山崎元 : 中高年者の運動療法を目的としたトレッドミルプロトコールとその臨床応用. *日本臨床スポーツ医学会誌* 8 : 252-259, 2000
 - 31) 勝川史憲 : 若年成人肥満者. *臨床スポーツ医学* 20 : 696-702, 2003
 - 32) Pollock ML, Gaesser GA, Butcher JD, Despres JP, Dishman RK, Franklin BA, Garber CE : ACSM Position Stand : the recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness and flexibility in healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* 30 : 975-991, 1998
 - 33) Pollock ML, Foster C, Schmidt D, Hellman C, Linnerud AC, Ward A : Comparative analysis of physiologic responses to three different maximal graded exercise test protocols in healthy women. *Am Heart J* 103 : 363-373, 1982
 - 34) 東宏一郎, 勝川史憲, 小口修司, 佐々木誠一, 小熊祐子, 成田和穂, 木下訓光, 石田浩之, 大西祥平, 山崎元, 島田朗, 猿田享男 : 肥満者におけるレジスチンと運動耐容能の検討. *日本臨床スポーツ医学会誌* 12 : 260-265, 2004

- 35) Chakravarti A, Buetow KH, Antonaraki SE, Waber PG, Boehm CD, Kazazian HH : Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. *Am J Hum Genet* 36 : 1239-1258, 1984
- 36) Humphries S, Temple A, Lane A, Green F, Cooper J : Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost* 75 : 567-572, 1996
- 37) Swinburn BA, Nyomba BL, Saad MF, Zurlo F, Raz I, Knowler WC, Lillioja S, Bogardus C, Ravussin E : Insulin resistance associated with lower rates of weight gain in Pima Indians. *J Clin Invest* 88 : 168-173, 1991
- 38) Hoag S, Marshall JA, Jones RH, Hamman RF : High fasting insulin levels associated with lower rates of weight gain in persons with normal glucose tolerance : the San Luis Valley Diabetes Study. *Int J Obes* 19 : 175-180, 1995
- 39) Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 11 : 997-1001, 2003
- 40) Zhang J, Qin Y, Zheng X, Qiu J, Zou DJ : Serum resistin level in essential hypertension patients with different glucose tolerance. *Diabet Med* 20 : 828-831, 2003
- 41) Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS : Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentration in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 1730-1736, 2003
- 42) Yang J, Li M, Wu CY, Wang H, Xu QS, Deng JY : Reduced resistin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83 : 1471-1474, 2003
- 43) Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R, Zhu Q, Considine RV : Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 5452-5455, 2003
- 44) Youn BS, Yu KY, Park HJ, Lee NS, Min SS, Youn MY, Cho YM, Park YJ, Kim SY, Lee HK, Park KS : Plasma resistin concentration measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 89 : 150-156, 2004
- 45) Fujinami A, Obayashi H, Ohta K, Ichimura T, Nishimura M, Matsui H, Kawahara Y, Yamazaki M, Ogata M, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Nakano K, Ohta M : Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin : resistin concentration in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 339 : 57-63, 2004
- 46) Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BLG, Murphy LJ : Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects : correlation with insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 149 : 331-335, 2003
- 47) Fehmann HC, Heyn J : Plasma resistin levels in patients with type 1 and type 2 diabetes and in healthy controls. *Horm Metab Res* 34 : 671-673, 2002
- 48) Furuhashi M, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Shimamoto K : Circulating resistin levels in essential hypertension. *Clin Endocrinol* 59 : 507-510, 2003
- 49) Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K, Moussa A, Mantzoros CS : Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insulin resistance. *Obes Res* 11 : 1048-1054, 2003
- 50) Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, Orlova C, Mantzoros CS : Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration : cross-sectional and interventional studies in normal, insulin resistant and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 4848-4856, 2003
- 51) Kielstein JT, Becker B, Graf S, Brabant G, Haller H, Fliser D : Increased resistin blood levels are not associated with insulin resistance in patients with renal disease. *Am J Kidney Dis* 42 : 62-66, 2003
- 52) Pfutzner A, Langenfeld M, Kunt T, Lobig M, Forst T : Evaluation of human resistin assay with serum from patients with type 2 diabetes and different degrees of insulin resistance. *Clin Lab* 49 : 571-576, 2003
- 53) Boudou P, Sobngwi E, Mauvais-Jarvis F, Vexiau P, Gautier JF : Absence of exercise-induced variations in adiponectin levels despite decreased abdominal adiposity and improved insulin sensitivity in type 2 diabetic men. *Eur J Endocrinol* 149 : 421-424, 2003
- 54) Hulver MW, Zheng D, Tanner CJ, Houmard JA, Kraus WE, Slentz CA, Sinha MK, Pories WJ, MacDonald KG, Dohm GL : Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 : E861-865, 2002
- 55) Azuma K, Oguchi S, Matsubara Y, Mamizuka T, Murata M, Kikuchi H, Watanabe K, Katsukawa F, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Novel resistin promoter polymorphisms : association with serum resistin level in Japanese obese individuals. *Horm Metab Res* 36 : 564-570, 2004
- 56) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW : Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112 : 1796-1808, 2003
- 57) Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L : Preadipocyte conversion to macrophage, evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278 :

- 9850-9855, 2003
- 58) Jiang C, Ting AT, Seed B : PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391 : 82-86, 1998
- 59) Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112 : 1821-1830, 2003
- 60) McEernan PG, Fisher FM, Valsamakis G, Chetty R, Harte A, McEernan CL, Clark PM, Smith SA, Barnett AH, Kumar S : Resistin and type 2 diabetes : regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects of recombinant resistin on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 6098-6106, 2003
- 61) Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA : Resistin promotes endothelial cell activation : further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 108 : 736-740, 2003
- 62) Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R : Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells : a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 314 : 415-419, 2004
-

学位論文

卵管内胚移植のための子宮鏡用カテーテルの開発

— 組織学的評価とその臨床応用 —

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：吉村 泰典教授)

またむらせいじ
北村誠司

(平成 16 年 5 月 27 日受付)

Key Words : catheterization, fallopian tube, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, hysteroscopic tubal embryo transfer

体外受精-胚移植 (IVF-ET) は元来、卵管性不妊症例のために開発された手技であるが、最近では男性不妊のみならず、内膜症性不妊、免疫性不妊、原因不明不妊症例にも臨床応用されている。現在の胚移植あたりの妊娠率は、20%前後と決して高率とはいえず、その改善が望まれている。胚移植時期は採卵後 2-3 日目であり、4-8 細胞期の胚を子宮腔内に移植するのが標準的な胚移植法である。ヒトにおいては、排卵後、卵は卵管膨大部で受精すると約 7 日で子宮腔内に輸送され、子宮内膜へ着床する。IVF-ET では、胚は子宮腔内において着床するまでの 2-3 日、浮遊している状態におかれる。この時間差を解消するとともに胚にとって良好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開発され、臨床的には配偶子卵管内移植法 (GIFT 法)¹⁾ や接合子卵管内移植法 (ZIFT 法)^{2), 3), 4)} のような卵管移植法が、不妊女性に一般的に用いられている。体外受精卵と通常の妊娠における胚の発育の時間差を解消するために、近年胚盤胞移植という技術が開発され普及してきているが、本来の目的は難治症例に対する治療ではなく多胎の予防であり、体外培養時間の延長がもたらす胚へのリスクも現在のところ不明である。

卵管は、排卵された卵子の捕捉と受精部位への運搬、精子の受精能獲得と受精部位への運搬、受精および初期胚の発育環境の提供、胚の子宮への運搬という機能を有

している。卵管は、卵管采、卵管膨大部、卵管峡部、卵管間質部から成り、受精は卵管膨大部で、初期胚発育は卵管峡部で行われている。卵管は、漿膜、筋層、内膜の 3 層からなる 7-13 cm の長さを有する臓器であり、その内膜上皮は、線毛細胞、分泌細胞ならびに小桿細胞からなる 1 層の円柱上皮に覆われる。卵管内腔には、縦走する卵管ひだが存在する。卵管の主な機能のうち、卵子と初期胚の運搬は卵管の平滑筋による蠕動運動、線毛運動と卵管粘液の流れによるところが大きい。受精および初期胚の発育環境の提供という機能については、Bongso ら⁵⁾ がヒト卵管膨大部上皮細胞と初期胚の共培養による胚の質の改善を、Yeung ら⁶⁾ がヒト卵管上皮細胞との共培養で妊娠率の向上を報告したように、初期胚にとり体外環境に比べ適切であると考えられている。

従来は卵管移植法では、全身麻酔下の腹腔鏡により受精卵を卵管采より移植していたが、最近になり子宮鏡下卵管胚移植法 (hysteroscopic tubal stage transfer : h-TEST)⁷⁾、卵管への経腔的胚移植法⁸⁾ が行われるようになり、全身麻酔下の腹腔鏡に伴うリスクの解消を可能にした。しかし、これらの方法で用いられている卵管へ挿入するカテーテルの標準的な外径は 1 mm 前後であり、これに対して卵管の最も狭い部位の内径は 0.1-0.4 mm と言われ、卵管の内腔にカテーテルを挿入し、さらにその先端を卵管峡部に正確に到達させることは困難である

本論文は Kitamura S, Miyazaki T, Iwata S, Akaboshi K, Osawa Y, Yoshimura Y. Ultrastructural evaluation following catheterization of the fallopian tube with a hysteroscopic catheter. J Assist Reprod Genet 1998 ; 15 : 411-417³⁰⁾ と Kitamura S, Sugiyama T, Iida E, Miyazaki T, Yoshimura Y. A new hysteroscopic tubal embryo transfer catheter : Development and clinical application. J Obstet Gynaecol Res 2001 ; 27 : 281-284³¹⁾ の一部を含む。

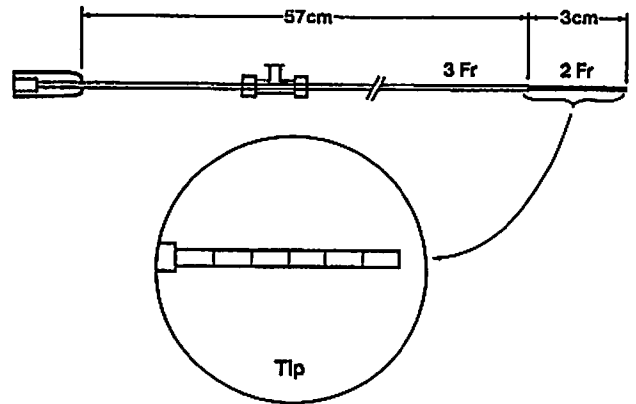
と考えられている。卵管内圧の上昇と卵管内腔の擦過という点から、カテーテル挿入は卵管に機械的損傷を与える可能性が考えられるが、これまで用いられてきたカテーテルでは、十分な検討がなされていないのが現状である。卵管の解剖学的形態あるいはカテーテルの操作性の点から、カテーテルの先端部分は卵管挿入に適した細い径を持ち、残りの部分は、優れた操作性を持つ太い径を持つものが至適であると考えられる。

本研究では、本来の受精の場である卵管膨大部へ、より正確に胚を移植するために先端がより細く最適な長さの先端を持つ子宮鏡用の新カテーテルを開発した。現在まで、卵管へのカテーテル挿入の際の損傷などの変化を形態学的に検討した報告は殆ど認められないため、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。さらに不妊症例での腹腔鏡で実施する色素通水検査をこのカテーテルを用いて行い、卵管に挿入されたカテーテル先端から卵管采までの卵管内腔の容積を測定し、移植胚の卵管外への流出を防ぐために胚をカテーテル内に装填する際の培養液量を決定した。その上で、この新規カテーテルを子宮鏡下卵管胚移植法に臨床応用し、h-TESTの有用性を検討した。

方 法

1. 新規カテーテルの開発および子宮鏡下カテーテル挿入

卵管に挿入する先端部分の長さが3, 4, 5 cmである。3種類のテフロン製のカテーテルをオリンパスの協力のもとに新たに作成した。これらのカテーテルの外径は3French (Fr.) (1 mm)で、先端部分の外径は2 Fr. (0.66 mm)で、柔軟性に富むが子宮鏡のチャンネルを通してガイドワイヤーを使わずにこのカテーテルを卵管へ挿入することを可能とした。カテーテルの先端は、5 mmおきに印が付けられた(第1図)。これらカテーテルのうち卵管挿入に適切なものを選択するために、慶應義塾大学病院不妊外来に通う患者に対し、3種類のカテーテルを用いて20人ずつ計60人、子宮鏡下卵管内人工授精法(HIT法)⁹を事前の十分な説明と同意の上に行った。カテーテルを子宮鏡(HYF type-P, オリンパス, 東京)に装着した後、患者を載石位とし子宮口を露出させるため、腔鏡を挿入した。子宮鏡のチャンネルを通して炭酸ガスを用いて子宮頸管と子宮内腔を拡張すると同時に、子宮鏡を子宮頸管を経て子宮腔内に挿入した。卵管口を確認した後、カテーテルを卵管に挿入した。2



第1図. 子宮鏡下卵管胚移植用の新規テフロンカテーテル。カテーテルの外径は3Fr.で、先端部分は、3 cmで、外径が2Fr. (0.66 mm)と先細になっていて、柔軟性に富み、5 mm 間隔で印がつけられた。子宮鏡のチャンネルを通して、ガイドワイヤーを使わずに卵管へ挿入することが可能であった。(Kitamura et al : J Assist Reprod and Genet, 15.7 : 411-417, 1998 の Fig. 1 を許可を得て、転載。)

Fr.の先端部分が完全に挿入された状態を挿入成功とし、それぞれのカテーテルでの挿入の成功率を調べた。

2. 光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた形態学的観察対象および手術

1995年から1996年に慶應義塾大学病院と荻窪病院において、子宮筋腫あるいは子宮腺筋症のため腹式子宮全摘術を受けた閉経前の20人の婦人患者から事前の十分な説明と同意の上で卵管を採取した。7人は卵胞期、6人は排卵期、7人は分泌期であった。全身麻酔下で子宮摘出術を行う前に、一側の卵管に子宮鏡下で新規カテーテルを挿入し、対側の卵管にはカテーテル挿入を行わずにコントロールとした。カテーテルを子宮内腔側つまり卵管口より卵管内に3 cm進め、炭酸ガスの注入を止めた。約1分後、カテーテルを子宮鏡とともに抜去した。子宮と卵管を摘出後ただちに、卵管を卵管角より3 cm迄切り出し、5 mm間隔で5×5 mmの細片を作成した。

検体作成

標本を2%グルタルアルデヒドに4℃で2時間浸して前固定を行い、0.1%カコジル酸緩衝液に12時間4℃浸して洗浄した。透過型電子顕微鏡(TEM)による検索を行う際は、卵管(n=8)を4℃で1.5時間、1%四酸化オスミウムで後固定した。標本を連続する濃度

勾配のエタノール液（50, 60, 70, 80, 90, 95%）で脱水した。切片を epon812 に包埋した。卵管上皮細胞の範囲は、トルイジンブルー染色を施した準超薄切片で同定した。標本が包埋された epon から超薄切片をガラスナイフで作成し、200-mesh 銅グリッドに載せた。酢酸ウラニルで染色した切片をのせたグリッドを日立 HV-12AS にて 75 KV で観察した。TEM では、カテーテル挿入した 4 本の卵管と非挿入の 4 本の卵管における、細胞接着装置としてのデスマゾーム、タイトジャンクション等の確認、基底膜の肥厚あるいは破壊の有無、ミトコンドリアの数と形態に着目した。1 標本あたり 20 個の線毛細胞と 20 個の非線毛細胞における細胞接着装置を同定し、基底膜に関してはカテーテル挿入した 20 切片とカテーテル非挿入の 20 切片における基底膜の肥厚あるいは破壊の有無を判定した。加えて、ミトコンドリアは 1 標本あたり 20 個の線毛細胞と 20 個の非線毛細胞における細胞あたりの数と形態に着目した。

走査型電子顕微鏡（SEM）による検索を行う際は、標本を TEM 同様に 2% グルタルアルデヒドでの固定と 0.1% カコジル酸緩衝液での洗浄を行い、TEM の準備と同様に連続する濃度勾配のエタノール液で脱水し、液体窒素で臨界点乾燥を行った後、実体顕微鏡下でフェザーナイフを用いて切断した。切片標本の卵管上皮側を上にして、アルミニウム片に載せ、金を蒸着し、日立 SV-4000 にて 15 KV で観察した。本研究では、SEM で 16 症例（平均年齢 46.3 ± 4.8 歳）32 本の卵管を対象とし、その内訳としては 16 本の卵管にカテーテル挿入を行い、残り 16 本には行わなかった。光学顕微鏡による検索を行う際は、TEM で用いたトルイジンブルー染色の準超薄切片を用いて線毛細胞上皮の欠損などを判定した。顕微鏡下の観察・評価にあたっては、研究協力者によって全ての検体を無作為に準備し、全ての標本の評価が終了するまで研究対象を同定する事が出来ないようにした。

3. 卵管腔容積の測定

子宮卵管造影において異常所見を示した 20 症例 30 卵管（10 卵管が形態的に正常卵管、20 卵管は卵管留水症）に対して行った腹腔鏡の際、先端 3 cm が細くなっているカテーテルを用いて選択的子宫鏡下卵管通水法を実施した。子宫鏡の観察下にカテーテルを卵管内 3 cm まで挿入した。色素通水法を目的として、炭酸ガス注入の停止 1 分後にインジゴカルミン液をカテーテルに注入した。腹腔鏡で卵管采からインジゴカルミン液の流出が確認される迄の注入量を卵管腔容積とした。

4. h-TEST の臨床応用

1996 年から 1998 年の間、慶應義塾大学病院と荻窪病院不妊外来に通院していた腹腔鏡下に正常な卵管を確認されていて、不妊原因が男性因子あるいは原因不明であり、2 回以上の体外受精-胚移植（IVF-ET）を受けても妊娠に至っていない 60 症例を対象とした。全ての患者は、事前の十分な説明と同意の上で h-TEST と従来の胚移植の 2 グループに乱数表的に振り分けられた。h-TEST と従来の胚移植法はそれぞれ 30 症例に施行され、これら 2 方法での臨床妊娠率、流産率、着床率を前方視的に比較検討した。

IVF-ET においては、卵巣刺激法として gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa, スプレキュア, アヴェンティス, 東京) を用いた下垂体 down regulation 後に、human menopausal gonadotropin (HMG, オルガノン, 東京) 150, 225 あるいは 300 単位を月経周期 3 日目より、筋肉注射して卵巣刺激を行った。血清 E₂ 濃度を測定すると同時に経膈超音波検査で卵胞径を計測し、卵胞発育を評価した。最大径 17 mm 以上の卵胞が 2 個以上得られた時点で、human chorionic gonadotropin (hCG, 持田, 東京) 10,000 単位を筋肉注射し、その 34 から 36 時間後に経膈的に採卵を行った。採卵から 3 時間後、卵と精子を媒精し、混合ガス（酸素 5% 二酸化炭素 5% 窒素 90%）下に患者血清添加 HTF (human tubal fluid, Irvine, USA) 中で培養し、採卵から 48 時間後に胚移植を行った。胚移植は、従来法では子宮内胚移植カテーテル（富士システムズ, 東京）を用いて子宮腔内に胚を移植し、h-TEST では新規カテーテルの中に 0.05 ml の培養液とともに 1 個から 3 個の胚を装填した。子宮鏡下で卵管内にカテーテル挿入を行い、炭酸ガスの注入停止 1 分後に子宮腔内の炭酸ガスの十分な減少を図ったうえで胚を卵管内に培養液とともに移植した。黄体機能を補うため、プロゲステロン 25 mg を胚移植の日から連日、筋肉注射した。約 3 週間後に超音波検査にて胎嚢を確認して妊娠判定を行った。

5. 統計

卵管挿入の成功率の検定は Fisher の直接確率計算法を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定し卵管内色素注入量は平均 ± 標準偏差で表した。h-TEST と従来の胚移植法の妊娠率、流産率、着床率は Fisher の直接確率計算法と χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。TEM を用いた形態学的観察は Yates の補正済み χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定

した。

結 果

1. カテーテル挿入と先端の長さ決定

先端 3 cm が 2Fr. と細くなっているカテーテルは、20 人中 18 人で挿入に成功した (第 1 表)。一方、先端 4 cm 及び 5 cm が 2Fr. と細くなっているカテーテルでの挿入成功率は低率であった。先端 3 cm が 2Fr. と細くなっているカテーテルは、先端 5 cm が細くなっているカテーテルに比べ、その完全挿入率は有意に高かったが、先端 4 cm が細くなっているカテーテルに比べ高値であったが、有意差は認められなかった。

第 1 表 カテーテル挿入の成功率。卵管に挿入する先端の長さが 3, 4, 5 cm である、3 種類の新しいテフロン製カテーテルのうち、卵管への挿入に適切なものを選ぶために、20 人ずつ計 60 人、子宮鏡下卵管内人工授精法 (HIT 法) を行った。2Fr. の先端部分が完全に挿入された状態を挿入成功とし、それぞれのカテーテルでの挿入の成功率を検討した。

length of the catheter tip	insertion/trial (%)
3 cm	18/20 (90%)*
4 cm	15/20 (75%)
5 cm	10/20 (50%)*

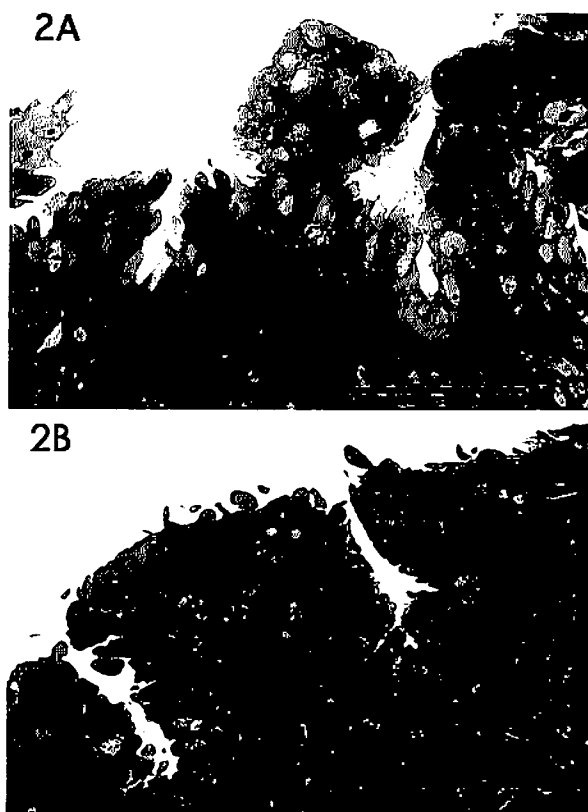
* $p < 0.05$ (Kitamura et al : J Obstet Gynecol Res, 27.5 : 281-284, 2001 の Table. 1 を許可を得て、転載.)

2. 光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた形態学的観察 光学顕微鏡

光学顕微鏡による観察では、卵管内腔上皮においてカテーテル非挿入例と挿入例を比較すると線毛細胞と非線毛細胞が同様に認められ、線毛には形態学的差異は認められなかった (第 2A, 2B 図)。

透過型電子顕微鏡

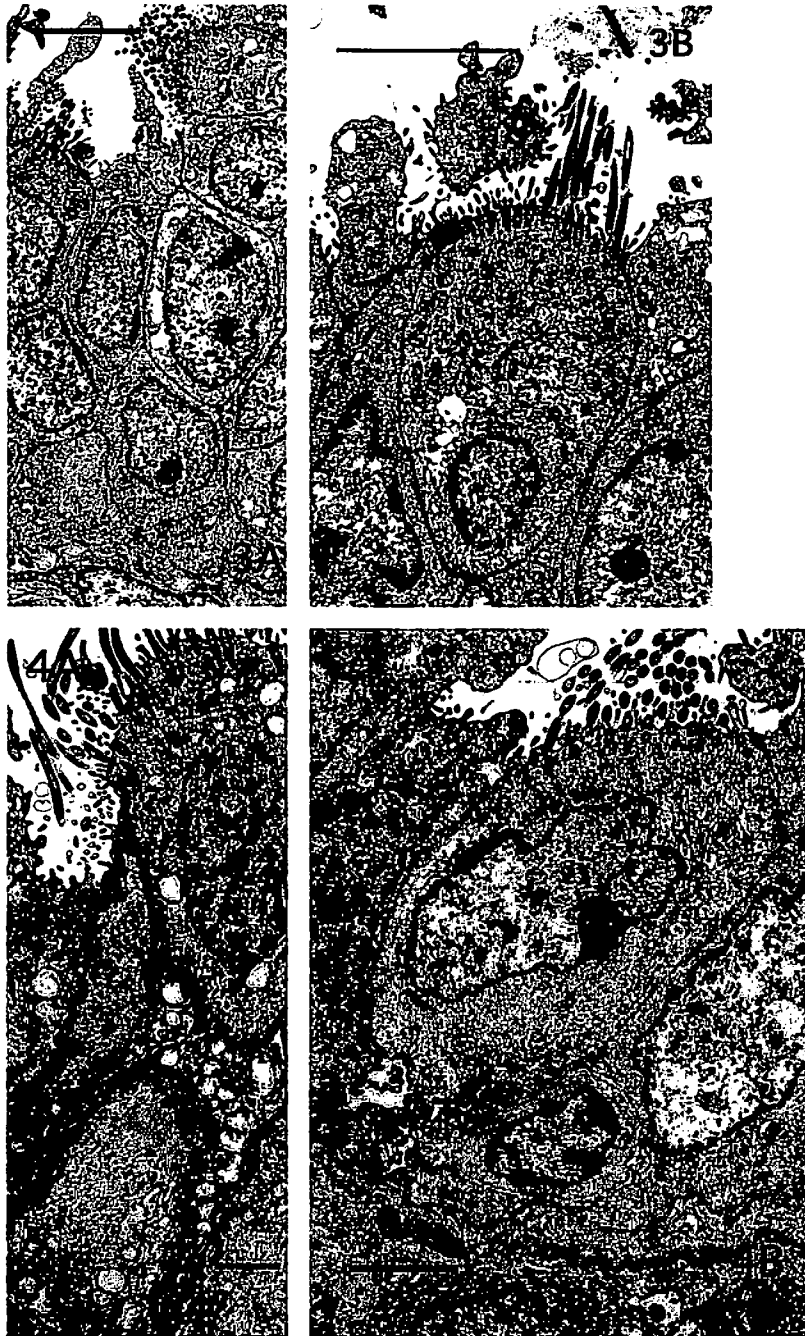
カテーテル非挿入例、挿入例いずれにおいても同様に卵管上皮は主に非線毛細胞から成り、線毛細胞も散見された。(第 3A, 4A 図)。非線毛細胞は、その表面を多数の微絨毛に覆われ、卵管内腔に向かって細胞突起が散見された。卵管上皮では線毛と微絨毛において、細胞質内では、ミトコンドリア、フリーリボソーム、粗面小胞体を含む様々な細胞内小器官において、また基底膜において両群間で形態学的差異は認められなかった (第 3B, 4B 図)。



第 2 図. (A) カテーテル非挿入例. トルイジン・ブルー染色した semithin section. (bar=50 μ m) (B) カテーテル挿入例. 両者に形態学的差異は認められず、線毛上皮および非線毛細胞が観察された. (bar=50 μ m) (Kitamura et al : J Assist Reprod and Genet, 15.7 : 411-417, 1998 の Fig. 6, 7 を許可を得て、転載.)

線毛細胞における細胞接着装置は、カテーテル非挿入例の卵管 80 断面のうち 2 断面、2 細胞 (2.5%) において観察されず、カテーテル挿入例の卵管 80 断面のうち 4 断面、4 細胞 (5%) において観察されなかった。非線毛細胞における細胞接着装置は、カテーテル非挿入例及びカテーテル挿入例の卵管において、それぞれ 80 断面のうち 2 断面、2 細胞 (2.5%)、1 断面、1 細胞 (1.3%) において観察されず、線毛細胞、非線毛細胞ともに両群間で有意差を認めなかった (第 2 表)。

カテーテル非挿入の 4 卵管の 80 線毛細胞中の 1196 個のミトコンドリアとカテーテル挿入した 4 卵管の 80 線毛細胞中の 1012 個のミトコンドリアが同定された。線毛細胞あたりのミトコンドリアの数の平均は、カテーテル非挿入卵管で 15.0 ± 4.9 個、カテーテル挿入卵管で 12.6 ± 6.4 個であった。カテーテル非挿入の 4 卵管の 80 非線毛細胞中の 1134 個のミトコンドリアとカテーテル挿入した 4 卵管の 80 非線毛細胞中の 978 個のミトコン



第3図. カテーテル非挿入例の卵管上皮の透過型電子顕微鏡像。(A) (bar=5 μm) (B) (bar=5 μm) (A) 線毛上皮, 微絨毛を有する非線毛上皮が認められた. 細胞接着装置も明らかであった. (A, B) また両者にはミトコンドリア, フリーリボソーム, 小胞体を含む様々な細胞内小器官が認められ, ミトコンドリア, 小胞体を含む細胞内器官が卵管上皮に観察された. 基底膜も明らかに認められた. (Kitamura et al : J Assist Reprod and Genet, 15.7 : 411-417, 1998 の Fig. 5 を許可を得て, 転載.)

第4図. カテーテル挿入例の卵管上皮の透過型電子顕微鏡像。(A) 基底膜は正常, 非挿入例と同様に線毛細胞, 微絨毛を有する非線毛細胞が認められた. (bar=1 μm) (B) 基底膜, 細胞内小器官, 細胞接着装置も非挿入例と比較して形態学的差異は認められなかった. (bar=5 μm) (Kitamura et al : J Assist Reprod and Genet, 15.7 : 411-417, 1998 の Fig. 4 を許可を得て, 転載.)

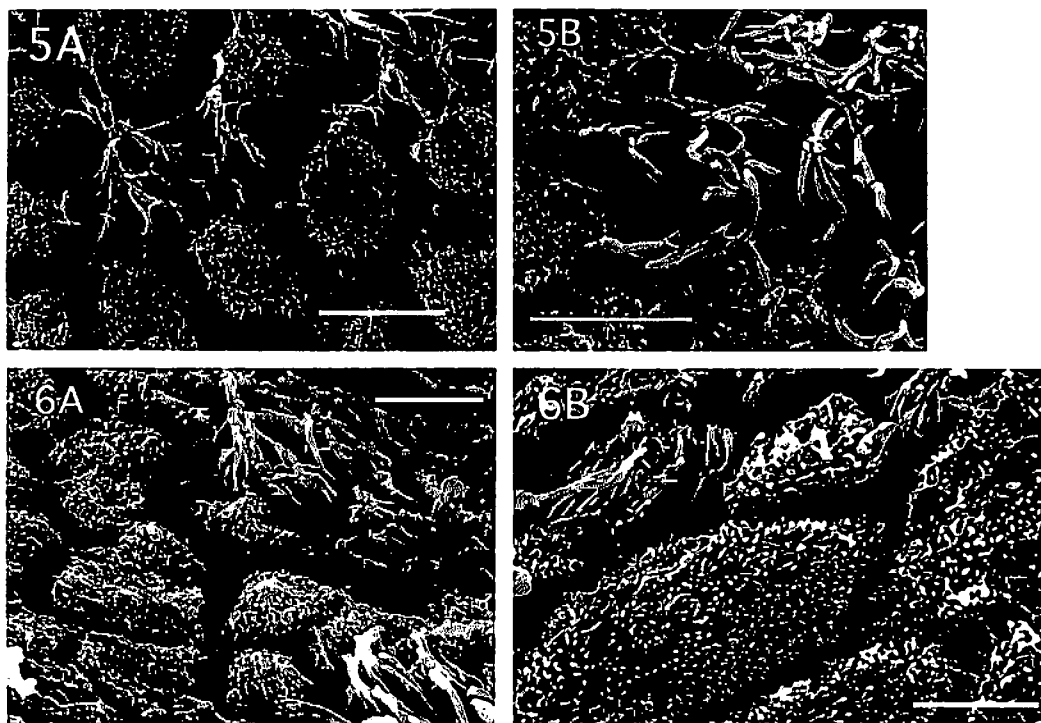
第2表 テスモゾーム等の細胞接着装置が透過型電子顕微鏡下に観察されない断面数(細胞数), カテーテル挿入した4本の卵管と非挿入の4本の卵管における, 1検体あたり20個の線毛細胞と20個の非線毛細胞における細胞接着装置が認められない断面数(細胞数)を測定した。

	カテーテル挿入卵管 (n=80)	カテーテル非挿入卵管 (n=80)
線毛細胞	4 (5%)	2 (2.5%)
非線毛細胞	1 (1.3%)	2 (2.5%)

第3表 透過型電子顕微鏡下に観察された細胞あたりのミトコンドリア数。

カテーテル挿入した4卵管とカテーテル非挿入の4卵管につき, それぞれ80個の線毛細胞と80個の非線毛細胞のミトコンドリアを同定, 測定した。

	カテーテル挿入卵管	カテーテル非挿入卵管
線毛細胞	12.6±6.4	15.0±4.9
非線毛細胞	12.2±5.0	14.2±7.3



第5図. カテーテル非挿入例の卵管内腔表面の走査電子顕微鏡像。

(A) 多数の線毛細胞と非線毛細胞が認められた。(bar=5 μm) (B) 非線毛細胞に微絨毛が密集していた。(bar=5 μm) (Kitamura et al : J Assist Reprod and Genet, 15.7 : 411-417, 1998 の Fig. 2 を許可を得て, 転載。)

第6図. カテーテル挿入例の卵管内腔表面の走査電子顕微鏡像。

(A) 多くの線毛細胞が観察され, 非挿入例と比べ形態学的差異は認められなかった。(bar=5 μm) (B) 線毛細胞とドーム状の非線毛細胞の表面に微絨毛が観察され, 非挿入例と比べ形態学的差異は認められなかった。(bar=5 μm) (Kitamura et al : J Assist Reprod and Genet, 15.7 : 411-417, 1998 の Fig. 3 を許可を得て, 転載。)

ドリアが同定された。非線毛細胞あたりのミトコンドリアの数の平均は、カテーテル非挿入の卵管で 14.2 ± 7.3 個、カテーテル挿入卵管で 12.2 ± 5.0 個であった。線毛細胞と非線毛細胞の両者ともカテーテル非挿入例、カテーテル挿入例のいずれの例においても細胞あたりのミトコンドリアの数の平均には有意差が認められず（第3表）、システルネには形態学的差異は認められなかった。

走査型電子顕微鏡

カテーテル非挿入例の卵管上皮では、多数の線毛細胞、密集した微絨毛を伴う非線毛細胞が認められた（第5A, 5B図）。カテーテル挿入例の卵管においても多数の線毛細胞とドーム型の非線毛細胞の表面に位置する微絨毛が認められた（第6A, 6B図）。月経周期を問わず、線毛細胞及び非線毛細胞にはカテーテル非挿入例、カテーテル挿入例のいずれの例においても形態学的差異は認め

第4表 卵管内腔容積。子宮卵管造影において異常所見を示した20症例に対して行った腹腔鏡の際、特別に作成した先端3cmが細くなっているカテーテルを用いて選択的子宮鏡下卵管通水法を30卵管に実施した。子宮鏡の観察下にカテーテルを卵管内3cmまで挿入し、炭酸ガスの注入停止1分後に色素通水法を目的としてインジゴカルミン液をカテーテルに注入した。腹腔鏡で卵管采からインジゴカルミン液の流出が確認される迄の注入量を卵管内腔容積とした。

	卵管数	インジゴカルミン液の 通水量
正常卵管	10	0.26 ± 0.03 ml
卵管留水症	20	0.60 ± 0.15 ml

られなかった。

3. 卵管内腔容積

30卵管のうち10卵管が形態的に正常卵管であり、インジゴカルミン液注入量は 0.26 ± 0.03 mlであった。残り20卵管は明らかに卵管留水症であり、インジゴカルミン液注入量は 0.60 ± 0.15 mlであった（第4表）。

4. h-TEST の臨床成績

h-TEST と従来の胚移植の両群間にはゴナドトロピンのアンプル量、採卵数、移植胚数、移植した良好胚数に関して有意差は明らかに認められなかった（第5表）。30周期のh-TESTから12例の妊娠を得た。妊娠した12例のうち2例は双胎で、10例は正常分娩し、2例が流産した。子宮外妊娠は発生しなかった。妊娠率はh-TESTで40%、従来の胚移植法で16.7%。h-TESTにおける妊娠率は、従来の胚移植法における値に比し有意な高値を示した。流産率はh-TESTで16.7%、従来の胚移植法の40%に比し低率であったが、両者間に有意差は認められなかった。Veeckによるところの形態学的良好胚¹⁰⁾ (Grade I or II) の着床率は、h-TESTで66.7%、従来の胚移植法で20%であり、h-TESTでの着床率は、従来の胚移植法に対し有意に高率を示した（第6表）。

第5表 h-TEST と従来の IVF における臨床成績。

腹腔鏡下に正常卵管を確認されていて不妊原因が男性因子あるいは原因不明であり、2回以上の体外受精-胚移植 (IVF-ET) を受けても妊娠に至っていない60症例を対象とした。全ての患者は、h-TEST と従来の胚移植の2グループに乱数表的に振り分けられた。h-TEST と従来の胚移植法はそれぞれ30症例に施行され、これら2方法での結果を前方視的に比較、検討した。(Kitamura et al : J Obstet Gynecol Res, 27.5 : 281-284, 2001 のTable. 2を許可を得て、転載。)

	h-TEST (n=30)	conventional IVF (n=30)
Total ampules of gonadotropins	33.3 ± 6.4	31.8 ± 10.2
oocytes retrieved	6.7 ± 2.1	7.4 ± 3.7
embryos transferred	2.0 ± 0.6	1.8 ± 0.4
good embryos transferred*	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.1

*移植した、Veeckによるところの形態学的良好胚¹⁰⁾数 (Grade I or II)

第6表 h-TEST と従来の胚移植法における治療成績。2回の IVF-ET の結果、妊娠に至らない60症例を対象とした。腹腔鏡下に正常卵管を確認され、不妊原因が男性因子あるいは原因不明であり、2回以上の体外受精-胚移植 (IVF-ET) を受けても妊娠に至っていない60症例を対象とした。全ての患者は h-TEST と従来の胚移植法の2グループに乱数表的に振り分けられた。h-TEST と従来の方法での胚移植法はそれぞれ30症例に施行され、これら2方法での結果を前方視的に比較、検討した。経腔的採卵後、HTF 中で胚培養し、採卵から48時間後、1個から3個の胚を移植した。

	h-TEST (n=30)	conventional ET (n=30)
Pregnancy rate	40% (12/30)	16.7% (5/30)*
Abortion rate	16.7% (2/12)	40% (2/5)
Implantation rate**	66.7% (14/21)	20% (5/25)*

*p<0.05

**胚着床率は、移植した形態良好胚 (Grade I or II) (Veck, 1991) に対する着床した胚の割合。妊娠12症例のうち2例が双胎のため、14胚が着床したと見なした。(Kitamura et al: J Obstet Gynecol Res, 27.5: 281-284, 2001 の Table. 3 を許可を得て、転載。)

考 察

卵管内胚移植法は、胚を子宮内に移植する従来の胚移植法、つまり移植用のチューブを子宮口から挿入し、その先端を子宮底から約1cm付近に到達させて胚移植する方法を越える多くの利点を有している^{11), 2), 3)}。さらに、今回検討した h-TEST 法は、従来の GIFT 法、ZIFT 法における全身麻酔下での腹腔鏡という操作を必要とせず、安全かつ低侵襲の手技と考えられる。すなわち、子宮鏡を用いて直視下で観察することで、卵管へのカテーテル挿入の深さの正確な評価が可能となった。卵管膨大部・峡部接合部は子宮から3から5cmの部位に位置し、正常体内における受精と初期胚の発育の場となっている。約3Fr. (1mm) の径を持つカテーテルが経腔的卵管カテーテルとして従来用いられてきているが^{7), 12), 13)}、これらのカテーテルを用いた卵管挿入は、卵管口より0.5から1cmしか可能ではなかった。さらに卵管の最も狭い部位、特に卵管間質部から峡部にかけての卵管内径は0.4mmであるため、より細かいカテーテルの必要性が考えられた。しかしながらカテーテルの径を細くすることにより、その操作性は低下することが予想された。そこで今回の検討では、先端部分の3cm, 4cm, 5cmが2Fr.と細くなっている3種類の新規カテーテルを作成し、その先端を卵管峡部へ到達させ、胚を卵管膨大部へ今まで以上により確実に移植し、2Fr.の径を持つ先端が卵管組織を圧迫しないよう図られた。今回の検討から、先端3cmが細くなっているカテーテルが最も高い

卵管への完全挿入率を示したことより、h-TEST への臨床応用のためのカテーテルに選ばれた。

GIFT 法、ZIFT 法などの技術が不妊女性に一般的に用いられ、さらに卵管閉塞を解消するためのカテーテル挿入の手法が改良されてきているにもかかわらず、卵管へのカテーテル挿入の卵管内腔に及ぼす影響はほとんど検討されていない。カテーテル挿入などによる、あるいは卵管閉塞後の卵管留水症に見られる卵管内腔の圧の上昇は、粘膜皺壁の消失、上皮の萎縮、様々の程度の脱線毛化のような形態学的変化を導く¹⁴⁾と報告され、卵管炎発症後の卵管では卵管采の線毛細胞の割合に有意な減少が認められたとの報告もみられる¹⁵⁾。明らかな、もしくは無症候性の炎症性疾患を持つ女性に見られる卵管の異常としては、平坦化した粘膜皺壁、広範囲に及ぶ脱線毛化、非線毛細胞の変性が認められる。閉塞した卵管の粘膜の内腔表面は広範囲にわたり非線毛細胞と線毛細胞の両者を欠いている¹⁶⁾。今回の検討では、走査型電子顕微鏡による観察において、カテーテル挿入後の卵管内腔の線毛細胞と非線毛細胞の表面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。

卵管上皮は折り畳まれた様な形態を持ち、その大部分を走査型電子顕微鏡で観察することは困難と考えられるため、透過型電子顕微鏡による検索を行った。この検索において、カテーテル挿入後の卵管内腔上皮表面にはカテーテル非挿入例と比較して形態学的差異が認められなかった。このように、新規カテーテルの挿入は卵管内腔圧力の上昇を引き起こさないと考えられ、挿入の結果生

対 象

検体の採取にあたっては研究内容および安全性について十分な説明を行い、患者から同意を得たうえで行った。

1. 子宮頸部扁平上皮系病変におけるハイリスク型 HPV 感染の検出と p16^{INK4} 蛋白質過剰発現頻度の関連

慶應義塾大学病院を受診した軽度異形成患者 75 症例、中等度異形成患者 49 症例、高度異形成患者 34 症例、上皮内癌患者 21 症例、および扁平上皮癌患者 18 症例を対象としてハイリスク型 HPV 感染の検出を行った。さらにハイリスク型 HPV 感染が検出された症例を対象として p16^{INK4} 蛋白質過剰発現の検出を免疫組織化学染色を用いて行った。また扁平上皮化生や炎症性異型と診断された良性異型患者 7 症例を p16^{INK4} 蛋白質免疫組織化学染色の対照群とした。

2. 子宮頸部腺系病変におけるハイリスク型 HPV 感染の検出と p16^{INK4} 蛋白質過剰発現頻度の関連

慶應義塾大学病院にて手術を行った上皮内腺癌 10 症例、頸部腺癌 62 症例、腺扁平上皮癌 9 症例を対象として p16^{INK4} 蛋白質過剰発現の検出を免疫組織化学染色にて行った。また正常子宮頸管腺上皮 7 症例を p16^{INK4} 蛋白質過剰発現の対照群とした。さらに頸部腺癌症例のうち 49 症例を対象として HPV16 型および 18 型の感染の有無を検討した。

3. 子宮頸部擦過細胞を用いた p16^{INK4} 蛋白質免疫細胞化学染色

慶應義塾大学病院を受診した軽度異形成患者 12 症例、中等度異形成患者 15 症例、高度異形成患者 12 症例、上皮内癌患者 13 症例、および頸部腺癌患者 14 症例を対象とした。

方 法

1. 子宮頸部扁平上皮系病変におけるハイリスク型 HPV 感染の検出

前述の対象症例において、ThinPrep 法 (Cytoc Corp, アメリカ) にて回収した子宮頸部擦過細胞浮遊液を用いてハイリスク型 HPV DNA の検出を行った²⁹⁾。なお、本研究では多くの報告でハイリスク型として認識されている HPV16 型、18 型、31 型、33 型、35 型、45 型、51 型、52 型、56 型、58 型をハイリスク型 HPV と定義した^{6), 7)}。

子宮頸部擦過浮遊液 10 ml を 3000 rpm で 30 分間遠沈し、沈渣をリン酸緩衝食塩水 (以下 PBS と略す) にて洗浄後、0.2M 塩化ナトリウム 250 μ l, pH8.0 の 0.1M EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 250 μ l, 20 mg/ml proteinase K 2.5 μ l, 10%ドデシル硫酸ナトリウム (以下 SDS と略す) 25 μ l を加え 37°C にて一晩反応させた。煮沸処理にて DNase 活性を失活させた 10 mg/ml RNase を 5 μ l 加え、37°C にて 4 時間反応させ、TE (10mM Tris-HCl+1mM EDTA pH8.0) 飽和フェノール 500 μ l と混和させ 12000 rpm にて 5 分間遠沈し、上清にイソアミルアルコール含有クロロホルム 500 μ l を混和し、12000 rpm にて 5 分間遠沈した。上清に 5 mg/ml glycogen 1 μ l, 3M の酢酸ナトリウム 50 μ l, イソプロピルアルコール 500 μ l を混和して 12000 rpm にて 5 分間遠沈した。沈殿したゲノム DNA を 70% エタノールにて洗浄後 50 μ l の TE (pH8.0) に溶解した。抽出したゲノム DNA から、Yoshikawa らが作成したコンセンサスプライマー L1C1・L1C2 (第 1 図) を使用して HPV L1 領域の約 250 塩基対を標的とした PCR 法を行った³⁰⁾。プロトコールは 95°C で 10 分の後に 95°C で 1 分 30 秒、48°C で 1 分 30 秒、70°C で 2 分間を 43 サイクル、その後 70°C 10 分と設定した。

PCR 産物の一部分を L1C1 プライマーを用いて再増幅して約 200 塩基対の DNA 断片を得た後に、自動 DNA シークエンサー (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems, アメリカ) を用いてその塩基配列を決定した。得られた HPV L1 領域の塩基配列から NCBI データベース (GeneBank sequences <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) および Sequencing Analysis 3.3 software (Perkin-Elmer Corp, アメリカ) を用いて HPV の型判定を行った。

2. 子宮頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の検出

前述の対象症例の手術検体パラフィン包埋切片から病変部分のみを切り出し、HPV16 型と 18 型感染の有無について解析を行った。

手術検体を 15 μ m に薄切し、パラフィン除去としてキシレン 500 μ l を加えて 3000 rpm で 5 分間の遠沈を行い上清を捨てる行程を 3 回繰り返した。沈渣を 100% エタノールにて洗浄後、0.2M 塩化ナトリウム 200 μ l, pH8.0 0.1M EDTA 200 μ l, 20 mg/ml proteinase K 4 μ l, 10%SDS 20 μ l を加え 37°C にて一晩反応させた。フェノール、クロロホルム処理を行った後に、エタノール沈殿し 50 μ l の TE (pH8.0) に溶解した。

抽出したゲノム DNA から HPV16 型および 18 型の E6E7 領域を標的とした nested PCR 法を行った。PCR 法のプライマーは HPV16 型および 18 型の E6E7 領域の塩基配列から第 1 図の通りに設定した^{6), 31)}。PCR 法の陽性コントロールとして、HPV16 型の亜型がサブクローニングされたプラスミド PK114/K (Mattis Durst 博士より供与) および Japanese Collection of Research Bioresources より入手した HPV18 型がサブクローニングされているプラスミドを使用し、至適プロトコールを決定した。PCR 法のプロトコールは、95°C で 10 分の後に 94°C で 1 分 30 秒、55°C で 2 分、72°C で 2 分間を 30 サイクル、その後 70°C 10 分と設定した。

さらに、高感度 in situ hybridization (以下 ISH と略す) 検出システム GenPoint キット (DAKO Cytomation, 日本) を用いて頸部腺癌における HPV16 型、18 型 DNA の局在を調べた。前述の頸部腺癌症例のうち 43 症例の手術検体からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、キシレンによる脱パラフィン化、99% および 95% エタノールによる親水化を行った。ターゲット遺伝子の賦活化のために Target Retrieval Solution (DAKO Cytomation, 日本) に 95°C、40 分間浸した。6000~10,000 倍に希釈した proteinase K (DAKO Cytomation, 日本) に室温で 10 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため 0.3% 過酸化水素とメタノールに 20 分間反応させ、95% および 100% エタノールにて脱色し風乾した。HPV-wide spectrum, HPV16 型、HPV18 型のビオチン標識プローブ (DAKO Cytomation, 日本) を用いて 37°C で一晩反応させた。HPV-wide spectrum は HPV6 型、11 型、16 型、18 型、30 型、31 型、33 型、35 型、45 型、51 型 および 52 型を検出可能なプローブである。さらに 50

倍希釈 Stringent Wash Solution (DAKO Cytomation, 日本) にて、45°C から 55°C で 20 分間洗浄し、50mM Tris-HCl, 300 mM 塩化ナトリウム, 非イオン性界面活性剤 Tween 20 から成る TBST 溶液 (DAKO Cytomation, 日本) で洗浄した。100 倍希釈した二次酵素試薬 (DAKO Cytomation, 日本) を滴下し、horse raddish peroxidase 標識ストレプトアビジンと反応させた。TBST にて洗浄後、ジアミノベンチジンによる発色とヘマトキシリンによる後染色を行った。

3. 子宮頸部腫瘍における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色

扁平上皮系病変においては子宮頸部生検検体を用い、頸部腺系病変においては手術検体を用いて p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現を免疫組織化学染色にて検出した。

前述の検体からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成した。キシレンと 100% エタノールに反応させた後 PBS にて洗浄し、1% 過酸化水素に 5 分間浸透させて内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。PBS にて洗浄後クエン酸 (pH 6.0, 95°C, 20 分間) による抗原賦活化を行った。正常ヤギ血清を 15 分間作用させ非特異的反応を抑制し、抗 p16^{INK4a} 蛋白質モノクローナル抗体 clone E6H4 (MTM Laboratories AG, ドイツ) を 200 倍希釈したものを 1 次抗体として 3 時間作用させた^{17), 32-34)}。2 次抗体として HISTOFINE Simple Stain MAX PO (M) (Nichirei, 日本) を 30 分間加え、発色はジアミノベンチジンを用い、ヘマトキシリンで核染色を行った。

p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の評価法を第 1 表に示した。染色強度を陰性 (-) と 3 段階の陽性 (+, ++, +++) に分類し、病変に占める染色陽性細胞の割

第 1 表 p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色評価法

		染色頻度 (%)				p16 ^{INK4a} 蛋白質 過剰発現の評価
		0%	~5%	~50%	50%~	
染色強度	-					陰性
	+					弱陽性
	++					中陽性
	+++					強陽性

p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果を、染色強度と染色頻度の組合せから陰性、弱陽性、中陽性、強陽性に分類し、中陽性と強陽性を過剰発現と定義した。

(Ishikawa M et al : International Journal of Gynecological Pathology 22 : 378-385, 2003 の第 1 表を許可を得て転載)

合から染色頻度を3段階に分類した。染色強度と染色頻度の組合せから p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果を陰性、弱陽性、中陽性、強陽性に分類した。このうち中陽性と強陽性を p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現と定義した。

4. 子宮頸部擦過細胞を用いた p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色

前述の症例の子宮頸部擦過細胞を ThinPrep 法にて回収し、その浮遊液から擦過細胞をスライドガラスに噴霧してモノレイヤー標本を作製した。標本は 100%エタノールにて固定し、1%過酸化水素に5分間浸透させて内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。以後の行程は免疫組織化学染色と同じ手順で行った^{32,34)}。

p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色における判定は、細胞質と核に p16^{INK4a} 蛋白質染色が観察された場合に陽性とした。

5. 統計

扁平上皮系病変の進行と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の相関については Spearman 順位相関係数検定を用いて解析した。頸部腺癌における各臨床因子と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の相関については Kruskal-Wallis 検定または Mann-Whitney 検定にて解析した。いずれも危険率 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意差ありと判定した。

結 果

1. 子宮頸部扁平上皮系病変におけるハイリスク型 HPV 感染率と p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現頻度の関連

扁平上皮系病変において PCR 法で検出されたハイリスク型 HPV サブタイプは 16 型, 18 型, 31 型, 33 型, 35 型, 51 型, 52 型, 56 型, および 58 型であった。各病変におけるハイリスク型 HPV 感染の検出率を第 2 表に示した。軽度異形成症例では 75 例中 37 例 (49.3%)、中等度異形成症例では 49 例中 39 例 (79.6%)、高度異形成症例では 34 例中 26 例 (76.5%)、上皮内癌症例では 21 例中 18 例 (85.7%)、扁平上皮癌症例では 18 例中 16 例 (88.9%) でハイリスク型 HPV が検出された。

扁平上皮系病変における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果を第 2 図に示した。軽度異形成症例 (第 2 図 A, B) では上皮全層を占める異型細胞において細胞核および細胞質に p16^{INK4a} 蛋白質への染色を認めた。特に上皮のうち下層 3 分の 1 に p16^{INK4a} 蛋白質の強い染色を認め、p16^{INK4a} 蛋白質の強染色は異常増殖を示す領域に

第 2 表 扁平上皮系病変におけるハイリスク型 HPV 感染頻度

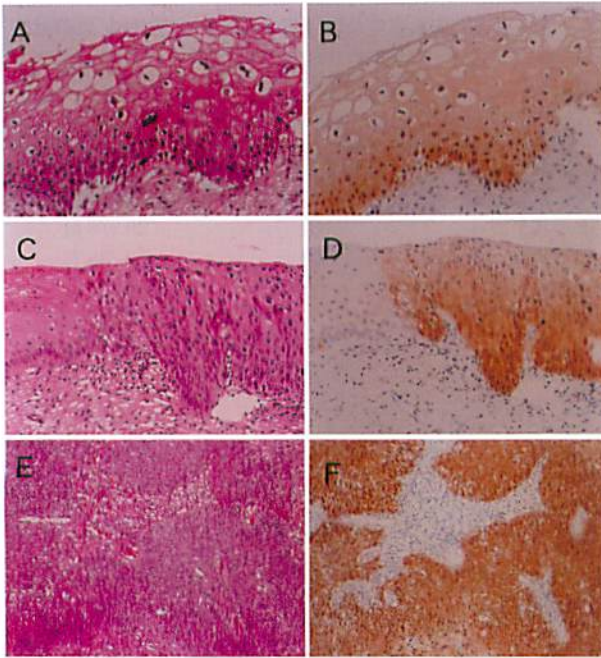
	ハイリスク型 HPV 感染検出率	
	症例数	陽性 (%)
軽度異形成	75	37 (49.3)
中等度異形成	49	39 (79.6)
高度異形成	34	26 (76.5)
上皮内癌	21	18 (85.7)
扁平上皮癌	18	16 (88.9)

一致していた。一方で基底膜下の間質は正常細胞で占められ、この部位には p16^{INK4a} 蛋白質への反応は認められなかった。また中等度異形成症例 (第 2 図 C, D) では上皮のうち下層 3 分の 2 に異常増殖を示す異型細胞を認め、同部位に p16^{INK4a} 蛋白質への強染色が認められた。本症例では病変に連続して正常上皮領域を認めたが、間質と共に p16^{INK4a} 蛋白質の染色は認められなかった。扁平上皮癌症例 (第 2 図 E, F) では病巣に局限して p16^{INK4a} 蛋白質の強陽性を認めたが、間質部分では p16^{INK4a} 蛋白質への反応は認めなかった。対照群である良性異型症例では 7 例中 1 例で弱陽性を示したのみであった。

ハイリスク型 HPV 感染陽性症例での p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度は、軽度異形成では 37 例中 12 例 (32.4%)、中等度異形成では 39 例中 32 例 (82.1%)、高度異形成では 26 例中 23 例 (88.5%) であった。上皮内癌症例 18 例および扁平上皮癌症例 16 例は全例が p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現を示した (第 3 図)。p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度は病変の進行と共に増加する傾向を示し、特に中等度異形成からは有意に増加していた ($p < 0.05$)。

2. 子宮頸部腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度

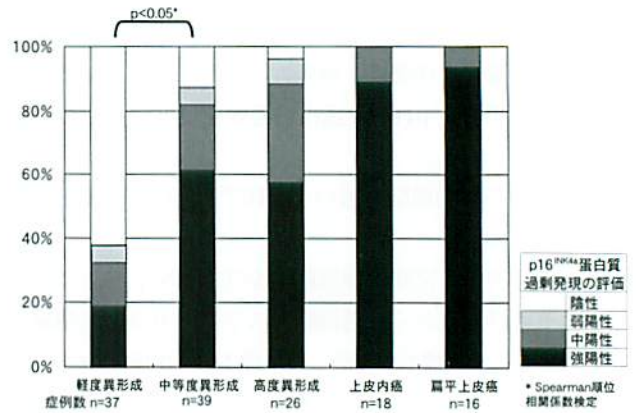
上皮内腺癌および頸部腺癌症例における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果を第 4 図に示した。第 4 図 A, B に示した上皮内腺癌症例においては、同一腺管内に正常腺上皮と腫瘍細胞が隣接している。腫瘍細胞では細胞質と核に p16^{INK4a} 蛋白質の強反応が認められたのに対し、正常腺上皮細胞では p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は認められなかった。また周囲の間質にも反応が認められず、p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は病変に局限して観察された。第 4 図 C, D に示した頸部腺癌症例においても、腫瘍細胞では細胞質と核に p16^{INK4a} 蛋白質の強反応が認



第2図 扁平上皮系病変における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色

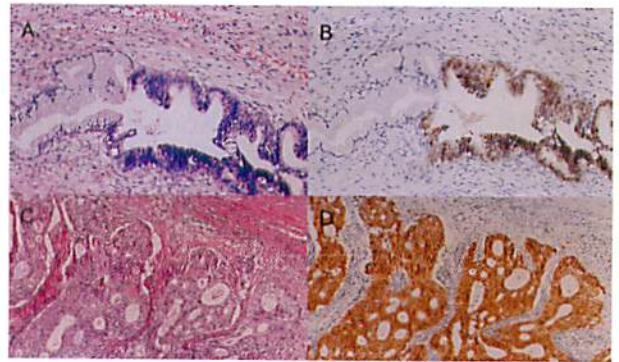
A, B: 軽度異形成症例, C, D: 中等度異形成症例, E, F: 扁平上皮癌症例, A, C, E: ヘマトキシリン-エオジン染色, B, D, F: p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色 (すべて対物20倍)

A-B, C-D, E-F ではそれぞれ連続切片を用いて各染色法を行い, 同一視野を対比した。



第3図 ハイリスク型 HPV 感染陽性症例における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度

ハイリスク型 HPV 感染が検出された扁平上皮系病変における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度を示した。病変が進行するに伴い p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度が増加する傾向が示され, 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増加していた。



第4図 腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色

A, B: 上皮内腺癌症例, C, D: 頸部腺癌症例, A, C: ヘマトキシリン-エオジン染色, B, D: p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色 (すべて対物20倍)

A-B, C-D ではそれぞれ連続切片を用いて各染色法を行い, 同一視野を対比した。(Ishikawa M et al: International Journal of Gynecological Pathology 22: 378-385, 2003 の第1図を許可を得て転載)

第3表 腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度

症例数	p16 ^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色				
	陰性 (%)	弱陽性 (%)	中陽性 (%)	強陽性 (%)	
正常子宮頸管腺	7	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)	0 (0)
上皮内腺癌	10	1 (10.0)	0 (0)	4 (40.0)	5 (50.0)
頸部腺癌	62	8 (12.9)	8 (12.9)	13 (21.0)	33 (53.2)
腺扁平上皮癌	9	1 (11.1)	0 (0)	1 (11.1)	7 (77.8)

染色態度は第1表による。

(Ishikawa M et al: International Journal of Gynecological Pathology 22: 378-385, 2003 の第2表を許可を得て転載)

第 4 表 頸部腺癌における病理組織学的分類と p16^{INK4} 蛋白質過剰発現頻度の相関

	症例数	p16 ^{INK4} 蛋白質免疫組織化学染色				
		陰性 (%)	弱陽性 (%)	中陽性 (%)	強陽性 (%)	
組織型						
粘液性腺癌	38	6 (15.8)	4 (10.5)	7 (18.4)	21 (55.3)	} n.s.*
類内膜腺癌	16	1 (6.3)	3 (18.8)	3 (18.8)	9 (56.3)	
混合型	5	1 (20.0)	0 (0)	2 (40.0)	2 (40.0)	
分類不能	3	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	
分化度						
G1	17	3 (17.6)	1 (5.9)	4 (23.5)	9 (52.9)	} n.s.*
G2	10	2 (20.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	5 (50.0)	
G3	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	
扁平上皮系病変合併						
あり	11	1 (9.1)	1 (9.1)	4 (36.4)	5 (45.5)	} n.s.**
なし	51	7 (13.7)	7 (13.7)	9 (17.6)	28 (54.9)	

検定は、*Kruskal-Wallis 検定および**Mann-Whitney 検定による

染色態度は第 1 表による

(Ishikawa M et al : International Journal of Gynecological Pathology 22 : 378-385, 2003 の第 2 表, 第 3 表を許可を得て転載)

第 5 表 頸部腺癌における予後因子と p16^{INK4} 蛋白質過剰発現頻度の相関

	症例数	p16 ^{INK4} 蛋白質免疫組織化学染色				
		陰性 (%)	弱陽性 (%)	中陽性 (%)	強陽性 (%)	
術後進行期分類						
pT1N0M0	46	6 (13.0)	5 (10.9)	9 (19.6)	26 (56.5)	} n.s.*
pT1N1M0, 1	6	0 (0)	1 (16.7)	4 (66.7)	1 (16.7)	
pT2N0M0	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
pT2N1M0, 1	5	2 (40.0)	0 (0)	0 (0)	3 (60.0)	
pT3, 4	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
再発						
あり	11	3 (27.3)	1 (9.1)	3 (27.3)	4 (36.4)	} n.s.**
なし	47	4 (8.5)	6 (12.8)	9 (19.1)	28 (59.6)	

検定は、*Kruskal-Wallis 検定および**Mann-Whitney 検定による

染色態度は第 1 表による

(Ishikawa M et al : International Journal of Gynecological Pathology 22 : 378-385, 2003 の第 3 表を許可を得て転載)

第6表 頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度の相関

ハイリスク型 HPV	症例数	p16 ^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色			
		陰性 (%)	弱陽性 (%)	中陽性 (%)	強陽性 (%)
HPV16	16	0 (0)	1 (6.3)	1 (6.3)	14 (87.5)
HPV18	13	0 (0)	0 (0)	5 (38.5)	8 (61.5)
HPV16 & 18 重複感染	3	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)
陰性	17	6 (35.3)	2 (11.8)	5 (29.4)	4 (23.5)

p < 0.01*

*検定は、Mann-Whitney 検定による
 頸部腺癌 49 症例のうち HPV16 型が 16 例、18 型が 13 例、混合感染が 3 例で検出された。染色態度は第 1 表による。
 (Ishikawa M et al : International Journal of Gynecological Pathology 22 : 378-385, 2003 の第 4 表を許可を得て転載)

第7表 頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の検出-PCR 法と ISH 法の比較-

単位：症例数

PCR 法	ISH 法			
	陰性	HPV16 型	HPV18 型	wide spectrum*
陰性	13	0	1	1
HPV16 型	9	6	0	0
HPV16 型, 18 型重複	1	1	0	1
HPV18 型	6	0	3	1

は、PCR 法と ISH 法で結果が一致した群
 HPV wide spectrum* : HPV6 型, 11 型, 16 型, 18 型, 30 型, 31 型, 33 型, 35 型, 45 型, 51 型および 52 型を認識可能なプローブ

められたのに対し、周囲の間質には反応が認められず、p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は病変に局限していた。腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度を第 3 表に示した。対照群 7 症例において、p16^{INK4a} 蛋白質の弱陽性を 3 例に認めたが過剰発現を示した症例はなかった。p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度は、上皮内腺癌 90.0%、頸部腺癌 74.2%、腺扁平上皮癌 88.9%であり、腺系病変においても p16^{INK4a} 蛋白質は高率に過剰発現していることが判明した。

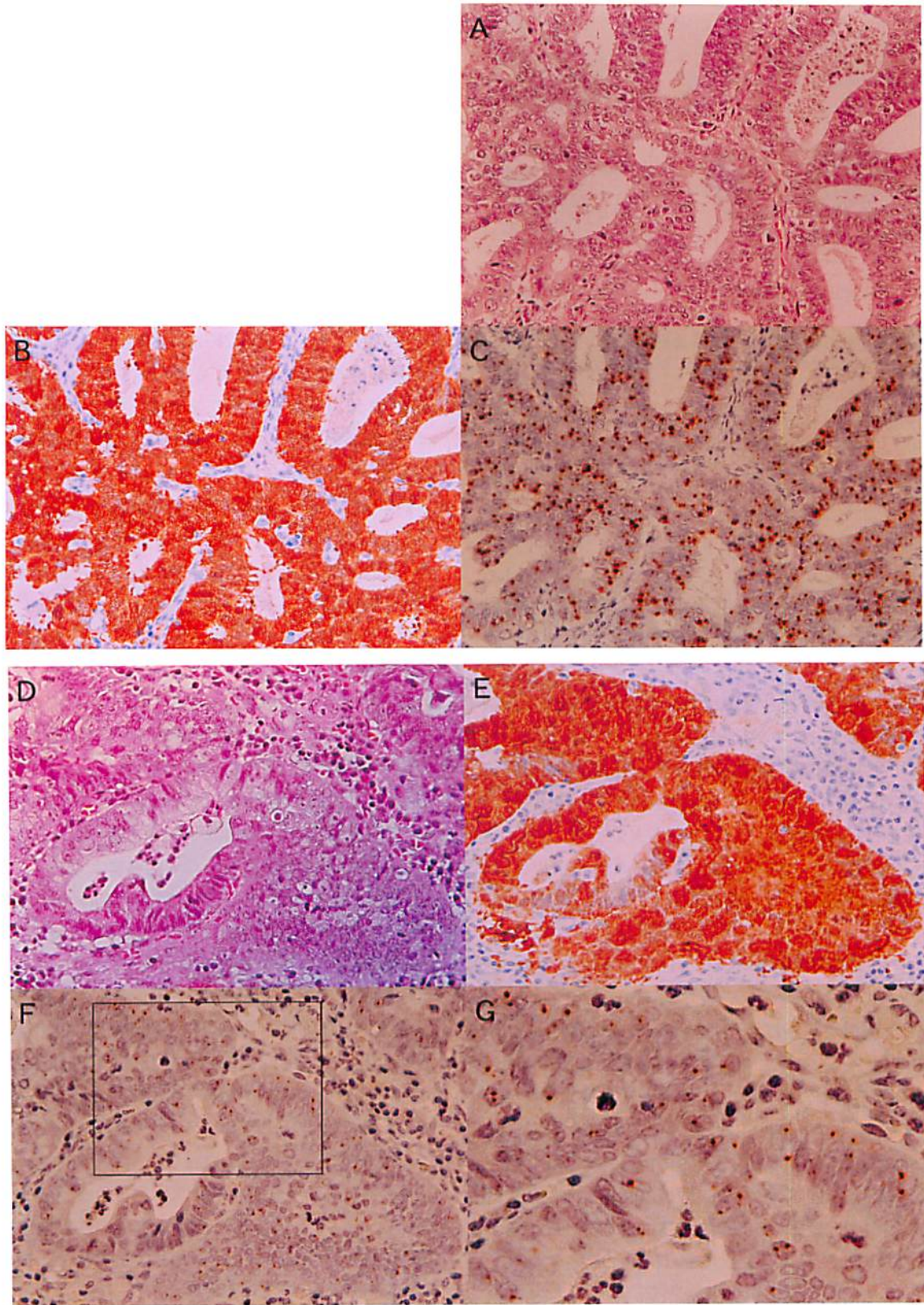
今回検討した頸部腺癌 62 例は病理組織学的に粘液性腺癌 38 症例 (内頸部型 37 症例および腸型 1 症例)、類内膜腺癌 16 症例および混合型 5 症例と、組織型分類が不能であった 3 症例に分類した。これらの組織型分類や分化度、扁平上皮系病変共存の有無といった病理組織学的分類と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関が認められるかを検討したが、各分類と p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現頻度に有意な相関は認められなかった (第 4 表)。また

術後進行期分類や再発の有無といった各予後因子においても p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度との相関は認められなかった (第 5 表)。

3. 子宮頸部腺癌における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度と HPV 感染率の相関

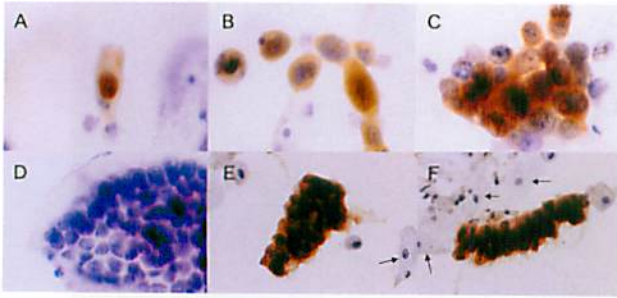
HPV 感染の検出を行った頸部腺癌 49 症例のうち HPV16 型もしくは 18 型が検出されたのは 32 症例 (65.3%) であった。頸部腺癌における HPV 感染の有無と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の相関を第 6 表にまとめた。HPV16 型または 18 型が陽性であった 32 症例のうち 30 症例 (93.8%) で p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が認められたのに対し、HPV16 型、18 型が陰性であった 17 症例では 9 症例 (52.9%) で p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が認められ、HPV 感染の有無により p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現頻度に有意な差が認められた (p < 0.01)。

第 5 図に HPV16 型、18 型が陽性であった症例のへ



第5図 頭部腺癌における p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色と HPV16 型, 18 型 In situ Hybridization
A-C : HPV16 型陽性症例, D-G : HPV18 型陽性症例, A, D : ヘマトキシリン-エオジン染色, B, E :
p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色, C : HPV16 型特異的 in situ Hybridization, F : HPV18 型特異的 in situ
Hybridization, G : F の黒枠内を拡大した。(A-F 対物 40 倍)
A-C, D-F ではそれぞれ連続切片を用いて各染色法を行い, 同一視野を対比した。

考 察



第6図 子宮頸部擦過細胞を用いた p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色

A: 中等度異形成症例, B: 高度異形成症例, C: 上皮内癌症例, D: 正常子宮頸管腺, E, F: 頸部腺癌症例 (すべて対物 100 倍)

E, F 内の矢印は正常扁平上皮細胞を示す。(Ishikawa M et al: International Journal of Gynecological Pathology 22: 378-385, 2003 の第2図を許可を得て転載)

マトキシリン-エオジン染色と p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色および HPV16 型, 18 型特異的のプロンプを用いた ISH 法の切片を比較した。病変部分に限局して p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が認められ, さらに腺癌細胞の核内に HPV16 型, 18 型 DNA の点状のシグナルが認められた。ISH 法の結果を第7表に示した。PCR 法にて HPV16 型もしくは 18 型が検出された 28 症例のうち 12 症例 (42.9%) で HPV DNA が点状のシグナルとして検出され, PCR 法と ISH 法の検出結果は 43 例中 25 例 (58.1%) で一致していた。

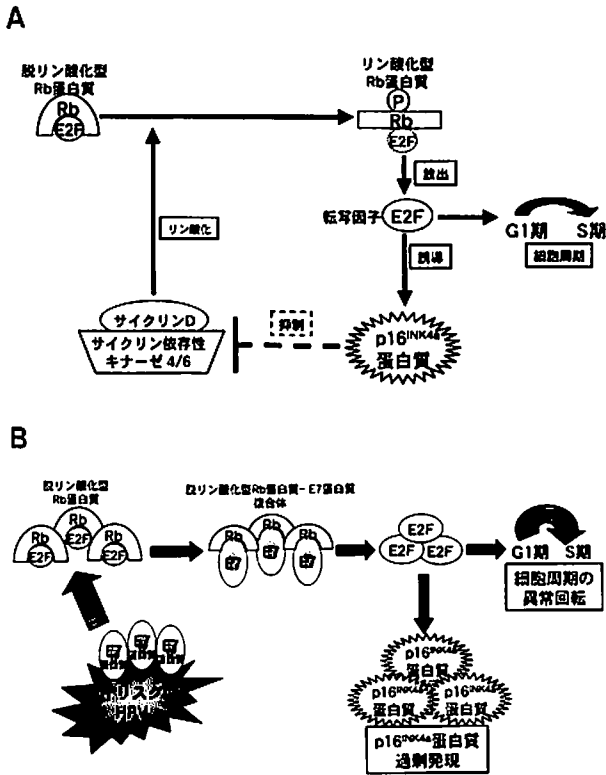
4. 子宮頸部擦過細胞を用いた p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色

p16^{INK4a} 蛋白質免疫細胞化学染色の結果を第6図に示す。第6図 A, B, C, E, F の腫瘍細胞では p16^{INK4a} 蛋白質への染色を認めたのに対し, 正常の子宮頸管腺 (第6図 D) や第6図 E, F 視野内の矢印に認められる正常扁平上皮細胞では p16^{INK4a} 蛋白質への染色は認められなかった。軽度異形成 12 症例中 3 症例 (25.0%), 中等度異形成 15 症例中 8 症例 (53.3%), 高度異形成 12 症例中 9 症例 (75.0%) および上皮内癌 13 症例全例において腫瘍細胞に p16^{INK4a} 蛋白質への染色を認めた。また腺癌においては 14 症例中 12 症例 (85.7%) で染色陽性であった。

サイクリン依存性キナーゼインヒビターである p16^{INK4a} 蛋白質は Rb 蛋白質による細胞周期調節機構を制御する蛋白質である。Rb 蛋白質は脱リン酸化の状態では細胞周期転写因子である E2F を捕捉し細胞周期の回転を抑えている。しかし, Rb 蛋白質がサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ複合体によるリン酸化を受けると, リン酸化型 Rb 蛋白質は E2F と結合する活性を失い, E2F は細胞周期を G1 期から S 期に進めて細胞の増殖が始まる。また E2F はこの際に p16^{INK4a} 蛋白質の発現を誘導すると考えられている³⁵⁾。誘導された p16^{INK4a} 蛋白質はサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ複合体を阻害するため, 間接的に Rb 蛋白質のリン酸化を抑制している。このように p16^{INK4a} 蛋白質は Rb 蛋白質による細胞周期調節機構を制御する役割を有している^{12), 13)} (第7図 A)。p16^{INK4a} 蛋白質は Serrano らにより 1993 年に報告された蛋白質であるが⁸⁾, 肺癌や白血病をはじめとする多種の悪性腫瘍において p16^{INK4a} 遺伝子の欠失や変異またはプロモーターのメチル化などの遺伝子異常が見い出され, 以来 p16^{INK4a} 蛋白質の不活化は発癌因子として注目されてきた⁹⁻¹¹⁾。

一方で, ヒト乳腺上皮細胞にハイリスク型 HPV として最も代表的な HPV16 型の E7 蛋白質を導入すると p16^{INK4a} 蛋白質が過剰に発現されることが報告された³⁵⁾。E7 蛋白質は脱リン酸化型 Rb 蛋白質と結合してその機能を抑制する活性を有し, この活性により脱リン酸化型 Rb 蛋白質に結合できない E2F が増加する。その結果細胞は異常増殖を起こし, 同時に p16^{INK4a} 蛋白質が過剰に発現してくると考えられる (第7図 B)。以上の論理から扁平上皮癌の発癌過程でハイリスク型 HPV が Rb 蛋白質および細胞周期に及ぼす影響を p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現として捉えることができる^{14-16), 32)}。そこで本研究では, ハイリスク型 HPV が関与していると考えられている扁平上皮系病変において, HPV 感染と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の関連を検討した。

扁平上皮系病変での p16^{INK4a} 蛋白質免疫組織化学染色の結果, p16^{INK4a} 蛋白質は正常細胞や良性異型細胞では過剰発現を示さなかったが, 扁平上皮系病変の癌細胞や異形成細胞では高率に過剰発現を示していたことが判明し, 免疫組織化学染色を用いることにより正常細胞と腫瘍細胞を容易に鑑別することが可能であった。さらに p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現頻度は病変の進行と共に増加していく傾向があり, 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ることが判明した。



第7図 p16^{INK4a} 蛋白質の生理活性と過剰発現のメカニズム
 (A) p16^{INK4a} 蛋白質の生理活性と発現のしくみ
 脱リン酸化型 Rb 蛋白質は転写因子 E2F と結合することで細胞周期の調節を行っている。サイクリン D-サイクリン依存性キナーゼ 4/6 の複合体が Rb 蛋白質をリン酸化すると、リン酸化型 Rb 蛋白質は活性を失い E2F を放出する。フリーとなった E2F は細胞周期を G1 期から S 期に進め、細胞の増殖が始まる。この際 E2F は p16^{INK4a} 蛋白質の発現を誘導する。p16^{INK4a} 蛋白質はサイクリン依存性キナーゼ 4/6 を抑制する活性を有しており、Rb 蛋白質のリン酸化に歯止めを掛けている。
 (B) HPV E7 蛋白質による p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現のメカニズム

ハイリスク型 HPV の E7 蛋白質は宿主細胞の脱リン酸化型 Rb 蛋白質と結合してその機能を抑制する。E7 蛋白質の存在下では脱リン酸化型 Rb 蛋白質は E2F と結合できないため、フリーとなった E2F が増加する。このため細胞周期の異常回転が生じ、同時に p16^{INK4a} 蛋白質は過剰に発現する。Rb 蛋白質失活の結果として過剰に発現された p16^{INK4a} 蛋白質の生理的な役割は明らかにされていないが、p16^{INK4a} 蛋白質が過剰に発現されても、ターゲットである脱リン酸化型 Rb 蛋白質はすでに E7 蛋白質による不活化を受けているため、もはや Rb 蛋白質による細胞周期調節機構は機能しなくなっている。(Ishikawa M et al: International Journal of Gynecological Pathology 22: 378-385, 2003 の第3図を許可を得て転載)

p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は Rb 蛋白質の機能的失活を示していることから、HPV 感染による発癌機構において Rb 蛋白質の不活化は軽度異形成から中等度異形成に進行する際に高率に生じていることが判明した。この結果から、細胞周期調節機構の破綻という観点において軽度異形成と中等度異形成は異なる病態であることが示唆された。また軽度異形成症例のうち p16^{INK4a} 蛋白質が過剰発現を示す群は上位病変へ進行する危険が高い群であると推測されるが、我々の検討ではこの推測を裏付ける明確な結論は未だ得られていない。今後、p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現というパラメーターを応用することで、軽度異形成患者群のうち上位病変へ進行する危険性が高い症例群を抽出する方法が導き出されれば臨床にきわめて有用なツールになると思われる。

一方、頸部腺系病変においても p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現は病変に局限して高頻度に認められた。Riethdorf や Milde-Langosch らも頸部腺系病変における p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現を報告している^{36), 37)}。本研究においても彼等が使用した抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったが、正常頸管腺上皮への非特異的の反応を認めたため、至適条件を見い出せなかった。

頸部腺癌は発癌因子や組織型別の分子生物学的差異などにおいて明かにされていない点が多い。そのため頸部腺癌における組織型、分化度、扁平上皮系病変の混在の有無といった病理組織学的分類と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関があるかを検討した。その目的は組織型の違いが HPV 感染の有無と関連しているか否かを検討することであったが、各組織学的分類と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関は認められず、組織型の違いと HPV 感染の有無を結び付けることは出来なかった。

また本研究では術後進行期分類や再発の有無といった予後因子と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関があるかを検討した。Lee らは p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が前立腺癌における再発予知のマーカーになりうることを報告しているが³⁸⁾、子宮頸部腺癌においては各予後因子と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に相関は認められなかった。

頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の関与について今日までいくつかの報告がされてきた^{23, 28)}。いずれも PCR 法や ISH 法を用いた HPV 感染の検出に関する報告であるが、ハイリスク型 HPV 感染の検出率はその解析方法の違いも反映して 32% から 91% と報告により大きな差が見られた。またハイリスク型 HPV 感染が検出されても頸部腺癌の発癌と結びつける根拠がなく、頸部腺癌の発癌過程に HPV 感染が関与しているか否かは不明であった。そこで本研究では、扁平上皮系病変にお

いて行った解析と同様に頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の有無と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現の相関を検討し、頸部腺癌の発癌過程におけるハイリスク型 HPV の関与を明らかにしようと試みた。頸部腺癌におけるハイリスク型 HPV 感染の検出に際しては、コンタミネーションなどの偽陽性を防ぐために、検体は頸部腺癌の病巣のみから抽出して隣接する扁平上皮細胞の混入を防いだ。さらに ISH 法も行い HPV DNA の局在を明らかにした。またパラフィン包埋切片を検体として用いることから生じる PCR 法の検出感度の低下を防ぐために、代表的なハイリスク型である HPV16 型と 18 型に標的を絞る^{23, 29)}、HPV16 型、18 型 DNA の E6E7 領域の塩基配列からそれぞれ特異的な nested-PCR 法を独自に開発して検出感度を高めた^{6), 31)}。その結果、頸部腺癌の 65.3% で HPV16 型もしくは 18 型が検出された。ISH 法においても HPV16 型、18 型の DNA が腫瘍細胞の核内に点状のシグナル (ドットパターン) として検出された。Cooper らによると ISH におけるドットパターンは HPV DNA が宿主細胞核にインテグレーションしていることを示している³⁹⁾。このことから頸部腺癌細胞に HPV16 型もしくは 18 型の DNA がインテグレーションしていることがわかった。

HPV 感染の有無と p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度との相関を検討したところ、ハイリスク型 HPV 感染陽性症例における p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度は 93.8% を占め、ハイリスク型 HPV 感染陰性症例に比べて有意に高かった。頸部腺癌の 61.2% の症例でハイリスク型 HPV 感染とともに p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が検出された。これらの症例ではハイリスク型 HPV の DNA が検出されただけでなく宿主細胞の反応である p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現が認められたことから、頸部腺癌の発癌にハイリスク型 HPV 感染が関与している可能性が強く示唆された。

一方で、ハイリスク型 HPV が検出されなかった頸部腺癌においても p16^{INK4a} 蛋白質が過剰発現を示した群が 49 例中 9 例 (18.4%) 存在していたが、これらの症例では Rb 遺伝子の異常などの発癌機構が生じていると考えられた。しかし PCR 法による HPV 検出感度の限界も考慮に入れざるを得ない。また頸部腺癌のうち HPV 感染と p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現が共に検出されなかった群は 49 例中 8 例 (16.3%) 存在していた。これらの症例は、HPV 感染が関与しないメカニズムにより発癌に至ったと考えられた。

現在子宮頸癌のスクリーニングの方法として細胞診が用いられていることから、本研究で行ってきた組織検体

を用いた p16^{INK4a} 蛋白質の免疫化学染色を細胞診検体に応用することが可能か否かを検討する目的で p16^{INK4a} 蛋白質の免疫細胞化学染色を試みた^{32, 33)}。その結果、組織検体と同様に細胞診検体で p16^{INK4a} 蛋白質の過剰発現を検出することが可能であることが判明した。加えて頸部腺癌ではその解剖学的位置により、生検や腔拡大鏡診にて病巣を捉えにくいことがあり細胞診の診断精度が強くと求められることがある。今回行った免疫細胞化学染色の試みから、臨床的に有用な補助診断法への発展が期待された。

総 括

本研究では、p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現とハイリスク型 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、ハイリスク型 HPV による Rb 蛋白質の不活化は軽度異形成から中等度異形成に進行する際に高率に生じていることが判明した。さらに、頸部腺癌においてハイリスク型 HPV 感染の有無により p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現頻度に有意差が認められ、頸部腺癌の 61.2% の症例は発癌にハイリスク型 HPV 感染が関与している可能性が強く示唆された。

このように p16^{INK4a} 蛋白質過剰発現を検討することで、扁平上皮系病変においてはハイリスク型 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、さらに腺系病変においてもハイリスク型 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。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際し直接御指導、御助言をいただきました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室塚崎克己助教授、久布白兼行講師、藤井多久磨博士に厚く感謝いたします。

本研究の一部は第 14 回国際細胞診学会 (アムステルダム, 2001)、第 42 回日本臨床細胞学会 (宇都宮, 2001)、第 30 回日本婦人科腫瘍学会 (横浜, 2001)、第 60 回日本癌学会 (横浜, 2001)、第 40 回日本臨床細胞学会秋期大会 (米子, 2001)、第 54 回日本産科婦人科学会学術集会 (東京, 2002)、第 43 回日本臨床細胞学会 (大阪, 2002)、第 61 回日本癌学会 (東京,

2002), 第20回国際パピローマ学会(パリ, 2002), 第9回国際婦人科癌学会(ソウル, 2002), 第55回日本産科婦人科学会学術集会(福岡, 2003), 第21回国際パピローマ学会(メキシコシティ, 2004), および第56回日本産科婦人科学会学術集会(東京, 2004)において発表した。

文 献

- 1) Gissmann L, zur Hausen H : Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*) : *Int J Cancer* 25 : 605-609, 1980
- 2) Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H : A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 3812-3815, 1983
- 3) Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E : The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243 : 934-937, 1989
- 4) Werness BA, Levine AJ, Howley PM : Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248 : 76-79, 1990
- 5) Fujii T, Tsukazaki K, Kiguchi K, Kubushiro K, Yajima M, Nozawa S : The major E6/E7 transcript of HPV-16 in exfoliated cells from cervical neoplasia patients. *Gynecol Oncol* 58 : 210-215, 1995
- 6) Sasagawa T, Minemoto Y, Basha W, Yamazaki H, Nakamura M, Yoshimoto H, et al : A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res* 67 : 127-139, 2000
- 7) zur Hausen H : Papillomaviruses and cancer : from basic studies to clinical application : *Nat Rev Cancer* 2 : 342-350, 2002
- 8) Serrano M, Hannon GJ, Beach D : A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366 : 704-707, 1993
- 9) Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al : Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genetics* 8 : 27-32, 1994
- 10) Kamb A : Cell-cycle regulators and cancer. *Trends in Genetics* 11 : 136-140, 1995
- 11) Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al : 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1 : 686-692, 1995
- 12) Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G : Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16^{INK4}/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO Journal* 14 : 503-511, 1995
- 13) Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, Yoon HE, Komoto Y, Oue T, et al : Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers : an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 65 : 442-445, 1996
- 14) Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, et al : Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer* 75 : 1410-1416, 1997
- 15) Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T : Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* 48 : 580-585, 1998
- 16) Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T : Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 153 : 1741-1748, 1998
- 17) Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, et al : P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol* 34 : 778-783, 2003
- 18) Sasieni P, Adams J : Changing rates of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix in England. *Lancet* 357 : 1490-1493, 2001
- 19) Liu S, Semenciw R, Mao Y : Cervical cancer : the increasing incidence of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in younger women. *CMAJ* 164 : 1151-1152, 2001
- 20) Chen RJ, Lin YH, Chen CA, Huang SC, Chow SN, Hsieh CY : Influence of histologic type and age on survival rates for invasive cervical carcinoma in Taiwan. *Gynecol Oncol* 73 : 184-190, 1999
- 21) Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, Itamochi H, Sato S, Akeshima R, et al : Prognosis and clinicopathological characteristics of Ib-IIb adenocarcinoma of the uterine cervix in patients who have had radical hysterectomy. *Eur J Surg Oncol* 26 : 464-467, 2000
- 22) Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, et al : Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81 : 1144-1151, 2002
- 23) Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J : Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer* 77 : 2275-2279, 1996
- 24) Lee MF, Chang MC, Wu CH : Detection of human papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the polymerase chain reaction. *Int J Gynaecol Obstet*

- 63 : 265-270, 1998
- 25) Tase T, Okagaki T, Clark BA, Manias DA, Ostrow RS, Twiggs LB, et al : Human papillomavirus types and localization in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix : a study by in situ DNA hybridization. *Cancer Res* 48 : 993-998, 1988
- 26) Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM : International trends in the incidence of cervical cancer : I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 75 : 536-545, 1998
- 27) Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, et al : Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol* 157 : 1055-1062, 2000
- 28) Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E : The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer* 37 : 246-250, 2001
- 29) Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Mukai M, Saito M, Iwata T, et al : Papanicolaou tests and molecular analyses using new fluid-based specimen collection technology in 3000 Japanese women. *Br J Cancer* 88 : 1883-1888, 2003
- 30) Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A : Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 82 : 524-531, 1991
- 31) Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K : Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J General Virol* 72 : 1039-1044, 1991
- 32) Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al : Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92 : 276-284, 2001
- 33) Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ : Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 46 : 25-29, 2002
- 34) Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al : p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis : CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 56 : 56-63, 2003
- 35) Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al : Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 4350-4354, 1996
- 36) Riethdorf L, Riethdorf S, Lee KR, Cviko A, Loning T, Crum CP : Human papillomaviruses, expression of p16, and early endocervical glandular neoplasia. *Hum Pathol* 33 : 899-904, 2002
- 37) Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Poppinghaus A, Riethdorf L, Loning T : Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virch Arch* 439 : 55-61, 2001
- 38) Lee CT, Capodiceci P, Osman I, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, et al : Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 5 : 977-983, 1999
- 39) Cooper K, Herrington CS, Graham AK, Evans MF, McGee JO : In situ evidence for HPV 16, 18, 33 integration in cervical squamous cell cancer in Britain and South Africa. *J Clin Pathol* 44 : 406-409, 1991

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導: 池田康夫教授)

鈴木 美佐子

(平成 16 年 9 月 24 日受付)

Key Words : VWF-CP, ADAMTS-13, VWF, TTP, thrombosis

Von Willebrand 因子 (以下 VWF と略す) は血液凝固第 VIII 因子の安定化因子/キャリアーとして第 VIII 因子と複合体を形成し血中を循環しているほか細動脈等で生じる高ずり応力のもとで血小板血栓形成の補因子として機能する。すなわち、血管内皮が損傷すると内皮下に露呈したコラーゲンに血漿 VWF が結合し、VWF を標的に血小板粘着・凝集反応がおきるという止血機構を担っている。VWF は血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生される巨大糖タンパクで、血漿中だけでなく血管内皮下組織にも広く分布している。また循環している VWF の 15-25% は血小板の α 顆粒中に貯蔵されている。VWF は生合成の過程で 741 残基という長いプレプロ配列が切断され、成熟体として 2050 残基のアミノ酸からなる分子量約 25 万のモノマーが、分子間ジスルフィド結合を介して N 末側と N 末側、C 末側と C 末側で互い違いに重合したマルチマーを形成する。VWF 高分子マルチマーは、血管内皮細胞内では、通常の“large”マルチマーよりさらに高分子量の“unusually large”マルチマーとして存在し、血流中へ放出されると速やかに部分分解を受けて分子量 500~20,000 kDa の不連続に分布するマルチマーパターンを示すことが知られている。この分解に働くのが VWF 切断酵素であり VWF の A2 ドメイン内に存在するペプチド結合 Y842-M843 を切断する^{1), 2)}。

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; 以下 TTP と略す) は血小板減少、細血管障害性溶血性貧血、動揺性精神神経障害、腎機能障害、発熱の古典的 5 徴候を特徴とする全身性疾患である。近年の研究により、TTP 患者血漿中には“unusually large” VWF マルチマーが存在してお

り、微小血管内で血小板凝集を惹起し、血小板血栓を心臓、脳、腎臓などの諸臓器に形成することが TTP の病態と考えられている。後天性 TTP では VWF 切断酵素に対する自己抗体が存在するためにその酵素活性が低下し^{3), 4)}、先天性 TTP では遺伝子変異による酵素活性の欠損⁵⁾が病因であることが明らかとなった。

1996 年 Furlan¹⁾らや Tsai²⁾は VWF 切断酵素の活性測定法を考案し、その部分精製を行い、ゲル濾過での溶出位置や各種プロテアーゼインヒビターとの反応性あるいは活性発現時の 2 価金属イオン要求性などから、VWF 切断酵素は分子量約 150~300 kDa のメタロプロテアーゼであろうと報告した。2001 年、複数の研究グループがヒト血漿からの VWF 切断酵素の精製に成功し、得られた N 末端アミノ酸配列の情報をもとに、その遺伝子解析から VWF 切断酵素が ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif) ファミリーに属する新規な亜鉛型メタロプロテアーゼの 1 種、ADAMTS-13 であることが判明した^{6), 7)}。

一方、ADAMTS-13 の発現部位に関しては、ADAMTS-13 の部分 cDNA 配列が脳や前立腺で確認されており、RT-PCR による検討では卵巣、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、小腸ならびに末梢白血球で弱い mRNA が検出されたと報告されている⁸⁾。しかし半定量的な PCR による解析の結果では骨髄での ADAMTS-13 の遺伝子発現はみられたものの末梢白血球での発現はみられなかったとされている¹⁰⁾。現在までの報告では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の形成のうえで必須のものであることをふまえると、血小板

における ADAMTS-13 の有無ならびにその機能は大変重要な論点である。前述のとおり VWF が血小板の α 顆粒中に存在するという事実も考慮し、我々は ADAMTS-13 が血小板で発現しているか否か、また血小板での局在に関する研究¹¹⁾をおこなった。

一方、全長 4.7 kb の mRNA は肝臓で特異的に発現していることから血漿の VWF 切断酵素は肝臓由来であろうと考えられているが^{6), 8), 9)}、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。Lee らは肝生検、剖検例で *in situ hybridization* を施行した結果から ADAMTS-13 が perisinusoidal cells で発現していると報告したが (学会発表)¹²⁾、肝臓における ADAMTS-13 の産生部位がどこであるかについての検討はされていない。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¹³⁾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。

実験方法

1. 血小板における VWF 切断酵素 (ADAMTS-13) の発現と局在の検討

1) 血液検体

研究に供したヒト血小板、白血球検体は健常者 (既往歴、現症を有さない) の末梢血から分離した。これに先立ち研究内容についてインフォームドコンセントを取得した。

2) ウェスタンブロット法

3.8%クエン酸添加血を室温で 100×g 15 分間遠心分離し platelet-rich plasma (PRP) を得た。血小板凝集防止のため、PRP に 3 分の 2 量相当の ACD-A 溶液 (クエン酸ナトリウム 2.2 w/v%, クエン酸 0.8 w/v%, ブドウ糖 2.2 w/v%, pH4.5-5.5, Terumo, Tokyo, Japan), プロスタグランジン E₁ (終濃度 1.2 μ M) と EDTA (終濃度 1.2 μ M) を加えた。この PRP から白血球を除去する目的で、輸血用フィルター Sepacell PLX (Asahi Medical, Tokyo, Japan) を 2 回通過させ、室温で 780×g, 7 分間遠心分離を施行した。得られた血小板のペレットを ACD-A, プロスタグランジン E₁ 存在下で N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes)-Tyrode's buffer で洗浄し、浮遊させた。洗浄血小板は 5% 2-mercaptoethanol を含む Laemmli sample buffer に 1 : 1 の割合で混合し、5-15% gradient gel を用い SDS 電気泳動を行った。こ

の際、約 2×10^7 個の血小板を 1 レーンにのせた。同時にリコンビナント ADAMTS-13 を陽性コントロールとして用いた。電気泳動後、polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, CA, USA) に転写し 1% のスキムミルクでブロッキングした。その後メンブレンをマウス抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体 (1 μ g/ml, 化学及血清療法研究所 副島見事先生より提供, exon 25 に相当する合成ペプチドを抗原として免疫) でインキュベートした。T-TBS 溶液で 3 回洗浄後、二次抗体として horseradish-peroxidase-conjugated sheep IgG against mouse Ig (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) を反応させた。その後 Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer, MA, USA) により発光させた。リコンビナント ADAMTS-13 は human fetal liver cDNA library (Biochain Institute Inc. CA, USA) を用いたオリゴヌクレオチドの合成によって得られた DNA 断片をつなぎ合わせ、VWF 切断酵素全長 cDNA を得、発現ベクター pcDNA 3.1/myc-His に導入、HEK293 細胞を使用し pcDNA3.1/VWF-CP/myc-His を導入し形質転換を行った (HEK293/ rADAMTS-13)¹⁴⁾。

3) フローサイトメトリーによる解析

PRP (4.8×10^8 個血小板/ml) をマウス抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体 (1 μ g/ml), 抗ヒト CD41 抗体 (5B12, 2.25 μ g/ml, Dako Cytomation, Kyoto, Japan), 抗 β -actin 抗体 (AC15, 25 μ g/ml, Sigma, MO, USA) または抗ヒト CD45 抗体 (T29/33, 3 μ g/ml, Dako Cytomation) で 1 時間室温にて反応させた。対照実験として mouse IgG1 (1.125 μ g/ml, Dako Cytomation) を 1 次抗体として使用した。permeabilization の目的で 0.1% NP40 で前処理を行った。permeabilization 処理した血小板は permeabilization 処理なしの血小板と同条件下で 1 次抗体と反応させた。1 次抗体と反応後、すべての検体を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、FITC-conjugated rabbit F (ab)² fragments of anti-mouse IgG antibody (10 μ g/ml, Dako Cytomation) と室温で 30 分間反応させた。その後、プロスタグランジン E₁ 添加 PBS (10 mM リン酸ナトリウム, 150 mM 塩化ナトリウム, pH7.4) で洗浄し、フローサイトメーター (COULTER EPICS XL-MCL Flow-Cytometer; Beckman, FL, USA) で解析、データは System II software で解析した。

4) 免疫電顕法

ヒト正常洗浄血小板を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、ショ糖に浸漬後、凍結、超薄切片を製作した。

これらの切片をマウス抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体でインキュベートし、さらに金粒子標識ヤギ抗マウス二次抗体でインキュベート後、ウラン染色を行い透過型顕微鏡で観察した。

5) RT-PCR 法と塩基配列決定法

2) で記したと同様に Sepacell PLX を用いて PRP より白血球除去を行い、リアルタイム PCR にて CD20 が増幅されないことにより白血球の混入がないことを確認した。血小板のペレットは TRIZOL (Invitrogen, CA, USA) を用いて処理し、クロロホルムで溶解した血小板のペレットから total RNA を抽出しイソプロパノールで沈降した。血小板 RNA (3 µg) は 70°C で 10 分間処理後 TrueScript II Reverse Transcriptase kit (Sawady Technology, Tokyo, Japan) を使用し、特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用い 42°C で 65 分間逆転写反応を行った。ADAMTS-13 の exon 1-7 に対応する cDNA の増幅に用いたプライマーはセンスプライマーとして RT-1 (5'-ATGCACCAGCGTCACCCCG-3')、アンチセンスプライマーとして RT-2 (5'-AATGGTGACTCCCAGGTCGA-3') を用いた。PCR は TaKaRa LA Taq (Takara Shuzo, Shiga, Japan) を用い、5 分間 96°C で反応後、脱重合に 96°C で 1 分、プライマーの重合に 52°C で 1 分、伸長反応に 72°C で 1 分の条件を用い、35 サイクルの反応を行った。PCR 産物を 2% アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイド液で染色した。アガロースゲルよりバンドを切り出し GENE CLEAN II kit (Bio 101, CA, USA) を用い DNA を抽出、精製した。塩基配列は ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Chiba, Japan) を用い、Model 310 DNA autosequencer (Applied Biosystems, CA, USA) で決定した。

6) リアルタイム PCR 法

5) に記したように RNA を単離し cDNA を合成したのち、ADAMTS-13 ならびに内部コントロールとして β -actin、また白血球の混入のモニターとして CD20 について各々 5' 端に 6-carboxy fluorescein (FAM) ならびに 3' 端に 6-carboxy-tetramethyl rhodamine (TAMRA) を標識した TaqMan Probe とプライマーペアとして TaqMan Universal Master Mix を用いて、ABI Model 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) で増幅し測定した。まずフォワードプライマーとして 5'-CCCAACCTGACCAGTGTCTACA-3' (exon 15)、リバースプライマーとして 5'-CTTCCCAGCCACGACATAGC-3' (exon 16)、およびその

間に 2 つの蛍光色素を持った TaqMan probe として 5'-FAM-ACAGGCCTCTCTTCACACACTTGGCG-TAMRA-3' (exon 15-16) を重合させた。この 2 つの色素は TaqMan Probe に結合している間は発光しないが、DNA ポリメラーゼ活性と 5'-3' エキソヌクレアーゼ活性を有する Taq ポリメラーゼによりプライマーからの伸長反応が生じ TaqMan Probe が分解されると、TaqMan Probe に結合していた蛍光色素が発光する。この発光を検出し、threshold fluorescence intensity に到達するサイクル数が threshold cycle (Ct) と定義される。各々の反応は脱重合に 95°C で 15 秒、プライマーの重合と伸長反応に 60°C で 1 分の条件を用い 40 サイクルの反応を施行した。実験は再現性を得るため三重に施行した。

2. 肝臓における ADAMTS-13 の産生部位に関する検討

1) 抗 ADAMTS-13 ポリクローナル抗体の作成

第 5 図 a. に示すように ADAMTS-13 の構造上、4 カ所の異なるペプチドに対し抗ペプチドポリクローナル抗体を作製した。ペプチド A は propeptide (アミノ酸番号 42-55)、B は cysteine-rich domain (アミノ酸番号 449-462)、C は thrombospondin type I domain (アミノ酸番号 712-724)、D は CUB2 domain (アミノ酸番号 1312-1322) に相当する。各々の部位は他の ADAMTS タンパクとの相同性を回避すべく選択した。

2) 各種細胞の培養

リコンビナント ADAMTS-13 を発現させた HEK293 (HEK293/rADAMTS-13) 細胞と HEK293/Mock を type I コラーゲンをコートしたディッシュで 10% ウシ胎児血清と 100 U/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM (Invitrogen, CA, USA) で培養し、24 時間培養後、無血清の OPTI-MEM I (Invitrogen) で置換し 48 時間培養した。ヒト肝細胞癌の細胞株である HepG2 は European Collection of Cell Cultures から購入し、2 mM グルタミン酸、1% 必須アミノ酸と 10% ウシ胎児血清を加えた MEM-R 培養液 (MP Biomedicals, CA) で培養した。24 時間培養後、無血清の MEM-R 培養液で置換し 48 時間培養した。HEK293 細胞、HepG2 細胞の培養上清を回収し Centricon YM-100 (Millipore Co, MA, USA) を用いて 5 倍濃縮した。正常肝細胞 (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. MD, USA) は type I コラーゲンをコートしたディッシュ上で、アスコルビン酸、ウシ血清アルブミン、トランスフェリン、インスリンそして

hEGF を添加した肝細胞基本培地 (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) を用いて培養した。非腫瘍性の肝細胞を SV40 導入により不死化した細胞株である tPH5CH¹⁶⁾ は type 1 コラーゲンをコートしたディッシュ上で、10%ウシ胎児血清と 100 U/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培養液 (Sigma-Aldrich, MO, USA) で培養し、ヒト肝臓類洞毛細血管内皮細胞 (Applied Cell Biology Research Institute, WA, USA) は 10%ウシ胎児血清を含む CS-C 培養液を用い type 1 コラーゲンをコートしたディッシュ上で培養した。

3) 各種細胞の免疫組織染色

HEK293/rADAMTS-13 と HEK293/Mock, 正常肝細胞, tPH5CH と HepG2 細胞を type1 コラーゲンでコートしたカルチャースライド上で培養した。0.1M PBS で洗浄後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 1 時間固定し 0.01M PBS で洗浄した。内因性ペルオキシダーゼブロッキングは 0.3%過酸化水素を含む 0.1%アジ化ナトリウム溶液で行った。固定した細胞を 0.01M PBS で洗浄しウシ血清でブロッキングした。1次抗体として、抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体, HepPar 1 抗体, そして non-immune IgG のいずれかを持ち、4°Cで一晩インキュベートした。マウスモノクローナル HepPar 1 抗体 (OCH1E5.2.10, 20 µg/ml, DAKO company, CA, USA) は良性悪性、両方の肝細胞に特異的に反応する抗体^{16), 17)}であり陽性コントロールとして使用した。HepPar 1 抗体との反応前に、検体を 100 mmol/L クエン酸バッファー (pH6.0), 100°Cで処理した。抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体 (10 µg/ml) は前処理なしで使用した。mouse IgG1 (10 µg/ml, DAKO company) または rabbit immunoglobulin fraction (10 µg/ml, DAKO company) を陰性コントロールとして使用し、mouse IgG1 については HepPar 1 抗体使用時と同様に前処理を行った。0.01M PBS で 3 回洗浄後 DAKO ENVISIO NTM System Labelled Polymer, HRP (DAKO company) を用い、室温で 30 分間反応させた。細胞は 0.01M PBS で 3 回洗浄後、DAB 発色を行い、Harris hematoxylin により核染色を行った。

4) 肝組織の免疫組織染色

正常肝組織ならびに肝硬変を伴う肝細胞癌組織について免疫組織染色を施行した。脱パラフィン処理後、3) で記したと同様の手順で、1次抗体として抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体、HepPar1 抗体または rabbit immunoglobulin fraction

(陰性コントロール) を用い免疫組織染色を行った。

5) ウェスタンブロット法

HEK293/rADAMTS-13, HEK293/Mock ならびに HepG2 細胞の培養上清を回収し、Centricon YM-100 を用いて 5 倍濃縮し、5%2-mercaptoethanol を含む 4×SDS sample buffer と混合、5-15%gradient gel を用い SDS 電気泳動を行った。電気泳動後、polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, CA, USA) に転写し 5%スキムミルクでブロッキングした。その後メンブレンを抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体 (10 µg/ml) でインキュベートした。T-TBS 溶液で 3 回洗浄後、二次抗体として horseradish-peroxidase-linked whole antibody (Amersham Biosciences, UK) を反応させた。その後 Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer) により発光させた。

6) RT-PCR 法と塩基配列決定法

正常肝細胞, tPH5CH, HepG2 またはヒト肝臓類洞毛細血管内皮細胞についてそれぞれ TRIZOL (Invitrogen) を用いて処理し、クロロホルムで溶解したベレットから total RNA を抽出しイソプロパノールで沈降した。各 RNA (1 µg) は 70°Cで 5 分間処理後、ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega Corporation, WI, USA) を使用し、特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用い 42°Cで 60 分間逆転写反応を行った。ADAMTS-13 の exon 1 に対応する cDNA の増幅に用いたプライマーはセンスプライマーとして RT-3 (5'-CTGTGTGGCCGGAATCCTT-3'), アンチセンスプライマーとして RT-4 (5'-TTGGAGCCACAGGC CG-3') を用いた。PCR は TaKaRa LA Taq (Takara Shuzo) を用い、5 分間 96°Cで反応後、脱重合に 96°Cで 1 分、プライマーの重合に 52°Cで 1 分、伸長反応に 72°Cで 1 分の条件を用い、35 サイクルの反応を行った。PCR 産物を 2%アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイド液で染色した。正常肝細胞, tPH5CH, HepG2 の PCR 産物は各々アガロースゲルよりバンドを切り出し GENE CLEAN II kit (Bio 101) を用い DNA を抽出、精製した。塩基配列は ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer) を用い、Model 310 DNA auto-sequencer (Applied Biosystems) で決定した。

実験結果

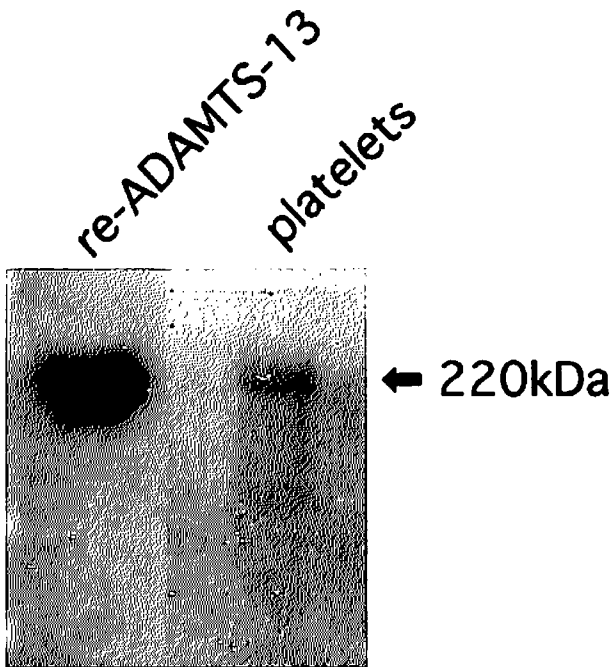
1. 血小板における VWF 切断酵素 (ADAMTS-13) の発現と局在

1) ウェスタンブロット法

ADAMTS-13 の exon 25 に相当する部位に対するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットの結果、リコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清に認められたバンドに一致する約 220 kDa のバンドを血小板で確認した (第 1 図)。これにより血小板での ADAMTS-13 タンパクの発現が示された。

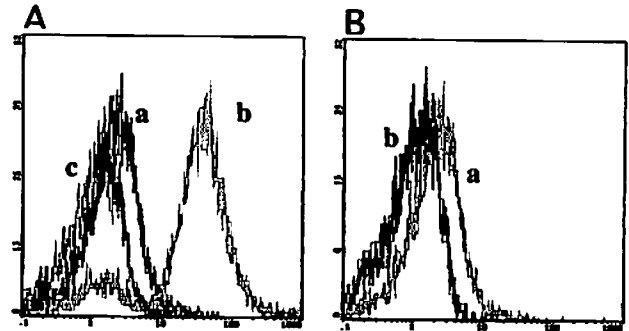
2) フローサイトメトリーによる解析

第 2 図 A で示すように、permeabilization 処理を行った血小板では、陽性コントロールとして用いた抗 β -actin 抗体に対する反応よりは弱いものの、抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体に対し反応性を認めた。第 2 図 B は permeabilization 処理を行った血小板



第 1 図. ウェスタンブロットによる血小板における ADAMTS-13 発現の証明。約 2×10^7 の洗浄血小板とリコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清で、実験方法に明記した方法でウェスタンブロットを施行した。レン左：リコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清、レン右：血小板。

Suzuki M et al : Biochem Biophys Res Comm 313 : 212-216, 2004 の Fig. 1. を許可を得て転載。



第 2 図. フローサイトメトリーによる ADAMTS-13 発現の解析。

パネル A ; 血小板は 0.1% NP40 による permeabilization 処理後、マウス anti-ADAMTS-13 モノクローナル抗体 (a)、マウス抗 β -actin 抗体 (b、陽性コントロール) または mouse IgG1 (c、陰性コントロール) とインキュベートした。パネル B ; permeabilization 処理後血小板と permeabilization 処理なしの血小板の比較。permeabilization 処理後の血小板 (a) と permeabilization 処理なしの血小板 (b) を用いパネル A と同様の実験を行い比較した。サンプルはすべて 4% パラホルムアルデヒドで固定後、2 次抗体として FITC-conjugated rabbit F (ab')₂ fragments of anti-mouse IgG antibody を使用した。

Suzuki M et al : Biochem Biophys Res Comm 313 : 212-216, 2004 の Fig. 2. を許可を得て転載。

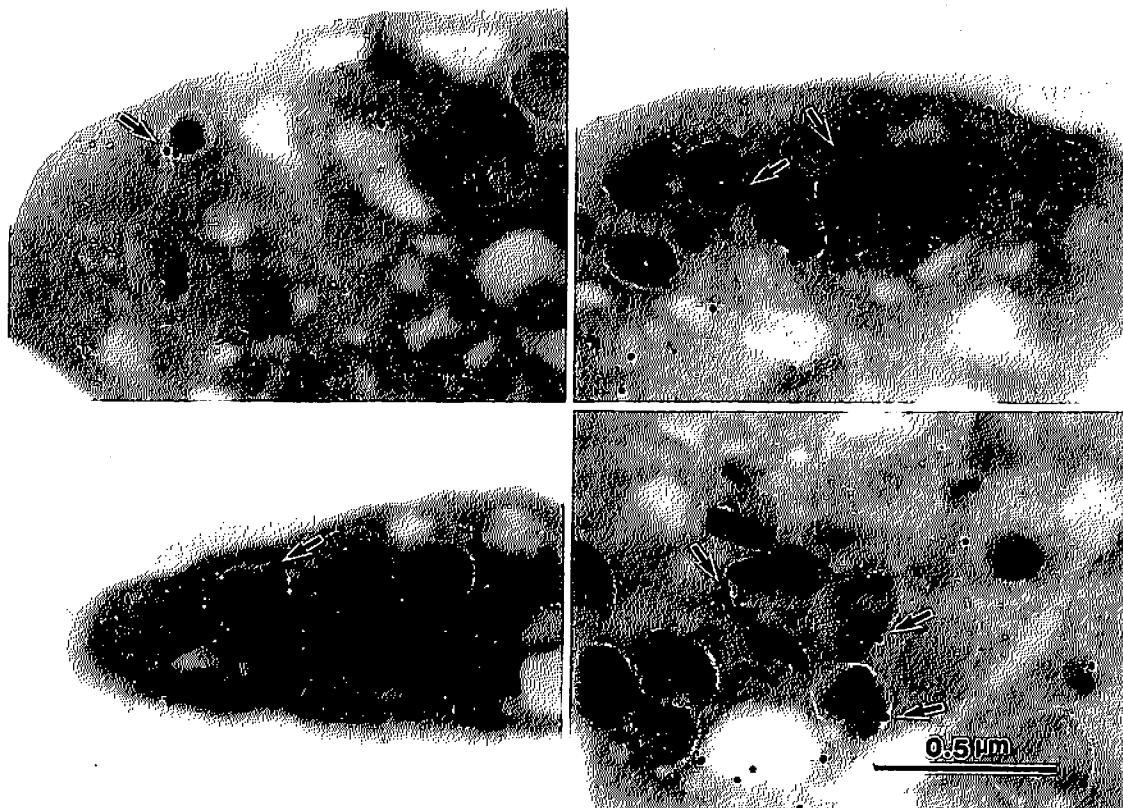
と permeabilization 処理なしの血小板での抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体に対する反応性の違いを示しており、ADAMTS-13 が血小板の内部に存在することを示唆している。permeabilization 処理後の血小板ならびに permeabilization 処理なしの血小板のどちらでも白血球に特徴的な CD45 の発現は認めず、明らかな白血球の混入の可能性は除外された。

3) 免疫電顕による ADAMTS-13 の血小板における局在の検討

免疫電顕の結果、ADAMTS-13 に対する金粒子は α 顆粒の内部ならびにその膜上で認められ、ADAMTS-13 が血小板の α 顆粒内に存在することが確認された (第 3 図)。

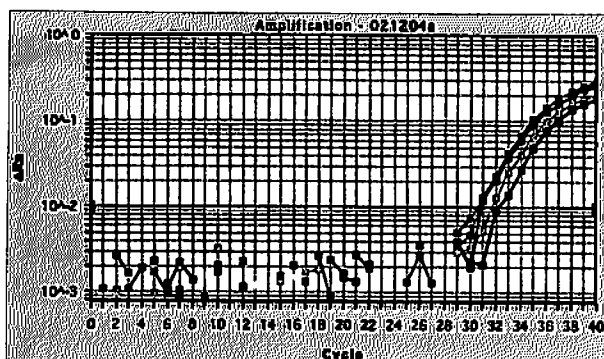
4) RT-PCR による解析と塩基配列の決定

PRP より抽出された血小板 RNA は RT-PCR により増幅された。アガロースゲルより増幅されたバンドを切り出し DNA を抽出、精製した。予想していた 660 bp の cDNA 断片が得られ direct sequencing analysis により決定された塩基配列は、BLAST (Basic local alignment search tool) による検索の結果、ADAMTS-13



第3図. 免疫電顕による ADAMTS-13 の血小板における局在の検討.

ヒト正常洗浄血小板を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定, 超薄切片をマウス抗 ADAMTS-13 モノクローナル抗体でインキュベートし, さらに金粒子標識ヤギ抗マウス二次抗体でインキュベート後, ウラン染色を行い透過型電顕で観察した. ADAMTS-13 に対する金粒子は α 顆粒の内部ならびにその膜上(矢印)で認められた. bar=0.5 μ m



第4図. リアルタイム PCR による血小板 ADAMTS-13 mRNA の発現量の評価 (代表例の提示). ADAMTS-13 に特異的なプライマーと TaqMan Probe を用いて6検体の mRNA について各々 PCR を施行した. 縦軸が relative normalized fluorescence change (Δ Rn), 横軸が PCR cycle number である. threshold fluorescence intensity (0.01, 水平線) を決定した後に threshold cycle が決まる. 目的とする遺伝子と内部コントロールの threshold cycle を測定した.

Suzuki M et al : Biochem Biophys Res Comm 313 : 212-216, 2004 の Fig. 3.を許可を得て転載.

cDNA (exon 1-7) に一致した.

5) リアルタイム PCR による mRNA の定量

血小板 ADAMTS-13 の mRNA の発現についてはリアルタイム PCR により定量的に評価を行った. 第4図に示すように6検体の血小板について評価を行ったが threshold cycle について検体間での差異はほとんど認められなかった. 三重に実験を行った結果その平均値を第1表に示した. データは内部コントロールである β -actin の threshold cycle と ADAMTS-13 の threshold cycle の比で表した. またフィルターを使用した白血球除去の効果について, リアルタイム PCR による CD20 増幅の欠如により確認を行った (第2表).

第1表 β -actin と ADAMTS-13 の threshold cycle の比

	Ct of β -actin	Ct of ADAMTS-13	β -actin/ADAMTS-13
PRP 1	15.99 \pm 0.24	28.52 \pm 0.36	0.563 \pm 0.007
PRP 2	16.06 \pm 0.11	28.16 \pm 0.26	0.570 \pm 0.005
PRP 3	16.47 \pm 0.03	29.08 \pm 0.25	0.567 \pm 0.005
PRP 4	16.95 \pm 0.06	29.62 \pm 0.13	0.572 \pm 0.003
PRP 5	16.79 \pm 0.34	28.83 \pm 0.19	0.583 \pm 0.004
PRP 6	17.13 \pm 0.04	30.47 \pm 0.36	0.563 \pm 0.007

データは内部コントロールの β -actin と ADAMTS-13 の threshold cycle (Ct) の比で示している。数値は平均 \pm SD で表した。PRP1~6：6人のPRPから得た血小板 mRNA を示す。

Suzuki M et al : Biochem Biophys Res Comm 313 : 212-216, 2004 の Table 1 を許可を得て転載。

第2表 リアルタイム PCR による血小板 ADAMTS-13 mRNA と CD20 mRNA の定量。

	Ct of ADAMTS-13	Ct of CD20
Platelet-1	38.75/38.71	40.00/39.49
Platelet-2	36.62/36.59	40.00/40.00
Lym-1	32.47/34.10	26.43/27.29
Lym-2	35.91/35.25	27.30/27.53
Buffy-1	29.34/27.52	26.46/26.27
Buffy-2	34.43/34.57	26.36/26.22

2名(1, 2)の mRNA を用いて ADAMTS-13 と CD20 についてそれぞれリアルタイム PCR を施行した。Platelet-1 と 2 は白血球除去後の血小板 cDNA である。Lym-1 と 2 は Lympho-Prep (AXIS-SHIELD ProC AS, Oslo, Norway) により得られたリンパ球由来の cDNA である。Buffy-1 と 2 は buffy coat 由来の cDNA である。

Suzuki M et al : Biochem Biophys Res Comm 313 : 212-216, 2004 の Table 2 を許可を得て転載。

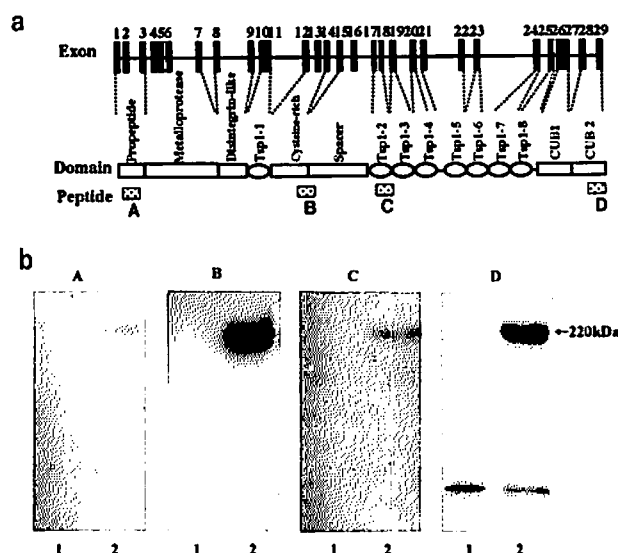
2. 肝臓における ADAMTS-13 の産生部位

1) 抗 ADAMTS-13 ポリクローナル抗体の評価

1次抗体として4種類のポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果、抗 ADAMTS-13 ペプチド B または D ポリクローナル抗体はリコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清に強い反応性を示した(第5図 a, b)。ウェスタンブロットで特異性が確認された抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体を使って、HEK293/rADAMTS-13 の免疫組織染色を行ったところ、細胞質の染色が確認された(第6図)。

2) 肝細胞における免疫組織染色

正常肝細胞, tPH5CH 細胞, さらに HepG2 細胞は抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体に対してびまん性に、強い顆粒状の染色パターンを示した(第7



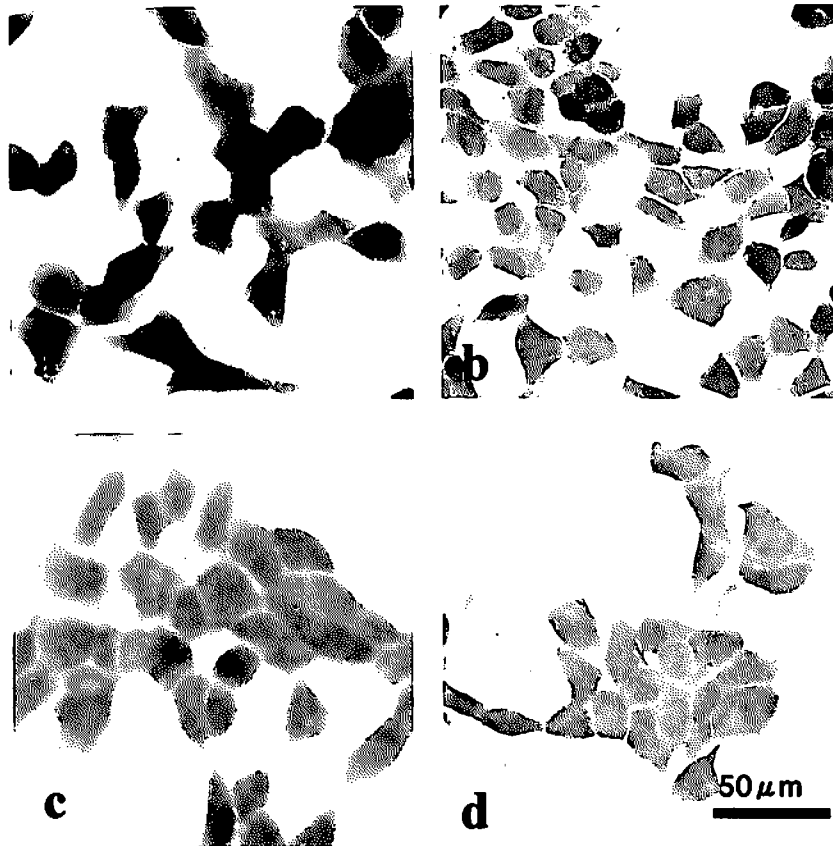
第5図. 抗 ADAMTS-13 ポリクローナル抗体の評価

a. ADAMTS-13 のドメイン構造と抗ペプチドポリクローナル抗体の免疫部位。

ADAMTS-13 タンパクは propeptide, metalloprotease domain, disintegrin, cys-rich, そして spacer domains, 2つの CUB domain, さらに8つの Tsp type1 repeats (1-8) から構成されている。4箇所のペプチドに対し各々抗ペプチドポリクローナル抗体を作製した。部位は以下のとおりである：A, propeptide domain (exon 2) の内部；B, cys-rich domain (exon 12) の内部；C, Tsp-1-2 (exon 18) の内部, D, C-terminal (exon 29) 部。

b. ウェスタンブロットにおける抗ペプチドポリクローナル抗体の有用性。

レーン 1, HEK293/Mock の培養上清；レーン 2, HEK293/rADAMTS-13 の培養上清。1次抗体として4種類の抗ペプチドポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った。(A), 抗 ADAMTS-13 ペプチド A ポリクローナル抗体 (20 μ g/ml)；(B), 抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体 (10 μ g/ml)；(C), 抗 ADAMTS-13 ペプチド C ポリクローナル抗体 (20 μ g/ml)；(D), 抗 ADAMTS-13 ペプチド D ポリクローナル抗体 (10 μ g/ml)。



第6図. 免疫組織染色における抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体の有用性.

(a, b) HEK293/rADAMTS-13 を抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体 (a) または non-immune rabbit IgG (b) で免疫組織染色した. 抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体により細胞質が染色された.

(c, d) HEK293/Mock を抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体 (c) または non-immune rabbit IgG (d) で免疫組織染色したがいずれも染色されなかった. bar=50 μm

図 a, d, g). 一方対照とした抗体では染色されなかった (c, f, i). HepPar1 抗体 (b, e, h) を陽性コントロールとして使用した.

3) 肝組織における免疫組織染色

正常肝組織は抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体に対し、びまん性に、強い顆粒状の染色性を示した (第8図 a, b). 特に中心静脈と門脈周囲の肝細胞が強く染まっており、血管内皮細胞や Kupffer 細胞は染まらなかった. 肝硬変、肝細胞癌の組織では、再生肝細胞ならびに肝癌細胞の両者とも免疫染色された (第8図 d, e, g, h).

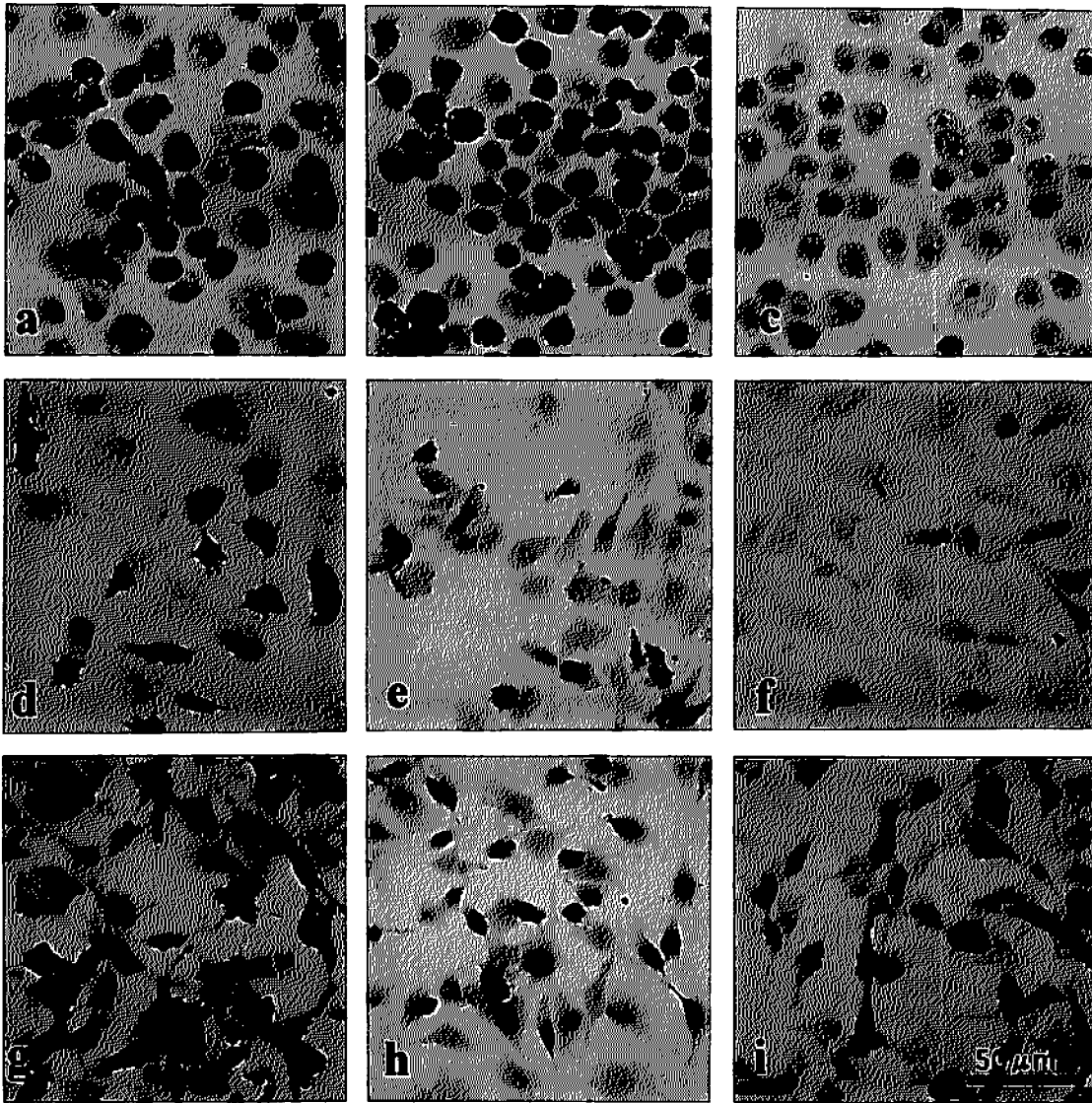
4) HepG2 の培養上清を用いたウェスタンブロット法

Cystein-rich domain に対する抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体を1次抗体として HepG2 細胞の培養上清でウェスタンブロットを行った結果、リコ

ンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清に認められたバンドに一致する約 220 kDa のバンドを確認した (第9図). 対照とした HEK293/Mock の培養上清ではバンドは検出されなかった. この所見より HepG2 細胞で ADAMTS-13 が発現していることが判明し、ADAMTS-13 タンパクが HepG2 細胞で合成され、培養上清中に分泌されている可能性が示唆された.

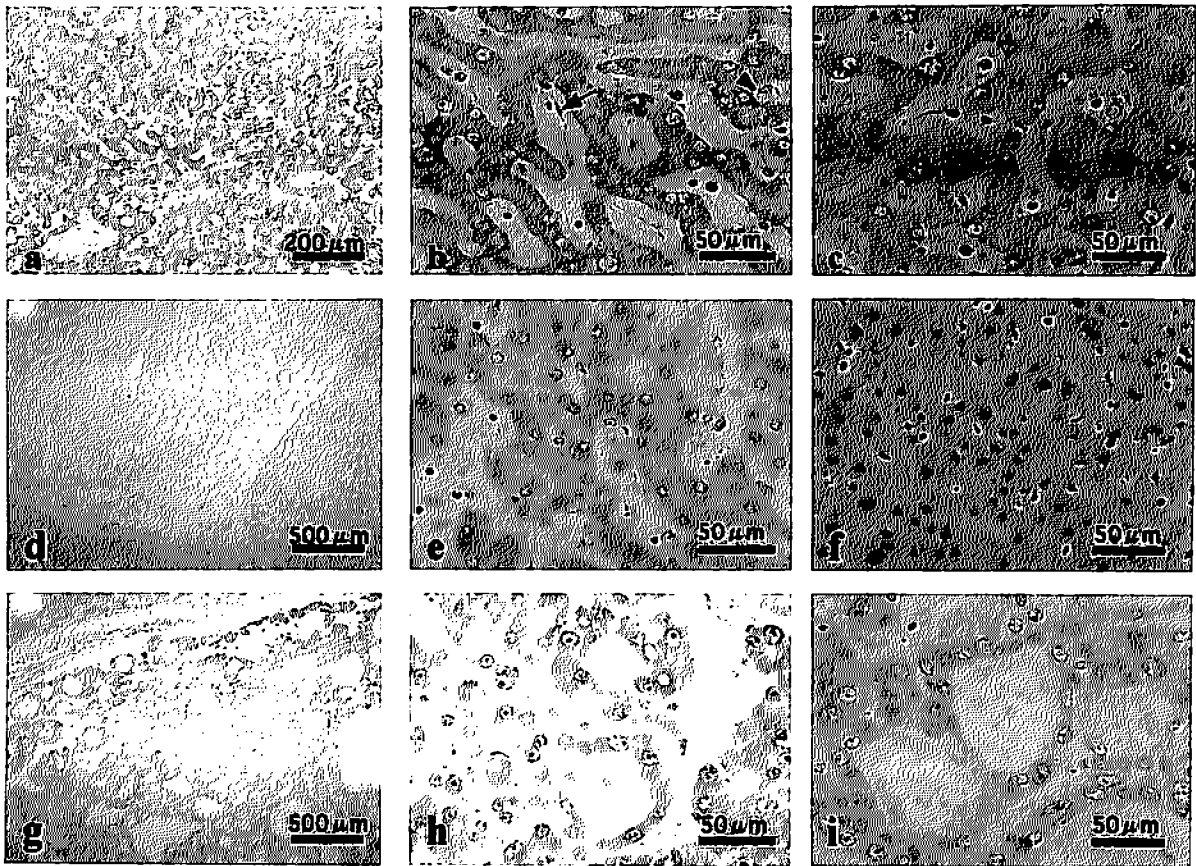
5) 肝細胞における mRNA の発現

RT-PCR の結果、正常肝細胞、tPH5CH そして HepG2 において ADAMTS-13 の exon 1 に相当する 100 bp の cDNA フラグメントが増幅されたが、ヒト肝臓類洞毛細血管内皮細胞では増幅は認めなかった (第10図). アガロースゲルより増幅されたバンドを切り出し DNA を抽出、精製した. 得られた cDNA 断片について direct sequencing analysis により塩基配列を決



第7図. 種々の肝細胞における ADAMTS-13 タンパクの発現.

正常肝細胞：(a), (b), (c)；tPH5CH 細胞：(d), (e), (f)；HepG2 細胞 (g), (h), (i). (a), (d), (g)：各々の細胞について抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行ったところびまん性に強く、顆粒状の染色パターンを示した。(b), (e), (h)；各々の細胞について HepPar1 抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ顆粒状に細胞質が染色された。(c), (f), (i) は non-immune rabbit IgG を用いた陰性コントロールである。(a)-(i) bar=50 μ m



第8図. 肝組織における ADAMTS-13 の局在.

(a) (b) (c) : 正常肝組織

(d) (e) (f) : 肝硬変

(g) (h) (i) : 肝細胞癌

(a) (b) (d) (e) (g) (h) : 抗 ADAMTS-13 ペプチド B ポリクローナル抗体

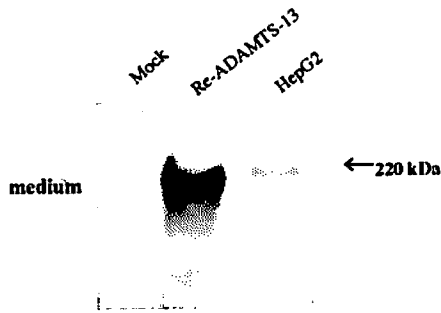
(c) (f) (i) : non immune rabbit IgG

(a) : bar = 200 μ m

(d) (g) : bar = 500 μ m

(b) (c) (e) (f) (h) (i) : bar = 50 μ m

正常肝組織においてびまん性の強い顆粒状の染色性を示した。特に中心静脈周囲の肝細胞でより強い染色性が認められた (a, b)。血管内皮細胞 (矢印) や Kupffer cell (矢頭) では ADAMTS-13 に対する反応はみられなかった (b)。また陰性コントロールでは染色を認めなかった (c)。また肝硬変、肝細胞癌組織において再生肝細胞 (e)、肝癌細胞 (h) の両者が ADAMTS-13 に対してびまん性で強い顆粒状の染色パターンを呈した。一方 non-immune rabbit IgG では染色はみられなかった (f, i)。



第9図. HepG2の培養上清を用いたウェスタンブロット. 抗ADAMTS-13ペプチドBポリクローナル抗体を1次抗体としてHepG2細胞の培養上清でウェスタンブロットを行った. レーン左, HEK293/Mockの培養上清; レーン中央, HEK293/rADAMTS-13の培養上清; レーン右, HepG2細胞の培養上清.



第10図. 種々の肝細胞におけるADAMTS-13 mRNAの発現. 正常肝細胞(nHep), tPH5CHまたHepG2細胞株から各々抽出したRNAを用いRT-PCRを施行したところ, リコンビナントADAMTS-13のplasmid cDNAでみられたシグナルと同じシグナルが検出された. しかしヒト肝臓類洞毛細血管内皮細胞(LSE)ではシグナルは検出されなかった.

定した. BLAST (Basic local alignment search tool) による検索の結果, ADAMTS-13 cDNA (exon1) であることを確認した.

考 察

1. 血小板におけるVWF切断酵素(ADAMTS-13)の発現および血小板における局在

今回の検討により我々は初めて血小板でのADAMTS-13の発現を証明した. 我々の実験結果によりADAMTS-13タンパクが血小板表面ではなく, 血小板内部に存在すること, しかもVWFが貯蔵されている α 顆粒内に存在していることが明らかとなった. また, ADAMTS-13 mRNAの定量的評価法としてリアルタイムPCRの有用性を示した. ADAMTS-13 mRNAに

ついて6名の健常者間でほとんど定量的差異はみられなかった. これらの結果より血小板には定常量のADAMTS-13 mRNAとタンパクが存在しており, 血小板による血漿中のADAMTS-13のエンドサイトーシスの結果ではないことが確認された.

今回の実験ではRT-PCRに際しADAMTS-13のexon 1から7に相当するcDNAの増幅を行った. さらにリアルタイムPCRではADAMTS-13のexon15-16に位置するTaqMan Probeを使用した. これによりゲノムDNAの増幅の可能性は除外され, 少なくともexon 1から16に相当するADAMTS-13 mRNAが血小板に発現していることが明らかになった. Alternative splicingはADAMTS遺伝子ファミリーに共通する特徴であり, ADAMTS-13についても肝臓, 前立腺, 脳でsplice variantの報告がある⁶⁾. 血小板におけるsplice variantについても, 今後その検討が必要と考えている.

VWFの15~25%は血小板の α 顆粒内に貯蔵されておりトロンビンまたはADP刺激により血小板から血漿中に放出される. 今回免疫電顕による検討からADAMTS-13が α 顆粒内に存在していることが明らかとなり, その意義として血小板のADAMTS-13がVWFのサイズを制御している可能性が考えられる. 血小板由来のVWFの性状は局所組織における血小板血栓形成において一つの制御因子となりうると考えられ, 今後血小板のADAMTS-13の活性評価法を確立していくことは, 易血栓性の予測という点で臨床的意義を有するものと思われる. また今後ADAMTS-13に対する自己抗体がTTP患者の血小板に結合するか, すなわちTTPの診断に血小板でのADAMTS-13に対する自己抗体が有用となりうるかについて検討が必要である. 血小板におけるADAMTS-13の存在はTTPのみならず血小板血栓形成の病態において重要な役割を担うものと思われる.

2. 肝臓におけるADAMTS-13の産生部位に関する検討

ADAMTS-13は現在までmRNAの解析により全長cDNAが肝臓でのみ特異的に発現したという報告^{6), 8), 9)}にもとづき, 血漿ADAMTS-13は肝臓由来であろうとされていたが, タンパクレベルでの発現ならびに肝臓のどの細胞がADAMTS-13を産生するかについての実験的証明はされていない. 今回我々はヒトの肝臓において主に肝細胞でADAMTS-13が発現していることを新規に証明した. 抗ADAMTS-13ペプチドBポリクローナ

ル抗体を1次抗体として HepG2 細胞の培養上清でウェスタンブロットを行った結果, リコンビナント ADAMTS-13 を含む培養上清に認められたバンドに一致する約 220kDa のバンドが確認され, また HepG2 における ADAMTS-13 mRNA の発現が認められた. ヒト肝細胞癌の細胞株である HepG2 は正常肝細胞に属する種々の機能を表す細胞株である. HepG2 は, 主要な血漿タンパクであるアルブミンや α -フェトプロテイン, フィブリノーゲンやアポリポタンパク, またプロトロンビンやアンチトロンビンなどの凝固に関わるタンパクを培養上清中に分泌する^{18), 19)}. 我々は, 肝細胞における生合成と分泌を評価する上で有用なモデルとして HepG2 を実験に用いた.

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¹²⁾の中で, 血漿 ADAMTS-13 の酵素活性は肝臓で合成される血漿アルブミンや総コレステロール値と相関すると報告されている. この知見は ADAMTS-13 の産生部位が肝細胞であることを示唆する我々の実験結果に矛盾しないものである. しかしながら, 肝硬変患者の多くで血漿中に ADAMTS-13 のインヒビターが検出されたという口述発表もあり, 肝硬変患者の血漿における ADAMTS-13 の活性低下は肝細胞の脱落のみで引き起こされるものではないと考えられる.

肝由来の血漿タンパクは肝細胞の粗面小胞体上のポリソームで合成される. 肝細胞は肝臓の 60% を占め, 多角形をしている. 肝細胞には 3 つの表面があり, 1 つめは類洞と Disse 腔に面し, 2 つめは毛細胆管に面し, 3 つめは隣接する肝細胞に接している. 我々の実験結果からは, 肝細胞と類洞の内皮細胞の間にある Disse 腔では ADAMTS-13 の発現はみられなかった. また Rappaport による肝臓の zonality では zone 1 は流入システム (門脈) に隣接, zone 3 は流出システム (肝静脈) に隣接し zone 2 はその間にある. すなわち zone 1, 2, 3 は酸素と栄養内容の点では第 1, 第 2, 第 3 等級の血液で供給されているといえるが, 免疫組織学的検討では ADAMTS-13 の発現は zone 2 に比し zone 1, 3 では強いという傾向は示したものの ADAMTS-13 の発現と zonality の相関は明らかではなく, ADAMTS-13 が流入システム, 流出システム両方の近傍の肝細胞で合成されていることが示唆された. さらに, 肝硬変を伴う肝細胞癌組織, ならびに種々の肝細胞における検討により, 良性, 悪性両方の肝細胞で明らかな差異なく ADAMTS-13 が発現されていることが明らかとなった.

今後肝細胞と血漿における ADAMTS-13 の活性の相関, 肝細胞における ADAMTS-13 発現の制御因子に関する研究, ならびに肝細胞における ADAMTS-13 の splice variant の検索について検討をすすめることにより, 酵素としての ADAMTS-13 の特性に関する知見が深まるものと思われる.

総 括

血栓形成に重要な役割を担う VWF の機能を制御する VWF 切断酵素 (ADAMTS-13) の血小板での発現と局在に関する検討, ならびに肝臓での ADAMTS-13 の産生部位に関して検討を行い, 以下の結果を得た.

1. 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た.
2. フローサイトメトリーにより, permeabilization 処理後または permeabilization 処理なし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, 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.
3. RT-PCR により血小板での ADAMTS-13 mRNA の発現を示した. 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.
4. 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において免疫組織染色を行い, 細胞質における ADAMTS-13 の発現を確認した.
5. 免疫組織染色の結果, 肝組織において肝細胞で主に ADAMTS-13 の発現を認めた.
6. 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.
7. RT-PCR により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.

以上の結果より, 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. 今後, 血小板の ADAMTS-13 の活性評価法を確立していくことは, 易血栓性の予測という点で臨床的意義を有するものと思われる. 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。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室池田康夫教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に際し、直接ご指導、ご校閲をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室村田満先生、同病理学教室岡田保典教授に深謝いたします。またtPH5CH細胞をご提供くださいました同病理学教室坂元亨宇教授、免疫電顕をご指導頂いた東京都臨床医学総合研究所鈴木英紀先生に感謝の意を表します。

なお本研究は慶應義塾大学リサーチパーク内における(株)第一製薬との共同研究の一環して行われた。

本論文は、Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y : Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Comm* 313 : 212-216, 2004. の一部を含む。

文 献

- 1) Furlan M, Robles R, Lammle B : Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. *Blood* 87 : 4223-4234, 1996
- 2) Tsai HM : Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 87 : 4235-4244, 1996
- 3) Tsai HM, Lian ECY : Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 339 : 1585-1594, 1998.
- 4) Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lammle B : Von Willebrand factor cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 339 : 1578-1584, 1998
- 5) Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle B : Deficient Activity of von Willebrand Factor-cleaving protease in chronic re-

- lapsing thrombotic thrombocytopenic purpura, *Blood* 89 : 3097-3103, 1997
- 6) Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler E, Fujikawa K : Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 276 : 41059-41063, 2001
- 7) Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D : Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood* 98 : 1662-1666, 2001
- 8) Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD, Ginsburg JD, Tsai HM : Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura, *Nature* 413 : 488-494, 2001
- 9) Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, Nozaki C : A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood : possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem (Tokyo)* 130 : 475-480, 2001
- 10) Plaimauer B, Zimmermann K, Volkel D, Antoine G, Kerschbaumer R, Jenab P, Furlan M, Gerritsen H, Lammle B, Schwartz HP, Scheiflinger F : Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* 100 : 3626-3632, 2002.
- 11) Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y : Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Comm* 313 : 212-216, 2004.
- 12) Lee TP, Bouhassira EE, Lyubsky S, Tsai HM : ADA MTS13, the Von Willebrand factor cleaving Metalloprotease, is expressed in the perisinusoidal cells of the liver. *Blood* 100 : 497 abstract, 2002
- 13) Matsumoto M, Chisuwa H, Nakazawa Y, Ikegami T, Hashikura Y, Kawasaki S, Yagi H, Ishizashi H, Matsui T, Titani K, Fujimura Y : Liver transplantation rescues a deficient state of von Willebrand factor-cleaving protease activity in patients with liver cirrhosis due to congenital biliary atresia. *Blood* 96 : 636 abstract, 2000
- 14) Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M : Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 104 : 2081-2083, 2004.
- 15) Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuji H, Kanetaka K, Asaka M, Hirohashi S : Overexpression

- of ORPHAN G-Protein-Coupled Receptor, Gpr49, in Human Hepatocellular Carcinomas with β -Catenin Mutations. *Hepatology* 37 : 528-533, 2003
- 16) Minervini MI, Demetris AJ, Lee RG, Carr BI, Madariaga J, Nalesnik MA : Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. *Mod Pathol* 10 : 686-692, 1997
- 17) Siddiqui MT, Saboorian MH, Gokaslan ST, Ashfaq R : Diagnostic Utility of the HepPar 1 antibody to differentiate hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration samples. *Cancer* 96 : 49-52, 2001.
- 18) Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G : Further cellular investigation of the human hepatoblastoma derived cell line HepG2 : morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 25 : 267-275, 1989
- 19) Fair DS and Bahnak BR : Human hepatoma cells secrete single cain factor X, Prothrombin and Antithrombin III. *Blood* 64 : 194-204, 1984
-

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

矢 島 賢

(平成 16 年 10 月 15 日受付)

Key Words : peroxisome proliferator-activated receptor, glucose-stimulated insulin secretion, glucolipotoxicity, insulin resistance, type 2 diabetes with obesity

近年、我が国の 2 型糖尿病患者数および肥満患者数は軒並み増加しつづけている。これにより、疾患特有の合併症、特に動脈硬化性疾患や虚血性心疾患の発症や進展、それによる死亡および医療費の増大が社会問題にまで発展している。動脈硬化性疾患、特に虚血性心疾患の成因研究の基盤にリスクファクターの同定があり、多くの疫学調査から糖尿病および肥満はもちろんのこと、高血圧、高コレステロール血症、高中性脂肪血症、喫煙などさまざまなものが判明している(マルチプルリスクファクター症候群)。1988 年に Reaven がインスリン抵抗性、高インスリン血症、高 very low-density lipoprotein (以下 VLDL と略す) 血症、低 high-density lipoprotein-cholesterol (以下 HDL-C と略す) 血症、高血圧および耐糖能異常を併せ持つ病態を「シンドローム X」として名づけ、非肥満者でもこれらの因子が集積し、動脈硬化性疾患の発症基盤として重要であることを示した¹⁾。1989 年に Kaplan は、肥満者の体型を考慮した上で上半身肥満の重要性を指摘し、「死の四重奏」を提唱した²⁾。DeFronzo らは、肥満にかかわらずその中心にはインスリン抵抗性が存在するとして、「インスリン抵抗性症候群」を提唱した³⁾。このように、リスクファクターが単独で存在するというよりもむしろ個人に集積することが多く、集積したもののほど動脈硬化性疾患の発症が著増することが以前より提唱されてきた。しかし、なぜリスクファクターが個人に集積するのかは不明であった。

そのなかで、大阪大学の松澤らは 1987 年に「内臓脂肪型肥満」を提唱し、近年その概念を確立している。彼らは、肥満の中でも治療すべき「肥満症」は腹腔内(主

に腸間膜)に脂肪が蓄積する「内臓脂肪型肥満」⁴⁾で、これは肥満者のみでなく非肥満者においても動脈硬化性疾患の発症と強く関連していることを報告している⁵⁾。そして、内臓脂肪蓄積型の肥満はインスリン抵抗性の上流に位置し、糖尿病、高血圧、高脂血症といった生活習慣病を惹起していると考え、肥満および脂肪細胞に対する研究(アディポサイエンス)が活発に行われるようになった。これまで脂肪細胞は単にエネルギーを貯蔵する組織と考えられていたが、レプチンの発見を皮切りとして、脂肪細胞からはさまざまな生理活性物質(アディポサイトカインと呼ばれる)が分泌されていることが判明し、これらの分泌異常が生体内の代謝に影響することが明らかとなった。

また、脂肪組織としての脂肪だけでなく、各臓器の細胞内のトリグリセリド(以下 TG と略す)も障害をもたらしていることが注目されている。インスリン分泌を行う膵 β 細胞への TG の蓄積はインスリン分泌を低下させ⁶⁻⁸⁾、糖取り込みを行う骨格筋や肝臓においては細胞内 TG 含量とこれらの臓器のインスリン抵抗性が強く相関しており、脂肪毒性として注目されている⁹⁾。また、生活習慣の改善やインスリン抵抗性改善薬によって、これら細胞内の TG 含量が低下しインスリン抵抗性が改善されることが示されている。

インスリン抵抗性改善薬は糖尿病患者、特に肥満 2 型糖尿病患者の治療に世界中で用いられているが、近年 peroxisome proliferator-activated receptor (以下 PPAR と略す) γ アゴニストであることが判明した。PPAR γ アゴニストは、骨格筋や肝臓、脂肪組織などの

末梢組織においてインスリン抵抗性をさまざまなメカニズムにより改善させることが知られている。しかし、PPAR γ アゴニストの膵臓に対する影響、とくにインスリン分泌を調査した研究は少ない¹⁰⁻¹³⁾。PPAR γ は、げっ歯類だけではなくヒトのランゲルハンス氏島（以下ラ島と略す）にも発現していることが確認されているため¹⁴⁾、PPAR γ アゴニストの膵臓での影響が注目されている。

一方、高脂血症の治療に用いられているフィブラート系薬剤は、PPAR α アゴニストであることが最近判明した。PPAR α アゴニストは主に脂肪酸代謝に関連しており、フィブラート系薬剤の脂質低下作用はこのメカニズムによるとされているが、インスリン抵抗性を改善させるとの報告が散見され注目されている^{15, 16)}。しかし、そのインスリン分泌に対する影響は不明である。

PPAR γ アゴニストとPPAR α アゴニストとの併用療法の報告は数少ないが、動脈硬化と密接に関連する脂質代謝において併用療法が単独よりも優れていることなどを示す報告がある^{17), 18)}。最近、PPAR γ とPPAR α の両方に効くアゴニストが開発され、糖尿病や代謝症候群に対する有効性—両アゴニストはPPAR γ アゴニストによる体重増加を抑制すること、肝臓や筋肉のTG含量を低下させること、およびインスリン抵抗性を改善することなどが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。

そこで我々は、次のような仮説を立てた。PPAR γ アゴニストとPPAR α アゴニストはともに脂質代謝改善作用があるため、その併用療法により脂質低下作用を増強することを介して肥満2型糖尿病患者の脂肪毒性、とくに膵ラ島におけるインスリン分泌不全をより解除できるであろうというものである。

本研究では、PPAR γ アゴニストとしてpioglitazoneを、PPAR α アゴニストとしてbezafibrateを用いた、PPAR γ アゴニスト単独療法としてpioglitazone群（以下PIO群と略す）、pioglitazoneとbezafibrateを用いての併用療法群（以下P+B群と略す）そしてPPAR γ とPPAR α の両アゴニストである5-[(2, 4-dioxothiazolidin-5-yl) methyl]-2-N-[4-(trifluoromethyl)-phenyl] methyl] benzamide群（以下KRP-297群と略す）に分け、それぞれの薬剤を雄性C57BL/6Jマウスおよび肥満2型糖尿病のモデルである雄性db/dbマウスに用い、未治療群と比較した。体重、食餌および飲水摂取量、代謝関連の血漿パラメーターを測定し、肥満および糖・脂質代謝への影響を評価した。膵 β 細胞への影響として、インスリン分泌に関しては膵灌流実験によるグルコース刺激性インスリン分泌（glucose-stimulated insulin secretion：以下GSISと略す）を評価し、さらにラ島

への影響を病理組織学的に評価した。

材料・対象と方法

1. 材料

Pioglitazone, bezafibrate および KRP-297 は、それぞれ武田薬品工業（大阪）、キッセイ薬品工業（松本）、杏林製薬（東京）から供与を受けた。コントロール食としてCE-2を日本クレア社（東京）より購入し、PIO, P+B および KRP-297 は 0.1% の carboxymethyl-cellulose を使用してCE-2に混餌させた。

2. 動物

5週齢の雄性C57BL/6Jマウスおよび5週齢の雄性db/dbマウスを、日本クレア社より購入した。慶應義塾大学の実験動物の取り扱い方のガイドラインに従って実験を行った。両種のマウスをコントロール食であるCE-2で1週間飼育し、その後それぞれの薬剤混餌食で4週間飼育した。PIO群は【C57BL/6J：0.02% (wt/wt), 31.3±0.3 mg/kg/日；db/db：0.02% (wt/wt), 34.2±0.4 mg/kg/日】、P+B群は【C57BL/6J：0.02% (wt/wt), 29.2±0.5 mg/kg/日；db/db：0.02% (wt/wt), 33.3±0.4 mg/kg/日】+【C57BL/6J：0.06% (wt/wt), 97.3±1.5 mg/kg/日；db/db：0.07% (wt/wt), 111.0±1.5 mg/kg/日】、KRP-297群は【C57BL/6J：0.02% (wt/wt), 30.2±0.3 mg/kg/日；db/db：0.02% (wt/wt), 32.2±0.4 mg/kg/日】であった。すべてのマウスの食餌摂取量、飲水摂取量および体重は、週に3-4回朝に測定した。

3. 血漿の代謝パラメーターの測定

10週齢のマウスの眼窩から、EDTAでコーティングされたヘマトクリット管にて血液を採取した。血漿中の糖およびTGは、富士ドライケミ5500（富士フィルム、東京）を用いて測定した。遊離脂肪酸は、NEFA-Cテスト（和光、大阪）にて測定した。インスリンは、酵素免疫法（以下EIAと略す）（森永、横浜）にて、アディポネクチンはradioimmunoassay法（コスミック、東京）にて測定した。

4. 膵臓のインスリン含量

膵臓を1.8 mlの酸エタノール中でホモゲナイズし、ホモジネートを48時間4℃で貯蔵した後、4℃にて10分間10,000 rpmで遠心分離した。上清を貯蔵し、さらにペレットを0.2 mlの酸エタノールで再抽出した。遠

心分離の後、集めた上清を 0.25% の牛血清アルブミン (以下 BSA と略す) を含んだ 0.1M のリン酸緩衝液で 10,000 倍に希釈した。インスリン濃度は EIA にて測定した。

5. 膵臓の TG 含量

膵臓をメタノール 2 ml 中に入れ、4℃で保存した後ホモジネートし、クロロホルム 2 ml および Folch 液 (クロロホルム：メタノール=2：1) 4 ml を加えた。室温で 1 時間振盪させ、室温にて 15 分間 3,000 rpm で遠心し、上清を 60℃にて乾燥固定させた。沈渣を Folch 液で再抽出し、上清を同条件で乾燥固定した後、4% Triton X-100 を加え 1 時間 65℃に加熱した。さらに超音波を 20 分かけた後、TG 量を富士ドライケミ 5500 (富士フィルム、東京) にて測定した。

6. 膵灌流実験

10 週齢の各群マウスを一晩絶食後、50 mg/kg のペントバルビタールで麻酔した。腹腔動脈と門脈にカニューレーションし、他の動脈は結紮した。灌流の速度は毎分 0.5ml で一定にした。灌流液は、3% (wt/vol) のデキストラン T-40 を含んだ Krebs-Ringer bicarbonate buffer, 1% (wt/vol) の BSA および 20 mM の HEPES にて構成した。95% の酸素および 5% の二酸化炭素の混合ガスを灌流液に流し、pH を 7.35 から 7.45 の間に維持した。膵臓からの灌流液は 2 分間隔で門脈のカテーテルからチューブに採取し、即座に冷凍してインスリン測定のために -20℃で保存した。手術後の平衡状態を保つため 5.6 mM の糖濃度の灌流液で 15 分間灌流した後、本実験に移った。すなわち、正常の糖濃度 (5.6 mM) の灌流液で 10 分間の灌流を行った後、高い糖濃度 (16.7 mM) の灌流液に切り替え 20 分間灌流し、その後 20 分間はもとの糖濃度 (5.6 mM) の灌流液に戻すというプロトコルで行った。

7. 病理組織学的検討

膵灌流実験を行っていないマウスから膵臓を摘出し、35-38% のホルマリンで固定した。膵組織をパラフィンで固定し、切り出してヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、モルモット抗ヒトインスリン抗体およびウサギ抗 glucose transporter 2 (以下 GLUT2 と略す) ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行い、検討した。

8. 統計学的分析

すべての結果は平均値±標準誤差で示し、統計学的分析は StatView プログラム (ver 5.0J, SAS 社, 米国ノースカロライナ州) を使用して行った。有意差の検定は、分散分析 (以下 ANOVA と略す) の後、Bonferroni-Dunn 法を用いて post hoc 多重比較検定を行った。P<0.05 を統計学的に有意と解釈した。

結 果

1. 体重、食餌摂取量および飲水摂取量の変化

第 1 表に示すように、C57BL/6J マウスにおいて PPAR γ アゴニスト治療群のマウスの体重は、未治療群よりも有意に増加していた²²⁾。db/db マウスにおいても、PPAR γ アゴニスト治療群のマウスの体重は未治療群よりも有意に増加していたが、KRP-297 治療群の体重増加は他の治療群と比べ最も少なかった。

C57BL/6J マウスにおいて、PPAR γ アゴニスト治療群のマウスの食餌摂取量もまた未治療群と比較して有意に増加していた。一方、db/db マウスにおいては、KRP-297 治療群の食餌摂取量は最も少なく、他の治療群では未治療群と差は認められなかった。C57BL/6J マウスにおける PPAR γ アゴニスト治療群では飲水摂取量がやや増加していたが、db/db マウスでは未治療群で著明に増加していた。

2. 血漿の代謝パラメーター

第 1 図に示すように、db/db マウスの未治療群の血糖、インスリン、TG および遊離脂肪酸は C57BL/6J マウスの未治療群と比較して著明に上昇しており、これらは PPAR γ アゴニスト治療群では改善した²²⁾。アディポネクチンは、db/db マウスにおいて PPAR γ アゴニスト治療群では著明に増加しており、KRP-297 群ではさらに有意に増加していた (第 2 図)。

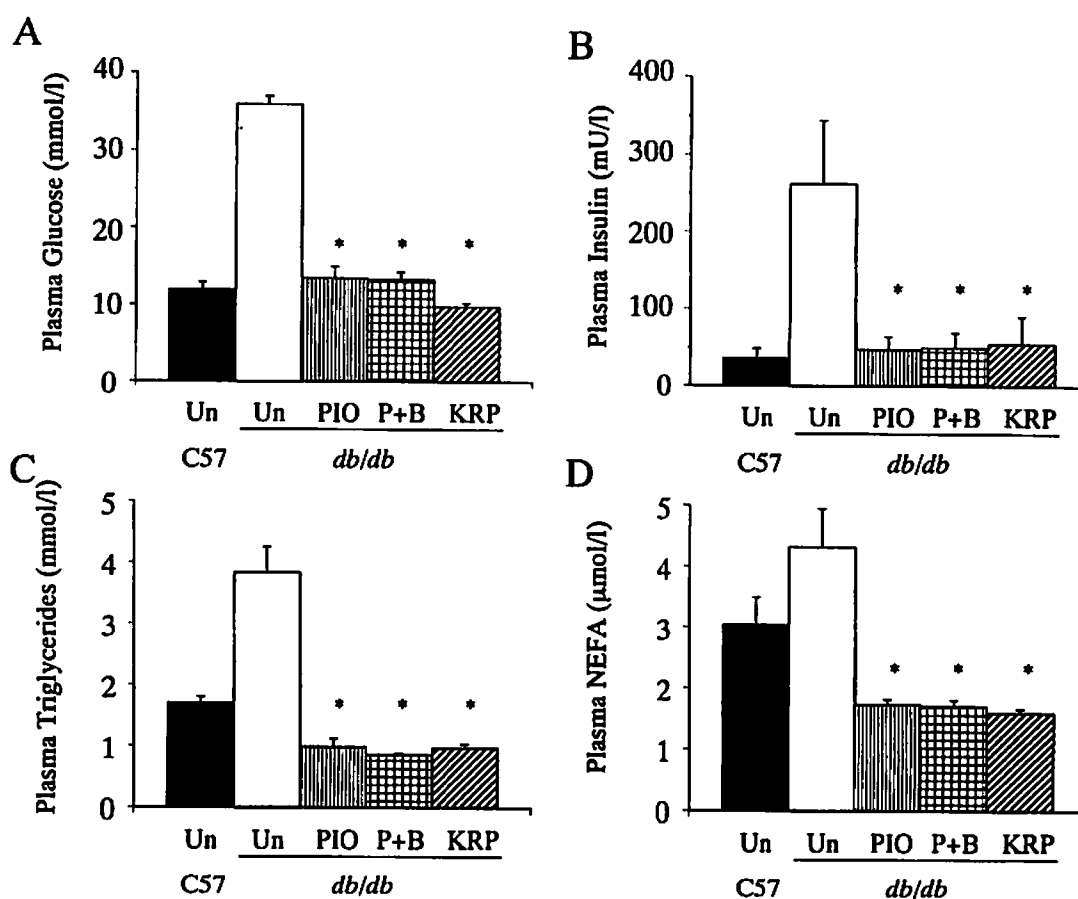
3. 膵臓のインスリン含量

db/db マウスの未治療群の膵インスリン含量は、C57BL/6J マウスの未治療群と比較してほぼ完全に枯渇していた (第 3 図)²²⁾。統計学的有意差はなかったが (P=0.051, ANOVA による)、db/db マウスの PIO 群および P+B 群の膵臓インスリン含量は、db/db マウスの未治療群と比べて改善していた。db/db マウスの KRP-297 群の膵インスリン含量は、C57BL/6J マウスの未治療群とほぼ同じであった。

第1表 C57BL/6J マウスおよび *db/db* マウスにおける4週間での体重変化, 食餌摂取量および飲水量

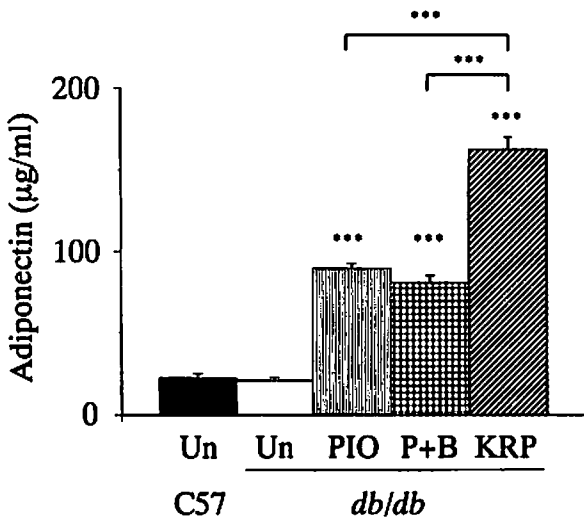
マウス	群	体重変化 (g)	食餌摂取量 (g)	飲水量 (g)
C57BL/6J	Untreated	3.06±0.25	96.35±1.59	158.45±5.12
	PIO	4.91±0.17*	112.29±1.38*	189.88±7.95*
	P+B	4.12±0.34*	108.27±1.75*	178.79±6.33
	KRP-297	4.70±0.18*	107.98±1.71*	198.33±7.63*
<i>db/db</i>	Untreated	9.90±0.46	191.50±2.77	505.60±17.64
	PIO	21.17±0.45*	182.80±3.07	196.10±5.12*
	P+B	19.30±0.48*	180.67±3.29	197.40±8.23*
	KRP-297	15.46±0.43* ^{††}	164.93±2.04* ^{††}	191.13±4.31*

*P<0.0083 compared with untreated group in each strain. †P<0.0083 compared with PIO group in each strain. ††P<0.0083 compared with P+B group in each strain.



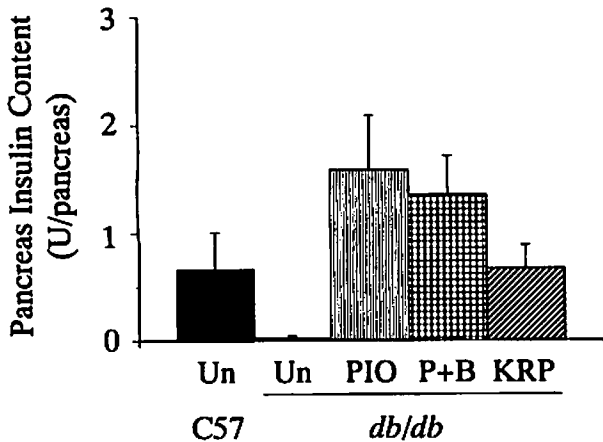
第1図 10週齢における血漿パラメーター

A: 糖, B: インスリン, C: 中性脂肪, D: 遊離脂肪酸. Un: 未治療群, PIO: pioglitazone 群, P+B: pioglitazone+bezafibrate 群, KRP: KRP-297 群, C57: C57BL/6J マウス, *db/db*: *db/db* マウス. それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した. *P<0.0083, ANOVA (Bonferroni-Dunn) による. C57BL/6J 未治療群の値は参考値として示した. (Yajima K et al: Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E966-E971, 2003²³⁾の Fig. 1を許可を得て転載)



第2図 10週齢における血漿アディポネクチン値

Un：未治療群，PIO：pioglitazone 群，P+B：pioglitazone+bezafibrate 群，KRP：KRP-297 群，C57：C57BL/6J マウス，db/db：db/db マウス，それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した。***P<0.0001，ANOVA (Bonferroni-Dunn) による。C57BL/6J 未治療群の値は参考値として示した。

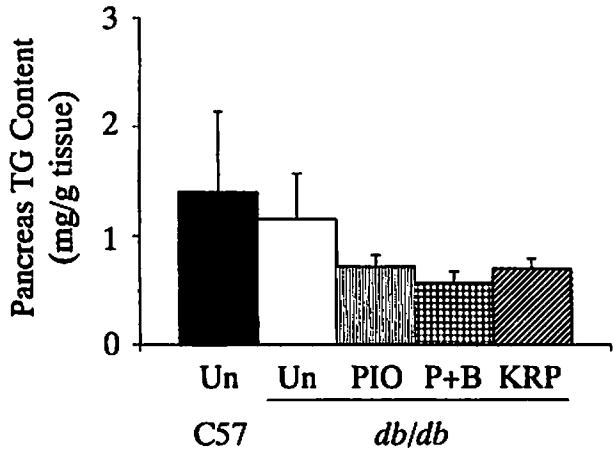


第3図 10週齢における膵臓のインスリン含量

Un：未治療群，PIO：pioglitazone 群，P+B：pioglitazone+bezafibrate 群，KRP：KRP-297 群，C57：C57BL/6J マウス，db/db：db/db マウス，それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した。P=0.051，ANOVA (Bonferroni-Dunn) による。C57BL/6J 未治療群の値は参考値として示した。(Yajima K et al：Am J Physiol Endocrinol Metab 284：E966-E971，2003²²⁾の Fig. 2 を許可を得て転載)

4. 膵臓の TG 含量

db/db マウスにおける膵臓の TG 含量は，PPAR γ アゴニスト治療群では未治療群と比べて低下傾向にあったが，統計学的に有意差はなかった (P=0.322，ANOVA による) (第4図)。



第4図 10週齢における膵臓の中性脂肪含量

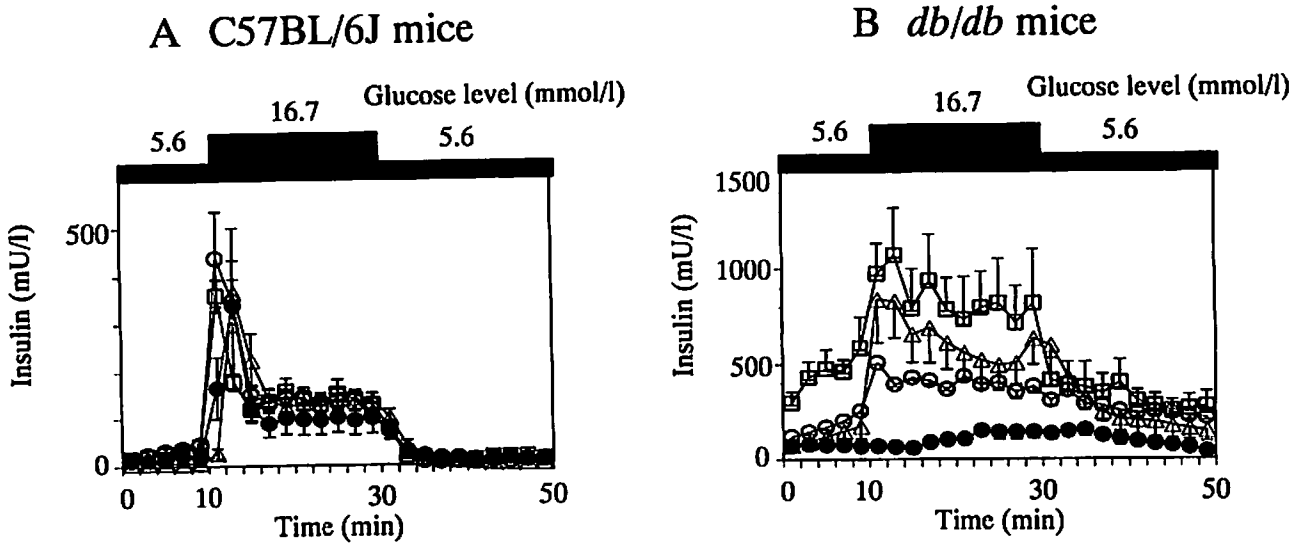
Un：未治療群，PIO：pioglitazone 群，P+B：pioglitazone+bezafibrate 群，KRP：KRP-297 群，C57：C57BL/6J マウス，db/db：db/db マウス，それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した。P=0.322，ANOVA (Bonferroni-Dunn) による。C57BL/6J 未治療群の値は参考値として示した。

5. 膵灌流実験

C57BL/6J マウスの各群間で，GSIS の差は認められなかった (第5図A)²²⁾。一方 db/db マウスでは (第5図B)，未治療群では C57BL/6J マウスのような良好な GSIS は全く見られなかったが，PPAR γ アゴニスト治療群では GSIS が良好に保たれていた²²⁾。4 群間で比較すると，PIO 群の GSIS は db/db マウスの未治療群と比べて有意差はなかったが，P+B 群および KRP-297 群の GSIS はともに有意に増加していた (第2表)²²⁾。

6. 病理組織学的検討

db/db マウスの未治療群のラ島は過形成で，インスリンは著明に減少しており，染色パターンもまばらであった (第6図)²²⁾。db/db マウスの PIO 群および P+B 群のラ島も過形成であったが，インスリン染色はほぼ正常であった。db/db マウスの KRP-297 群のラ島では過形成は認められず，インスリン染色もほぼ正常であった。インスリン染色の結果は，膵臓のインスリン含量の結果



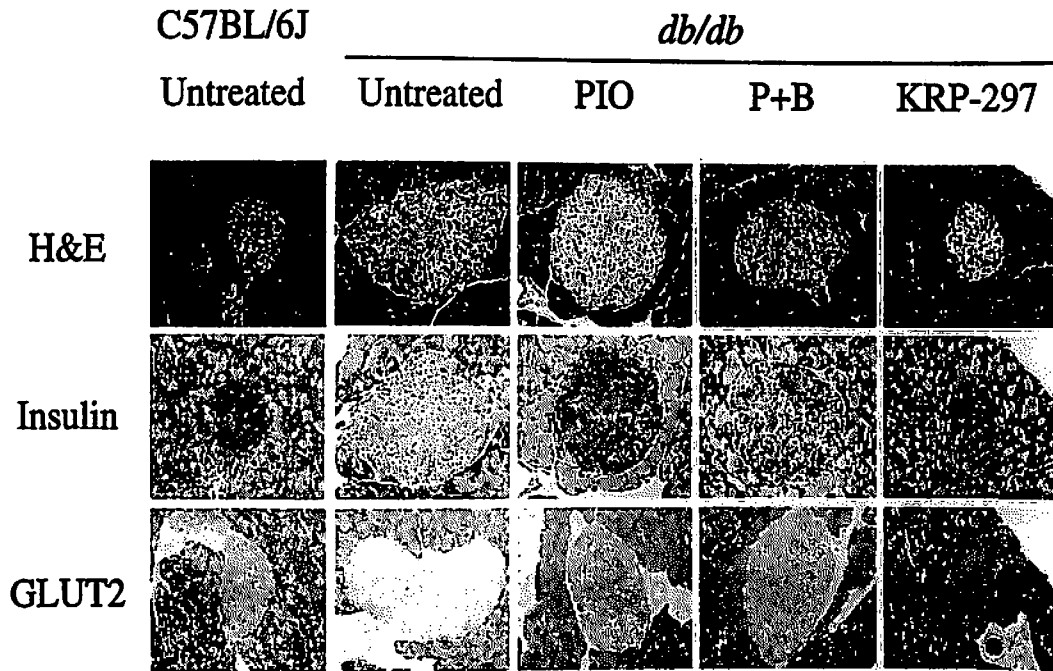
第5図 豚灌流実験におけるグルコース刺激性インスリン分泌

A: C57BL/6J マウス ●: 未治療群, ○: pioglitazone 群, □: pioglitazone+bezafibrate 群, △: KRP-297 群, それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した. B: db/db マウス ●: 未治療群, ○: pioglitazone 群, □: pioglitazone+bezafibrate 群, △: KRP-297 群, それぞれのバーは平均値-標準誤差で示した. pioglitazone+bezafibrate 群のバーは平均値+標準誤差で示した. (Yajima K et al: Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E966-E971, 2003²⁰⁾の Fig. 3 を許可を得て転載)

第2表 C57BL/6J マウスおよび db/db マウスにおける豚灌流実験によるグルコース刺激性インスリン分泌 (GSIS)

GSIS (mU)	C57BL/6J		db/db	
	0-10分	10-30分	0-10分	10-30分
Untreated	79.02±52.01	1301.10±333.07	371.60±49.90	1059.50±190.91
PIO	151.80±27.54	1857.53±269.23	878.89±206.04	4054.41±997.69
P+B	138.32±22.75	1637.92±194.65	2248.18±410.89 ^{*†‡}	8426.53±1788.66 [*]
KRP-297	29.35±19.08	1556.51±202.71	602.60±189.85	6334.80±1161.62 [*]

*P<0.0083 compared with untreated group in each strain during the same period. †P<0.0083 compared with PIO group in each strain during the same period. ‡P<0.0083 compared with KRP-297 group in each strain during the same period.



第6図 10週齢における膵ラ島の組織標本

Untreated：未治療群，PIO：pioglitazone 群，P+B：pioglitazone+bezafibrate 群，KRP-297：KRP-297 群，H&E：ヘマトキシリンエオジン染色，Insulin：インスリン染色，GLUT2：GLUT2 染色，倍率：80×。（Yajima K et al：Am J Physiol Endocrinol Metab 284：E966-E971, 2003²⁹⁾の Fig. 4 を許可を得て転載）

と類似していた。GLUT2 は、正常な C57BL/6J マウスの膵β細胞膜に発現していた。db/db マウスの未治療群では GLUT2 の発現が欠損していたが、PPAR γ アゴニスト治療群では C57BL/6J マウスと同様に保たれていた。しかし、db/db マウスの PIO 群、P+B 群および KRP-297 群における GLUT2 発現の差違は認められなかった。

考 察

本研究では、肥満 2 型糖尿病のモデルである db/db マウスの高血糖、高脂血症、インスリン抵抗性、膵インスリンの枯渇および GSIS の無反応を、PPAR γ アゴニストが改善させることを示した。さらに、PPAR α アゴニストの併用や PPAR γ/α 両アゴニストの投与によって GSIS が増強することを示した。すなわち、肥満 2 型糖尿病において PPAR γ アゴニストと PPAR α アゴニストの併用療法は、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 促進の両面においてより効果的である可能性を示した。

1. 体重変化、食餌摂取量および飲水量

PPAR γ アゴニストは、インスリン抵抗性を呈する肥満 2 型糖尿病患者の治療によく用いられる。しかし、PPAR γ は脂肪細胞のマスターレギュレーターであるため、その作用により体脂肪量の増加や肥満を引き起こすことが知られている²³⁾。体重増加の程度は、PPAR γ アゴニストの種類により異なると報告されている²⁴⁾。また、PPAR γ アゴニストによる体重の増加はげっ歯類だけでなくヒトでも報告されており²⁵⁻²⁸⁾、それは食餌摂取量の増加または薬物の作用による脂肪細胞の増加によるものと推測されている²⁹⁻³⁴⁾。

本研究では、C57BL/6J マウスにおいて、PPAR γ アゴニスト治療群の体重は食餌摂取量の増加に伴って有意に増加した。一方 db/db マウスにおいては、KRP-297 群が PIO 群や P+B 群と比べ最も体重増加が少なかっ

た。これは、KRP-297 群で食餌摂取量が最も少なかったことに加え、以前の報告にあるように KRP-297 の PPAR α 作用による脂質異化の増強および脂肪量の減少といった薬剤の効果によるものであろうと推測している^{17), 35)}。また、KRP-297 群の膵インスリン含量が正常マウスとほぼ同じであったことや、ラ島が PIO 群や P+B 群と比べ過形成でなかったことは、KRP-297 が肥満を最も改善させたことによるものと推測している¹⁹⁾。

2. 血漿の代謝パラメーター

PPAR γ アゴニストの投与により、*db/db* マウスの未治療群では上昇した血糖、インスリン、TG および遊離脂肪酸が正常化した。しかし、これらのパラメーターに関して、PPAR α アゴニストの付加効果は見出せなかった。*db/db* マウスにおいて KRP-297 群が最も血糖が低かったのは、おそらく薬剤の影響に加え食餌摂取量が最も少なかったためであろうと考えられた。

アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌されるインスリン感受性ホルモンで、抗動脈硬化作用をもつため最近注目されている^{36), 37)}。げっ歯類およびヒトにおいても、肥満の改善や PPAR γ アゴニストの投与によりアディポネクチンが増加することが近年報告されているが^{38)~40)}、本実験においてもその効果が確認された。また、PIO と比較して KRP-297 によるアディポネクチンの分泌効果が強いことが示されたが、薬剤の効果に加え、食餌摂取量の抑制に伴う肥満抑制による二次的な効果の影響も考えられた。

3. グルコース刺激性インスリン分泌および膵ラ島における変化

C57BL/6J マウスの GSIS は良好な反応を示し、PPAR α アゴニストや PPAR γ アゴニストの4週間の治療による変化は認めなかった。一方、*db/db* マウスの未治療群においては重篤なインスリン抵抗性、糖毒性および脂肪毒性の結果によるインスリンの枯渇のため、GSIS の反応は見られなかった。*db/db* マウスの未治療群の血漿インスリンレベルは、この週齢では他の治療群よりも高かったが、それは未治療群の *db/db* マウスのラ島が、極度の高血糖に対してなんとかインスリンを分泌しているからと考えられた。本研究において、刺激する灌流液の糖濃度は 16.7 mM であり、*db/db* マウスの未治療群の血糖よりも低い。そのため、*db/db* マウスの未治療群のラ島では高血糖に対する感受性が低下し、16.7 mM での GSIS 反応が見られなかった可能性も推測している。我々は、*db/db* マウスの未治療群において

ラ島の過形成を伴ったインスリン染色の低下および膵臓のインスリン含量の枯渇を示したが、それらはともにインスリン欠乏を物語っている。

本研究では、*db/db* マウスの GSIS は PPAR γ アゴニストの治療により保持された。これらの群では血糖、インスリン、TG および遊離脂肪酸の改善が認められた。また我々は、PPAR γ アゴニスト治療群においてラ島のインスリンの保持を示し、PPAR γ アゴニストによるインスリンの節約効果はインスリン抵抗性の改善によるものであろうと結論付けた。de Souza らは、Zucker diabetic fatty (以下 ZDF と略す) ラットの膵灌流実験において、GSIS の改善が PIO の直接効果ではないことを示し、インスリン抵抗性の改善によるものと推測している⁴¹⁾。

また本研究では、P+B および KRP-297 による治療は *db/db* マウスの GSIS を有意に増強させたが、PPAR α アゴニストを加えたことでなぜ GSIS が増強したのかは明らかにできなかった。しかしながら PIO 群、P+B 群および KRP-297 群間で血糖、インスリン、TG および遊離脂肪酸に相違はなかったことから、P+B 群と KRP-297 群においてインスリン分泌が増加したのはインスリン抵抗性の改善によるものではなく、膵 β 細胞における糖の感受性が増強したためではないかと考えられた。

脂肪毒性は膵 β 細胞の異常、すなわち GSIS と GLUT2 の消失および TG の蓄積を招く^{41), 42)}とされ、Higa らは、ZDF ラットを用いて troglitazone がこのような脂肪毒性の特徴を防いだことを報告している⁴³⁾。本研究においても、糖感受性や GSIS と関連している GLUT2 の染色性を評価した。その結果、PPAR γ アゴニスト治療によって *db/db* マウスにおける GLUT2 が保持されたことを示した。PPAR α アゴニストの付加により GSIS が増強されたが、PIO 群、P+B 群および KRP-297 群の間で GLUT2 染色における差を同定することは困難であった。しかし、ZDF ラットのラ島において PPAR α の発現が抑制されていたとの報告や⁴⁴⁾、高血糖が膵 β 細胞の PPAR α 発現を減弱させる報告⁴⁵⁾など、ラ島への PPAR α の直接作用が注目され PPAR α と GSIS が関連していると考えられる⁴⁶⁾。さらに Wang らは、PPAR α は正常ラットのラ島での GLUT2 を直接増加させる転写調節因子の一つであると推測していること⁴⁷⁾、近年ラットの GLUT2 遺伝子のプロモーター領域に PPAR 応答配列 (以下 PPRE と略す) が同定されたことなどから⁴⁸⁾、PPAR α アゴニストが膵 β 細胞における GLUT2 遺伝子の PPRE に影響している可能性があ

る。さらに本研究からは、PPAR α アゴニストが GLUT2 を量的にはなく質的な面から糖感受性を亢進させ GSIS を増強させている可能性が考えられた。

また膵臓における TG 含量の差について検討したところ、PPAR γ アゴニスト治療によりそれらの低下傾向を示したものの統計学的な有意差は見られず、PPAR α アゴニストによる影響も説明できなかった。また、我々は検討することができなかったが、分離したラウ島での TG 含量が PPAR α アゴニストにより減少する可能性がある。GSIS における PPAR α の直接の影響を解明するためにはさらなる研究が必要であると考えられた。

総 括

本研究は、PPAR γ アゴニストと PPAR α アゴニストの併用療法や PPAR γ/α 両アゴニストによる治療は脂質低下作用を増強することを介して、肥満2型糖尿病モデル動物である db/db マウスの脂肪毒性や膵ラウ島におけるインスリン分泌不全をより解除できるであろうという仮説のもとに実験を行い、以下の結果を得た。

1. db/db マウスにおいて、PPAR γ アゴニスト治療群では高血糖、高脂血症および高インスリン血症が改善した。このため、db/db マウスの代謝状態は改善され、未治療群よりも体重は増加していた。KRP-297 群では PIO 群や P+B 群と比べ、体重増加および食餌摂取量が最も少なかった。

2. 未治療群の db/db マウスのラウ島で認められたインスリン顆粒の枯渇および膵 β 細胞膜に存在する GLUT2 の消失が、PPAR γ アゴニストの治療により改善された。KRP-297 群の膵臓のインスリン含量が正常マウスとほぼ同程度であったこと、および膵ラウ島が PIO 群や P+B 群と比べ過形成ではなかったことは、KRP-297 が肥満を最も改善させたことによるものと考えられた。

3. GSIS は、db/db マウスの未治療群で消失していたが、PPAR γ アゴニストの治療により改善され、PPAR α アゴニストの併用によりさらに増強された。PPAR γ アゴニストと PPAR α アゴニストの併用により、代謝パラメーターにおいては仮説のような増強効果は認められなかったが、GSIS の増強効果が認められた。また、PPAR γ/α の両アゴニストによる治療では、体重増加の抑制およびラウ島の過形成防止も認められた。以上より、肥満2型糖尿病において PPAR γ アゴニストと PPAR α

アゴニストの併用療法や PPAR γ/α の両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 増強の両面においてより効果的である可能性を示した。

本稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室 嶺田享男教授に深謝いたします。また、本研究を直接御指導くださり論文の御校閲をいただきました慶應義塾大学保健管理センター兼医学部内科学教室 広瀬 寛講師、研究を御指導いただきました元慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 藤田晴久講師ならびに瀬戸淑子講師、慶應義塾大学病理学教室 山田健人講師、研究にご協力いただきました研究室の諸先生方、先端医科学研究所の方々に感謝いたします。

本論文は、Yajima K, Hirose H, Fujita H, Seto Y, Fujita H, Ukeda K, Miyashita K, Kawai T, Yamamoto Y, Ogawa T, Yamada T, Saruta T : Combination therapy with PPAR γ and PPAR α agonists increases glucose-stimulated insulin secretion in db/db mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 284 : E966-E971, 2003²²⁾の一部を含む。

本研究の一部は、第 61 回米国糖尿病学会 (2001 年、フィラデルフィア)、第 44, 45, 47 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2001 年 京都, 2002 年 東京, 2004 年 東京)、第 24 回日本肥満学会年次学術集会 (2003 年、千葉) において報告した。

文 献

- 1) Reaven GM : Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37 : 1595-1607, 1988
- 2) Kaplan NM : The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. Arch Intern Med 149 : 1514-1520, 1989
- 3) DeFronzo RA, Ferrannini E : Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care 14 : 173-194, 1991
- 4) Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Tokunaga K : Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. Ann N Y Acad Sci 676 : 270-278, 1993
- 5) Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S : Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in

- human obesity. *Metabolism* 36 : 54-59, 1987
- 6) Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH : Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats : impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 10878-10882, 1994
 - 7) Hirose H, Lee YH, Inman LR, Nagasawa Y, Johnson JH, Unger RH : Defective fatty acid-mediated beta-cell compensation in Zucker diabetic fatty rats. Pathogenic implications for obesity-dependent diabetes. *J Biol Chem* 271 : 5633-5637, 1996
 - 8) Unger RH : Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44 : 863-870, 1995
 - 9) Shulman GI : Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106 : 171-176, 2000
 - 10) Prigeon RL, Kahn SE, Porte D : Effect of troglitazone on B cell function, insulin sensitivity, and glycemic control in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83 : 819-823, 1998
 - 11) Masuda K, Okamoto Y, Tsuura Y, Kato S, Miura T, Tsuda K, Horikoshi H, Ishida H, Seino Y : Effects of troglitazone (CS-045) on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets and HIT cells : an insulinotropic mechanism distinct from glibenclamide. *Diabetologia* 38 : 24-30, 1995
 - 12) Ohtani K, Shimizu H, Tanaka Y, Sato N, Mori M : Pioglitazone hydrochloride stimulates insulin secretion in HIT-T 15 cells by inducing Ca²⁺ influx. *J Endocrinol* 150 : 107-111, 1996
 - 13) Ohtani KI, Shimizu H, Sato N, Mori M : Troglitazone (CS-045) inhibits beta-cell proliferation rate following stimulation of insulin secretion in HIT-T 15 cells. *Endocrinology* 139 : 172-178, 1998
 - 14) Dubois M, Pattou F, Kerr Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J : Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 43 : 1165-1169, 2000
 - 15) Guerre Millo M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 275 : 16638-16642, 2000
 - 16) Taniguchi A, Fukushima M, Sakai M, Tokuyama K, Nagata I, Fukunaga A, Kishimoto H, Doi K, Yamashita Y, Matsuura T, Kitatani N, Okumura T, Nagasaka S, Nakaishi S, Nakai Y : Effects of bezafibrate on insulin sensitivity and insulin secretion in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 50 : 477-480, 2001
 - 17) Chaput E, Saladin R, Silvestre M, Edgar AD : Fenofibrate and rosiglitazone lower serum triglycerides with opposing effects on body weight. *Biochem Biophys Res Commun* 271 : 445-450, 2000
 - 18) Lefebvre AM, Peinado Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, Staels B : Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 1756-1764, 1997
 - 19) Murakami K, Tobe K, Ide T, Mochizuki T, Ohashi M, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T : A novel insulin sensitizer acts as a coligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) and PPAR-gamma : effect of PPAR-alpha activation on abnormal lipid metabolism in liver of Zucker fatty rats. *Diabetes* 47 : 1841-1847, 1998
 - 20) Murakami K, Tsunoda M, Ide T, Ohashi M, Mochizuki T : Amelioration by KRP-297, a new thiazolidinedione, of impaired glucose uptake in skeletal muscle from obese insulin-resistant animals. *Metabolism* 48 : 1450-1454, 1999
 - 21) Ide T, Nakazawa T, Mochizuki T, Murakami K : Tissue-specific actions of antidiabetic thiazolidinediones on the reduced fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver of Zucker diabetic fatty rats. *Metabolism* 49 : 521-525, 2000
 - 22) Yajima K, Hirose H, Fujita H, Seto Y, Fujita H, Ukeda K, Miyashita K, Kawai T, Yamamoto Y, Ogawa T, Yamada T, Saruta T : Combination therapy with PPARgamma and PPARalpha agonists increases glucose-stimulated insulin secretion in db/db mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284 : E966-971, 2003
 - 23) Lehmann JM, Moore LB, Smith Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA : An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270 : 12953-12956, 1995
 - 24) King AB : A comparison in a clinical setting of the efficacy and side effects of three thiazolidinediones. *Diabetes Care* 23 : 557, 2000
 - 25) Hirshman MF, Fagnant PM, Horton ED, King PA, Horton ES : Pioglitazone treatment for 7 days failed to correct the defect in glucose transport and glucose transporter translocation in obese Zucker rat (fa/fa) skeletal muscle plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 208 : 835-845, 1995
 - 26) Murase K, Odaka H, Suzuki M, Tayuki N, Ikeda H : Pioglitazone time-dependently reduces tumour necrosis factor-alpha level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* 41 : 257-264, 1998
 - 27) Kawai T, Takei I, Oguma Y, Ohashi N, Tokui M, Oguchi S, Katsukawa F, Hirose H, Shimada A, Watanabe K, Saruta T : Effects of troglitazone on fat distribution in the treatment of male type 2 diabetes.

- Metabolism 48 : 1102-1107, 1999
- 28) Schwartz S, Raskin P, Fonseca V, Graveline JF : Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. Troglitazone and Exogenous Insulin Study Group. N Engl J Med 338 : 861-866, 1998
 - 29) Hallakou S, Doare L, Foufelle F, Kergoat M, Guerre Millo M, Berthault MF, Dugail I, Morin J, Auwerx J, Ferre P : Pioglitazone induces *in vivo* adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. Diabetes 46 : 1393-1399, 1997
 - 30) Pickavance L, Widdowson PS, King P, Ishii S, Tanaka H, Williams G : The development of overt diabetes in young Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and the effects of chronic MCC-555 treatment. Br J Pharmacol 125 : 767-770, 1998
 - 31) Shimaya A, Kurosaki E, Nakano R, Hirayama R, Shibasaki M, Shikama H : The novel hypoglycemic agent YM440 normalizes hyperglycemia without changing body fat weight in diabetic db/db mice. Metabolism 49 : 411-417, 2000
 - 32) De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J : Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Clin Invest 98 : 1004-1009, 1996
 - 33) Wang Q, Dryden S, Frankish HM, Bing C, Pickavance L, Hopkins D, Buckingham R, Williams G : Increase in feeding in fatty Zucker rats by the thiazolidinedione BRL 49653 (rosiglitazone) and the possible involvement of leptin and hypothalamic neuropeptide Y. Br J Pharmacol 122 : 1405-1410, 1997
 - 34) Zhang B, Graziano MP, Doebber TW, Leibowitz MD, White Carrington S, Szalkowski DM, Hey PJ, Wu M, Cullinan CA, Bailey P, Lollmann B, Frederich R, Flier JS, Strader CD, Smith RG : Down-regulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and db/db mice. J Biol Chem 271 : 9455-9459, 1996
 - 35) Etgen GJ, Oldham BA, Johnson WT, Broderick CL, Montrose CR, Brozinick JT, Misener EA, Bean JS, Bensch WR, Brooks DA, Shuker AJ, Rito CJ, McCarthy JR, Ardecky RJ, Tyhonas JS, Dana SL, Bilakovics JM, Paterniti JR Jr, Ogilvie KM, Liu S, Kauffman RF : A tailored therapy for the metabolic syndrome : the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist LY465608 ameliorates insulin resistance and diabetic hyperglycemia while improving cardiovascular risk factors in preclinical models. Diabetes 51 : 1083-1087, 2002
 - 36) Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR : Adiponectin : more than just another fat cell hormone? Diabetes Care 26 : 2442-2450, 2003
 - 37) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H : The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nat Med 7 : 941-946, 2001
 - 38) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y : Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20 : 1595-1599, 2000
 - 39) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y : PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes 50 : 2094-2099, 2001
 - 40) Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Oguma Y, Takei I, Saruta T : Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. Metabolism 51 : 314-317, 2002
 - 41) de Souza CJ, Yu JH, Robinson DD, Ulrich RG, Meglasson MD : Insulin secretory defect in Zucker fa/fa rats is improved by ameliorating insulin resistance. Diabetes 44 : 984-991, 1995
 - 42) Unger RH, Zhou YT, Orci L : Regulation of fatty acid homeostasis in cells : novel role of leptin. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 2327-2332, 1999
 - 43) Higa M, Zhou YT, Ravazzola M, Baetens D, Orci L, Unger RH : Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 11513-11518, 1999
 - 44) Zhou YT, Shimabukuro M, Wang MY, Lee Y, Higa M, Milburn JL, Newgard CB, Unger RH : Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in disease of pancreatic beta cells. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 8898-8903, 1998
 - 45) Roduit R, Morin J, Masse F, Segall L, Roche E, Newgard CB, Assimacopoulos Jeannet F, Prentki M : Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene in the pancreatic beta-cell. J Biol Chem 275 : 35799-35806, 2000
 - 46) Sugden MC, Holness MJ : Potential role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in the modulation of glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes 53 Suppl 1 : S71-81, 2004
 - 47) Wang MY, Koyama K, Shimabukuro M, Mangelsdorf D, Newgard CB, Unger RH : Overexpression of leptin

receptors in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats restores GLUT-2, glucokinase, and glucose-stimulated insulin secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 95 : 11921-11926, 1998

48) Kim HI, Kim JW, Kim SH, Cha JY, Kim KS, Ahn YH : Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. Diabetes 49 : 1517-1524, 2000

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

山本 幸宏

(平成16年10月26日受付)

Key Words : adiponectin, insulin resistance, lipid profile, gene polymorphism

肥満とは、「脂肪組織が過剰に蓄積した状態」と定義されている。肥満は糖尿病・耐糖能異常、高血圧症、高脂血症などを伴うことが多く、その結果として虚血性心疾患や脳血管障害などの動脈硬化性疾患が生じる。肥満を伴う糖尿病・耐糖能異常、高血圧症、高脂血症などの疾患はさまざまな名前で呼ばれてきた。1988年にReavenが「シンドローム X」という疾患概念を初めて明らかにし¹⁾、その翌年、Kaplanは上半身肥満に重点を置いて「死の四重奏」を提唱した²⁾。同様の疾患概念として、DeFronzoらは「インスリン抵抗性症候群」を³⁾、我が国の松澤らのグループは内臓脂肪に重点を置いた「内臓脂肪型肥満」という概念を提唱した⁴⁾。肥満はこれらの危険因子の中でも上流に位置していると考えられていたが、その分子基盤は明らかではなかった。従来、脂肪組織は中性脂肪を蓄積する受動的なエネルギー貯蔵臓器と考えられてきた。1994年に*ob* 遺伝子とその遺伝子産物であるレプチンが発見⁵⁾されて以降、さまざまな研究により脂肪組織は単なるエネルギー貯蔵臓器ではなく、ホルモンやサイトカインなどの生理活性物質を分泌する人体最大の内分泌臓器と考えられるようになった。

アディポネクチンは、それらの生理活性物質の中で脂肪細胞に特異的な分泌蛋白として、1995年から1996年にかけて4つの独立したグループにより発見された。Maedaらは、脂肪組織の遺伝子ライブラリーに最も頻回に出現した遺伝子を *adipose most abundant gene transcript 1* と命名し、脂肪組織に特異的に発現し分泌されることを示し⁶⁾、遺伝子産物をアディポネクチンと命名した⁷⁾。Nakanoらは、ゼラチンアフィニティークロマトグラフィーを用いてヒト血漿から28kDaの新規血漿蛋白 *gelatin-binding protein of 28kDa* を単離し

たが⁸⁾、アミノ酸分析の結果、アディポネクチンと同一分子であった。Schererらは、マウス3T3-L1脂肪細胞の分化過程で誘導されてくる蛋白として *adipocyte complement-related protein of 30kDa* を同定し⁹⁾、Huらはマウス3T3-F442A脂肪細胞の分化前後の *differential display* によって *adipoQ* を同定した¹⁰⁾。*Adipocyte complement-related protein of 30kDa* と *adipoQ* は同一分子であり¹⁰⁾、ヒトアディポネクチンとはアミノ酸レベルで83%の相同性があり、マウスのカウンターパートと考えられている。

アディポネクチンの調節や生理的役割はしばらくの間不明であったが、1999年にアディポネクチンは脂肪細胞特異的な分泌蛋白であるにもかかわらず、その血中濃度は *body mass index* (以下 BMI と略す) とは負の相関関係にあり、肥満者では血中濃度が低いことが報告された¹¹⁾。その後、2型糖尿病患者を対象とした臨床研究において、冠動脈疾患を有している人は血中アディポネクチン濃度が低下していることが示された¹²⁾。さらに、血中アディポネクチン濃度は BMI とは独立して中性脂肪と負の相関関係にあることが報告された¹³⁾。アディポネクチンが動脈硬化を抑制するメカニズムとして、血管内皮細胞に対する直接作用が明らかにされた。すなわち、アディポネクチンは *NF- κ B* シグナルを抑制する¹²⁾ ことにより、*tumor necrosis factor- α* による内皮細胞接着因子の発現を抑制し¹³⁾、動脈硬化の初期反応である単球が内皮細胞に接着するのを抑制する。また、免疫組織学的解析により、アディポネクチンは正常な血管壁には認めないが、カテーテルにより障害された血管壁に集簇していることが示された¹⁴⁾。

上述のように、アディポネクチンは肥満者および冠動

脈疾患患者では血中濃度が低いことが明らかとなった。冠動脈疾患など動脈硬化性疾患の危険因子としては、従来より糖尿病・耐糖能異常、高脂血症、高血圧症などがあげられている。アディポネクチンは、上記のように直接内皮細胞に働き動脈硬化を抑制するだけでなく、これらの危険因子を改善させて動脈硬化を抑制している可能性もあり、肥満と糖尿病・耐糖能異常、高脂血症、高血圧症をつなぐ蛋白質でありうると考えられた。そこで著者は、アディポネクチンとこれら危険因子との関係を断面的及び縦断的臨床研究により検討することとした。

上述の通り、肥満者ではアディポネクチン濃度は低下している⁷⁾。また、peroxisome proliferator-activated receptor γ (以下 PPAR γ と略す) のアゴニストであるチアゾリジン系薬剤の投与により、アディポネクチンの血中濃度が上昇することが報告された^{15), 16)}。このように、アディポネクチン濃度は肥満やチアゾリジン系薬剤の投与という環境因子により変化するが、アディポネクチン濃度は遺伝的にも規定されていることが考えられ、アディポネクチン遺伝子多型と PPAR γ 2 遺伝子多型に注目してこの点を検討することにした。アディポネクチンの遺伝子多型は、JSNP データベース¹⁷⁾に登録されている T45G 多型、G276T 多型および A349G 多型を検討することとした。

PPAR γ は主に脂溶性分子をリガンドとする核内受容体型転写因子であり¹⁸⁾、PPAR γ の合成アゴニストであるチアゾリジン系薬剤は、インスリン抵抗性改善薬として臨床応用されている¹⁹⁾。PPAR γ は同じく核内受容体型転写因子である retinoid X receptor (以下 RXR と略す) とヘテロダイマーを形成し、peroxisome proliferator responsive element (以下 PPRE と略す) に結合し、脂肪細胞での遺伝子の転写を調節している。PPAR γ アゴニストにより、インスリン抵抗性を惹起する tumor necrosis factor α 、および interleukin-6 の発現が低下し^{20), 21)}、視床下部に働き、食欲を抑制し交感神経系を活性化させるレプチンが低下する²²⁾。さらに、脂肪細胞への遊離脂肪酸の取り込みを促進する fatty acid translocase^{23), 24)}、ブドウ糖の取り込みを促進する glucose transporter 4²⁵⁾ の発現が亢進する。PPAR γ には PPAR γ 1 と PPAR γ 2 の2つのスプライシングによるアイソフォームが存在し、共に脂肪細胞に多く発現しているが、PPAR γ 2 はほぼ脂肪細胞特異的に発現している²⁶⁾。Tontonoz らは、PPAR γ 2 を脂肪細胞への分化能を持たない線維芽細胞に強制発現させ、同時に PPAR γ アゴニストを添加することにより、線維芽細胞が脂肪細胞へ分化することを示した²⁷⁾。このように、

PPAR γ は脂肪細胞での遺伝子の転写を制御し、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとしての役割を果たしている。

ヒトにおいて、PPAR γ 2 の12番目のアミノ酸であるプロリン(以下 Pro と略す)がアラニン(以下 Ala と略す)に置換した多型が同定され²⁸⁾、本多型と BMI、インスリン感受性、糖尿病との関連が報告されている。Ala 保持者は Caucasian²⁹⁾ と台湾人³⁰⁾ においては BMI が高いと報告されており、フィンランド人においては BMI が低い³¹⁾と報告されている。Ala 保持者は日本人³²⁾、日系アメリカ人³¹⁾ および Caucasian^{33, 35)} においてインスリン感受性が高く、さらに日本人^{32), 36)} および Caucasian³⁷⁾ を対象とした臨床研究において、Ala 保持者は糖尿病の頻度が低いと報告されている。In vitro の実験で、PPAR γ 2 の Pro から Ala に置換した変異体は、PPAR γ 2 転写活性の上昇作用が低下していることが報告された³¹⁾。そこで、Ala 保持者はアディポネクチンの血清濃度が低くなるという仮説を立て、PPAR γ 2 Pro12Ala 多型に注目して、血清アディポネクチン濃度、BMI および糖・脂質代謝指標との関係を検討することとした。

対象と方法

1. 対象

1) アディポネクチンと BMI、血圧および糖・脂質代謝指標の断面的検討

2000年に定期健康診断を受診した、30~65歳の男性705人および女性262人を対象とした。

2) アディポネクチンと BMI、血圧および糖・脂質代謝指標の縦断的検討

2000年と2002年ともに定期健康診断を受診した、30~65歳の男性590人を対象とした。

3) アディポネクチン遺伝子多型および PPAR γ 2 遺伝子多型の検討

2000年に定期健康診断を受診した、30~65歳の男性478人および女性117人を対象とした。

いずれの検討においても、内分泌疾患、腎疾患、肝疾患、冠動脈疾患または脳血管障害を有する人、糖尿病または高脂血症で薬物療法を受けていた人は対象に含まなかった。本研究はヘルシンキ宣言を遵守して施行し、対象者全員に本研究の目的、性質、すべての手順での危険性をすべて説明した上でインフォームドコンセントを得た。

2. 測定

前述の対象者において、身長、体重、収縮期血圧、拡張期血圧および心拍数を測定し、空腹時採血にて採取された血液を用いて、血糖、インスリン、血清脂質（総コレステロール、中性脂肪、高比重リポ蛋白コレステロール（以下 HDL-C と略す）、低比重リポ蛋白コレステロール（以下 LDL-C と略す））および尿酸を測定した。女性においてのみ、高感度 C-reactive protein（以下 CRP と略す）を測定した。インスリン抵抗性指数は、homeostasis model assessment を用いて計算した（以下 HOMA-IR と略す）^{38), 39)}。

3. ELISA 法によるアディポネクチンの測定

測定前に血清を 441 倍に希釈した。希釈血清およびアディポネクチン標準検体を各 100 μ l、マウス抗ヒトアディポネクチンモノクローナル抗体を付着させた 96 ウェルマイクロタイタープレート（中外診断科学、東京）に添加した。この抗体は、天然のアディポネクチンのみを認識する⁸⁾。60 分間室温で放置し、ウェルを洗浄し、horseradish peroxidase で標識したアディポネクチンモノクローナル抗体で 30 分間反応させた。再度ウェル

を洗浄し、tetramethylbenzidine を 30 分間反応させた。0.18M 硫酸を添加して反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。アッセイ内再現性およびアッセイ間再現性の変動係数はそれぞれ、4.8-4.9% および 3.3-6.8% であった。

4. 遺伝子多型の解析

アディポネクチン遺伝子の T45G 多型、G276T 多型、A349G 多型および PPAR γ 2 遺伝子 Pro12Ala 多型は、TaqMan polymerase chain reaction（以下 PCR と略す）法^{40, 42)}を用いて同定した。第 1 表に、使用したプライマーおよび TaqMan プローブを示した。反応組成は Universal Master Mix（Applied Biosystems、東京）12.5 μ l、プライマー各 22.5 pmol、プローブ各 5 μ mol、DNA 約 10-50 ng とし、蒸留水を加えて全量で 25 μ l として反応させた。PCR 反応は、ABI Prism-7700（Applied Biosystems）を用いて、アディポネクチン遺伝子 T45G 多型は 95°C 10 分を 1 サイクルの後、95°C 15 秒および 62°C 60 秒を 35 サイクルで、その他の多型は 95°C 10 分を 1 サイクルの後、92°C 15 秒および 60°C

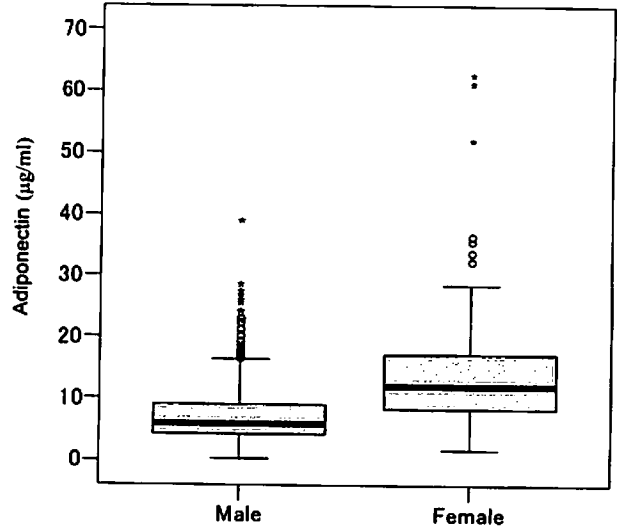
第 1 表 本研究で使用したプライマーおよび TaqMan プローブ

	5'プライマー	3'プライマー	TaqMan プローブ
アディポネクチン 遺伝子 T45G 多型	5'-TGCTGTT	5'-ACTCCGGG	T-アレル特異的プローブ
	GCTGGGAG	CCCTTGAG	5'-Vic-CTCTGCCCGGTCATGA
	CTG-3'	TC-3'	CCAGG-3'
アディポネクチン 遺伝子 G276T 多型	5'-TTTCATCA	5'-CTCCCTG	G-アレル特異的プローブ
	CAGACCTCC	TGTCTAGGC	5'-Vic-TATATGAAGGCATTCA
	TACTACTGA-3'	CTTAGTTAA-3'	TT-MGB-3'
アディポネクチン 遺伝子 A349G 多型	5'-ACTAAGG	5'-CACCATCT	A-アレル特異的プローブ
	CCTAGACAC	ACACTCATC	5'-Vic-CCAAATCACTTCAGGT
	AGGGAGAA-3'	CTTGAA-3'	TG-MGB-3'
PPAR γ 2 Pro12Ala 多型	5'-GTTATGG	5'-TGTTTGC	Pro-アレル特異的プローブ
	GTGAACTC	AGACAGTGT	5'-Vic-CTATTGACCCAGAAA
	TGGGAGAT-3'	ATCAGTGAA-3'	G-MGB-3'
			Ala-アレル特異的プローブ
			5'-Fam-CTATTGACGCAGAAA
			G-MGB-3'

60秒を35サイクルで行った。

5. 統計学的解析

すべてのデータは、平均値±標準偏差として示した。断片的検討において、血清アディポネクチン濃度の性差の検定には Mann-Whitney の U 検定を、血清アディポネクチン濃度と他のパラメーターとの関係の解析は、単回帰分析、重回帰分析およびステップワイズ多重回帰分析を用いて行った。縦断的検討において、2000年と2002年の各パラメーターの比較は、Wilcoxon signed-rank 検定にて行った。ベースラインの血清アディポネクチン濃度と他のパラメーターの2年間の変化量との関係の解析は、単回帰分析および重回帰分析を用いて行った。遺伝子多型の検討においては、Hardy-Weinberg 平衡への適合の検定には χ^2 検定を使用し、ノンパラメトリックな検定法として2群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を、3群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を使用した。中性脂肪、インスリン、アディポネクチン、高感度 CRP および HOMA-IR は対数正規分布に従うため、対数変換後に解析を行った。すべての統計学的解析には、Statview ソフトウェア (ver 5.0J, 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図 血清アディポネクチン濃度の男女別分布

血清アディポネクチン濃度の分布を男女別に箱ひげ図で示した。箱の下端、中央、上端はそれぞれ25%タイル、中央値、75%タイルを示す。箱の上端から、箱の長さの1.5倍から3倍の間にある値を持つケースを外れ値(白丸)、箱の上端から、箱の長さの3倍より大きい値を持つケースを極値(星印)として示した。外れ値、極値を除いた最大値、最小値をもつケースをそれぞれひげの上端、下端として示した。

第2表 30-65歳の日本人967名における、臨床指標および代謝指標(A)、血清アディポネクチン濃度(log)と臨床指標および代謝指標との単回帰分析(B)および重回帰分析(C)

vs log [adiponectin]	A		B		C	
	mean±SD	r	P	adjusted for age, sex and BMI		
				r	P	
Age (years)	45.1±10.3	-0.046	NS	-	-	
BMI (kg/m ²)	22.5±2.9	-0.446	<0.0001	-	-	
Systolic blood pressure (mm Hg)	121±18	-0.237	<0.0001	-0.022	NS	
Diastolic blood pressure (mm Hg)	75±12	-0.238	<0.0001	-0.02	NS	
Heart rate (beats/min)	75±12	-0.032	NS	-0.009	NS	
Glucose (mg/dl)	93±13	-0.177	<0.0001	-0.05	0.086	
Insulin (log) (µU/ml)	5.36±3.35	-0.322	<0.0001	-0.19	<0.0001	
HOMA-IR (log) (-)	1.25±0.88	-0.339	<0.0001	-0.191	<0.0001	
Total cholesterol (mg/dl)	198±31	-0.077	0.016	-0.006	NS	
Triglycerides (log) (mg/dl)	105±73	-0.454	<0.0001	-0.245	<0.0001	
HDL-cholesterol (mg/dl)	58±15	0.519	<0.0001	0.320	<0.0001	
LDL-cholesterol (mg/dl)	122±28	-0.243	<0.0001	-0.099	0.0008	
Uric acid (mg/dl)	5.7±1.4	-0.422	<0.0001	-0.158	<0.0001	

平均±標準偏差。BMI: body mass index, NS: 有意差なし (P>0.1)。

(Yamamoto Y et al: Clin Sci (Lond) 103: 137-142, 2002¹³⁾の Table 1 を許可を得て転載)

第6表 30-65歳の日本人女性262名における、臨床指標および代謝指標(A)、血清アディポネクチン濃度(log)と臨床指標および代謝指標との単回帰分析(B)および重回帰分析(C)

vs log [adiponectin]		A		B		C	
		mean±SD	r	P	adjusted for age and BMI		
					r	P	
Age	(years)	41.5±9.8	0.097	NS	-	-	
BMI	(kg/m ²)	20.6±2.7	-0.247	<0.0001	-	-	
Systolic blood pressure	(mm Hg)	112±16	-0.016	NS	0.076	NS	
Diastolic blood pressure	(mm Hg)	68±11	-0.030	NS	0.033	NS	
Heart rate	(beats/min)	74±10	0.068	NS	0.101	0.095	
Glucose	(mg/dl)	89±9	-0.119	0.055	-0.021	NS	
Insulin (log)	(μU/ml)	4.82±2.51	-0.247	<0.0001	-0.159	0.018	
HOMA-IR (log)	(-)	1.08±0.61	-0.249	<0.0001	-0.152	0.025	
Total cholesterol	(mg/dl)	193±33	0.008	NS	0.003	NS	
Triglycerides (log)	(mg/dl)	67±37	-0.318	<0.0001	-0.282	<0.0001	
HDL-cholesterol	(mg/dl)	69±15	0.405	<0.0001	0.350	<0.0001	
LDL-cholesterol	(mg/dl)	111±28	-0.186	0.0025	-0.207	0.0027	
Uric acid	(mg/dl)	4.3±0.94	-0.006	NS	-0.015	NS	
hs-CRP	(mg/dl)	0.04±0.07	-0.124	0.044	0.013	NS	

平均±標準偏差。BMI：body mass index, hs-CRP：高感度C-reactive protein, NS：有意差なし (P>0.1).
(Yamamoto Y et al : Clin Sci (Lond) 103 : 137-142, 2002⁴³⁾の Table 5 を許可を得て転載)

第7表 30-65歳の日本人女性262名における、血清アディポネクチン濃度を従属変数としたステップワイズ重回帰分析

Variable	Standardized Regression Coefficient	F-value	P-value	Change in R ²
HDL-cholesterol	0.362	38.3	<0.001	15.8%
HOMA-IR	-0.165	7.9	<0.001	2.6%

R²=(0.429)²=18.4%

年齢, BMI, 空腹時血糖値, LDL-C, HDL-C, HOMA-IR を独立変数としてステップワイズ重回帰分析を行った。変数は採択された順に表示した。

(Yamamoto Y et al : Clin Sci (Lond) 103 : 137-142, 2002⁴³⁾の Table 6 を許可を得て転載)

第8表 30-65歳の日本人男性590名における、2000年および2002年の臨床指標および代謝指標

		In 2000 mean ± SD	In 2002 mean ± SD	P*
Body weight	(kg)	67.0 ± 8.5	67.6 ± 8.4	<0.0001
BMI	(kg/m ²)	23.2 ± 2.6	23.5 ± 2.5	<0.0001
Systolic blood pressure	(mm Hg)	125 ± 18	128 ± 20	<0.0001
Diastolic blood pressure	(mm Hg)	78 ± 12	80 ± 13	0.0022
Heart rate	(beats/min)	75 ± 13	76 ± 12	NS
Glucose	(mg/dl)	94 ± 14	97 ± 14	<0.0001
Insulin	(μU/ml)	5.54 ± 3.32	6.05 ± 4.10	0.0002
HOMA-IR	(-)	1.31 ± 0.88	1.48 ± 1.09	<0.0001
Total cholesterol	(mg/dl)	200 ± 30	209 ± 30	<0.0001
Triglycerides	(mg/dl)	119 ± 81	124 ± 85	NS
HDL-cholesterol	(mg/dl)	55 ± 13	57 ± 13	<0.0001
LDL-cholesterol	(mg/dl)	126 ± 28	125 ± 27	NS
Adiponectin	(μg/ml)	7.17 ± 4.52	6.60 ± 4.40	<0.0001

平均 ± 標準偏差. BMI : body mass index, NS : 有意差なし (P>0.1). *Wilcoxon signed-rank 検定
(Yamamoto Y : J Clin Endocrinol Metab 89 : 87-90, 2004⁴⁰)の Table 1 を許可を得て転載)

第9表 30-65歳の日本人男性590名における、ベースラインの血清アディポネクチン濃度と臨床指標および代謝指標の変化量との単回帰分析および重回帰分析

vs log [adiponectin]		Simple regression		Adjusted for baseline values		Adjusted for baseline values and change in BMI	
		r	P	r	P	r	P
Δ Body weight	(kg)	0.103	0.013	0.060	NS	-	-
Δ BMI	(kg/m ²)	0.096	0.020	0.034	NS	-	-
Δ Systolic blood pressure	(mm Hg)	0.033	NS	-0.011	NS	-0.019	NS
Δ Diastolic blood pressure	(mm Hg)	0.033	NS	-0.007	NS	-0.014	NS
Δ Heart rate	(beats/min)	0.023	NS	-0.004	NS	0.012	NS
Δ Glucose	(mg/dl)	-0.016	NS	-0.065	NS	-0.056	NS
Δ Insulin	(μU/ml)	-0.096	0.020	-0.165	<0.0001	-0.162	<0.0001
Δ HOMA-IR	(-)	-0.100	0.015	-0.153	0.0001	-0.140	0.0006
Δ Total cholesterol	(mg/dl)	-0.00004	NS	-0.019	NS	-0.040	NS
Δ Triglycerides	(mg/dl)	0.014	NS	-0.058	NS	-0.071	NS
Δ HDL-cholesterol	(mg/dl)	-0.092	0.025	-0.001	NS	0.022	NS
Δ LDL-cholesterol	(mg/dl)	0.032	NS	-0.026	NS	-0.042	NS

BMI : body mass index, NS : 有意差なし (P>0.1).

(Yamamoto Y : J Clin Endocrinol Metab 89 : 87-90, 2004⁴⁰)の Table 2 を許可を得て転載)

第10A表 30-65歳の日本人男性478名における、アディポネクチン遺伝子T45G多型と臨床指標および代謝指標との関係

Parameter	Adiponectin T45G genotype			P*
	T/T	T/G	G/G	
No. of subjects	248 (51.9%)	187 (39.1%)	43 (9.0%)	
Age (years)	48.6±9.6	47.9±9.3	49.4±9.8	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.4±2.5	23.1±2.6	23.3±3.3	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	127±19	123±18	122±19	0.0337
Diastolic blood pressure (mm Hg)	80±13	79±12	77±13	NS
Heart rate (beats/min)	75±12	74±12	75±14	NS
Glucose (mg/dl)	95±10	94±10	92±8	NS
Insulin (μU/ml)	5.3±3.0	5.5±3.9	6.4±4.8	NS
HOMA-IR (-)	1.24±0.73	3.26±0.93	1.47±1.20	NS
Adiponectin (μg/ml)	7.1±4.9	7.2±4.1	8.5±5.0	0.0722
Total cholesterol (mg/dl)	199±26	200±28	203±26	NS
Triglycerides (mg/dl)	123±76	129±121	119±64	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	54±13	54±12	58±15	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	125±27	126±27	126±26	NS
Uric acid (mg/dl)	6.3±1.2	6.2±1.1	6.2±1.3	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。*Kruskal-Wallis 検定

第10B表 30-65歳の日本人女性117名における、アディポネクチン遺伝子T45G多型と臨床指標および代謝指標との関係

Parameter	Adiponectin T45G genotype			P*
	T/T	T/G	G/G	
No. of subjects	54 (46.2%)	53 (45.3%)	10 (8.5%)	
Age (years)	45.4±8.9	47.6±8.5	45.0±9.5	NS
Body mass index (kg/m ²)	21.1±2.7	20.7±3.2	19.2±1.8	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	115±17	116±19	110±10	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	70±12	71±12	70±11	NS
Heart rate (beats/min)	73±11	73±8	77±10	NS
Glucose (mg/dl)	91±8	91±11	90±7	NS
Insulin (μU/ml)	4.9±2.4	4.4±2.2	3.3±1.6	NS
HOMA-IR (-)	1.11±0.61	1.02±0.57	0.74±0.37	NS
Adiponectin (μg/ml)	13.3±6.6	13.2±8.1	14.0±6.1	NS
Total cholesterol (mg/dl)	197±29	204±35	204±43	NS
Triglycerides (mg/dl)	64±26	77±38	72±33	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	68±13	67±15	73±18	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	116±26	121±31	116±31	NS
Uric acid (mg/dl)	4.4±1.0	4.6±1.0	4.3±0.8	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。*Kruskal-Wallis 検定

第11A表 30-65歳の日本人男性478名における、アディポネクチン遺伝子G276T多型と臨床指標および代謝指標との関係

Parameter	Adiponectin G276T genotype			P*
	G/G	G/T	T/T	
No. of subjects	234 (49.0%)	207 (43.3%)	37 (7.7%)	
Age (years)	48.5±9.3	48.0±9.7	49.3±9.7	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.3±2.6	23.1±2.7	23.9±2.6	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	124±19	125±18	131±19	0.0639
Diastolic blood pressure (mm Hg)	79±13	78±12	82±14	NS
Heart rate (beats/min)	75±13	75±11	76±11	NS
Glucose (mg/dl)	94±10	94±10	93±8	NS
Insulin (μU/ml)	5.5±3.7	5.4±3.5	5.6±3.7	NS
HOMA-IR (-)	1.29±0.88	1.26±0.84	1.31±0.92	NS
Adiponectin (μg/ml)	7.1±4.1	7.5±5.1	6.9±4.3	NS
Total cholesterol (mg/dl)	200±27	207±27	195±28	NS
Triglycerides (mg/dl)	128±97	120±95	132±86	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	54±13	55±13	55±13	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	126±26	126±27	120±26	NS
Uric acid (mg/dl)	6.3±1.2	6.2±1.2	6.4±1.3	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。*Kruskal-Wallis 検定

第11B表 30-65歳の日本人女性117名における、アディポネクチン遺伝子G276T多型と臨床指標および代謝指標との関係

Parameter	Adiponectin G276T genotype			P*
	G/G	G/T	T/T	
No. of subjects	57 (48.7%)	53 (45.3%)	7 (6.0%)	
Age (years)	47.3±8.8	45.5±8.7	44.9±10.0	NS
Body mass index (kg/m ²)	20.5±2.4	21.2±3.3	19.4±2.7	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	113±17	116±19	120±20	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	71±11	70±13	70±11	NS
Heart rate (beats/min)	74±8	73±11	73±12	NS
Glucose (mg/dl)	90±8	92±11	92±8	NS
Insulin (μU/ml)	4.6±2.3	4.5±2.2	4.7±2.9	NS
HOMA-IR (-)	1.04±0.58	1.04±0.60	1.05±0.64	NS
Adiponectin (μg/ml)	12.6±5.8	13.2±8.1	18.9±10.0	NS
Total cholesterol (mg/dl)	205±37	197±28	190±26	NS
Triglycerides (mg/dl)	77±37	63±27	56±18	0.0337
HDL cholesterol (mg/dl)	69±16	67±13	74±14	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	122±31	116±26	106±23	NS
Uric acid (mg/dl)	4.5±0.87	4.5±0.94	4.0±1.60	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。*Kruskal-Wallis 検定

第 12A 表 30-65 歳の日本人男性 478 名における、アディポネクチン遺伝子 A349G 多型と臨床指標および代謝指標との関係

Parameter	Adiponectin A349G genotype			P*
	A/A	A/G	G/G	
No. of subjects	253 (52.9%)	185 (38.7%)	40 (8.4%)	
Age (years)	48.5±9.6	48.2±9.3	49.2±9.6	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.4±2.5	23.1±2.6	23.4±3.3	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	127±19	123±18	122±18	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	80±13	79±12	77±12	NS
Heart rate (beats/min)	75±12	75±12	75±15	NS
Glucose (mg/dl)	95±10	94±10	92±7	NS
Insulin (μU/ml)	5.3±3.0	5.5±3.9	6.4±4.9	NS
HOMA-IR (-)	1.24±0.73	1.28±0.93	1.48±1.22	NS
Adiponectin (μg/ml)	7.1±4.9	7.2±4.1	8.4±5.1	NS
Total cholesterol (mg/dl)	199±26	200±28	202±26	NS
Triglycerides (mg/dl)	123±75	129±121	121±65	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	54±13	54±13	56±15	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	125±26	126±27	126±26	NS
Uric acid (mg/dl)	6.3±1.2	6.2±1.1	6.2±1.3	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。*Kruskal-Wallis 検定

第 12B 表 30-65 歳の日本人女性 117 名における、アディポネクチン遺伝子 A349G 多型と臨床指標および代謝指標との関係

Parameter	Adiponectin A349G genotype			P*
	A/A	A/G	G/G	
No. of subjects	60 (51.3%)	47 (40.2%)	10 (8.5%)	
Age (years)	45.4±8.8	47.7±8.6	45.0±9.5	NS
Body mass index (kg/m ²)	21.2±3.1	20.5±2.8	19.1±1.8	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	115±17	115±20	110±10	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	70±11	71±13	70±11	NS
Heart rate (beats/min)	74±11	72±8	77±10	NS
Glucose (mg/dl)	92±10	91±9	90±7	NS
Insulin (μU/ml)	4.8±2.3	4.4±2.3	3.3±1.6	NS
HOMA-IR (-)	1.10±0.61	1.01±0.58	0.74±0.37	NS
Adiponectin (μg/ml)	13.2±6.6	13.5±8.2	14.0±6.1	NS
Total cholesterol (mg/dl)	195±29	208±35	204±43	NS
Triglycerides (mg/dl)	63±25	80±40	72±33	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	68±13	67±15	73±18	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	114±26	124±31	116±31	NS
Uric acid (mg/dl)	4.5±1.0	4.5±1.0	4.3±0.8	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。*Kruskal-Wallis 検定

第13表 30-65歳の日本人男性478名における、PPAR γ 2遺伝子Pro12Ala多型と臨床指標および代謝指標との関係

Parameter	PPAR γ 2 Pro12Ala genotype		P*
	Pro/Pro	Pro/Ala	
No. of subjects	454 (95.0%)	24 (5.0%)	
Age (years)	48.5 \pm 9.4	45.8 \pm 10.6	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.2 \pm 2.6	23.7 \pm 3.7	NS
Glucose (mg/dl)	94.2 \pm 9.7	91.0 \pm 7.1	NS
Insulin (μ U/ml)	5.4 \pm 3.4	6.1 \pm 5.3	NS
HOMA-IR (-)	1.27 \pm 0.84	1.38 \pm 1.13	NS
Adiponectin (mg/dl)	7.3 \pm 4.6	5.5 \pm 3.0	0.038
Total cholesterol (mg/dl)	200 \pm 27.0	206 \pm 24.7	NS
Triglycerides (mg/dl)	124 \pm 95.8	134 \pm 76.6	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	54.4 \pm 13.3	51.0 \pm 9.2	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	125 \pm 26.7	133 \pm 23.4	0.075
Uric acid (mg/dl)	6.3 \pm 1.2	6.3 \pm 1.1	NS

平均 \pm 標準偏差. NS:有意差なし (P>0.1). *Mann-Whitney U検定 (Yamamoto Y et al: Metabolism 51: 1407-1409, 2002⁴⁵)のTable 1を許可を得て転載)

第14表 30-65歳の日本人女性117名における、PPAR γ 2遺伝子Pro12Ala多型と臨床指標および代謝指標との関係

Parameter	PPAR γ 2 Pro12Ala genotype		P*
	Pro/Pro	Pro/Ala	
No. of subjects	109 (93.2%)	8 (6.8%)	
Age (years)	46.5 \pm 8.9	44.1 \pm 6.1	NS
Body mass index (kg/m ²)	20.8 \pm 2.9	19.8 \pm 2.6	NS
Glucose (mg/dl)	90.9 \pm 9.3	91.9 \pm 7.0	NS
Insulin (μ U/ml)	4.5 \pm 2.3	4.5 \pm 1.9	NS
HOMA-IR (-)	1.04 \pm 0.58	1.04 \pm 0.53	NS
Adiponectin (mg/dl)	13.6 \pm 7.3	9.0 \pm 3.9	0.042
Total cholesterol (mg/dl)	202 \pm 33.3	188 \pm 26.5	NS
Triglycerides (mg/dl)	70.3 \pm 33.7	74.1 \pm 17.4	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	68.5 \pm 14.3	65.4 \pm 14.2	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	119 \pm 28.5	110 \pm 30.5	NS
Uric acid (mg/dl)	4.5 \pm 1.0	4.2 \pm 1.0	NS

平均 \pm 標準偏差. NS:有意差なし (P>0.1). *Mann-Whitney U検定 (Yamamoto Y et al: Metabolism 51: 1407-1409, 2002⁴⁵)のTable 2を許可を得て転載)

指標の変化量は各指標のベースラインの値と相関関係を示し、さらにいくつかの指標の変化量はBMIの変化量と相関したため、これらの相関関係をまずベースラインの値で補正し、さらにBMIの変化量でも補正して検討した。各指標のベースラインの値で補正した後も、ベ-

ースラインの血清アディポネクチン濃度は2年間のインスリンの変化量およびHOMA-IRの変化量と負の相関関係を示した。これらの相関関係は、さらにBMIの変化量で補正した後も有意であった。

3. アディポネクチン遺伝子多型および PPAR γ 2 遺伝子多型の検討

1) アディポネクチン遺伝子多型

アディポネクチン遺伝子の T45G 多型, G276T 多型および A349G 多型と臨床指標, 代謝指標との関係をそれぞれ第 10 表, 第 11 表および第 12 表に示した. いずれの多型も Hardy-Weinberg 平衡に合致していた. 多型間での血清アディポネクチン濃度の差は, 3 多型ともに認めなかった. アディポネクチン遺伝子 T45G 多型間で, 収縮期血圧の差が男性において認められた. また, アディポネクチン遺伝子 G276T 多型間で, 中性脂肪の差異が女性において認められた. その他は, 多型間による臨床指標, 代謝指標に差異を認めなかった.

2) PPAR γ 2 遺伝子 Pro12Ala 多型

PPAR γ 2 遺伝子 Pro12Ala 多型の Pro/Pro 型は男性 454 人 (95.0%), 女性 109 人 (93.2%), Pro/Ala 型は男性 24 人 (5.0%), 女性 8 人 (6.8%) で, Ala/Ala 型は今回の対象に認めなかった. BMI, 空腹時血糖, インスリン, 脂質代謝指標, 尿酸および HOMA-IR に多型間で差を認めなかった. Pro/Pro 型を有する群は Pro/Ala 型を有する群と比較して, 血清アディポネクチン濃度が男女ともに高値であった (第 13 表⁴⁵⁾, 第 14 表⁴⁶⁾).

考 察

アディポネクチンは脂肪細胞に特異的な分泌蛋白質であり, 当初は抗動脈硬化作用が報告された¹¹⁻¹⁴⁾. 本研究では, アディポネクチンとインスリン抵抗性, 高脂血症および高血圧症という動脈硬化の危険因子との関係を検討した. 断面的検討において, 血清アディポネクチン濃度はインスリン抵抗性指数である HOMA-IR と負の相関を示した. 脂質代謝面では, 血清アディポネクチン濃度が高い人は LDL-C および中性脂肪が低く, HDL-C が高いことが明らかとなった. BMI と血清アディポネクチン濃度は負の相関を示したが, BMI は HOMA-IR や脂質代謝指標とも相関関係にあったため, 血清アディポネクチン濃度と HOMA-IR および脂質代謝指標との関連を BMI で補正して検討したが, BMI で補正後もこれらの相関は有意であった. したがって, アディポネクチンは BMI とは独立してインスリン抵抗性および脂質代謝指標と関連があることが明らかになった. 一方, アディポネクチンと血圧や高感度 CRP (女性のみ) との関連は, 単相関では有意な相関関係を示したものの, BMI で補正すると相関関係は消失してしまったため,

間接的なものである可能性が考えられた. これらの検討は断面的検討であり, 血清アディポネクチン濃度が高くなるとインスリン抵抗性が改善し脂質代謝が良好になるのか, インスリン感受性や脂質代謝が良好であると血清アディポネクチン濃度が上昇するのかなどの因果関係は明らかにならなかった. 肥満・糖尿病モデル動物にアディポネクチンを投与すると, インスリン抵抗性が改善することが報告されている^{46), 47)}. ヒトにおいてもおそらく同様に, 血清アディポネクチン濃度が高くなるとインスリン感受性および脂質代謝が改善すると考えられたが, この点を検証するためにさらに縦断的検討を行った.

縦断研究の結果, ベースラインの血清アディポネクチン濃度はその後 2 年間の HOMA-IR の変化量と負の相関を示した. この相関関係は, 2 年間の BMI の変化量で補正した後も有意であった. 一方, ベースラインの血清アディポネクチン濃度と HDL-C の変化量や BMI の変化量とは単回帰分析では有意な相関関係にあったが, HDL-C および BMI それぞれのベースラインの値で補正後は相関関係が消失したため, ベースラインの血清アディポネクチン濃度と其後の脂質代謝や BMI の変化とは関連がないものと本研究では考えられた. ピマインディアンは, 糖尿病の有病率が 6 割以上という著しく高率な人種である. Stefan らは, 成人ピマインディアン 38 人を対象として, ベースラインのアディポネクチン濃度はベースラインのインスリン誘導性糖利用, 性別, 年齢, 観察期間および体脂肪量の変化量とは独立して, 平均 3 年後のインスリン誘導性糖利用と正の相関を示すことを報告した⁴⁸⁾. ピマインディアンの子供を対象とした検討では, 5 歳児のアディポネクチン濃度と其後の血清インスリン濃度の変化とは関連がなかったと報告されている⁴⁹⁾. ピマインディアン以外の人種では, アディポネクチンとインスリン抵抗性との関係を縦断的に検討した報告はなかった. アカゲザルでは, アディポネクチン濃度の低下とともにインスリン抵抗性が亢進することが報告されている⁵⁰⁾. 本研究では, ベースラインの血清アディポネクチン濃度は 2 年間の HOMA-IR の変化量と負の相関を示し, BMI の変化量で補正後も相関関係は有意であった. すなわち, 血清アディポネクチン濃度が高いと 2 年間でインスリン抵抗性が改善し, 逆に低いと 2 年後のインスリン抵抗性が悪化することが示された. この結果は, 肥満・2 型糖尿病の動物モデルにアディポネクチンを投与するとインスリン抵抗性が改善するという結果⁴⁷⁾や, アディポネクチンノックアウトマウスでインスリン抵抗性が悪化するとの報告^{51), 52)}と合致していた. そのメカニズムとして, アディポネクチンは筋細胞, 肝

細胞で 5'-AMP-activated protein kinase (以下 AMPK と略す) を活性化し, acetyl-coenzyme A carboxylase をリン酸化し, 脂肪酸を酸化することにより, 糖代謝およびインスリン感受性を調節していると報告された⁵³⁾. その後, 発現クローニング法により, 7 回膜貫通型のアディポネクチン受容体 (AdipoR1, AdipoR2) が同定された⁵⁴⁾. AdipoR1 は骨格筋に, AdipoR2 は肝臓に多く発現しており, small interfering RNA を用いた発現抑制実験などにより, AMPK の活性化を介し, 脂肪酸の酸化, 糖取り込み促進作用を伝達していることが示された⁵⁴⁾. ヒトにおいても同様なメカニズムが働いているか否かについては, 今後の研究が必要である.

脂質代謝に関しては, 断面的検討において血清アディポネクチン濃度が中性脂肪と負の相関を示し, HDL-C と正の相関を示すことが著者⁴³⁾を含め複数のグループから報告されている^{11), 55), 56)}. しかし, アディポネクチンと脂質代謝の関係に関しては詳細な動物実験やヒトを対象とした縦断研究はこれまで報告されておらず, 因果関係は明らかとなっていない。本研究の縦断的検討では, ベースラインの血清アディポネクチン濃度は 2 年間の脂質代謝指標の変化とは相関関係になかった。この結果からは, アディポネクチンは直接的には脂質代謝に影響を与えない可能性が考えられた。しかし, 本研究の断面的検討では, 血清アディポネクチン濃度は HDL-C と最も強い相関を示し, この相関関係はインスリン感受性とは独立しており, アディポネクチンが脂質代謝に直接関与していることも否定はできない。観察期間を変更して検討することにより, アディポネクチンはその後の脂質代謝に影響を与えるという結果が得られる可能性もある。上述の通り, アディポネクチンは AMPK を活性化する⁵³⁾. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (以下 AICAR と略す) は, AMPK の活性化物質として実験で用いられている⁵⁷⁾. AICAR を糖尿病モデル動物に投与すると, AMPK が活性化され, 耐糖能が改善する^{58), 59)}. 一方, AICAR が脂質代謝に及ぼす影響は報告により異なっている。すなわち, AICAR を糖尿病モデル動物に投与すると, 中性脂肪を低下させるという報告⁵⁸⁾と AICAR 投与により中性脂肪が増加するとの報告⁵⁹⁾がある。アディポネクチンが AMPK やほかの系を介して脂質代謝に与える影響に関しては, 今後も検討が必要である。

断面的検討では, 血清アディポネクチン濃度は体重および BMI と負の相関関係を示していた。2 ヶ月間のカロリー制限食や胃の縫縮術による体重減少により, 血清アディポネクチン濃度が上昇することが報告されてい

る^{11), 60)}. カロリー摂取が同量でも, 食物繊維の多い高炭水化物食ではアディポネクチン濃度が変化しないのに対して, 高脂肪食や食物繊維の少ない高炭水化物食ではアディポネクチン濃度は低下する⁶¹⁾. 本研究の縦断的検討では, ベースラインの血清アディポネクチン濃度は 2 年間の体重や BMI の変化に影響を与えなかった。この結果はビマインディアンを対象とした Vozarova らの報告⁶²⁾と合致しており, それ以外にヒトを対象とした縦断的検討は報告されていない。マウスにおいては, アディポネクチン投与により食事摂取量には影響を与えず, 脂肪酸酸化を亢進させて体重を減少させることが報告されている⁶³⁾. しかし, ヒトでは血清アディポネクチン濃度は脂肪酸酸化とは相関しないことが報告されている⁶⁴⁾. この差異がどのような要因により生じるかは不明であるが, 動物種, アディポネクチンの濃度 (薬理学的か生理学的か), 食事 (高脂肪かつ高蔗糖食か否か), 肥満度の違いなどによるのかもしれない。少なくともヒトにおいては, 体重減少によりアディポネクチン濃度は増加するが^{11), 60)}, アディポネクチンはその後の体重変化には影響を与えないようである。

アディポネクチンの断面研究および縦断研究により, アディポネクチンはインスリン抵抗性改善作用を有することが明らかとなった。また, アディポネクチンには抗動脈硬化作用も報告されている^{11), 65)}. フランス白人を対象としたゲノムワイドスクリーンにより, アディポネクチン遺伝子が存在する染色体 3q27 が糖尿病や耐糖能障害の感受性遺伝子座であることが示された⁶⁵⁾. また, 3q27 はメタボリックシンドロームと関連がある遺伝子座であることが報告された⁶⁶⁾. そこで, アディポネクチン遺伝子多型と血清アディポネクチン濃度および糖・脂質代謝指標との関連を調べた。本研究で調べたアディポネクチン遺伝子 T45G 多型, G276T 多型および A349G 多型は, いずれも多型間による血清アディポネクチン濃度の差異は認められなかった。また, 血糖, インスリンおよび HOMA-IR にも差異はみられなかった。日本の他施設から, アディポネクチン G276T 多型は多型間で HOMA-IR の差が認められ, 肥満者 (BMI > 26.7 kg/m²) でのみ多型間でアディポネクチン濃度の差異があると報告されたが⁶⁷⁾, 本研究とは結果が一致しなかった。T45G 多型^{67), 68)}および A349G 多型⁶⁷⁾に関しては, 血清アディポネクチン濃度とは関連がないことが他の施設からも報告されており, 著者の結果と一致した。本研究では, アディポネクチン遺伝子 T45G 多型で多型間による収縮期血圧の差が男性で認められ, また G276T 多型で多型間による中性脂肪の差異が女性で認められた。

しかし、男女で一致した結果は得られず、さらにアディポネクチン遺伝子多型間での血清アディポネクチン濃度には差異が認められなかったため、これらの有意差は第1種の過誤である可能性が高いと考えられた。

アディポネクチン濃度に影響を及ぼす遺伝因子に関してさらに検討を加えることとし、PPAR γ 2 Pro12Ala多型との関連を検討した。PPAR γ 2 Pro12Ala多型と糖・脂質代謝との関連は数多く報告されているが^{29, 36), 69), 70)}、アディポネクチンとの関係はこれまでに報告されていなかった。また、PPAR γ 2 Pro12Ala多型と脂質代謝については一定の結果が得られていない^{31), 32), 36), 69), 70)}。本研究では、多型間での脂質代謝の違いは認められなかった。また、多型間で空腹時血糖値にも違いがなく、これは今までの報告と一致していた^{29, 36), 69)}。PPAR γ 2 遺伝子の Ala12 保持者は空腹時インスリン値が低いとの報告もあるが³¹⁻³³⁾、関連がないとの報告^{30), 34-35), 69)}もあり、本研究でも多型による空腹時インスリン値の違いはみられなかった。また、Ala12 保持者はインスリン感受性が高いとの報告があるが³¹⁻³⁵⁾、本研究では多型間での HOMA-IR の差異はみられなかった。このような違いが生じる要因は不明であるが、著者の研究対象者が健常者であり、BMI が比較的低いため生じた可能性がある。なぜならば、日本人では過体重または肥満者においてのみ、PPAR γ 2 Pro12Ala 多型間でのインスリン抵抗性に差が認められた³²⁾からである。本研究では、PPAR γ 2 Pro12Ala 多型により糖・脂質代謝指標や HOMA-IR には差異を認めなかったが、PPAR γ 2 Ala12 保持者は血清アディポネクチン濃度が低いということを初めて示した。In vitro で、PPAR γ 2

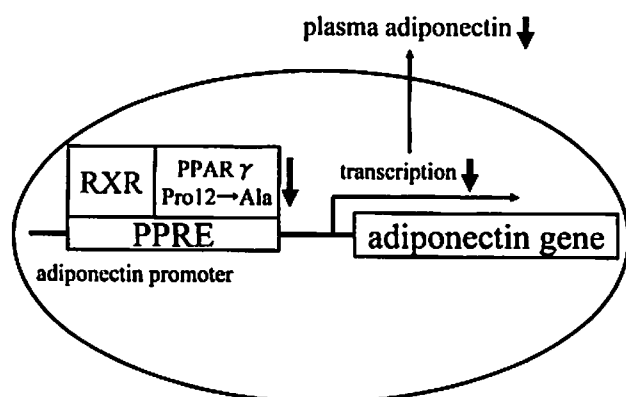
の Ala 変異体は PPAR γ 転写活性上昇作用が低下していること³¹⁾、アディポネクチンのプロモーター領域は PPRE を有すること⁷¹⁾、3T3-L1 脂肪細胞において PPAR γ リガンドがアディポネクチンのプロモーター活性を上昇させること¹⁵⁾、ヒトに PPAR γ のアゴニストであるチアゾリジン系薬剤を投与するとアディポネクチン濃度が上昇すること^{15), 16)}が報告されている。これらのことを考慮すると、PPAR γ 2 Ala 保持者はアディポネクチンのプロモーター活性が低下して、アディポネクチン遺伝子の転写が低下し、その結果として血清アディポネクチン濃度が低下したという機序が考えられた(第2図)。

以上より、アディポネクチンは糖・脂質代謝に深く関わっていること、およびインスリン抵抗性改善作用を有することが明らかとなった。アディポネクチンが脂質代謝改善作用を有するか否かに関しては、動物実験や観察期間を変えた縦断的臨床研究が今後必要であると考えられた。また、肥満という環境因子により血清アディポネクチン濃度は変化し、PPAR γ 2 遺伝子多型の検討から、遺伝因子によっても血清アディポネクチン濃度は規定されていることが明らかとなった。今後さらに、アディポネクチンと耐糖能異常・糖尿病、高脂血症、高血圧症、動脈硬化症などの関連を明らかにすることにより、アディポネクチンはこれらの疾患の有用な代謝マーカー、または新たな予防・治療薬になる可能性も考えられる。

総括

脂肪細胞特異的な分泌蛋白質であるアディポネクチンと、BMI、血圧および糖・脂質代謝指標との関連を断面的および縦断的に検討した。さらに、アディポネクチン遺伝子多型および PPAR γ 2 遺伝子多型と血清アディポネクチン濃度、BMI、血圧、糖・脂質代謝指標との関連を検討することにより、以下の結果を得た。

1. 断面的検討において、女性では男性より血清アディポネクチン濃度が有意に高値であり、脂肪細胞に特異的な分泌蛋白質であるにもかかわらず、血清アディポネクチン濃度は肥満者では低下していた。また、血清アディポネクチン濃度は収縮期血圧、拡張期血圧、空腹時血糖、インスリン、HOMA-IR、総コレステロール、中性脂肪、LDL-C および尿酸と負の相関を、HDL-C と正の相関関係を示した。血清アディポネクチン濃度とインスリン、HOMA-IR、中性脂肪、HDL-C、LDL-C および尿酸との相関関係は年齢、性別および BMI で補正した後も有意であった。



第2図 PPAR γ 2 遺伝子 Pro12Ala 多型の Ala 保持者における血清アディポネクチン濃度低下の機序の仮説

2. 縦断的検討において、ベースラインの血清アディポネクチン濃度は2年間のインスリンの変化量およびHOMA-IRの変化量と負の相関関係を示した。これらの相関関係は、各ベースラインの値およびBMIの変化量で補正した後も有意であった。ベースラインの血清アディポネクチン濃度は2年間のBMIまたは脂質代謝指標の変化には影響を与えないと考えられた。

3. アディポネクチン遺伝子 T45G 多型, G276T 多型および A349G 多型の検討で、多型間での血清アディポネクチン濃度の差異は認められなかった。PPAR γ 2 遺伝子 Pro12Ala 多型の検討では、Ala 保持者は血清アディポネクチン濃度が低いことを示し、遺伝因子により血清アディポネクチン濃度が規定されることが示唆された。

以上より、脂肪細胞特異的分泌蛋白質であるアディポネクチンは、肥満や遺伝的素因で低下しており、糖・脂質代謝と深く関わっていることが明らかとなった。肥満による糖・脂質代謝の異常にアディポネクチンの低下が関与している可能性が考えられた。

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、本研究を直接御指導くださり、論文の御校閲をいただきました慶應義塾大学保健管理センター広瀬寛講師に深謝いたします。さらに、御協力をいただきました慶應義塾大学医学部内科腎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)、第64回米国糖尿病学会(2002年、サンフランシスコ)、第23回日本肥満学会(2002年、京都)、第47回日本糖尿病学会年次学術集会(2004年、東京)において発表した。

本論文は Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Nishikai K, Saruta T : Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)* 103 : 137-142, 2002, Yamamoto Y, Hirose H, Miyashita K, Nishikai K, Saito I, Taniyama M, Tomita M, Saruta T : PPAR γ 2 gene Pro12Ala polymorphism may influence serum level of an adipocyte-derived protein, adiponectin, in the Japanese population. *Metabolism* 51 : 1407-1409, 2002 および Yamamoto Y, Hirose H,

Saito I, Nishikai K, Saruta T : Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance : two-year follow-up study in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 89 : 87-90, 2004 の一部を含む。

文 献

- 1) Reaven GM : Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37 : 1595-1607, 1988
- 2) Kaplan NM : The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 149 : 1514-1520, 1989
- 3) DeFronzo RA, Ferrannini E : Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14 : 173-194, 1991
- 4) Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S : Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism* 36 : 54-59, 1987
- 5) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM : Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372 : 425-432, 1994
- 6) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K : cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221 : 286-289, 1996
- 7) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoaka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y : Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257 : 79-83, 1999
- 8) Nakano Y, Tobe T, Choi Miura NH, Mazda T, Tomita M : Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 120 : 803-812, 1996
- 9) Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF : A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270 : 26746-26749, 1995
- 10) Hu E, Liang P, Spiegelman BM : AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271 : 10697-10703, 1996
- 11) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H,

- Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y : Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 1595-1599, 2000
- 12) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y : Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102 : 1296-1301, 2000
 - 13) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y : Novel modulator for endothelial adhesion molecules : adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100 : 2473-2476, 1999
 - 14) Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, Igura T, Inui Y, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Miyagawa J, Funahashi T, Matsuzawa Y : An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res* 32 : 47-50, 2000
 - 15) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y : PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50 : 2094-2099, 2001
 - 16) Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Oguma Y, Takei I, Saruta T : Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 51 : 314-317, 2002
 - 17) Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T : Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project : identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet* 47 : 605-610, 2002
 - 18) Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W : Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68 : 879-887, 1992
 - 19) Henry RR : Thiazolidinediones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 26 : 553-573, 1997
 - 20) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T : Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101 : 1354-1361, 1998
 - 21) Sigrist S, Bedoucha M, Boelsterli UA : Down-regulation by troglitazone of hepatic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 mRNA expression in a murine model of non-insulin-dependent diabetes. *Biochem Pharmacol* 60 : 67-75, 2000
 - 22) De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J : Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* 98 : 1004-1009, 1996
 - 23) Teboul L, Febbraio M, Gaillard D, Amri EZ, Silverstein R, Grimaldi PA : Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter : activation during adipose differentiation. *Biochem J* 360 : 305-312, 2001
 - 24) Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA : Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem* 274 : 3970-3977, 1999
 - 25) Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR : PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest* 101 : 22-32, 1998
 - 26) Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J : The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272 : 18779-18789, 1997
 - 27) Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM : Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79 : 1147-1156, 1994
 - 28) Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR : Molecular scanning of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians : identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 241 : 270-274, 1997
 - 29) Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR : Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 47 : 1806-1808, 1998
 - 30) Lei HH, Chen MH, Yang WS, Chiu MC, Chen MC, Tai TY, Chuang LM : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 Pro12Ala gene variant is strongly associated with larger body mass in the Taiwanese. *Metabolism* 49 : 1267-1270, 2000
 - 31) Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W,

- Auwerx J : A Pro12Ala substitution in PPAR gamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20 : 284-287, 1998
- 32) Hara K, Okada T, Tobe K, Yasuda K, Mori Y, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Kimura S, Ito C, Kadowaki T : The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 271 : 212-216, 2000
- 33) Koch M, Rett K, Maerker E, Volk A, Haist K, Deninger M, Renn W, Haring HU : The PPAR gamma2 amino acid polymorphism Pro 12 Ala is prevalent in offspring of Type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia* 42 : 758-762, 1999
- 34) Jacob S, Stumvoll M, Becker R, Koch M, Nielsen M, Loblein K, Maerker E, Volk A, Renn W, Balletshofer B, Machicao F, Rett K, Haring HU : The PPAR gamma2 polymorphism pro12Ala is associated with better insulin sensitivity in the offspring of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 32 : 413-416, 2000
- 35) Stumvoll M, Wahl HG, Loblein K, Becker R, Machicao F, Jacob S, Haring H : Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with increased antilipolytic insulin sensitivity. *Diabetes* 50 : 876-881, 2001
- 36) Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M : The Pro12→Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population : possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 50 : 891-894, 2001
- 37) Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES : The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26 : 76-80, 2000
- 38) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC : Homeostasis model assessment : insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28 : 412-419, 1985
- 39) Rudenski AS, Matthews DR, Levy JC, Turner RC : Understanding "insulin resistance" : both glucose resistance and insulin resistance are required to model human diabetes. *Metabolism* 40 : 908-917, 1991
- 40) 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
- 41) Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J : 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28 : 655-661, 2000
- 42) Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, Pesich R, Hebert J, Chen YD, Dzau VJ, Curb D, Olshen R, Risch N, Cox DR, Botstein D : High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 11 : 1262-1268, 2001
- 43) Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Nishikai K, Saruta T : Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)* 103 : 137-142, 2002
- 44) Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Nishikai K, Saruta T : Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance : two-year follow-up study in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 89 : 87-90, 2004
- 45) Yamamoto Y, Hirose H, Miyashita K, Nishikai K, Saito I, Taniyama M, Tomita M, Saruta T : PPAR (gamma) 2 gene Pro12Ala polymorphism may influence serum level of an adipocyte-derived protein, adiponectin, in the Japanese population. *Metabolism* 51 : 1407-1409, 2002
- 46) Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE : The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7 : 947-953, 2001
- 47) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T : The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7 : 941-946, 2001
- 48) Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA : Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 51 : 1884-1888, 2002
- 49) Stefan N, Bunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tataranni PA : Plasma adiponectin

- concentrations in children : relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 4652-4656, 2002
- 50) Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y : Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50 : 1126-1133, 2001
- 51) Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y : Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8 : 731-737, 2002
- 52) Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T : Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277 : 25863-25866, 2002
- 53) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T : Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8 : 1288-1295, 2002
- 54) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T : Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423 : 762-769, 2003
- 55) Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, Haap M, Shirkavand F, Rahe S, Staiger H, Maerker E, Haring H, Stumvoll M : Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 52 : 239-243, 2003
- 56) Matsubara M, Maruoka S, Katayose S : Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 2764-2769, 2002
- 57) Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG : 5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229 : 558-565, 1995
- 58) Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell RR 3rd, Young LH, Shulman GI : Effect of 5-aminimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on *in vivo* glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 50 : 1076-1082, 2001
- 59) Song XM, Fiedler M, Galuska D, Ryder JW, Fernstrom M, Chibalin AV, Wallberg Henriksson H, Zierath JR : 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic (ob/ob) mice. *Diabetologia* 45 : 56-65, 2002
- 60) Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM : Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86 : 3815-3819, 2001
- 61) Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di Palo C, Ciotola M, Barbieri M, Paolisso G, Giugliano D : Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 78 : 1135-1140, 2003
- 62) Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Krakoff J, Knowler WC, Funahashi T, Matsuzawa Y, Stumvoll M, Weyer C, Tataranni PA : Low plasma adiponectin concentrations do not predict weight gain in humans. *Diabetes* 51 : 2964-2967, 2002
- 63) Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF : Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 2005-2010, 2001
- 64) Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Ravussin E, Weyer C, Tataranni PA : Plasma adiponectin levels are not associated with fat oxidation in humans. *Obes Res* 10 : 1016-1020, 2002
- 65) Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, De Matos F, Durand E, Lepretre F, Lecoeur C, Gallina P, Zekiri L, Dina C, Froguel P : Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites : evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet* 67 : 1470-1480, 2000
- 66) Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K, James RG, Marks JA, Krakower GR, Jacob HJ, Weber J, Martin L, Blangero J, Comuzzie AG : Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 14478-14483, 2000
- 67) Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Kimura S, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T : Genetic variation in the gene encoding adiponectin is

- associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51 : 536-540, 2002
- 68) Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y : Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 : 861-868, 2000
- 69) Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Deeb SS, Amouyel P : Impact of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 : 195-199, 2000
- 70) Swarbrick MM, Chapman CM, McQuillan BM, Hung J, Thompson PL, Beilby JP : A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *Eur J Endocrinol* 144 : 277-282, 2001
- 71) Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I : Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52 : 1655-1663, 2003
-

学位論文

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 —

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

いり え じゅんいちろう
入 江 潤 一 郎

(平成 16 年 11 月 19 日受付)

Key Words : type 1 diabetes mellitus, antioxidant, 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る。最終的にインスリンの絶対的欠乏に陥ることが多く、インスリン依存状態にある典型例では、インスリン欠乏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代謝失調に至り致命的となる¹⁾。1 型糖尿病は、自己免疫による T リンパ球を介した膵 β 細胞の破壊が原因の多くとされ、生後 6 ヶ月頃から発症を認めるようになり、12 歳から 14 歳に発症率のピークをむかえる²⁾。絶対的なインスリン欠乏のため血糖管理が困難で、それに伴い合併症の出現頻度が高くなり、糖尿病発症後 30 年で約 20% の患者が末期腎不全に至ると報告されている³⁾。様々なインスリン製剤の開発により適切な血糖管理が可能となってきており、糖尿病性腎症や急性合併症による 1 型糖尿病患者の死亡は減少してきているが、それでも今なお生命予後は悪い⁴⁾。日常生活でのインスリン注射が生活の質 (Quality of life) を低下させ、また精神的苦痛を生じることが多い。若年で発症し罹病期間が長くなり、合併症を併発し社会的不都合を生じることが多く、1 型糖尿病の発症機転の解明およびそれに基づく発症予防や治療の開発は、きわめて重要な課題であると考えられる。

1 型糖尿病の発症に関わる膵 β 細胞の傷害には、酸化ストレスが関与していると考えられている。自己免疫 1 型糖尿病の優れた動物モデルである NOD マウスにおいて、膵 β 細胞傷害に酸化ストレスが重要な役割を担っていることが明らかにされ⁵⁾、各種の抗酸化薬が NOD マウスの膵 β 細胞傷害を抑制することが報告されている⁶⁾。現在ヒトにおいて、抗酸化薬を利用した 1 型糖尿病の予防が臨床試験されている¹⁰⁾。

抗酸化薬の一つ、システイン誘導体の N-acetyl-cysteine (以下 NAC と略す) は広く使用されているチオール含有薬であり¹¹⁾、慢性腎不全の患者に造影剤を用いた検査を行う場合に、同時に NAC を経口投与させることで造影剤による腎障害を軽減することや¹²⁾、血液透析を受けている患者に NAC を経口投与することで、その後の心筋梗塞などの心血管事故が減ることなど、臨床上有益な報告が多い¹³⁾。自己免疫糖尿病に関しては、NAC を若週令の NOD マウスに投与すると糖尿病発症が抑制されるとの報告があるが¹⁴⁾、NAC は免疫担当細胞にも影響し、T 細胞の増殖、IL-2 産生を促進すること¹⁵⁾、リンパ球の活性酸素産生を促進することが報告されており¹⁶⁾、NAC の投与が逆に自己免疫疾患を増悪させる可能性も考えられる。特に NOD マウスにおいては、若週令と糖尿病発症直前ではリンパ球の応答性が異なることが報告されており¹⁷⁾、投与する時期によっては NAC が細胞傷害性のリンパ球を増殖させ、膵 β 細胞破壊を助長させる可能性がある。NOD マウスでは、4 週令頃から 10 週令頃まで膵ランゲルハンス島周囲にリンパ球浸潤を認めるが、膵島の破壊には至らない時期があり (良性膵島炎期)、その後 18 週令頃から急激に膵島が破壊され (破壊性膵島炎期)、最終的に糖尿病にいたる。T ヘルパーリンパ球の応答が良性膵島炎期と破壊性膵島炎期で異なることが知られており¹⁷⁾、破壊性膵島炎期にある NOD マウスへの NAC の投与は糖尿病発症を促進すると予想される。

破壊性膵島炎期にある NOD マウスに対する NAC の投与の影響を明らかにするためには、確実に糖尿病を発症する均一な免疫学的背景を有するマウスを用いるのが

望ましい。NOD マウスは 12 週令頃から 30 週令頃までの間に雌性で 70-80%，雄性で 20-30%程度の個体が糖尿病を発症するが、どの個体が実際に糖尿病を発症するかを予知することは不可能である。そこで本研究では細胞移入の系を利用することとした^{18,20)}。すなわち、既に糖尿病を発症している NOD マウスよりリンパ球を得て、遺伝的背景は NOD マウスと同様でありながらリンパ球を欠く NOD-*scid/scid* (severe combined immunodeficiency, 以下 NOD-*scid* と略す) マウスをレシピエントとして細胞移入を行い、糖尿病を移入させる系を用いた。本実験系では NOD-*scid* レシピエントにドナーの NOD マウスの免疫学的状態を再現できることが知られており²¹⁾、破壊性膵島炎期にある NOD マウスと同じ免疫学的状態をレシピエントに再構築し、そのレシピエントに NAC を投与し、糖尿病発症への影響を検討することで、破壊性膵島炎期にある NOD マウスに対する NAC の影響を明らかにすることとした²²⁾。

対象と方法

1. 動物

5-10 週令の雌性 NOD マウス、NOD-*scid* マウスを日本クレア (東京) より購入し、慶應義塾大学医学部動物実験センター内にて特定病原体非感染 (specific pathogen-free; SPF) 環境下にて飼育した。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。また、本実験は本学医学部動物実験委員会の承認を得た (承認番号 034002)。糖尿病の発症の診断には、隔日にテストテープ (Eli Lilly 社, 米国) を用いて尿糖を検査し、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た。血糖値が 250 mg/dl 以上の時に糖尿病の発症と判定した。

2. 脾細胞の調整と細胞移入および腹腔浸出細胞の採取

各マウスより脾臓を無菌的に摘出し、ナイロン・メッシュ (Becton Dickinson 社, 米国) にて細胞分散し、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 の蒸留水に溶解して作成した液を用いて赤血球を溶血させ、その後リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; 以下 PBS と略す) で 3 回洗浄した。細胞移入には、糖尿病発症後の雌性 NOD マウス (16-32 週令, 血糖値 250 mg/dl 以上) の脾細胞を調整し、 2×10^6 個ずつ雌性 NOD-*scid* マウスの腹腔内へ注射し移入した。

腹腔浸出細胞の採取は屠殺直後に脾臓や膵臓の摘出に先じて 5 ml の PBS で腹腔内を無菌的に洗浄回収し、この洗浄液中に含まれる細胞のすべてを腹腔浸出細胞 (peritoneal exudate cells (以下 PEC と略す)) とした。

3. N-acetyl-cysteine の投与

N-acetyl-cysteine (Sigma 社, 米国) を蒸留水に溶解し 1 mg/ml の濃度として給水瓶へ入れ、NAC 投与群の NOD-*scid* マウスに経口投与した。コントロール群へは蒸留水を単独に与えた。

4. 組織学的検討

脾細胞移入後 14 日経過した NOD-*scid* マウスより膵臓を採取し、10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。150 μm の間隔をあけた非連続切片にてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作成し、個々の膵島炎の程度 (膵島への炎症細胞浸潤) を以下のようにスコア化した。1 膵臓あたり 40 個以上の膵島を観察して、平均スコアにより膵島炎の程度を評価した。

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。

5. 免疫組織学的検討

脾細胞移入後 14 日経過した NOD-*scid* マウスより膵臓を採取し、OCT コンパウンド (サクラファインテック, 東京) に包埋し液体窒素で凍結した。10 μm の厚みで薄切してスライドガラスに添付し、冷アセトンで 10 分間固定した。PBS で 2 回洗浄後、1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; 以下 BSA と略す) (Sigma 社, 米国)-PBS 溶液で 1 時間処理し、fluorescein isothiocyanate (以下 FITC と略す) 標識抗マウス CD8 抗体, phycoerythrin (以下 PE) 標識抗マウス CD4 抗体 (Pharmingen 社, 米国) を 1% BSA-PBS 溶液で溶解し標本に添加した。1 時間染色し PBS で洗浄した後、封入薬を乗せカバーガラスを乗せ、蛍光顕微鏡で観察した (オリンパス, 東京)。

6. 細胞の純化と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

CD4 陽性または CD8 陽性の脾細胞を純化するために、磁気細胞分離システム MiniMACS system (Miltenyi Biotech 社, ドイツ) を用いた。脾細胞浮遊液に磁性マ

イクロビーズの付着した抗CD4抗体または抗CD8抗体を加え、15分間静置し0.5%BSA-PBSで洗浄した後、磁気カラム (Miltenyi Biotech社, ドイツ) でCD4陽性またはCD8陽性細胞を分離した。この細胞浮遊液をベニシリン/ストレプトマイシン添加した2%仔牛胎児血清 (Fetal Calf Serum; 以下FCSと略す) (JRH Bioscience社, 米国) を含むRPMI1640 (GibcoBRL社, 米国) (以下2%FCS-RPMI1640と略す) に浮遊させた。0.5×10⁶個/250 μlに調整し、96穴マイクロプレート (Corning社, 米国) の各ウェルに加えた。CD4陽性またはCD8陽性脾細胞の刺激には、抗CD3抗体 (clone 145-2C11) (Pharmingen社, 米国) でコートしたマイクロプレートに、抗CD28抗体 (clone 37.51) (Pharmingen社, 米国) の最終濃度が1 μg/mlになるように添加し刺激をした。未純化脾細胞の刺激には抗CD3抗体 (Pharmingen社, 米国) が最終濃度5 μg/mlになるように添加した。コントロールのウェルには培養液のみを加えた。5%CO₂・37℃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℃にて凍結保存した。

7. フローサイトメーターによるリンパ球上発現マーカーおよび腹腔浸出細胞内グルタチオンレベルの検討

脾細胞浮遊液を5 ml ポリスチレンチューブ (Becton Dickinson社, 米国) に移し、サンプルを0.1%BSA-PBSで2回洗浄し、FITC標識抗マウスT細胞受容体抗体 (clone H57-597) およびPE標識抗マウスCD4抗体 (clone GK1.5) またはCD8抗体 (clone 53-6.7) を加え冷所で20分間静置した。続いてサンプルを0.1%BSA-PBSで洗浄してフローサイトメーター (EPICS XL, Coulter社, 米国) でリンパ球ゲート内の陽性細胞数を分析した。

腹腔内を洗浄し回収した腹腔浸出細胞は、PBSで希釈したmonochlorobimane (以下MBCIと略す) (Clontech, アメリカ) と混じて最終濃度40 μmol/lとし、室温下で5分間静置した。その後直ちにフローサイトメーター (EPICS ALTRA, Coulter社, 米国) を用いて、20 mWの紫外線を照射下でのグルタチオン-MBCIによる蛍光を測定した。

8. ELISA法によるサイトカインの測定

上清中のサイトカインの計測にはenzyme-linked immunosorbent assay (以下ELISAと略す) 法を用いた。すなわち、平底の96穴プレートに各種抗マウスサイトカイン抗体 (抗インターフェロン (interferon;

以下IFNと略す)-γ (clone R4-6A2), 抗インターロイキン (interleukin; 以下ILと略す)-2 (JES6-1A12), 抗IL-4 (BVD4-1D11) 抗体 (Pharmingen社, 米国) をPBSに溶解し、4℃で一夜静置してコーティングし、翌日、採取された上清もしくは各サイトカインの標準溶液 (組換えマウスIFN-γ, IL-4, IL-2, Pharmingen社, 米国) を加えて2時間室温で静置した。0.1%Tween 20 (BioRad社, 米国) を加えたPBS (以下0.1% Tween20-PBSと略す) で洗浄した後、ビオチン化した各種抗マウスサイトカイン抗体 (抗IFN-γ (XMG1.2), 抗IL-2 (JES6-5H4), 抗IL-4 (BVD6-24G) 抗体, Pharmingen社, 米国) 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、アビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ (Vector Laboratories社, 米国) を加え30分間静置した。最後に発色試薬3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (Sigma社, 米国) および0.5Mの硫酸水溶液を加え、ELISAリーダー (BioRad社, 米国) にて吸光度 (A₄₅₀) を測定して各サイトカインを検出した。本研究では検体をすべて二重に計測し、スタンダード検体より得られたスタンダードカーブより各種サイトカインの濃度を求めた。

9. 脾局所における各種サイトカインの半定量的リアルタイムPCR分析

マウスの脾臓からのRNAの抽出はAcid Guanidinium-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ェナイズし、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。DNaseI (キアゲン, 東京) を用いてゲノムDNAの分解処理を行った。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, 大津) にてPolymerase Chain Reaction (PCR) を行った。IFN-γ, IL-4, IL-1β, IL-2, Tumor necrosis factor-α (以下TNF-αと略す), FASおよびglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下GAPDHと略す) (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

第1表 半定量的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-1 β	5'-CAACCAACAAGT GATATTCTCCATG-3'	5'-GATCCACACTCT CCAGCTGCA-3'	5'-CTGTGTAATGAAAG ACGGCACACCCACC-3'
IL-2	5'-CCTGAGCAGGAT GGAGAATTACA-3'	5'-TCCAGAACATGC CGCAGAG-3'	5'-CCCAAGCAGGCCA CAGAATTGAAAG-3'
TNF- α	5'-TCCAGGCGGTGC CTATGT-3'	5'-GAGCGTGGTGG CCCCT-3'	5'-TCAGCTCTTCTCA TTCCTGCTTGTGG-3'
FAS	5'-GGAGGGCAAGAT AGATGAGATCA-3'	5'-ATGCATCACTCT TCCCATGAGA-3'	5'-AGTCCAGCTGCTCC TGTGCTGGTA-3'
GAPDH	5'-ACTGGCATGGCC TTCCG-3'	5'-CAGGCGGCACG TCAGATC-3'	5'-TTCTACCCCCCAA TGTGTCCGTCGT-3'

リアルタイム PCR 法にて半定量的に測定した²³⁾。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、米国) を用いて行った。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 GAPDH 産物に対する相対的な量として算出した。

10. 統計処理

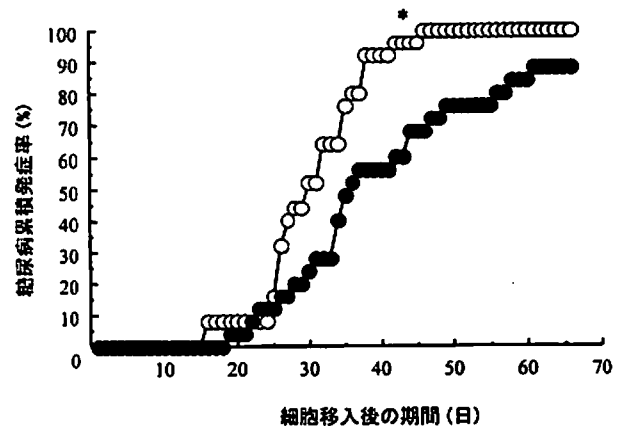
結果はすべて平均値±標準誤差で表示した。糖尿病累積発症率の比較には log-rank 検定を行った。膵島炎スコア、サイトカイン産生量、mRNA 発現レベルの比較は、Mann-Whitney U 検定で解析した。CD8 陽性膵島の割合の比較では Fisher 検定を用いた。p 値<0.05 を

統計学的に有意差があると判定した。

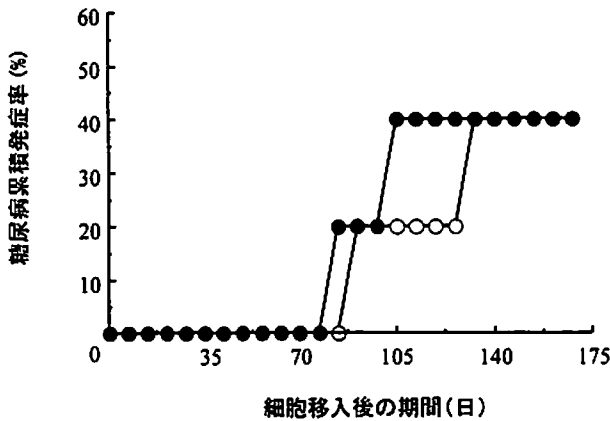
結 果

1. NAC の投与が糖尿病発症に与える影響

NAC の投与が NOD マウスの糖尿病発症に与える影響を評価するため、糖尿病発症後の NOD マウスの脾細胞を NOD-scid レシピエントに移入し、レシピエントに



第1図：糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞を移入後の NOD-scid レシピエントにおける累積糖尿病発症率
糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞を移入後の NOD-scid レシピエントのうち NAC 投与群 (n=25, 白丸) には NAC を経口投与した。一方対照群 (n=25, 黒丸) には蒸留水を与えた。(*p<0.002, log-rank 検定) (Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 1 を許可を得て転載)



第2図：8週令糖尿病未発症NODマウスの脾細胞を移入後のNOD-scidレシピエントにおける累積糖尿病発症率
糖尿病未発症NODマウス（8週令）の脾細胞を移入後のNOD-scidレシピエントのうちNAC投与群（n=5, 白丸）にはNACを経口投与した。対照群（n=5, 黒丸）には蒸留水を与えた。

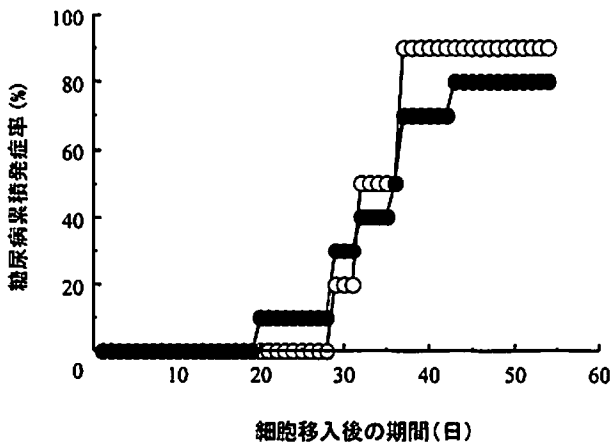
NACまたは蒸留水を与えた。NAC投与群にはNACを細胞移入直後より飲水に溶解して投与し、対照群には蒸留水を与えた。NAC投与群のNOD-scidレシピエントの糖尿病発症は対照群に比し有意に促進された（各群n=25；p<0.002：log-rank検定，第1図）。一方、ドナーとして8週令の糖尿病未発症NODマウスを用いた場合は、NACによる糖尿病移入の促進は認められなかった（第2図）。

2. NACの投与がNOD-scidレシピエントの膵β細胞に与える影響

次にNACの投与がNOD-scidレシピエントの膵β細胞に直接的に影響するか否かを検討した。レシピエントに細胞移入を行う4週前から直前まで、NAC投与群にはNACを投与し、その後糖尿病発症NODマウスの脾細胞を移入し、NACの投与を中止した。対照群には本期間蒸留水を与えた。細胞移入前のNACの投与では、NACによる糖尿病移入の促進や抑制は認められなかった（第3図）。

3. NAC投与がリンパ球による膵β細胞破壊に与える影響

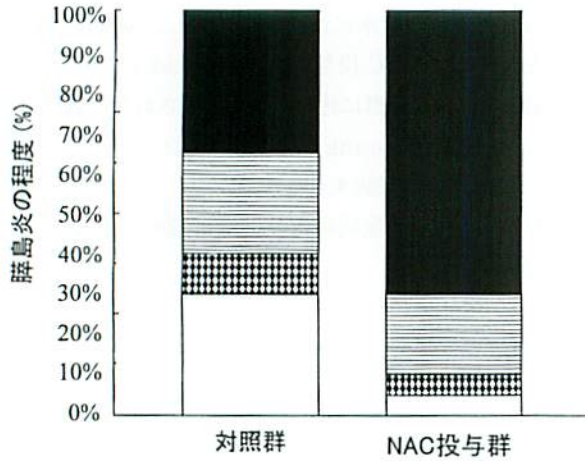
NAC投与による糖尿病移入促進の機序を明らかにするため、脾細胞を移入しその後NACを与えたNAC投与群、および対照群のNOD-scidレシピエントの膵臓を、細胞移入後14日目に検討した。両群のランゲルハンス島にはともにリンパ球浸潤が認められたが、膵島炎スコアはNAC投与群で対照群に比し有意に高値であった（膵島炎平均値：NAC投与群2.56；対照群1.69，p=0.025，Mann-Whitney U検定，第4図）。免疫組織学的な検討では、NAC投与群の浸潤リンパ球はCD8陽性細胞が多く（第5図）、CD8陽性細胞が各ランゲルハンス島の50%以上を占めるものをCD8陽性膵島と定義すると、NAC投与群では60.1%がCD8陽性膵島であるが、対照群では4.8%がCD8陽性膵島であり、CD8陽性膵島の割合はNAC群で対照群に比し有意に高値であった（p<0.001，Fisher検定）。



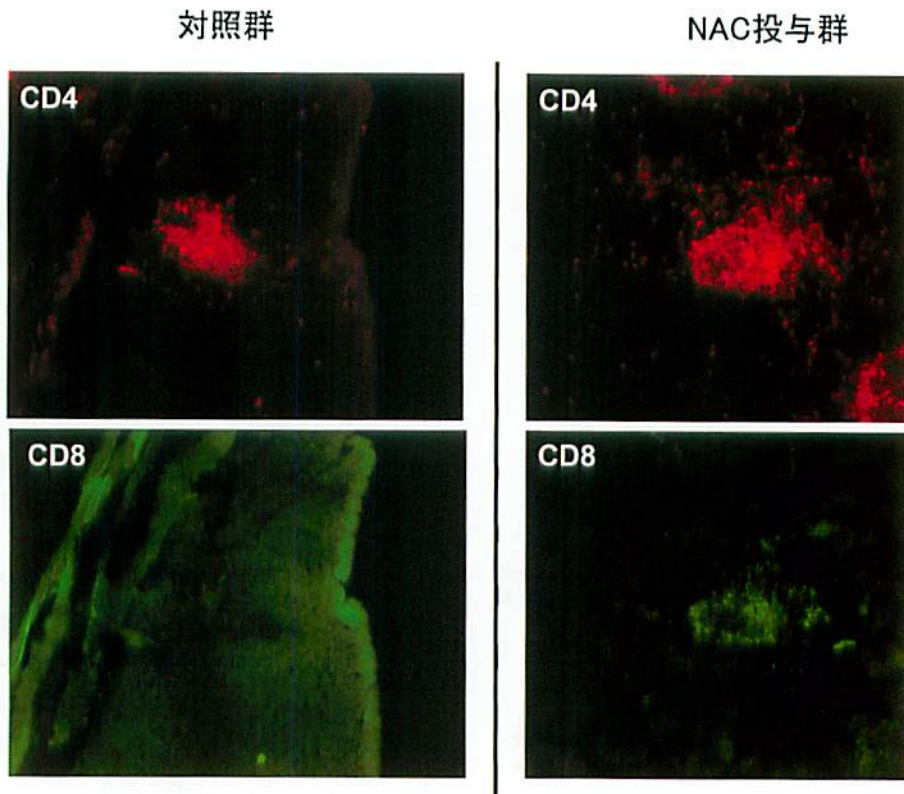
第3図：細胞移入前にNACを投与され、その後脾細胞を移入されたNOD-scidレシピエントにおける累積糖尿病発症率
NOD-scidレシピエントに細胞移入4週前から細胞移入直前までNACを投与し（NAC投与群；n=10, 白丸）、その後糖尿病発症NODマウスの脾細胞を移入した。対照群（n=10, 黒丸）には同時期に蒸留水を与えた。（Irie J et al：Diabetologia 47：1803-1809, 2004のFig. 2を許可を得て転載）

4. NACの投与が膵β細胞におけるサイトカイン産生に与える影響

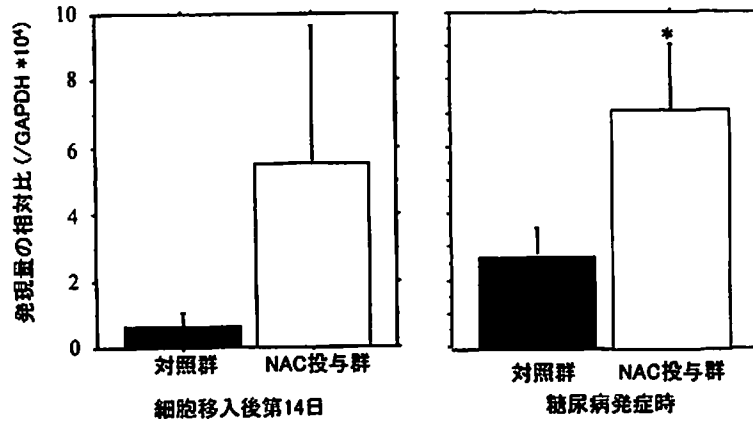
NAC投与による膵β細胞破壊促進の機序を明らかにするため、NAC投与群および対照群のNOD-scidレシピエントの膵臓のサイトカインメッセンジャーRNA量を、細胞移入後14日目およびレシピエントの糖尿病発症時に検討した。IFN-γの産生量は、細胞移入後14日



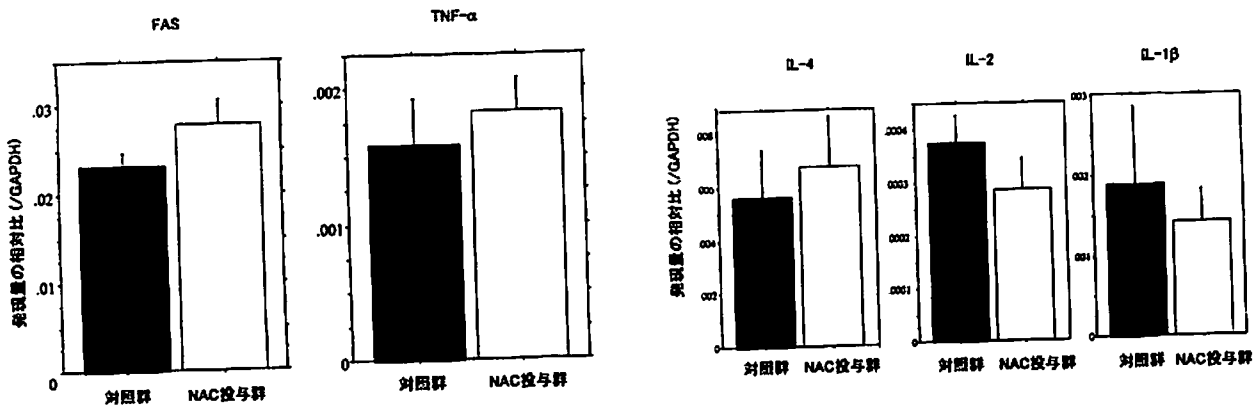
第4図：糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目の NOD-scid レシピエントにおける膵島炎スコア
 糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞を移入後の NOD-scid レシピエントのうち NAC 投与群には NAC を経口投与し、対照群には蒸留水を与えた。移入後 14 日目に膵臓を摘出しヘマトキシリン-エオジン染色し、膵島へのリンパ球浸潤の程度を膵島炎スコアで評価した。グレード 0 (白)、グレード 1 (ダイヤモンド)、グレード 2 (実線)、グレード 3 (黒)。(p=0.025, Mann-Whitney U 検定) (Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 3 を許可を得て転載)



第5図：糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目の NOD-scid レシピエントの膵島における免疫組織染色像
 糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目の NAC 投与群および対照群の膵臓を CD4 陽性細胞 (赤色)、もしくは CD8 陽性細胞 (緑色) にて染色した。各群とも連続切片における染色像を示す。(Irie J et al : Diabetologia 47 : 1803-1809, 2004 の Fig. 4 を許可を得て転載)



第6図：糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目および糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの脾臓における IFN- γ mRNA 発現量
 糖尿病発症 NOD マウスの脾細胞移入後 14 日目および糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの脾臓における IFN- γ mRNA 発現量を半定量 PCR 法にて測定した。発現量は GAPDH に対する相対比で示す (* $p=0.004$, Mann-Whitney U 検定)。(Irie J et al: Diabetologia 47: 1803-1809, 2004 の Fig. 5 を許可を得て転載)



第7図：糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの脾臓における FAS および TNF- α mRNA 発現量
 糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの脾臓における FAS および TNF- α mRNA 発現量を半定量 PCR 法にて測定した。発現量は GAPDH に対する相対比で示す。

第8図：糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの脾臓における IL-4, IL-2 および IL-1 β mRNA 発現量
 糖尿病発症時の NOD-scid レシピエントの脾臓における IL-4, IL-2 および IL-1 β mRNA 発現量を半定量 PCR 法にて測定した。発現量は GAPDH に対する相対比で示す。

目で NAC 投与群では対照群に比し高い傾向を認め、糖尿病発症時には NAC 投与群で対照群に比し有意に高値であった (NAC 投与群 $7.7 \pm 1.4 \times 10^4$; 対照群 $3.4 \pm 0.7 \times 10^4$ 対 GAPDH 比, $p=0.004$, Mann-Whitney U 検定, 第6図)。FAS および TNF- α は NAC 投与群において高い傾向を認めたが (第7図), IL-4, IL-2, IL-1 β では差を認めなかった (第8図)。

5. NAC の投与が NOD-scid レシピエントでのリンパ球の構築, サイトカイン産生に与える影響

NOD-scid レシピエントでの移入されたリンパ球の構築, サイトカイン産生に対する NAC 投与の影響を評価するため, NAC 投与群および対照群の NOD-scid レシピエントの脾臓を, 細胞移入後 14 日目ならびにレシピエントの糖尿病発症時に検討した。細胞移入後 14 日目では CD4 陽性 T 細胞受容体陽性細胞数, CD8 陽性 T

ており¹⁶⁾、NACの投与が逆に自己免疫疾患を増悪させる可能性も予想された。

本研究で著者は、糖尿病を発症し細胞傷害性のリンパ球を有しているNODマウスの脾細胞をNOD-scidレシピエントへ移入し、糖尿病を移入させる系を用いて、NACが自己免疫糖尿病を促進することを明らかにした²²⁾。細胞移入にて病態を移入する系は、免疫担当細胞の*in vivo*における役割を検討する時に用いられるが¹⁸⁾、²⁰⁾、NODマウスの糖尿病移入の系においては移入する細胞数、移入する細胞を採取するドナーの週令に糖尿病移入の可否は影響される。実際本研究においても、8週令のNODマウスから得た脾細胞を移入されたNOD-scidレシピエントにおいては、糖尿病移入に要した期間は糖尿病発症後のマウスをドナーに用いた場合に比し長くなり、またレシピエントの糖尿病累積発症率は低くなった(第2図)。これは著者の以前の報告とも一致した²⁶⁾。本研究ではドナー側のNODマウスの条件を均一化するため、明らかに細胞傷害性のリンパ球が存在し活性化されていると考えられる糖尿病発症後のNODマウスをドナーに用いた。実際にこのドナーを用いた場合の対照群のNOD-scidレシピエントへの糖尿病移入に要した時間、移入率は同じ細胞数を移入した他者の報告と一致しており²⁷⁾、よってNACが糖尿病移入を促進するとする本研究の結果を支持するものと考えられた。

著者はNACが糖尿病移入を促進する機序を解明すべく、免疫応答の目標となる膵局所、ならびに末梢として脾細胞を検討した。NACの投与によりレシピエントの糖尿病発症時には、膵局所と末梢の両所のリンパ球のサイトカインプロファイルにIFN- γ 産生の増強が認められた。しかし細胞移入後14日目では末梢でのリンパ球の構築、サイトカインプロファイルには差を認めないにも関わらず膵島のリンパ球浸潤は増悪しており、これは特異的に膵局所でリンパ球の集積、増殖をNACが促進したことを示唆していると考えられた。NACの投与が*in vivo*において膵島自己反応性T細胞の増殖を膵局所で促し、膵島の破壊を増悪させたと解釈しうる所見である。糖尿病発症後のNODマウスより得た脾CD4陽性細胞の*in vitro*での刺激によるIL-2産生がNACの添加にて増強されたことや、NAC群の膵島にCD8陽性細胞浸潤が有意に多く見られたことは、この可能性を支持するものと考えられた。またCD8陽性リンパ球に対してNACが腫瘍細胞やウイルスに対する傷害性を増強するとする他者の報告とも一致した²⁸⁾、²⁹⁾。

Tヘルパーリンパ球の機能、特にT-helper cell type 1/T-helper cell type 2(以下Th1/Th2と略す)バラ

ンスについては、NACが抗原提示細胞の細胞内グルタチオン量を増加し、Th1タイプの応答を誘導する、との報告が*in vivo*および*in vitro*でなされている³⁰⁾。一方で*in vitro*でBALB/cマウスの脾細胞のサイトカインプロファイルがNACの添加でTh2タイプとなるとの報告もあり、一致した意見を見ていない³¹⁾。本研究では、*in vivo*と*in vitro*の両方でNACの投与がNODマウスではTh1タイプの応答を誘導することを示した。糖尿病発症後のNODマウスはTh1タイプの応答を示し、BALB/cマウスはTh2タイプの応答を示す傾向にあることが報告されており¹⁷⁾、NACのTh1/Th2バランスに対する影響は、遺伝的背景に規定されているサイトカイン応答パターンを増強している可能性が考えられる。NODマウスでは、良性膵島炎期にはTヘルパーリンパ球はTh2タイプの応答を示し、その後の破壊性膵島炎期にはTh1タイプ応答期が誘導されるとされている¹⁷⁾。それゆえ、NAC投与の効果は投与する時期に依存すると予測され、著者の検討では、NACによる糖尿病移入の促進は糖尿病未発症NODマウスの脾細胞を移入した際には認められなかった。これはその時期のNODマウスが良性膵島炎期にあり、Tリンパ球応答がTh1タイプに偏移していなかったためと考えられた。

また以前著者は本研究と同様の移入の系を用いて、NODマウスの腹腔浸出細胞の細胞内グルタチオン量がNODマウスの膵 β 細胞への自己免疫応答の程度を反映することを報告した²⁶⁾。本研究でも同様に腹腔浸出細胞の細胞内グルタチオン量を検討したところ、NAC投与群では対照群に比し細胞内グルタチオン含有量が多い細胞が増加していることを見出した。これはグルタチオン含有量が多いマクロファージがTh1タイプの応答を誘導するとする報告と一致する¹⁴⁾、³⁰⁾。またグルタチオン含有量が多いマクロファージにおいては一酸化窒素やIFN- γ の産生量が多い、との報告と併せて考えると¹⁴⁾、NACの投与が膵局所でマクロファージへのシステインの供与となり、細胞傷害性を増強した可能性も考えられる。その他にもシステインの供給がメチオニンの合成を促進し、Sアデノシルメチオニン経路を活性化しDNAのメチル化に影響し細胞機能の変化をもたらした可能性もある³²⁾。

結論として、著者は1型糖尿病モデルマウスにおいてNACの投与が疾患を増悪させる可能性を示した。NACの投与は非特異的にシスチンやシステインを活性化されたリンパ球やマクロファージに供給し、膵 β 細胞に対する細胞性免疫応答を増悪させると考えられる。近年ヒトの2型糖尿病と思われる患者の中にも、1型糖尿病患

者に認められる自己抗体抗グルタミン酸脱炭酸酵素 glutamic acid decarboxylase 抗体を有し、脾β細胞にリンパ球浸潤を認め³⁰⁾、徐々に脾β細胞機能が低下する緩徐進行1型糖尿病が存在することが報告されており³⁰⁾、通常の典型的1型糖尿病患者のみならず、これらの緩徐進行1型糖尿病患者へのNACの投与は病態を悪化させる可能性がある。NACは広く使用されている薬剤で有益な効果も多く報告されているが、NACの投与時には自己免疫疾患患者の病態を悪化させる可能性も念頭に置く必要があると考えられた。

総 括

1型糖尿病において抗酸化薬 N-acetyl-cysteine (NAC) の影響を検討する目的で、糖尿病を発症した NOD マウス (1型糖尿病モデル動物) の脾細胞を NOD-scid マウス (レシピエント) へ移入し、さらにレシピエントへNACを投与してその影響を検討した。

1. NACの投与はレシピエントへの糖尿病移入を有意に促進した。しかし細胞移入前のNACの投与のみでは同様の効果は認めなかった。

2. 細胞移入後14日目の時点で、NACの投与はリンパ球の脾β細胞浸潤を増悪させた。特にCD8陽性細胞の浸潤が増強されていた。

3. 細胞移入後14日目の時点で、NACの投与は脾臓でのIFN-γのmRNA発現量を増加させた。さらにレシピエントの糖尿病発症時には、NACの投与は脾臓でのIFN-γのmRNA発現量を有意に増加させた。

4. 細胞移入後14日目の時点で、NACの投与はレシピエントの脾臓でのCD4、CD8陽性細胞数に影響を与えなかった。ま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にも影響を与えなかった。

5. レシピエントの糖尿病発症時には、NACの投与はレシピエントの脾細胞の抗CD3抗体刺激によるIFN-γ、IL-2産生量を有意に増加させた。

6. 糖尿病発症NODマウスの脾細胞より得たCD4、CD8陽性リンパ球を抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激し、NACを添加したところ、IFN-γ、IL-2産生量が有意に増加した。

以上より、NACはリンパ球機能に影響することにより1型糖尿病の病期を進行させる可能性が示唆された。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に関して直接ご指導、ご

校閲を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。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46回日本糖尿病学会年次学術集会(2003年、富山)にて発表した。

本論文は Irie J, Shimada A, Oikawa Y, Shigihara T, Saruta T : N-acetyl-cysteine accelerates transfer of diabetes into non-obese diabetic scid mice. *Diabetologia* 47 : 1803-1809, 2004 の一部を含む。

文 献

- 1) 葛谷健, 中川昌一, 佐藤譲, 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) Melton LJ III, Palumbo PJ, Chu CP : Incidence of diabetes mellitus by clinical type. *Diabetes care* 6 : 75-86, 1983
- 3) Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR : Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* 317 : 1390-1398, 1987
- 4) 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
- 5) Mathis D, Vence L, Benoist C : β-cell death during progression to diabetes. *Nature* 414 : 792-798, 2001
- 6) Nomikos IN, Wang Y, Lafferty KJ : Involvement of O₂ radicals in "autoimmune" diabetes. *Immunol Cell Biol* 67 : 85-87, 1989
- 7) Corbett JA, Mikhael A, Shimizu J, Frederick K, Misko TP, McDaniel ML, Kanagawa O, Unanue ER : Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice : Aminoguanidine-sensitive and resistant stages in the immunological diabetic process. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 8992-8995, 1993
- 8) Fukuda M, Ikegami H, Kawaguchi Y, Sano T, Ogihara T : Antioxidant, probucol, can inhibit the generation of hydrogen peroxide in islet cells induced by macrophages and prevent islet cell destruction in NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun* 209 : 953-958, 1995
- 9) Piganelli JD, Flores SC, Cruz C, Koepf J, Batinic-Haberle I, Crapo J, Day B, Kachadourian R, Young R, Bradley B, Haskins K : A metalloporphyrin-based

- superoxide dismutase mimic inhibits adoptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone. *Diabetes* 51 : 347-355, 2002
- 10) Daaboul J, Schatz D : Overview of prevention and intervention trials for type 1 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 4 : 317-323, 2003
 - 11) Meister A : Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal : applications in research and therapy. *Pharmacol Ther* 51 : 155-194, 1991
 - 12) Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W : Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 343 : 180-184, 2000
 - 13) Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W : The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure. *Circulation* 107 : 992-995, 2003
 - 14) Murata Y, Amao M, Hamuro J : Sequential conversion of the redox status of macrophages dictates the pathological progression of autoimmune diabetes. *Eur J Immunol* 33 : 1001-1011, 2003
 - 15) Eylar E, Rivera-quinones C, Molina C, Baez I, Molina F, Mercado CM : N-acetylcysteine enhances T cell functions and T cell growth in culture. *Int Immunol* 5 : 97-101, 1993
 - 16) Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, Fuente MD : Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. *Pharmacol Biochem Behav* 73 : 797-804, 2002
 - 17) Shimada A, Charlton B, Edwards CT, Fathman CG : β -cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45 : 1063-1067, 1996
 - 18) Hanafusa T, Sugihara S, Fujino-Kurihara H, Miyagawa J, Miyazaki A, Yoshida T, Yamada K, Nakajima H, Asakawa H, Kono N, Fujiwara H, Hamaoka T, Tarui S : Induction of insulinitis by adoptive transfer with L3T4+Lyt2- T-lymphocytes in T-lymphocyte-depleted NOD mice. *Diabetes* 37 : 204-208, 1988
 - 19) 島田 朗 : インスリン依存型糖尿病発症に関する免疫学的研究—NOD マウスにおける腹腔内マクロファージの移入—. *慶應医学* 70 : 81-91, 1993
 - 20) Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y : Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35 : 855-860, 1986
 - 21) Rohane PW, Shimada A, Kim DT, Edwards CT, Charlton B, Shultz LD, Fathman CG : Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. *Diabetes* 44 : 550-554, 1995
 - 22) Irie J, Shimada A, Oikawa Y, Shigihara T, Saruta T : N-acetyl-cysteine accelerates transfer of diabetes into non-obese diabetic scid mice. *Diabetologia* 47 : 1803-1809, 2004
 - 23) Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C : Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11 : 305-312, 1999
 - 24) Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M : Beneficial effects of antioxidants in diabetes. *Diabetes* 48 : 2398-2406, 1999
 - 25) Ho E, Chen G, Bray TM : Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFkappaB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FASEB J* 13 : 1845-1854, 1999
 - 26) Yamada S, Irie J, Shimada A, Kodama K, Morimoto J, Suzuki R, Oikawa Y, Saruta T : Assessment of beta cell mass and oxidative peritoneal exudate cells in murine type 1 diabetes using adoptive transfer system. *Autoimmunity* 36 : 63-70, 2003
 - 27) Tarbell KV, Lee M, Ranheim E, Chao CC, Sanna M, Kim SK, Dickie P, Teyton L, Davis M, McDevitt H : CD4+ T cells from glutamic acid decarboxylase (GAD)65-specific T cell receptor transgenic mice are not diabetogenic and can delay diabetes transfer. *J Exp Med* 196 : 481-492, 2002
 - 28) Yim CY, Hibbs JB, McGregor JR, Galinsky RE, Samlowski WE : Use of N-acetyl cysteine to increase intracellular glutathione during the induction of antitumor responses by IL-2. *J Immunol* 152 : 5796-5805, 1994
 - 29) Boon ACM, Vos AP, Graus YMF, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME : In vitro effect of bioactive compounds on influenza virus specific B- and T-cell responses. *Scand J Immunol* 55 : 24-32, 2002
 - 30) Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C : Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 3071-3076, 1998
 - 31) Monick MM, Samavati L, Butler NS, Mohning M, Powers LS, Yarovinsky T, Spitz DR, Hunninghake GW : Intracellular thiols contribute to Th2 function via a positive role in IL-4 production. *J Immunol* 171 : 5107-5115, 2003
 - 32) Singh SM, Murphy B, O'Reilly RL : Involvement of gene-diet/drug interaction in DNA methylation and its contribution to complex disease : from cancer to schizophrenia. *Clin Genet* 64 : 451-460, 2003
 - 33) Shimada A, Imazu Y, Morinaga S, Funae O, Kasuga A, Atsumi Y, Matsuoka K : T-cell insulinitis found in anti-GAD65+ diabetes with residual beta-cell function. A case report. *Diabetes Care* 22 : 615-617, 1999
 - 34) 小林哲郎, 佐藤謙, 赤澤昭一 : 糖尿病の分類における1型の位置付け. *糖尿病* 41 : A11-A13, 1998

第1表 本研究で使用したプライマーおよび TaqMan プローブ

	5'プライマー	3'プライマー	TaqMan プローブ
LEPR 遺伝子 Lys109Arg 多型	5'-TTTCTAACTTATCCA AAACAACCTTCCA-3'	5'-GCTAATGCTTACCTA TTTGTGAAAAAC-3'	Lys-アリアル特異的プローブ 5'-VIC-TTGAAGGAAAGACATTTG-MGB-3' Arg-アリアル特異的プローブ 5'-FAM-TTGAAGGAAGGACATTT-MGB-3'
LEPR 遺伝子 Gln223Arg 多型	5'-TTTGAAAAATCACAT CTGGTGGAGTA-3'	5'-ACCCATATTTATGGG CTGAACTG-3'	Gln-アリアル特異的プローブ 5'-VIC-ATTTTCCAGTCACCTCTA-MGB-3' Arg-アリアル特異的プローブ 5'-FAM-TTTCCGGTCACCTCT-MGB-3'
GPR40 遺伝子 Arg211His 多型	5'-GCCATCACAGCCTTC TGCTAC-3'	5'-CCACGTTGGAGGCGT TGTA-3'	Arg-アリアル特異的プローブ 5'-VIC-CACTGGCCCCGCTC-MGB-3' His-アリアル特異的プローブ 5'-FAM-ACTGGCCCCACTCC-MGB-3'

温で放置し、ウェルを3回洗浄し、horseradish peroxidase で標識した抗レプチン受容体モノクローナル抗体で1時間反応させた。再度ウェルを4回洗浄し、tetramethylbenzidine で5分間反応させた。0.2Mの硫酸を添加して反応を停止させ、450 nmでの吸光度を測定した。アッセイ内およびアッセイ間再現性の変動係数は、それぞれ2.6~4.7%および6.3~7.2%であった。

3. 遺伝子多型の解析

LEPR 遺伝子の Lys109Arg 多型、Gln223Arg 多型および GPR40 遺伝子の Arg211His 多型を、TaqMan polymerase chain reaction (以下 PCR と略す) 法により同定した^{38), 39)}。Universal master mix (Applied Biosystems 社, 東京) 12.5 μ l, プライマー各 22.5 pmol, プローブ各 5 μ mol, DNA 約 10~50 ng とし、蒸留水を加えて全量で 25 μ l として反応させた。PCR 反応は、ABI prism 7700 (Applied Biosystems) を用いて、95°C10分を1サイクルの後、92°C15秒および60°C60秒を35サイクル繰り返した。第1表に使用したプライマーおよび TaqMan プローブを示した。

4. 統計学的解析

すべてのデータは、平均値±標準偏差として示した。血中 sOB-R 濃度のほか各種臨床・代謝指標の性差の解析にはノンパラメトリックな Mann-Whitney の U 検定を、血中 sOB-R 濃度と各種臨床・代謝指標との関連の解析には単回帰分析および年齢と BMI を独立変数として組み込んだ重回帰分析を使用した。遺伝子多型の検討では、Hardy-Weinberg 平衡への適合の検定には χ^2 検

定を使用し、ノンパラメトリックな検定法として2群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を、3群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を使用した。健常者群と糖尿病患者群における GPR40 遺伝子多型の遺伝子型およびアリアル頻度の比較には、Fisher の直接法を使用した。GPR40 遺伝子型と血清インスリン、HOMA-IR および HOMA- β との関連は、年齢および BMI を独立変数として組み込んだ重回帰分析により解析した。中性脂肪、インスリン、HOMA-IR、レプチン、sOB-R およびアディポネクチンは対数正規分布にしたがったため、対数変換後に解析を行った。多重比較のための Bonferroni 補正による検討も行った。P 値 0.05 未満を統計学的に有意と解釈した。統計処理には Stat View ソフトウェア (ver 5.0J, SAS インスティテュート社, 米国ノースカロライナ州) を使用した。

結 果

1. 血中可溶性レプチン受容体濃度の検討

1) 健常者および糖尿病患者における血中 sOB-R 濃度

第2表は419名の健常者を男女に分けて、各種臨床・代謝指標を比較したものである⁴⁰⁾。血中レプチンおよびアディポネクチン濃度は、女性よりも男性で有意に低値であった ($P < 0.0001$)。逆に血中 sOB-R 濃度は、女性 (22.9 ± 7.4 U/ml) よりも男性 (24.9 ± 5.8 U/ml) で有意に高値であった ($P < 0.0001$)。したがってレプチン/sOB-R 比は、女性よりも男性で有意に低値であった ($P < 0.0001$)。第3表は150名の2型糖尿病患者を男女に分けて、各種臨床・代謝指標を比較したものである⁴⁰⁾。

第2表 健常者419名の臨床・代謝指標

Parameter	Male (n=198)	Female (n=221)	P value*
Age (years)	44.5±9.3	41.7±9.7	0.0011
BMI (kg/m ²)	22.9±2.2	20.6±2.4	<0.0001
SBP (mmHg)	119±16	112±15	<0.0001
DBP (mmHg)	75±12	68±10	<0.0001
Glucose (mg/dl)	91±8	89±7	0.0025
Insulin (μU/ml)	4.8±2.6	4.9±2.6	NS
HOMA-IR	1.1±0.6	1.1±0.6	NS
Total cholesterol (mg/dl)	197±28	194±33	NS
Triglycerides (mg/dl)	112±70	68±37	<0.0001
HDL-cholesterol (mg/dl)	55±14	69±15	<0.0001
LDL-cholesterol (mg/dl)	123±27	112±29	<0.0001
Leptin (ng/ml)	3.9±1.8	7.3±4.1	<0.0001
Adiponectin (μg/ml)	7.2±4.4	13.4±7.2	<0.0001
sOB-R (U/ml)	24.9±5.8	22.9±7.4	<0.0001
Leptin/sOB-R	0.09±0.06	0.19±0.15	<0.0001

平均±標準偏差。NS：有意差なし (Bonferroni 補正により $P>0.0033$)。*Mann-Whitney U 検定。SBP：収縮期血圧。DBP：拡張期血圧。

(Ogawa T et al : Metabolism 53 : 879-885, 2004⁴⁰⁾の Table 1 を許可を得て転載)

第3表 糖尿病患者150名の臨床・代謝指標

Parameter	Male (n=96)	Female (n=54)	P value*
Age (years)	58.5±7.8	59.2±9.1	NS
BMI (kg/m ²)	24.4±3.6	24.0±4.1	NS
SBP (mmHg)	130±16	128±19	NS
DBP (mmHg)	80±9	76±10	NS
Glucose (mg/dl)	138±21	135±22	NS
HbA1c (%)	6.9±0.9	6.8±1.1	NS
Insulin (μU/ml)	5.8±3.5	6.5±4.0	NS
HOMA-IR	2.0±1.3	2.2±1.5	NS
Total cholesterol (mg/dl)	203±33	206±32	NS
Triglycerides (mg/dl)	137±87	109±50	NS
HDL-cholesterol (mg/dl)	52±10	59±14	0.0021
LDL-cholesterol (mg/dl)	126±31	125±31	NS
Leptin (ng/ml)	5.6±3.3	10.4±6.2	<0.0001
sOB-R (U/ml)	25.3±6.6	22.1±6.3	0.0013
Leptin/sOB-R	0.12±0.10	0.28±0.23	<0.0001

平均±標準偏差。NS：有意差なし (Bonferroni 補正により $P>0.0033$)。*Mann-Whitney U 検定。SBP：収縮期血圧。DBP：拡張期血圧。

(Ogawa T et al : Metabolism 53 : 879-885, 2004⁴⁰⁾の Table 2 を許可を得て転載)

第4表 健常男性 198 名における、血中 sOB-R 濃度 (Log) と臨床・代謝指標との単回帰および重回帰分析

Parameter	Simple regression		Adjusted for age and BMI	
	R	P	R	P
Age (years)	0.211	0.0032	—	—
BMI (kg/m ²)	-0.381	<0.0001	—	—
SBP (mmHg)	0.012	NS	0.059	NS
DBP (mmHg)	-0.023	NS	-0.028	NS
Glucose (mg/dl)	0.058	NS	0.048	NS
Log [Insulin (μU/ml)]	-0.348	<0.0001	-0.239	0.0011
Log [HOMA-IR]	-0.326	<0.0001	-0.219	0.0027
Total cholesterol (mg/dl)	0.054	NS	-0.022	NS
Log [Triglycerides (mg/dl)]	-0.226	0.0016	-0.134	NS
HDL-cholesterol (mg/dl)	0.351	<0.0001	-0.222	0.0018
LDL-cholesterol (mg/dl)	-0.059	NS	-0.086	NS
Log [Leptin (ng/ml)]	-0.392	<0.0001	-0.258	0.0009
Log [Adiponectin (μg/ml)]	0.324	<0.0001	0.192	NS
Log [Leptin/sOB-R]	-0.683	<0.0001	-0.649	<0.0001

平均±標準偏差。NS：有意差なし (Bonferroni 補正により $P > 0.0036$)。SBP：収縮期血圧。DBP：拡張期血圧。

(Ogawa T et al : Metabolism 53 : 879-885, 2004⁴⁰⁾の Table 3 を許可を得て転載)

第5表 健常女性 221 名における、血中 sOB-R 濃度 (Log) と臨床・代謝指標との単回帰および重回帰分析

Parameter	Simple regression		Adjusted for age and BMI	
	R	P	R	P
Age (years)	0.150	NS	—	—
BMI (kg/m ²)	-0.401	<0.0001	—	—
SBP (mmHg)	-0.076	NS	-0.018	NS
DBP (mmHg)	0.027	NS	0.045	NS
Glucose (mg/dl)	-0.168	NS	-0.118	NS
Log [Insulin (μU/ml)]	-0.476	<0.0001	-0.363	<0.0001
Log [HOMA-IR]	-0.477	<0.0001	-0.358	<0.0001
Total cholesterol (mg/dl)	0.003	NS	-0.034	NS
Log [Triglycerides (mg/dl)]	-0.262	<0.0001	-0.201	0.0025
HDL-cholesterol (mg/dl)	0.315	<0.0001	0.224	0.0003
LDL-cholesterol (mg/dl)	-0.134	NS	-0.164	NS
Log [Leptin (ng/ml)]	-0.403	<0.0001	-0.189	NS
Log [Adiponectin (μg/ml)]	0.295	<0.0001	0.204	0.0010
Log [Leptin/sOB-R]	-0.736	<0.0001	-0.823	<0.0001

平均±標準偏差。NS：有意差なし (Bonferroni 補正により $P > 0.0036$)。SBP：収縮期血圧。DBP：拡張期血圧。

(Ogawa T et al : Metabolism 53 : 879-885, 2004⁴⁰⁾の Table 4 を許可を得て転載)

第6表 健常者419名における、血中sOB-R濃度(Log)と臨床・代謝指標との単回帰および重回帰分析

Parameter	Simple regression		Adjusted for age, sex and BMI	
	R	P	R	P
Age (years)	0.193	<0.0001	-	-
BMI (kg/m ²)	-0.261	<0.0001	-	-
SBP (mmHg)	0.003	NS	0.016	NS
DBP (mmHg)	0.058	NS	0.016	NS
Glucose (mg/dl)	-0.048	NS	-0.060	NS
Log [Insulin (μU/ml)]	-0.412	<0.0001	-0.305	<0.0001
Log [HOMA-IR]	-0.402	<0.0001	-0.298	<0.0001
Total cholesterol (mg/dl)	0.028	NS	-0.029	NS
Log [Triglycerides (mg/dl)]	-0.137	NS	-0.167	0.0014
HDL-cholesterol (mg/dl)	0.204	<0.0001	0.233	<0.0001
LDL-cholesterol (mg/dl)	-0.064	NS	-0.123	NS
Log [Leptin (ng/ml)]	-0.431	<0.0001	-0.262	<0.0001
Log [Adiponectin (μg/ml)]	0.156	0.0015	0.215	<0.0001
Log [Leptin/sOB-R]	-0.708	<0.0001	-0.814	<0.0001

平均±標準偏差。NS：有意差なし (Bonferroni 補正により P>0.0036)。SBP：収縮期血圧。DBP：拡張期血圧。

(Ogawa T et al : Metabolism 53 : 879-885, 2004⁴⁰⁾の Table 5 を許可を得て転載)

糖尿病患者でも健常者と同様に、血中レプチン濃度は女性よりも男性で有意に低値であり (P<0.0001)、血中sOB-R濃度は女性よりも男性で有意に高値であった (P=0.0013)。したがってレプチン/sOB-R比は、女性よりも男性で有意に低値であった (P<0.0001)。

2) 健常者における血中sOB-R濃度と各種臨床・代謝指標との関連

第4表は健常男性198名における結果である⁴⁰⁾。sOB-R濃度はBMI、インスリン、HOMA-IR、中性脂肪、レプチン濃度およびレプチン/sOB-R比と有意な負の相関を示し、年齢、HDL-Cおよびアディポネクチン濃度と有意な正の相関を示した。年齢およびBMIで補正した後も、sOB-R濃度とインスリン、HOMA-IR、HDL-C、レプチン濃度およびレプチン/sOB-R比との相関は有意であった。第5表は健常女性221名における結果である⁴⁰⁾。sOB-R濃度はBMI、インスリン、HOMA-IR、中性脂肪、レプチン濃度およびレプチン/sOB-R比と有意な負の相関を示し、HDL-Cおよびアディポネクチン濃度と有意な正の相関を示した。年齢およびBMIで補正した後も、sOB-R濃度とインスリン、HOMA-IR、中性脂肪、HDL-C、アディポネクチン濃度およびレプチン/sOB-R比との相関は有意であった。第6表は419名の健常者全体における結果である⁴⁰⁾。

sOB-R濃度はBMI、インスリン、HOMA-IR、レプチン濃度およびレプチン/sOB-R比と有意な負の相関を示し、年齢、HDL-Cおよびアディポネクチン濃度と有意な正の相関を示した。年齢、性別およびBMIで補正した後、sOB-R濃度はインスリン、HOMA-IR、中性脂肪、レプチン濃度およびレプチン/sOB-R比と有意な負の相関を示し、HDL-Cおよびアディポネクチン濃度と有意な正の相関を示した。

3) 2型糖尿病患者における血中sOB-R濃度と各種臨床・代謝指標との関連

男性2型糖尿病患者96名において、sOB-R濃度はBMI (R=-0.453, P<0.0001)、インスリン (R=-0.512, P<0.0001)、HOMA-IR (R=-0.483, P<0.0001)、レプチン濃度 (R=-0.486, P<0.0001) およびレプチン/sOB-R比 (R=-0.731, P<0.0001) と有意な負の相関を示し、HDL-C (R=0.439, P<0.0001) と有意な正の相関を示した。年齢およびBMIで補正した後も、sOB-R濃度とインスリン (R=-0.402, P=0.0006)、HOMA-IR (R=-0.357, P=0.0029)、HDL-C (R=0.384, P<0.0001) およびレプチン/sOB-R比 (R=-0.861, P<0.0001) との相関は有意であった。女性2型糖尿病患者54名において、sOB-R濃度はBMI (R=-0.644, P<0.0001)、インス

第9A表 健常男性127名における、LEPR遺伝子Gln223Arg多型と臨床・代謝指標との関連

Parameter	Gln/Gln+Gln/Arg	Arg/Arg	P value*
No. of subjects	4+25 (22.8%)	98 (77.2%)	
Age (years)	43±9	46±9	NS
BMI (kg/m ²)	22.6±2.1	22.9±2.4	NS
SBP (mmHg)	119±20	120±16	NS
DBP (mmHg)	74±13	76±12	NS
Glucose (mg/dl)	92±8	92±7	NS
Insulin (μU/ml)	4.7±1.8	4.8±2.7	NS
HOMA-IR	1.1±0.4	1.1±0.6	NS
Total cholesterol (mg/dl)	198±23	197±28	NS
Triglycerides (mg/dl)	105±49	112±72	NS
HDL-cholesterol (mg/dl)	54±15	56±15	NS
LDL-cholesterol (mg/dl)	127±22	123±27	NS
Leptin (ng/ml)	3.6±1.8	3.8±1.8	NS
Adiponectin (μg/ml)	7.1±4.2	7.0±4.7	NS
sOB-R (U/ml)	26.1±6.4	25.0±6.0	NS
Leptin/sOB-R	0.08±0.05	0.09±0.06	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (Bonferroni補正により $P > 0.0033$)。*Mann-Whitney *U* 検定。SBP：収縮期血圧。DBP：拡張期血圧。

第9B表 健常女性90名における、LEPR遺伝子Gln223Arg多型と臨床・代謝指標との関連

Parameter	Gln/Gln+Gln/Arg	Arg/Arg	P value*
No. of subjects	3+22 (27.8%)	65 (72.2%)	
Age (years)	47±9	45±8	NS
BMI (kg/m ²)	21.0±2.7	20.4±2.4	NS
SBP (mmHg)	117±21	113±14	NS
DBP (mmHg)	73±12	69±10	NS
Glucose (mg/dl)	92±7	89±7	NS
Insulin (μU/ml)	4.6±2.5	4.5±2.5	NS
HOMA-IR	1.1±0.6	1.0±0.6	NS
Total cholesterol (mg/dl)	204±32	199±33	NS
Triglycerides (mg/dl)	69±34	72±31	NS
HDL-cholesterol (mg/dl)	66±13	69±16	NS
LDL-cholesterol (mg/dl)	124±28	116±30	NS
Leptin (ng/ml)	6.5±3.4	7.3±3.8	NS
Adiponectin (μg/ml)	13.9±7.4	12.6±6.3	NS
sOB-R (U/ml)	23.2±6.7	23.6±8.7	NS
Leptin/sOB-R	0.16±0.12	0.18±0.14	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (Bonferroni補正により $P > 0.0033$)。*Mann-Whitney *U* 検定。SBP：収縮期血圧。DBP：拡張期血圧。

第10表 健常者および2型糖尿病患者における、GPR40 遺伝子多型の分布

	Controls (n=327)	Patients (n=203)	P*
Genotype frequencies			
Arg/Arg	15 (4.6%)	11 (5.4%)	
Arg/His	107 (32.7%)	60 (29.6%)	NS**
His/His	205 (62.7%)	132 (65.0%)	
Allele frequencies			
Arg	137 (20.9%)	82 (20.2%)	
His	517 (79.1%)	324 (79.8%)	NS

NS: 有意差なし (P>0.05). *Fisherの直接法.

**Arg/Arg+Arg/His群とHis/His群との間で解析した.

第11表 健常男性327名における、GPR40 遺伝子 Arg211His 多型と臨床・代謝指標との関連

Parameter	Arg/Arg	Arg/His	His/His	P*
No. of subjects	15 (4.6%)	107 (32.7%)	205 (62.7%)	
Age (years)	54±9	48±8	50±9	0.0416
BMI (kg/m ²)	22.1±1.9	23.3±2.3	23.3±2.5	NS
Glucose (mg/dl)	96±7	94±6	94±6	NS
Insulin (μU/ml)	4.1±2.9	5.1±2.6	5.5±2.4	0.0075
HOMA-IR	1.0±0.7	1.2±0.6	1.3±0.6	0.0152
HOMA-β	46±29	60±31	65±29	0.0039
Total cholesterol (mg/dl)	212±21	206±30	211±30	NS
Triglycerides (mg/dl)	90±69	112±74	125±94	NS
HDL-cholesterol (mg/dl)	59±11	60±13	58±13	NS
LDL-cholesterol (mg/dl)	130±22	122±29	126±27	NS
Free Fatty Acids (mEq/L)	0.63±0.24	0.70±0.24	0.74±0.37	NS

平均±標準偏差. NS: 有意差なし (P>0.05). *Kruskal-Wallis 検定.

(Ogawa T et al: Metabolism 54: 296-299, 2005¹¹⁾の Table 1 を許可を得て転載)

第12表 健常男性327名における

(A) 血清インスリンを従属変数とした重回帰分析

Parameter	R	P
Age	-0.132	0.0076
BMI	0.412	<0.0001
Genotype	0.151	0.0023

(B) HOMA-IR を従属変数とした重回帰分析

Parameter	R	P
Age	-0.082	NS
BMI	0.422	<0.0001
Genotype	0.138	0.0055

(C) HOMA-β を従属変数とした重回帰分析

Parameter	R	P
Age	-0.271	<0.0001
BMI	0.315	<0.0001
Genotype	0.173	0.0005

NS: 有意差なし (P>0.05).

GPR40 遺伝子型は以下のように規定した: Arg/Arg = 0, Arg/His = 1, His/His = 2.

(Ogawa T et al: Metabolism 54: 296-299, 2005¹¹⁾の Table 2 を許可を得て転載)

0.0416). その他の指標に関しては, 3群間で有意差を認めなかった。

第12表は, GPR40の遺伝子型と血清インスリン, HOMA-IR および HOMA- β との関係重回帰分析で確認したものである⁴¹⁾. 年齢および BMI を独立変数とした重回帰分析において, 遺伝子型と血清インスリン ($R=0.151$, $P=0.0023$), HOMA-IR ($R=0.138$, $P=0.0055$) および HOMA- β ($R=0.173$, $P=0.0005$) との間に有意な関連が認められた。

考 察

本研究では, 血中 sOB-R 濃度が BMI, インスリン抵抗性, 脂質代謝指標, 血中レプチンおよびアディポネクチン濃度と関連していること, また GPR40 遺伝子の Arg211His 多型が血清インスリン濃度およびインスリン分泌能と関連していることが示唆された。

1. 血中可溶性レプチン受容体濃度に関して

レプチンやアディポネクチンとは逆に, 血中 sOB-R 濃度は女性よりも男性で有意に高かった。sOB-R 濃度に関する性差はすでに報告されており, いずれも女性よりも男性で高値であった^{14), 16), 42)}. Ogier らは, sOB-R 濃度の性差は体脂肪率の違いにより説明できると報告したが¹⁴⁾, 本研究では体脂肪率を測定できなかった。日本人での検討では, sOB-R 濃度は生理周期の間有意には変化せず¹⁷⁾, また *in vitro* fertilization 中 sOB-R 濃度に有意差を認めなかったと報告されている¹⁸⁾. 最近拒食症患者において, 生理の回復に伴い sOB-R 濃度が減少傾向を示すと報告された⁴³⁾. 本研究では, 閉経前 (50歳未満) の健常女性は, 閉経していると思われる (50歳以上の) 健常女性よりも sOB-R 濃度が有意に ($P=0.007$) 低いことを認めた。この結果からは, 女性ホルモン濃度の変化が sOB-R 濃度に影響を与える可能性が示唆された。

本研究では, 健常者において年齢, 性別および BMI で補正した後も, sOB-R 濃度はインスリン, HOMA-IR, 中性脂肪およびレプチン濃度と負の相関を示し, HDL-C およびアディポネクチン濃度と正の相関を示した。sOB-R 濃度と BMI またはレプチン濃度との負の相関はすでに報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾. しかし一方で, sOB-R 濃度とインスリン濃度との関連に関しては, 相関を認めなかった¹⁶⁾という報告と, 負の相関を認めたが BMI で補正後は相関が消失した²¹⁾という報告がある。最近 Sandhofer らは, 76人のメタボリックシンドロームを呈する中年肥満男性において, sOB-R 濃度は年齢, BMI および体

脂肪量とは独立して, インスリンおよび HOMA-IR と負の相関を示すことを報告した⁴⁴⁾.

アディポネクチンは脂肪組織から特異的に分泌され, その血中濃度は肥満, 糖尿病または冠動脈疾患を有する者では低いことが報告されている^{45), 46)}. また, 血中アディポネクチン濃度は年齢, 性別および BMI とは独立して HOMA-IR と負の相関, HDL-C と正の相関を示すことが報告されている³⁷⁾. したがって, sOB-R はアディポネクチンと同様に, 善玉のアディポサイトカインとして作用している可能性が考えられた。すなわち, sOB-R 濃度が高い場合にはインスリン抵抗性が低く, HDL-C およびアディポネクチン濃度が高く, インスリン抵抗性およびメタボリックシンドロームの改善を反映していることを本研究は示唆した。Sandhofer らも, BMI および体脂肪量が同程度でも, メタボリックシンドロームのコンポーネント数が増すにつれて sOB-R 濃度が減少することを示しており, sOB-R 低値はメタボリックシンドロームの一つの指標かもしれないと考察している⁴⁴⁾. しかし, sOB-R 濃度が上昇するとインスリン抵抗性や脂質代謝が改善するのか, あるいはインスリン抵抗性や脂質代謝が改善すると sOB-R 濃度が上昇するのかという因果関係は断片的検討のため不明であり, 今後の縦断的検討が必要と考えられる。

糖尿病患者においても, 年齢, 性別および BMI で補正した後も, sOB-R 濃度はインスリン, HOMA-IR およびレプチン濃度と負の相関を示し, HDL-C と正の相関を示した。糖尿病患者における sOB-R 濃度の報告は二報しかなく, いずれも特殊な病態での検討である。Lewandowski らは, 正常の妊婦に比べてインスリン依存型糖尿病の妊婦では sOB-R 濃度が有意に高いことを報告した⁴⁷⁾. Pecoits-Filho らは, 非糖尿病性末期腎不全患者よりも糖尿病性末期腎不全患者において sOB-R 濃度は有意に高く, また sOB-R 濃度は糖化ヘモグロビン値と正相関することを報告した⁴⁸⁾. 著者は, 一般的に BMI, HOMA-IR およびレプチン濃度が高い 2型糖尿病患者よりも健常者において sOB-R 濃度が高いことを予測したが, 本研究では健常者と糖尿病患者との間では血中 sOB-R 濃度に有意差を認めなかった。

元来フリーレプチン濃度はゲル・フィルトレーション・クロマトグラフィー法によってのみ測定できたが, sOB-R に対するレプチンの比 (レプチン/sOB-R 比) が体脂肪率と強く関連することを Ogier らは報告し¹⁴⁾, この比はフリーレプチンのインデックスとして簡便に使用されるようになった⁴⁹⁾. 本研究では, レプチン/sOB-R 比は男性よりも女性で有意に高値であった。健常者より

も糖尿病患者でこの比は有意に高値であったが、BMIで補正後に有意差は消失した。また健常者において、レプチン/sOB-R比はBMIおよびHOMA-IRと正の相関を示し、HDL-Cおよびアディポネクチン濃度と負の相関を示した。本研究では、レプチン/sOB-R比はレプチン自体と比較して、BMIやインスリン抵抗性との相関係数を若干高めたが、付加的な意義を認めなかった。

2. LEPR 遺伝子多型に関して

1997年以降異なる人種集団において、ヒトLEPR遺伝子の多型が報告された。Matsuokaらは、日本人において七つの多型を同定したが、肥満者と非肥満者との間でそれぞれの多型のアリアル頻度に有意差を認めなかった²³⁾。Wautersらは、閉経後の白人女性において、Gln223ホモ遺伝子型の者は腹部脂肪がより多く、Lys109ホモ遺伝子型の者はレプチン濃度がより高いことを報告した²⁴⁾。Quintonらは、閉経後の白人女性において、Gln223アリアルを有する者はBMI、体脂肪量およびレプチン濃度が高く、レプチン結合活性が低いことを報告し、この多型により受容体機能が変化する可能性が示唆された²⁵⁾。Heoらはメタ解析において、三つのLEPR多型(Lys109Arg, Gln223Arg, Lys656Asn)とBMIまたはウェスト周囲径との間に関連がないと結論した²⁶⁾。以上のごとく報告により結果の違いが見られるが、これは対象とする人種、性別、年齢層および肥満度の違いが原因かもしれない。本研究では、LEPR遺伝子のLys109Arg多型またはGln223Arg多型とBMI、インスリン、HOMA-IR、血清脂質、レプチン濃度およびsOB-R濃度との間に有意な関連を認めなかった。母集団の人数が十分ではなかった可能性を否定できないが、本研究では日本人集団においてLEPR遺伝子のLys109Arg多型およびGln223Arg多型は各種臨床・代謝指標と関連しないと結論した。

3. GPR40 遺伝子 Arg211His 多型に関して

GPR40はG蛋白質共役型受容体の一員であり、GPR41~43とともに、19番染色体長腕13.1にマップされたCD22の下流の遺伝子としてクローニングされた⁵¹⁾。GPR40は特徴的な7回膜貫通型ドメインを含む300アミノ酸からなり、イントロンがない。長鎖脂肪酸は、細胞内代謝およびfatty acyl-CoAのような脂質由来分子の産生を通じて、膵β細胞からのGSISを増強すると従来考えられてきた。脂肪酸がGPR40を活性化するという最近の報告は、脂肪酸が細胞外受容体のリガンドとして作用することを示している^{30~32)}。Itohらは、

膵β細胞に豊富に発現しているGPR40が長鎖脂肪酸の受容体として機能することを示し、また長鎖脂肪酸はGPR40を活性化することにより膵β細胞からのGSISを増強することを示した³⁰⁾。Briscoeらは、ヒトGPR40発現細胞において中鎖~長鎖脂肪酸が細胞内Ca濃度の上昇を誘発することを示し、またGPR40がげっ歯類の膵β細胞とともにヒトの膵臓にも特異的に発現していることを示した³¹⁾。これらの結果は、脂肪酸によるインスリン分泌機能の調節に関して新たな見解を示した。

本研究では、健常者と2型糖尿病患者との間で、GPR40遺伝子型およびアリアル頻度に有意な違いを認めなかった。このことは、GPR40遺伝子のArg211His変異が単独では2型糖尿病の発症に関与しないことを示唆している。なお、今回対象とした糖尿病患者の多くが糖毒性の強い入院例であり、糖・脂質代謝指標との関連については検討しなかった。本研究では、健常者において遺伝子型の間で血糖や血清脂質には有意差を認めなかったが、His/His型の者よりもArg/Arg型の者において血清インスリン、HOMA-IRおよびHOMA-βは有意に低かった。*in vitro*および*in vivo*にて、この多型に関する機能的な研究は今まで報告されておらず、これらの違いの正確な機序は不明である。Briscoeらは、対照のやせ型マウスと比べて*ob/ob*マウスの膵臓では、インスリンmRNAと並行してGPR40mRNAの発現が有意に上昇すると報告した³¹⁾。したがって、Arg211アリアルを持つヒトのGPR40は転写活性が低下して同等のグルコースと脂肪酸の条件下でのインスリン分泌が低下する、またはHis211アリアルを持つヒトのGPR40はインスリン分泌を増強してインスリン抵抗性になりやすい可能性がある。GPR40遺伝子多型がインスリン分泌またはインスリン抵抗性のいずれに主に影響するかは不明であるが、多重比較のためのBonferroni補正の後にHOMA-βのみが遺伝子型の間で有意に異なるという結果は、インスリン分泌により影響することを示唆していると思われる。本研究では、残念ながら経口糖負荷または食事負荷試験を行うことができなかったが、GPR40は高濃度グルコースでより活性化されるため³⁰⁾、負荷後にさらなるインスリン濃度の違いが見られる可能性がある。本研究ではまた、年齢およびBMIを独立変数とした重回帰分析において、GPR40遺伝子多型が血清インスリン、HOMA-IRおよびHOMA-βと有意な関連があることを示した。したがって、GPR40遺伝子のArg211His多型は他の遺伝子とともにインスリン分泌能に関与し、膵β細胞機能障害に関連している可能性が示唆された。

総括

本研究では、血中 sOB-R 濃度および LEPR 遺伝子多型と BMI, 血圧, 血糖, 血清脂質, 血清インスリン濃度, HOMA-IR, 血中レプチンおよびアディポネクチン濃度との関係について、日本人健常者および 2 型糖尿病患者を対象に検討した。また、GPR40 遺伝子 Arg211His 多型と血清インスリン濃度, HOMA-IR, HOMA-β および血清脂質との関係について日本人健常男性を対象に検討し、以下の結果を得た。

1. 健常者において、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、HDL-C および血中アディポネクチン濃度と正の相関を示した。糖尿病患者においても、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 および血中レプチン濃度と負の相関を示し、HDL-C 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、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。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深謝いたします。また、本研究を直接御指導下さり、論文の御校閲をいただきました慶應義塾大学保健管理センター兼医学部内科学教室広瀬 寛講師に感謝いたします。さらに御協力をいただいた研究室、中央臨床検査部、先端医学研究所および三越診療所の方々に感謝いたします。

本研究の一部は、第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2004 年、東京) および第 64 回米国糖尿病学会 (2004 年、オーランド) において発表した。

本論文は、Ogawa T, Hirose H, Yamamoto Y, Nishikai K, Miyashita K, Nakamura H, Saito I, Saruta T : Relationships between serum soluble leptin receptor level and serum leptin and adiponectin levels, insulin resistance index, lipid profile, and leptin receptor gene polymorphisms in the Japanese population. *Metabolism* 53 : 879-885, 2004 の一部、および Ogawa T, Hirose H, Miyashita K, Saito I, Saruta T : GPR40 gene Arg211His polymorphism may contribute to the variation of insulin secretory capacity in Japanese men. *Metabolism* 54 : 296-299, 2005 の一部を含む。

文献

- 1) DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E : Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15 : 318-368, 1992
- 2) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285 : 2486-2497, 2001
- 3) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM : Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372 : 425-432, 1994
- 4) Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM : Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269 : 543-546, 1995
- 5) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannessian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL : Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334 : 292-295, 1996
- 6) Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J : Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83 : 1263-1271, 1995
- 7) Lee GH, Proença R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM : Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379 : 632-635, 1996

- 8) Maamra M, Bidlingmaier M, Postel-Vinay MC, Wu Z, Strasburger CJ, Ross RJ : Generation of human soluble leptin receptor by proteolytic cleavage of membrane-anchored receptors. *Endocrinology* 142 : 4389-4393, 2001
- 9) Brabant G, Nave H, Mayr B, Behrend M, van Harmelen V, Arner P : Secretion of free and protein-bound leptin from subcutaneous adipose tissue of lean and obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 3966-3970, 2002
- 10) Cohen P, Yang G, Yu X, Soukas AA, Wolfish CS, Friedman JM, Li C : Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation. *J Biol Chem* 280 : 10034-10039, 2005
- 11) Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF : Evidence of free and bound leptin in human circulation : studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98 : 1277-1282, 1996
- 12) Landt M, Parvin CA, Wong M : Leptin in cerebrospinal fluid from children : correlation with plasma leptin, sexual dimorphism, and lack of protein binding. *Clin Chem* 46 : 854-858, 2000
- 13) Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J : Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 283 : 982-988, 2001
- 14) Ogier V, Ziegler O, Mejean L, Nicolas JP, Stricker-Krongrad A : Obesity is associated with decreasing levels of the circulating soluble leptin receptor in humans. *Int J Obes* 26 : 496-503, 2002
- 15) Kratzsch J, Lammert A, Bottner A, Seidel B, Mueller G, Thiery J, Hebebrand J, Kiess W : Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 4587-4594, 2002
- 16) Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS : Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin : observational and interventional studies in humans. *Diabetes* 51 : 2105-2112, 2002
- 17) Shimizu H, Shimomura K, Negishi M, Masunaga M, Uehara Y, Sato N, Shimomura Y, Kasai K, Mori M : Circulating concentrations of soluble leptin receptor : influence of menstrual cycle and diet therapy. *Nutrition* 18 : 309-312, 2002
- 18) Kado N, Kitawaki J, Koshihara H, Ishihara H, Kitaoka Y, Teramoto M, Honjo H : Relationships between the serum levels of soluble leptin receptor and free and bound leptin in non-pregnant women of reproductive age and women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 18 : 715-720, 2003
- 19) Laimer M, Ebenbichler CF, Kaser S, Sandhofer A, Weiss H, Nehoda H, Aigner F, Patsch JR : Weight loss increases soluble leptin receptor levels and the soluble receptor bound fraction of leptin. *Obes Res* 10 : 597-601, 2002
- 20) van Dielen FM, van't Veer C, Buurman WA, Greve J W : Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 1708-1716, 2002
- 21) Lahlou N, Issad T, Lebouc Y, Carel JC, Camoin L, Roger M, Girard J : Mutations in the human leptin and leptin receptor genes as models of serum leptin receptor regulation. *Diabetes* 51 : 1980-1985, 2002
- 22) Thompson DB, Ravussin E, Bennett PH, Bogardus C : Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Hum Mol Genet* 6 : 675-679, 1997
- 23) Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, Matsuda J, Masuzaki H, Miyawaki T, Azuma N, Natsui K, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nishi S, Thompson DB, Nakao K : Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects : evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. *Diabetologia* 40 : 1204-1210, 1997
- 24) Wauters M, Mertens I, Chagnon M, Rankinen T, Considine RV, Chagnon YC, Van Gaal LF, Bouchard C : Polymorphisms in the leptin receptor gene, body composition and fat distribution in overweight and obese women. *Int J Obes* 25 : 714-720, 2001
- 25) Quinton ND, Lee AJ, Ross RJM, Eastell R, Blakemore AI : A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women. *Hum Genet* 108 : 233-236, 2001
- 26) Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD : The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* 100 : 398-403, 1996
- 27) Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH : Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats : impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 10878-10882, 1994
- 28) Hirose H, Lee YH, Inman LR, Nagasawa Y, Johnson JH, Unger RH : Defective fatty acid-mediated beta-cell compensation in Zucker diabetic fatty rats. Pathogenic implications for obesity-dependent diabetes. *J Biol Chem* 271 : 5633-5637, 1996
- 29) Yaney GC, Corkey BE : Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46 : 1297-1312, 2003
- 30) Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama Y, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M : Free

- fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature* 422 : 173-176, 2003
- 31) Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR Jr, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI : The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278 : 11303-11311, 2003
 - 32) Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B : A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 301 : 406-410, 2003
 - 33) Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T : Gene-based SNP discovery as part of the Japanese millennium genome project : identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet* 47 : 605-610, 2002
 - 34) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC : Homeostasis model assessment : insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28 : 412-419, 1985
 - 35) Hirose H, Saito I, Kawai T, Nakamura K, Maruyama H, Saruta T : Serum leptin level, possible association with haematopoiesis in adolescents, independent of body mass index and serum insulin. *Clin Sci* 94 : 633-636, 1998
 - 36) Hirose H, Saito I, Tsujioka M, Mori M, Kawabe H, Saruta T : The obese gene product, leptin : possible role in obesity-related hypertension in adolescents. *J Hypertens* 16 : 2007-2012, 1998
 - 37) Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishi T, Nishikai K, Saruta T : Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci* 103 : 137-142, 2002
 - 38) Yamamoto Y, Hirose H, Miyashita K, Nishikai K, Saito I, Taniyama M, Tomita M, Saruta T : PPAR γ 2 gene Pro12Ala polymorphism may influence serum level of an adipocyte-derived protein, adiponectin, in the Japanese population. *Metabolism* 51 : 1407-1409, 2002
 - 39) 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 polymorphism in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27 : 303-307, 2004
 - 40) Ogawa T, Hirose H, Yamamoto Y, Nishikai K, Miyashita K, Nakamura H, Saito I, Saruta T : Relationships between serum soluble leptin receptor level and serum leptin and adiponectin levels, insulin resistance index, lipid profile, and leptin receptor gene polymorphisms in the Japanese population. *Metabolism* 53 : 879-885, 2004
 - 41) Ogawa T, Hirose H, Miyashita K, Saito I, Saruta T : GPR40 gene Arg211His polymorphism may contribute to the variation of insulin secretory capacity in Japanese men. *Metabolism* 54 : 296-299, 2005
 - 42) Mann DR, Johnson AO, Gimpel T, Castracane VD : Changes in circulating leptin, leptin receptor, and gonadal hormones from infancy until advanced age in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 3339-3345, 2003
 - 43) Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Aggarwal A, Herzog DB, Neubauer G, Breu J, Klibanski A : Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 89 : 3486-3495, 2004
 - 44) Sandhofer A, Laimer M, Ebenbichler CF, Kaser S, Paulweber B, Patsch JR : Soluble leptin receptor and soluble receptor-bound fraction of leptin in the metabolic syndrome. *Obes Res* 11 : 760-768, 2003
 - 45) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y : Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 1595-1599, 2000
 - 46) Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA : Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes : close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86 : 1930-1935, 2001
 - 47) Lewandowski K, Horn R, O'callaghan CJ, Dunlop D, Medley GF, O'Hare P, Brabant G : Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 84 : 300-306, 1999
 - 48) Pecoits-Filho R, Nordfors L, Heimbürger O, Lindholm B, Anderstam B, Marchlewska A, Stenvinkel P : Soluble leptin receptors and serum leptin in end-stage renal disease : relationship with inflammation and body composition. *Eur J Clin Invest* 32 : 811-817, 2002
 - 49) Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS : Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin*

- Endocrinol Metab 88 : 1730-1736, 2003
- 50) Heo M, Leibel RL, Fontaine KR, Boyer BB, Chung WK, Koulou M, Karvonen MK, Pesonen U, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa MI, Chagnon Y, Bouchard C, Donohoue PA, Burns TL, Shuldiner AR, Silver K, Andersen RE, Pedersen O, Echwald S, Sorensen TI, Behn P, Permutt MA, Jacobs KB, Elston RC, Hoffman DJ, Gropp E, Allison DB : A meta-analytic investigation of linkage and association of common leptin receptor (LEPR) polymorphisms with body mass index and waist circumference. *Int J Obes* 26 : 640-646, 2002
- 51) Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu S, Kolakowski LF, O'Dowd BF : A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun* 239 : 543-547, 1997
-

学位論文

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～

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

鈴木 竜 司

(平成 16 年 11 月 24 日受付)

Key Words : diabetes mellitus, slowly progressive type 1 diabetes, latent autoimmune diabetes in adults (LADA), glutamic acid decarboxylase (GAD), CXC chemokine ligand-10 (CXCL-10) /interferon-inducible protein-10 (IP-10)

現在、日本における糖尿病患者は、740 万人にまで増加し、40 歳以上の国民の 6 人に 1 人といわれており、大きな社会問題になっている。糖尿病患者のうち、1 型糖尿病患者の占める割合は、かつては約 1% とかなり少なく、小児領域を中心とするものとされてきた。しかし、1996 年に膵島関連自己抗体の 1 つである抗 GAD65 抗体 (以下、GAD65Ab ; anti-glutamic acid decarboxylase 65 antibody) の測定が保険適用になって以来、2 型糖尿病と診断された患者の約 10% で GAD65Ab が陽性とする報告が出されており、従来考えられてきたよりもはるかに多くの 1 型糖尿病患者が存在していることが認識されてきた。このような患者では、食事療法が守られたとしても血糖コントロールが困難なことが多く、経口血糖降下薬であるスルホニル尿素薬を増量しても二次無効の状態となり、進行性にインスリン依存状態に陥ることが多い。結果として、インスリンが必要になった時点ですでに合併症が進行している例も少なくない。一方で、GAD65Ab が陽性でもインスリン非依存状態のまま経過する患者も存在し、GAD65Ab 陽性の糖尿病患者をすべて 1 型糖尿病患者として扱うべきなのかは結論が出ていない。したがって、GAD65Ab 陽性の糖尿病患者からインスリン依存に進行する緩徐進行 1 型糖尿病患者を早期にしっかりと診断し、的確に対応することが必要である。

1 型糖尿病は、膵 β 細胞破壊によるインスリンの欠乏を成因とする糖尿病と定義され、最終的にインスリン依存状態に陥ることが多く、かつてはインスリン依存型

糖尿病 (IDDM ; insulin-dependent diabetes mellitus) と呼ばれていた。大多数は膵 β 細胞を標的とする自己免疫疾患であり、特に T 細胞を主体とする細胞性免疫異常が成因として重要と考えられている。1 型糖尿病患者の 85-90% に膵島細胞抗体 (ICA ; islet cell antibody), GAD65Ab, インスリン自己抗体 (以下、IAA ; insulin autoantibody), 抗 IA-2 抗体 (以下、IA-2A ; insulinoma associated protein-2 antibody) などの膵島関連自己抗体がみられる^{1), 2)}。前述したように GAD65Ab は、一般臨床の場で測定可能であり、診断に有用なマーカーとなっている。一方、1 型糖尿病は、膵 β 細胞破壊の速度の差、すなわちインスリン依存状態に至るまでの期間による発症形式の違いで、劇症型³⁾、急性発症典型例 (典型例)、緩徐進行型の 3 つの亜型に分類される。糖尿病発症からインスリン依存状態に至るまでの期間は、劇症型が 1 週間前後、典型例が 2-3 ヶ月程度、緩徐進行型は 6 ヶ月以上で、数年にわたることもあり、緩徐進行型は slowly progressive IDDM (もしくは slowly progressive type 1 diabetes)⁴⁾あるいは latent autoimmune diabetes in adults (LADA)⁵⁾と呼ばれている。緩徐進行型は、日本人に比較的多いとされ、インスリン非依存状態である期間に将来のインスリン依存状態への進行を予知できれば、早期からのインスリン治療などにより、残存する膵 β 細胞機能を保持できる可能性が報告されており⁶⁾、その予知は重要な意味がある。

緩徐進行 1 型糖尿病の早期診断、すなわち発症より 6

ヵ月以上インスリン治療を必要としない糖尿病（以下、本論文では、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をNIDDM; non-insulin-dependent diabetes mellitusと呼ぶ）において、インスリン依存状態への進行を予知するためには、GAD65Abの測定が最も重要と考えられている。日本人では、NIDDM患者の2.4-9.7%がGAD65Ab陽性と報告されている^{7,10)}。しかしながら、全てのGAD65Ab陽性例がインスリン依存状態へ進行するわけではなく、GAD65Ab陽性NIDDMのうち、GAD65抗体価が10 U/ml以上（正常1.3 U/ml未満）の高抗体価の患者（高抗体価群）においては高率にインスリン治療が必要になるが、1.3-9.9 U/mlの低抗体価の患者（低抗体価群）はインスリン治療が必要になることが少ないと報告されている¹⁰⁾。また、GAD65Ab陽性NIDDM患者において、実際に組織学的に膵β細胞破壊を起こすと考えられる膵島炎（膵ランゲルハンス島へのリンパ球浸潤）の存在も証明されたが、これも、高抗体価群の症例であった¹¹⁾。現状では、GAD65Abが陽性ならば一般に1型糖尿病と診断されることが多いが、低抗体価群は1型として扱うべきなのか疑問が残る報告であった。しかしながら、高抗体価群と低抗体価群との間に病態の違いがあるかどうかは全く報告がない。今回著者は、この両群間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を、1、2、3、の方法で検討した。

1. 末梢血リンパ球 (PBMC; peripheral blood mononuclear cells) のポリクローナルな刺激に対するサイトカイン分泌能の検討

典型例の1型糖尿病の発症に、T helper 1 (Th1) / T helper 2 (Th2) バランスの不均衡が関与していることが、ヒト^{12,14)}およびマウス^{15, 16)}において、ここ数年来報告されてきた。いずれも、PBMCのポリクローナルな刺激に対して、Th2タイプのサイトカインの低下またはTh1タイプのサイトカインの上昇を示すことが特徴とされた。今回、高抗体価群と低抗体価群において、PBMCの抗CD3抗体で刺激した際のサイトカイン分泌能を検討した。

2. 血清 CXC chemokine ligand-10 (CXCL-10)/ interferon-inducible protein-10 (IP-10) (以下 IP-10 と略す) の検討

最近、活性化されたTh1細胞の局所への遊走を促進させるケモカインであるIP-10の血中レベルが典型例の1型糖尿病患者において上昇していることが報告された¹⁷⁾。今回、高抗体価群と低抗体価群において、血清IP-10値を検討した。

3. 膵β細胞抗原特異的の刺激に反応する末梢血CD4陽性細胞数の検討

膵β細胞抗原に対するT細胞の特異的な反応を評価するために、GAD65刺激に反応する末梢血CD4陽性細胞数を測定し、高抗体価群と低抗体価群で比較検討した。

第1表 GAD65Ab陽性NIDDM患者（高抗体価群、低抗体価群）、典型例1型糖尿病患者、GAD抗体陰性が確認された2型糖尿病患者のそれぞれの特徴

	高抗体価群	低抗体価群	典型例1型糖尿病	2型糖尿病
人数	36	48	36	47
性別 (男/女)	19/17a	14/34c	11/25c	30/17
年齢 (歳)	51.6±2.6 ^{a,b}	58.9±2.1 ^b	37.3±2.4 ^c	57.8±2.2
罹病期間 (年)	7.1±1.1 ^{a,c}	12.0±1.3 ^b	6.6±1.1 ^c	13.0±1.4
C-ペプチド (ng/ml)	1.0±0.2 ^{b,c}	1.3±0.1 ^b	0.6±0.7 ^c	2.0±0.3
GAD65Ab (U/ml)	913.8±545.6	3.4±0.3	1934±1722.2	<1.3
IA-2A陽性者	46%	28%	37%	測定せず
DR4保有者	58%	44%	59%	測定せず
DR9保有者	54%	44%	52%	測定せず
DR4 or DR9保有者	85%	81%	96%	測定せず
A24保有者	46%	43%	測定せず	測定せず
インスリン治療者	81%	54%	100%	68%

平均値±標準誤差で示した。a: p<0.05 (低抗体価群に対して), b: p<0.05 (典型例1型糖尿病患者に対して), c: p<0.05 (2型糖尿病患者に対して)

C-ペプチド: 空腹時血清C-ペプチド, GAD65Ab: 抗GAD65抗体, IA-2A: 抗IA-2抗体

対象と方法

1. 末梢血リンパ球 (PBMC) のポリクローナルな刺激に対するサイトカイン分泌能の検討

1) 対象患者 (第1表)

糖尿病診断から6ヵ月以上インスリン治療を必要としなかった GAD65Ab 陽性 NIDDM 患者 84 名を対象とし、診断時の GAD65 抗体価が 10 U/ml 以上の高抗体価群 (n=36, 51.6±2.6 歳, 男女比 19/17, 罹病期間 7.1±1.1 年, 空腹時血清 C ペプチド 1.0±0.2 ng/ml) と、1.3-9.9 U/ml の低抗体価群 (n=48, 58.9±2.1 歳, 男女比 14/34, 罹病期間 12.0±1.3 年, 空腹時血清 C ペプチド 1.3±0.1 ng/ml) に分けた。また対照として、急性発症典型例の GAD65Ab 陽性 1 型糖尿病患者 (n=36, 37.3±2.4 歳, 男女比 11/25, 罹病期間 6.6±1.1 年, 空腹時血清 C ペプチド 0.6±0.7 ng/ml) と GAD65Ab 陰性 2 型糖尿病患者 (n=47, 57.8±2.2 歳, 男女比 30/17, 罹病期間 13.0±1.4 年, 空腹時血清 C ペプチド 2.0±0.3 ng/ml) を加えた。高抗体価群と低抗体価群で、抗 IA-2 抗体 (IA-2A) の陽性率 (46 vs. 28%), 日本人 1 型糖尿病で多いとされる HLA DR4 または DR9¹⁸⁾ の保有率 (85 vs. 81%), インスリン依存への進行が速いとされる HLA A24¹⁹⁾ の保有率 (46 vs. 43%) ともすべて有意差はなかった。その他、インスリン治療者の割合など、4 群の特徴は第 1 表に示した。患者は、慶應義塾大学病院、埼玉社会保険病院、済生会中央病院の通院者で同意の得られた者とした。

2) PBMC の抗 CD3 抗体による刺激

各患者から 10 ml の末梢血を採取し、Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia, Sweden) を用いて PBMC を分離した。2% の熱処理非活化仔牛胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) (JRH Biosciences, USA) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Life Technologies, USA) を含んだ L-グルタミン添加 RPMI-1640 液 (Life Technologies, USA) を培養液 (以下、2% FBS-RPMI) とし、 1×10^6 個の PBMC を 96 穴丸底細胞培養プレート (Beckton Dickinson, USA) 上で 100 μ l の 2% FBS-RPMI 中に浮遊させた。抗 CD3 抗体 (HIT 3a; PharMingen, USA) を 2% FBS-RPMI 中に 10 μ g/ml の濃度で調製し、100 μ l ずつ加えた。最終液量 200 μ l の 2% FBS-RPMI 中に 1×10^6 個の PBMC, 抗 CD3 抗体濃度は 5 μ g/ml とした。37°C, 5% CO₂ 下で 40-48 時間培養し、上清を回収し、サイトカイン計測まで数日間-20°C で冷凍保存した。

3) PBMC の CD4, CD8, CD45RO 陽性細胞分画の評価

各患者から分離した PBMC 1×10^6 個を、2% の FBS を含んだリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (以下、2% FBS-PBS) 100 μ l に浮遊させ、抗 CD4-FITC 抗体 (Becton Dickinson) と抗 CD8-PE 抗体 (Becton Dickinson) を加えて、4°C で 10 分間静置させ染色した後、フローサイトメーター (EPICS ALTRA; Coulter, USA) を用いて解析した。また同様の方法で、抗 CD4-FITC 抗体と抗 CD45RO-PE 抗体 (PharMingen) で染色して、解析した。

4) サイトカインの計測

Th1 タイプのサイトカインとしてインターフェロン (IFN)- γ , Th2 タイプのサイトカインとしてインターロイキン (IL)-10 を計測した。上清中のサイトカインの計測には enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いた。すなわち、平底 96 穴プレート (Nunc, Denmark) に、PBS に溶かして 10 μ g/ml の濃度とした各モノクローナル抗体 (抗 IFN- γ 抗体 (NIB 42; PharMingen), 抗 IL-10 抗体 (JES3-9D7; PharMingen)) を、各ウェルに 50 μ l ずつ加えて、4°C で一晚静置しコーティングをした。0.1% の Tween20 (BioRad, USA) を加えた PBS (以下、0.1% Tween20-PBS) で洗浄した後、1% の仔牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) (Sigma, USA) を含んだ PBS (以下、1% BSA-PBS) を各ウェルに 100 μ l ずつ加え、37°C で 1 時間静置しブロッキングをした。0.1% Tween20-PBS で洗浄後、採取された上清または各サイトカインのスタンダード検体 (PharMingen) を各ウェルに 50 μ l ずつ加えて、2 時間室温で静置した。0.1% Tween20-PBS で洗浄後、ビオチン化した各抗体 (抗 IFN- γ 抗体 (4S-B3; PharMingen), 抗 IL-10 抗体 (JES3-12G8; PharMingen)) を 1% BSA-PBS に溶かして 5 μ g/ml の濃度とし、各ウェルに 50 μ l ずつ加えて、室温で 1 時間静置した。その後、AB 溶液 (Vectastain ABC kit; Vector, USA) を各ウェルに 50 μ l ずつ加えて 30 分静置した後、2,2'-azino-bis-3-ethyl benz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; Sigma) を各ウェルに 100 μ l ずつ加えて、405 nm での発色を ELISA リーダー (BIO-RAD; Richmond, USA) で調べた。検体はすべて二重に計測し、スタンダード検体より得られたスタンダードカーブより各サイトカインの濃度を求めた。IFN- γ と IL-10 の検出感度はそれぞれ 40 pg/ml, 30 pg/ml であった。同様の方法で、Th2 タイ

ブのサイトカインとして IL-4 も計測したが、この ELISA システムでは大部分の検体が検出感度以下となり検討できなかった。

5) 自己抗体の測定

GAD65 抗体価は、recombinant human GAD65 (RSR Ltd, UK) を用いた GAD65 Ab kit により測定した。この測定法では、陽性は 1.3 U/ml 以上 (健康人の平均 + 3 × 標準偏差) と定義され、感度、特異度とも 100% である (国際糖尿病免疫ワークショップ, 実験室 ID 番号 305)。陽性結果は、ヒト膵 GAD65 をコードする cDNA (pEx 9, ワシントン大学 Ake Lernmark 教授より提供) より作製した [³⁵S]-GAD65 を用いた、後述の IA-2A の測定と同様の radioligand binding 法 (インデックス 0.020 以上が陽性)²⁰⁾でも確認した。

IA-2A の測定は radioligand binding 法を用いた²⁰⁾。すなわち、ヒト膵 IA-2 の C 末側の主要なエピトープを有する cDNA (ICA 512.bdc, コロラド大学 George S Eisenbarth 教授より提供) を pc DNA II (Invitrogen, USA) に組み込み、*in vitro* transcription/translation system (Promega, USA) を用いて [³H]-IA-2 を作製した。20,000 cpm の標識蛋白を、反応溶液 (20 mM Tris hydroxymethyl aminomethan, 150 mM NaCl, 0.15% Tween 20, 0.1% Aprotinin, 10mM benzamidine) 中で 25 倍希釈した患者血清と 4°C で一晚反応させた。免疫複合体を 50 μl の 50% プロテイン A-セファロースビーズ (Pierce, USA) で沈降させた後、multiscreen assay system (Millipore, USA) を用いて反応溶液で洗浄後、セファロースビーズを回収し、トップカウント (Packard, USA) で放射活性を測定した。測定値は陽性および陰性コントロール血清を用いて、インデックスとして下式のごとく計算した。IA-2 抗体インデックス = (未知検体のカウント - 陰性コントロールのカウント) / (陽性コントロールのカウント - 陰性コントロールのカウント)

正常人におけるインデックスの分布によりインデックス 0.010 以上を陽性とした。

2. 血清 IP-10 値の検討

血清 IP-10 濃度は ELISA 法により測定した²¹⁾。すなわち、平底 96 穴プレートに、抗 IP-10 抗体 (αhIPb) を PBS に溶かして 20 μg/ml の濃度として、各ウェルに 50 μl ずつ加えて、4°C で一晚静置しコーティングをした。0.05% Tween20-PBS で洗浄後、ブロックエースを各ウェルに 100 μl ずつ加え、室温で 2 時間静置し

ロッキングをした。0.05% Tween20-PBS で洗浄後、患者血清または IP-10 のスタンダード検体を各ウェルに 50 μl ずつ加えて、1 時間室温で静置した。0.05% Tween20-PBS で洗浄後、ビオチン化抗 IP-10 抗体 (αhIPd) を 1% BSA-PBS に溶かして 0.3 μg/ml の濃度として、各ウェルに 50 μl ずつ加えて、室温で 1 時間静置した。0.05% Tween20-PBS で洗浄後、streptavidin-conjugated β-D-galactoside を各ウェルに 50 μl ずつ加えて 1 時間静置した。0.05% Tween20-PBS で洗浄後、0.01% 4-methyl-umbelliferyl-β-D-galactoside を各ウェルに 50 μl ずつ加えて 10 分間震盪し、2 mol/l の炭酸塩を各ウェルに 100 μl ずつ加え反応を停止させた後、460 nm での発色を ELISA リーダー (Fluorascan II; Labsystems, UK) で調べた。スタンダード検体より得られたスタンダードカーブより IP-10 濃度を求めた。検出感度は 10 pg/ml であった。健康人の血清 IP-10 濃度の平均値は、41.5 pg/ml であった¹⁷⁾。

3. 膵β細胞抗原特異的刺激に反応する末梢血 CD4 陽性細胞数の検討

抗原特異的なサイトカイン反応を調べるため、GAD65 刺激に反応する末梢血 CD4 陽性細胞数を計測した。患者の全血 500 μl を 5 ml ポリスチレン丸底チューブ (Beckton Dickinson) に入れ、10% FBS と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含んだ L-グルタミン添加 RPMI-1640 液を培養液 (10% FBS-RPMI) として 500 μl 加え、さらに 1 μg の抗 CD28 抗体 (L293; Beckton Dickinson) を副刺激として加えたものを 2 本用意し、1 本にはリコンビナント GAD65 (RSR, UK) を 5 μg/ml 加えた。攪拌後、37°C、5% CO₂ 下で 72 時間培養し、最後の 4 時間は 10 μg/ml のプレフェルジン A (Sigma) を加えた。培養後、それぞれ 300 μl ずつ別のチューブに分け、20 μl の抗 CD4-PC5 抗体 (Coulter, France) を加え攪拌し、室温で 15 分間静置した。4 ml の FACS lysing solution (Beckton Dickinson) を加え攪拌し、室温で 10 分間静置した。1600 回転で 5 分間遠心後、上清を捨て、細胞を 0.1% BSA-PBS で洗浄し、1.5 ml の FACS permeabilizing solution (Beckton Dickinson) を加え攪拌し、暗室温で 10 分間静置した。0.1% BSA-PBS で洗浄後、一方に 20 μl の混合抗体 (抗 IFN-γ-FITC 抗体と抗 IL-4-PE 抗体; Beckton Dickinson) と一方に 20 μl の混合アインタイプコントロール (抗 IgG2a-FITC 抗体と抗 IgG1-PE 抗体; Beckton Dickinson) を加え攪拌し、暗室温で 30 分間静置した。洗浄後、フローサイトメー

ター (EPICS ALTRA) を用いて解析した。

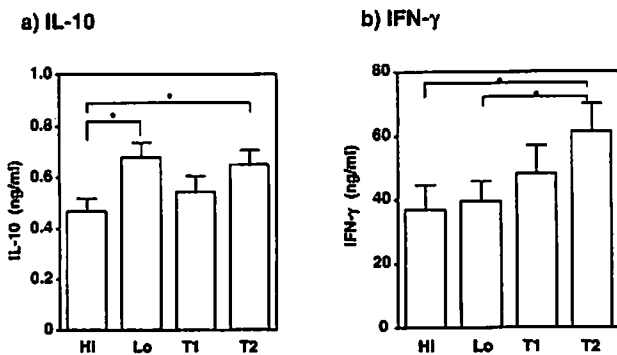
4. 統計学的解析

サイトカイン濃度の群間の比較は、正規分布を示したため unpaired *t*-test を用いて解析した。成績は平均値 ± 標準誤差で示した。血清 IP-10 値あるいは GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数の群間の比較は、正規分布を示さないため Mann-Whitney *U*-test を用いて解析した。血清 IP-10 値と GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数の相関は、Spearman の順位相関を使用した。

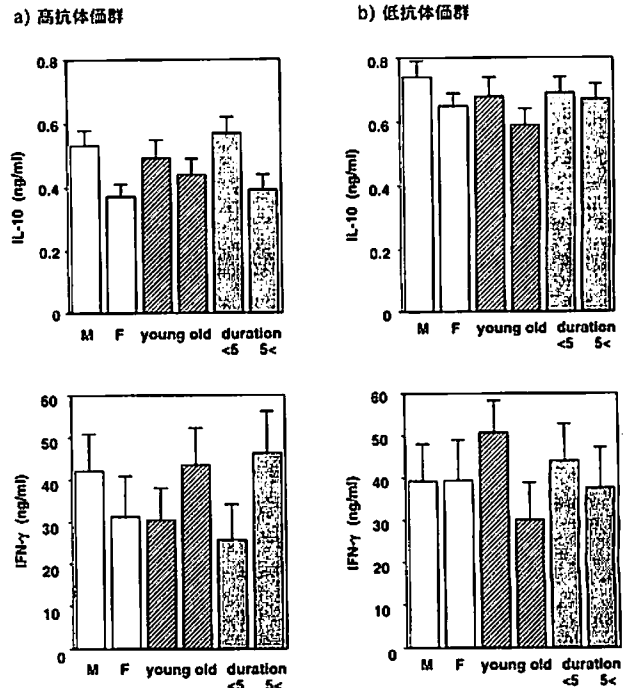
結果

1. 末梢血リンパ球 (PBMC) のポリクローナルな刺激に対するサイトカイン分泌能の検討

はじめに、ポリクローナルな T 細胞の反応を比較するため、PBMC の抗 CD3 抗体刺激 (5 μ g/ml) に対するサイトカイン分泌能 (Th2 タイプのサイトカインとして IL-10, Th1 タイプのサイトカインとして IFN- γ) を 4 群で比較した。第 1 図に示すように、IL-10 産生能は、高抗体価群 (n=36, 0.46 \pm 0.05 ng/ml) が低抗体価群 (n=48, 0.68 \pm 0.06 ng/ml) と 2 型糖尿病 (n=47, 0.65 \pm 0.06 ng/ml) に比して、有意に低値を示した (それぞれ、*p*<0.05, *p*<0.05)。IFN- γ 産生能は、



第 1 図 PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対する IL-10 (a), IFN- γ (b) の産生能の 4 群間の比較。Hi (n=36) : GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群), Lo (n=48) : GAD65Ab 陽性 NIDDM (低抗体価群), T1 (n=36) : 典型例 1 型糖尿病患者, T2 (n=47) : 2 型糖尿病患者。**p*<0.05。IL-10 産生能は、高抗体価群が低抗体価群と 2 型糖尿病患者に比して有意に低値を示した。IFN- γ 産生能は、高抗体価群と低抗体価群に有意差はなかった。

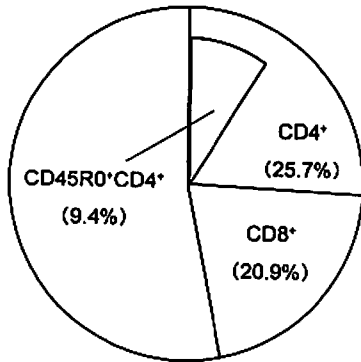


第 2 図 性別、年齢、罹病期間の GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群 (a)、低抗体価群 (b)) におけるサイトカイン産生能への影響。PBMC を抗 CD3 抗体で刺激した際のサイトカイン (IL-10, IFN- γ) 産生量を示す。M : 男性, F : 女性, young : 年齢平均値よりも若年, old : 年齢平均値よりも高齢, duration : 罹病期間, < 5 : 5 年未満, > 5 : 5 年以上。高抗体価群, 低抗体価群各々において、性別、年齢、罹病期間は、IL-10 および IFN- γ 産生能に有意な影響を与えなかった。

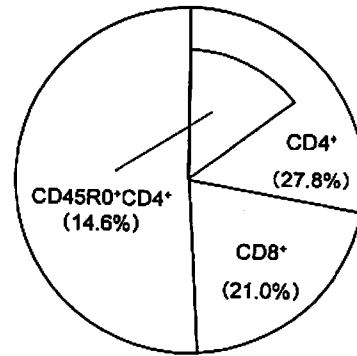
高抗体価群と低抗体価群に有意差はなかった (両群とも 2 型糖尿病に比して有意に低値を示した)。

第 1 表に示すように、4 群間において、性別、年齢、罹病期間に差異が存在したため、これらが高抗体価群、低抗体価群各々においてポリクローナルな刺激に対する T 細胞のサイトカイン分泌能に影響を与えないかどうか確認した。第 2 図に示すように、男女差については、高抗体価群で、IL-10 産生能は男性 0.53 ng/ml に対して女性 0.37 ng/ml, IFN- γ 産生能は男性 42.1 ng/ml に対して女性 31.1 ng/ml, 低抗体価群で、IL-10 産生能は男性 0.74 ng/ml に対して女性 0.65 ng/ml, IFN- γ 産生能は男性 39.2 ng/ml に対して女性 39.4 ng/ml と有意差を認めなかった。年齢差については各群の年齢平均値よりも若年か高齢かで比較したところ、高抗体価群で、IL-10 産生能は若年 0.49 ng/ml に対して高齢 0.44 ng/ml, IFN- γ 産生能は若年 30.3 ng/ml に対して高齢

a) 高抗体価群

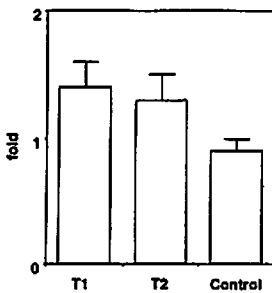


b) 低抗体価群

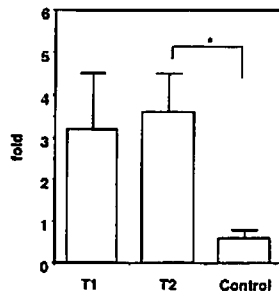


第3図 GAD65Ab陽性NIDDM (高抗体価群 (a), 低抗体価群 (b))における末梢血T細胞分画 (CD4陽性細胞, CD8陽性細胞, CD45RO陽性CD4陽性細胞)の検討。CD4⁺: CD4陽性細胞, CD8⁺: CD8陽性細胞, CD45RO⁺CD4⁺: CD45RO陽性CD4陽性細胞。高抗体価群と低抗体価群で, 末梢血T細胞分画に有意差はなかった。

a) IL-10

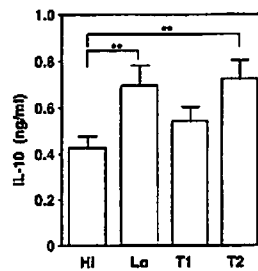


b) IFN-γ

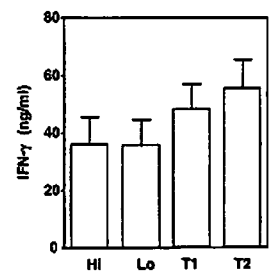


第4図 PBMCの抗CD3抗体刺激に対するIL-10 (a), IFN-γ (b)の産生能のインスリン治療前と2週間後の変化の検討 (2週間後の値/治療前の値)。T1 (n=13): 典型例1型糖尿病患者, T2 (n=20): 2型糖尿病患者, Control (n=9): インスリン治療をせずに2週間の間隔を開けて同様に検討した健常者。*p<0.05, 典型例1型糖尿病患者, 2型糖尿病患者ともに, インスリン治療によってIL-10およびIFN-γ産生能が亢進した。

a) IL-10



b) IFN-γ



第5図 PBMCの抗CD3抗体刺激に対するIL-10 (a), IFN-γ (b)の産生能の4群間の比較 (インスリン治療者のみ)。Hi (n=29): GAD65Ab陽性NIDDM (高抗体価群), Lo (n=26): GAD65Ab陽性NIDDM (低抗体価群), T1 (n=36): 典型例1型糖尿病患者, T2 (n=30): 2型糖尿病患者。**p<0.01。IL-10産生能は, 高抗体価群が低抗体価群と2型糖尿病患者に比して有意に低値を示した。IFN-γ産生能は, 高抗体価群と低抗体価群に有意差はなかった。

(Suzuki R et al : J Autoimmun 20 : 83-90, 2003 の Fig. 1 より許可を得て転載)

43.4 ng/ml, 低抗体価群で, IL-10産生能は若年 0.68 ng/ml に対して高齢 0.59 ng/ml, IFN-γ産生能は若年 50.7 ng/ml に対して高齢 30.0 ng/ml とやはり有意差を認めなかった。罹病期間については5年未満か5年以

上かで比較したところ, 高抗体価群で, IL-10産生能は5年未満 0.57 ng/ml に対して5年以上 0.39 ng/ml, IFN-γ産生能は5年未満 25.6 ng/ml に対して5年以上 46.3 ng/ml, 低抗体価群で, IL-10産生能は5年未満

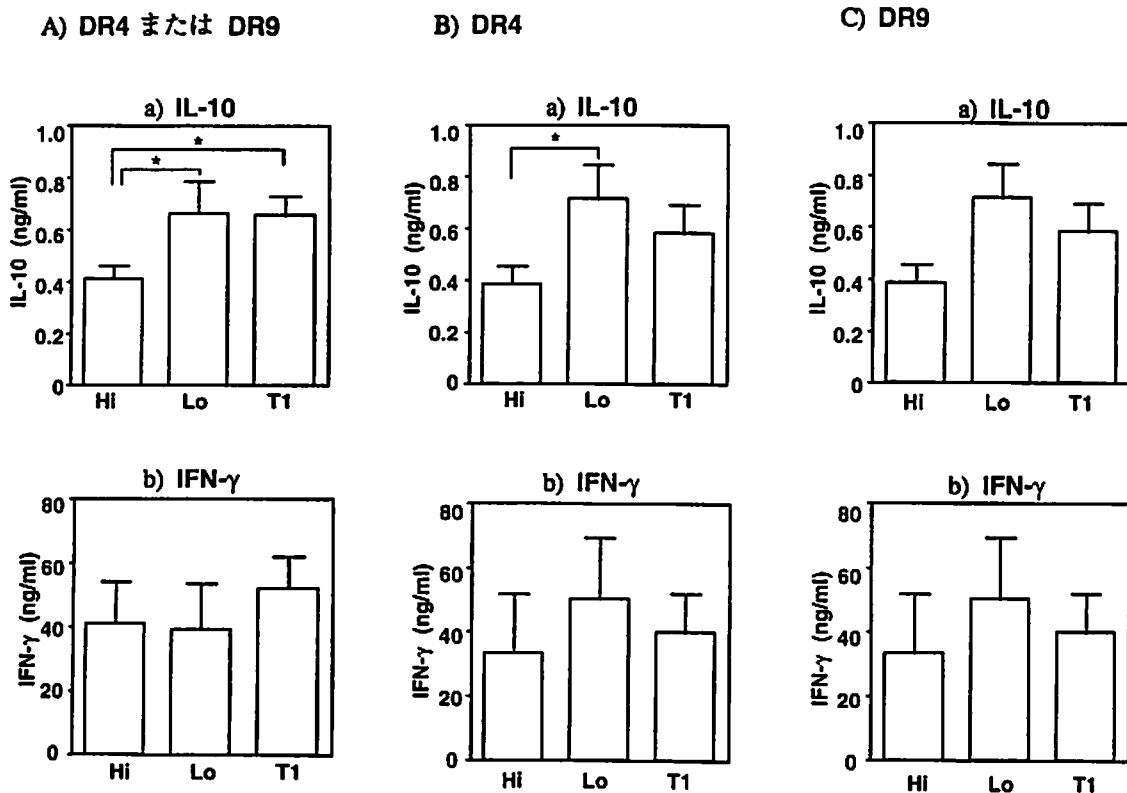
0.69 ng/ml に対して 5 年以上 0.67 ng/ml, IFN- γ 産生能は 5 年未満 44.1 ng/ml に対して 5 年以上 37.4 ng/ml と同様に有意差を認めなかった。

さらに、抗 CD3 抗体刺激では T 細胞すべてが刺激されるため、サイトカイン分泌能を検討する際には T 細胞の CD4, CD8 の占める割合に差がないことが前提となることを考慮し、末梢血 T 細胞分画につき検討した。その結果、第 3 図に示すように、高抗体価群と低抗体価群で、CD4 陽性細胞（高抗体価群 25.7% に対して低抗体価群 27.8%）、CD8 陽性細胞（高抗体価群 20.9% に対して低抗体価群 21.0%）、CD45RO 陽性 CD4 陽性細胞（高抗体価群 9.4% に対して低抗体価群 14.6%）に有意差がないことを確認した。

また、インスリン治療により PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対するサイトカイン産生能が変化するかを検討した。その結果、1 型糖尿病においては、インスリン治療 2 週

間後のサイトカイン産生能が治療前に比して、IL-10 は 1.4 ± 0.2 倍、IFN- γ は 3.2 ± 1.4 倍、また 2 型糖尿病においては、IL-10 は 1.3 ± 0.2 倍、IFN- γ は 3.6 ± 0.9 倍と、ともにインスリン治療によってサイトカイン産生能が亢進するという結果を得た（第 4 図）。

このためインスリン治療者に限定して PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対するサイトカイン産生能を再検討したところ、第 5 図に示すように、IL-10 産生能は、高抗体価群 ($n=29$, 0.42 ± 0.05 ng/ml) が低抗体価群 ($n=26$, 0.70 ± 0.09 ng/ml) と 2 型糖尿病 ($n=30$, 0.72 ± 0.08 ng/ml) に比して、有意に低値を示した（それぞれ、 $p < 0.01$, $p < 0.01$ ）。すなわち、高抗体価群は典型例の 1 型糖尿病 ($n=36$, 0.54 ± 0.06 ng/ml) と同レベルの、また低抗体価群は 2 型糖尿病と同レベルの IL-10 産生能を示した。IFN- γ 産生能にはやはり両群間に有意差はなかった。



第 6 図 PBMC の抗 CD3 抗体刺激に対する IL-10 (a), IFN- γ (b) の産生能の 3 群間の比較 (インスリン治療者における HLA タイプ別の検討)。A : DR4 もしくは DR9 の保有者, B : DR4 保有者, C : DR9 保有者。Hi ($n=20$ (A), $n=13$ (B), $n=13$ (C)) : GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群), Lo ($n=14$ (A), $n=10$ (B), $n=6$ (C)) : GAD65Ab 陽性 NIDDM (低抗体価群), T1 ($n=26$ (A), $n=16$ (B), $n=14$ (C)) : 典型例 1 型糖尿病患者。* $p < 0.05$ 。IL-10 産生能は、DR4 もしくは DR9 の保有者および DR4 保有者で高抗体価群が低抗体価群に比して有意に低値を示し、DR9 保有者でも有意差はなかったが高抗体価群が低抗体価群に比して低値を示した。IFN- γ 産生能は、各 HLA タイプにおいて高抗体価群と低抗体価群に有意差はなかった。

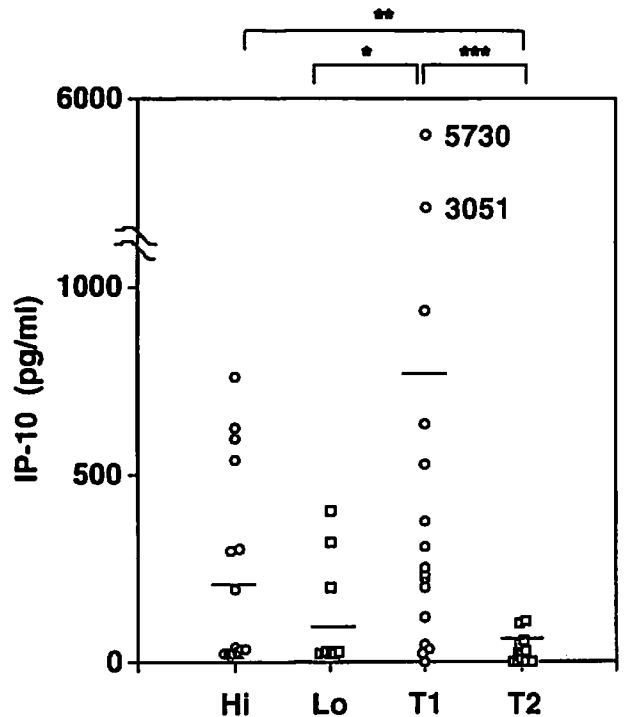
日本人の1型糖尿病における疾患感受性HLAタイプはDR4およびDR9であるため、HLAタイプ別に再検討したところ、第6図に示すように、DR4もしくはDR9の保有者、DR4保有者、DR9保有者のいずれにおいてもPBMCの抗CD3抗体刺激に対するIL-10産生能は同様の傾向が確認された。IFN- γ 産生能については、高抗体価群、低抗体価群とでやはりHLAタイプ別に分けても差を認めなかった。

2. 血清IP-10値の検討

4群の一部[GAD65Ab陽性NIDDM高抗体価群(n=18)、GAD65Ab陽性NIDDM低抗体価群(n=10)、典型例1型糖尿病患者(n=16)、2型糖尿病患者(n=17)]について、血清IP-10値を比較した。以前、罹病期間の短い自己免疫性1型糖尿病において血清IP-10値が高いことが報告されているため¹⁹⁾、今回、罹病期間10年未満の患者に限定して検討した。血清IP-10値に影響を与えることが知られている慢性肝炎やその他ウイルス感染症の患者は含まれていないことを確認した。第2表に示すように、高抗体価群と低抗体価群で性別、年齢、罹病期間、HLA DR4またはDR9の保有率(高抗体価群85%に対して低抗体価群56%)には有意差を認めなかったが、IA-2Aの陽性率(高抗体価群50%に対して低抗体価群0%)には有意差を認めた。このため、高抗体価群においてIA-2A陽性者(n=9)とIA-2A陰性者(n=9)とで血清IP-10値に違いがないか検討したが、陽性者は平均150.7(中値34)pg/mlに対して、陰性者は平均250.0(中値34)pg/mlであり有意差は認めなかった。また、インスリン治療者の割合(高抗体価群89%に対して低抗体価群20%)にも有意差を認め

たため、インスリン治療者(n=18)とインスリン未使用者(n=10)とで血清IP-10値に違いがないか検討したが、治療者は平均169.5(中値34)pg/mlに対して未使用者は平均165.1(中値24.5)pg/mlであり有意差は認めなかった。

第7図に示すように、高抗体価群の血清IP-10値(平均200.2(中値34)pg/ml)は、低抗体価群(平均108.9(中値26)pg/ml)より高い傾向を認め、2型糖尿病患者(平均32.9(中値19)pg/ml)より有意に高かったが(p<0.01)、典型例1型糖尿病患者(平均793.0(中値242.5)pg/ml)とは有意差を認めなかった。一方、典型例1型糖尿病患者の血清IP-10値は、低抗体価群および2型糖尿病患者より有意に高かった(そ



第7図 血清IP-10値の4群間の比較(罹病期間10年未満)。Hi (n=18) : GAD65Ab陽性NIDDM(高抗体価群)、Lo (n=10) : GAD65Ab陽性NIDDM(低抗体価群)、T1 (n=16) : 典型例1型糖尿病患者、T2 (n=17) : 2型糖尿病患者。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001。血清IP-10値は、高抗体価群が低抗体価群に比して有意差は認めなかったが高い傾向であった。典型例1型糖尿病患者が低抗体価群と2型糖尿病患者に比して有意に高値を示し、高抗体価群が2型糖尿病患者に比して有意に高値を示した。

(Suzuki R et al : J Autoimmun 20 : 83-90, 2003 の Fig. 2 より許可を得て転載)

第2表 GAD65Ab陽性NIDDM患者(高抗体価群、低抗体価群;罹病期間10年未満)の背景

	高抗体価群	低抗体価群
人数	18	10
性別(男/女)	9/9	5/5
年齢(歳)	46.5±3.7	52.5±4.8
罹病期間(年)	3.8±0.7	2.2±0.5
IA-2A陽性者	50% ^a	0%
DR4保有者	46%	33%
DR9保有者	69%	22%
DR4 or DR9保有者	85%	56%
インスリン治療者	89% ^a	20%

平均値±標準誤差で示した。a : p<0.05(低抗体価群に対して) GAD65Ab : 抗GAD65抗体、IA-2A : 抗IA-2抗体

それぞれ、 $p < 0.05$, $p < 0.001$). 低抗体価群と 2 型糖尿病患者の血清 IP-10 値には有意差を認めなかった。以上より、高抗体価群と低抗体価群の血清 IP-10 値には違いがあると結論付けた。

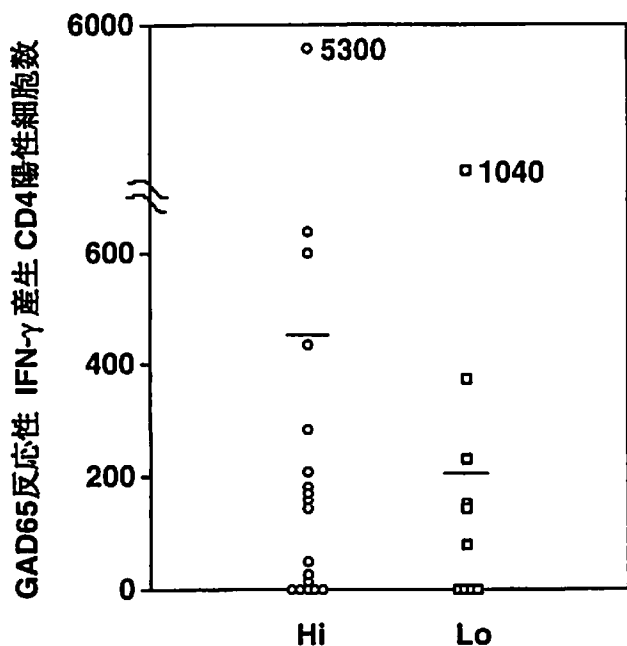
3. 膵 β 細胞抗原特異的刺激に反応する末梢血 CD4 陽性細胞数の検討

第 2 表に示した、GAD65Ab 陽性 NIDDM 高抗体価群 ($n=18$) と GAD65Ab 陽性 NIDDM 低抗体価群 ($n=10$) について、末梢血の GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数を検討した。抗原特異的に反応する T 細胞の検出には他に ELISPOT 法などがあり、この ELISPOT 法による検出感度は T 細胞 1,000-10,000 個に 1 個程度とされているが、Waldrop らによるとフローサイトメーターを用いた細胞内サイトカイン染色法を用いることにより CD4 陽性 T 細胞 50-1,000 個に 1 個の抗原特異的 T 細胞が検出可能であると報告されている²¹。今回の著者の検討では、健常人の末梢血 GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数の平均は CD4 細胞

50,000 個あたり 7.7 個であった。第 8 図に示すように、高抗体価群では低抗体価群に比して、CD4 細胞 50,000 個あたりの GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数は有意ではなかったが多い傾向を示した (高抗体価群平均 456 個に対して低抗体価群平均 202 個)。このように高抗体価群は、血清 IP-10 値と GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数の両者とも、低抗体価群に比して高い傾向を示した。さらに血清 IP-10 値と GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数との相関について検討したところ、低抗体価群では両者の相関を認めなかったが、高抗体価群では両者に有意な正相関を認めた ($p < 0.05$)。以上により、血清 IP-10 値と GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数とが同時に高いことが、高抗体価群におけるインスリン依存状態への進行の速さに関与している可能性が示唆された。なお、今回末梢血 GAD65 反応性 IL-4 産生 CD4 陽性細胞数も測定したが、大部分の患者において検出感度以下であった。

考 察

GAD65Ab 陽性 NIDDM が、単に GAD65Ab が陽性というだけで抗体価にかかわらずすべて 1 型糖尿病と診断して良いかどうかは結論が出ていない。臨床的な経過からは、GAD65Ab 陽性 NIDDM の高抗体価群は、インスリン依存に進行しやすく、緩徐進行 1 型糖尿病のインスリン非依存期として良いが、低抗体価群は 2 型糖尿病として扱ってもよいのではないかと推察されている¹⁰。そこで、1 型糖尿病は大部分が T 細胞を主体とする細胞性免疫異常に基づく自己免疫疾患とされていることから、高抗体価群と低抗体価群の T 細胞機能の違いを評価することとした。今回の研究で、ポリクローナルな T 細胞の反応性を検討した結果、高抗体価群でのみ IL-10 産生能の低下が認められ、低抗体価群では認められなかった。過去のいくつか報告により、典型例 1 型糖尿病の発症に Th1/Th2 バランスの不均衡が関与していることが明らかにされている。すなわち、(1) 罹病期間の短い典型例 1 型糖尿病において phytohemagglutinin (PHA) 刺激に対する PBMC の IL-4 産生能が低下していたこと¹²)、(2) 典型例 1 型糖尿病で PHA 刺激に対する全血の IFN- γ 産生能とその IL-4 または IL-10 産生能に対する比 (IFN- γ /IL-4 または IFN- γ /IL-10) が亢進していたこと¹³)、(3) 典型例 1 型糖尿病で PHA 刺激に対する PBMC の IL-4 または IL-10 産生能の低下と長時間刺激による IFN- γ 産生能が亢進していたこと¹⁴)、などがある。これらの報告はいずれも、典型例 1 型糖尿



第 8 図 GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群および低抗体価群) における GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数。Hi ($n=18$): GAD65Ab 陽性 NIDDM (高抗体価群), Lo ($n=10$): GAD65Ab 陽性 NIDDM (低抗体価群)。Y 軸は CD4 陽性細胞 50,000 個あたりの GAD65 反応性 IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞数を示す。高抗体価群が低抗体価群に比して有意差は認めなかったが多い傾向を示した。

病ではポリクローナルな刺激に対して「Th2の低下」あるいは「Th1の亢進」が特徴である、としている。今回明らかにされたIL-10産生能の低下を特徴とする高抗体価群は、典型例1型糖尿病と近い病態を有しており、低抗体価群とは異なると考えられた。IL-10はTh2細胞以外に、Th1介在免疫応答を抑制する調節性Th細胞であるTr1細胞からも産生されるサイトカインであり²⁹⁾、本研究ではIL-4に関しての評価が困難であったことから、「Th2細胞の機能異常」とは断定できず、「Tr1細胞の機能異常」である可能性もあり、今後さらなる検討が必要と考えられるが、少なくともTh1を抑制するIL-10産生能の低下が高抗体価群の病態形成に関与していることが示唆された。一方で、IFN- γ 産生能については高抗体価群と低抗体価群とで差を認めなかった。ポリクローナルな刺激による活性化では、IFN- γ のようなTh1タイプのサイトカインは、メモリーCD4、ナイーブCD4、CD8細胞などから産生されるが、IL-10のようなTh2(もしくはTr1)タイプのサイトカインは、メモリーCD4細胞から主に産生される²⁹⁾。そのため、抗CD3抗体刺激によるIL-10産生は、おそらく膵 β 細胞抗原を含む何らかの抗原を認識したメモリーCD4細胞からのものと推察された。また、Th1タイプのサイトカインは、ポリクローナルな刺激ではなく、抗原特異的な刺激に対する反応をみるべきであり、末梢血のGAD65反応性IFN- γ 産生CD4陽性細胞数の測定を試みることにした。さらに、活性化されたTh1細胞の局所への遊走を促進させるケモカインであり、典型例1型糖尿病患者で高値を示すことが報告された血清IP-10値¹⁷⁾についても検討した。その結果、高抗体価群と典型例1型糖尿病における血清IP-10値は両群で有意な差を認めず、また低抗体価群と2型糖尿病の血清IP-10値についても有意差を認めなかった。一方で、高抗体価群の血清IP-10値は2型糖尿病に比較して有意に高く、また低抗体価群の血清IP-10値は典型例1型糖尿病に比較して有意に低かった。従って、局所(膵島)における病勢(膵島炎)の活動性については、高抗体価群は典型例1型糖尿病に類似しており、低抗体価群とは異なる病態であると推察された。ただし、慢性活動性肝炎において血清IP-10値が高値を示す²¹⁾ことが報告されていることから、今回の対象患者から肝炎患者を除外(HBs抗原およびHCV抗体陽性者を除外)しているものの、完全には膵島に関連した自己免疫の病態以外の原因によって血清IP-10値が高値を示している可能性を否定できないため、末梢血のGAD65反応性IFN- γ 産生CD4陽性細胞数の同時測定も不可欠と考えられた。その結果、高抗体

価群の方が低抗体価群に比してGAD65反応性IFN- γ 産生CD4陽性細胞数が多い傾向にはあるものの、両群ともにGAD65反応性CD4細胞が検出された。しかしここで重要なことは、高抗体価群においてのみ血清IP-10値とGAD65反応性IFN- γ 産生CD4陽性細胞数との間に有意な正相関を認め、低抗体価群ではこのような相関は認められなかったことである。この高抗体価群において認められた結果は、自己抗体陽性の典型例1型糖尿病において、同様に血清IP-10値とGAD65反応性IFN- γ 産生CD4陽性細胞数の有意な正相関を認めたとする報告¹⁷⁾と合致するものであった。このように高抗体価群のみにおいて両者が正相関した結果から、血清IP-10値は高抗体価群においてのみ膵島に関連した自己免疫反応を示すものと推察された。なお、今回、膵 β 細胞抗原特異的な刺激としてGAD65のみを用いIA-2による検討をしなかった理由としては、GAD65は酵母によって作られたものであるのに対して、IA-2は大腸菌を用いて作られたものであり、エンドトキシン濃度が高いために非特異的な反応が検出される可能性が高いと考えたからである。本研究で用いたGAD65抗原はchromogenic assay法によってエンドトキシン濃度を測り、国際糖尿病免疫ワークショップにより問題ないとされる低濃度であることが確認されている。

膵 β 細胞機能の残存しているGAD65Ab陽性NIDDMにおいては、インスリン依存状態への進展、すなわち緩徐進行1型糖尿病の可能性について診断することが重要である。インスリン依存状態に陥ると血糖値を良好に保つことが非常に困難となり、ひいては合併症出現の危険が高まるからである。膵 β 細胞機能のまだ比較的保たれる早期の段階から少量のインスリン治療を開始することにより膵 β 細胞機能の保持が可能かどうかは結論されていないが(最近、中間報告ではあるが、膵 β 細胞機能の十分保たれた高抗体価群で、早期からのインスリン治療が膵 β 細胞機能の保持に有効であることが確認された²⁵⁾)、将来インスリン依存となる確率の高い患者群を抽出して、インスリンによる早期介入を試みる必要はあると考えられる。この際、インスリンを使用しなくてもインスリン依存にならない患者もいることを念頭に置き、不必要な介入は避ける必要がある。臨床的な経過からは、GAD65Ab陽性NIDDMにおいて、「インスリン治療への進展度」という観点でGAD65Abの抗体価のカットオフ値を検討した場合、カットオフ値を1.3 U/mlではなく10 U/mlに設定し直すべきと報告されている¹⁰⁾。著者の今回のGAD65Ab陽性NIDDM患者におけるT細胞機能に関する検討結果は、その報

告を強く支持するものである。低抗体価群においては、GAD65 反応性 CD4 陽性細胞が存在するものの、病勢（膵島炎）の活動性を必ずしも反映していないと考えられ、単に GAD65Ab が陽性というだけで典型例 1 型糖尿病と同様に治療されるべきではないと考えられる。高抗体価群や典型例 1 型糖尿病で認められた、膵島抗原反応性の T 細胞とそれを局所へ遊走させる IP-10 のような因子がともに同期して高値を示すことが病勢の進展に重要であると考えられる。

今回の対象において、高抗体価群と低抗体価群とで IA-2A の陽性率に有意な差を認めなかったが、IA-2A は膵β細胞の破壊と強い関連があると考えられており²⁶⁾、今回の検討でも実際に低抗体価群の IA-2A 陽性患者は現在全員 (n=9) がインスリンで治療されていることから、低抗体価群であっても IA-2A 陽性患者についてはインスリン依存への進展の可能性を常に念頭に置く必要はある。また、GAD65Ab 陽性 NIDDM の自然史につき、UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) においては、インスリン依存への進展のリスクと年齢との関係が検討されており、45 歳未満では 3-6 年で高率にインスリン治療が必要となるが、45 歳以上では 3 割程度に留まることが報告されている²⁷⁾。今回の検討においても実際、低抗体価群であっても 45 歳未満の患者は現在全員 (n=7) がインスリンで治療されていた。従って、低抗体価群であっても 45 歳未満の場合には早期にインスリン治療を開始する必要があることを示唆している。現状においては、GAD65 抗体価をまず確認し、IA-2A、年齢についても加味しながらインスリン依存への進行のリスクにつき予知を試みるべきではないかと考えられた。

今回の検討により、GAD65Ab 陽性 NIDDM の高抗体価群と低抗体価群において、T 細胞機能につき差異が存在することが確認された。この違いは両者の病態を考える上で非常に重要な知見であり、膵β細胞機能の残存している GAD65Ab 陽性 NIDDM 患者を「細分類する」必要性を示唆しており、膵β細胞機能を保持するために介入を行う際の適応の決定に大きく寄与するものと考えられた。

総括

GAD65Ab 陽性 NIDDM では、GAD65 抗体価が 10 U/ml 以上の高抗体価群は高率にインスリン依存状態へ進行するが、10 U/ml 未満の低抗体価群はインスリン非依存状態のまま経過すること多い。この両群間の病態

の差を明らかにするため、両群における T 細胞機能の差異を検討した。その結果、

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 産生能については、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、高抗体価群においてのみ血清 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. GAD65Ab 陽性 NIDDM において、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、これらの成績は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であった。

以上は、高抗体価群においては早期にインスリンによる介入を開始し、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。

謝辞

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、本研究に際し、直接御指導、御校閲をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室島田朗講師に深謝いたします。さらに、本研究に終始、御指導、御協力いただいた埼玉社会保険病院内科丸山太郎先生に感謝いたします。また、血清 IP-10 値の測定に御協力頂いた東京大学大学院医学研究科分子予防医学教室成見正作先生に深謝いたします。

本論文は、Suzuki R, Shimada A, Maruyama T, Funae O, Morimoto J, Kodama K, Oikawa Y, Kasuga A, Matsubara K, Saruta T, Narumi S : T-cell function in anti-GAD65⁺ diabetes with residual β-cell function. *J Autoimmun* 20 : 83-90, 2003 の一部を含む。

本論文の要旨は、第42, 43, 44回日本糖尿病学会年次学術集会 (1999, 2000, 2001年), 第98回日本内科学会講演会 (2001年), 第29, 30回日本免疫学会年次学術集会 (1999, 2000年), 第62回アメリカ糖尿病学会総会 (2002年), 第4回 Immunology of Diabetes Society Congress (1999年, イタリア) にて報告した。

文 献

- 1) Tisch R, McDevitt H : Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85 : 291-297, 1996
- 2) The Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus : Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20 : 1182-1197, 1997
- 3) Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y : A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. *N Engl J Med* 342 : 301-307, 2000
- 4) Kobayashi T, Tamemoto K, Nakanishi K, Kato N, Okubo M, Kajio H, Sugimoto T, Murase T, Kosaka K : Immunogenetic and clinical characterization of slowly progressive IDDM. *Diabetes Care* 16 : 780-788, 1993
- 5) Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Mackay IR : Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adult with non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes* 42 : 359-362, 1993
- 6) Kobayashi T, Nakanishi K, Murase T, Kosaka K : Small dose of subcutaneous insulin as a strategy for preventing slowly progressive β -cell failure in islet cell antibody-positive patients with clinical features of NIDDM. *Diabetes* 45 : 622-626, 1996
- 7) Kasuga A, Maruyama T, Ozawa Y, Takei I, Falorni A, Lernmark A, Saruta T : Antibody to Mr 65,000 isoform of glutamic acid decarboxylase are detected in non-insulin-dependent diabetes in Japanese. *J Autoimmun* 9 : 105-111, 1996
- 8) Abiru N, Takino H, Yano M, Kawasaki E, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Akazawa S, Nagataki S : Clinical evaluation of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients with autoantibodies to glutamic acid decarboxylase. *J Autoimmun* 9 : 683-688, 1996
- 9) Maruyama T, Kasuga A, Ozawa Y, Nagata A, Abiko F, Suzuki Y, Saruta T : Glutamic acid decarboxylase (GAD65) antibodies and insulin auto-antibodies in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr J* 44 : 43-51, 1997
- 10) Kasuga A, Maruyama T, Nakamoto S, Ozawa Y, Suzuki Y, Saruta T : High-titer autoantibodies against glutamic acid decarboxylase plus auto-antibodies against insulin and IA-2 predicts insulin requirement in adult diabetic patients. *J Autoimmun* 12 : 131-135, 1999
- 11) Shimada A, Imazu Y, Morinaga S, Funae O, Kasuga A, Atsumi Y, Matsuoka K : T-cell insulinitis found in anti-GAD65⁺ diabetes with residual β -cell function. *Diabetes Care* 22 : 615-617, 1999
- 12) Bermann MA, Sandborg CI, Wang Z, Imfeld KL, Zaldiver FJ, Dadufalza V, Buckingham BA : Decreased IL-4 production in new onset type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 157 : 4690-4696, 1996
- 13) Kallmann BA, Huther M, Tubes M, Feldkamp J, Bertrams J, Gries FA, Lampeter EF, Kolb H : Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes* 46 : 237-243, 1997
- 14) Rapoport MJ, Mor A, Vardi P, Ramot Y, Winker R, Hindi A, Bistrizter T : Decreased secretion of Th2 cytokines precedes up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 11 : 635-642, 1998
- 15) Shimada A, Rohane P, Fathmann CG, Charlton B : Pathogenic and protective roles of CD45RB^{hi} CD4⁺ cells correlate with cytokine profiles in spontaneously autoimmune diabetic mouse. *Diabetes* 45 : 71-78, 1996
- 16) Shimada A, Charlton B, Taylor EC, Fathmann CG : β -cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45 : 1063-1067, 1996
- 17) Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T, Narumi S : Elevated serum IP-10 level observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24 : 510-515, 2001
- 18) 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
- 19) Homeyman MC, Harrison LC, Drummond B, Colman PG, Tait BD : Analysis of families at risk for insulin-dependent diabetes mellitus reveals that HLA antigens influence progression to clinical disease. *Mol Med* 1 : 576-582, 1995
- 20) Kasuga A, Ozawa Y, Maruyama T, Ishihara T, Amemiya S, Saruta T : Autoantibody against ICA512 did not improve test sensitivity for slowly progressive IDDM in adults. *Diabetes Care* 20 : 679-689, 1998
- 21) Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T : Expres

- sion of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 158 : 5536-5544, 1997
- 22) Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ : Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry : evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 99 : 1739-1750, 1997
- 23) Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG : A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389 : 737-742, 1997
- 24) Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C : Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159 : 197-207, 1993
- 25) Maruyama T, Shimada A, Kanatsuka A, Kasuga A, Takei I, Yokoyama J, Kobayashi T : Multicenter prevention trial of slowly progressive type 1 diabetes with small dose of insulin (the Tokyo Study) : preliminary report. *Ann N Y Acad Sci* 1005 : 362-369, 2003
- 26) Yamada K, Yuan X, Inada C, Hayashi H, Koyama K, Ichikawa F, Eisenbarth GS, Nonaka K : Combined measurements of GAD65 and ICA512 antibodies in acute onset and slowly progressive IDDM. *Diabetes Res Clin Pract* 35 : 91-98, 1998
- 27) Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR, Shattock M, Bottazzo GF, Holman R : UKPDS 25 : Autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet* 350 : 1288-1293, 1997
-

学位論文

HDL コレステロールに関する遺伝因子の研究
—日本人女性における CETP 遺伝子 Taq IB 多型と
Apo A-I 遺伝子 MspI 多型の意義—

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導: 猿田亨男教授)

中村佳子

(平成 16 年 11 月 24 日受付)

Key Words: high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), cholesteryl ester transfer protein (CETP), apolipoprotein A-I (Apo A-I), gene, polymorphism

High density lipoprotein cholesterol (以下 HDL-C と略す) は末梢細胞からコレステロールを引き抜く「コレステロール逆転送系」といわれる生体にとって重要な動脈硬化防御機構に関わっているため、高 HDL-C 血症は冠動脈疾患発症の危険を減少させると言われている^{1), 2)}。血清 HDL-C 値とその分画は喫煙、飲酒、身体活動性、エストロゲン、肥満などの多くの環境因子の影響を受けることが報告されてきたが³⁻⁶⁾、近年、遺伝子研究の進歩により HDL-C の代謝に関与する様々な酵素や生化学因子に関与する遺伝子の多型や変異が明らかにされ、遺伝因子についても注目されるようになった。

遺伝因子の中でも最近注目されているものにコレステロールエステル転送蛋白 (cholesteryl ester transfer protein; 以下 CETP と略す) と apolipoprotein A-I (以下 Apo A-I と略す) がある。CETP は 476 のアミノ酸からなる親水性の糖タンパクであり、動脈硬化に関係していると考えられている^{7), 8)}。この CETP は中性脂肪 (triglyceride; 以下 TG と略す) と交換に HDL-C から low density lipoprotein (以下 LDL と略す) と very low density lipoprotein (以下 VLDL と略す) へコレステロールエステルを転送し^{9), 10)}、末梢組織から肝臓にコレステロールを転送する「コレステロール逆転送系」において重要な役割を担っている。過去に CETP と脂質代謝の関係が報告されており、CETP 量と CETP 活性は相関し¹¹⁾、高 CETP 血症は CETP 活性を高め、血清 HDL-C 値を下げ¹²⁻¹⁵⁾、そして血清 LDL-C 値を上昇

させる¹¹⁾。実験動物を用いた研究で高 CETP 血症は動脈硬化性に働くこと示唆されている¹⁶⁻¹⁸⁾が、一方抗動脈硬化作用を有しているという報告もある¹⁹⁻²¹⁾。この CETP をコードする遺伝子において様々な多型が報告され、そのほとんどが血清 HDL-C 値に影響し、その結果動脈硬化に影響するのではないかと報告されている。イントロン 1 に存在する Taq IB 多型もその一つであり脂質の転送活性や血清 HDL-C 値と関係していると報告されている^{12), 13), 22)}。

Apo A-I は HDL-C の主たる構成アポ蛋白であり、高 Apo A-I 血症も冠動脈疾患発症の危険を減少させると言われている¹⁾。Apo A-I の遺伝因子については、Apo A-I 遺伝子の変異が HDL-C や Apo A-I の血中濃度に影響していることが報告されている。その中で Apo A-I 遺伝子のプロモーター領域に存在する-75bp (M1) とイントロン 1 に存在する+83bp (M2) の2つの多型は制限酵素 (Msp I) により検出され、血清 HDL-C 値と Apo A-I 値に関係していると報告されている^{23), 24)}。この2つの多型は1回の polymerase chain reaction (以下 PCR と略す) と1回の制限酵素 (Msp I) 反応により検出することが可能である。

著者は HDL-C の代謝に関係すると考えられる CETP と Apo A-I の遺伝子が独立して、また両者が多因子として血清 HDL-C 値に影響を及ぼすのではないかと設定し、HDL-C 代謝におけるこれらの遺伝因子の影響を明らかにするために、日本人女性において、CETP 遺伝

子 Taq IB 多型および Apo A-I 遺伝子 Msp I 多型と HDL-C を始めとする血清脂質レベルとの関係、さらにこの多型の組み合わせの意義を検討した。

対象と方法

1) 対象

三重県渡会郡紀勢町の住民検診の受診者で高脂血症薬を内服している人を除外した 30 歳から 69 歳の女性 270 名 (平均年齢 51.9±10.3 歳) を対象とした。対象すべてに対して文書による説明・同意を得た。

2) 検査項目

対象全てに対して身長、体重を測定し、Body mass index (体重 (kg)/身長 (m)²; 以下 BMI と略す) を算出した。5 分間安静にした後、血圧を測定した。空腹時に静脈より採血し、総コレステロール (total cholesterol; 以下 TC と略す)、HDL-C、Apo A-I、TG、空腹時血糖 (fasting plasma glucose; 以下 FPG と略す) と血清インスリン (immunoreactive insulin; 以下 IRI と略す) を測定した。LDL-C 値は Friedewald の式 (TC-HDL-C-TG/5) を用い算出した。インスリン抵抗性の指標となる HOMA-R は FPG (mg/dl) × IRI (μU/ml)/405 の式を用い算出した。

対象に対して問診により喫煙、飲酒、閉経の有無、身体活動性の情報を調べた。“喫煙者” は現喫煙者と定義

し、過去の喫煙習慣は除外した。“飲酒者” は量に関係なく週 3 日以上飲酒する人と定義した。身体活動性に関しては余暇時間に運動を行う頻度で比較した。運動の種類に関わらず、週に 5 日以上運動をしている人を高い身体活動性と定義した。対象の背景を第 1 表²⁵⁾に示す。

3) CETP 遺伝子 Taq IB 多型の解析

Polymerase chain reaction-restriction fragments of length polymorphism (以下 PCR-RFLP と略す) 法にて多型の分析を行った。DNA は末梢血から抽出し、forward primer 5'-CACTAGCCCAGAGAGAGGAGT GCC-3' と reverse primer 5'-CTGAGCCCAGCCGCAC ACTAAC-3' を用い、イントロン 1 の多型の部位を含む部分を PCR で増幅させた。PCR の条件は 95°C 5 分に引き続き 95°C 1 分、60°C 1 分、72°C 1.5 分を 30 サイクルし最後の伸長反応を 72°C で 10 分間行った。535bp の PCR 産物 (B2 allele) ができ、制限酵素 Taq I にて 65°C 3 時間処理した後、ethidium bromide を含む 2% のアガロースゲルで電気泳動を行った。制限酵素部位を有し、361bp と 174bp の断片となる allele を B1 allele とした。変異の有無より遺伝子型 B1B1、B1B2 および B2B2 に判別した²⁶⁾。

4) Apo A-I 遺伝子 Msp I (-75bp : M1, +83bp : M2) 多型の解析

Forward primer 5'-AGGGACAGAGCTGATCCTT GAACTCTTAAG-3' と reverse primer 5'-TTAGGGG ACACCTACCCGTCAGGAAGAGCA-3' を用い PCR で増幅後、制限酵素 Msp I を用い PCR-RFLP 法にて解析を行った。PCR の条件は 95°C 5 分に引き続き 94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 2 分を 35 サイクルし最後の伸長反応を 72°C で 10 分間行った。433bp の PCR 産物に対して制限酵素 Msp I で 37°C overnight にて処理した後、ethidium bromide を含む 8% のアガロースゲルで電気泳動を行った。Apo A-I 遺伝子 Msp I 多型の -75bp (M1) 多型と +83bp (M2) 多型の二つの解析は一度の PCR-RFLP 法で行うことが可能で、制限酵素部位の有無により -75bp (M1) 遺伝子多型を M1+/+, M1-/-, M1+/-, +83bp (M2) 遺伝子多型を M2+/+, M2-/-, M2+/- とした^{27), 28)}。

5) 統計学的解析

全てのデータは統計解析ソフト StatView 5.0 (SAS) にて解析した。本文、表のすべての値は平均値±標準偏差 (SD) で表した。多群間比較は分散分析 (ANOVA) とその後の Bonferroni 検定を用いた多重比較法を行った。カテゴリー変数の比較はカイ二乗検定を用いた。多変量解析はステップワイズ重回帰分析 (変数増加法) に

第 1 表 対象の背景

n	270
年齢 (歳)*	51.9±10.3
BMI (kg/m ²)*	22.9±3.4
収縮期血圧 (mmHg)*	126.8±16.9
拡張期血圧 (mmHg)*	80.1±10.7
TC (mmol/L)*	5.78±1.04
TG (mmol/L)*	1.12±0.65
HDL-C (mmol/L)*	1.63±0.44
LDL-C (mmol/L)*	3.64±0.97
Apo A-I (mg/dl)*	183.9±37.7
FPG (mmol/L)*	5.67±1.09
IRI (pmol/L)*	42.0±31.2
HOMA-R*	1.8±1.7
閉経後 (%)	54.8
喫煙者 (%)	4.1
飲酒者 (%)	9.6
高身体活動性 (%)	13.0

FPG; fasting plasma glucose *平均値±標準偏差 (Motohashi Y, et al: Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 14: 6-14, 2004 の Table 1 を許可を得て転載)

より行った。

結 果

1) CETP 遺伝子 Taq IB 多型の分布と各種パラメーターとの関係

CETP 遺伝子 Taq IB 多型の頻度は B1B1 30.0% (n=81), B1B2 50.4% (n=136), B2B2 19.6% (n=53) であった。B1 allele の頻度は 0.552, B2 allele の頻度は 0.448 であり, Hardy-Weinberg の均衡の法則に合致した。

CETP 遺伝子 Taq IB 多型は血清 HDL-C 値と TG 値に有意な関係を認めた (HDL-C : p=0.0020, TG : p=0.0290)。B1B1 と B1B2 の血清 HDL-C 値は B2B2 より有意に低値であった (1.54±0.36, 1.63±0.44 vs. 1.80±0.41 mmol/L, p<0.001, p<0.05)。血清 TG 値は B2B2 で最も低値を示した (B2B2 : 0.91±0.42 mmol/L)。一方, TC, LDL-C, Apo A-I においては有意差を示さなかった。糖代謝関係 (FPG, IRI と HOMA-R), 年齢, BMI, 血圧, 環境因子パラメーターとの関係では統計学的有意差は認められなかった (第 2 表)²⁵⁾。

2) Apo A-I 遺伝子 Msp I (-75bp : M1) 多型の分布と各種パラメーターとの関係

Apo A-I 遺伝子 M1 多型の頻度は, M1+/+71.1% (n=192), M1+/-26.7% (n=72), と M1-/-2.2% (n=6) であった。M1+allele の頻度は 0.844, M1-allele の頻度は 0.156 であった。M1-/-は 6 名にしか認めなかったため, M1-allele を有する M1+/-と M1-/-を合わせて M1-(M1+/-, -/-) 群とし, M1+(M1+/+) 群の 2 群に群分けし比較した。M1+(M1+/+) 群は M1-(M1+/-, -/-) 群に比べて血清 HDL-C 値と Apo A-I 値が有意に低値であった (HDL-C : 1.59±0.41 vs 1.75±0.43 mmol/L, p=0.0029 ; Apo A-I : 179.2±36.8 vs 195.6±37.5 mg/dl, p=0.0012)。一方血清 TC 値は M1+(M1+/+) 群で M1-(M1+/-, -/-) 群に比べ有意に低値であった (5.69±1.04 vs 6.02±1.03 mmol/L, p=0.0198)。糖代謝関係, 年齢, BMI, 血圧や環境因子のパラメーターはこの 2 群間で統計学的有意差を認めなかった (第 3 表)²⁵⁾。

3) Apo A-I 遺伝子 Msp I (+83bp : M2) 多型の分布と各種パラメーターとの関係

Apo A-I 遺伝子 M2 多型の M2+/+と M2+/-遺伝子型の頻度はそれぞれ 94.8% (n=256) と 5.2% (n=14) であった。M2-/-遺伝子型は検出されなかつ

第 2 表 CETP 遺伝子 TaqIB 多型と各種パラメーターの関係

	B1B1 (n=81)	B1B2 (n=136)	B2B2 (n=53)	p 値
年齢 (歳)*	52.3±10.4	51.1±10.4	53.4±9.9	NS*
BMI (kg/m ²)*	23.1±3.5	22.6±3.5	23.0±2.9	NS*
収縮期血圧 (mmHg)*	123.8±16.0	127.3±17.5	129.8±16.7	NS*
拡張期血圧 (mmHg)*	79.3±9.9	80.1±10.9	81.5±11.1	NS*
TC (mmol/L)*	5.63±0.84	5.87±1.11	5.81±1.15	NS*
TG (mmol/L)*	1.13±0.53	1.19±0.77	0.91±0.42	0.0290*
HDL-C (mmol/L)*	1.54±0.36†	1.63±0.44‡	1.80±0.41	0.0020*
LDL-C (mmol/L)*	3.43±0.78	3.68±0.98	3.18±0.92	NS*
Apo A-I (mg/dl)*	179.4±34.5	184.0±40.2	190.9±35.3	NS*
FPG (mmol/L)*	5.62±0.99	5.63±1.23	5.72±0.73	NS*
IRI (pmol/L)*	38.4±19.2	46.2±39.6	40.2±21.0	NS*
HOMA-R*	1.6±1.0	2.0±2.1	1.7±1.0	NS*
閉経後 (%)	55.6	52.2	60.3	NS*
喫煙者 (%)	4.9	3.6	3.7	NS*
飲酒者 (%)	11.0	8.7	9.2	NS*
高身体活動性 (%)	14.8	10.3	15.6	NS*

† p<0.001 vs B2B2 ‡ p<0.05 vs B2B2 FPG ; fasting plasma glucose *平均値±標準偏差

※ANOVA #カイ二乗検定

(Motohashi Y, et al : Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 14 : 6-14, 2004 の Table 2 の一部を許可を得て転載, 内容を追加)

第3表 Apo A-I 遺伝子 MspI (M1) 多型と各種パラメーターの関係

	M1+(M1+/+) (n=192)	M1-(M1+/-, -/-) (n=78)	p 値
年齢(歳)*	51.7±10.6	52.5±9.4	NS*
BMI (kg/m ²)*	22.4±3.4	22.7±3.4	NS*
収縮期血圧 (mmHg)*	126.4±16.7	127.5±17.6	NS*
拡張期血圧 (mmHg)*	80.4±10.9	79.4±10.1	NS*
TC (mmol/L)*	5.69±1.04	6.02±1.03	0.0198*
TG (mmol/L)*	1.13±0.65	1.07±0.66	NS*
HDL-C (mmol/L)*	1.59±0.41	1.75±0.43	0.0029*
LDL-C (mmol/L)*	3.59±0.96	3.78±0.99	NS*
Apo A-I (mg/dl)*	179.2±36.8	195.6±37.5	0.0012*
FPG (mmol/L)*	5.66±1.09	5.66±1.08	NS*
IRI (pmol/L)*	43.8±34.2	38.4±23.4	NS*
HOMA-R*	1.9±1.8	1.6±1.2	NS*
閉経後 (%)	53.1	58.9	NS*
喫煙者 (%)	4.6	2.4	NS*
飲酒者 (%)	10.2	7.6	NS*
高身体活動性 (%)	14.1	10.2	NS*

FPG : fasting plasma glucose *平均値±標準偏差 ※ANOVA #カイ二乗検定
(Motohashi Y, et al : Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 14 : 6-14, 2004 の Table 2
の一部を許可を得て転載, 内容を追加)

第4表 Apo A-I 遺伝子 MspI (M2) 多型と各種パラメーターの関係

	M2+/+ (n=256)	M2+/- (N=14)	p 値
年齢(歳)*	52.2±10.1	47.0±11.9	NS*
BMI (kg/m ²)*	22.9±3.4	21.9±1.9	NS*
収縮期血圧 (mmHg)*	126.8±17.1	125.1±13.7	NS*
拡張期血圧 (mmHg)*	80.1±10.9	80.4±6.5	NS*
TC (mmol/L)*	5.82±1.19	5.27±1.01	NS*
TG (mmol/L)*	1.13±0.66	0.87±0.56	NS*
HDL-C (mmol/L)*	1.63±0.42	1.66±0.42	NS*
LDL-C (mmol/L)*	3.66±0.97	3.20±0.86	NS*
Apo A-I (mg/dl)*	184.1±37.8	182.0±35.4	NS*
FPG (mmol/L)*	5.63±1.11	5.52±0.48	NS*
IRI (pmol/L)*	42.6±32.4	35.4±13.8	NS*
HOMA-R*	1.8±1.7	1.5±0.6	NS*
閉経後 (%)	55.1	53.0	NS*
喫煙者 (%)	3.9	7.1	NS*
飲酒者 (%)	9.7	7.1	NS*
高身体活動性 (%)	12.5	21.2	NS*

FPG : fasting plasma glucose *平均値±標準偏差 ※ANOVA #カイ二乗検定

た。M2+alleleの頻度は0.974, M2-alleleの頻度は0.026であった。この二つの遺伝子型間ではHDL-C, Apo A-Iを始めいずれのパラメーターと統計学的有意差を認めなかった(第4表)²⁵⁾。

4) 血清HDL-C値に対するステップワイズ重回帰分析
過去の疫学調査などから一般的に血清HDL-C値に関係していると考えられる年齢, 肥満(BMI), 他の環境因子(閉経, 喫煙, 飲酒, 身体活動性)と, 遺伝因子と

第 5 表 血清 HDL-C 値に対するステップワイズ重回帰分析 (A)

変数	標準回帰係数	F 値	p 値	R ²
BMI	-0.328	27.648	<0.0001	0.107
CETP 遺伝子 Taq IB 多型 (B1B1 vs. B1B2 vs. B2B2)	0.208	20.262	<0.0001	0.043
Apo A-I 遺伝子 M1 多型 (M1+群 vs. M1-群)	0.181	16.892	<0.0001	0.032

血清 HDL-C 値を目的変数とし、年齢、BMI、CETP 遺伝子 Taq IB 多型 (B1B1=0 vs. B1B2=1 vs. B2B2=2)、Apo A-I 遺伝子 M1 多型 (M1+群=0 vs. M1-群=1)、閉経 (前=0 vs. 後=1)、喫煙 (あり=0 vs. なし=1)、飲酒 (あり=0 vs. なし=1)、そして身体活動性 (高い=0 vs. 低い=1) の 8 つの変数を用いステップワイズ重回帰分析 (変数増加法) を行った。

結果、BMI、CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 M1 多型が有意な説明変数となった。

決定係数 R²=0.182 (p<0.0001)

(Motohashi Y, et al : Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 14 : 6-14, 2004 の Table 3A を許可を得て転載)

第 6 表 血清 HDL-C 値に対するステップワイズ重回帰分析 (B)

変数	標準回帰係数	F 値	p 値	R ²
TG	-0.446	59.453	<0.0001	0.205
TC	0.264	48.337	<0.0001	0.092
BMI	-0.192	37.115	<0.0001	0.031
CETP 遺伝子 Taq IB 多型 (B1B1 vs. B1B2 vs. B2B2)	0.128	29.554	<0.0001	0.014
Apo A-I 遺伝子 M1 多型 (M1+群 vs. M1-群)	0.125	25.022	<0.0001	0.014
飲酒 (あり vs. なし)	0.107	21.815	<0.0001	0.012

血清 HDL-C 値を目的変数とし、年齢、BMI、TC、TG、CETP 遺伝子 Taq IB 多型 (B1B1=0 vs. B1B2=1 vs. B2B2=2)、Apo A-I 遺伝子 M1 多型 (M1+群=0 vs. M1-群=1)、閉経 (前=0 vs. 後=1)、喫煙 (あり=0 vs. なし=1)、飲酒 (あり=0 vs. なし=1)、そして身体活動性 (高い=0 vs. 低い=1) の 10 つの変数を用いステップワイズ重回帰分析 (変数増加法) を行った。

結果、TG、TC、BMI、CETP 遺伝子 Taq IB 多型、Apo A-I 遺伝子 M1 多型と飲酒が有意な説明変数となった。決定係数 R²=0.368 (p<0.0001)

(Motohashi Y, et al : Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 14 : 6-14, 2004 の Table 3B の一部を許可を得て転載)

して CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 M1 多型を用いてステップワイズ重回帰分析を行った (第 5 表)²⁶⁾。BMI と CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 M1 多型が有意な説明変数であり、血清 HDL-C 値の 18.2% を説明し得る結果であった。

さらに TC、TG を含め解析を行ったが、この二つの

多型は有意な説明変数として残り、その他 TG、TC、BMI と飲酒が説明変数であり、血清 HDL-C 値の 36.8% を説明し得る結果であった (第 6 表)²⁵⁾。

5) 遺伝因子と血清 HDL-C 値の関係における BMI の影響

ステップワイズ重回帰分析で BMI、CETP 遺伝子

第7表 遺伝子多型と血清 HDL-C 値の関係における BMI の影響

	CETP 遺伝子 TaqIB 多型				Apo A-I 遺伝子 MspI (M1) 多型		
	B1B1	B1B2	B2B2	P 値*	M1+ (M1+/+)	M1- (M1+/-, -/-)	P 値*
BMI							
BMI < 22.7 (20.3 ± 1.6)	1.63 ± 0.33 (40)	1.81 ± 0.43 (75)	1.89 ± 0.37 (23)	0.0216	1.70 ± 0.41 (96)	1.95 ± 0.34 (42)	0.0008
BMI ≥ 22.7 (25.6 ± 2.4)	1.45 ± 0.38 (40)*	1.39 ± 0.32 (58)**	1.72 ± 0.43 (29)	0.0005	1.47 ± 0.38 (92)†	1.52 ± 0.42 (35)‡	0.5632

表内の数値は平均値 ± 標準偏差 (mmol/L)(n) で表示した。 ※ANOVA

*p=0.0266 vs BMI < 22.7 群の B1B1 †p < 0.0001 BMI < 22.7 群の M1+(M1+/+) 群

**p < 0.0001 vs BMI < 22.7 群の B1B2 ‡p = 0.0001 BMI < 22.7 群の M1-(M1+/-, -/-) 群

(Motohashi Y, et al : Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 14 : 6-14, 2004 の Table 4 を許可を得て転載)

第8表 血清 HDL-C 値に影響する CETP 遺伝子 TaqIB 多型と Apo A-I 遺伝子 (M1) 多型の関係

	Taq IB 遺伝子型			P 値*
	B1B1	B1B2	B2B2	
M1 遺伝子型				
M1+ (M1+/+)	1.52 ± 0.36 (58)*	1.59 ± 0.43 (96)*	1.69 ± 0.39 (38)	0.1135
M1- (M1+/-, -/-)	1.60 ± 0.37 (23)**	1.73 ± 0.44 (40)	2.06 ± 0.34 (15)	0.0034
p 値	0.3795	0.084	0.0024	

表内の数値は平均値 ± 標準偏差 (mmol/L)(n) で表示した。

*p < 0.0001 vs B2B2 & M1-(M1+/-, -/-) 群

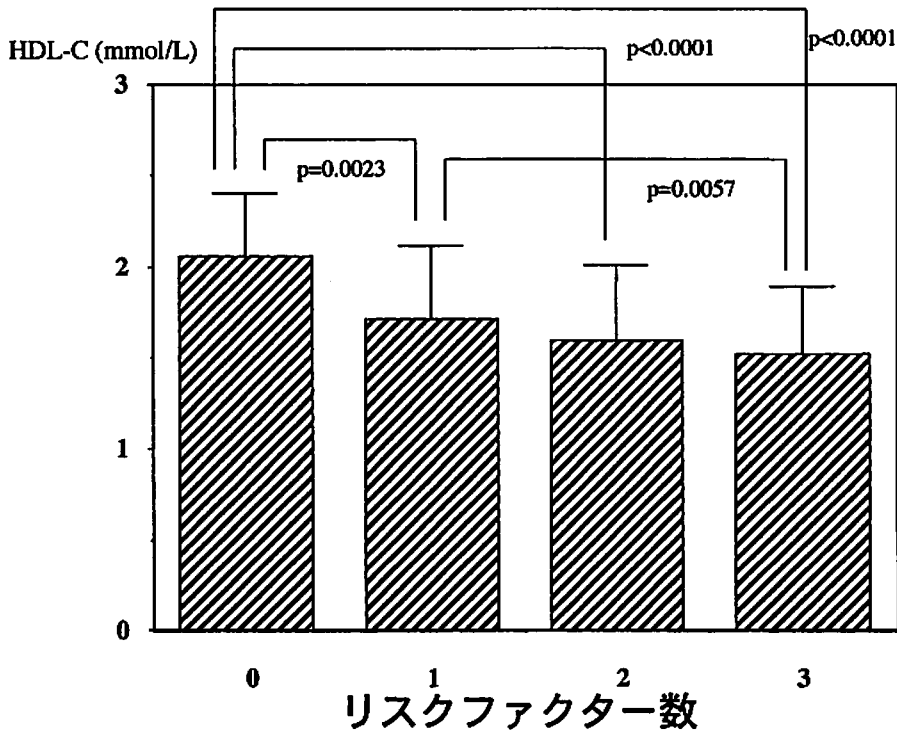
**p = 0.0006 vs B2B2 & M1-(M1+/-, -/-) 群

(Motohashi Y, et al : Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 14 : 6-14, 2004 の Table 5 を許可を得て転載)

Taq IB 多型, Apo A-I 遺伝子 M1 多型が血清 HDL-C 値の有意な説明変数であったので, 遺伝因子と血清 HDL-C 値の関係に BMI が影響を及ぼすかどうか検討した。対象の BMI の中央値 (22.7) を用い, BMI が 22.7 未満の低 BMI 群 (平均 BMI 20.3 ± 1.6), 22.7 以上の高 BMI 群 (平均 BMI 25.6 ± 2.4) の 2 群に分け, この 2 群での CETP 遺伝子 Taq IB 多型, Apo A-I 遺伝子 M1 多型の遺伝子型と血清 HDL-C 値の関係を調べた (第 7 表)²⁵⁾。

CETP 遺伝子 Taq IB 多型の B1 allele を有する方が低 HDL-C 血症と関係している傾向は BMI に左右されず, 低 BMI 群と高 BMI 群の両群で有意な関係を認めた。

高 BMI 群において全体に血清 HDL-C 値は低 BMI 群に比べ低値であった。その中でも B1 allele を有する B1B1 と B1B2 に注目すると, 高 BMI 群の方が低 BMI 群より有意に血清 HDL-C 値は低値を示した。一方, Apo A-I 遺伝子 M1 多型では低 BMI 群においてのみ血清 HDL-C 値との有意な関係を認め, 高 BMI 群の中では遺伝子多型と血清 HDL-C 値の影響は認めなかった。高 BMI 群の血清 HDL-C 値は低 BMI 群に比べ, 有意に低値を示した。



(Motohashi Y, et al: Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease 14: 6-14, 2004のFig 1を許可を得て転載)

第1図 リスクファクター数と血清 HDL-C 値の関係

CETP 遺伝子 Taq I B 多型と Apo A-I 遺伝子 M1 多型 (2 群) の組み合わせと血清 HDL-C 値の関係を示す。B1 allele を一つ有する場合と M1+(M1+/+) 群を有する場合をそれぞれ 1 リスクファクターとした。そうすると B1B1 & M1+(M1+/+) 群の組み合わせは 3 リスクファクターであり、B1B2 & M1-(M1+/-, M1-/-) 群の組み合わせは 1 リスクファクターとなる。このリスクファクター数と血清 HDL-C 値の間には有意な関係を認めた。

0 Risk factor : B2B2 & M1-(M1+/-, M1-/-) 群

1 Risk factor : B2B2 & M1+(M1+/+) 群, B1B2 & M1-(M1+/-, M1-/-) 群

2 Risk factor : B1B2 & M1+(M1+/+) 群, B1B1 & M1-(M1+/-, M1-/-) 群

3 Risk factor : B1B1 & M1+(M1+/+) 群

6) 血清 HDL-C 値と、CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 M1 多型の遺伝子型の組み合わせの関係

CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 M1 多型の二つの遺伝子型の組み合わせの効果を調べるために、二元配置分散分析法 (two-way ANOVA) を行い群間比較した。B1 allele を有する方が低 HDL-C 血症となる傾向は M-(M1+/-, -/-) 群において有意差を認めた。B2B2 群では M1-(M1+/-, -/-) 群を有する方が M1+(M1+/+) 群を有する群に比べ有意に血清 HDL-C 値が高値であった (1.69±0.39 vs 2.06±0.34 mmol/L, p=0.0024) (第 8 表)²⁵⁾。

遺伝子多型の組み合わせを用いること、つまり多因子の影響を調べることにより、血清 HDL-C 値についてより詳細な情報が得られた。今までの結果から B1 allele を有する場合と M1+(M1+/+) 群を有する場合が低 HDL-C 血症を呈しやすいと考えられ、B1B1 & M1+(M1+/+) 群の“高リスク”の組み合わせは最も低い HDL-C 値 (1.52±0.36 mmol/L) を示し、一方 B2B2 & M1-(M1+/-, -/-) 群の“低リスク”群は最も高い HDL-C 値 (2.06±0.34 mmol/L) を示した。

多因子による影響を理解しやすいように、遺伝子多型の違いをリスクファクター数として表現し、血清 HDL-C 値との関係を調べた。低 HDL-C 血症を呈しやすい

B1 allele を一つ有する場合と、M1+(M1+/+) 群を有する場合をそれぞれ1リスクファクターとした。そうするとB1B1とM1+(M1+/+) 群の組み合わせは3リスクファクターとなる。B1B2とM1-(M1+/-, -/-) 群の組み合わせでは1リスクファクターとなる。このようにして算出したリスクファクター数と血清HDL-C値の間に有意な関係を認めた(第1図)²⁵⁾。0リスクファクターでは最もHDL-Cが高値(2.06±0.34 mmol/L)を示し、1, 2, 3とリスクファクターが増えるとともに段階的にHDL-Cは低値を示した(1リスクファクター: 1.71±0.41, 2リスクファクター: 1.59±0.42, 3リスクファクター: 1.52±0.37 mmol/L)。0リスクファクターはその他のいずれの群とも有意差を認めた。

考 察

低HDL-C血症と低Apo A-I血症は冠動脈疾患の負の因子とみなされ、低HDL-C血症を改善することが冠動脈疾患の予防につながると考えられている^{1), 2), 29)}。血清HDL-C値とApo A-I値における遺伝因子と環境因子の影響について多くの研究者たちが調べてきたが、多遺伝子、多因子の疾患のメカニズムについて明らかにした報告は少ない。そこで、著者は日本人女性においてCETP遺伝子Taq IB多型およびApo A-I遺伝子Msp I多型が血清HDL-C値にどのように影響を及ぼすか、多因子遺伝のモデルとしてこの多型の組み合わせが血清HDL-C値に与える影響を検討した。

本研究の結果から日本人女性において、CETP遺伝子Taq IB多型とApo A-I遺伝子Msp I (M1) 多型が独立して血清HDL-C値に関連していることが示唆され、CETP遺伝子Taq IB多型のB1 alleleとApo A-I遺伝子Msp I (M1) 多型のM1+(M1+/+) 群が低HDL-C血症と関係していると考えられた。この血清HDL-C値に負の影響を与える遺伝因子をリスクファクターと設定し検討した結果、リスクファクター数と血清HDL-C値は関係することも示唆された。また、BMIも血清HDL-C値に対して独立した説明変数であるが、BMIが遺伝因子と血清HDL-C値の関わりに影響を与えることが示唆された。

本研究でのCETP遺伝子Taq IB多型の遺伝子型、allele頻度は過去の研究で報告されている頻度と同様な結果であった³⁰⁾。本研究でCETP遺伝子Taq IB多型は血清HDL-C値とTG値と関係を認め、B1 alleleが低HDL-C値と高TG値を示すことが示唆された。これまでにB1 alleleが低HDL-C値に影響しているという報

告があり、そのメカニズムとしてCETP濃度・活性が関係していると考えられている^{12), 13), 15), 22), 26)}。B1 alleleを有する群のCETP濃度が高く^{22), 26)}、血清CETP濃度はHDL-C濃度と逆相関していると報告されている^{12), 13)}。一方日本人健康人で血清CETP濃度とLDL-C濃度の正相関を報告している研究もある¹¹⁾。著者は本研究の対象の一部(78名)でCETP濃度を測定している。それらについて、遺伝子多型と比較したところ、過去の報告と同様B1B1で高CETP血症を認めており(data not shown)、CETP値を介して血清HDL-C値に影響していると推察された。しかしCETP遺伝子多型と、血清LDL-C値およびApo A-I値とは関係は認められなかった。CETP濃度と血清脂質濃度との関連は一定の傾向はなく、どのような要因によってこのような違いが生じるのかは不明であるが、多型がCETP濃度に影響を及ぼし、結果として血清脂質代謝に影響すると考えられる。他に本研究ではB1 alleleが高TG値と関係していることが示唆された。過去の報告では、Taq IB多型は血清TG値と関係がないとされている¹²⁾。本研究では調べた範囲の環境因子には差を認めなかったが、調査対象外の何らかの環境因子が影響している可能性もあり、さらなる検討が必要と思われた。

Apo A-I遺伝子M1, M2多型の遺伝子型とallele頻度に関して、M1- alleleは比較的一般的に認められ、Caucasiansで約20%に存在していると報告されている³¹⁾。それに対してM2- alleleは稀であり過去の報告ではその頻度は2~6%である^{23), 29), 31)}。本研究ではM1- allele頻度は15.6%、M2- allele頻度は2.9%であり過去の報告²³⁾と類似した結果であった。血清脂質との関係では、Apo A-I遺伝子M1多型の2群と血清HDL-C値、Apo A-I値との間に有意な関係を認めた。今までに-75bpの変異(M1)がHDL-Cに関係しているという報告³¹⁾や、一方血清HDL-C値とは関係がないが、血清Apo A-I値に関係しているという報告²⁴⁾など様々な成績がある。遺伝子多型と脂質の関係を説明し得るメカニズムは現在のところ明らかではないが、-75bpの変異によるhypomethylationがApo A-I遺伝子の発現に関係しているとも報告されている³²⁾。血清TC値は逆にM1+(M1+/+) 群で低値を示し、冠動脈疾患のリスクと考えるには相反する結果であった。これまでにTCとの関係についての報告はなく、どのように作用しているかは不明である。+83bpの変異(M2)については血清HDL-C値やApo A-I値の上昇と関係している^{23), 24)}という報告がある。本研究では、Apo A-I遺伝子M2多型と血清HDL-C値やApo A-I値との関係は

見いだせなかった。しかし M2-allele の頻度が非常に低く、関係を否定するには対象を増やし、さらなる研究が必要と考えられた。

ステップワイズ重回帰分析の結果、CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 M1 多型の二つの遺伝因子は有意な説明変数であり、両者は HDL-C 代謝において重要な遺伝因子であることが示唆された。血清 HDL-C 濃度は遺伝因子のみが影響しているわけではなく、環境因子の影響も受けることは明らかである。それ故、遺伝子多型と血清 HDL-C 値の関係にも、環境因子が影響すると仮定するのは自然と考えられる。本研究では二つの遺伝子多型とともに血清 HDL-C 値の説明変数であった BMI が、遺伝因子と血清 HDL-C 値の関性に影響を及ぼすかどうかを検討した。CETP 遺伝子 Taq IB 多型の B2 allele と高 HDL-C 値の関係は BMI に関係なく残っていた。しかし B1 allele を有す B1B1, B1B2 群では低 BMI 群より高 BMI の方が有意差をもって低 HDL-C 値を示した。過去に内臓脂肪の影響を報告している研究があるが、そこでは B1 allele より B2 allele の方がより内臓脂肪の影響を受けやすいと報告している³³⁾。その他肥満、喫煙、高 TG 血症や飲酒により CETP 遺伝子 Taq IB 多型のリポ蛋白に与える影響は変化すると報告^{26), 30), 34)}があり、CETP が環境因子の影響を直接受けるのかまたは他の遺伝子の影響を受けるかメカニズムは不明であるが、環境因子の重要性を示唆する結果であった。

高 BMI 群においては Apo A-I 遺伝子 M1 多型と血清 HDL-C 値の関係は消失し、遺伝子型に関係なく血清 HDL-C 値は低 BMI 群に比べ有意に低値を示した。遺伝的に有益と考えられる M1-(M1+/-, -/-) 群の因子を有していても、肥満を呈していると遺伝因子の影響が減弱してしまう結果であった。過去にこの多型において肥満の影響に関する報告はない。他の環境因子から受ける影響については、Apo A-I 遺伝子の -75bp (M1) と +83bp (M2) 多型と HDL-C 値の関係で性差や喫煙の影響を受けると報告されている^{35), 36)}。本研究は女性のみを対象としたこと、また、その結果、喫煙者や飲酒者、高 TG 血症を呈する対象が少なかったため、性差や他の環境因子の喫煙、飲酒や TG レベルとの交互関係については、調べることは出来なかった。今後のさらなる検討が必要と考えられた。

多遺伝因子の概念に基づいて、著者は遺伝因子の組み合わせにより、より詳細な情報が得られるのではないかと仮定した。過去に CETP 遺伝子に存在する HDL-C に関わる複数の遺伝子多型 (Taq IB, I14A と D442G)

の組み合わせの影響が報告されている³⁴⁾。また、Apo A-I 遺伝子に関して、-75bp と +83bp の多型のハプロタイプを組み合わせた解析が一つの多型の解析より詳細な結果が得られると、非喫煙健常人で報告されている²⁴⁾。同一遺伝子上での解析はこのように散見されるが、メカニズムは不明である。本研究のように異なる遺伝子多型の組み合わせで調べた報告はないため、この CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 Msp I 多型の組み合わせが血清 HDL-C 値に与える影響を調べた。その結果、“高リスク”の B1B1 と M1+(M1+/+) 群の組み合わせが最も血清 HDL-C 値が低く、一方“低リスク”の B2B2 と M1-(M1+/-, -/-) 群の組み合わせが最も血清 HDL-C 値が高値であったという点は今後の研究に重要な知見と考えられた。Apo A-I 遺伝子は chromosome 11 に位置し²⁸⁾、CETP 遺伝子は chromosome 16 に位置する³⁷⁾。それぞれ離れて存在するため、この二つの遺伝子はお互いの遺伝子の発現や酵素活性に直接的な影響を及ぼす可能性は低いと思われ、メカニズムの解明にはさらなる研究を要すると考えられた。

また、著者は今回低 HDL-C 血症に影響すると示唆された allele や遺伝子型をリスクファクターと仮定し血清 HDL-C 値との関係を検討したが、リスクファクターの数が増えると血清 HDL-C 値が減少するという結果を得た。この関係は多遺伝子疾患、multiple risk factor syndrome を理解する上で大変興味深いと思われた。

最近我が国においても、大規模介入観察研究の Japan Lipid Intervention Trial (J-LIT) では、一次予防、二次予防のいずれにおいても、治療中の HDL-C レベルが低い群で冠動脈イベント発生率の大きいことが示された^{38), 39)}。これら複数の疫学調査結果より、HDL-C 低値が心血管イベントのリスク上昇につながると考えられ、临床上、低 HDL-C 血症は積極的に治療すべきものと位置づけられてきている。本研究の結果は临床上、遺伝因子により低 HDL-C 血症を呈しやすい高リスク群の検出に役立つものと考えられる。また、生活習慣の悪化は良い遺伝因子の影響を減弱させることも示唆されたため、低 HDL-C 血症の治療として、生活習慣の改善の重要性が再認識された。日常临床上、生活習慣の改善を行っても低 HDL-C 血症が改善しない場合には薬物治療が行われている。薬物治療は脂質代謝の中で代謝酵素の合成・活性に様々な影響を及ぼす。CETP 遺伝子 Taq IB 多型において、プラバスタチンの効果が遺伝子多型により異なると報告されており²²⁾、薬物治療の反応も遺伝子多型の影響を受けると考えられる。このように遺伝因子の解析は、今後高リスク群の検出のみならず、治

療法の選択にも役立つものと考えられた。

総 括

コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 遺伝子の Taq IB 遺伝子多型と Apo A-I 遺伝子の Msp I 遺伝子多型が日本人女性の血中 HDL-C 値に及ぼす影響を 270 名の日本人女性を対象に検討し、以下の結果および結論を得た。

1. 日本人女性における CETP 遺伝子 Taq IB 多型の頻度は B1B1 30.0% (n=81), B1B2 50.4% (n=136), B2B2 19.6% (n=53), Apo A-I 遺伝子 Msp I (M1) 多型の頻度は M1+/+71.1% (n=192), M1+/-26.7% (n=72), M1-/-2.2% (n=6), Apo A-I 遺伝子 Msp I (M2) 多型の頻度は M2+/+94.8% (n=256), M2+/-5.2% (n=14) であった。

2. CETP 遺伝子 Taq IB 多型の B1 allele を有するものは B1 allele を有しないものに比し有意に血清 HDL-C 値が低値であった。

3. Apo A-I 遺伝子 Msp I (M1) 多型の M1+allele をホモに有する M1+(M1+/+) 群は M1-(M1+/-, -/-) 群に比べ、有意に血清 HDL-C 値は低値であった。一方、M2 多型では血清脂質との関係は認めなかった。

4. ステップワイズ重回帰分析の結果、CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 Msp I (M1) 多型は血清 HDL-C 値の有意な説明変数と考えられた。

5. Apo A-I 遺伝子 Msp I (M1) 多型と血清 HDL-C 値の関係は肥満の影響を受け、高 BMI 群では遺伝子型と血清 HDL-C 値の関係は失われた。一方、CETP 遺伝子 Taq IB 多型は BMI の影響は受けなかったが、高 BMI 群で低 BMI 群に比べいずれの遺伝子型で血清 HDL-C 値は低値であった。

6. CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 Msp I (M1) 多型の遺伝子型を組み合わせで検討したところ、低 HDL-C 血症を示しやすい B1B1 と M1+(M1+/+) 群が最も低い血清 HDL-C 値を示し、B2B2 と M1-(M1+/-, -/-) 群が最も高い血清 HDL-C 値を示した。リスクファクター数を求め検討した結果、リスクファクター数が増加するにつれ血清 HDL-C 値は低値を示した。

以上の結果より CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 Msp I (M1) 多型の二つの遺伝子多型の単独また複合しての解析、さらに肥満など環境因子の影響を考慮することにより、低 HDL-C 血症を呈す冠動脈疾患の高リスク群の検出や治療法の決定に役立つ可能性が見いだされ、両遺伝子多型の精査は冠動脈疾患発症の予防に

役立つものと考えられた。今後さらなる因子の影響についても検討していくべきであると考えられた。

謝 辞

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。本研究に際し、直接御指導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。

また、本研究に御協力、御助言を頂きました国際医療福祉大学附属熱海病院老年内科都島基夫先生、慶應義塾大学医学部内科学教室腎臓内分泌代謝研究室の諸先生方に感謝致します。

本論文は、Motohashi Y, Maruyama T, Murata M, Nakano S, Maruyama C, Kyotani S, Tsushima M, Saruta T : Role of genetic factors (CETP gene Taq IB polymorphism and Apo A-I gene MspI polymorphism) in serum HDL-C levels in women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14 : 6-14, 2004 の一部を含む。

文 献

- Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH : A protective study of cholesterol, apolipoproteins and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 325 : 373-381, 1991
- Tribble DL, Krauss RM : HDL and coronary artery disease. *Adv Intern Med*. 38 : 1-29, 1993
- Wilson PWF, Garrison RJ, Abbott RD, Castelli WP : Factors associated with lipoprotein cholesterol levels : the Framingham study. *Arteriosclerosis* 3 : 273-281, 1983
- Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE : Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations : an analysis of published data. *B M J* 298 : 784-788, 1989
- Kiechl S, Willeit J, Rungger G, Egger G, Oberhollenzer F, Bonora E : Alcohol consumption and atherosclerosis : what is the relation? Prospective results from the Bruneck study. *Stroke* 29 : 900-907, 1998
- Lloyd T, Chinchilli VM, Rollings N, Kieselhorst K, Tregea DF, Henderson NA, Sinoway LI : Fruit consumption, fitness, and cardiovascular health in female adolescents : the Penn State Young Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 67 : 624-630, 1998
- Bhatnagar D, Durrington PN, Channon KM, Prais H, Mackness MI : Increased transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to low density and very low density lipoproteins in patients with angiographic evidence of coronary artery disease.

- Atherosclerosis 98 : 25-32, 1993
- 8) Foger B, Luef G, Ritsch A, Schmidauer C, Doblinger A, Lechleitner M, Aichner F, Patsch JR : Relationship of high-density lipoprotein subfractions and cholesteryl ester transfer protein in plasma to carotid artery wall thickness. *J Mol Med* 73 : 369-372, 1995
 - 9) Hester CB, Tall AR, Swenson TL, Weech PK, Marcel YL, Milne RW : Monoclonal antibodies to the Mr 74000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J Biol Chem* 263 : 5020-5023, 1988
 - 10) Yen FT, Deckelbaum RJ, Mann CJ, Marcel YL, Milne RW, Tall AR : Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody : effects on cholesteryl ester formation and neutral lipid mass transfer in human plasma. *J Clin Invest* 83 : 2018-2024, 1989
 - 11) Kinoshita M, Teramoto T, Shimizu N, Kaneko K, Ohta M, Koike T, Hosogaya S, Ozaki Y, Kume S, Yamanaka M : CETP is determinant of serum LDL-cholesterol but not HDL-cholesterol in healthy Japanese. *Atherosclerosis* 120 : 75-82, 1996
 - 12) Hannuksela ML, Liinamaa MJ, Kesaniemi YA, Savolainen MJ : Relation of polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene to transfer protein activity and plasma lipoprotein levels in alcohol drinkers. *Atherosclerosis* 110 : 35-44, 1994
 - 13) Kuivenhoven JA, de KP, Boer JM, Smalheer HA, Botma GJ, Seidell JC, Kastelein JJ, Pritchard PH : Heterogeneity at the CETP gene locus. Influence on plasma CETP concentration and HDL cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 560-568, 1997
 - 14) Hibino T, Sakuma N, Sato T : Higher level of plasma cholesteryl ester transfer activity from high-density lipoprotein to ApoB-containing lipoproteins in subjects with angiographically detectable coronary artery disease. *Clin Cardiol* 19 : 483-486, 1996
 - 15) Kondo I, Berg K, Drayne DT, Lawn RM : DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and lipoprotein levels. *Clin Genet* 35 : 49-56, 1989
 - 16) Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW : Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 364 : 73-75, 1993
 - 17) Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, Bisgaard CL, Breslow JL, Tall AR : Increased atherosclerosis in apoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 : 1105-1110, 1999
 - 18) Sugano M, Makino N, Sawada S, Otsuka S, Watanabe M, Okamoto H, Kamada M, Mizushima A : Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Biol Chem* 273 : 5033-5036, 1998
 - 19) Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL, Tall AR : Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest* 96 : 2071-2074, 1995
 - 20) Foger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, Fruchart-Najib J, Paiz JA, Koch CA, Hoyt RF, Brewer HB, Santamarina-Fojo S : Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin : cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J Biol Chem* 274 : 36912-36920, 1999
 - 21) Stvenson CG : Cholesterol ester transfer protein : a molecule with three faces? *Crit Rev Clin Lab Sci* 35 : 517-546, 1998
 - 22) Kuivenhoven JA, Jukema W, Zwinderman AH, Knijff P, MCPerson R, Bruschke AVG, Lie KL, Kastelein JP : The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med* 338 : 86-93, 1998
 - 23) Pulkkinen A, Lehto S, Viitanen L, Laakso M, Kareinen A : Msp I polymorphism at +83 bp in intron 1 of human apolipoprotein A1 gene in associated with elevated levels of HDL cholesterol and apolipoprotein A1 in nondiabetic subjects but not in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *Diabetes Care* 23 : 791-795, 2000
 - 24) Kamboh MI, Aston CE, Nestlerode CM, McAllister AE, Hamman RF : Haplotype analysis of two APOA1/Msp I polymorphisms in relation to plasma levels of apo A-I and HDL-cholesterol. *Atherosclerosis* 127 : 255-262, 1996
 - 25) Motohashi Y, Maruyama T, Murata M, Nakano S, Maruyama C, Kyotani S, Tsushima M, Saruta T : Role of genetic factors (CETP gene Taq IB polymorphism and Apo A-I gene MspI polymorphism) in serum HDL-C levels in women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14 : 6-14, 2004
 - 26) Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O, Jemaa R, Evans A, Arveiler D, Marques-Vidal P, Bard JM, Fruchart JC, Ducimetiere P, Apfelbaum M, Cambien F : Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest* 96 : 1664-1671, 1995
 - 27) Paul-Hayase H, Rosseneu M, Robinson D, Van Bervliet JP, Deslypere JP, Humphries SE : Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene

- cluster : detection of genetic variation determining plasma apo AI, apo CIII, apo AIV concentrations. *Hum Genet* 88 : 439-446, 1992
- 28) Wang XL, Badenhop R, Humphrey KE, Wilcken DE : C to T and/or G to A transitions are responsible for loss of a Msp I restriction site at the 5'-end of the human apolipoprotein A1 gene. *Hum Genet* 95 : 473-474, 1995
- 29) Yano Y, Irie N, Homma Y, Tsushima M, Takeuchi I, Nakaya N, Goto Y : High density lipoprotein cholesterol levels in the Japanese. *Atherosclerosis* 36 : 173-181, 1980
- 30) Freeman DJ, Griffin BA, Holmes AP, Lindsay GM, Gaffney D, Packard CJ, Shepherd J : Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environment factors. Associations between the Taq1B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler Thromb* 14 : 336-344, 1994
- 31) Wang XL, Badenhop R, Humphrey KE, Wilcken DE : New Msp I polymorphism at +83 bp of the human apolipoprotein A1 gene : association with increased circulating high density lipoprotein cholesterol levels. *Genet Epidemiol* 13 : 1-10, 1996
- 32) Shemer R, Walsh A, Eisenberg S, Breslow JL, Razin A : Tissue-specific methylation patterns and expression of human apolipoprotein A1 gene. *J Biol Chem* 265 : 1010-1015, 1990
- 33) Vohl MC, Lamarche B, Pascot A, Leroux G, Prud'homme D, Bouchard C, Nadeau A, Despres JP : Contribution of the cholesteryl ester transfer protein gene Taq1B polymorphism to the reduced plasma HDL-cholesterol levels found in abdominal obese men with the features of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes* 23 : 918-925, 1999
- 34) Hsu LA, Ko YL, Hsu KH, Ko YH, Lee YS : Genetic variations in the cholesteryl ester transfer protein gene and high density lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese Chinese. *Hum Genet* 110 : 57-63, 2002
- 35) Sigurdsson G Jr., Gudnason V, Sigurdsson G, Humphries SE : Interaction between a polymorphism of the apo A-I promoter region and smoking determines plasma levels of HDL and apo A-I. *Arterioscler Thromb* 12 : 1017-1022, 1992
- 36) Talmud PJ, Ye S, Humphries SE. On behalf of EARS Group : Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A1 gene associated with differences in apolipoprotein A1 levels : The European Atherosclerosis Research Study. *Genet. Epidemiol* 11 : 265-280, 1994
- 37) Lusis AJ, Zollman S, Soarkes RS, Klisak I, Mohandas T, Drayna D, Lawn RM : Assignment of the human gene for cholesteryl ester transfer protein to chromosome 16q12-16q21. *Genomics* 1 : 232-235, 1987
- 38) Matsuzaki M, Kita T, Mabuchi H, Matsuzawa Y, Nakaya N, Oikawa S, Saito Y, Sasaki J, Shimamoto K, Itakura H ; J-LIT Study Group. Japan Lipid Intervention Trial. Large scale cohort study of the relation between serum cholesterol concentration and coronary events with low-dose simvastatin therapy in Japanese patients with hypercholesterolemia : primary prevention cohort study of the Japan lipid intervention trial (J-LIT). *Crin J* 66 : 1087-1095, 2002
- 39) Mabuchi H, Kita T, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Nakaya N, Oikawa S, Saito Y, Sasaki J, Shimamoto K, Itakura H ; J-LIT Study Group. Large scale cohort study of the relation between serum cholesterol concentration and coronary events with low-dose simvastatin therapy in Japanese patients with hypercholesterolemia and coronary heart disease : secondary prevention cohort study of the Japan lipid intervention trial (J-LIT). *Crin J* 66 : 1096-1100, 2002

学位論文

若年成人肥満者の metabolic syndrome におよぼす年齢, 肥満度, 身体的フィットネスの影響, 生活習慣修正による減量の効用

慶應義塾大学スポーツ医学研究センター

(指導: 猿田亨男教授)

勝川史憲

(平成 16 年 11 月 26 日受付)

Key Words : metabolic syndrome, obesity, physical activity, physical fitness, modest weight loss

緒言

Metabolic syndrome は, 耐糖能異常, インスリン抵抗性, 脂質代謝異常, 高血圧症などの冠疾患危険因子が, 一個体に集簇した病態である。これらの疾患はひとりの個人に合併することが多く, 病因論的に共通した機序を持つ可能性は以前より考えられていた。Reaven は, これを「複数の疾患の合併」でなく「ひとつの病態」として捉え, その共通の病因としてインスリン抵抗性を想定し, 1988 年に Syndrome X として発表した¹⁾。以来, 同様の病態について諸家が様々な呼称と異なる定義で言及するようになったが, 1999 年になり WHO が糖尿病の Consultation²⁾で, また 2001 年には米国の National Cholesterol Education Program (NCEP) が Adult Treatment Panel III³⁾で, いずれも metabolic syndrome (MS) の呼称でそれぞれ診断基準を発表した(第 1 表)。これにより, 共通の基準にもとづいた病態の頻度や健康への影響, 治療効果の評価が可能となっている。

今日, MS はインスリン抵抗性だけでなく, 脂肪細胞由来のサイトカイン, 慢性炎症, 血栓凝固系の異常が相互に関連し関与すると考えられている。しかし一方で, 肥満や加齢, 身体活動量の低下が MS の発症に大きく関与しているとの認識には変わりがない^{4), 5)}。とりわけ肥満(とくに腹部肥満)は, 一般集団における MS の発症に大きな影響を与える因子とされており^{6), 7)}, WHO, NCEP のいずれの定義でも診断基準の中に盛り込まれている。

日本人では高度肥満者は少なく, 肥満度が低いレベル

から種々の代謝異常を合併しやすい⁸⁾。このため, 内臓脂肪蓄積を主体とする軽度肥満症例に注目が集まっている。しかし, 国民栄養調査のデータの再分析⁹⁾では, BMI 30 以上の肥満男性の頻度は 30, 40 歳代で最も高く('91~'95 年), BMI 25 以上の過体重者の頻度増加('76~'80 年 vs. '91~'95 年)は 20 歳代男性で最も著しい。若年女性も, 平均の BMI は低下しているが, BMI 30 以上の者の頻度は逆に増加しており, 若年成人層では高度の肥満が増加傾向にあるように思われる。実際に, 大学病院の肥満外来では, 初診患者の平均 BMI が過去 10 年間で 30 から 34 に増加し, BMI 30 以上の患者の 75% は年齢 45 歳未満の若年成人が占めている¹⁰⁾。

肥満とならんで MS の発現に大きな影響を与えるのが, 加齢の因子である。大規模な疫学調査^{11), 12)}では, MS の頻度が年齢とともに増加することが示されている。これは, 対象集団の加齢に伴う肥満の増加を一部には反映するものであろうが, 加齢に伴う体重増加の影響と同時に, 加齢それ自体にともない代謝異常が増悪する可能性は, 若年者の代謝異常を評価する際に重要な視点である。

さらに, MS に影響する因子のうち, 肥満や年齢に比べて評価が困難なものとして身体活動量があげられる。米国の National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III) では, 身体活動レベルの低い男性で MS の頻度が高いことが報告されている¹³⁾。しかし, MS の発現に関連する長期間の身体活動量について, 定量的評価は容易でない。その際, 過去の身体活動量を反映して変化し, 最大酸素摂取量(ピーク酸素摂取量)として定量化が比較的容易な身体的フィットネス

第1表 Metabolic Syndrome の定義

WHO	
オリジナル	修正版 (今回の研究)
1) 耐糖能異常または糖尿病	1) GTT で IGT, IFG または糖尿病型
2) インスリン抵抗性 (background population の上位 25 パーセントイル)	2) 平均インスリン $\geq 50 \mu\text{U/mL}$
3) 血圧 $\geq 140/90 \text{ mmHg}$	3) 血圧 $\geq 140/90 \text{ mmHg}$ または降圧薬服用中
4) TG $\geq 150 \text{ mg/dl}$ または HDL-C < 35 (男性)/ 39 (女性) mg/dl	4) TG $\geq 150 \text{ mg/dl}$ または HDL-C < 35 (男性)/ 39 (女性) mg/dl または fibrate 系薬剤服用中
5) ウェストヒップ比 > 0.90 (男性)/ 0.85 (女性) かつ/または BMI > 30	5) 内臓脂肪面積 $\geq 100 \text{ cm}^2$
6) 微量アルブミン尿	
Metabolic syndrome : 1) または 2) で, 3) ~ 6) の 2 項目以上	Metabolic syndrome : 1) または 2) で, 3) ~ 5) の 2 項目以上
NCEP	
オリジナル	修正版 (今回の研究)
1) ウェスト周囲径 $> 102 \text{ cm}$ (男性), 88 cm (女性)	1) 内臓脂肪面積 $\geq 100 \text{ cm}^2$
2) TG $\geq 150 \text{ mg/dl}$	2) TG $\geq 150 \text{ mg/dl}$ または fibrate 系薬剤服用中
3) HDL-C < 40 (男性)/ 50 (女性) mg/dl	3) HDL-C < 40 (男性)/ 50 (女性) mg/dl
4) 血圧 $\geq 130/85 \text{ mmHg}$	4) 血圧 $\geq 130/85 \text{ mmHg}$ または降圧薬服用中
5) 空腹時血糖 $\geq 110 \text{ mg/dl}$	5) 空腹時血糖 $\geq 110 \text{ mg/dl}$
Metabolic syndrome : 1) ~ 5) で 3 項目以上	Metabolic syndrome : 1) ~ 5) で 3 項目以上

(心肺持久力) が, 身体活動量の代用として用いられる場合も少なくない。

本研究は, 18~39 歳の若年成人肥満者について, 2 つの MS の診断基準を用い, 1) 年齢, 肥満度, 男女別に体組成, 代謝異常の特徴を比較すること, 2) 身体的フィットネスの影響を評価すること, そして最も重要な検討として 3) 食事プラス身体活動による生活習慣改善による減量が, これらのリスク改善に及ぼす効果を評価することを目的とした。

近年の国民栄養調査では, 20, 30 歳代の若年成人の体重はなお増加傾向にあることがうかがわれ, 今後は若年成人における肥満の増加が問題になってくるものと思われる。しかし, 若年成人は仕事や育児等による時間的制約, 職域健診で通常は血液検査がないこと, などから, 中高年者に比べ医療機関への受診は少ない。このため, 代謝異常, 治療効果に関するエビデンスが, 中高年者や小児に比べ不足しているのが現状である。いったん確立した肥満の治療が困難なことを考慮すると, 急激な体重増加期にある若年成人層は生活習慣修正による一次予防

の重要なターゲットである。本研究は, 大学病院肥満外来での治療成績から, こうした予防にかかわるエビデンスを抽出することを目的とした。

対象と方法

1. 対象

対象は, 慶應義塾大学病院肥満外来, スポーツクリニックを初回受診した, 年齢 18~39 歳, BMI 25 以上の肥満者 550 名 (男性 395 名, 女性 155 名) である (第 2 表)。多くは職場, 学校健診で過体重を指摘され受診した者で, みずから減量治療を希望, あるいは脂肪肝, 睡眠時無呼吸症候群等で他科より紹介され受診した者を一部含む。受診時, すでに薬物療法が開始されていた者は 17 名 (降圧薬 12 名, HMG-CoA reductase 阻害薬 4 名, fibrate 系薬剤 1 名) であった。

あわせて, 年齢 18~23 歳の運動習慣のない非肥満ボランティア 25 名 (男性 18 名, 女性 7 名) について同様の評価をおこない非肥満対照とした。

第2表 対象のプロフィール

	男性		女性	
	肥満者 (N=395)	非肥満者 (N=18)	肥満者 (N=155)	非肥満者 (N=7)
年齢 (歳)	24 (6)	20 (2)	29 (6)	21 (1)
身長 (cm)	171.8 (5.8)	172.2 (6.0)	158.7 (5.6)	156.8 (3.7)
体重 (kg)	94.1 (14.4)	62.8 (6.0)	82.9 (13.7)	48.2 (4.7)
BMI	31.9 (4.5)	21.2 (1.5)	32.9 (5.0)	19.6 (1.8)

平均 (標準偏差)

2. 腹部体脂肪分布, 体組成

腹部 CT スキャンを施行し, 臍高で CT 値 -150 ~ -50HU に相当する脂肪断面積を, ROI の density mask プログラムを用いて内臓脂肪, 皮下脂肪に分けて求めた¹⁴⁾.

また, 肥満者 256 名 (男性 182 名, 女性 74 名), 非肥満者 17 名 (男性 10 名, 女性 7 名) で, 水中体重秤量法により体組成を評価した (水中体重計 AD6204, エー・アンド・デイ, 東京, を使用), すなわち, 水中体重の秤量で得られる身体密度から Brozek の式¹⁵⁾

体脂肪率 (%) = (4.570 / 身体密度 - 4.142) × 100
を用いて体脂肪率を算出し, 体脂肪量, 除脂肪体重を求めた¹⁶⁾.

3. 血液代謝指標

早朝空腹時に, 中性脂肪 (TG), HDL- コレステロール (HDL-C) を採血した. また, 75 g ブドウ糖負荷試験 (GTT) をおこない, 血糖を 0, 30, 60, 90, 120, 180 分で, インスリンを 0, 30, 60, 120, 180 分で採血した. これらの値から, 平均血糖, インスリン (GTT 180 分間の血糖, インスリンの曲線面積を 180 分で除し, 理解しやすい値としたもの) を算出した.

また, 後述する減量指導の前後で, MS と関連する脂肪細胞由来のサイトカインとしてアディポネクチン, レジスチン, レプチン, 慢性炎症のマーカーとして高感度 CRP (hsCRP) を採血した.

測定方法は, TG は酵素法 (LPL/GK/GPO/POD), HDL-C は界面活性剤による選択的酵素測定法, 血糖は電極法 (GOD/酵素電極), インスリン, レジスチンは EIA 法 (それぞれ東ソー・エイアイエイ, 富山, および BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Brno, Czech Republic), アディポネクチン, レプチンは RIA 法 (いずれも Linco Research Inc., St.Charles, MO, USA),

hsCRP は免疫比濁法 (Dade Behring Inc., Deerfield, IL, USA) によった.

4. Metabolic syndrome の定義

WHO の糖尿病の Consultation²⁾, および NCEP ATP III³⁾ の MS の診断基準をもとに, MS を定義した.

診断基準は, 第 1 表のように一部を修正して用いた. すなわち, WHO の診断基準の耐糖能異常の判定は, GTT で血糖が IGT (IFG) または糖尿病型とした. 今回の集団は耐糖能正常の者が多いため, インスリン抵抗性の指標として GTT 中の平均インスリンを用いた¹⁷⁾.

そして, 非肥満対照男性 17 名を background population とし, その上位 4 分位値である 50 μ U/ml をカットオフ値とした. 腹部肥満の判定は, 内臓脂肪面積を指標とし, 日本肥満学会の肥満症判定基準¹⁸⁾ で用いられている 100 cm^2 をカットオフ値とした (NCEP の診断基準でも同様とした). WHO の基準は BMI のカットオフ値も設けているが, これはウェスト周囲径の測定を行っていない疫学調査での使用を前提にしたものようであり, また今回の検討では MS と BMI の関連について解析を行うことから, BMI の基準は除外した. 高血圧については, 降圧薬を服用している 12 名は高血圧ありとして扱った. 高 TG 血症の判定も, fibrate 系薬剤を服用中の 1 名を高 TG 血症ありとした. 微量アルブミン尿の測定は行っていないので, 他の疫学研究と同様, この項目は除外した. 以上により, MS を診断するコンポーネントの数は WHO, NCEP いずれも 5 つとなった.

WHO の基準で 1) または 2) と 3 ~ 5) のうち 2 項目以上を満たすもの, NCEP では 1 ~ 5) のうち 3 項目以上を満たすものを, MS と診断した. 以下, MS を構成する各コンポーネントの該当するもの数 (0 ~ 5 点満点), および MS を有する者の頻度に注目し, 検討をおこなった.

5. 身体的フィットネスの評価

上記の対象のうち、18～23歳の肥満男性127名、非肥満対照男性10名で、自転車エルゴメータ(Monark 818E, Monark Stiga AB, Sweden)により同一プロトコルで症候限界性の運動負荷試験を行なった。負荷のプロトコルは3分毎に50 Watt, 100 Watt, 以後は25 Wattずつ漸増し、下肢疲労により50 rpmのペダリングが維持できなくなった時点で終了とした。経過中、心拍数をモニターし、呼気ガス分析装置(Sensor Medics MMC4400tc, Yorba Linda, CA, USA)により酸素摂取量、二酸化炭素排泄量を測定した。

運動継続時間、ピーク心拍数、ピーク酸素摂取量を求め、体重で除したピーク酸素摂取量(peak V_{O_2}/wt)を身体的フィットネス(運動耐用能)の指標とした¹⁹⁾。

6. 減量プログラム

上記の対象のうち89名(男性61名、女性28)で、食事プラス身体活動による減量指導を行ない1.5年後に体組成、血液代謝指標を再評価した。

食事のエネルギー量の処方は、現在のエネルギー消費量(=摂取量)を基礎代謝(実測値または年齢、身長、体重からの予測値)×1.5により推定し、これより500～1000 kcal減じた量とした。P:F:Cバランスは15:20:65とし、独自の教材を用い医師の講義に引き続く管理栄養士の小グループないし個別指導を行った¹⁰⁾。

また、運動処方として、ウォーキングまたは自転車エルゴメータを用いたオールアウト運動負荷試験中の、酸素摂取量、二酸化炭素排泄量、またはピーク心拍数をもとに、50%心拍予備能～無酸素性作業閾値の強度で1回30分以上、週3～5回行なうよう指示した²⁰⁾。あわせて、米国疾病対策センター/アメリカ・スポーツ医学会による身体活動指針²¹⁾に即して、中等度の身体活動を1日合計30分以上、ほぼ毎日行なうよう指導した。身体活動量は自己申告式の日誌を記録させた。食事および運動指導後は、外来で1、2か月に1回フォローアップをおこなった。

7. 横断的検討

1) 代謝指標、MSのリスクにおよぼすBMI、年齢の影響

肥満者を均等な年齢幅で4群(18～23, 24～29, 30～34, 35～39歳)、BMIで2群(25～29.9, 30以上)に層別化し、男女別に体組成、代謝指標、血圧を比較し、MSのコンポーネント数、頻度におよぼす年齢、BMI、性差の影響を評価した。

2) MSのリスクにおよぼす身体的フィットネスの影響
つぎに、peak V_{O_2}/wt を測定した18～23歳の男性137名(肥満者127名、非肥満者10名)で、peak V_{O_2}/wt のMSのコンポーネント数、頻度への影響を検討した。

8. 縦断的検討：減量幅別に見た代謝指標、MSのリスクの変化

減量指導後1.5年で89名を再評価し、介入前後の体重変化率(=(介入後の値-介入前値)/介入前値)で3群(<-15, -15～<-5, -5～<0%)に層別化し、各群の体組成、代謝指標、血圧の変化率、およびMSのコンポーネント数、頻度の変化を検討した。介入後早期にドロップアウトし、1ないし2年後にフォローアップしえた15名(男性8名、女性7)(体重増加群)についても同様に再評価を行った。

9. 統計

データの解析には、統計ソフトSPSS for Windows version 12.0J (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), StatXact version 6, LogXact version 5 (Cytel Software, Cambridge, MA, USA) および Confidence Interval Analysis for Windows version 2.11 (available at <http://www.som.soton.ac.uk/cia/>)を用いた。

ロジスティック多重回帰はLogXact、ノンパラメトリックな検定はStatXact、重回帰分析およびその他の記述統計はSPSSを用いた。MSの頻度、介入前後の差の信頼区間はConfidence Interval Analysisを用い、それぞれWilson法、Newcombe法で算出した。有意水準は $P<0.05$ とした。

結 果

1. 横断的検討

1) : 代謝指標、MSのリスクにおよぼすBMI、年齢の影響

肥満者550名を年齢、BMIで層別化し、体組成、代謝指標、血圧を男女別に比較した(第3表)。BMI 30未満と30以上で比較すると、女性の脂質代謝指標、男性のHDL-Cを除くいずれの指標も有意差を認め、BMI 30以上の群で体脂肪の高値、代謝指標、血圧の好ましくないプロフィールを示した。一方、代謝指標の年齢に伴う傾向は一様でなく、血糖は男女とも高い年齢層で高値を示す傾向を示したが、空腹時および平均インスリンは30歳代後半で低値となる傾向を示し、年齢の影響が

第3表 対象の体組成・血液代謝指標・血圧

男性	非肥満対照	肥満者				P	
		18~23	24~29	30~34	35~39		
年齢(歳)	18~23	18~23	24~29	30~34	35~39		
N [N*]	18 [10*]	BMI	25 - 29.9	113 [40*]	17 [8*]	15 [7*]	17 [7*]
		≥ 30	187 [69*]	44 [22*]	28 [17*]	24 [12*]	
BMI	21.2 (0.3)	28.7 (0.1)	28.3 (0.4)	27.7 (0.3)	27.6 (0.3)		
体脂肪率 (%)*	15.6 (0.8)	33.1 (0.3)	36.0 (0.9)	36.0 (1.1)	35.4 (0.9)	年齢 BMI	
体脂肪量 (kg)*	10.0 (0.6)	25.3 (0.7)	26.7 (1.0)	29.6 (1.0)	26.2 (0.8)	0.0200	
除脂肪体重 (kg)*	54.2 (1.7)	31.1 (0.6)	34.1 (1.5)	34.4 (1.2)	35.1 (1.7)	0.0277	
内臓脂肪面積 (cm ²)	22 (2)	21.5 (0.6)	22.6 (1.2)	25.4 (1.2)	21.2 (0.8)	0.1313	
皮下脂肪面積 (cm ²)	50 (8)	81.0 (1.0)	86.8 (2.8)	89.0 (3.1)	85.3 (2.8)	0.0029	
空腹時血糖 (mg/dl)	87 (1)	63.3 (0.9)	61.7 (1.0)	60.1 (1.4)	59.9 (1.3)	0.0359	
平均血糖 (mg/dl)	102 (5)	67.5 (0.8)	68.8 (1.6)	72.4 (1.9)	70.2 (1.7)	0.0113	
空腹時インスリン (μU/ml)	8 (1)	91 (3)	131 (10)	138 (14)	142 (9)	<0.0001	
平均インスリン (μU/ml)	36 (4)	116 (4)	171 (7)	187 (9)	205 (14)	<0.0001	
TG (mg/dl)	66 (8)	233 (5)	216 (11)	228 (18)	178 (7)	0.0012	
HDL-C (mg/dl)	57 (3)	329 (8)	404 (24)	388 (21)	342 (26)	0.0547	
収縮期血圧 (mmHg)	121 (3)	86 (1)	92 (5)	96 (2)	101 (4)	<0.0001	
拡張期血圧 (mmHg)	71 (2)	89 (1)	98 (2)	98 (3)	119 (10)	0.0495	
		111 (2)	128 (9)	134 (8)	139 (9)	<0.0001	
		120 (3)	134 (6)	141 (6)	168 (15)	<0.0001	
		15 (1)	13 (2)	12 (1)	10 (1)	0.0013	
		20 (1)	22 (2)	23 (4)	24 (3)	0.1878	
		62 (2)	70 (9)	50 (4)	54 (7)	0.1049	
		90 (4)	102 (8)	106 (8)	86 (11)	<0.0001	
		107 (5)	112 (14)	132 (16)	185 (39)	0.0054	
		147 (7)	152 (12)	180 (19)	198 (39)	<0.0001	
		44 (1)	42 (2)	43 (2)	44 (2)	0.7017	
		42 (1)	41 (1)	43 (2)	42 (2)	0.9810	
		126 (1)	126 (3)	119 (2)	125 (3)	0.1005	
		132 (1)	130 (2)	132 (3)	134 (3)	<0.0001	
		74 (1)	79 (3)	78 (2)	81 (2)	0.0003	
		79 (1)	88 (2)	91 (3)	92 (2)	<0.0001	

平均 (標準誤差)

女性	非肥満対照	肥満者				P	
		18~23	24~29	30~34	35~39		
年齢(歳)	18~23	18~23	24~29	30~34	35~39		
N [N*]	7 [7*]	BMI	25 - 29.9	18 [7*]	9 [3*]	13 [3*]	12 [5*]
		≥ 30	24 [15*]	25 [13*]	29 [16*]	25 [13*]	
BMI	19.6 (0.7)	27.8 (0.4)	29.0 (0.2)	28.0 (0.4)	27.6 (0.5)		
体脂肪率 (%)*	25.0 (2.1)	36.3 (1.5)	37.2 (1.4)	35.2 (1.4)	37.0 (1.7)	年齢 BMI	
体脂肪量 (kg)*	12.2 (1.4)	41.3 (1.3)	43.7 (1.7)	45.5 (1.0)	43.8 (2.8)	0.6257	
除脂肪体重 (kg)*	36.0 (0.9)	26.6 (1.0)	26.7 (0.7)	25.1 (0.7)	26.5 (1.6)	0.5923	
内臓脂肪面積 (cm ²)	25 (6)	37.8 (2.8)	41.9 (3.0)	39.0 (1.5)	37.9 (2.4)	0.7019	
皮下脂肪面積 (cm ²)	92 (21)	46.8 (2.2)	45.3 (3.2)	46.3 (2.4)	45.1 (1.0)	<0.0001	
空腹時血糖 (mg/dl)	78 (2)	52.8 (2.1)	52.8 (1.7)	50.5 (1.2)	48.9 (2.7)	0.9563	
平均血糖 (mg/dl)	86 (7)	76 (7)	100 (14)	92 (7)	105 (15)	0.1749	
空腹時インスリン (μU/ml)	4 (1)	116 (7)	152 (12)	138 (8)	163 (10)	0.2472	
平均インスリン (μU/ml)	34 (3)	280 (16)	309 (25)	298 (13)	288 (15)	0.0677	
TG (mg/dl)	49 (5)	465 (22)	438 (28)	441 (18)	406 (23)	0.0001	
HDL-C (mg/dl)	75 (6)	85 (2)	87 (2)	86 (2)	99 (3)	0.0080	
収縮期血圧 (mmHg)	104 (4)	90 (2)	100 (4)	109 (7)	97 (2)	0.0004	
拡張期血圧 (mmHg)	69 (4)	115 (5)	119 (9)	113 (4)	140 (8)	0.0775	
		14 (2)	12 (2)	12 (1)	12 (2)	0.0224	
		21 (2)	21 (3)	17 (3)	16 (2)	0.4590	
		67 (8)	61 (9)	69 (11)	57 (8)	0.5304	
		101 (12)	87 (8)	99 (12)	83 (8)	0.0161	
		125 (25)	79 (10)	130 (24)	131 (31)	0.6165	
		129 (15)	115 (11)	128 (13)	119 (15)	0.4363	
		53 (2)	52 (4)	51 (3)	54 (3)	0.5530	
		49 (2)	47 (2)	52 (2)	52 (3)	0.8183	
		114 (3)	120 (6)	118 (5)	125 (3)	0.7402	
		127 (3)	125 (3)	128 (3)	129 (3)	0.1745	
		73 (2)	74 (3)	74 (3)	80 (4)	0.1024	
		82 (3)	88 (3)	88 (2)	85 (2)	0.0136	
						0.5307	
						0.0711	
						<0.0001	

平均 (標準誤差)

肥満者における年齢、BMIによるトレンドはそれぞれJonckheere-Terpstra Test, stratified Wilcoxon-Mann-Whitney Test により検定した。

第4表 Metabolic Syndrome の各コンポーネントの頻度

男性		非肥満対照 18~23	肥満者				P		
年齢(歳)	18~23		18~23	24~29	30~34	35~39	年齢	BMI	
各コンポーネントの頻度(%)			BMI						
内臓脂肪面積 $\geq 100\text{cm}^2$	0		25-29.9	37	82	73	88	<0.0001	0.0001
			≥ 30	57	95	100	96		
空腹時血糖 $\geq 110\text{mg/dl}$	0		1	12	7	18	<0.0001	0.2703	
			1	9	18	33			
IGT, IFG, 糖尿病型	6		9	18	27	35	<0.0001	0.1630	
			12	26	36	50			
平均インスリン $\geq 50\mu\text{U/ml}$	28		65	65	47	41	0.0050	<0.0001	
			88	86	86	71			
TG $\geq 150\text{mg/dl}$	6		15	24	33	35	0.0006	<0.0001	
			36	39	54	50			
HDL-C $< 40\text{mg/dl}$	6		28	29	27	35	0.3771	0.0830	
			86	41	43	42			
TG $\geq 150\text{mg/dl}$ または HDL-C $< 35\text{mg/dl}$	11		21	35	47	41	0.0042	0.0005	
			41	52	61	50			
血圧 $\geq 140/90\text{mmHg}$	6		25	18	13	24	0.3434	0.0001	
			39	41	39	63			
血圧 $\geq 130/85\text{mmHg}$	22		33	35	27	47	0.0033	<0.0001	
			52	60	69	60			

女性		非肥満対照 18~23	肥満者				P		
年齢(歳)	18~23		18~23	24~29	30~34	35~39	年齢	BMI	
各コンポーネントの頻度(%)			BMI						
内臓脂肪面積 $\geq 100\text{cm}^2$	0		25-29.9	17	56	38	50	0.0060	<0.0001
			≥ 30	63	92	90	88		
空腹時血糖 $\geq 110\text{mg/dl}$	0		0	0	0	25	0.1048	0.2647	
			4	24	10	16			
IGT, IFG, 糖尿病型	0		11	22	8	50	0.5953	0.0046	
			46	62	45	40			
平均インスリン $\geq 50\mu\text{U/ml}$	0		56	78	54	50	0.4152	0.0041	
			83	80	86	72			
TG $\geq 150\text{mg/dl}$	0		17	0	31	17	0.9326	0.2331	
			29	28	24	24			
HDL-C $< 50\text{mg/dl}$	0		22	67	46	33	0.9426	0.1238	
			58	60	41	56			
TG $\geq 150\text{mg/dl}$ または HDL-C $< 39\text{mg/dl}$	0		17	11	31	17	0.1781	0.0604	
			46	44	28	24			
血圧 $\geq 140/90\text{mmHg}$	0		6	11	15	42	0.0159	0.0010	
			33	44	52	52			
血圧 $\geq 130/85\text{mmHg}$	0		11	22	15	50	0.0568	<0.0001	
			50	80	69	60			

肥満者の各コンポーネントの頻度の年齢, BMI によるトレンドは Cochran-Armitage Trend Test により検定した。

はっきりしなかった。脂質代謝指標は、男性でTGが年齢とともに高値となったが、女性では年齢で差がなかった。また、収縮期血圧は年齢で差がなかったが、拡張期血圧は男性では年齢層があがるにつれ高値を示し、女性も同様の傾向を示した。

MSの診断基準となっている各コンポーネント陽性者の頻度をみると(第4表)、耐糖能異常の頻度は年齢とともに高値を示す傾向にあるものの頻度は低く、一方、高インスリン血症の頻度は、男性非肥満者では定義上約

25%であるのに対し、肥満者では40~80%台で、高インスリン血症を特徴的に呈していた。耐糖能異常に比べて、脂質代謝異常、高血圧症の頻度は一般に高い傾向にあった。

次に、MSのコンポーネント数、頻度について、年齢、BMI群ごとの比較をおこなった(第5表)。各代謝指標と同様、MSのコンポーネント数、頻度ともBMI30以上の群で高く、高度肥満者のMSのリスクは軽度肥満者に比べて明らかに高かった。また、男性では年齢層が

第5表 対象の Metabolic Syndrome の発現

年齢(歳)	非肥満対照 18~23	肥満者				P		
		18~23	24~29	30~34	35~39			
MSのコンポーネント数 平均(標準誤差)								
男性	WHO 0.5 (0.2)	BMI				年齢 BMI		
		25-29.9	1.6 (0.1)	2.2 (0.2)	2.1 (0.3)		2.3 (0.3)	
		≥30	2.4 (0.1)	3.0 (0.1)	3.2 (0.2)	3.3 (0.3)	<0.0001	<0.0001
NCEP	0.3 (0.1)							
		1.1 (0.1)	1.8 (0.3)	1.7 (0.3)	2.2 (0.3)		<0.0001	<0.0001
		1.8 (0.1)	2.4 (0.1)	2.9 (0.2)	3.0 (0.2)			
女性	WHO 0.0 (0.0)					年齢 BMI		
		1.1 (0.3)	1.8 (0.4)	1.4 (0.4)	2.1 (0.4)		0.1642	<0.0001
		2.7 (0.3)	3.1 (0.3)	3.0 (0.2)	2.8 (0.2)			
NCEP	0.0 (0.0)							
		0.7 (0.2)	1.4 (0.3)	1.3 (0.3)	1.8 (0.4)		0.0155	<0.0001
		2.0 (0.3)	2.6 (0.2)	2.3 (0.2)	2.4 (0.2)			
MSの頻度 % (95%信頼区間)								
男性	WHO 6 (1-25)	BMI				年齢 BMI		
		25-29.9	14 (9-22)	24 (10-47)	20 (7-45)		35 (17-59)	<0.0001
		≥30	44 (36-52)	77 (63-87)	75 (57-87)	71 (61-85)		
NCEP	0 (0-17)							
		9 (5-16)	35 (27-59)	13 (4-38)	41 (22-64)		<0.0001	<0.0001
		27 (20-35)	46 (31-59)	68 (49-82)	71 (51-85)			
女性	WHO 0 (0-35)					年齢 BMI		
		11 (3-33)	0 (0-30)	23 (8-50)	25 (9-53)		0.2735	<0.0001
		42 (25-61)	60 (41-77)	55 (38-72)	52 (34-70)			
NCEP	0 (0-35)							
		6 (10-26)	11 (20-44)	8 (1-33)	17 (5-45)		0.8058	0.0001
		38 (21-57)	52 (34-70)	41 (26-59)	40 (23-59)			

肥満者のMSのコンポーネント数の年齢、BMIによるトレンドはgeneralized Cochran-Mantel-Haenszel Testにより検定した。
肥満者のMSの頻度の年齢、BMIによるトレンドはCochran-Armitage Trend Testにより検定した。

第6表 体脂肪分布、MSのコンポーネント数・オッズにおよぼす年齢、BMI、性別の影響

	年齢 (10歳)			BMI (5 kg/m ²)			性別 (女性)			調整済 R ²
	偏回帰係数 (95%信頼区間)	標準化 係数	P	偏回帰係数 (95%信頼区間)	標準化 係数	P	偏回帰係数 (95%信頼区間)	標準化 係数	P	
内臓脂肪面積 (cm ²)	38 (33 to 44)	0.467	0.0001	29 (25 to 32)	0.490	0.0001	-28 (-36 to -20)	-0.229	0.0001	0.462
皮下脂肪面積 (cm ²)	-10 (-18 to -1)	-0.051	0.0330	103 (97 to 109)	0.791	0.0001	74 (61 to 86)	0.271	0.0001	0.725
MS (WHO) の コンポーネント数	0.4 (0.3 to 0.6)	0.229	0.0001	0.6 (0.5 to 0.7)	0.427	0.0001	-0.2 (-0.4 to 0)	-0.072	0.069	0.240
MS (NCEP) の コンポーネント数	0.6 (0.4 to 0.7)	0.326	0.0001	0.4 (0.3 to 0.5)	0.329	0.0001	-0.3 (-0.5 to 0)	-0.094	0.019	0.215

	年齢 (10歳)		BMI (5 kg/m ²)		性別 (女性)	
	オッズ比 (95%信頼区間)	P	オッズ比 (95%信頼区間)	P	オッズ比 (95%信頼区間)	P
MS (WHO)	1.99 (1.46 to 2.71)	<0.0001	3.22 (2.46 to 4.20)	<0.0001	0.49 (0.30 to 0.79)	0.0032
MS (NCEP)	2.28 (1.73 to 3.10)	<0.0001	2.01 (1.62 to 2.50)	<0.0001	0.61 (0.38 to 0.97)	0.0351

体脂肪分布、MSのコンポーネント数については重回帰モデル、MSのオッズについてはロジスティック多重重回帰モデルにより年齢、BMI、性別の関与を推定した。

上がるにつれMSのコンポーネント数、頻度も高値を示したが、症例数の少ない女性では同様の傾向を認めなかったもの、必ずしも有意でなかった。

年齢、BMI、性別を独立変数とし、重回帰およびロジスティック多重重回帰モデルによって、MSのコンポーネント数、頻度におよぼす影響を評価した(第6表)。MS

に重要な関与をおよぼすとされる内臓脂肪面積の蓄積には一般に性差があるため、同様のモデルであわせて評価をおこなった。(なお、MSのコンポーネント数は、得られる結果を理解が容易なものとするため、ここでは連続変数として扱い重回帰モデルを用いた) その結果、他の指標が等しく、年齢が10歳高い、またはBMIが5

大きいとき、MSのコンポーネント数は0.4~0.6多く、MSのリスクのオッズ比は2~3.2となることが示された。

女性は男性に比べてMSのリスクが低かったが、重回帰モデルの標準化係数の比較から、性別の影響は年齢、BMIに比して小さいことが示された。内臓脂肪面積を従属変数とする重回帰分析では、年齢、BMIが同じであれば、女性は男性に比べて内臓脂肪面積が28 cm²少なく、これは年齢が7.5歳若い、あるいはBMIが5小さいのと同等の効果であることがわかる。このような好ましい体脂肪分布にも関わらず、女性であることのMS

のリスクの低減効果はそれほど大きくないことが、今回の解析で明らかとなった。

2) MSのリスクにおよぼす身体的フィットネス (peak V_o/wt) の影響

年齢18~23歳の肥満男性127名、非肥満対照男性10名について、肥満者をBMIで2群に分け、BMI群間の身体的フィットネス (運動耐用量) の比較を行った (第7表)。運動継続時間、ピーク心拍数はBMIによる影響が認められなかったが、peak V_o/wtはBMIが高いほど低値を示した。

第7表 BMI階層別に見た身体的フィットネス

BMI	非肥満対照		肥満者		P
	<25 (N=10)	25-29.9 (N=57)	≥30 (N=70)		
運動継続時間 (分)	15.1 (2.2)	17.0 (2.7)	16.0 (3.1)	0.2789	
ピーク心拍数 (bpm)	182 (10)	182 (13)	180 (25)	0.9311	
Peak V _o /wt (ml/kg/min)	41.7 (3.3)	34.7 (4.8)	31.3 (4.5)	<0.0001	

平均 (標準偏差)

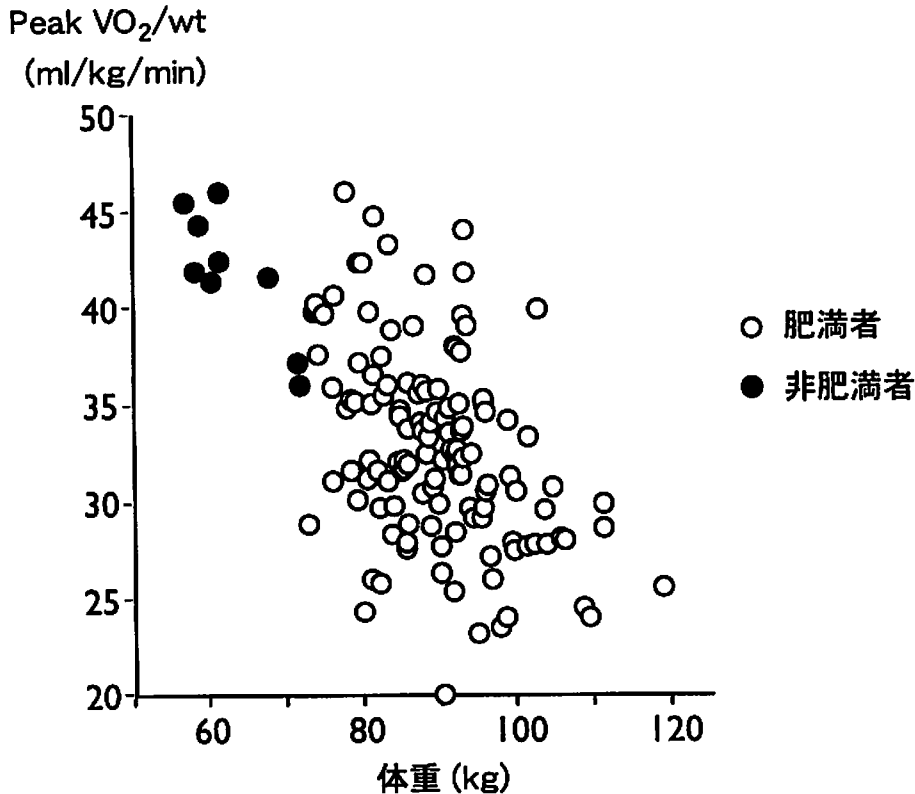
BMIによるトレンドをJonckheere-Terpstra Testにより検定した。

第8表 MSのコンポーネント数・オッズにおよぼす体重、peak V_o/wtの影響

	体重 (10 kg)			Peak V _o /wt (5 ml/kg/min)			調整済 R ²
	偏回帰係数 (95%信頼区間)	標準化 係数	P	偏回帰係数 (95%信頼区間)	標準化 係数	P	
MS (WHO) のコンポーネント数							
全例 (N=137)	0.2 (0 to 0.4)	0.204	0.030	-0.3 (-0.5 to -0.1)	-0.308	0.001	0.195
肥満者のみ (N=127)	0.2 (0 to 0.5)	0.186	0.040	-0.3 (-0.5 to -0.1)	-0.286	0.002	0.146
MS (NCEP) のコンポーネント数							
全例	0.3 (0.1 to 0.4)	0.240	0.012	-0.3 (-0.5 to -0.1)	-0.249	0.009	0.175
肥満者のみ	0.3 (0.1 to 0.5)	0.234	0.011	-0.3 (-0.5 to -0.1)	-0.236	0.010	0.142

	体重 (10 kg)		Peak V _o /wt (5 ml/kg/min)	
	オッズ比 (95%信頼区間)	P	オッズ比 (95%信頼区間)	P
MS (WHO)				
全例	1.74 (1.07-2.87)	0.0180	0.73 (0.45-1.16)	0.1984
肥満者のみ	1.98 (1.18-3.43)	0.0070	0.71 (0.43-1.16)	0.1748
MS (NCEP)				
全例	1.49 (0.87-2.61)	0.1484	0.48 (0.26-0.86)	0.0098
肥満者のみ	1.46 (0.82-2.56)	0.1862	0.49 (0.26-0.87)	0.0124

MSのコンポーネント数については重回帰モデル、MSのオッズについてはロジスティック多重回帰モデルにより体重、peak V_o/wtの関与を推定した。



第1図 Peak V_{O_2}/wt と体重の関係

Peak V_{O_2}/wt と体重との間には負の相関が認められた

(Spearman 順位相関, $\rho = -0.49$, $P < 0.001$ (全例, $N = 137$), $\rho = -0.38$, $P < 0.0001$ (肥満者のみ, $N = 127$)).

しかし, peak V_{O_2}/wt と体重の関係を見ると (第1図), 両者には負の相関が認められた (Spearman 順位相関, $\rho = -0.49$ (全例), -0.38 (肥満者のみ)). そこで, 体重と独立した peak V_{O_2}/wt の MS への関与を見るため, 体重, peak V_{O_2}/wt を独立変数とし, 重回帰およびロジスティック多重回帰モデルによって, MS のコンポーネント数, 頻度におよぼす影響を評価した (第8表). その結果, 体重が同じとき, peak V_{O_2}/wt が 5 ml/kg/min 高いと, MS のコンポーネント数は 0.3 少なく, オッズ比で示される MS のリスクの減少は 0.7~0.5 であることが示された. これらの結果は肥満者のみで見た場合も, 非肥満対照を含めた場合も同様であった.

2. 縦断的検討

1.5 年の介入による体重の変化率は平均-11.6%, ドロップアウト群を含めると平均-8.8 (-31.2~+21.2)%であった. 体重変化率で4群に層別化し, 各群の体組成, 代謝指標, 血圧の変化率を検討した (第9表). い

ずれの指標の変化率も体重変化率と強い関連が認められた. 各代謝指標の変化率の95%信頼区間を見ると, 体重変化率が<-15, -15~-<-5%の2群ではほとんどの指標が改善を示したのに対し, -5~-<0%の群では, 体組成は有意な変化を認めたものの, 代謝指標, 血圧の改善はいずれも有意ではなかった.

アディポネクチン, レジスチン, レプチン, および hsCRP の体重変化率別にみた介入前後の変化率 (第10表) を示す. これらの指標は, 体重変化率に応じた変化を認めた.

次に, 体重が減少した3群について, 減量前後での MS のコンポーネント数, 頻度の変化を比較した (第11表). 介入によりいずれの群も MS のコンポーネント数は減少したが, 体重変化率が-5~-<0%の群では MS の頻度の変化は必ずしも明らかでなかった. -15~-<-5% (平均-10%) の減量群では, WHO, NCEP の基準による MS の頻度はそれぞれ 52 から 21%, 41 から 16%に低下した. なお, 体重減少率の大きい群ほど,

第9表 体重変化率別にみた体組成・代謝指標の変化率

体重変化率 (%)	<-15%	≥-15% to <-5%	≥-5% to <0%	≥0%	P
平均 (標準偏差)	-21 (5)	-10 (3)	-3 (2)	8 (6)	
N (男性/女性)	16/9 (8/6*)	29/15 (13/9*)	16/4 (7/3*)	8/7 (2/3*)	
変化率 (%)					
体脂肪量*	-40 (-47 to -33)	-21 (-25 to -16)	-12 (-17 to -8)	18 (0 to 35)	<0.0001
除脂肪体重*	-9 (-12 to -6)	-4 (-5 to -2)	2 (0 to 3)	4 (1 to 8)	<0.0001
内臓脂肪面積	-57 (-63 to -50)	-33 (-40 to -26)	-16 (-23 to -9)	27 (8 to 47)	<0.0001
皮下脂肪面積	-48 (-57 to -40)	-25 (-29 to -20)	-8 (-12 to -4)	13 (6 to 19)	<0.0001
空腹時血糖	-10 (-15 to -4)	-6 (-10 to -2)	-4 (-8 to 0)	6 (1 to 12)	0.0001
平均血糖	-19 (-27 to -11)	-14 (-18 to -10)	-4 (-11 to 3)	4 (-3 to 12)	<0.0001
空腹時インスリン	-42 (-52 to -32)	-28 (-38 to -18)	-1 (-21 to 20)	36 (11 to 60)	<0.0001
平均インスリン	-44 (-54 to -35)	-26 (-36 to -15)	-5 (-21 to 12)	12 (-5 to 29)	<0.0001
TG	-41 (-49 to -34)	-13 (-24 to -2)	8 (-8 to 24)	40 (13 to 67)	<0.0001
HDL-C	23 (13 to 33)	11 (4 to 17)	2 (-4 to 8)	0 (-6 to 7)	0.0002
収縮期血圧	-7 (-11 to -3)	-6 (-10 to -3)	-5 (-10 to 0)	3 (-2 to 7)	0.0129
拡張期血圧	-15 (-20 to -9)	-4 (-9 to 1)	-4 (-11 to 3)	4 (-5 to 13)	0.0012

平均 (95%信頼区間)

体重変化率によるトレンドは Jonckheere-Terpstra Test で検定した。

第10表 体重変化率別にみた脂肪細胞由来のサイトカイン・hsCRPの変化率

	介入前の値	変化率 (%)				P
		体重変化率 (%)				
		<-15	≥-15 to <-5	≥-5 to <0	≥0	
アディポネクチン (N=47)	16.3 (10.6) µg/ml	51.7 (34.1)	9.3 (40.3)	12.9 (46.2)	-14.5 (28.8)	0.0094
レジスチン (N=29)	24.9 (16.7) ng/ml	-21.8 (16.1)	-12.9 (20.7)	15.3 (69.4)	23.2 (20.7)	0.0143
レプチン (N=47)	14.3 (7.9) ng/ml	-54.5 (19.8)	-23.7 (22.3)	-12.2 (28.2)	3.1 (32.4)	0.0005
hsCRP (N=38)	0.137 (0.125) mg/dl	-64.2 (26.0)	-32.2 (56.9)	-9.1 (49.4)	41.6 (96.6)	0.0019

値は平均 (標準偏差) を示した。

体重変化率によるトレンドは Jonckheere-Terpstra Test で検定した。

第11表 体重減少率別にみたMSのコンポーネント数・頻度の変化

体重減少率 (%)	MS コンポーネント数			MS の頻度 (%)			
	前	後	P	前	後	差 (95%信頼区間)	P
<-15%							
WHO	3.0	0.7	<0.0001	60	4	-56 (-73 to -31)	0.0001
NCEP	2.6	0.8	<0.0001	56	0	-56 (-73 to -33)	0.0001
≥-15% to <-5%							
WHO	2.8	1.5	<0.0001	52	21	-32 (-46 to -15)	0.0005
NCEP	2.3	1.4	<0.0001	41	16	-25 (-39 to -10)	0.0034
≥-5% to <0%							
WHO	2.5	1.7	0.0076	30	35	5 (-18 to 27)	0.1892
NCEP	1.7	1.4	0.0082	30	20	-10 (-31 to 12)	0.0309

MSの頻度の変化の95%信頼区間は Newcombe 法により求めた。

MSのコンポーネント数、頻度の変化はそれぞれ Wilcoxon signed rank Test, McNemar Test により検定した。

第12表 MSのコンポーネント数の変化におよぼす体重変化率、減量前のコンポーネント数の影響

	体重変化率 (-10%)			減量前の MS コンポーネント数			調整済 R ²
	偏回帰係数 (95%信頼区間)	標準化 係数	P	偏回帰係数 (95%信頼区間)	標準化 係数	P	
MS (WHO) の コンポーネント数	-0.71 (-0.40 to -1.0)	-0.418	0.0001	-0.43 (-0.25 to -0.61)	-0.427	0.0001	0.288
MS (NCEP) の コンポーネント数	-0.55 (-0.29 to -0.81)	-0.395	0.0001	-0.35 (-0.18 to -0.51)	-0.404	0.0001	0.239

重回帰モデルにより体重減少率、減量前のコンポーネント数の関与を評価した。

介入前の MS のコンポーネント数、頻度の多い傾向が認められた (コンポーネント数: WHO: P=0.1019, NCEP: P=0.0162 (Jonckheere-Terpstra Test), 頻度: WHO: P=0.0544, NCEP: P=0.0974 (Cochran-Armitage Trend Test)).

体重が減少した3群、計89名で、MSのコンポーネント数の減少量を従属変数、体重変化率、介入前のMSのコンポーネント数を独立変数とし、重回帰分析を行った (第12表)。その結果、10%の減量によってMSのコンポーネント数は0.6~0.7減少することが示された。

考 察

本研究は、若年の成人肥満に注目し、その代謝上のリスクを評価した。MSを構成する各代謝指標のうち、耐糖能異常の頻度は年齢とともに増加傾向にあったが、わが国の成人 (20~79歳) の糖尿病、IGTの頻度の推定値がそれぞれ6.9、13.0%である²⁷⁾ことと比較すると、肥満度が高いにもかかわらず耐糖能異常の頻度は低く、若年であることの影響が示唆された。今回の肥満者では40~80%以上が高インスリン血症を呈し、これが耐糖能異常の頻度の低さと関連していると考えられた²⁹⁾。また、耐糖能異常に比べて脂質代謝異常、高血圧症の頻度の方が高く、Reaven¹⁾が最初に示した典型的な Syndrome X の病態を呈していた。

WHO, NCEPの診断基準にもとづくMSの頻度は、大規模な疫学調査でおおむね10~20%代前半と報告されている^{6), 11), 12), 24), 25)}。若年者での報告は少ないが、NHANES IIIの対象では、12~19歳で4.2%²⁶⁾、20歳代で7%、30歳代で13%¹¹⁾、Canada Heart Health Survey⁶⁾では、20歳代5%、30歳代9%である。DECODE研究に参加した2つのコホートでも、30歳代の頻度は9%とされている¹²⁾。今回の検討のBMI 25~29.9の過体重者のMSの頻度は、こうした値に比

べてやや高い傾向にあり、さらに、BMI 30以上の症例では最も年齢の若い18~23歳群から、MSの頻度が極めて高いことが明らかとなった。

重回帰、およびロジスティック多重回帰モデルによる横断的検討から得られた年齢、BMIの影響が個人の縦断的な変化にも当てはまると仮定すると、若年成人肥満者は (たとえBMIが変化しなくても) 中高年となるまでに、MSのリスクがさらに増加することになる。また、男性は最も体重増加が著しい年齢でもあるので、さらにリスクの増加が予想される。一方、女性は皮下脂肪が多く内臓脂肪が相対的に少ない好ましい体脂肪分布を呈するため、リスクが少ないかのように考えられがちだが、今回の検討からは、女性であることのリスクの低減効果はそれほど大きくないことが示された。

MSは、大規模な前向き研究で全死亡^{12), 27), 28)}、心血管死^{12), 25), 27), 28)}、虚血性心疾患のイベント²⁹⁾および死亡リスク²⁷⁾の増加と関連することが報告されている。また、MSを有する非糖尿病患者では糖尿病発症のリスクが高いことも示されている^{29), 30)}。若年成人肥満者は早期予防の重要なターゲットといえる。

MSおよびそのリスクへの身体活動の関与を、身体的フィットネスを指標に用いて評価した検討としては、Aerobics Center Longitudinal Study (ACLS) と Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study (KIHD) の成績がある。ACLSの女性コホートを対象とした横断的検討では、身体的フィットネス・レベルの低い者で、MSの頻度が高いことが報告されている³¹⁾。また、男性コホートにおける平均10年間の前向き研究では、フィットネス・レベルで補正すると、MS合併の有無で全死亡および心血管死のリスクに差がなくなると報告されている²⁹⁾。もっとも、ACLSではトレッドミルの最大運動負荷試験での走行時間をフィットネスの指標に用いており、体重それ自体が運動耐容能に大きく影響する。実際、これらの成績ではフィットネス・レベルの

低い者は体重が多いが、体重の補正はされていない。一方、KIHDでは、住民から抽出した約1000名の男性を、質問紙法により調査した身体活動量と自転車エルゴメータによる最大運動負荷試験中の最大酸素摂取量でそれぞれ3群に分け、MSのオッズを比較している³²⁾。その結果、身体活動量やフィットネス・レベルの低い者でMSのリスクは高かったが、BMIで補正すると、身体活動量についてこの関連は消失し、フィットネスにおける関連も減弱したという。

ACLS, KIHDの対象はいずれも平均年齢が40歳代以降の中高齢者であるが、本研究では18~23歳の均一な年齢の若年者を対象とし、自転車エルゴメータで測定したpeak V_{O_2}/wt とMSの関連を評価した。その結果、有酸素能力を良く反映し身体的フィットネス評価のgold standardとされるpeak V_{O_2}/wt は、体重が多く広い範囲に分布する肥満者では(体重が負荷とならない自転車エルゴメータによって測定した場合でも)、体重とあきらかな負の相関を示すことがまず明らかとなった。本研究ではこのため体重補正を行い、体重とは独立したpeak V_{O_2}/wt のMSのリスクに対する抑制的関与を若年肥満男性で明らかにした。

運動療法を用いた介入研究では、HERITAGE Family Studyの20週間の有酸素トレーニングにより、当初MSを有した者の30.5%でMSを認めなくなったことが報告されている³³⁾。ただし、この報告では対象者の体重変化は触れられていない。一方、Watkinsら³⁴⁾は、WHOとNCEPのMSの診断基準を折衷した独自の基準で、高血圧に高インスリン血症、高脂血症を合併した過体重者42名を選出し、26週間の運動療法単独vs.運動プラス食事療法併用の無作為化対照試験を行っている。結果は、10kg(10%)の体重減少を認めた運動プラス食事療法併用群に比べて、体重減少が2kgにとどまった運動療法単独群の代謝指標の改善効果は劣っていたという。この成績から、運動療法は体重減少を伴わない場合その効果は限定的であり、MSをとまう過体重者の治療には運動と食事療法(減量)の併用が望ましいとWatkinsらは結論している。

本研究では、食事と運動療法を併用し、減量指導開始後1.5年後の時点で評価を行った。体重が大きく減少を続けている時期はエネルギー出納バランスは負の状態にあり、代謝指標は体重減少に加えて、負のエネルギーバランスの影響も受ける。極端な食事制限によって減量した直後の血液指標は大きく改善しているが、減量後、食事摂取量を増やすと、体重に変化がなくても血液指標の改善の程度が減弱するのはこのためである。減量開始

1.5年後でも、まだアクティブな体重減少が続いている症例も一部にはいるが、多くはこの時期は体重維持期に入っている。本研究では、食事制限による負のエネルギー出納バランスの影響を除いた減量それ自体の効果が評価されていると考えられる。

今回の-5~<0%の減量群では、体脂肪量、内臓・皮下脂肪面積は有意に減少し、除脂肪体重は増加傾向にあった。減量時には体脂肪、除脂肪体重は通常3:1の比率で減少するので、この群は運動の併用で除脂肪体重が維持され、体重の変化も少なかったものと推測される。しかし、こうした体組成の改善にも関わらず、この群では代謝指標の有意な改善を認めなかった。肥満者で、運動療法を行ないながら、消費したエネルギー量を補食させ体重を一定に維持した場合、インスリン感受性は改善しなかったという介入実験の成績^{35), 36)}もあり、肥満者の代謝指標の改善には、体脂肪を大きく減少させることがまず重要であること³⁷⁾が示唆される。

欧米の肥満診療指針では、当初の減量目標を治療前体重の10%減としている^{38), 39)}。その根拠は、無作為化対照試験による3~12か月の食事療法の減量プログラムの体重減少効果が平均8%、3~4.5年の体重維持は前値の4%減にとどまり、運動併用による追加の減量も~2kg程度で、現実に達成、維持できる減量がこの程度であることである³⁹⁾。また、こうした軽度の減量でも高血圧症、高脂血症などの代謝異常が著明に改善することも根拠として挙げられている³⁹⁾。こうした軽度減量のメリットに関するこれまでのエビデンスは、いずれも平均年齢が40歳代以上の中高齢者で検証されたものであるが、本研究の若年成人肥満者でも、-15~<-5%(平均-10%)の減量群で、ほとんどの代謝指標の改善を認め、-10%の減量が当初の目標として適切なものであることが確認された。体組成の変化は、内臓脂肪面積>皮下脂肪面積>体脂肪量>体重の順に減少率が大きく、-10%の体重減少でも内臓脂肪は-33%と大きく減少することが明らかとなった。

MSと関連する脂肪細胞由来のサイトカイン、および慢性炎症のマーカーであるhsCRPは、いずれも体重変化率に応じた変化を認め、減量に伴うインスリン感受性(アディポネクチン、レジスチン)、血圧(レブチン)の改善に関与している可能性が示唆された⁴⁰⁾。

-15~<-5%(平均-10%)の減量群のBMIの減少量は平均3.5であり、減量によるMSのコンポーネント数の減少効果(第12表)は、横断的検討(第6表)から予測されるよりも大きいことが明らかとなった。同様の関係は、インスリン感受性と体重の関連についても指

摘されており、同一個人の体重変化によるインスリン感受性の変化は、多人数の横断的観察から予想される両者の関係より 2.4~4.5 倍大きいという^{41,44)}。これらは、わずかの減量が MS のリスクの減少に有効であることを示唆する所見である。

最後に、本研究の limitation について言及する。本研究は、病院の外来患者を対象としており、一般集団と異なるのではないかという疑問がある。しかしながら、本研究の症例の多くは職場や学校検診で過体重を指摘されて受診した者であること、受診時に服薬治療を受けていた者が全体の 3% に過ぎないことから、患者を対象とした通常の成績と異なり、都市部の若年肥満者の状況を比較的良く反映する対象と考えられる。本研究の対象人数を一般集団で確保するには大規模な調査が必要となるであろう。

次に、長期間の縦断的な検討で介入手段のモニターが困難であるという問題がある。1.5 年という長期間にわたる摂取エネルギー量、消費エネルギー量の変化を精度高く評価する方法を我々は持ち合わせていない。今回の検討では、これらのエネルギー出納の結果としての体組成の変化を比較的正確に評価したに過ぎない。体重減少に比べて効果は小さいものの、身体活動量の増加も代謝指標の改善に関与していると考えられるが、どの程度の関与があるかは明らかではない。これは現在の介入研究すべてに共通する問題点といえる。

3 点目として、今回の縦断的検討では、介入前の MS のコンポーネント数、頻度が、体重減少率の大きい群ほど高い傾向にあり、介入による改善効果に影響しているという点があげられる。一般に介入前の代謝指標の異常の程度が顕著なほど、介入によるその改善効果は大きい。介入前の MS のコンポーネント数、頻度がその後の体重減少に関連する、という所見は興味深いものである。MS の病因に関連するとされるインスリン抵抗性は、体重調節にも関与しており、成人を対象とした複数の前向き研究で、インスリン感受性が高い者ほどその後体重増加をきたしやすいと報告されている^{41,44)}。インスリン抵抗性が高度で MS のコンポーネント数の高い個体は、体重増加に対し抑制的で減量しやすい可能性がある。今回の介入は、減量によって得られる効果が、こうした介入前の代謝異常の程度と個体の減量しやすい影響を含んだものをみている点には留意しておく必要があると考えた。

結論として、これらの若年肥満者では、年齢とともに体組成や多くの代謝指標に悪化が認められた。こうした代謝指標の改善には、-10%程度の軽度の減量でも（体

脂肪が大きく減少し）有効であることが、今回の検討から示唆された。若年肥満者の多くは体重がなお増加傾向にあり、今後さらに高度の肥満に移行する可能性が高い。いったん確立した肥満の治療が困難なことを考慮すると、軽度の減量をめざした、生活習慣修正による早期からの一次予防が重要と考えられた。

総 括

18~39 歳の若年成人肥満者 550 名について、WHO、NCEP の診断基準にしたがい metabolic syndrome (MS) のリスクを評価し、以下の結果を得た。

- 1) 若年成人肥満者では、高インスリン血症を特徴的に認め、耐糖能異常よりも早期に脂質代謝異常、高血圧症が発現していた。
- 2) 年齢が 10 歳、あるいは BMI が 5 高い場合の MS のコンポーネントの数の増加は 0.4~0.6、MS のオッズ比は 2~3.2 であった。年齢、BMI に比べて性差の影響は小さかった。
- 3) PeakV_o/wt は体重とは独立して MS のコンポーネント数の減少と関連していた。PeakV_o/wt が 5 ml/kg/min 高い場合の MS のコンポーネントの数の減少は 0.3、MS のオッズ比は 0.7~0.5 だった。
- 4) 生活習慣修正による減量の程度に応じて、各種代謝指標が改善した。MS と関連する脂肪細胞由来の各種サイトカイン、および hsCRP は体重変化率に応じて変化し、減量に伴う代謝指標の改善に関与している可能性が示唆された。
- 5) -10%程度の軽度の減量でも MS の頻度は、WHO の基準で 52 から 21%、NCEP の基準で 41 から 16% へと大きく減少した。

謝 辞

本研究に際し、ご指導ご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、多くの貴重なご指導ご鞭撻をいただきました慶應義塾大学スポーツ医学研究センター山崎元教授に深謝いたします。さらに、多大なるご助言をいただきました慶應義塾大学スポーツ医学研究センター大西洋平教授に感謝いたします。

本研究の一部は第 13, 15 回日本臨床スポーツ医学会、第 59 回日本体力医学会プロジェクト研究、第 23, 25 回日本肥満学会で発表した。

文 献

- 1) Reaven GM : Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37 : 1595-1607, 1988.
- 2) World Health Organization : Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation, part 1 : diagnosis and classification of diabetes mellitus. World Health Organization, February 1999.
- 3) National Cholesterol Education Program : Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) : executive summary. NIH Publication No. 01-3670, May 2001.
- 4) Grundy SM, Brewer B, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C : NHLBI/AHA Conference Proceedings : definition of metabolic syndrome : report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 109 : 433-438, 2004.
- 5) Grundy SM, Hansen B, Smith SC, Cleeman JI, Kahn RA : NHLBI/AHA Conference Proceedings : clinical management of metabolic syndrome : report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Management. *Circulation* 109 : 551-556, 2004.
- 6) Ardern CI, Katzmarzyk PT, Janssen I, Ross R : Discrimination of health risk by combines body mass index and waist circumference. *Obes Res* 11 : 135-142, 2003.
- 7) Palaniappan L, Carnethon MR, Wang Y, Hanley AJ, Fortmann SP, Haffner SM, Wagenknecht L : Predictors of the incident metabolic syndrome in adults : the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*. 27 : 788-93, 2004.
- 8) 吉池信男, 西信雄, 松島松翠, 伊藤千賀子, 池田義雄, 榎原英俊, 吉永英世, 小倉浩, 小峰慎吾, 佐藤祐造, 佐藤則之, 佐々木陽, 藤岡滋典, 奥淳治, 雨宮慎子, 坂田利家, 井上修二 : Body mass indexに基づく肥満の程度と糖尿病, 高血圧, 高脂血症の危険因子との関連 : 他施設共同研究による疫学的検討. *肥満研究* 6 : 4-17, 2000.
- 9) Yoshiike N, Seino F, Tajima S, Arai Y, Kawano M, Furuhashi T, Inoue S : Twenty-year changes in the prevalence of overweight in Japanese adults : The National Nutrition Survey 1976-95. *Obes Rev* 3 : 183-190, 2002.
- 10) 勝川史憲 : 運動処方・運動指導実践ファイル : 若年肥満者. *臨床スポーツ医学* 20 : 696-702, 2003.
- 11) Ford ES, Wayne HG, William HD : Prevalence of the metabolic syndrome among US adults : findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287 : 356-359, 2002.
- 12) Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyörälä K : Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med* 164 : 1066-1076, 2004.
- 13) Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB : The metabolic syndrome : prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 163 : 427-436, 2003.
- 14) 勝川史憲, 大西祥平, 山崎元, 辻秀一, 井筒睦, 平松京一 : 若年肥満者における糖質脂質代謝異常, 体脂肪分布と運動耐容能の関連の検討 : 運動療法効果を含めて. *臨床スポーツ医学* 9 : 1397-1402, 1992.
- 15) Brozek J, Grande F, Anderson JT, Keys A : Densitometric analysis of body composition : revision of some quantitative assumptions. *Ann N Y Acad Sci* 110 : 113-140, 1963.
- 16) 勝川史憲 : 体脂肪率と肥満. *臨床栄養* 90 : 1-9, 1997.
- 17) Yeni-Komshian H, Abbasi F, Carantoni M et al. : Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy nondiabetic volunteers. *Diabetes Care* 23 : 171-5, 2000.
- 18) 松澤佑次, 井上修二, 池田義雄, 坂田利家, 齋藤康, 佐藤祐造, 白井厚治, 大野誠, 宮崎滋, 徳永勝人, 深川光司, 山之内国男, 中村正 : 新しい肥満の判定と肥満症の診断基準. *肥満研究* 6 : 18-28, 2000.
- 19) 勝川史憲, 木下訓光, 大西祥平, 山崎元, 小熊祐子, 石田浩之 : 若年過体重男性において, 身体的フィットネスは内臓脂肪蓄積, 代謝異常と関連するか? *臨床スポーツ医学* 15 : 641-646, 1998.
- 20) 勝川史憲 : 若年成人肥満者を対象とした運動+食事指導による生活習慣修正の効用. *日本臨床スポーツ医学会誌* 11 : 454-463, 2003.
- 21) Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, Buchner D, Ettinger W, Heath GW, King AC, Kriska A, Leon AS, Marcus BH, Morris J, Paffenberger RS, Patrick K, Pollock ML, Rippe JM, Sallis J, Wilmore JH : Physical activity and public health : a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and American College of Sports Medicine. *JAMA* 273, 402-407, 1995.
- 22) International Diabetes Federation : *Diabetes Atlas* 2nd ed. p 64-67, 2004.
- 23) 勝川史憲, 辻秀一, 大西祥平, 山崎元, 西野素子, 和井内英樹, 片岡邦三 : 耐等能正常若年者の高インスリン血症 : 体組成, 身体的フィットネスの及ぼす影響, 動脈硬化危険因子との関連について. *肥満研究* 1 : 84-89, 1995.
- 24) Meigs JB, Wilson PW, Nathan DM, D'Agostino RB Sr, Williams K, Haffner SM : Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in the San Antonio Heart and Framingham Offspring Studies. *Diabetes* 52 : 2160-2167, 2003.

- 25) Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L : Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24 : 683-689, 2001.
- 26) Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH : Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents : findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157 : 821-827, 2003.
- 27) Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT : The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288 : 2709-2716, 2002.
- 28) Katzmarzyk PT, Church TS, Blair SN : Cardiorespiratory fitness attenuates the effects of the metabolic syndrome on all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Arch Intern Med* 164 : 1092-1097, 2004.
- 29) Sattar N, Gaw A, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Haffner SM, Isles C, Macfarlane PW, Packard CJ, Cobbe SM, Shepherd J : Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 29 : 414-419, 2003.
- 30) Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA : Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus : application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 156 : 1070-1077, 2002.
- 31) Farrell SW, Cheng YK, Blair SN : Prevalence of the metabolic syndrome across cardiorespiratory fitness levels in women. *Obes Res* 12 : 824-830, 2004.
- 32) Lakka TS, Laaksonen DE, Lakka HM, Mannikko N, Niskanen LK, Rauramaa R, Salonen JT : Sedentary lifestyle, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. *Med Sci Sports Exerc* 35 : 1279-1286, 2003.
- 33) Katzmarzyk PT, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, Rao DC, Rankinen T, Bouchard C : Targeting the metabolic syndrome with exercise : evidence from the HERITAGE Family Study. *Med Sci Sports Exerc* 35 : 1703-1709, 2003.
- 34) Watkins LL, Sherwood A, Feinglos M, Hinderliter A, Babyak M, Gullette E, Waugh R, Blumenthal JA : Effects of exercise and weight loss on cardiac risk factors associated with syndrome X. *Arch Intern Med* 163 : 1889-1895, 2003.
- 35) Segal KR, Edano A, Abalos A, Albu J, Blando L, Tomas MB, Pi-Sunyer FX : Effect of exercise training on insulin sensitivity and glucose metabolism in lean, obese, and diabetic men. *J Appl Physiol* 71 : 2402-2411, 1991.
- 36) Ross R, Dagnone D, Jones PJ, Smith H, Paddags A, Hudson R, Janssen I : Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. *Arch Intern Med* 133 : 92-103, 2000.
- 37) 勝川史憲 : 介入試験ほかのエビデンスからみた有効な減量法とは？日本臨床スポーツ医学会誌 12 : 186-197, 2004.
- 38) World Health Organization : Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. WHO Technical Report No. 894 1999.
- 39) National Institute of Health : Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults : the evidence report. NIH Publication No.98-4083, August 1998.
- 40) Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T : Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 11 : 997-1001, 2003.
- 41) Swinburn BA, Nyomba BL, Saad MF, Zurlo F, Raz I, Knowler WC, Lillioja S, Bogardus C, Ravussin E : Insulin resistance associated with lower rates of weight gain in Pima Indians. *J Clin Invest* 88 : 168-173, 1991.
- 42) Hoag S, Marshall JA, Jones RH, Hamman RF : High fasting insulin levels associated with lower rates of weight gain in persons with normal glucose tolerance : The San Luis Valley Diabetes Study. *Int J Obesity* 19 : 175-180, 1995.
- 43) Ravussin E, Swinburn BA : Insulin resistance is a result, not a cause of obesity : Socratic debate : pro side. *Progress in Obesity Research* 7. (Ed) Angel A, Anderson H, Bouchard C, Lau D, Leiter L, Mendelson R, John Libbey, London, p.173-174, 1996.
- 44) Katsukawa F, Oguma Y, Kinoshita N, Yamamoto S, Yamada S, Kawai T, Tsujioka M, Yamada K, Onishi S, Yamazaki H : 'Relative' hypoinsulinemia is associated with subsequent weight gain in professional 'sumo' wrestlers. *Med Sci Sports Exerc* 32 : S230, 2000.

学位論文

アンジオテンシン II 受容体遮断薬および Ca 拮抗薬の
慢性経口投与による、高血圧ラットの循環調節の
線形性の低下と、非線形性の亢進

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

おお なみ とし こ
大 波 敏 子

(平成 16 年 12 月 14 日受付)

Key Words : Hypertension, Sympathetic nerve activity, angiotensin II receptor blocker, Ca channel blocker, nonlinearity, coherence

生体にとっての正常状態では、生体を制御するさまざまなシステムがカオス的で、非線形性が高く、「複雑」であることが知られている^{1) 2)}。これまで、恒常性、ホメオスタシスが保たれているのはシステムが単純であるからと考えられていたが、一定に保つためにはむしろ多数のシステムが複雑に作用しあうことが必要であることがわかってきた。逆に、心拍変動や脳波などの非線形性が低下し、「複雑さ」が失われると重症不整脈やけいれんが生じることが臨床研究で報告されている^{3) 4)}。また、Huikuri ら⁵⁾は、心筋梗塞後に心拍変動の非線形性が低下していた患者は生命予後が悪いことを報告した。つまり、非線形性の低下は予後不良の因子と考えられる^{2) 6)}。

線形とは、加算や比例の関係が保たれている関係を目指す。もし、ある制御系が線形であるならば入力 1 に対する出力を出力 1 とすれば、入力 1 + 入力 2 に対する出力は出力 1 + 出力 2 となるはずであり、また、入力 1 の倍数は出力 1 の倍数となるはずである。このような関係を満たさない制御系を非線形という。生体の絶え間ない変化を解析するためには従来の線形の解析法のみでは不十分と考え、非線形の解析法として相互情報量を用いた。

著者の研究室ではこれまで、ヒト本態性高血圧モデルに相当する高血圧自然発症ラット (SHR) では、ウイスター京都ラット (WKY) に比べて腎交感神経活動 (RSNA) と血圧 (BP)、RSNA と腎血流量 (RBF) の相関の線形性が増加し、非線形性が低下していることを

報告してきた⁶⁾。さらに、非線形性の低下と不良な予後を結びつける因子の一つは交感神経活動の亢進であることを報告した。

そこで、本研究ではアンジオテンシン II 受容体遮断薬カンデサルタンと Ca 拮抗薬アムロジピンを 2 週間経口投与し、SHR の神経性循環調節の線形性および非線形性がどのように変化するかを、線形解析である伝達関数^{6) 7)}と線形と非線形を合わせた解析法である相互情報量を用いて比較検討した^{6) 8) 9)}。

さらに、もしカンデサルタンが SHR の線形性を低下させ、非線形性を亢進させるならば、その機序としてレニン-アンジオテンシン系および交感神経系の抑制が予想される。一方、アムロジピンはレニン-アンジオテンシン系および交感神経系を抑制しないので、線形性を低下させ、非線形性を亢進させるとしてもその機序は不明である。

筆者の研究室のこれまでの研究⁶⁾により、SHR に一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の前駆物質である L-アルギニンを静脈内投与すると、腎交感神経活動 (RSNA) と血圧 (BP)、RSNA と腎血流量 (RBF) の相関の線形性が低下したことから、NO の作用が SHR の線形性を低下させることが推察された。それゆえ、アムロジピンがもし SHR の高い線形性を低下させるとするならば、その機序としてアムロジピンによる NO 増加の関与が考えられた^{10) 11)}。そこで、アムロジピンと NO 合成酵素阻害薬である N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-

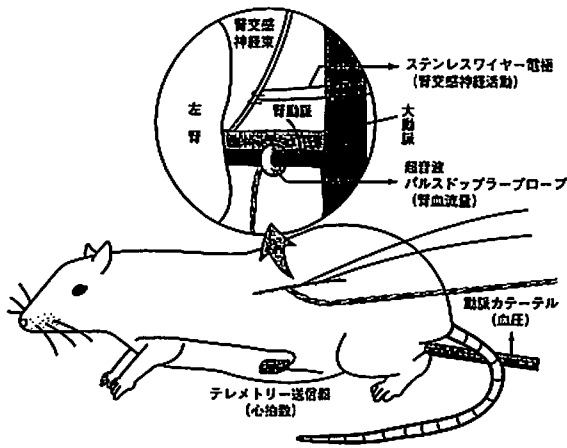


図1 実験方法の模式図。15週齢の高血圧自然発症ラット (SHR) を用い、ペントバルビタール麻酔下到大腿動脈に血圧測定用のカテーテルを挿入し、皮下にテレメトリー送信器を埋め込み心電図から瞬時心拍数を得る。次に左後腹膜切開し、左側の腎交感神経束にステンレスワイヤー電極を装着し、同側の腎動脈にドップラー血流計のプローブを装着する。(大波, 他; 循環制御 2004; 25: 105-221 の第1図を許可を得て転載)

NAME) を2週間、同時に経口投与した時の線形性および非線形性の変化についても検討した。

方法

本研究は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに準拠し、これを遵守した。動物は15週齢の雄のSHRを用いた。ペントバルビタール麻酔下到大腿動脈にカテーテルを挿入し、心拍数を正確に心電図から得るために腹部皮下にテレメトリー送信器を埋め込んだ。左後腹膜を切開し左腎交感神経束を剥離し、ステンレスワイヤー電極を装着した¹²⁾。また、同じ左側の腎動脈にパルスドップラープローブを装着し、シリコンゲルで固定した。(図1) 手術翌日、ラットの体位をホルダーに固定し、無麻酔、軽度の拘束状態であることを確認後、実験開始とした。大腿動脈内のカテーテルを圧トランスデューサーに接続し、血圧を測定した。また、テレメトリー送信器により心電図を記録し、このR-R間隔から瞬時心拍数(HR)を記録した。腎交感神経束の電極より得られた交感神経活動を差動アンプにより増幅した。それぞれA/D変換器により2000Hzで取り込み、6分30秒以上同時記録した⁶⁾。(図2)。R-R間隔の時系列が等間隔

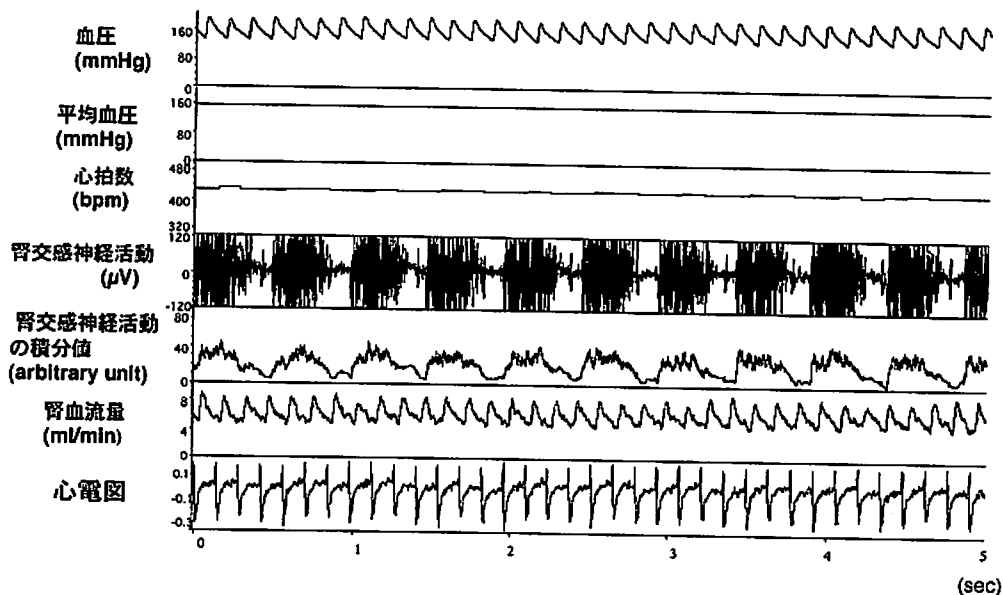


図2 無麻酔状態で記録したSHRの各パラメーターの実際の記録。上から順に血圧、平均血圧 (BP)、心拍数、腎交感神経活動 (RSNA) の原波形、RSNAの積分値、腎血流量 (RBF)、心電図。(大波, 他; 循環制御 2004; 25: 105-221 の第2図を許可を得て転載)

にサンプリングしたデータではないため、心電図はもとも 2000 Hz でサンプリングされていたが Berger ら⁷⁾の方法に従って 64 Hz でリサンプリングされた瞬時心拍数のデータを作成した。2000 Hz でサンプリングされた RSNA, BP と RBF の離散データを直線で結び、この連続した折れ線を 64 Hz でリサンプリングすることによって瞬時心拍数のデータのデータとサンプリング時刻を一致させた。

1) プロトコル 1 (降圧薬の効果)

カンデサルタン 1 mg/kg/日 (n=13), またはアムロジピン 5 mg/kg/日 (n=7) をそれぞれ 2 週間経口投与し, RSNA と BP, RSNA と RBF の相関の線形性, 非線形性を vehicle 群 (n=7) と比較した。

2) プロトコル 2 (NO の効果)

アムロジピンが SHR の高い線形性を低下すると仮定すると, その機序として NO の増加が考えられるため, アムロジピン 5 mg/kg/日と L-NAME 1.5 mg/kg/日 (n=9) を 2 週間同時に経口投与し, RSNA と BP, RSNA と RBF の相関の線形性, 非線形性を vehicle 群およびアムロジピン単独投与群 (n=7) と比較した。

線形解析

スペクトル解析 (高速フーリエ変換) に続いて 2 変量間の伝達関数を求め, 主にコヒーレンスを線形性の指標として用いた。コヒーレンスとは関連度関数のことで, 2 変量間の線形性, 相関性をあらわす。0.5 以上で有意に相関ありと判断され, 線形性が高いほど 1 に近づく。一次回帰でいえば r^2 にあたり, 以下の式であらわされる。

$$\text{コヒーレンス} = (\text{クロススペクトル})^2 /$$

(入力のパワー × 出力のパワー)

筆者の研究室のこれまでのデータより, 腎交感神経活動の低周波成分, 特に 0.05 Hz と 0.80 Hz が血圧および腎血流量の変動に重要であること, また, 0.010 Hz 未満では循環調節には中枢神経由来の交感神経活動が関与していることが推測されている。このため, 1.0 Hz 以下の低周波成分について解析を行った⁹⁾。

非線形解析

Fraser らによって発案された離散データに対する計算法に従って相互情報量を求めた⁹⁾。64 Hz でリサンプリングした BP, RSNA, RBF に 0.1 Hz 未満の low-pass filter をかけた。相互情報量は確率論で定義される情報エントロピー (ある事象の結果の意外性を数値化し

たもの) の一種で 1 組の時系列 $\{x(t)\}$ と $\{y(t)\}$ につき, $y(t)$ の値が $x(t)$ にどの程度依存しているのかを計測するものである。これらのデータ長は 2 のべき数である。一般的な一対の系 (S, Q) ; $S = \{s(t)\}$, $Q = \{q(t)\}$ に対する相互情報量 $I(S, Q)$ は, 「S が s という値をとる時, Q の値 q を, 平均してどれくらいの情報量で予測できるのか」ということを定量化している。

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

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

本実験について述べると, RSNA, 血圧 (BP), 腎血流量 (RBF) の時系列を $RSNA(t)$, $BP(t)$, $RBF(t)$ で表す。データ長は 2 の 14 乗点とした。リサンプリングレートが 64 Hz のため, これは 256 (=2⁸/64) 秒に相当し

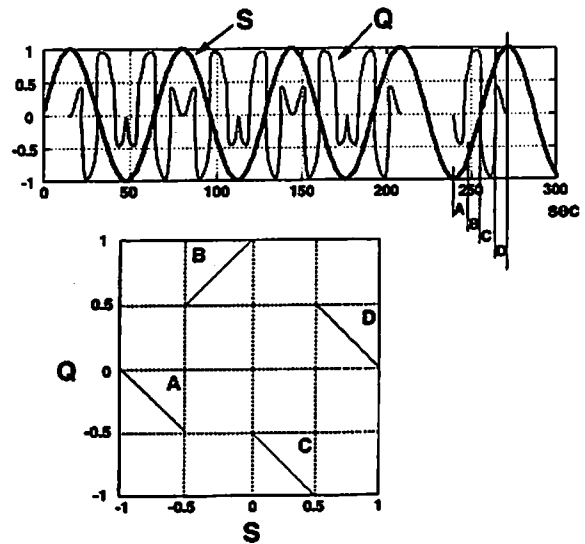


図3 相互情報量の概念。S と Q というある 2 つの変量が図のような関係にあるとき, 従来の線形の解析法では有意な 1 本の回帰直線を引くことができずに相関がない, ということになる。しかし, 相互情報量では順次小さな区画, たとえば図上の A, B, C, D という短い区画にわけていき, おのおの区画のなかで相関があるかどうかを決定していく。区画の大きさに応じて重みをもたせ, 最終的に合算して評価する。相互情報量は 0-1 の値をとり, 0.047 以上で有意に相関ありと判断する⁹⁾。(大坂, 他: Ther Res 1998; 19: 1845-1851 の第二図を許可を得て改変, 転載)

た。SとQが全く同一ならば、それらの相関は完全であるはずである。その時データ長が 2^n ならば、相互情報量 $I(S, Q)=n$ である。それはこのアルゴリズムが離散データに対して計算する制約による。すなわち2つの同一な時系列の相互情報量は n である。したがって相互情報量は n により正規化、つまり n によって除し、データ長によらず完全相関が1になるようにした。また、Osakaらの研究⁹⁾により、相互情報量は0.047以上で有意に相関ありと判断した(図3)。例えば、 $S=[RSNA(t)]$ 、 $Q=[BP(t+T)]$ とし、 T は-5秒から5秒の間の値を0.25秒刻みでとる。 $I(T)=I(S, Q)$ の値で、 $-5 \leq T \leq 5$ の範囲で最大の値をとるものを $I_{max}(S, Q)$ とあらわし、これをS、QすなわちRSNAとBPの相互情報量とした。

結 果

1) 降圧薬の効果

カンデサルタン群では血圧(BP)はvehicle群と比較し有意に低下し、腎血流量(RBF)は有意に増加した(図4)。さらに、有意な血圧低下にもかかわらず、腎交感神経活動(RSNA)は有意に抑制された。アムロ

ジピン群ではvehicleと比較しBPは有意に低下、RBFは有意に増加したが、RSNAは有意には抑制されなかった。

図5の上段にRSNAからBPへの伝達関数のコヒーレンスを各群一例ずつ示した。横軸に0-1 Hzの周波数を、たて軸に線形性を表すコヒーレンスをプロットした。図5の下段はコヒーレンスの平均値を示す。

RSNAからBPへのコヒーレンスはカンデサルタン、アムロジピンともにvehicleと比較して有意に低下した。両薬剤の間で差はみとめられなかった。RSNAからRBFへのコヒーレンスもvehicleと比較して同等に有意に低下した(図6)。また、血圧から腎血流量への伝達関数のコヒーレンスは0.5-1.0 Hzにおいてカンデサルタンよりもアムロジピンでより低下した(図7)。

腎交感神経活動から血圧への伝達関数のコヒーレンスはカンデサルタン、アムロジピン、いずれの投与群においてもピークル群とは有意差はなかった。一方、線形性の相関と非線形性の相関を表す相互情報量は、RSNAとBPとの相関においてカンデサルタン、アムロジピンともにvehicleと比べ有意に高値であった(図8)。また、RSNAとRBFの相関においても相互情報量はカンデサルタン、アムロジピンともにvehicleに比べ有意に

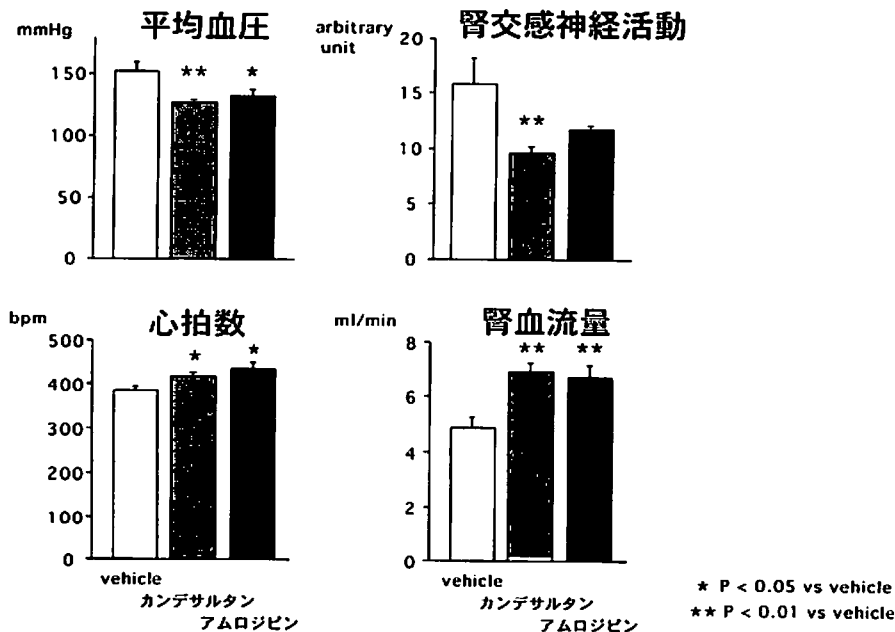


図4 各循環指標の平均値(±標準誤差)。カンデサルタン群とアムロジピン群ではvehicle群に比べて有意な血圧の低下を認めた。有意な降圧および腎血流量の増加にもかかわらず腎交感神経活動はカンデサルタンで有意に抑制されたが、アムロジピンでは有意には抑制されなかった。(大波, 他; 循環制御 2004; 25: 105-221の第4図を許可を得て転載)

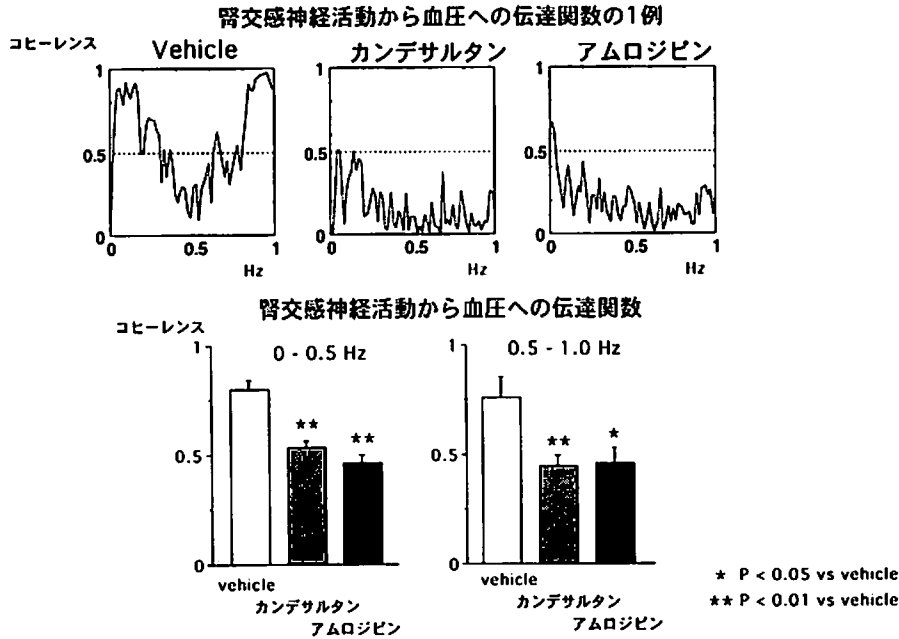


図5 (上段) SHR に vehicle, カンデサルタン, アムロジピンを2週間経口投与した時の腎交感神経活動 (RSNA, 入力と仮定する) から血圧 (BP, 出力と仮定する) への伝達関数のコヒーレンスの一例。横軸は周波数, 縦軸はコヒーレンスを示す。コヒーレンスは0.5以上で有意な相関ありと判定するが, カンデサルタン, アムロジピンによりコヒーレンスは低下した。
(下段) vehicle 群 (n=9), カンデサルタン群 (n=13), アムロジピン群 (n=7) のRSNA からBPへの伝達関数をまとめたもの。Vehicle群と比較してカンデサルタン群とアムロジピン群でコヒーレンスは有意に低下した。(大波, 他:循環制御 2004; 25: 105-221 の第4図を許可を得て転載)

増加した。図5, 6, 8の結果からカンデサルタンとアムロジピンはSHRの高い線形性を低下させ, 低い非線形性を増加させることが示された。

2) NOの効果

次に, アムロジピンによる線形性の低下の機序を明らかにするために, SHRにアムロジピンとL-NAMEを同時投与した。それらの循環指標の平均値を図9に示す。アムロジピン投与により有意な血圧低下と腎血流量の増加を認めた。アムロジピンとL-NAME同時投与群では有意な腎交感神経活動の抑制を認めた。

また, 0-0.5 Hzの周波数領域においてRSNAからBP, およびRSNAからRBFの伝達関数のコヒーレンスはアムロジピン群と比較して, アムロジピンとL-NAME同時投与群で有意に高値であった(図10)。さらに図11のようにアムロジピンとL-NAME同時投与群において, RSNAとBP, RSNAとRBFいずれについても相互情報量はアムロジピン単独投与群と比較して有意に低値であった。すなわち, vehicleと比較してア

ムロジピンによりSHRの線形性は低下し, 非線形性が増加したが, アムロジピンとL-NAMEを同時投与することにより, 線形性が増加し, 非線形性が低下した。これらの結果, アムロジピンによる線形性の低下にNOが関与していることが示唆された。

考案

カンデサルタンとアムロジピンにより, SHRのRSNAとBP, RSNAとRBFの相関の高い線形性(コヒーレンス)が低下した。また, 相互情報量がRSNAとBP, RSNAとRBFいずれにおいても有意に増加したことから, 線形性が低下したという結果とあわせて考えると, カンデサルタンとアムロジピンにより非線形性が増加したと考えられた。このことはカンデサルタンとアムロジピンがSHRの線形性を低下させ, 非線形性を増加させることにより循環調節を正常に近づけることを示す。また, カンデサルタンとアムロジピンは同等の線

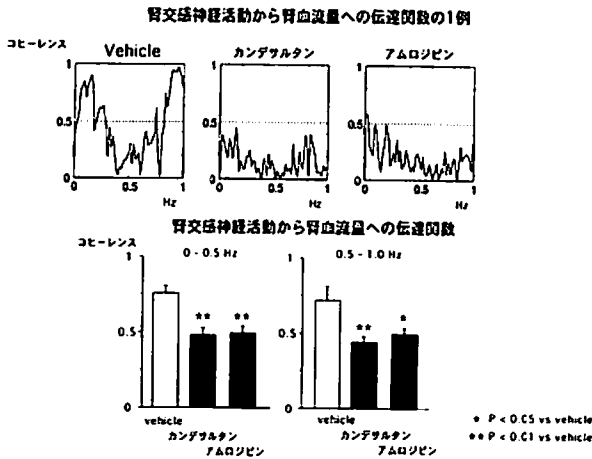


図6 (上段) SHR に vehicle, カンデサルタン, アムロジピンを2週間投与したときの腎交感神経活動 (RSNA, 入力と仮定する) から腎血流量 (RBF, 出力と仮定する) への伝達関数のコヒーレンス (線形性) の一例. カンデサルタン, アムロジピンによりコヒーレンスは低下した. (下段) vehicle 群 (n = 9), カンデサルタン群 (n = 13), アムロジピン群 (n = 7) の RSNA から RBF への伝達関数をまとめたもの. Vehicle 群にくらべ, カンデサルタン群とアムロジピン群でコヒーレンスは有意に低下した. (大波, 他; 循環制御 2004; 25: 105-221 の第6図を許可を得て転載)

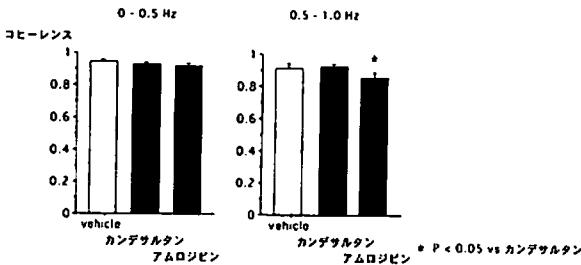


図7 SHR に vehicle, カンデサルタン, アムロジピンを2週間投与したときの血圧 (BP, 入力と仮定する) から腎血流量 (RBF, 出力と仮定する) への伝達関数のコヒーレンスの変化. 0.5-1.0 Hz において, コヒーレンスはカンデサルタンおよび vehicle に比べてアムロジピンでより低下した. (大波, 他; 循環制御 2004; 25: 105-221 の第7図を許可を得て転載)

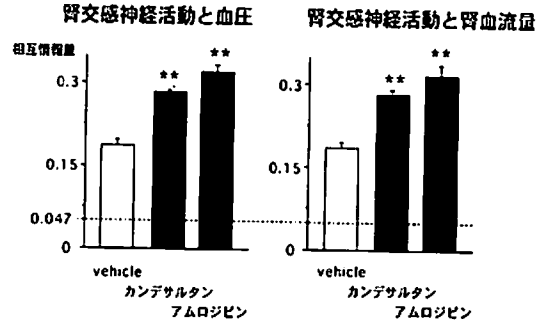


図8 SHR に vehicle, カンデサルタン, アムロジピンを2週間投与したときの腎交感神経活動と血圧, 腎交感神経活動と腎血流量の相互情報量 (線形と非線形を合わせた相関). 相互情報量は 0.047 以上で有意な相関ありと定義される. 「線形性が低下した」という結果とあわせて考えると, カンデサルタンとアムロジピンにより非線形性が増加したことがわかる. (大波, 他; 循環制御 2004; 25: 105-221 の第8図を許可を得て転載)

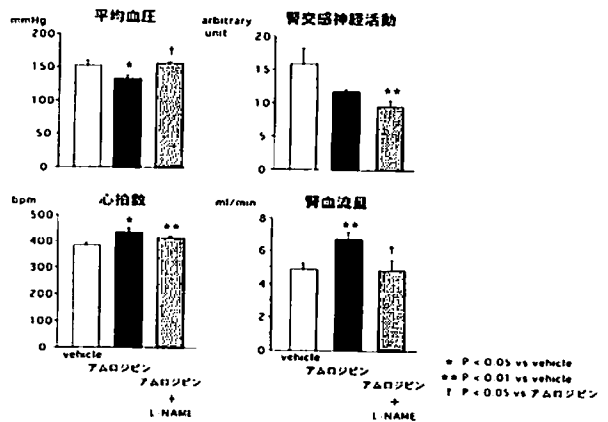


図9 SHR に vehicle (n = 13), アムロジピン (n = 9), アムロジピンと L-NAME (n = 9) を14日間経口投与したときの各循環指標の平均値. アムロジピン投与群で有意な血圧低下と腎血流量の増加を認めた. アムロジピンと L-NAME の同時投与群では, アムロジピンと比べて有意な血圧上昇と, vehicle 群と比べて有意な腎交感神経活動の低下を認めた. (大波, 他; 循環制御 2004; 25: 105-221 の第9図を許可を得て転載)

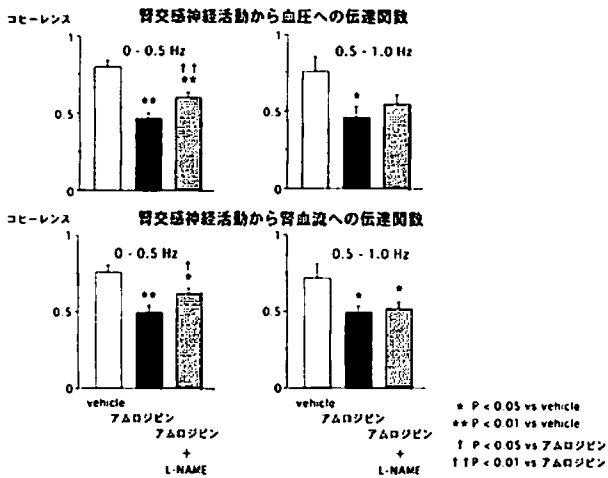


図10 SHRにアムロジピン、アムロジピンとL-NAMEを同時に2週間経口投与したときの腎交感神経活動から血圧、腎交感神経活動から腎血流量への伝達関数のコヒーレンス（線形性）。0-0.5 Hzにおいて、vehicleと比較してアムロジピンで線形性は低く、アムロジピンとL-NAMEの同時投与で線形性は有意に高い。（大波，他；循環制御 2004；25：105-221の第10図を許可を得て転載）

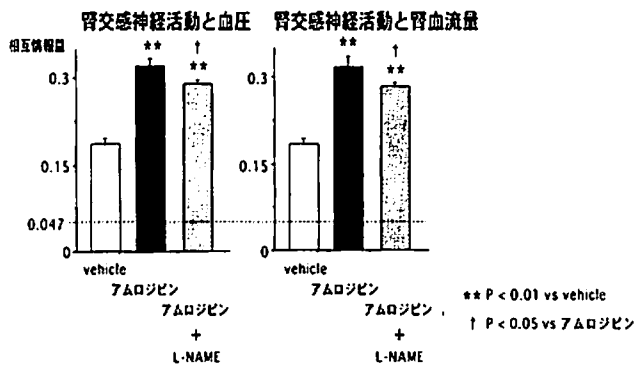


図11 腎交感神経活動と血圧、腎交感神経活動と腎血流量の間の線形と非線形を合わせた相関。アムロジピンとL-NAME同時投与群は、アムロジピン単独投与群にくらべて相互情報量は低値であり、「線形性（伝達関数のコヒーレンス）が増加した」という結果とあわせて考えると、非線形性が低下したことがわかる。（大波，他；循環制御 2004；25：105-221の第11図を許可を得て転載）

	正常血圧	高血圧	+カンデサルタン	+アムロジピン
レニン-アンジオテンシン系	～	↑	↓	↑
交感神経活動	～	↑	↓	～
圧受容体反射	～	↓	↑	…
Nitric oxide	～	↓	…	↑
心拍数	～	～	～	～
心拍数変動	～	…	…	…
線形性	～	↑	↓	↓
非線形性	～	↓	↑	↑

…は未検査を示す

図12 血圧を決定する様々な因子と循環調節の線形性、非線形性の関係。カンデサルタンは高血圧で亢進しているレニン-アンジオテンシン系あるいは交感神経系の亢進を抑制し、それにより線形性を低下、非線形性を増加させた。一方、アムロジピンはレニン-アンジオテンシン系を抑制せず、交感神経系も有意には抑制しなかったが、nitric oxideを増加させることで、カンデサルタンと同等の線形性の低下、非線形性の増加をもたらしたと考えられる。「…」は未検査であることを示す。（大波，他；循環制御 2004；25：105-221の第12図を許可を得て転載）

形性低下および非線形性亢進をもたらした。

カンデサルタンによる線形性低下と非線形性亢進は、レニン-アンジオテンシン系の抑制や交感神経活動抑制によるものと考えられる（図12）。逆にいうと、SHRの高い線形性や低い非線形性は、循環調節が一つまたは二つだけの調節系（レニン-アンジオテンシン系や交感神経系）に強く依存していることによると考えられる。また、当教室のMatsuuraら¹³⁾の、カンデサルタンにより交感神経の中核であるRVLM（延髄腹側外側野）のニューロンが過分極し、スパイク数を減少させるという結果と合わせて考えると、SHRに投与したカンデサルタンは血液脳関門を通過して¹⁴⁾交感神経中核に作用し、線形性を低下させる可能性が示唆された。

一方、アムロジピン投与により有意な交感神経活動抑制は認められなかったがカンデサルタンと同等に線形性が低下し、非線形性が増加したことから、その改善機序はカンデサルタンと異なる作用によるものと考えられた（図12）。筆者の研究室の以前の研究⁶⁾でNOの基質であるL-arginineを静脈内投与したところ、線形性低下が認められたことから、NOが線形性を低下させる効果をもつと考えた。アムロジピンには他のカルシウム拮抗薬と比較して一酸化窒素（NO）の産生増加を促進すると

結 論

ということが報告されているが¹⁵⁾、その機序はアムロジピンの2種類の光学異性体のS体とR体のうち、カルシウム拮抗作用が弱いR体によるものであるという¹¹⁾。また、アムロジピンは内皮型NO合成酵素(eNOS)の発現を促進すると推測されている。このことより、アムロジピンによる線形性の低下および非線形性亢進はNO産生増加によるものと推察した。

そこで、この仮説を検証するためにアムロジピンとL-NAMEを同時に経口投与した。アムロジピン単独と比較して、アムロジピンとL-NAME同時投与群によりSHRの線形性がさらに亢進した結果から、NOがアムロジピンによる線形性低下をもたらした因子の一つであることが示唆された。ただし、この結果はSHRのNO産生・遊離がWKYと比べて低下していることを示すものではない。一般的にはSHRのNO産生・遊離はWKYと比較して同等であるという報告¹⁶⁾と低下している報告¹⁷⁾がある。これらを確認する意味で、WKYにもアムロジピン、L-NAME単独、アムロジピンとL-NAME同時投与をすべきであるが、時間的な制約により行えなかった。

また、血圧から腎血流量へのコヒーレンスがカンデサルタンよりアムロジピンでより有意に低下したことから、アムロジピンの血圧降下作用は末梢血管拡張に大きく依存するものと考えられた。

なお、SHRに対してL-NAME(1.5 mg/kg/day)単独投与を14日間行ったが平均血圧が200 mmHgと高値となり、個体の衰弱が激しく手術・記録が困難であったため実験群間の評価から除外した。

カンデサルタン、アムロジピン投与によりvehicle投与群に比べ心拍数が有意に上昇したが、これは圧受容器反射によるものと考えられる。交感神経活動の抑制を反映してカンデサルタンによる心拍数増加は、アムロジピンよりも有意ではないものの少ない傾向が見られた。またアムロジピンによる心拍数増加に関しては、レニン-アンジオテンシン系の刺激による上昇も否定できない。

心筋梗塞後の患者において心拍変動の非線形性の低下は予後不良の因子である⁵⁾ことが報告されている。高血圧の治療の目標は血圧を下げるだけでなく、患者の予後を改善することにある。それゆえ、本研究の結果からカンデサルタンやアムロジピンのようにSHRの線形性を低下させ、非線形性を亢進する薬剤は高血圧患者の不良な予後を改善させることが期待される。

カンデサルタンとアムロジピンの2週間経口投与により、血圧が有意に低下し、腎血流量は増加した。腎交感神経活動はカンデサルタンにより有意に抑制されたが、アムロジピン投与では有意には抑制されなかった。また、カンデサルタンとアムロジピンにより腎交感神経活動と血圧および腎血流量との相関の線形性は低下し、非線形性は増加した。非線形性の低下は予後不良の因子であることが示されており^{2,5)}、交感神経系の亢進は心血管イベントのリスクファクターであることから¹⁸⁾、カンデサルタンやアムロジピンのように線形性を低下させ非線形性を亢進させる薬剤は、高血圧患者の不良な予後を改善させる可能性が示唆された。

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深謝いたします。また、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熊谷裕生講師、内科学教室佐方克史博士、ならびに日本医科大学老人病研究所生命情報科学解析科大坂元久助教授に深謝いたします。さらに、本研究にご協力、ご助言いただきました慶應義塾大学医学部内科学教室腎臓研究室の諸先生方に感謝いたします。

本研究の一部は第25回、26回日本高血圧学会(2002年東京、2003年宮崎)、第45回、46回、47回日本腎臓学会学術総会(2002年大阪、2003年東京、2004年栃木)、19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension 2002(プラハ)、20th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension 2004(サンパウロ)において発表した。

文 献

- 1) 熊谷裕生, 佐方克史, 松浦友一ほか: 循環調節を複雑系としてとらえる. 分子血管病 22: 177-187, 2001
- 2) Kobayashi M, Musha T: 1/f Fluctuation of heart-beat period. IEEE Trans Biomed Eng 29: 456-457, 1982
- 3) Skinner JE, Pratt CM, Vybiral T: A reduction in the correlation dimension of heartbeat intervals precedes imminent ventricular fibrillation in human subjects. Am Heart J 125: 731-743, 1993
- 4) Goldberger AL: Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside. Lancet 347: 1312-1314, 1996
- 5) Huikuri HV, Makikallio TH, Peng CK, Goldberger AL: Fractal correlation properties of R-R interval

- dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction. *Circulation* 101 : 47-53, 2000
- 6) Sakata K, Kumagai H, Osaka M. et al : Potentiated sympathetic nervous and renin-angiotensin systems reduce nonlinear correlation between sympathetic activity and blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 106 : 620-625, 2002
 - 7) Berger RD, Akselrod S, Gordon D et al : An efficient algorithm for spectral analysis of heart rate variability. *IEEE Trans Biomed Eng* 33 : 900-904, 1986
 - 8) Fraser AM, Swinney HL : Independent coordinates for strange attractors from mutual information. *Physiol Rev* A33 : 1134-1140, 1986
 - 9) Osaka M, Yambe T, Saito H et al : Mutual information discloses relationship between hemodynamic variables in artificial heart-implanted dogs. *Am J Physiol* 275 : H1419-1433, 1998
 - 10) Zhang XP, Hintze TH : amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels. *Circulation* 97 : 576-580, 1998
 - 11) Zhang XP, Loke K E, Mital S et al : Paradoxical release of nitric oxide by an L-type calcium channel antagonist, the R+enantiomer of amlodipine. *J Cardiovas Pharmacol* 39 : 208-214, 2002
 - 12) Kumagai H, Suzuki H, Saruta T et al : Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity is potentiated in early phase of two-kidney, one clip Goldblatt hypertension in conscious rabbits. *Circ Res* 67 : 1309-1322, 1990
 - 13) Matsuura T, Kumagai H, Kawai A et al : Rostral ventrolateral medulla nervous of neonatal Wistar-Kyoto and Spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 40 : 560-565, 2002
 - 14) Tsuchihashi T, Kagiya S, Fujishima M, et al : Effects of chronic oral treatment with imidapril and TCV-116 on the responsiveness to angiotensin II in ventrolateral medulla of SHR. *J Hypertens* 17 : 917-922, 1999
 - 15) Cooke JP, Dzau VJ : Nitric oxide synthase : Role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48 : 489-509, 1997
 - 16) Hayakawa H, Hirata Y, Suzuki E et al : Endthelium-derived relaxing factors In the kidney of spontaneously hypertensive rats ; *Life science* 56(21) : PL401-408, 1995
 - 17) Schäfer A, Widder J, Martin E et al : *Biochemical Pharmacology* 67 : 2273-2279, 2004
 - 18) Julius S : Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension* 21 : 886-893, 1993
-

慶應医学 第82巻第2号号外
平成17年6月25日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第176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17年 3月14日 慶大博士甲第2430号	植 村 修	昭和44年10月10日
同 同 第2432号	小 堺 有 史	昭和46年 3月21日
同 同 第2437号	本 間 康 一 郎	昭和50年10月12日
同 同 第2439号	森 居 俊 行	昭和45年 8月 5日
同 同 第2441号	若 林 寛 二	昭和42年 7月 8日
同 同 第2442号	王 筠	昭和47年 1月26日
平成17年 3月23日 慶大博士甲第2428号	泉 香 奈 子	昭和50年 8月 3日
同 同 第2429号	岩 波 明 生	昭和47年10月11日
同 同 第2431号	金 蔵 孝 介	昭和52年 9月28日
同 同 第2433号	清 水 孝 恒	昭和48年 8月23日
同 同 第2434号	千 葉 知 宏	昭和51年10月25日
同 同 第2435号	古 谷 正 敬	昭和47年 7月 6日
同 同 第2436号	細 野 克 博	昭和50年 3月14日
同 同 第2438号	南 修 司 郎	昭和51年 5月24日
同 同 第2440号	山 下 大 介	昭和45年10月13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17年 3月14日 慶大博士乙第3914号	浅井昌樹	昭和38年12月3日
同 第3915号	家田真樹	昭和46年2月24日
同 第3916号	井上卓	昭和42年3月8日
同 第3917号	内村英輝	昭和45年5月23日
同 第3918号	大波敏子	昭和46年12月18日
同 第3919号	奥山訓子	昭和43年12月4日
同 第3920号	春日美智子	昭和34年4月10日
同 第3921号	勝川史憲	昭和33年4月8日
同 第3922号	神田武志	昭和46年8月10日
同 第3923号	河野光智	昭和42年11月17日
同 第3924号	児玉桂一	昭和42年10月6日
同 第3925号	小林誠一郎	昭和41年7月3日
同 第3926号	佐藤聡一郎	昭和40年7月31日
同 第3927号	鈴木慶一	昭和44年8月20日
同 第3928号	舘野博喜	昭和40年5月26日
同 第3929号	永尾圭介	昭和44年11月23日
同 第3930号	中川博之	昭和43年4月6日
同 第3931号	中村佳子	昭和46年2月15日

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成17年 3月14日 慶大博士乙第3932号	西 澤 雅 彦	昭和37年11月 8日
同 同 第3933号	西 脇 祐 司	昭和39年 6月18日
同 同 第3934号	林 浩 二	昭和43年 2月21日
同 同 第3935号	廣 田 展 久	昭和42年10月26日
同 同 第3936号	藤 田 淳	昭和45年 5月26日
同 同 第3937号	舛 本 暢 生	昭和46年 9月19日
同 同 第3938号	渡 部 玲 子	昭和39年10月17日
平成17年 4月11日 慶大博士乙第3939号	林 明 德	昭和35年 1月 5日

目 次

植村 修	Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the <i>isll</i> gene for motor and sensory neuron-specific expression. (比較ゲノム学を用いた運動神経細胞ならびに感覚神経細胞特異的に発現する転写因子 <i>islet-1</i> の発現調節機構の解析)	7
小堺 有史	Activation of ERK1/2 is associated with Neuronal Survival after Focal Cerebral Ischemia in the Rat. (ERK1/2活性化はラット局所脳虚血後の神経細胞生存に関与する)	8
本間康一郎	高血糖が腎糸球体血行動態に与える影響の検討	9
森居 俊行	Cellular insulin resistance in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblasts from young insulin-resistant Japanese men. (若年性遺伝性高血圧におけるインスリン抵抗性関連遺伝子の追究 -不死化リンパ芽球を用いた細胞レベルのインスリン抵抗性-)	10
若林 寛二	Gene expression associated with the decrease in malignant phenotype of human liver cancer cells following stimulation with a histone deacetylase inhibitor. (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤刺激によるヒト肝癌細胞の悪性度低下に伴う遺伝子発現)	11
王 筠	Novel human BTB/POZ domain-containing zinc finger protein ZNF295 is directly associated with ZFP161. (BTB/POZドメインをもつ新規zinc fingerタンパクZNF295はZFP161と直接結合する)	12
泉 香奈子	Variants of Myocilin Gene in Japanese Patients with Normal-Tension Glaucoma. (日本人正常眼圧緑内障患者における緑内障遺伝子ミオシリンの遺伝子変異)	13
岩波 明生	Transplantation of Human Neural Stem Cells for Spinal Cord Injury in Primates. (サル脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の有効性)	14
金蔵 孝介	Alsln, the Product of <i>ALS2</i> Gene, Suppresses SOD1 Mutant Neurotoxicity through RhoGEF Domain by Interacting with SOD1 Mutants (<i>ALS2</i> 遺伝子がコードする蛋白AlslnはRhoGEFドメインを介してSOD1変異体が誘導する神経毒性を抑制する。)	15
清水 孝恒	A novel mechanism for imatinib mesylate (STI571) resistance in CML cell line KT-1 : Role of TC-PTP in modulating signals downstream from the BCR-ABL fusion protein. (慢性骨髄性白血病細胞株KT-1における新たなイマチニブ (STI571) 耐性化の機構: BCR-ABL融合蛋白下流のシグナル伝達を修飾するTC-PTPの役割)	16
千葉 知宏	Neuroprotective Effect of Activity-Dependent Neurotrophic Factor Against Toxicity From Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked Mutant SOD1 In Vitro and In Vivo. (in vitroおよびin vivoにおける家族性筋萎縮性側索硬化症変異型SOD1の神経毒性に対するActivity-dependent neurotrophic factorの神経保護作用)	17
古谷 正敬	Electroporation of Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells. (カニクイザル胚性幹細胞に対するエレクトロポレーション法による遺伝子導入法の確立)	18
細野 克博	Identification and characterization of a novel gene family YPEL in a wide spectrum of eukaryotic species. (広範な真核生物にメンバーを有する新規遺伝子ファミリーYPELの発見と性状解析)	19

南 修司郎	Calcineurin Activation Contributes to Noise-Induced Hearing Loss (音響外傷性難聴におけるカルシニューリンの役割)	20
山下 大介	Delayed production of free radicals following noise exposure. (音響外傷後のフリーラジカルの遅発性発現)	21
浅井 昌樹	Spironolactone in Combination with Cilazapril Ameliorates Proteinuria and Renal Interstitial Fibrosis in Rats with Anti-Thy-1 Irreversible Nephritis (スピロノラクトンとシラザプリルの併用投与は抗Thy-1不可逆性腎炎ラットモデル の尿蛋白と腎間質線維化を改善する)	22
家田 真樹	Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. (エンドセリン-1は神経成長因子を誘導し心臓交感神経系の発達を制御する)	23
井上 卓	CCL22 and CCL17 in rat radiation pneumonitis and in human idiopathic pulmonary fibrosis. (ラット放射線肺臓炎/肺線維症モデルおよび特発性肺線維症におけるCCL22と CCL17発現の検討)	24
内村 英輝	Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. (骨髄由来の血管新生細胞の腎臓内投与は、実験系糸球体腎炎の内皮障害と メサンギウム細胞の活性化を抑制する)	25
大波 敏子	アンジオテンシンII受容体遮断薬およびCa拮抗薬の慢性経口投与による 高血圧ラットの循環調節の線形性の低下と非線形性の亢進	26
奥山 訓子	EFFECT OF NUMBER OF FASCICLE ON AXONAL REGENERATION IN CABLE GRAFTS (Cable Graftにおける移植神経片数が軸索再生に及ぼす影響)	27
春日美智子	Relation between climacteric symptoms and ovarian hypofunction in middle-aged and older Japanese women. (本邦中高年婦人の不定愁訴の実態と卵巣機能低下との関連についての検討)	28
勝川 史憲	若年成人肥満者のmetabolic syndromeにおよぼす年齢、肥満度、身体的フィットネス の影響、生活習慣修正による減量の効用	29
神田 武志	Effect of fasudil on Rho-kinase and nephropathy in subtotaly nephrectomized spontaneously hypertensive rats. (部分腎摘高血圧自然発症ラットにおけるRhoキナーゼと腎障害に対する ファスジルの効果)	30
河野 光智	Hyperoxia-induced emphysematous changes in subacute phase of endotoxin-induced lung injury in rats. (ラットのエンドトキシン誘導性亜急性肺傷害における高濃度酸素誘導性気腫性 変化)	31
児玉 桂一	1型糖尿病における標的抗原としてのInsulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) の検討	32
小林誠一郎	尋常性天疱瘡皮膚病変の画像解析による客観的病勢判定	33
佐藤聡一郎	Pyk2 activation is integral to acid stimulation of sodium/hydrogen exchanger 3. (酸による腎臓NHE-3活性化系に果たすPyk2の役割の検討)	34
鈴木 慶一	The Influence of Platelets on the Promotion of Invasion by Tumor Cells and Inhibition by Antiplatelet Agents (血小板による腫瘍細胞浸潤能促進作用と抗血小板剤の効果)	35

館野 博喜	Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid. (ステロイド投与気管支喘息患者の重症度判定における血漿エオタキシン値測定 の意義)	36
永尾 圭介	Genetic identification and detection of human pathogenic <i>Rhizopus</i> species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. (ムーコル症の主病原菌、 <i>Rhizopus</i> 属のmultiplex PCR法を用いた同定および検出) ..	37
中川 博之	Single-stranded conformational polymorphism法を用いた高感度HPV重感染検出法の 開発.....	38
中村 佳子	HDLコレステロールに関する遺伝因子の研究 -日本人女性における CETP遺伝子Taq IB多型と Apo A-I遺伝子Msp I多型の意義-.....	39
西澤 雅彦	心筋梗塞後ラットの動脈圧受容器反射に対する、アンジオテンシンII受容体遮断薬 とアンジオテンシン変換酵素阻害薬の効果の比較	40
西脇 祐司	Six year observational cohort study of the effect of carbon disulphide on brain MRI in rayon manufacturing workers. (レーヨン製造作業における二硫化炭素の脳MRIへの影響に関する6年間 コホート研究)	41
林 浩二	A Neo-Esophagus Reconstructed by Cultured Human Esophageal Epithelial Cells, Smooth Muscle Cells, Fibroblasts, and Collagen. (ヒト培養食道上皮細胞, 平滑筋細胞, 線維芽細胞, コラーゲンを用いた 組織再構築型人工食道)	42
廣田 展久	正常および糖尿病モデルラットの傍糸球体細胞におけるレニン産生・分泌に及ぼす 圧負荷の影響	43
藤田 淳	Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. (心筋梗塞後における間葉系幹細胞の動員および心筋細胞への分化)	44
舩本 暢生	Papanicolaou tests and molecular analyses using new fluid-based specimen collection technology in 3000 Japanese women. (本邦3000例における液状検体を用いた細胞診と分子生物学的解析の有用性の 検討)	45
渡部 玲子	Bernard-Soulier syndrome with a homozygous 13 base pair deletion in the signal peptide-coding region of the platelet glycoprotein Ib β gene. (血小板膜糖蛋白GPIb β 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域に13塩基の ホモ接合性欠失を認めたBernard-Soulier症候群)	46
林 明徳	Establishment of an immortalized porcine granulosa cell line (PGV) and the study on the potential mechanisms of PGV cell proliferation. (不死化ブタ顆粒膜細胞 (PGV) の樹立とPGV細胞の増殖機序の研究)	47

Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isll* gene for motor and sensory neuron-specific expression.

(比較ゲノム学を用いた運動神経細胞ならびに感覚神経細胞特異的に
発現する転写因子*islet-1*の発現調節機構の解析)

植 村 修

内容の要旨

LIM/homeodomain型の転写因子 (LIM-HD) である *Islet-1* (*Isl1*) は、運動神経細胞ならびに感覚神経細胞の分化直後から発現しており、それらの発生過程に重要な役割を担っている。特に運動神経細胞では、他の LIM-HD との発現の組み合わせにより、軸索投射や細胞体の位置などの運動神経細胞のサブタイプが規定される。我々は、このサブタイプ特異的な *isll* の発現機構の解析を行った。

ゼブラフィッシュ *isll* においては、遺伝子の約 20Kb 下流に後脳の運動神経細胞での発現を調節する領域 (CM) と、約 55Kb 下流に感覚神経細胞での発現を調節する領域 (SS) が同定されている。これらの領域から数百 bp の最小制御領域を同定し、それぞれ zCREST1 (zebrafish conserved regulatory element for *islet-1*)、zCREST2 と名付けた。GFP を用いた transgenic fish の解析から、zCREST1 は、後脳の運動神経細胞だけでなく背側の体幹筋を支配する脊髄運動神経細胞に、一方 zCREST2 は、感覚神経細胞だけでなく、腹側の体幹筋と胸ビレの外転筋を支配する脊髄運動神経細胞に GFP を発現していた。

上述の通り、運動神経細胞は LIM-HD 群の発現の組み合わせでいくつかのサブタイプに分類される。マウスでは、背側の体幹筋を支配する運動神経細胞には *Isl1* と *Lhx3* が、腹側の体幹筋と肢芽の腹側の筋肉を支配する運動神経細胞には *Isl1* と *Isl2* が、そして肢芽の背側の筋肉を支配する運動神経細胞には *Lhx1* と *Isl2* が、それぞれ発現している。マーカー遺伝子の発現を検討したところ、ゼブラフィッシュの胸ビレの外転筋はマウスの肢芽の腹側の筋肉と相同であることが示された。また zCREST1 と zCREST2 には、その塩基配列やゲノム上の相対的位置関係まで高度に保存された領域が、フグからヒトにいたるまで存在していることがデータベース検索から分かった。これらのことから、高等動物でも脊髄運動神経細胞における *isll* の発現は、CREST1,2 によって制御されていると考えられた。transgenic mouse の解析では、期待された通り、CREST1 は背側の体幹筋を支配する運動神経細胞に、CREST2 は腹側の体幹筋と肢芽の腹側の筋肉を支配する運動神経細胞に、レポーターの発現を誘導していた。

興味深いことに、zCREST2 は感覚神経細胞における活性を有するが、ヒト CREST2 ではそれは認められなかった。このことから高等動物では *isll* の感覚神経細胞における発現は、CREST2 以外の領域によって担われていると考えられた。そこで、ゼブラフィッシュとヒトの *isll* 近傍のゲノム配列を比較し、遺伝子の上流に高度に保存された配列 (CREST3) を同定した。CREST3 は、感覚神経細胞に対する転写活性を持っていることが分かった。また CREST3 と似た配列 (C3R, CREST3 related) を、他の *isll* ファミリー遺伝子のゲノム近傍に同定した。C3R は、CREST3 と同様に、感覚神経細胞における活性を有していた。*isll* ファミリー遺伝子は全て感覚神経細胞に発現していることから、それらの発現は進化的に保存されて CREST3 とその類似配列 C3R によって制御されていることがここに示された。

以上のように、本研究から、*isll* とそのファミリー遺伝子の、種間で高度に保存された神経細胞特異的な発現機構が明らかになった。

論文審査の要旨

LIM/homeodomain型転写因子である *Islet-1* は、運動神経細胞並びに感覚神経細胞の発生直後から発現しており、それらの分化に重要な役割を担っている。しかし、特定の神経細胞におけるこれらの発現調節機構は不明であった。申請者らは、ゼブラフィッシュ *Islet-1* 遺伝子近傍のゲノム DNA を検索し、運動神経細胞特異的にこの遺伝子の転写を調節する 2 つのゲノム領域を同定した (CREST1, 2)。さらに、実験的手法とデータベース検索の併用により、神経細胞特異的な *Islet-1* ファミリー遺伝子の発現機構の解析を行い、*Islet-1* ファミリー遺伝子群の、種間で高度に保存された神経細胞特異的な発現機構を明らかにした。

審査では、低濃度の plasmid を用いた理由について質問され、ゼブラフィッシュ胚では外来の plasmid が増幅されることを利用して、DNA の細胞毒性を最小限に抑えつつ、効率良く解析するためと回答された。また、生体では染色体上で遠く離れた位置で機能しているが、promoter の直上に enhancer を挿入することで得られた結果の妥当性につき議論された。これに対し、古典的な enhancer の活性は染色体上の位置や向きに依存しないこと、今回の結果が生体での *Islet-1* の発現を再現していることから、妥当と考えられると回答された。hsp70 遺伝子 promoter を用いたことの妥当性にも言及され、研究の目的が enhancer の活性が promoter に依存しないことを示すことにあり、promoter を変えても齟齬のない結果が得られていること、transgenic mouse を作製する際に、外来の promoter を用いることは通例行われていることが説明された。

定量的な検討の必要性については、種間で保存された神経細胞特異的な発現を規定する制御領域の同定を目的としたため、定量的な解析は行わなかったと回答された。また、*Islet-1* の発現を制御するのに必要十分な領域を同定したことを完全に証明するためには、enhancer の knock out を行う必要があることが助言された。さらに CREST3 並びに C3R について transgenic を用いた解析を行っていない点については、CREST1, 2 に関して一過性発現系と transgenic を用いた解析を行い、それぞれ齟齬のない結果を得たことから、この結果が妥当なものと考えられると説明された。最後に、本研究の将来的な展望について質問があり、*Islet-1* 遺伝子は運動神経細胞の発生に重要な役割を担っていることから、神経細胞の再生治療への手がかりをつかむことを目標としていると回答された。

以上、本研究はいくつかの検討課題を残しているものの、神経細胞の分化・特異化機構の一端を解明した重要な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 リハビリテーション医学 里宇 明元
解剖学 仲嶋 一範 内科学 鈴木 則宏
分子生物学 清水 信義

学力確認担当者：

審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成17年 2月22日

Activation of ERK1/2 is associated with Neuronal Survival after Focal Cerebral Ischemia in the Rat.

(ERK1/2活性化はラット局所脳虚血後の神経細胞生存に関与する)

小 塚 有 史

内容の要旨

脳虚血における extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal cascade の役割は未だ議論のあるところである。今回ラット一過性 (90 分間) 中大脳動脈閉塞モデルを用いてリン酸化ERK発現の経時的变化と TUNEL 染色の二重染色による検討を行った。sham 群のリン酸化 ERK 陽性細胞は極少数で染色強度も弱く、TUNEL 陽性細胞は認めなかった。虚血中心部では再灌流開始後30分から3.5時間の間、神経細胞にリン酸化ERKの発現を認めた。虚血周辺部では再灌流開始後3.5時間から24時間の間、生存している神経細胞に持続的にリン酸化ERKの発現が認められた。再灌流開始24時間後の二重染色における検討では、虚血周辺部のリン酸化ERK陽性の神経細胞は虚血中心部の TUNEL 陽性細胞の分布領域と隣接した領域に存在し、これらリン酸化ERK陽性神経細胞は Bcl-2 陽性であった。以上の結果より、ERK リン酸化を介した情報伝達は、梗塞周辺部で神経保護的に作用している可能性がある。

論文審査の要旨

本研究では、脳虚血における extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal cascade の役割につき、ラット一過性 (90 分) 中大脳動脈閉塞モデルを用いて、リン酸化ERK発現の経時的变化とアポトーシスの進展の経過を検討した。ラットをコントロール群 (sham 手術群) と虚血・再灌流群に分け、再灌流群では右中大脳動脈を血管内栓子で90分閉塞、その後30分、3.5時間、12時間、24時間、および48時間に再灌流を行った群に分けて検討した。灌流固定後、凍結切片を作成し、抗リン酸化ERK1/2抗体を用いて免疫染色を行った。さらに、連続切片を用いて TUNEL 染色および cresyl violet 染色を行い、虚血中心部と周辺部領域において検討した。24時間後再灌流群では抗リン酸化ERK1/2抗体と TUNEL 染色、抗リン酸化ERK1/2抗体と抗 Bcl-2 抗体による 2 重染色を施行し、同領域組織においてコントロール群と虚血24時間後再灌流群において Western blot を行った。その結果、虚血周辺部皮質の神経細胞は、再灌流後3.5時間から24時間にかけてリン酸化ERK1/2陽性であり、これらの細胞は形態が正常に保たれており、かつ TUNEL 陰性であった。一方、虚血中心部皮質ではリン酸化ERK1/2陽性の細胞は再灌流後30分から12時間にかけて存在し、TUNEL 陽性細胞は再灌流24時間以後の初めて出現した。24時間再灌流群における Western blot 解析では、ERK1/2 のリン酸化は虚血中心部皮質においてコントロール群に比して減弱しているのに対して、虚血周辺部皮質においてはコントロール群に比して増加していた。再灌流開始24時間後においては、虚血周辺部の虚血中心部に隣接した部位では、リン酸化ERK1/2陽性の神経細胞に抗アポトーシス作用のある Bcl-2 が陽性であった。以上、ERK1/2 のリン酸化と

TUNEL 染色の経時的・分布的相異から、ERK1/2 を介するシグナルはアポトーシスの誘導に関与せず、さらに虚血周辺部皮質においては神経保護的に作用している可能性が示唆された。

審査では、まずリン酸化ERK1/2の発現部位は神経細胞に特異的であるのかどうか質問された。これに対して本研究および他の関連研究から神経細胞のみではなく星状膠細胞などにおいても発現する可能性があることが説明された。また、リン酸化 ERK1/2 の発現部位の分析に関しての質問がなされたが、詳細な分析ではないものの大脳皮質第5-6層中心に観察された現象であることが説明された。さらに、リン酸化ERK1/2の発現の低下は脳虚血の原因であるのか結果であるのかについて、すなわち神経細胞あたりの蛋白量が減少したのか、あるいは神経細胞が死滅したために全体として減少したのかが重要ではないかとの質問がなされた。これについては本研究単独ではこの現象の全貌の解明は困難であるが、ERK阻害実験により明らかになりうる可能性があり、次の研究課題としたいとの回答がなされた。また、ERK1/2のリン酸化は神経保護作用であるのか、神経毒性作用であるかの解釈についての質問がなされたが、虚血後再灌流の時間経過および部位により解釈が一定しない可能性があるが、本研究において設定された条件下と関心領域では神経保護的に作用すると考えられるとの回答がなされた。さらに、ERKのカスケードの上流にあるRasの活性化およびAKTの活性化を伴っているかどうか質問されたが、本研究では確認することはできず次の課題としたいとの回答がなされた。また、組織化学的検討には定量化の概念を導入することが必要であり、同一細胞内での発現の検証には共焦点顕微鏡での詳細な検討による確認が必要であることが指摘された。また、ERKとBcl-2の関係についての質問がなされたが、Bcl-2の発現にはカスケード下流のCREBのリン酸化が関与している可能性が高いと回答された。

以上のように、本研究はさらなる検討あるいは改善すべき点をいくつか残しているが、脳虚血後再灌流による神経細胞障害機序を、ラット一過性中大脳動脈閉塞モデルによりリン酸化 ERK1/2 の発現の経時的变化とアポトーシスの進展を検討したものであり、脳虚血の病態解明に向けて意義のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 鈴木 則宏
外科学 河瀬 斌 生理学 岡野 栄之
解剖学 仲嶋 一範

学力確認担当者:

審査委員長: 河瀬 斌

試問日: 平成17年 2月25日

高血糖が腎糸球体血行動態に与える影響の検討

本 間 康 一 郎

内容の要旨

糖尿病では、既に早期から腎血流増加が認められ、糸球体濾過能の亢進ならびに糸球体内圧の上昇が生じ、腎障害の進行に関与することが示唆されている。このような腎特異的な血流反応異常は、腎輸入細動脈の拡張ならびに収縮不全によると考えられているが、その機序については明らかではない。そこで本研究では糖尿病モデル動物を用いてその機序を検討した。

【対象と方法】

腎輸入細動脈の収縮には他の臓器細動脈にも共通する筋原性収縮反応と、腎臓に特異的な尿細管糸球体フィードバック機構 (TGF) が存在しており、この両者が腎灌流圧の変化に呼応して腎血流量を一定に保持する自動調節能を維持している。本研究では急性ならびに慢性高血糖状態が腎輸入細動脈の自動調節能に与える影響を、筋原性収縮反応、TGFの二つの機序の観点から生体内CCDカメラを用いて検討した。さらにヘンレ尿管緻密斑に分布する神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 由来の一酸化窒素 (NO) のTGFにおける役割が高血糖により変化するかどうかを評価した。これらの作用を直接観察する目的で、輸入細動脈の動態を正常血糖ラットに50%グルコースを持続静注することにより作成した急性高血糖状態、ならびに慢性高血糖状態であるZucker肥満ラットを用いて検討を行った。

【結果と考察】

急性高血糖状態では輸入細動脈は拡張反応を示し、この反応はnNOS抑制薬であるS-methyl-L-thiocitrullineにより消失した。急性高血糖では腎灌流圧上昇に伴う輸入細動脈の圧収縮反応は著明に減弱し、nNOS抑制により一部回復が見られた。一方、マニトールによる浸透圧の上昇は圧収縮反応の減弱を認めなかった事より急性高血糖状態における圧収縮反応の減弱は浸透圧非依存性であると考えられた。さらに筋原性収縮抑制薬であるガドリニウムあるいはTGFの抑制薬であるフロセミドの存在下で、おのおのTGF、筋原性収縮に与える急性高血糖の影響をみたところ、両機序は共に減弱していた。nNOS抑制薬は急性高血糖による筋原性収縮の減弱反応には影響を与えなかったが、TGFの減弱反応を改善した。慢性高血糖状態における検討においても同様に筋原性収縮反応、TGFが共に減弱しており、nNOSの抑制薬は筋原性反応の減弱には影響を与えなかったがTGFの減弱を回復させた。これらの結果より急性ならびに慢性高血糖状態において腎微小循環異常が認められ、その機序として筋原性収縮反応の低下ならびにnNOS由来のNOの過剰産生によるTGFの抑制が関与することが考えられた。これらの異常が糸球体内圧を上昇させることにより、長期的には糸球体障害の一因あるいは増悪因子となりうることを示唆された。

論文審査の要旨

糖尿病では糸球体内圧が上昇して糸球体障害が生じることが知られているが、その機序の詳細は明らかでない。本研究では腎の微小循環動態面から、高血糖に基づく糸球体障害の発症機構を明らかにすることを試みた。

50%グルコースを持続注入することによって急性高血糖状態にしたラットと、慢性高血糖状態であるZucker肥満ラットとにおいて、主体内CCDカメラで輸入細動脈径を観察することにより、筋原性収縮と尿管-糸球体フィードバック機構 (TGF) の両面から検討した。

まず急性高血糖状態において、筋原性収縮抑制薬であるガドリニウムあるいはTGFの抑制薬であるフロセミドの投与下で筋原性収縮およびTGFを検討し、両反応とも減弱していることを明らかにした。このような変化へのnNOSの関与をみるため、その抑制薬であるS-methyl-L-thiocitrulline (t-SMTC) を投与して検討したところ筋原性収縮は影響されず、TGFの減弱は改善された。次にZuckerラットでの検討でも、筋原性収縮およびTGF反応の減弱を認め、L-SMTCの投与はTGFの減弱のみを改善させた。この結果から、高血糖状態では輸入細動脈の収縮不全のために糸球体内圧が亢進し、糸球体障害が惹起されると結論した。なおその際nNOS由来のNOの過剰産生が、TGFの抑制機序に関与している可能性があるとした。

このような研究に対し、まず実験方法に関して質疑があり、輸入細動脈の筋原性収縮をみるための腎灌流圧の上昇度の決め方、また筋原性収縮の抑制薬であるガドリニウムの投与とTGFの抑制薬であるフロセミド投与実験の手順がはっきりしないとされた。腎灌流圧の上げ方に関しては経験的なもので、腹腔動脈や上腸管膜動脈の関係をはっきりさせ、糸での結紮により、30mmHgおよび60mmHgとほぼ正確に段階的に圧を上昇させることが可能とされた。実験の手順に関しては、ガドリニウムの作用持続が長いことから、ガドリニウムとフロセミドの実験は、別々のラットで施行したとされた。この実験でガドリニウムを用いた理由も問題となったが、当研究者の研究室で適量のガドリニウムの投与がカリウムチャネルを開閉して筋原性収縮を抑制することが明らかにされていたので、予備実験において投与量を検討した上で、本実験を行ったとされた。

次に筋原性収縮が生じたのち、TGFによっても輸入細動脈の収縮が生じたことが注目された。当研究者は、高血糖状態では輸入細動脈の収縮不全があるために糸球体への流量が多くなり、尿管への流量も多くなり、TGFが輸入細動脈の収縮に働くと考えられた。なおTGF作用にNOの関与があることは確かであるが、それだけで全てを説明できず、最近になってアデノシンの関与が想定されているが、この点に関しては今後の検討課題とされた。

以上の結果を今後の糖尿病腎症の治療にどう応用していくかに関しても議論があり、レニン・アンジオテンシン系抑制薬の作用機序からみて、最も適する薬剤とされた。

以上のように本研究は高血糖で生じる糸球体障害の機序を血行動態面から明らかにし、今後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 内科学 小川 聡
医化学 末松 誠

学力確認担当者：
審査委員長：村井 勝

試問日：平成17年 2月15日

Cellular insulin resistance in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblasts from young insulin-resistant Japanese men.

(若年性遺伝性高血圧におけるインスリン抵抗性関連遺伝子の追究
—不死化リンパ芽球を用いた細胞レベルのインスリン抵抗性—)

森 居 俊 行

内容の要旨

(背景) 本態性高血圧患者は正常者と比べ、高率に糖代謝異常、脂質代謝異常、肥満を合併することが知られており、この背景としてインスリン抵抗性が重要な役割を果たしている。従来のインスリン抵抗性は、個体レベル、もしくは骨格筋や脂肪細胞などインスリンの標的臓器における組織レベルでの現象、あるいは高血圧発症後の2次的結果とする説が提唱されてきたが、近年インスリン抵抗性には遺伝素因を認めることが明らかにされるようになった。このため今回我々は、個体レベル、臓器レベルのみならず、細胞レベルにおいても遺伝的にインスリン抵抗性が見られるかどうかについて以下の検討を行った。

(方法) 20歳から25歳の若年男性母集団 (n=218) より、本態性高血圧、心血管系疾患の家族歴を有し、かつ収縮期血圧が130mmHg以上の若年性遺伝性血圧高値群 (n=10) と、高血圧・心血管系疾患の家族歴を有さず、収縮期血圧110mmHg以下の血圧低値群 (n=10) を選択し、臨床データを比較した。次に両群について、7mlの血液よりリンパ球を分離し、Epstein-Barrウイルスを感染させ不死化Bリンパ芽球細胞ライン (リンパ芽球) を樹立し、両群由来のリンパ芽球における糖輸送担体を介したインスリン非刺激下の糖取り込み能、糖輸送担体を介したインスリン刺激による糖取り込み能と、細胞増殖能について検討を行った。

(結果) 臨床データを比較した結果、脈拍、BMI、空腹時血糖、血清インスリン濃度 (IRI)、インスリン抵抗性指数 (HOMA-R)、総コレステロール、LDL-コレステロールについて、血圧高値群は血圧低値群に比して有意に高値であった。従って、血圧高値群は個体レベルのインスリン抵抗性を示した。一方、リンパ芽球における、糖輸送担体を介した糖取り込み能は、血圧高値群は血圧低値群に比して有意に低値であり、インスリン刺激により両群共に糖取り込み能は有意に増加したが、両群とインスリン刺激の相互作用を検討した結果、血圧低値群のみがインスリン刺激による糖輸送担体を介した糖取り込み能を有意に増加させた。従って、血圧高値群は細胞レベルにおいてもインスリン抵抗性を示した。さらに、インスリン、糖輸送担体を介した細胞内への糖取り込み能は、IRI、MOHA-Rと有意な相関を示した。

リンパ芽球の細胞増殖能は、両群間で有意差を認めなかった。

(結論) 高血圧もしくは心血管系の家族歴を有する日本人の若年性血圧高値群は、個体レベルでのインスリン抵抗性のみならず、リンパ芽球における細胞レベルでのインスリン抵抗性を有することを明らかにした。この細胞レベルのインスリン抵抗性には、糖輸送担体の関与が示唆された。

我々が樹立したリンパ芽球は、インスリン抵抗性の分子的機序を解明するために有用なツールであると考えられた。

論文審査の要旨

近年本態性高血圧患者では、高率に肥満、糖、脂質代謝異常を合併することが知られており、その基礎にインスリン抵抗性の存在が明らかにされている。本研究では、遺伝子レベルおよび個体レベルにおいてインスリン抵抗性があるか否かを検討した。

20~25歳の若年男性で、本態性高血圧・心血管系疾患の家族歴を有し、収縮期血圧130mmHg以上の若年性遺伝性血圧高値群と高血圧・心血管疾患の家族歴を有さず、収縮期血圧110mmHg以下の血圧低値群とにおいて、インスリン抵抗性等、臨床パラメーターと、Epstein-Barrウイルスを感染させ不死化βリンパ芽球細胞ラインを樹立し、その細胞を用いて糖輸送担体を介した糖の取り込みを検討した。

以上の検討において、血圧高値群では、脈拍数、BMI、血糖、血清インスリン濃度、インスリン抵抗性指数、総コレステロール、LDL-コレステロールが、血圧低値群より高値であり、リンパ芽球における糖取り込み能は有意に低値であった。

以上の成績から、高血圧・心血管疾患の家族歴を有する日本人の若年性遺伝性血圧高値群は、個体レベルでのインスリン抵抗性ばかりでなく、リンパ芽球の細胞レベルにおいてもインスリン抵抗性を呈することが明らかにされた。

このような研究に対して、まず論文題名として、若年性遺伝性高血圧という言葉が用いられたことが問題とされた。高血圧・心血管疾患の家族歴があつて、130mmHg以上の血圧値のものを勝手に若年性遺伝性高血圧と名づけることはよくないとされた。

次に不死化βリンパ芽球を用いることの利点と欠点とが議論された。培養したリンパ芽球であることから、高血糖や高インスリン血症といった生体内の環境に影響されず、任意な細胞外液の条件下で細胞機能を測定できる点や、ストックした細胞をサルベージすることにより繰り返し実験できることや、DNAやmRNAを豊富に採取できること等が利点である。しかし最も重要な点は不死化することによる細胞の何らかの変化である。このような研究では、同一人で新鮮なリンパ芽球と不死化したリンパ芽球とを用いて糖の取り込み等に差がないことが確認されるべきであったと助言された。

以上のほか、本研究では踏検査が行われた218名の対象者の中から血圧高値群10名と低値群10名とを選出して比較検討されたが、脂質代謝、インスリン抵抗性あるいは脈拍等に有意差を認めたが、10名ずつの選出において偏見がなかったかどうか問題となった。若年者で高血圧や心血管系疾患の家族歴があつて、130mmHg以上の血圧を呈するものは少ないのは随かであり、10名を選出するのも大変であったが偏見はなかったとされた。

本論文は題名のつけ方や対象者が少ない等の問題があつたが、インスリン抵抗性の遺伝的異常を明らかにした点で、この領域で価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
内科学 小川 聡 泌尿器科学 村井 勝
内科学 池田 康夫

学力確認担当者：
審査委員長：小川 聡

試問日：平成17年 3月 1日

Gene expression associated with the decrease in malignant phenotype of human liver cancer cells following stimulation with a histone deacetylase inhibitor.

(ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤刺激によるヒト肝癌細胞の悪性度低下に伴う遺伝子発現)

若林 寛二

内容の要旨

酪酸は短鎖脂肪酸の一つであり、生体内では消化管内で自然に形成されることが知られている。酪酸は各種癌細胞に対しアポトーシスや分化誘導作用を有することが報告されている。酪酸はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一つであり、クロマチンのかたまりを解除し、転写活性を高めることが考えられている。酪酸は肝癌細胞に対して高濃度では一部の細胞にアポトーシスを、低濃度では悪性度低下を生じることを報告してきた。低濃度ではアルブミンの産生が亢進し、 α -feto proteinの産生が低下し、ソフトアガー内での足場非依存性増殖は抑制される。しかし、その機序についてはいまだ不明な点が多い。そこで、ヒト肝癌細胞株HCC-Tを用いてアポトーシスが生じない低濃度（2 mM）で酪酸を添加培養し、早期の段階での遺伝子発現変化につき検討した。

酪酸刺激によりHCC-Tは細胞周期においてG0/G1期での停止し、p21^{WAF-1}の分化の発現がみられた。アポトーシス抑制蛋白であるBcl-2、Bcl-XLは分化誘導早期において発現は増加し、Bcl-2ファミリー蛋白で発生分化初期に発現するMcl-1/EATも発現は上昇した。一方アポトーシス促進蛋白であるBAXは変化がみられなかった。こうしたアポトーシス抑制蛋白の発現が増加することにより、アポトーシスを抑制しながら細胞周期をG0/G1期において停止し、悪性度低下へと進んでいくもので、細胞分化の誘導の一種とも考えられる。

どのような遺伝子発現が変化し、悪性度低下に関わっているのかを追求することが、今後遺伝子を標的とした肝癌治療に有用となる可能性がある。そこで、differential displayとcDNA expression arrayにて誘導初期の段階での遺伝子変化を検討した。Differential display法ではラミニニン、ケラチン18といった細胞骨格にかかわる遺伝子の発現上昇がみられた。cDNA expression arrayでは、Western blotでの解析に一致して、Mcl-1/EATとp21^{WAF-1}の発現増加がみられ、p21^{WAF-1}の上流にて変化するIRF-1の発現も上昇が確認された。

生体内での酪酸の産生増加や、悪性度低下誘導課程でみられた遺伝子を操作することにより、肝癌治療への応用が期待される。

論文審査の要旨

酪酸は肝癌細胞に対して高濃度では一部の細胞にアポトーシスを誘導し、低濃度では悪性度を低下させる。酪酸刺激によりどのような遺伝子発現が変化し、どのような蛋白が誘導され、悪性度低下に関わっているのかを追求することは、将来新たな肝癌細胞の発生子防法や治療方法につながる可能性がある。本研究では肝癌細胞株を酪酸で刺激し、早期の段階での遺伝子発現変化をdifferential display法とcDNA expression arrayにて検討した。Differential display法ではラミニニン、ケラチン18の2つの細胞骨格に関わる遺伝子発現が上昇し、細胞の形態変化が悪性度の低下に関わる一つの重要な因子であることが示唆された。cDNA expression arrayでは細胞周期に関わるp21^{WAF-1}遺伝子や細胞骨格に関わるRho E遺伝子の発現変化がみられた。また、分化マーカーであるELF-1やMcl-1/EATの発現が上昇し、インターフェロン関連遺伝子IRF-1、STAT2、STAT3の発現上昇が認められ、酪酸がインターフェロンと類似した作用を有することが示唆された。

審査では、まず何故肝癌細胞株としてHCC-Tを用いたのか、他の細胞株についても検討しなかったのか、より強力な分化誘導剤であるトリコスタチンAによる作用については検討されているのか、との質問があった。これに対してHCC-Tは当研究室で樹立された細胞株で、これまで酪酸刺激による悪性度の低下に関するデータがあり、肝癌細胞株の中ではもっとも酪酸刺激による細胞増殖抑制効果ははっきりしているため、今回の研究に適していると回答された。トリコスタチンAによる肝癌細胞株の増殖抑制作用については確認しているが、これまで酪酸でのデータの方が多いため、differential displayとcDNA expression arrayは酪酸による刺激で検討したと回答された。

また、differential displayとcDNA expression arrayの結果についてはRT-PCRやNorthern blotでの検討、Western blotによる蛋白レベルでの発現確認がなされているかなど、再現性の有無を指摘された。これに対して、今回特に注目された遺伝子発現についてWestern blotにより確認したと回答された。

さらに、differential displayとcDNA expression arrayで発現変化がみられた個々の遺伝子について、より深く現象との関連について検討されるべきであると指摘があった。

本研究は今後検討されるべき課題を残しているが、酪酸による肝癌細胞の悪性度低下に伴う変化を蛋白、遺伝子のレベルで検討した点が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 病理学 坂元 亨宇
先端医科学 河上 裕
学力確認担当者：
審査委員長：北島 政樹

試問日：平成17年 3月 2日

Novel human BTB/POZ domain-containing zinc finger protein ZNF295 is directly associated with ZFP161.

(BTB/POZドメインをもつ新規zinc fingerタンパクZNF295はZFP161と直接結合する)

王 筠

内容の要旨

ヒト21番染色体q22.3領域から新規遺伝子ZNF295を単離した。ZNF295は、BTB/POZドメインおよび*krüppel*タイプ (C₂H₂) zinc finger (ZF) ドメインをもつPOK (POZと*krüppel*) 転写因子群の一つである。ZNF295は5個のエキソンからなる約24kbの遺伝子であるが、調べた27種類のヒト組織のすべてで長さの異なる多様な転写産物の発現が認められた。これらの様々な転写産物は5'非翻訳領域エキソンにおける選択的スプライシング、翻訳領域内におけるエキソン内のスプライシング、3'非翻訳領域における3ヵ所のポリアデニル化シグナルの使用によって生じていることを発見した。エキソン内のスプライシングにより603塩基のコーティング配列が除かれるため、ZNF295遺伝子は長型ZNF295L (1,066アミノ酸残基) と短型ZNF295S (865アミノ酸残基) の2種類のタンパク質を産生した。ZNF295Lは、N末側に1個のBTB/POZドメイン、C末側にそれぞれ9個のZFドメインをもち、ZNF295Sは、最初の4個のZFドメインを含む201アミノ酸残基を欠いていた。ZNF295LおよびZNF295SをヒトのHEK293とHeLa細胞で発現させたところ、両者は共に核内に局在した。BTB/POZドメイン単独でも核内に局在した。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いて調べたところ、GAL4 DNA結合ドメインと融合したZNF295はHEK293細胞においてc-mycプロモーターからの転写を発現量依存的に抑制した。さらに、ZNF295の各部分断片を用いて同様の実験を行った結果、ZNF295のc-mycプロモーターに対する転写抑制活性はBTB/POZドメインだけでなく、BTB/POZドメインとZFドメインの中間部分にも存在することが判った。この中間部分の中にフグのZNF295と高い相同性を示す2つの領域を発見し、HFC-1、HFC-2と名付けた。また、GAL4 DNA結合ドメインと融合したZNF295は、c-mycの他にCDC6、PGK、RSV、SV40、TKプロモーターからの転写も抑制したが、GAL4 DNA結合ドメインなしでも、c-myc、CDC6とPGKプロモーターからの転写を抑制した。これらの実験によって、ZNF295は転写の抑制因子であり、その抑制作用は様々なプロモーターに選択的に及ぶことが示された。一方、2種類のタグを付加したZNF295をHEK293細胞で共発現させ、免疫沈降を行った結果、ZNF295タンパクは互いに結合して二量体を形成することが示された。また、ZNF295タンパクは同じくPOKファミリーに属するZFP161とも結合し、その結合はZNF295のBTB/POZドメイン単独でも、ZFドメイン領域単独でも可能であることが判った。ZFP161タンパクは発生の段階、細胞および環境によって、転写に抑制的にも促進的にも作用すると報告されているから、ZNF295はZFP161と協同して、様々な遺伝子の抑制・促進両方の転写調節に関係するかもしれない。またZNF295は胎児、成人の様々な組織で普遍的に発現しており、その過剰発現が様々な遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性が高い転写因子なので、ダウン症の諸症状の有力な候補遺伝子である。

論文審査の要旨

ダウン症は21番染色体のトリソミーに起因することから、21番染色体に存在する遺伝子の網羅的解析はダウン症の原因遺伝子を解明するために必須と考えられる。また、21番染色体バンドq22.3領域は双極性障害の疾患感受性遺伝子がマップされている領域でもある。本研究ではこの疾患候補領域から単離した新規遺伝子ZNF295の転写産物の構造及びタンパクの機能解析を行った。ZNF295遺伝子は翻訳領域における選択的スプライシング等のため、ヒトの様々な組織で長さの異なる多様な転写産物を発現しており、その結果、長短2種類のタンパクが産生されることが明らかにされた。また、ZNF295はBTB/POZドメインおよび*krüppel*タイプzinc fingerドメインをもつPOKタンパクであり、転写の抑制因子として、様々なプロモーターに選択的に働き、この抑制作用はBTB/POZドメインと中間部分に別々に存在することが示された。さらに、ZNF295はホモダイマーになることが確認され、POKタンパクファミリーのZFP161と直接結合することも確認された。ZNF295はZFP161と協同して、様々な遺伝子の転写調節に関係していると考えられた。

審査においては、まず、ZNF295がプロモーターに選択的に働く原因について質問がなされた。これについて、類似のPOXタンパクの機能解析からの類推により、DNA結合活性をもつzinc fingerドメインが認識する特異的配列をもつプロモーターの転写を抑制すると考えたと回答された。次に、ZNF295の中間部分にあるHFC-1とHFC-2ドメインはフグ以外の種に存在するかどうかおよび中間部分の抑制作用ドメインの探索方法について質問がなされた。HFC-1およびHFC-2ドメインはフグの他に、マウス、ラット、ニワトリ、イヌおよびパンジーのZNF295に共通に存在すると回答された。中間部分の抑制作用ドメインを同定するために、中間部分由来の短い断片あるいはHFC-1、HFC-2に突然変異を持つ断片を用いた実験を計画していると説明された。また、ZNF295がZFP161のほかにも別のタンパクと結合する可能性および結合するタンパクの探索方法について質問がなされ、ZNF295はPOKタンパクだけではなく、共抑制因子などのタンパクとの結合の可能性もあると回答され、結合タンパクの探索方法にはTwo-hybrid法あるいは質量分析法などの方法があると回答された。最後に、ZNF295と双極性障害およびダウン症との関連について質問がなされた。ZNF295およびそれと結合するタンパクZFP161は各々双極性障害の疾患感受性遺伝子がマップされた領域に同定されたので、正常対照群と患者群におけるZNF295とZFP161遺伝子の多型の頻度を調べることによりこの疾患との関連がわかると回答された。ZNF295とダウン症との関連について、Zn295を含む領域をトリソミーでもつモデルマウスがダウン症の類似症状をもつと回答された。さらに、このモデルマウスとZn295のノックアウトマウスとの交配により、Zn295のみを二倍体に戻すことにより、改善される症状がある場合、Zn295とダウン症との関連が証明できると説明された。

以上のように、本研究はさらに検討すべき課題が残されているが、ZNF295は転写の抑制因子として、プロモーターに選択的に働くことが示されており、ダウン症や双極性障害の原因解明にもつながり得る興味深く有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 分子生物学 清水 信義

先端医科学 河上 裕 微生物学・免疫学 小安 重夫
発生・分化生物学 須田 年生

学術確認担当者:

審査委員長: 河上 裕

試問日: 平成17年 2月21日

Variants of Myocilin Gene in Japanese Patients with Normal-Tension Glaucoma.

(日本人正常眼圧緑内障患者における緑内障遺伝子ミオシリンの遺伝子変異)

泉 香 奈 子

内容の要旨

(序) わが国の緑内障患者は推定約200万人に達し失明原因第2位の疾患である。緑内障は視神経萎縮を来し視野欠損を生じ、進行すると失明に至る疾患である。緑内障は多因子疾患で、遺伝的要素と環境的因子の双方が関係している。原発開放隅角緑内障 (POAG) の決定因子ともいべき緑内障遺伝子は現在少なくとも6種類存在が確認され、その内の1つが我々のグループが見出したミオシリン (MYOC) である。現在までに世界中で確認されているMYOCのアミノ酸変異は50種類以上に及ぶ。MYOC変異による緑内障の機序として、2つの仮説が提唱されている。1つは変性したMYOCが線維柱帯からシュレム氏管への房水流出経路を障害することにより眼圧が上昇するというもの、もう1つは変異MYOCにより線維柱帯細胞が障害され細胞外への分泌機構が障害され細胞内に蓄積するという仮説である。しかし、変異MYOCによる緑内障の正確な発症機序は未だ明らかにされていない。

(目的) MYOC変異は若年発症および晩期発症型開放隅角緑内障で認められるが、正常眼圧緑内障 (NTG) との関連性は明らかにされていない。今回我々はMYOCとNTGの関連性を、NTG患者のスクリーニング検査およびMYOC蛋白の細胞外分泌能を調べることにより検討した。

(方法) 日本人のNTG患者80人と正常人コントロール100人を対象にMYOC遺伝子変異についてスクリーニング検査を行った。更に、MYOCの5種類の変異をCOS-1細胞へ遺伝子導入し、MYOCの培養細胞での発現変化、及び細胞外への分泌能をWestern Blotting法により解析した。

(結果) 80人のNTG患者で6種類の塩基置換 (R46Stop, R76K, R158Q, D208E, A488A, 3'non-coding region) が認められた。R46Stop, R158Q及びA488Aは正常人コントロールでは認められなかった。NTG患者で認められた他の塩基置換 (R76K, D208E, 3'non-coding) は正常人コントロールとの間に統計学的有意差は認められなかった。正常型、R158Q, D208EのベクターをCOS-1細胞へ遺伝子導入させるとMYOC蛋白の細胞外分泌を認めた。一方、POAGの遺伝子変異として同定されたI360N, A363T, I477Sの変異MYOCをCOS-1細胞へ遺伝子導入したところMYOC蛋白の細胞外分泌量は有意に減少した。またI360Nと正常型を混合してCOS-1細胞へ遺伝子導入したところMYOC蛋白の細胞内発現、細胞外分泌能ともに著明に低下し、変異MYOCが正常なMYOCの機能も障害することが明らかとなった。

(結論) NTGではMYOC蛋白の細胞外分泌能の異常は認められず、分泌能以外の機能異常でNTGと関与している可能性が考えられた。

論文審査の要旨

正常眼圧緑内障 (NTG) は日本人の開放隅角緑内障 (OAG) の大半を占める病型でNTG患者の多くが家族歴を有することが知られている。ミオシリン (MYOC) 遺伝子はOAGで初めて同定された遺伝子であるが変異MYOCによる緑内障発症機序は未だ解明されていない。またNTGとの関係も明らかにされていない。本研究では、NTG患者に対するMYOC変異のスクリーニング検査を行ない、またMYOC蛋白の細胞外への発現実験を行なった。スクリーニング検査によりMYOC遺伝子の6種類の塩基置換が検出された。MYOC蛋白の細胞外への発現実験の結果、NTGで認められたアミノ酸置換を含むMYOCでは、正常型と同程度の細胞内での蛋白発現、細胞外への蛋白分泌が認められた。一方原発開放隅角緑内障 (POAG) で認められたアミノ酸置換を含むMYOCでは細胞内での蛋白発現が抑制され、細胞外分泌は認められなかった。また正常型とPOAGで認められたアミノ酸置換を含むMYOCを混合して発現させると、細胞内発現、細胞外分泌ともに抑制された。以上の結果からMYOCはPOAGで認められた細胞外分泌能低下とは異なる機序でNTG発症に関与していることが明らかとなった。

審査では、まずWestern blotの結果において細胞外へ分泌されたMYOC蛋白のバンドが2本検出されている理由を質問され、MYOCにはATGサイトが2箇所存在し1.7KDaの差があるためか、細胞外への分泌時糖鎖が付加され2本のバンドが認められたのではないかと回答された。正常型と変異型を1:1に混合して発現させた実験では、遺伝子導入するDNA量ではなくmRNAの発現量を1:1になるよう混合すべきではないかとの指摘がなされた。次にMYOCの異なるドメインに存在する変異MYOC同士で分泌能を比較すればMYOCの何らかの機能が明らかになるのではとの質問がなされ、今回のNTGで検出されたアミノ酸置換はミオシン様ドメイン、POAGで認められるアミノ酸置換はオルファクトメジン様ドメインに存在しており、今回の実験で両者間に分泌能の差が認められたことから、MYOC蛋白のN末側は細胞骨格系蛋白、C末側は分泌性蛋白としての機能に関与している可能性があるかと回答された。また今回の培養液中のMYOC蛋白量の差は分泌能の差ではなくプロテアーゼへの感受性の差によるのではないかと指摘を受けdegradationの実験を行なうと異なる機能の解明につながると助言された。MYOCのknockout mouseについて質問されphenotypeに変化がないという報告があるとの回答がなされた。最後にNTGで検出されたD208Eは正常人にも認められSNPではないかとの指摘を受けR158Qに関しては正常人では検出されず変異の可能性が高いとの回答がなされた。

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、NTG患者でのMYOC変異の存在を明らかにしMYOCがPOAGとは異なる機序でNTGの発症に関与していること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
分子生物学 清水 信義 医化学 末松 誠
病理学 岡田 保典
学力確認担当者:
審査委員長: 清水 信義

試問日: 平成17年 3月 5日

Transplantation of Human Neural Stem Cells for Spinal Cord Injury in Primates.

(サル脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の有効性)

岩波 明生

内容の要旨

近年の神経科学、特に幹細胞生物学の目覚ましい進歩により、これまで不可能と考えられていた損傷脊髄の再生が現実味を帯びてきている。既にわれわれは新生及び成体ラット脊髄損傷に対するラット神経幹細胞移植を行い、その有効性を報告した。しかし、齧歯類と霊長類では神経機能解剖学にかなりの隔りがあるため、ヒトと同じ霊長類を用いた前臨床試験が必須である。そこで本研究の目的は、サル損傷脊髄に対するヒト神経幹細胞移植を行い、その有効性を明らかにすることである。

まず、成体コモンマーモセット10匹に対して、全身麻痺下に独自に開発した装置を用いて、17gの重錘を50mmの高さから第5頸髄レベルの硬膜上に落下させて頸髄不全圧挫損傷モデルを作製した。即ち損傷後急性期には重度の四肢麻痺を呈し、その後下肢機能は徐々に回復し、最終的には上肢優位の四肢麻痺が残存する頸髄不全損傷モデルである。次に損傷脊髄内の微小環境を考慮して、損傷後9日目にBrdUで標識したヒト胎児脊髄由来神経幹細胞を損傷脊髄内に約 1×10^6 個移植した(移植群)。対照群では培養液のみを損傷脊髄内に注入した。脊髄損傷および移植後にMRIを撮影し損傷部の経時的変化を調べ、移植後8週に組織学的検討を行った。また、運動機能評価としては上肢筋力を測定するためにBar Grip testと、3次元自発運動量を測定するために赤外線センサーによる24時間モニタリングを独自に開発し、損傷前から移植後8週まで毎日行い2群間で比較検討した。

MRIでサル損傷脊髄は、急性期にはT1強調像で等信号、T2強調像でびまん性の高信号を呈し、経過とともにT1強調像で低信号、T2強調像で高信号の境界明瞭な領域に局限化した。同信号部位は組織学的には空洞とその周囲のグリア瘢痕であった。神経幹細胞移植によりこの空洞は縮小していた。また、免疫組織染色で空洞周囲にBrdU陽性の移植細胞を多数認め、各マーカーとの2重染色でNeuron, Astrocyte, Oligodendrocyteに分化していた。さらにBar grip testと自発運動量計測のいずれにおいても、移植群が対照群よりも有意に良好な機能回復が認められた。機能回復メカニズムに関しては、移植細胞由来のニューロンとホスト軸索とのシナプス形成、移植細胞由来のOligodendrocyteによる再髄鞘化、移植細胞からの神経栄養因子などが考えられる。本研究の結果は、霊長類脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の有効性を示唆するものであり、神経幹細胞移植の臨床応用に向けた大きな一歩と考えている。

論文審査の要旨

近年の幹細胞生物学の進歩により、今まで不可能とされていた損傷脊髄の再生が現実味を帯びてきた。我々は成体ラット脊髄損傷に対するラット神経幹細胞移植の有効性を報告したが、齧歯類と霊長類では神経解剖学的にも隔りがあるため、本治療を臨床応用するにあたってはヒトと同じ霊長類を用いた前臨床試験が必須である。そこで本研究の目的は、サル損傷脊髄に対するヒト神経幹細胞移植の有効性を明らかにすることである。まず、成体コモンマーモセット10匹に対して定量的な頸髄圧挫損傷を作製し、損傷後9日目にBrdUで標識したヒト胎児神経幹細胞を損傷脊髄内に約 1×10^6 個移植した(移植群)。対照群では培養液のみを注入した。損傷後・移植後にMRIを撮影し損傷部の経時的変化を調べ、移植後8週に組織学的検討を行った。運動機能評価は上肢筋力を測定するBar grip testと、赤外線センサーによる自発運動量モニタリングを独自に開発し、2群間で比較検討した。MRIで損傷脊髄は、ヒトと同様にT1強調像で低信号、T2強調像で高信号の境界明瞭な領域に局限化した。同部位は組織学的には空洞とその周囲のグリア瘢痕であったが、移植群では空洞は縮小傾向にあった。免疫組織染色で空洞周囲にBrdU陽性の移植細胞を多数認め、各マーカーとの2重染色でNeuron, Astrocyte, Oligodendrocyteへの分化を確認した。Bar grip testと自発運動量計測の両方で、移植群が対照群よりも有意な機能回復を認めた。

審査では、脊髄損傷を定量的に作製しても炎症の程度や回復には個体差があるのでは、との質問がなされた。これに対して、実際に個体差はすべてのin vivo実験に存在するがnを増やし統計学的解析を行うことで影響を減らせると回答された。また、損傷脊髄内の血流動態の変化について質問され、文献的には齧歯類で損傷後新生血管は発現するも約2週間でastrocyteの遊走とともに退縮してしまうとの報告があり、損傷部中心の血管新生を促進すれば移植細胞の生着率の上昇や空洞の減少に寄与できるのではないかと回答された。次に、移植により空洞が縮小したのはどの細胞によるのかとの質問がなされ、生着した移植細胞そのものもあるが、移植の効果で2次損傷を免れた正常組織が残存した可能性も高いとの推察が述べられた。さらに、Oligodendrocyteに分化した移植細胞は再髄鞘化したのかとの質問に対しては、未検討であり今後の課題であると回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、脊髄損傷に対する神経幹細胞移植療法の効果を霊長類モデルで証明することによって、臨床応用に一步近づけたという点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
解剖学 仲嶋 一範 内科学 鈴木 則宏
外科学 河瀬 斌
学術監認担当者：
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成17年 2月18日

Alsin, the Product of *ALS2* Gene, Suppresses SOD1 Mutant Neurotoxicity through RhoGEF Domain by Interacting with SOD1 Mutants

(*ALS2*遺伝子がコードする蛋白AlsinはRhoGEFドメインを介してSOD1変異体が誘導する神経毒性を抑制する。)

金 蔵 孝 介

内容の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位下位運動神経細胞が進行性に脱落する神経変性疾患で、90%が孤発性、10%が家族性に発症する。1993年、常染色体優性遺伝ALSの原因遺伝子として、*Superoxide dismutase 1 (SOD1)* の変異が報告された。以降、SOD1変異体が神経細胞死を起こすこと及びSOD1変異体トランスジェニックマウスがALS様の症状を示すことなどが明らかにされたが、未だにその神経毒性機構の詳細はほとんど解明されていない。また、2001年に常染色体劣性遺伝ALSの家系からalsin蛋白をコードする新規ALS原因遺伝子*ALS2*が同定された。alsinはsmall G proteinのグアニン交換促進因子 (GEF) と相同部位を複数持ち、何らかのシグナル伝達に関与することが予想されている。未だその正確な機能は解明されていないが、少なくとも一部の症例においては*ALS2*の遺伝子変異によるalsinの機能損失がALS発症にいたる原因であると想像されている。本研究では、alsinが運動神経細胞の生存を維持するシグナル伝達機構に関与している分子ではないかという仮説のもと、alsinがSOD1変異体の引き起こす運動神経細胞死にどのような影響をおよぼすか検討した。

まず*ALS2*遺伝子の2つのスプライシングバリエント、*ALS2 long form (ALS2LF)* と *ALS2 short form (ALS2SF)* をヒトcDNAよりクローニングし、SOD1変異体とマウス運動神経細胞株NSC34細胞に共発現させたところ、*ALS2LF*がコードするalsinLFはSOD1変異体が惹起する神経細胞死を著明に抑制することを見出した。注目すべきことに、この神経保護作用はSOD1変異体誘導性細胞死特異的であり、アルツハイマー病関連など他の神経変性疾患侵害刺激に対しては無効であった。さらにalsinLFの神経保護作用の責任ドメインがsmall G proteinのひとつRhoを活性化するRhoGEFドメインであることを見出した。不完全なRhoGEFを持つalsinLF変異体では神経保護作用が失われたことから、alsinLFの神経保護作用にはRhoGEF活性が必要であることが示唆された。また、免疫染色によって、両者の細胞内局在を検討したところ、alsinとSOD1変異体の細胞内局在が一致した。さらに、alsinとSOD1とを共発現させた細胞融解液を用いて免疫沈降を行うと、alsinLFがSOD1と共沈することから、alsinLFとSOD1とは直接結合していることが示唆された。最後に、種々の欠損alsinLF変異蛋白質を作成し、変異型SOD1と種々の共沈実験を行った結果、alsinLFはRhoGEFドメインを介してSOD1変異体と結合していることが明らかとなった。以上の実験結果を総合すると、alsinLFはRhoGEF領域を介して変異SOD1と結合し、変異SOD1の引き起こす神経毒性を抑制すると結論された。この結果は、alsinLFが運動神経細胞の生存を維持する機能を持つことを示唆するのみならず、従来全く異なる機序でALSを引き起こすと考えられていた*ALS2*と*SOD1*の遺伝子異常が実は密接に機能的相互作用していることを示唆している。今後、両者の関与する神経細胞死シグナル伝達経路や生存シグナル伝達経路の解明がALSの原因解明および治療法開発に大きく貢献すると考えられる。

論文審査の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は進行性に運動神経細胞が脱落していく神経変性疾患であり、その選択的運動神経細胞死機構は未だ不明のままである。本研究では常染色体優性遺伝ALSの原因遺伝子SOD1変異体の持つ神経毒性に対し、新規に同定された常染色体劣性遺伝ALS原因遺伝子*ALS2*がコードする蛋白alsinの示す神経保護作用について検討がなされた。運動神経細胞株NSC34細胞にSOD1変異体を発現させると顕著な神経細胞死が惹起されるが、alsin long form (alsinLF) はそれを抑制した。さらにalsinLFの神経保護作用には疾患特異性が見られた。神経保護作用の責任ドメインはalsinのRhoGEFドメインであった。次いで、神経保護作用機構検討の結果、alsinとSOD1変異体の細胞内における局在が一致し、さらに細胞内で結合していることが示された。この結合の責任ドメインもRhoGEFドメインであり、変異SOD1のみと特異的に結合することが示された。

審査に当たり、まずSOD1変異体の毒性機構およびalsinの神経保護作用機構の詳細について質問があり、現在知られている変異SOD1の毒性に関する諸仮説について説明がなされ、さらに発表者が見いだしたalsin/Rac1/PI3K/Akt3抗アポトーシス系路に関する説明がなされるとともに、それに関してAkt3特異的にシグナルを伝える分子の介在を考慮に入れて現在scaffold蛋白などを含め探索中であると回答された。次にalsinの生体内での発現およびその役割に対する質問では、全身性に発現していること、その役割に関してはin vitroでの検討のみでin vivoにおいては未知であることの回答がなされた。また、in vivoにおける神経保護作用の検討の必要性も議論され、現在alsinLF高発現マウスとSOD1変異体マウス交配実験中であるとの回答がなされた。なお、*ALS2*の変異に起因する症例では上位運動神経優位に障害されることから、上位運動神経細胞を用いた検討の必要性が助言されるとともに、運動神経細胞と他の細胞との比較検討を行うことにより、ALSの病態解明へつなげるのではないかと助言がなされた。最後に家族性ALSと孤発性ALSとの類似および相違についての質疑があり、今後家族性ALSの研究成果を孤発例に応用する重要性についての助言があった。

以上より、本論文は家族性ALSにおける病態の中心である神経細胞死に関してAlsinの果たす機序とその意義について先駆的な知見を表したものであり、今後の同疾患の病態解明研究と治療法開発に大きな影響を与えるものとして、その内容は学位論文として十分に値するものであることが認められた。

論文審査担当者 主査 解剖学 相磯 貞和
内科学 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範
医化学 末松 誠

学力確認担当者：

審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成17年 2月18日

A novel mechanism for imatinib mesylate (STI571) resistance in CML cell line KT-1 : Role of TC-PTP in modulating signals downstream from the BCR-ABL fusion protein.

(慢性骨髄性白血病細胞株KT-1における新たなイマチニブ (STI571) 耐性化の機構 : BCR-ABL融合蛋白下流のシグナル伝達を修飾するTC-PTPの役割)

清水 孝 恒

内容の要旨

【背景・目的】 ABLキナーゼの特異的阻害薬であるイマチニブ (STI571) は慢性期の慢性骨髄性白血病 (CML) の第一選択薬として定着したが、その耐性症例は臨床的に問題である。我々はイマチニブ感受性CML細胞株KT-1より、イマチニブ耐性株KTRを樹立した。p糖タンパクの発現、bcr-ablキメラ遺伝子の増幅、ABLキナーゼのATP結合領域の点変異を検討したが、いずれもKTR細胞のイマチニブ耐性化の機序には関与していなかった。脱リン酸化酵素の中で、TC-PTPの著明な発現低下を認めたため、イマチニブ耐性獲得におけるTC-PTPの意義について検討した。

【方法】 KTR細胞に、TC-PTPのnuclear isoformであるTC45遺伝子と酵素活性を持たないTC45-D182A遺伝子をレトロウイルスにより導入した。MTTアッセイによりイマチニブに対する感受性を検討し、ウェスタンブロット法によりシグナル伝達経路を解析した。

【結果】 MTTアッセイでは、KTR-TC45細胞は0.2、0.5、1 μ MのSTI571暴露により37、74.2、89.3%の増殖抑制を認め、イマチニブに対する感受性を回復した。一方KTR-mock、KTR-D182A細胞では感受性の回復は見られなかった。flow cytometerを用いたapoptosis細胞の検討では、0.5 μ Mのイマチニブ刺激により、TC45導入細胞では、12%から56%まで増加し、アポトーシス誘導効果の回復を認めた。イマチニブ刺激による細胞内シグナル伝達機構について検討したところ、KTR-TC45細胞では、0.5 μ Mのイマチニブ刺激により野生型KT-1細胞と同様にSTAT5のリン酸化は完全に抑制された。一方、耐性を維持したKTR-mock、KTR-D182A細胞では、親株KTR細胞と同様にSTAT5のリン酸化は亢進しており刺激後もリン酸化が維持された。JAK2、BCR-ABLのリン酸化は遺伝子導入株間での差異は見られなかった。また、BCR-ABLの下流にあるPKB/AKT、JNK、ERK1/2の活性化状態を遺伝子導入株間で比較したが、差異は認められなかった。TC-PTPのmRNAの発現を半定量PCR法で比較したところ、親株KT-1と比べKTR細胞で低下がみられ、TC-PTPの蛋白発現の低下はmRNAレベルであることが示唆された。

【結語】 KTR細胞のイマチニブ耐性化にはTC-PTPの発現低下によるSTAT5のリン酸化亢進が関与していた。脱リン酸化酵素TC-PTPの発現低下は、CML細胞がイマチニブへの耐性化を獲得する新たな分子機構となり得る可能性が示唆された。

論文審査の要旨

ABLの特異的チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブは慢性骨髄性白血病 (CML) の治療薬であるが、治療中の耐性化獲得が臨床問題となっており、耐性化機構の解明は重要である。これまでに、bcr-abl遺伝子の増幅、bcr-abl遺伝子のキナーゼ領域の点突然変異、多剤耐性遺伝子産物の発現などが機序として報告されているが不明な点も多い。CML細胞株KT-1から樹立されたイマチニブ耐性KTR細胞には、既知の機序とは異なる耐性化機構の存在が示唆され、親株と比較してKTR細胞で発現が低下しているT cell protein tyrosine phosphatase (TC-PTP) に注目した。本研究において、TC-PTPを再構築することにより、KTR細胞のSTAT5リン酸化亢進が抑えられ、イマチニブ感受性を回復することを示し、TC-PTPの発現低下がイマチニブの新たな耐性化機構となり得ることを示唆した。

審査において、本研究で解明された耐性化機構が実際のイマチニブ耐性患者の中でどの程度存在するかがたずねられた。この点に関して、非常に重要な問題であると認識しているが本邦では欧米に比較し現在、耐性患者の検体が得られにくく解析することが困難であることが述べられた。また他の脱リン酸化酵素の発現低下がイマチニブ耐性化に関与するとの学会報告が引用され、TC-PTPの発現低下が実際に耐性に関与する可能性が高いと回答された。患者検体を用いた検討は今後の課題とされた。次に、KTR細胞のイマチニブ耐性化の程度が他の耐性株の報告より弱いことが指摘された。この点に関して、これまでの報告では本研究と異なる耐性化機構が上げられており、耐性化の程度の差異は耐性化機構の差異によるのではないかと回答された。またTC-PTPがSTAT5を直接の基質としているかがたずねられた。直接の証明はなされておらず報告により意見が割れているが、本研究においてTC-PTPとSTAT5の共沈を確認しており基質となる可能性を強く示唆すると回答した所、実際に結果を提示しその点により踏み込むと興味深かったとの助言があった。その他、p糖タンパクの発現亢進はKTR細胞のイマチニブ耐性化には関与しないとベラパミルの阻害実験により結論したが、サイクロスポリンなど別の阻害薬を試みるべきであるとの指摘、更に増殖抑制効果の解析ではMTT解析だけでなく実際の細胞数の推移を示すべきであるとの指摘があった。また、BCR-ABL下流のシグナル解析に関しては、AKT、JNK、ERK以外の検証も要すると指摘された。

以上のように、本研究では特に患者検体の解析も含め、さらなる検討を要する点が課題として残されているものの、分子標的治療薬の新しい耐性化機構の発見が新規性として認められ、臨床へのフィードバックの可能性と併せて有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫
先端医科学 河上 裕 発生・分化生物学 須田 年生
薬剤学 谷川原祐介
学力確認担当者 :
審査委員長 : 河上 裕

試問日 : 平成17年 2月18日

Neuroprotective Effect of Activity-Dependent Neurotrophic Factor Against Toxicity From Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked Mutant SOD1 In Vitro and In Vivo.

(in vitroおよびin vivoにおける家族性筋萎縮性側索硬化症変異型SOD1の神経毒性に対する Activity-dependent neurotrophic factorの神経保護作用)

千葉 知宏

内容の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は中年以降に発症する最も頻度の高い致死性の運動神経疾患である。現在、ALSに対する根治療法は存在しない。多くの研究によって、家族性ALS (FALS) 変異型スーパーオキシドディスムターゼ1 (SOD1) のアポトーシス誘導活性がFALSの病態において重要な役割を果たすことが支持されてきた。我々は元々、抗アルツハイマー病作用を持つものとして同定されたActivity-dependent neurotrophic factor (ADNF) が、3種のFALS変異型SOD1 (A4T-, G85R-, およびG93R-SOD1) に起因する神経細胞死を用量依存的に抑制することを発見した。SOD1変異体が誘導する神経細胞死に対するADNFの神経保護作用は、100nMという極めて低い濃度で完全に発揮される。また、このADNFの神経保護作用は1nM以上の濃度でも維持される。この発見はADNFがアルツハイマー病関連神経毒性に対しては、1nM以上の高濃度において神経保護作用を失うというこれまでに発見された特徴とは明白に異なる。さらに我々は、SOD1変異体が誘導する細胞死に対するADNFの神経保護作用は、Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) と特定のチロシンキナーゼがADNFによって媒介されることを明らかにした。ALS動物モデル、G93A-SOD1トランスジェニックマウスを用いた検討から、合成ADNFペプチドの脳室内投与によって生存期間の延長はわずかであったものの運動機能を向上させることを明らかにした。このように、本研究は、ALS治療薬開発において新たな知見を提供するものと考えられる。

論文審査の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は中年以降に発症する最も頻度の高い致死性の運動神経疾患であり、有効な治療薬は存在しない。本研究では、家族性ALS (FALS) 変異型SOD1の誘導する神経毒性に対するActivity-dependent neurotrophic factor (ADNF) の効果を検討した。ADNFは3種のFALS変異型SOD1 (A4T-, G85R-, およびG93R-SOD1) の起因する神経細胞死を用量依存的に抑制し、このADNFの神経保護作用が、Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) と未同定のチロシンキナーゼによって媒介されることを明らかにした。さらに、in vitro実験結果に基づいて、ALS動物モデルであるG93A-SOD1トランスジェニックマウスを用いて合成ADNFペプチドの脳室内投与実験を行なった結果、ALSモデルマウスの運動機能が有意に改善されることが示された。

審査ではまず、ADNFの受容体についての質問がなされた。それに対して、現在のところ受容体が同定されていないが、膜表面の分子を想定して現在探索中であると回答された。次に、変異型SOD1遺伝子の導入効率と導入後の神経細胞死亡率に関する質問がなされ、これに対しては60-70%の安定した導入効率結果を得ていること、細胞死の判定にはtrypan blue dye exclusion testが用いられているがWST-8 testと併用した場合にも同様のデータが得られていること、導入効率と細胞死亡率から変異体が導入された細胞において高率に細胞死が誘導されていると想定されているが今後その直接的証明を行いたいなどの回答がなされた。さらに、Aβに対するADNFの神経保護作用とSOD1変異体に対する神経保護作用の違いに関して質問がなされ、Aβに対する神経保護作用を媒介するHSP60の機能を抑制してもSOD1変異体に対する神経保護作用が抑制されないことが回答された。また、ADNFをモデルマウスに投与した際に顕著な寿命延長がみられないことに関する議論がなされ、運動機能に対する効果と寿命に対する効果は別個に考察されるべきであること、運動機能の指標の他に体重の変化を観察すること、および経時的に組織学的な変化を観察することの助言がなされた。投与したADNFの体内動態に関する質問もなされ、今後血中、脳脊髄液中での濃度を測定する系を確立することの重要性が議論された。最後に、臨床では孤発性のALSが大部分であり、今回得られたSOD1変異体に対するADNFの抗ALS作用をもとに孤発例に応用することが重要であるとの助言がなされた。

以上のように、現在有効な治療法が存在しないALSに対して新規の治療薬シーズとなる分子を同定した本研究は今後の発展により臨床応用に結びつく可能性が高い有意義な研究であり、博士論文として妥当なものであるものと認められた。

論文審査担当者 主査 解剖学 相磯 貞和
内科学 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範
生理学 岡野 栄之

学力確認担当者：
審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成17年 3月 2日

Electroporation of Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells.

(カニクイザル胚性幹細胞に対するエレクトロポレーション法による遺伝子導入法の確立)

古 谷 正 敬

内容の要旨

胚性幹細胞 (ES細胞) を用いた基礎研究および臨床応用においてES細胞に対する安定した遺伝子改変技術の確立は必要不可欠なものであり、その利用価値は大きい。しかし霊長類ES細胞ではマウスES細胞と異なり高効率の遺伝子導入が困難とされてきた。我々は非ヒト霊長類ES細胞としてカニクイザル (サル) ES細胞の樹立および安定培養に成功している。サルES細胞はヒトES細胞と類似した性質を持つことから将来ヒトES細胞への遺伝子導入を目指し、その基礎実験としてサルES細胞に対する遺伝子導入法の確立を検討した。とくに遺伝子ターゲティングも視野に入れエレクトロポレーション法による遺伝子導入法の確立を試みた。

遺伝子導入法としてエレクトロポレーション法を用い、細胞解離方法や遺伝子導入条件を変えて蛍光遺伝子を発現するベクターを導入し、安定して蛍光蛋白を有する細胞を確認する事で導入効率を比較した。遺伝子導入に先立つ細胞解離方法に改良を加え単一の細胞まで解離せず、細胞塊に対して電気パルスを加えることで導入効率が改善した。さらに電気パルスの条件を最適化することで 10^7 個の細胞から約100クローンの安定遺伝子導入体を得た。統いて安定遺伝子導入体の薬剤選別によりサルES細胞で有効に働くプロモーターを検討した。その結果マウスES細胞と対照的にサルES細胞ではCMVプロモーターよりSV40プロモーターが有効に作用する事が明らかとなった。確立した遺伝子導入法を用いて蛍光標識したサルES細胞を作製しその特性解析、神経前駆細胞の分化誘導およびマウス胎仔脳室内への移植実験を行った。蛍光標識したサルES細胞がES細胞の性質を保持し、分化後も導入遺伝子である蛍光蛋白の発現が維持されることを確認した。また神経前駆細胞の脳室内移植実験により蛍光標識された移植細胞が宿主脳組織に取り込まれる様子を追跡する事ができた。

サルES細胞に対するエレクトロポレーション法による高効率の遺伝子導入法を確立した。この手法は霊長類ES細胞の基礎研究及び臨床研究に広く応用できるものと考えられる。

論文審査の要旨

胚性幹細胞 (ES細胞) の基礎研究および臨床応用には安定した遺伝子導入技術の確立が必須であるが霊長類ES細胞においてはマウスES細胞と異なり高効率の遺伝子導入が困難とされてきた。特にジーンターゲティングに一般に用いられるエレクトロポレーション法による高効率の遺伝子導入に成功した報告はこれまでになかった。本研究では霊長類ES細胞特有の性質である低いクローニング効率、すなわち細胞を単一細胞まで解離するとその後の細胞生存率が著しく減少するという性質に着目し、従来の単一細胞まで解離する方法を改良し細胞塊に対してエレクトロポレーションを行う事でカニクイザルES細胞に対する遺伝子導入効率を大幅に改善する事に成功した。

審査では、まず、霊長類ES細胞におけるクローニング効率の改善によって遺伝子導入効率を改善する可能性について質問がなされた。これに対し単一細胞に解離された霊長類ES細胞はフィーダー細胞への接着能が著しく低下し、フィーダー細胞との接触が絶たれた結果死滅してしまうこと、また接着したとしても単一細胞からの細胞増殖が遅延することから現時点ではクローニング効率の改善は極めて困難であり、細胞塊として扱うことで細胞増殖能を保つことが遺伝子導入効率改善の最善策であると回答された。これに対し本研究では単一細胞に解離する際に機械的な損傷を与えていると考えられ、より細胞障害性の低い化学的な細胞解離方法を更に検討することによりクローニング効率の改善を期待できる可能性があるとの指摘を受けた。次に細胞塊に対して遺伝子導入を行うことで得られる安定遺伝子導入体がクローナルなものでない可能性について質問がなされた。これに対し安定遺伝子導入体の獲得効率から考えて同一コロニー内に複数クローンが含まれる可能性は低く、また複数クローンから構成されるコロニーであったとしてもある程度細胞を増殖させた後であれば効率は低いもののクローニングが可能であると回答された。更にサザンブロット解析にてシングルコピーのクローンを確認しており、クローナルな安定遺伝子導入体の獲得は可能との回答がなされた。最後に本研究において達成された 10^5 という効率はジーンターゲティングに応用できるものかとの質問がなされた。これに対し一般にジーンターゲティングでは約300クローンの安定遺伝子導入体をスクリーニングすれば数千クローンの相同組み換え体が含まれており、そこから逆算すると 3×10^7 個のES細胞を準備すれば良いことになりジーンターゲティングに十分応用できる効率であるとの回答がなされた。

以上の様に本研究はさらに検討すべき課題を残しているが、今後ヒトES細胞を含めた霊長類ES細胞の基礎研究および臨床研究に広く応用できる遺伝子導入技術を確立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
生理学 岡野 栄之 発生・分化生物学 須田 年生
分子生物学 清水 信義
学力確認担当者：
審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成16年10月19日

Identification and characterization of a novel gene family YPEL in a wide spectrum of eukaryotic species.

(広範な真核生物にメンバーを有する新規遺伝子ファミリーYPELの発見と性状解析)

細野 克博

内容の要旨

分子生物学教室は、ヒト染色体として初めて22番染色体の全真正クロマチンのシーケンシングを英米との国際協力で完遂した。申請者は、その後の教室での22番染色体全遺伝子の網羅的同定と構造・機能解析研究に参加し、セントロメアから約6 Mbの位置、22q11.2上PPIL2とMAPK1遺伝子の間に新規遺伝子YPEL1を発見した。本研究ではYPEL1とその関連遺伝子の性状と機能に関して検討した。

YPEL1は昆虫の血球タンパク質関連遺伝子として報告された*Drosophila*のyippee遺伝子に相同性を示すが、yippee、YPEL1ともに機能は未知である。相同性検索の結果、ヒトゲノムにはYPEL1のパラログ遺伝子が他に4コピー (YPEL2~5) 存在することが予測されたので、それら全ての全長cDNAをクローニングし、遺伝子構造を決定した。我々はそれらを合わせて新規にYPEL遺伝子ファミリーと提唱した。ヒトYPELファミリーのメンバー間ではアミノ酸配列で43.8~96.6%の相同性を示すことがわかった。また、全メンバーについてマウスでオルソログ遺伝子が存在することがわかったのでcDNAをクローニングし塩基配列を解析したところ、各オルソログ間ではアミノ酸配列で99.2~100%の相同性を示した。既知の全生物ゲノムに対する相同性検索により、YPEL遺伝子ファミリーを探索したところ、68種の動物、植物、真菌類に関して100種類が見出されたが、原核生物、古細菌からは見出されなかった。これら100種類のアミノ酸配列の解析により全メンバーに共通なコンセンサス配列が存在することがわかった。また100種類のYPELファミリータンパク質の系統樹を作成したところ、5つのサブファミリー (動物: 2群、植物: 2群、真菌: 1群) に分類された。YPELファミリーが真核生物に普遍的に存在することは、その機能が生命維持のために極めて重要であることを示唆する。

次に、哺乳類のYPEL1~4タンパク質とYPEL5タンパク質をそれぞれ認識する2種類の特異的抗体 (抗YPEL1-4、抗YPEL5) を作成し、COS-7細胞における発現局在を間接蛍光抗体法で解析した。その結果、YPEL1-4タンパク質は間期において中心体と核小体に局在し、分裂期においては複数のドット状構造を形成し、分裂装置の周辺に局在することが判明した。これに対し、YPEL5タンパク質は間期において中心体と核に局在し、分裂期の一時期においては紡錘体上に局在した。これら細胞内局在解析の結果から、YPELタンパク質は中心体や紡錘体と相互作用していると考えられた。このことからYPELファミリータンパク質は細胞分裂に関与する新たな機能を有していることが示唆された。

論文審査の要旨

ヒトゲノムのシーケンシングは完了したが、その成果を疾患原因解明や健康維持の研究にさらなる活用を図るために、塩基配列の意味を読み解き、存在する遺伝子を網羅的に同定することが今後のゲノム研究で重要なことのひとつである。慶大と英米の共同研究で、世界で最初に全シーケンシングを完了した22番染色体に関しても、その「網羅的遺伝子同定」が進められており、本研究はその一環として行われた。申請者は22q11.2から新規遺伝子YPEL1を発見した。さらに、ヒトゲノム上にYPEL1のパラログ遺伝子4コピー (YPEL2~5) も見出し、それらの遺伝子構造も決定した。それらをYPEL遺伝子ファミリーと名付けて、他種生物での同ファミリー遺伝子を探索したところ、動物、植物、真菌類から100種類見出されたが、原核生物、古細菌からは見出されなかった。全種のYPELタンパク質の系統樹を作成したところ、5つのサブファミリー (2群の動物、2群の植物、真菌) を形成した。ヒトYPEL1~4が動物のA群に、YPEL5がB群に分類された。それら2群のサブファミリーを区別できる特異的抗体を作成し、COS-7細胞における発現を間接蛍光抗体法で解析した。YPEL1~4タンパク質は間期において中心体と核小体に局在し、分裂期には複数のドット状構造を形成し、分裂装置の周辺に局在することが判明した。一方、YPEL5タンパク質は間期において中心体と核に局在し、分裂期の一時期においては紡錘体上に局在した。事実上すべての真核生物にYPELファミリー遺伝子が高度に保存されていることから、同ファミリータンパク質が真核生物に共通の重要な生命機能を担っていること、それは細胞分裂関連の現象に関与することが示唆された。

審査に際しては、YPEL遺伝子ファミリーの新規性、YPELファミリータンパク質の局在に関する他の培養細胞も用いた普遍性、今後の機能解析の方針等について質疑がなされた。申請者からは、YPELファミリータンパク質は広範な真核生物で高度に保存された巨大なファミリーを形成しているにもかかわらず、メンバーの解明、包括的な構造解析、機能解析など報告がなく、新規カテゴリーの遺伝子ファミリーであるとの説明があった。また、細胞内局在の普遍性に関しては、COS-7細胞以外の培養細胞として、ヒトHeLa S3細胞で同一の染色像が得られたので、普遍的な結果であると考えていること、HEK293細胞では染色部位が不鮮明で、今後さらに検討を継続する予定である旨の説明がなされた。さらに、機能解析については、細胞内局在解析の結果から新規の細胞分裂関連タンパク質である可能性を追究すること、そのために細胞分裂期における局在のより詳細な解析と、培養細胞でのRNAi法による遺伝子発現抑制を用いた解析を進める方針が表明された。その際、本研究で作成した抗体はYPEL1~4タンパク質の個々を区別できないため、個別のメンバーを認識する抗体を作成する努力も続ける予定であると説明がなされた。最後に、YPEL1~4タンパク質の分裂期の細胞における空間的な局在に関しては共焦点顕微鏡を用いて再確認するとよとの指摘があった。

以上、本研究はさらに継続して実験を行い検討を加えるべき点が残されているが、遺伝子ファミリーYPELを新たに発見したこと、YPELファミリータンパク質が細胞分裂の新たな機能に関与する可能性を示したという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 分子生物学 清水 信義
微生物学・免疫学 小安 重夫 医化学 末松 誠
先端医科学 河上 裕
学力確認担当者:
審査委員長: 小安 重夫

試問日: 平成17年 2月17日

Calcineurin Activation Contributes to Noise-Induced Hearing Loss (音響外傷性難聴におけるカルシニューリンの役割)

南 修 司 郎

内容の要旨

モルモットの音響外傷モデルの蝸牛有毛細胞死における calcineurin の役割を検討した。過度の音響は蝸牛有毛細胞を破壊し永久的な難聴を引き起こす。有毛細胞死は二次的に蝸牛神経の変性をきたすため、有毛細胞死を防ぐことが音響外傷における治療の最初の目的となる。

強大音刺激は蝸牛有毛細胞内のカルシウム濃度を上昇させる。calcineurin はカルシウムによって制御される phosphatase である。免疫染色的手法でモルモットの有毛細胞内の calcineurin の発現を検討した。音響外傷 (4kHz OBN, 120dB, 5時間) 直後、cuticular plate 部分に calcineurin の発現を認めた。この事から calcineurin は音刺激に反応して発現したといえる。また音響外傷後、日数の経過とともに calcineurin 陽性の有毛細胞の数は減り、7日目までには音響負荷をかけていないコントロールと同様に calcineurin 発現はみられなくなった。それと同時に多数の有毛細胞死を認めた。

Calcineurin 陽性の有毛細胞が死に行く細胞であるかどうかを調べるために propidium iodide (PI) による核染色を行った。PI は正常細胞膜を通過する事ができず、細胞死初期の現象である崩壊した細胞膜のみ通過する事ができるため、死に行く細胞を認識する。Calcineurin 陽性の有毛細胞は PI 染色においても陽性を示した。この結果により、calcineurin は有毛細胞死と密接に関係していると考えられた。

次に、calcineurin の活性を阻害する FK506 と cyclosporin A を局所的に浸透圧ポンプを利用して投与した。FK506、cyclosporin A は共に音響外傷による ABR の閾値の変化を小さくし、有毛細胞死の数を減少させるという事が確認された。つまり、calcineurin 阻害剤が音響外傷による難聴を生理的また形態的に防御する事が分った。calcineurin の活性化が音響外傷による難聴の経路において重要な役割を担っている事が示唆された。

論文審査の要旨

Calcineurin はカルシウムによって直接制御される唯一の phosphatase である。モルモット音響外傷モデルを用いて、有毛細胞内の calcineurin の役割を検討した。音響暴露直後、cuticular plate 部分に calcineurin の発現を認めた。calcineurin 陽性の有毛細胞は PI 核染色においても陽性を示し、calcineurin は有毛細胞死と関係していると考えられた。さらに、calcineurin の役割を検討するために calcineurin 阻害剤 (FK506、cyclosporin A) を局所的に浸透圧ポンプにて投与した。FK506、cyclosporin A は共に音響外傷による ABR の閾値上昇を抑制し、有毛細胞死の数を減少させることが確認された。以上の結果より、calcineurin の活性化が音響外傷による不可逆性の難聴発現に重要な役割を担っている事が示唆された。

審査ではまず本研究に使用した音響外傷モデルはどのような臨床像を想定しているのかと質問された。それに対して、実際の臨床においては慢性的な音響刺激による難聴が多いが、このモデルは爆撃音、ディスコ騒音等の急性音響性聴力障害にあたりと回答された。次に、calcineurin 阻害剤として使用した FK506 と cyclosporin A の違いについて、またこの研究では calcineurin 阻害剤は局所投与、音響暴露前投与であるが、全身投与または音響暴露後投与で効果は期待できるのか、と質問された。FK506、cyclosporin A はそれぞれ calcineurin 阻害以外にも、神経栄養、ミトコンドリア膜安定などの働きもある。しかし FK506、cyclosporin A 共に同様の効果を認めた事により calcineurin の不活化が音響外傷の防御に重要であると考えられる。また、全身投与では血液内耳関門の問題があり、蝸牛内に薬が移行するかどうか明らかではない。そして、音響外傷直後に calcineurin の発現が最も高いため、音響外傷後投与により同様の効果を期待することは難しいが、今後検討する必要があると、各々回答された。また、calcineurin 陽性の細胞と PI 陽性の細胞が同一である点をより鮮明にする工夫について助言された。最後に、音響刺激による calcineurin 発現の機序、calcineurin による有毛細胞死の経路、また calcineurin 阻害剤をどのように臨床応用していくかも今後の重要な検討課題とされた。

以上のように、本研究には今後の課題が残されてはいるものの、音響外傷における蝸牛有毛細胞内の calcineurin の役割を初めて明らかにしたことは、今後、他の感音難聴の発症機序の研究のみならず音響外傷の臨床においても有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 耳鼻咽喉科学 小川 郁
生理学 岡野 栄之 外科学 河瀬 斌
内科学 鈴木 則宏

学力確認担当者：

審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成17年 1月26日

Delayed production of free radicals following noise exposure.

(音響外傷後のフリーラジカルの遅発性発現)

山下 大介

内容の要旨

音響外傷による内耳有毛細胞の障害のメカニズムには、音そのものによる直接的・機械的ダメージと種々の代謝的ダメージがある。代謝的障害の中には活性酸素やフリーラジカルが、内耳における細胞死に重要な役割を持つと考えられている。しかし一般的にフリーラジカルの反応は*in vitro*においては数ミリ秒と速いものであり、音響曝露後に持続して生じる遅発性の蝸牛障害を説明できるものではない。そこで今回我々は、有色モルモットに音響負荷(120dB SPL, 4 kHz OBN, 5h)、その後の聴覚機能(ABR:聴性脳幹反応)および細胞死の形態変化を経時的に観察し、さらにフリーラジカルの発現を活性酸素のマーカー(4-HNE)および活性窒素のマーカー(Nitrotyrosine)を用いて免疫組織学的に検討した。

このモデルにおける聴覚機能は、負荷後7日目で固定化し、聴覚の残存するPTS(permanent threshold shift:永続的閾値上昇)を呈していた。細胞死の形態変化も同様に7~10日目で固定化していた。これに対して、免疫組織学的には7~10日目に活性酸素・活性窒素共に外有毛細胞での発現のピークを確認した。この結果は機能的・形態的变化と一致するものであり、音響曝露後、持続する代謝的障害を示唆するものと考えられた。

音響曝露後、形態的には徐々に障害が増加・拡大するのに対し、聴覚機能は音響負荷後に閾値が最大値を示し、その後、徐々に減少し、7日目に固定している。この最初の閾値上昇は、様々な蝸牛における可逆的な構造の変化によると考えられる。例えば、基底膜の機械的なコンプライアンスの変化や、有毛細胞の感覚毛のスティッフネスの減少、求心性神経終末の興奮毒性などである。最終的な内耳組織障害の程度は、この遅発性に生じるフリーラジカルの負の要素と可逆的な構造変化の正の要素によるバランスにより決定されていると考えられた。

遅発性のフリーラジカルの発現のメカニズムとして我々の仮説は、最初に障害を受けた部位(4kHz領域)より種々のケミカルメディエーター(これには活性酸素やフリーラジカルも含まれる)が放出され、周囲の隣接細胞に影響を及ぼし、その隣接細胞内でまた種々の反応により細胞死(これにはアポトーシスやネクローシスも含まれる)が誘導され、またその隣の細胞にとダメージが空間的・時間的に拡大するのではというものである。この結果に基づき音響曝露後から、種々のスカベンジャーの投与によって音響外傷性聴覚を防御できる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

音響性聴器障害による内耳性聴覚は感音聴覚の主な原因の一つで、その多くが難治性である。本研究の目的は、強大音響曝露により内耳蝸牛に生じる病態生理的、形態的、生化学的变化を解明することである。有色モルモットに強大音響を負荷(120dB SPL, 4kHz OBN, 5h)、その後の聴覚機能(ABR:聴性脳幹反応)および細胞死の形態変化を経時的に観察し、さらにフリーラジカルの発現を活性酸素のマーカー(4-HNE)および活性窒素のマーカー(Nitrotyrosine)を用いて免疫組織学的に検討した。聴覚機能は、強大音響負荷後7日目で固定化し、不可逆的聴覚の所見と考えられる永続的閾値上昇(PTS)を呈した。細胞死の形態変化も同様に7~10日目で固定化した。これに対して、免疫組織学的には7~10日目に外有毛細胞で活性酸素・活性窒素の各マーカーが発現のピークを示した。この結果は機能的・形態的变化と一致するものであり、音響曝露後も外有毛細胞内で代謝的障害が進行する可能性が示唆された。

審査ではまず、生理的な状態での蝸牛における環境に関して質問がなされた。蝸牛は日常において騒音を含め、様々なストレスに曝露されており、組織内での酸化ストレスと内因性の抗酸化作用とのバランスで障害のレベルが決まると考えられている。また基礎実験での報告では、中等度の音響を持続的に曝露することによって、内因性の抗酸化作用を誘導することにより、強大音響に曝露された際に蝸牛保護効果を呈する機構(sound conditioning)があると回答された。次に、蝸牛とiNOSの関与に対する質問に対し、有毛細胞や外側壁でのiNOSの局在に関する報告があると回答された。また、周波数別に聴覚閾値と有毛細胞の形態変化に相関があるかと質問された。これに対しては、蝸牛の頂回転側と基底回転側の有毛細胞での酸化ストレスに対する感受性に差があり(基底回転側の有毛細胞が酸化ストレスに対してより脆弱)、必ずしも同等のストレスに対し障害の程度は一致しないこと、また、形態的には残存する細胞が機能していない可能性や、逆に形態的な細胞死が多い場合でも、残存する細胞が過剰に機能する可能性などが考えられ、必ずしも機能的な聴覚閾値と形態的な有毛細胞死の数に相関は見られないと回答された。最後に臨床応用に関して、現在臨床で用いられているステロイド剤などとの効果の比較について質問がなされ、現状での基礎実験では種々の抗酸化剤やフリーラジカルスカベンジャーとステロイド剤での蝸牛保護効果には大きな差がないと回答された。

以上のように、本研究は臨床応用を含めて今後の検討課題は残しているものの、強大音響曝露後も進行する代謝的障害と活性酸素・活性窒素との関与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 耳鼻咽喉科学 小川 郁
生理学 岡野 栄之 解剖学 仲嶋 一範
医化学 末松 誠

学力確認担当者:
審査委員長:岡野 栄之

試問日:平成17年 2月10日

Spironolactone in Combination with Cilazapril Ameliorates Proteinuria and Renal Interstitial Fibrosis in Rats with Anti-Thy-1 Irreversible Nephritis

(スピロノラクトンとシラザプリルの併用投与は抗Thy-1不可逆性腎炎ラットモデルの尿蛋白と腎間質線維化を改善する)

浅井 昌樹

内容の要旨

近年、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) や抗アルドステロン (ALDST) 薬の臓器保護が注目されており、これら2剤の心疾患に対する治療効果は報告されているが、ヒトの進行性腎障害への抗ALDST薬の効果に関しての十分な検討がなされていない。また、ヒトの終末期腎疾患のほぼ半数が免疫原性の腎炎であるのにも関わらず、免疫原性の腎疾患動物モデルに対する抗ALDST薬の効果に関する報告もなされていない。そこで我々は、ヒトの進行性糸球体腎炎に近似していると考えられている抗胸腺 (Thy-1) 抗体不可逆性腎炎ラットモデルを用いて、抗ALDST薬 (スピロノラクトン) の単独投与およびACEIとの併用投与の腎保護作用を検討した。

【対象と方法】6週齢雄性Wistarラットの右腎摘出後に抗Thy-1抗体 (MoA b 1-22-3) を静脈内投与して進行性慢性腎炎モデルを作成した。非治療群、抗ALDST薬のスピロノラクトン (SP) 単独投与群 (400mg/Kg/日)、ACEIのシラザプリル (CLZ) 単独投与群 (1mg/Kg/日)、SPおよびCLZの併用投与群の計4群を10週間飼育し、尿中蛋白排泄量、腎組織所見、血圧、腎機能について検討した。

【結果と考察】腎炎惹起後70日目の尿蛋白は、非治療群 (212.9±49.2mg/day) と比較して、SP単独投与群 (62.0±4.0mg/day, P=0.0046 vs 非治療群) およびCLZ単独投与群 (71.8±26.0mg/day, P=0.0048 vs 非治療群) で有意に減少しており、併用投与群 (42.4±4.5mg/day, P=0.0019 vs 非治療群) は単独投与群と比較して更なる尿蛋白排泄量の減少が認められた。Masson-Trichrome染色した腎皮質組織の間質線維化病変をグリッド法で定量評価したところ、SPとCLZ併用投与群 (80.3±18.5ポイント) は、非治療群 (142.0±18.4ポイント) と比較して有意 (P=0.0123) な線維化の抑制効果が認められた。非治療群の収縮期血圧 (158.2±8.1mmHg) は抗体注射前と比較して注射後56日目の慢性期においても有意に上昇しているのに対して、SP単独投与群 (117.0±6.5mmHg, P=0.0017)、CLZ単独投与群 (123.2±6.0mmHg, P=0.0037)、および併用投与群 (117.5±8.1mmHg, P=0.0019) の血圧上昇は非治療群と比較して有意に抑えられていた。非治療群 (5.9±0.1mEq/l) と比較して、SP単独投与群 (5.9±0.3mEq/l) およびSPとCLZの併用投与群 (6.2±0.1mEq/l) はいずれも血清カリウムの有意な上昇を認めなかった。

【結論】以上のように、ヒトの慢性腎炎に近似した不可逆性の腎炎モデルであるラットの片腎摘後に抗Thy-1抗体を投与したモデルにおいて、抗ALDST薬のSPとACEIのCLZとの併用療法が、尿蛋白排泄減少と腎間質線維化の抑制効果を有することが示され、腎炎の進展阻止にこれら両薬剤の併用が効果的であることが明らかにされた。

論文審査の要旨

近年アルドステロンは腎尿管からのNa⁺水再吸収促進による循環血液量の増加に基づく血圧上昇作用のほか、アルドステロンが直接心血管系に作用して血管障害を惹起することが明らかになってきた。このようなアルドステロンの腎障害の発症・進展に果たす役割は未だ明らかでない。そこで本研究では、ヒトの腎炎にきわめて近いとされる抗胸腺 (Thy) 抗体不可逆性腎炎ラットモデルを用いて、抗アルドステロン薬であるスピロノラクトン (SP) の効果を検討した。なおその際、腎保護効果がすでに広く認められているアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬のシラザプリル (CLZ) の効果を比較するとともに、両薬剤の併用効果も検討した。その結果、抗Thy-1腎炎モデルラットでの腎炎惹起後70日目の尿蛋白排泄量は、非治療群に比しSP群とCLZ群ではほぼ同等に減少した。両薬剤の併用群ではさらに尿蛋白排泄量が減少した。腎炎惹起により非治療群では著明に血圧が上昇したが、各薬剤の投与は有意に血圧上昇を抑制した。

腎組織の観察では、非治療群で腎皮質の間質の線維化が著明であり、SPあるいはCLZの投与はその線維化を軽度抑制し、両薬剤の併用投与はその線維化を著明に抑制した。尿蛋白の由来がどの程度糸球体障害によるものか検討するため、ネフリンの変化を検討したが、SPとCLZの投与群に差がみられなかった。

以上のような研究に関してまず問題とされたことは、各薬剤の投与方法である。飲料水あるいは食餌に混ぜての投与で、各ラットがほぼ同等に薬剤を摂取したかどうかが議論された。当研究者は、確実に摂取する飲量および食餌量を検討し、全量摂取する量を代謝ケージに入れて与えたので、各ラットがほぼ同量を摂取したとされた。正確には血中濃度が測定されるべきであるが、本研究ではなされなかった。

次にSPとCLZの腎保護効果の機序が議論された。両薬剤とも良好な降圧効果を示したことから、降圧効果が腎保護効果に関与したことは確かであるが、SPにはCLZのような糸球体内圧の低下作用は明らかでなく、アルドステロンの作用の抑制が関係したと推測した。アルドステロンの作用の抑制を確認するためにSP以外の抗アルドステロン薬での検討があればよかったと助言された。なおSPとCLZの併用で著しく腎保護効果が増強されたのは、両薬剤の腎保護作用に差があることを示唆するとされた。

腎組織所見に関して、写真のとり方が悪く、糸球体や尿管および間質の変化をもっと明瞭に示すべきであったとされた。間質の線維化の観察には、Masson Trichrome染色よりも銀染色の方がよかったと助言があった。

以上のように本論文では、SPの腎保護効果の機序が明らかにされなかったり、病理組織所見の検出方法に問題があったが、アルドステロンの腎障害促進作用を明らかにし、その作用の抑制が腎障害の進展阻止に有用な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
泌尿器科学 村井 勝 病理学 岡田 保典
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

試問日: 平成17年 2月23日

Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression.

(エンドセリン-1は神経成長因子を誘導し心臓交感神経系の発達を制御する)

家 田 真 樹

内容の要旨

心臓は自律神経支配を豊富に受け、その活動は自律神経系により精密に調節されている。交感神経支配が心臓にとって重要であることはよく知られているが、その神経支配形成に関与する分子機構はほとんど明らかとなっていない。Nerve growth factor (以下NGFと略す)は神経支配臓器より神経終末側に向かって逆行性に分泌され、神経の発生、維持に重要な役割を果たすが、心筋内のNGF制御機構、心臓から分泌されたNGFが心臓交感神経系形成に与える影響などは不明であった。そこで本研究では、まず心筋細胞でNGFを制御する分子について検討した。その結果、Endothelin-1 (以下ET-1と略す)のみがNGFを特異的に誘導し、アンギオテンシンII、フェニレフリン、Leukemia inhibitory factor、IGF-1などは影響しなかった。このET-1刺激によるNGF誘導はETA受容体、Giβγ、PKC、src family、EGFR、ERK、p38MAPKを介し、PKA、PI3K、CaMKを介さないことが、シグナル伝達物質の特異的阻害薬、ドミナントネガティブアデノウイルス、プラスミドを使用した実験より明らかとなった。またNGFプロモーター領域にはAP-1、C/EBP6があるが、双方ともET-1-NGF経路に関与することがルシフェラーゼアッセイにより示された。ET-1刺激した心筋細胞の培養上清液や心筋細胞との共培養下でのET-1刺激によりPC12細胞の神経分化が促進し、またこの作用はNGFに対する中和抗体で抑制された。これよりET-1刺激により心筋細胞から誘導されたNGFがPC12細胞の神経分化を誘導したと考えた。

次に、実際に生体心においてET-1はNGFを制御するか、またET-1-NGF経路が心臓交感神経系の形成に与える影響などを調べるため、Edn1-deficient mice (以下Edn1^{-/-}と略す)の解析を行った。胎生18.5日目のEdn1^{-/-}は野生型と比べ心臓内NGF、交感神経線維、ノルエピネフリン含量が減少していたが、Angiotensinogen-deficient miceでは変化をみとめなかった。Edn1^{-/-}では星状神経節の発達も障害されていたが、神経細胞の移動、神経細胞の増殖、分化などは障害されておらず、TUNEL法の結果、過剰のアポトーシスが神経細胞数減少の原因として示唆された。また心臓特異的NGF過剰発現マウスとEdn1^{-/-}を掛け合わせ、Edn1^{-/-}の心臓内NGFの減少を救済したマウスを作製し解析したところ、心臓交感神経系の発達障害が改善していることが明らかとなった。以上の結果より、生体心においてもET-1がNGF誘導に必須であること、また心臓内ET-1-NGF経路により心臓交感神経系の発達が調節されていることが示された。

論文審査の要旨

近年、心臓再生研究が臨床、研究両面より注目を集めており、それに伴い心臓血管系の発生分化に関する知見が増加してきた。心臓交感神経は生体において重要だが、その形成に関与する分子機構はほとんど明らかとされていない。NGFは神経支配臓器より神経側に向かって分泌され、神経形成に重要な役割を果たすが、NGF制御機構、心臓交感神経系に与える影響などは不明であった。そこで本研究では培養心筋細胞を用い心筋細胞内のNGF制御を明らかとし、生体心におけるET-1-NGF経路が交感神経系に与える影響を解明するためET-1欠失マウス、心臓特異的NGF過剰発現マウスを用い解析を行った。その結果、ET-1刺激は心筋細胞内でNGFを誘導すること、ET-1刺激によるNGF誘導はGiβγ、PKC、src family、EGFR、ERK、p38MAPK、AP-1、C/EBP6を介すること、ET-1刺激により心筋細胞から分泌されるNGFはPC12細胞の神経分化を促進することなどが示された。ET-1欠失マウスでは心臓内のNGF、交感神経、星状神経節内神経細胞数が減少すること、心臓特異的にNGFを過剰発現するとその交感神経系の発達障害が改善することが示され、心臓でのET-1-NGF経路が心臓交感神経系の形成に必須であることが明らかとされた。

審査では、ET-1欠失マウスにおける星状神経節細胞数が減少する機序について質問があった。これに対しNGF欠失マウスでも同様に神経細胞数が減少すること、心臓特異的NGF過剰発現でET-1欠失マウスの表現型が救済されたこと、神経細胞がNGF依存性となっている時期に一致して細胞数減少が観察されたことなどが示された。次に心筋細胞内でのET-1-NGF経路について質問があった。これに対して、今回の阻害薬、ウイルスを用いた結果や過去の報告などを踏まえ想定されたシグナル伝達経路が示された。次に4種類のNGF転写産物量を心臓、脳、顎下腺で示した理由について質問があった。これに対して各臓器での転写の相違を検討し、また転写産物によっては転写制御部位が異なるためluciferase assayの結果に影響しうるなどの説明がされた。また本研究の結果を今後どのように臨床に結び付けていくかの質問があった。心筋梗塞、心不全などの病態においてET-1が上昇し、また神経再支配の時期に一致して不整脈などの突然死が起きることなどが知られており、今後ETA受容体拮抗薬、遺伝子治療などを開発する際はET-1-NGFによる交感神経系への影響も考慮した治療戦略を練ることが重要との回答がされた。

以上のように本研究は検討されるべき点を残しているものの、心臓交感神経系の発生に関与する分子機構をはじめ明らかにした点や、今後心臓神経間のクロストークにも注目し治療を行う必要性を指摘した点などで有意義な論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
解剖学 仲嶋 一範 外科学 四津 良平
生理学 柚崎 通介
学力確認担当者: 北島 政樹、仲嶋 一範
審査委員長: 仲嶋 一範

試問日: 平成17年 1月11日

CCL22 and CCL17 in rat radiation pneumonitis and in human idiopathic pulmonary fibrosis.

(ラット放射線肺臓炎／肺線維症モデルおよび特発性肺線維症におけるCCL22とCCL17発現の検討)

井 上 卓

内容の要旨

【緒言】肺の線維化機序は未だ不明な点が多いが、最近では肺局所の2型ヘルパーT細胞(Th2)優位性と病因との関わりが注目されている。本研究ではラット放射線肺臓炎／肺線維症モデルを作成し、肺組織における8種類のケモカインに関する遺伝子発現を検討した。さらに、動物モデルで遺伝子発現の増強を認めたケモカインの中でCCL17、CCL22が特発性肺線維症(IPF)患者において如何なる動態を示すかについても解析した。

【材料・方法】8週令雄性SPF-ウィスターラットの胸部に18Gyの放射線照射を行い、照射28日後、56日後に屠殺した。左肺からの気管支肺胞洗浄液(BALF)を用いて総細胞数、細胞分画を算定した。右肺前葉よりハイドロキシプロリン量を測定し、右肺中・後葉において病理・免疫組織学的検討を行った。さらに、右肺副葉を用いてCXCL2、CCL2、CCL3、CCL4、CX3CL1、XCL1、CCL17、CCL22に関するReal time PCR解析を行い、各ケモカインのmRNA発現量を測定した。さらにIPF患者(18人)のBALF中のCCL17、CCL22蛋白量をELISA法で定量し、サルコイドーシス(19人)、正常ボランティア(6人)から得られた値と比較した。

【結果】動物モデルでは照射28日後に間質性肺炎の所見を認めた。56日後には線維化を認め、ハイドロキシプロリン量も増加した。BALF細胞解析でも照射28日後、56日後に総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数、好中球数の増加を認めた。また、照射28日後の肺組織においてCCL2、CCL17、CCL22のmRNA発現が有意に増加し、CX3CL1のそれは低下した。照射56日後にはこれらのケモカインに関するmRNA発現量は照射前値に戻った。照射28日後の免疫組織学的検討においてCCL22は肺胞マクロファージに、CCL17は肺胞マクロファージ、リンパ球、肺胞上皮細胞に有意な発現を認めた。両ケモカインの受容体であるCCR4は肺胞マクロファージとリンパ球に発現が認められた。患者BALFにおける検討では、IPF患者のCCL22量が正常ボランティア、サルコイドーシス患者から得られた値に比べ有意に高値であったが、CCL17についてはすべての群で検出感度以下であった。

【考察と結語】CCL17及びCCL22はCCケモカインに属し、ともにTh2リンパ球に特異的に発現するCCR4受容体のリガンドである。本研究の結果より、ラット放射線肺臓炎／肺線維症モデルでは、CCL22、CCL17が過剰産生され、CCR4を介した肺胞マクロファージ、リンパ球の肺局所への集積に関与していることが判明した。IPF患者のBALF中CCL22濃度が高値であったことから、実際の臨床的肺線維化過程にもCCL22が重要な病態修飾因子として関与するものと考えられた。

論文審査の要旨

肺の線維化において肺局所の2型ヘルパーT細胞(Th2)優位性と病因との関わりが注目されている。本研究ではまずラット放射線肺臓炎／肺線維症モデルを作成し、照射28日後に間質性肺炎を、照射56日後に線維化を認めた。肺組織の8種類のケモカイン遺伝子発現を検討し、照射28日後にTh2を特異的に遊走するCCL17、CCL22のmRNA発現が有意に増加し、免疫組織学的検討においてCCL22は肺胞マクロファージに、CCL17は肺胞マクロファージ、リンパ球、肺胞上皮細胞に発現を認めた。両ケモカインの受容体CCR4は肺胞マクロファージとリンパ球に発現が認められた。臨床研究として気管支肺胞洗浄液における検討を行い、特発性肺線維症患者のCCL22量が健常人、サルコイドーシス患者に比べ有意に高値であった。以上より、ラット放射線肺臓炎／肺線維症モデルでは、CCL22、CCL17が過剰産生され、CCR4を介した炎症細胞の肺局所への集積に関与していること、また、実際の臨床的肺線維化過程にもCCL22が関与することが判明した。

審査では、まず放射線肺傷害の病理学的変化について質問がなされた。これに対し、照射14日後までは肉眼的には明らかな変化を認めず、その後発症してくる比較的急性な炎症所見であると考えられ、さらに、線維化の時期と捉えた照射56日後の組織でフィブリンが析出しているのは急性炎症が一部遅延している可能性があるが肺全体では多くは認められなかったと回答された。次に、免疫組織染色で、前処置などの工夫が必要であるとの指摘がされた。抗体や条件を変更の上、複数回検討し非特異的反応ではないと判断したが、さらなる工夫が必要で今後の検討課題であると回答された。また、ケモカインの免疫染色と受容体の免疫染色の染色法や写真のスケールを統一すべきであり、またNegative controlの吸収試験もするべきであるとの助言がなされた。次に、臨床検体でCCL17が検出できなかった理由について質問され、ELISAキットの感度の問題があり、後に実用化された高感度キットで測定したところ特発性肺線維症患者で有意に高値であったと回答された。さらに、炎症から線維化の過程について質問され、集積されたTh2から放出されるIL-4などが肺局所におけるTGF-βなどの線維化に関与するサイトカイン産生を促したり、線維芽細胞を活性化したりすることで線維化が進むと考えられていると回答された。臨床的応用についても質問され、ケモカインの中和抗体や受容体拮抗剤が放射線肺臓炎や肺線維症の治療の一つとなりうる可能性があるが、今後の検討課題であると回答された。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき課題を残しているものの、肺の線維化過程においてCCL22、CCL17が関与することを初めて明らかにした点で、価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
外科学 小林 絃一 病理学 岡田 保典
病理学 坂元 亨宇
学力確認担当者：北島 政樹、小林 絃一
審査委員長：小林 絃一

試問日：平成17年 2月14日

Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis.

(骨髄由来の血管新生細胞の腎臓内投与は、実験系糸球体腎炎の内皮障害とメサンギウム細胞の活性化を抑制する)

内村 英輝

内容の要旨

内皮前駆細胞を含むと考えられる骨髄単核細胞による血管新生療法が、閉塞性動脈硬化症およびBurger病患者の下肢虚血障害に有用であることが証明されている。この治療法が腎疾患に応用できるか否かは未だ明らかでない。そこで本研究では、実験腎炎モデル-Thy-1糸球体腎炎において培養骨髄単核細胞を腎動脈内に注入して、その効果を検討した。

(対象と方法)

6週齢の雌ルイスラットの尾静脈に、体重100gあたり250 μ gのモノクローナル抗体1-22-3を注射し、Thy-1糸球体腎炎ラットを作成した。内皮前駆細胞が育つ条件下で培養した骨髄単核細胞 $1.0 \pm 0.2 \times 10^6$ 個を、蛍光マーカーCM-Dilで標識した後PBSに溶解し計1 mlとし、抗体注射翌日のThy-1糸球体腎炎ラットの左腎動脈に選択的に注入し、6日後の左右の腎臓の形態を評価した。また、注入細胞がVEGFを産生するかを検討するため、骨髄単核細胞を採取し、培養4日間(採取直後)ならびに、培養6日目から9日目まで(注入時)の培養上清中VEGF濃度をELISA法で測定した。

(結果と考察)

培養骨髄単核細胞は、アセチルLDLを取り込み、かつBS-Iレクチン陽性であった。これらの性質はいずれも内皮前駆細胞に見られ、我々の培養条件下で内皮系への分化が誘導されている所見と考えられた。

抗体注射7日後のThy-1糸球体腎炎において糸球体内の内皮細胞は減少することが知られているが、骨髄細胞を注入された左腎では、右腎に比して内皮細胞減少の著しい抑制が認められた。それに加え、左腎ではメサンギウム細胞の活性化、増殖性変化、および糸球体内マクロファージの浸潤も抑制された。

CM-Dil陽性細胞は左腎の糸球体に分布したが、右腎には分布しなかった。糸球体内に取り込まれたCM-Dilラベル細胞の $16.5 \pm 1.2\%$ が、成熟した血管内皮細胞のマーカーであるRECA-1染色に対して陽性であった。

細胞移植による血管新生療法において、移植細胞が産生する内皮増殖因子が重要な役割をするという報告に基づき骨髄単核細胞のVEGF産生量を検討したが、採取直後の産生量は少量だが注入時には著明に増加することが分かった。

本実験で、培養骨髄単核細胞をThy-1糸球体腎炎ラットの腎動脈内に注入することにより、その内皮障害、メサンギウム細胞の活性化、増殖性変化、および炎症性変化を抑制することが出来た。これは、注入された培養骨髄単核細胞が糸球体内で内皮細胞として取り込まれたことや、糸球体内で産生された血管新生因子によって、培養骨髄単核細胞の腎保護効果が糸球体障害の過程で発揮された結果と推察された。

以上より、腎機能障害の進行に対して効果のある治療法が限られている現状において、今後、本実験の血管新生細胞療法が新しい治療法の一つとなり得ることが示された。

論文審査の要旨

骨髄単核細胞による血管新生療法の有用性が認められ、閉塞性動脈硬化症等において優れた効果が報告されているが、腎疾患の治療に有用か否かは明らかでない。そこで本研究では、ラットに抗胸腺抗体により糸球体腎炎を発生させ、この腎炎ラットにおいて内皮前駆細胞が育つ条件下で培養した骨髄単核細胞を注入し、腎炎の進展阻止効果を検討した。

$1.0 \pm 0.2 \times 10^6$ 個の培養骨髄単核細胞を腎炎ラットの左腎動脈より注入したところ、腎炎発症7日目の時点で、注入された左腎では右腎に比して内皮細胞の減少が有意に抑制され、メサンギウム細胞の活性化と増殖性変化の抑制および糸球体内へのマクロファージの浸潤も抑制された。糸球体に取り込まれた骨髄単核細胞はアセチルLDLを取り込み、かつBS-Iレクチン陽性であった。しかし腎組織の観察において、糸球体へ取り込まれた細胞数は1~2個であった。移植細胞の効果発現には、その細胞が産生する内皮増殖因子が重要と考えられていることから、骨髄単核細胞のVEGF産生量を別の培養実験で検討し、培養した骨髄細胞ではVEGFの産生量が著しく増加することを明らかにした。以上の結果から、腎炎ラットの腎動脈から注入した培養骨髄単核細胞は、糸球体内で内皮細胞として取り込まれ、VEGF等の産生によって糸球体障害の進展阻止効果を発揮すると結論した。

以上の研究に関してまず問題となったのが $1.0 \pm 0.2 \times 10^6$ 個の培養骨髄単核細胞を腎動脈から注入しても、組織学的観察で1つの糸球体に1~2個しか取り込まれていなかったことである。注入量を2~3倍量にしても取り込まれる細胞数には大きな変化がなく、しかし、明らかに腎炎の進行が阻止されたので、その後の実験はすべて $1.0 \pm 0.2 \times 10^6$ 個の細胞を注入して実験したとされた。糸球体へ取り込まれる骨髄単核細胞がわずかであるのにも関わらず、腎炎の進行が明らかに阻止された機序に関して議論がなされた。本研究者は、腎組織の観察は一断片で見ているので、一断片で1個でも糸球体全体では数個の細胞があり、そこから放出されるVEGF等の血管新生因子が重要な役割を果たして腎保護効果を発揮したと考えた。それを確認するためにVEGFを腎炎モデルの腎動脈に注入して、その阻止効果が観察されればよかったと助言された。また用いた抗胸腺抗体腎炎が、本研究のために妥当であったかも議論された。抗胸腺抗体腎炎はヒトの糸球体腎炎にきわめて類似したモデルであるが、軽い腎炎であり、抗体注射後1週間の時点で最も腎障害が深く、2週間後に腎障害が改善してくるモデルであることから、腎組織の観察時間が問題であるとされた。当研究者は、ヒトの腎炎に近いものとしてこのモデルを用い、腎組織の観察は病変の強い7日目に行ったとされた。

以上のように本研究において培養骨髄単核細胞の注入が腎炎の進行を阻止した機序は明らかでないが、新しい腎炎の治療を考える上で、大変興味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 内科学 池田 康夫
病理学 岡田 保典
学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成17年 2月26日

アンジオテンシンⅡ受容体遮断薬およびCa拮抗薬の慢性経口投与による 高血圧ラットの循環調節の線形性の低下と非線形性の亢進

大 波 敏 子

内容の要旨

生体における正常状態では循環調節の線形性が低く、非線形性が高いことが知られている。これまで著者の研究室では高血圧自然発症ラット (SHR) では、正常血圧ラット (WKY) に比べて神経性循環調節の線形性が高く、非線形性が低いことを報告してきた。そこで、本研究ではSHRにカンデサルタンとアムロジピンを14日間経口投与することより、腎交感神経活動 (RSNA) と血圧 (BP) およびRSNAと腎血流量 (RBF) の相関の線形性および非線形性がどのように変化するかを検討した。

(対象と方法)

動物は15週齢のSHRを用いた。(1) プロトコール1 ; SHRにカンデサルタン1 mg/kg/日 (n=13)、アムロジピン5 mg/kg/日 (n=7) またはvehicle (n=7) を2週間経口投与し、RSNAとBP、RSNAとRBFの相関の線形性、非線形性を比較した。(2) プロトコール2 ; アムロジピンがSHRの高い線形性を低下させると仮定すると、その機序としてNOの増加が考えられるため、SHRにアムロジピン5 mg/kg/日とL-NAME1.5mg/kg/日 (n=9) を2週間経口で同時投与し、RSNAとBP、RSNAとRBFの相関の線形性、非線形性をアムロジピン単独投与群 (n=7) と比較した。各薬剤を投与したSHRの血圧、心拍数、腎交感神経活動、腎血流量を無麻酔状態で同時に記録し、A/D変換器に取り込んだ。得られたデータを線形解析であるスペクトル解析により分析し、さらに伝達関数のコヒーレンスを求めた。また、非線形解析としては相互情報量を用いた。

(結果)

(1) カンデサルタン、アムロジピン投与群で有意なBP低下およびRBFの増加を認めた。RSNAはカンデサルタン群で有意に抑制されたが、アムロジピン群では有意には抑制されなかった。RSNAからBP、RSNAからRBFへの伝達関数のコヒーレンス (線形性) は、カンデサルタン群、アムロジピン群でvehicle群と比較して有意に低下し、相互情報量 (線形性と非線形性) は有意に増加した。

(2) アムロジピンとL-NAME同時投与群ではvehicle群と比べて有意な血圧上昇と腎交感神経活動の低下を認めた。また、RSNAからBP、RSNAからRBFへの伝達関数のコヒーレンスは、アムロジピン投与群と比較して有意に高値であった。さらに、RSNAとBP、RSNAとRBFの相互情報量はアムロジピン単独投与群と比較して有意に低値であった。

以上のことから、カンデサルタンとアムロジピン投与によりSHRの高い線形性が低下し、低い非線形性が増加することが示された。カンデサルタン投与群の線形性低下、非線形性亢進の機序として交感神経系の抑制およびレニン-アンジオテンシン系の抑制が考えられたが、アムロジピン投与群においては有意な交感神経活動の抑制を認めず、レニン-アンジオテンシン系を抑制しないことからその機序としてNOの増加の関与が示唆された。カンデサルタン、アムロジピンのように循環調節の線形性を低下させ、非線形性を亢進させる薬剤は、高血圧患者の不良な予後を改善することが期待される。

論文審査の要旨

高血圧自然発症ラット (SHR) では、対照のウイスター京都ラット (WKY) に比し神経性循環調節線形性が高く、非線形性が低いと考えられている。このようなSHRにおいて、腎交感神経活動 (RSNA) と血圧 (BP) およびRSNAと腎血流量 (RBF) の相関の線形性および非線形性を観察し、これらの関係がアンジオテンシンⅡ受容体阻害薬のカンデサルタン (Cad) とカルシウム拮抗薬のアムロジピン (Am) を投与した時にどのように変化するか検討し、これらの薬剤の高血圧治療における有用性を比較検討した。

SHRにおいて両薬剤ともBPの低下とRBFの増加をもたらした。その際、CadはRSNAを優位に抑制したが、Amは軽度の抑制にとどまった。RSNAからBP、RSNAからRBFへの伝達関数のコヒーレンスは、vehicle投与に比し、両薬剤投与で有意に低下し、相互情報量は増加した。Amの単独投与とAmと一酸化窒素 (NO) の阻害薬であるL-NAMEの併用投与とを比較すると、Amの単独投与時に線形性が低下し、非線形性が増加した効果が、L-NAMEの投与で抑えられてしまった。以上の結果から、両薬剤ともSHRの高い線形性を低下させ、低い非線形性を増加させることが明らかにされた。その際、Cadレニン・アンジオテンシン系と交感神経系の抑制により、Amは降圧とともにNOを増加させてこのような効果を呈していると結論した。

このような論文に対し、まず循環制御に関するこのような研究において、線形性や非線形性という用語を用いることでかえって解り難くしている可能性があると考えられた。さらにこのような実験システムにおいてARBのような複雑な作用機序の薬剤でなく、作用機序が簡単な薬剤で十分に検討した上で、今回のような薬剤の検討をすべきであったと助言された。

次に多くの臨床研究成績から推測し、Cadに比しAmの効果がかなり劣ると考えられたが、本研究では交感神経活動を低下させる傾向を示すなど、Amが良好な効果を示したことが注目された。本研究者はAmによるNOの増加効果に注目したが、SHRにNO阻害薬であるL-NAMEを投与すると血圧が上昇すること、Amの投与で線形性の低下と非線形性の増加がみられたが、この効果がL-NAMEの投与で消失したことから、NOの何らかの関与があることは確かであるが、Amの効果に関してはさらに検討が必要であるとされた。

本論文は学位申請論文であるが、そのまとめ方や論文の書き方が練れていない部分があり、ラットの実験条件や本研究で重要な位置を占めるNOの役割などに関して、記述をしっかりとらせる必要があるとされた。

以上のように本論文では、線形性や非線形性という一般的でない言葉が十分に説明されていなかったり、論文の書き方に問題が指摘されたが、代表的な2種の降圧薬の効果を循環制御という新しい角度から検討した点で、この領域で価値ある研究と評価された。

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

試問日: 平成17年 2月28日

EFFECT OF NUMBER OF FASCICLE ON AXONAL REGENERATION IN CABLE GRAFTS

(Cable Graftにおける移植神経片数が軸索再生に及ぼす影響)

奥山 訓子

内容の要旨

【目的】臨床における末梢神経欠損の再建では、宿主神経とほぼ同径のcable graftを作成して移植することが多い。しかし移植神経片を利用した神経再生の様式は実験的に明らかにされておらず、再生神経の誘導に必要な移植神経片の太さについては、いまだ十分な検討がなされていない。本研究の目的は、動物モデルを用いて断面積の異なるcable graftの神経誘導能を比較検討することである。

【材料・方法】Wistarラットの切断した後脛骨神経に、20mmの腓腹神経を移植した(実験モデルA)。移植神経片の数により、5本群、3本群(宿主神経とほぼ同径)、1本群の3群を設定した。移植後16週で、移植神経より末梢、移植部中央、近位の3か所で横断切片を作成し、光学顕微鏡を用いて軸索数と軸索密度、断面積を計測し組織形態学的評価を行った。経時的歩行解析による機能回復度評価も行った。また、シリコンチューブで移植神経片全長を被覆したモデルB、シリコンチューブを介し接合したモデルCを作成して同様に3群について検討し、接合部における縫合操作の軸索再生への影響を評価した。

【結果】全個体で移植部・末梢ともに大径の再生有髄軸索がみられた。移植神経片の間隙にも有髄軸索が観察された。モデルB、Cでの3群間の軸索数、密度に有意差はなく、縫合操作の影響はないと考えた。実験モデルAにおける移植部での軸索数(平均±SD本)は、5本群、3本群、1本群でそれぞれ10795±4430、8953±4428、5089±2212であり、3本群、5本群で有意に多くの軸索が観察された。末梢部では4226±1870、4717±3252、3447±2992と、3群間で有意差を認めなかった。軸索密度では、移植部、末梢部ともに3群間に有意差を認めなかった。移植部での移植神経片断面積(mm²)は5本群、3本群、1本群でそれぞれ、0.23±0.16、0.13±0.04、0.07±0.03と、3本群、5本群が有意に大きかった。機能回復度も全経過を通じて3群間に有意差はなかった。

【考察】本研究で、小さい断面積の1本群が3、5本群に遜色ない軸索再生能を有することが明らかとなった。これは移植神経片間隙に観察された再生軸索が末梢の宿主神経に誘導され有効に利用されたことによると考えた。また、採取時の断面積比が移植時の1:3:5に対し1:2:3となったことから、小さい径のcable graftでは移植神経片が径を大きくして、より多くの再生軸索を受け入れたことも関与していると考えた。

【結語】宿主より断面積の小さいcable graftが、同径以上のものに匹敵する機能的軸索再生を誘導できることが明らかとなった。

論文審査の要旨

臨床における末梢神経欠損の再建では、一般に宿主神経とほぼ同径の神経束移植(cable graft)が行われているが、移植神経片を利用して軸索が再生する機序は明らかではない。本研究では、動物モデルを用いて断面積の異なるcable graftの神経誘導能を比較検討した。Wistarラットの切断した後脛骨神経に腓腹神経を移植し、移植神経片の数により5本群、3本群(宿主とほぼ同径)、1本群の3群を設定した。移植後16週で、移植神経より遠位、移植部中央、近位の3か所で横断切片を作製し、光学顕微鏡を用いて軸索数と軸索密度、断面積を計測し組織形態学的評価を行った。経時的歩行解析による機能回復度評価も行った。また、シリコンチューブを介して接合したモデルを用いて接合部における縫合操作の軸索再生への影響を除外できることを確認した。移植部、末梢部ともに大径の再生有髄軸索が観察され、移植神経片の間隙にも有髄軸索が観察された。移植部での軸索数は3本群、5本群で有意に多く、末梢部では3群間で有意差を認めなかった。軸索密度には移植部、末梢部ともに3群間に有意差を認めなかった。移植部での移植神経片断面積は3本群、5本群が有意に大きかったが、断面積比は1本群:3本群:5本群で1:2:3と不均等な拡大傾向を示した。全経過を通じ機能回復度に3群間の有意差はなかった。小さい断面積の1本群が3、5本群に遜色ない軸索再生を誘導し得たのは、移植神経片間隙に観察された再生軸索が末梢の宿主神経に誘導され有効に利用されたこと、小さい径のcable graftで移植神経片が径を大きくしてより多くの再生軸索を受け入れたことが関与していると考えた。以上より、宿主より断面積の小さいcable graftが、同径以上のものに匹敵する機能的軸索再生を誘導できることが示唆された。

審査では、まず間隙に再生した軸索と移植神経片内の軸索の質的な差異につき質問された。それに対して末梢に誘導された軸索は均一であり両者に差異はないと回答がなされた。また、軸索の径を増やす成分について質問がなされ、主な成分は軸索であるとの回答がなされた。さらに移植神経片間隙の基質成分について質問がなされ、今後の確認を要すると示唆を受けた。また、逆行性のラベリングやGFP発現ラットを用いて再生軸索の由来を明らかにすべく更なる検証を要すること、伝導速度など電気生理学的検証の裏づけを行うこと、実験個体数を増やし統計学的有意差に確実性をもたせることなど、今後の課題について示唆を受けた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点をのこしているものの、細いcable graftが同じ径以上のcableに匹敵する軸索再生を誘導する可能性を示し、今後臨床応用が期待されるという点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
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17年 2月 9日

Relation between climacteric symptoms and ovarian hypofunction in middle-aged and older Japanese women.

(本邦中高年婦人の不定愁訴の実態と卵巣機能低下との関連についての検討)

春日 美智子

内容の要旨

(緒言) 更年期障害とは、欧米では卵巣機能低下により出現する諸症状を主体として認識されているが、本邦では「更年期に現れる多種多様の症候群で、器質的変化に相応しない自律神経失調症を中心とした不定愁訴を主訴とする症候群」と定義されている。このように更年期障害の概念は地域によって違いが存在し、統一した診断基準が存在しないのが現状であるが、本邦のみならず世界的にも更年期婦人に出現する諸症状の実態についてほとんど検討されていない。本研究では本邦中高年婦人にみられる不定愁訴の実態とその特徴について解明する目的で、慶應義塾大学病院産婦人科外来に併設されている更年期専門外来受診者を対象に調査を行い、各不定愁訴の詳細と自然閉経を中心とした卵巣機能低下との関連性について検討した。

(対象と方法) 1993年から1998年の6年間における慶應義塾大学病院産婦人科更年期専門外来受診者のうち40歳以上60歳未満の1069例〔50.2±4.7歳(平均年齢±標準偏差)〕を対象とした。更年期不定愁訴の客観的評価法であるKuppermanの更年期指数を基に作成された慶應式調査票を用いて記入方式のアンケート調査を行った。回収された調査表から各症状における有症率と重症率を算出して評価した。卵巣機能は血清卵胞刺激ホルモンおよびエストラジオール濃度を測定し評価した。さらに対象を閉経前期、閉経周期、閉経早期、閉経後期の4群に分類し比較検討した。

(結果) 解析の結果、以下の事実を明らかにした。有症率は高値の順に「疲れやすい」、「肩こり」、「もの忘れ」、「神経質」、「発汗」であり、重症率は高値の順に「肩こり」、「疲れやすい」、「発汗」、「手足の冷え」、「神経質」であった。これらの症状と比較して「ほてり」、「イライラ」、「不眠」は有症率および重症率のいずれも高値を示さなかった。女性ホルモン低下に起因する「ほてり」、「不眠」は、閉経前に比し閉経周囲や閉経後の有症率が有意に高値であった。「寝乾燥感」は閉経前に比し閉経後の有症率が有意に高値であった。「ほてり」、「寝乾燥感」における有症率は、いずれも卵巣機能低下群の方が卵巣機能群より有意に高値であった。

(結論) 本邦中高年婦人において「ほてり」、「発汗」、「不眠」の各症状は、欧米と異なり最頻度に出現する症状ではないことを明らかにした。また、「ほてり」、「寝乾燥感」は女性ホルモン低下に密接に関連した症状であることを実証した。

本研究により、日本人女性における更年期不定愁訴の実態の一部が解明され、日本と欧米との間に更年期における症状出現傾向に差異が存在する可能性が示唆された。

論文審査の要旨

更年期障害の概念は、日本と欧米で異なるため統一した診断基準が存在せず、また世界的にも更年期女性に出現する症状の実態について詳細には検討されていない。本研究では、更年期障害の実態を明らかにする目的で、慶應義塾大学病院産婦人科更年期外来受診者を対象として、慶應式調査票を用いて不定愁訴の実態(有症率と重症率)およびその症状群の自然閉経による卵巣機能低下との関連を検討した。

審査では、まず慶應式調査票の20症状40項目が、細分化されすぎており、患者の協力を得にくいのではないかと指摘がなされたが、更年期女性の不定愁訴を幅広く検討するためには40項目が必要と考え、未記入部分などについては問診で補っているとの回答がなされた。次に検討課題として、これらの諸症状を原因別に性ホルモン低下による症状、自律神経失調由来の症状、うつ傾向などの精神神経症状などに分けて検討すべきではないかと指摘がなされた。その際、自律神経失調に対する検査法として血圧や脈圧の変動測定などは簡便でありかつ客観的な評価につながるものであろうとの助言がなされた。また自律神経症状の比較対象として中高年男性の検討も行うべきとも提案された。それに対して、今後このような客観的な評価も加えての調査研究を考えるべきであると回答がなされた。また本研究では、更年期外来受診者が対象であったことから、「疲れやすい」などの有症率が高かったのは当然の帰結とも考えられ、問題にすべきは有症率よりは重症率ではないかと指摘がなされた。そして対象者に各種病前性格テストを施行することにより、更年期外来受診者の性格傾向が明確になるのではないかと提案がなされた。これに対してこれまでも当外来では、自己抑うつ評定法(SDS)を用いて、抑うつ傾向の評価は施行しており、半数以上の患者が抑うつ傾向を示しているが、その中で精神科受診の必要性を認めた症例については、当外来より依頼しているとの回答がなされた。さらに更年期障害の各症状に対するホルモン補充療法の有効性に関する質問がなされた。これに対して、ホルモン補充療法を施行することにより比較的早期に改善する症状は、「ほてり」「発汗」などの血管運動神経障害様症状や睡眠障害であり、緩徐に改善する症状として、「手足のしびれ」などの知覚障害様症状があげられると回答がなされた。反対にホルモンが無効な症状は、「疲れやすい」「心悸亢進」であるとの回答もなされた。最後に更年期症状の発現には、血清エストロゲンレベルのみならず、エストロゲン受容体の遺伝子多型、HLAタイプあるいはABO式などの血液型を介しての遺伝との関連も存在するのではないかと指摘があり、今後検討すべき課題とされた。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題はいくつかあるものの、本邦中高年婦人の不定愁訴の実態の一部を明らかにし、卵巣機能低下と関連する症状と関連が薄い症状とを明確にした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
精神神経科学 鹿島 晴雄 内科学 猿田 享男
内科学 鈴木 則宏
学力確認担当者: 北島 政樹、鹿島 晴雄
審査委員長: 鹿島 晴雄
研究指導者: 野澤 志明 (産婦人科学)

試問日: 平成17年 2月22日

若年成人肥満者のmetabolic syndromeにおよぼす年齢、肥満度、 身体的フィットネスの影響、生活習慣修正による減量の効用

勝川 史憲

内容の要旨

Metabolic syndrome (MS) は、耐糖能異常、インスリン抵抗性、脂質代謝異常、高血圧症などの冠疾患危険因子が集積した病態で、近年、WHOおよび米国のNational Cholesterol Education Program (NCEP) より、それぞれ独自の診断基準が発表されている。本研究は、中高年者や小児に比べて検討されることの少ない若年成人に注目し、この年齢層の肥満者のMSの病態と減量による治療効果を検討することを目的とした。

対象は、大学病院肥満外来を受診した18~39歳の肥満者550名(男性395名、女性155名)である。血液指標(血糖、インスリン、中性脂肪、HDL-コレステロール)、血圧、臍高部CTスキャンでの内臓脂肪断面積を用い、WHO、NCEPの診断基準にもとづき、MSを構成する各コンポーネントのうち該当するもの数、MSの有無を評価した。そして、1) 全例でBMI、年齢、性差のおよぼす影響について断面的検討を行った。また、2) 身体活動量低下の影響について、18~23歳の男性127名で、身体的フィットネスの指標であるピーク酸素摂取量(peakVO₂/wt)を用いて断面的に検討した。さらに、3) 89名で、食事と身体活動の生活習慣修正を指導し、1.5年後に再評価し、減量の効果について検討した。

その結果、以下のことが明らかとなった。1) 若年成人肥満者の代謝面の特徴として、高インスリン血症を高頻度に認め、耐糖能異常よりも早期に脂質代謝異常、高血圧症が発現していた。年齢が10歳、あるいはBMIが5高い場合のMSのコンポーネントの数の増加は0.4~0.6、MSのオッズ比は2~3.2であった。年齢、BMIに比べて性差の影響は小さかった。2) PeakVO₂/wtは体重とは独立してMSのリスクの減少と関連していた。PeakVO₂/wtが5ml/kg/min高い場合のMSのコンポーネントの数の減少は0.3、MSのオッズ比は0.7~0.5だった。3) 生活習慣修正による減量の程度に応じて、各種代謝指標の改善を認めた。10%程度の軽度の減量でも、内臓脂肪面積は33%減少し、多くの代謝指標は有意に改善した。また、MSの頻度は、WHOの基準で52から21%、NCEPの基準で41から16%へと大きく減少した。減量によるMSのリスクの減少効果は、断面的検討から予測されるよりも大きかった。

結論として、これらの若年肥満者のMSのリスクの改善には、10%程度の軽度の減量でも(体脂肪が大きく減少し)有効であることが、今回の検討から示唆された。若年肥満者の多くは体重が増加傾向にあり、いったん確立した肥満の治療が困難なことを考慮すると、軽度の減量をめざした、生活習慣修正による早期からの一次予防が重要と考えられた。

論文審査の要旨

近年、肥満、インスリン抵抗性、耐糖能異常、脂質代謝異常および高血圧症などが集積した病態であるmetabolic syndrome (MS) が急速に増加してきている。このMSに関して、若年成人を対象とした研究は少なく、若年成人の肥満者にどの程度MSが存在し、減量による治療効果がどの程度あるのか未だ明らかでない。そこで本研究では、18歳~39歳の肥満者(男性395名、女性155名)を対象とし、MSの有無を評価するとともに、1部のものでは1.5年間にわたる生活習慣の修正効果を検討した。

その結果、若年成人肥満者では、高インスリン血症を特徴的に認め、耐糖能異常よりも早期に脂質代謝異常および高血圧症を認めること、断面的研究で、年齢が10歳あるいはBMIが5高い場合には、MSのコンポーネント数は0.4ないし0.6増加したが、性差の影響は少ないこと、身体的フィットネスの指標であるピーク酸素摂取量は、体重とは独立してMSのリスクの減少と関連していること、生活習慣の修正による減量の程度に応じて各代謝指標が改善し、その際、MSのコンポーネント数の減少は断面的検討から予測されるよりも大きいこと、および~10%程度の減量でも体脂肪が大きく減少し、大変有効であると結論した。

このような研究に関して、まず年齢およびBMIに比し、性差の影響が少なかったことが注目された。この年齢の女性では、皮下脂肪が多く、内臓脂肪は男性に比して有意に少ないことから、リスクの少ない肥満と考えられていたが、本研究では予測に反し、男性と比較してMSへの影響には有意差がみられず、その理由に関しては今後の検討課題とされた。次に、MSIに關与する諸症状に關して、個々の症状に關してリスクの重みづけができれば、予後予測に一層有用ではないかとの助言があり、この点についても今後の検討課題とされた。

MSの診断基準に關して、本研究ではWHOの糖尿病のConsultationおよびNCEP ATPⅢの基準に基づいたが、インスリン抵抗性の診断法に問題もあり、本研究のように多数例での検討成績があれば、日本としてインスリン抵抗性を含め、MSの診断基準が作成されるべきではないかとの助言があった。またMSで中心的役割を果たす中性脂肪はアルコール摂取量より強く影響されることから、本研究でアルコール摂取量に關しても調査されるべきであったとされた。さらにMSを呈する患者では脂肪肝を有することが多いことから、MSにおける脂肪肝の位置づけに關しては今後検討すべき重要な課題とされた。

以上のほか、論文中の語句が統一されていない点や用いた統計法に問題があることも指摘された。それらの訂正と学位申請論文としてその基本に沿って書き直すことが指示されたが、研究は長年にわたる肥満に対する身体的フィットネスの影響を検討したきわめて貴重な研究であり、肥満研究の進歩に大きく貢献する研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
衛生学公衆衛生学 大前 和幸 内科学 小川 聡
内科学 日比 紀文
学力確認担当者: 北島 政樹、大前 和幸
審査委員長: 大前 和幸

試問日: 平成17年 2月25日

Effect of fasudil on Rho-kinase and nephropathy in subtotaly nephrectomized spontaneously hypertensive rats.

(部分腎摘高血圧自然発症ラットにおけるRhoキナーゼと腎障害に対するファスジルの効果)

神田 武志

内容の要旨

低分子量GTP結合蛋白質であるRhoとその標的分子であるRhoキナーゼは血管の収縮弛緩に関与しているのみならず、多くの標的分子の活性化を介して細胞増殖など多彩な細胞機能の調節に関与し、血管障害において重要な役割を果たすことが知られるようになった。一方、腎障害進展におけるRhoキナーゼの役割についてはいまだ十分な検討が行われていない。本研究では高血圧を伴う慢性腎障害の腎障害進展機構においてRhoキナーゼの役割を検討した。

(対象と方法)

6週令の雄高血圧自然発症ラット(SHR)に対し部分腎摘を施行し、高血圧合併慢性腎障害モデルを作成した。無処置SHR群、部分腎摘SHR群とRhoキナーゼ阻害薬(ファスジル, 3mg/kg/日、腹腔内投与)投与群に分け、2週間毎に収縮期血圧・尿蛋白を測定し、ファスジル投与後6週の時点でRhoキナーゼの活性ならびに腎組織の評価を行った。

(結果と考察)

腎障害作成8週目において、無処置SHR群に比し部分腎摘SHR群において収縮期血圧の上昇(217 ± 14 mmHg, $n=8$)を示した。ファスジル投与により有意な降圧は認めなかった(208 ± 8 mmHg, $n=8$, $p>0.1$)。一方、蛋白尿は部分腎摘SHR群(124 ± 16 mg/日, $n=8$)に比しファスジル投与群(79 ± 12 mg/日, $n=8$)で減少を示した。腎組織に対する影響では、腎障害作成により発現した細動脈硬化病変、糸球体メサンジウム細胞の増殖亢進、ならびに尿細管の萎縮、間質の炎症性変化が、ファスジルにより有意に改善した。さらに、部分腎摘により糸球体ならびに尿細管間質のPCNA陽性細胞、ED-1陽性細胞は増加したが、この変化はファスジル慢性投与により抑制された。腎組織におけるRhoキナーゼの発現ならびに活性をウエスタンブロッティング法により検討したところ、同週令のSHRに比し部分腎摘により腎皮質のRhoキナーゼの蛋白発現、活性はともに増加し、ファスジル投与によりRhoキナーゼ活性は有意に抑制された。さらにファスジルはサイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白であるp27^{Kip1}の発現を糸球体ならびに尿細管間質において亢進させた。

以上より、腎障害の進展にRhoキナーゼの活性亢進が関与することが示唆された。さらに、p27^{Kip1}の発現亢進により細胞増殖を抑制し、マクロファージの浸潤を抑制することから、Rhoキナーゼの抑制が腎障害の進展機序に対し治療手段のひとつになり得ることが示唆された。

論文審査の要旨

低分子量GTP結合蛋白質であるRhoとその標的分子であるRhoキナーゼは、血管の収縮弛緩や細胞増殖などに関与し、血管障害において重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。このRhoキナーゼの腎障害の進展における役割は未だ明らかでないことから、本研究では腎障害における役割を検討した。

腎障害モデルとして部分腎摘した高血圧自然発症ラットを用い、Rhoキナーゼの腎組織における発現および活性を検討するとともに、ファスジルによる腎保護効果およびその機序について研究した。この腎障害モデルにおいて、腎皮質においてRhoキナーゼの蛋白発現および活性ともに増加し、この増加はファスジル投与により抑制されることが明らかにされた。さらにファスジルは、サイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白であるp27^{Kip1}の発現を糸球体および尿細管の間質において亢進させた。

以上の成績から、高血圧を呈する腎障害モデルにおいて、Rhoキナーゼの活性亢進がその進展に関与すること、さらにRhoキナーゼ阻害薬であるファスジルは、p27^{Kip1}の発現亢進により細胞増殖を抑制し、マクロファージの浸潤を抑制することにより、腎障害の進展阻止をもたらすと結論した。

このような研究に関して、まずファスジル投与による腎障害の改善部位が糸球体よりも、尿細管・間質および血管の方で著明であることが注目された。当研究者は本研究では血圧を低下させない量のファスジルを用いたので、糸球体よりも間質の方の改善が著明であったと考えた。また血管障害の改善も、細動脈よりも太い動脈の方で明らかであったとされた。次に、このモデルにおける腎障害の進行においてRhoキナーゼの活性亢進が生じる機序について議論があり、アンジオテンシンIIが重要な役割を果たしているだけでなく、動脈に対する圧の影響も強く関与しているとされた。この腎障害モデルに対してアンジオテンシンII受容体拮抗薬が、蛋白尿の減少および腎の組織障害の改善をもたらすが、その効果とファスジル投与によるRhoキナーゼの活性抑制に基づく効果に差があるとされた。ファスジルの投与によりp27^{Kip1}の発現亢進が生じ、それが細胞増殖の抑制とマクロファージの浸潤抑制をもたらすことが、ファスジルの腎保護作用の重要な機序とされた。なお今回の研究ではマクロファージから放出される諸種サイトカインに関する検討はなされておらず、その面での検討もあればなおよかったとされた。

今回の研究は腎障害モデル動物での検討であったが、ヒトへの応用に関しても議論があった。すでに脳梗塞や狭心症に対して臨床試験が始まっており、将来ファスジルに類似した薬剤が腎障害の進展阻止薬として用いられる可能性があると考えられた。

以上のように本研究は、腎での役割が明らかでなかったRhoキナーゼの腎障害の進展に果たす役割を明らかにし、新しい治療法を考える上で有用な論文とされた。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
泌尿器科学 村井 勝 内科学 小川 聡
病理学 岡田 保典
学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成17年 2月15日

Hyperoxia-induced emphysematous changes in subacute phase of endotoxin-induced lung injury in rats.

(ラットのエンドトキシン誘導性亜急性肺傷害における高濃度酸素誘導性気腫性変化)

河野 光智

内容の要旨

エンドトキシンをラットに10日間持続静注し同時に高濃度酸素 (FiO₂=0.75) に曝露するエンドトキシン誘導性亜急性肺傷害のモデルを作成した。肺胞構造の変化と肺コラーゲンの代謝、コラゲナーゼ活性とゼラチナーゼ活性、およびマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP-2とMMP-9) の活性化に及ぼす高濃度酸素の影響について評価した。エンドトキシン投与の群にはLPS 10mg/kgをボラス注射した後、500μg/kg/dayの速度で持続投与し、生理食塩水投与の群には生理食塩水 1 mlをボラス注射した後、生理食塩水を12μl/dayの速度で投与した。以下の4群を作成した。1) コントロール群 (生理食塩水+室内気)、2) エンドトキシン単独群 (LPS+室内気)、3) エンドトキシン+高濃度酸素群 (LPS+75%酸素)、4) 高濃度酸素単独群 (生理食塩水+室内気)。4群は10日後に犠牲死させた。肺血管透過性の指標である血漿中アルブミン濃度に対する気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中アルブミン濃度 (albumin B/P ratio) はエンドトキシン+高濃度酸素群で有意に増加し、コントロール群の4倍であった。マクロファージや好中球の肺への集積も有意に増加した。高濃度酸素によりエンドトキシン誘導性亜急性肺傷害はさらに悪化することが示唆された。組織学的には高濃度酸素群では気腫性変化を認め、エンドトキシン群では肺胞隔壁の肥厚とコラーゲンの肺胞壁への沈着を認めた。肺胞の気腫性破壊はエンドトキシン+高濃度酸素群で最も著明で、単位体積あたりの肺胞表面積もエンドトキシン+高濃度酸素群において有意に低下していた。エンドトキシンは肺組織中コラーゲン含有量を増加させ、一方、高濃度酸素はコラーゲンを減少させていた。エンドトキシン+高濃度酸素群のコラーゲン量はエンドトキシン群と高濃度酸素群との中間値を示した。BAL液中のコラゲナーゼ活性とゼラチナーゼ活性は同様の傾向を示し、高濃度酸素群およびエンドトキシン+高濃度酸素群で有意に上昇していた。ゼラチンザイモグラフィではコントロール以外の3群で不活型MMP-9と不活型MMP-2が大きなバンドとして認められた。不活型MMP-9はエンドトキシン群とエンドトキシン+高濃度酸素群で最も強いバンドを示し、さらにこの2群では活性型MMP-9のバンドも認めた。一方、活性型MMP-2のバンドは高濃度酸素群とエンドトキシン+高濃度酸素群で検出された。MMP-9の活性化率はエンドトキシン群とエンドトキシン+高濃度酸素群で有意に上昇していた。MMP-2の活性化率は高濃度酸素群とエンドトキシン+高濃度酸素群とで上昇した。高濃度酸素によって活性化されたコラゲナーゼとMMP-2が、MMP-9とともに作用して肺胞基底膜を破壊し、肺胞壁を裏打ちするコラーゲンの分解に大きな役割を果たしたと考えられた。

論文審査の要旨

亜急性期或いは慢性期肺傷害はその臨床的重要性にもかかわらず、これまで動物実験はほとんど知られていなかった。敗血症性肺傷害において働きが重要と考えられるグラム陰性桿菌表面のエンドトキシンと、肺毒性にもかかわらず呼吸不全の治療に不可欠な高濃度酸素をラットに同時に10日間投与する亜急性肺傷害のモデルを作成した。汎発性腹膜炎や膿胸などの感染症が重症化、遷延して敗血症となり、肺傷害、呼吸不全を併発し、高濃度酸素治療が行われた状況を想定した。

長期の高濃度酸素投与はエンドトキシン惹起性肺傷害亜急性期において肺胞毛細管バリアーを持続的に傷害し、肺胞に気腫性変化を生じさせることが示唆された。高濃度酸素によって活性化されたコラゲナーゼとMMP-2が、MMP-9とともに作用して肺胞基底膜を破壊し、肺胞壁を裏打ちするコラーゲンの分解に大きな役割を果たしていることが示された。

審査ではまず、コラゼナーゼ活性、ゼラチナーゼ活性、MMP-2およびMMP-9の活性上昇がそれぞれ高濃度酸素によるものなのか、エンドトキシンによるものなのか、違いについて説明が不十分であることが指摘された。また、統計学的検出においてコントロール群との有意差のみ示されていることに関し、エンドトキシン群とエンドトキシン+高濃度酸素群との有意差が示されるべきであることが助言された。高濃度酸素下での肺血流の変化について質問され、炎症性細胞から供給される内因性活性酸素が肺においてどのように働くのかを検討するのによりモデルであることが評価され、将来の検討事項とすべきことが助言された。酸素濃度がFiO₂のみで示されていることに関し、PaO₂が実際は高くなっている可能性があり、PaO₂の上昇により網内系などの他臓器において炎症細胞が活性化され、肺傷害に関与している可能性が指摘された。臨床的にも問題であるPaCO₂も測定すべきであることが助言された。ラットでは気道内圧が想像以上に高くなっている可能性があり、このために気腫性変化が生じる可能性も指摘された。一回換気量や呼吸数も測定すべきであることが助言された。エンドトキシンと高濃度酸素がコラーゲン代謝に関し相反する影響を及ぼしていることに関し、本実験では酸素濃度75%と設定されて気腫性変化が生じているが、設定を下げることでプロテアーゼのバランスをはかり、エンドトキシンによる肺傷害を相殺することが可能か否かの質問がなされた。酸素濃度、投与期間のほか様々な要素が関与するため非常に難しいことではあるが、将来の検討事項とする旨返答された。

以上、本研究には今後なお検討すべき課題が残るものの、エンドトキシン惹起性亜急性肺傷害における高濃度酸素のもたらす悪影響を示し、コラゲナーゼ、MMP-2およびMMP-9の関与を示した点において、意義ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 小林 紘一
臨床麻酔学 武田 純三 医化学 末松 誠
内科学 小川 聡
学力確認担当者: 北島 政樹、武田 純三
審査委員長: 武田 純三

試問日: 平成17年 1月11日

1 型糖尿病における標的抗原としての Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) の検討

児 玉 桂 一

内容の要旨

1 型糖尿病はリンパ球を介した膵β細胞の自己免疫学的破壊によってインスリン分泌能が枯渇することによって生じる。これまで1 型糖尿病発症の原因となる抗原として膵β細胞内のグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) やインスリン (B鎖9-23) などが候補として研究されてきたが、未だその確定には至っていない。そこで、著者はリンパ球の初期の感作が膵β細胞外で起こり、これが膵島へのリンパ球浸潤 (膵島炎) と膵β細胞破壊の原因となる可能性を考え、その候補として肝臓で主に産生されるIGF-1に着目した。

【対象と方法】(実験1) 4 週齢の雌NODマウス (1 型糖尿病モデル動物) にIGF-1、GAD、インスリン (12.5μg/匹) をそれぞれ免疫賦活剤と混和して皮下注射 (対照群は免疫賦活剤のみ)、36週齢まで糖尿病発症率を観察した。36週齢で糖尿病未発症マウスから膵組織を摘出、膵島炎の程度を評価した。また、一部が糖尿病の発症が明らかになる前の8 週齢で屠殺され、脾細胞と膵組織が分離され、脾細胞のIGF-1、GAD、インスリン各刺激に対するサイトカイン反応 (IFN-γ (Th1タイプ) とIL-4 (Th2タイプ) のどちらを分泌するリンパ球が優位か) と膵組織におけるサイトカイン発現 (IFN-γ、IL-4) を検討した。(実験2) 次に、IGF-1のどの部位がエピトープであるか明らかにするためIGF-1をインスリンと相同性のある部分 (IGF-1 8-23) とない部分 (IGF-1 24-41、IGF-1 50-70) に分け、これらを実験1と同様にNODマウスに投与して糖尿病発症率、膵島炎、脾細胞のサイトカイン反応、膵組織のサイトカイン発現を評価した。

【結果と考察】(実験1) IGF-1投与群において糖尿病の発症が有意に抑制されていたが膵島炎の程度に有意差はなかった。脾細胞のサイトカイン反応では、GAD刺激に対するTh2タイプのサイトカイン反応がIGF-1投与群において誘導され、膵組織におけるサイトカイン発現でもIGF-1投与群においてTh2タイプのサイトカインの発現が優位であった。この結果は著者の仮説とは異なり、IGF-1の投与は自己免疫の反応過程を初期の段階で停止させるのではなく、他の膵島内抗原 (GAD) に対するTh2細胞を誘導することによって糖尿病の発症を抑制していると考えられた。(実験2) IGF-1 50-70投与群において糖尿病の発症が抑制され、GAD刺激に対してだけでなくインスリン刺激に対しても脾細胞のTh2タイプの反応が誘導され、膵組織においてもTh2優位の状態が認められ以上のことよりIGF-1全体のうち、特に50-70のペプチドが1 型糖尿病の標的抗原のひとつとして重要であることが示唆された。また、同時に1 型糖尿病の発症を抑制する治療法としてIGF-1 50-70の投与が有効である可能性が示された。

論文審査の要旨

1 型糖尿病の発症原因となる抗原として、膵β細胞内のグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD)、インスリンのほか、肝臓で産生されるInsulin-like Growth Factor (IGF-1) が注目されている。本研究は、IGF-1を1 型糖尿病のモデルマウスである雌のNODマウスに皮下注射し、糖尿病発症に及ぼす影響を検討した。

Whole IGF-1の皮下注射群では、GAD投与群やコントロール群に比べて糖尿病の発症率が有意に低値であった。IGF-1のどの部分が糖尿病の発症抑制に関与しているか明らかにするため、IGF-1を構成する3種類のペプチド -8-23、24-41および50-70-を皮下注射したところ、IGF-1 50-70の注射群で糖尿病の発症率が最も低値であった。IGF-1の3種類のペプチドを注射したマウスの脾細胞において、その抗原特異的的刺激に対するサイトカイン反応を検討したところ、IGF-1 50-70注射群でGAD、インスリン、IGF-1ペプチド刺激に対するTh2タイプのサイトカイン反応が誘導されることが明らかにされた。以上の結果から、IGF-1を構成するペプチドのうち、50-70のペプチドが1 型糖尿病の発症に関与する抗原として重要であり、同時に1 型糖尿病の発症を抑制する治療法として、IGF-1 50-70の投与が有効である可能性があるかと結論した。

このような研究に関して自己抗原としてなぜIGF-1に注目したかが議論された。これまでにIGF-1を頻回に注射した研究で、糖尿病の発症が抑制されたとする報告があったことから、IGF-1の効果を免疫学的に検討する事を計画したとされた。免疫学的面からの検討で、これまで1 型糖尿病の自己抗原としてGADおよびインスリンが注目されているので、本研究でもNDOマウスにGAD、インスリンおよびWhole IGF-1とを注射して、糖尿病の発症率および発症時期をみると、IGF-1注射群で糖尿病の発症時期がおそく、しかも発症率も低く、IGF-1が1 型糖尿病の発症と密接な関係にある事は確かであるとされた。

次にIGF-1を構成する3種類のペプチドに注目し、その中でインスリンとの相同性のないペプチドIGF-1 50-70が、糖尿病の発症防止に効果的であったことが議論された。本研究者は、このIGF-1 50-70のところはGADと相同性を有する部分があり、それが関係しているのではないかとされた。さらにIGF-1 50-70の効果はTh2細胞の活性化が関係しているとされたが、その理由についても議論があった。IGF-1 50-70の注射で、Th2優位のTリンパ球が誘導されることにより、IL-4、IL-10といったサイトカインが産生され、Th1細胞の機能を抑制してβ細胞の破壊を抑制していることは確かであるが、その機序の詳細な説明は今後の課題とされた。論文の作成上いくつかの問題点が指摘された。膵ラ氏島の病理観察では、対照と病変部位とを同じような部位で比較することや、考察をわかりやすく書くように指示が出された。研究内容は、1 型糖尿病の発症機構に関してIGF-1の役割を明らかにした点で、今後のこの領域の研究に役立つ論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 幸男
内科学 日比 紀文 病理学 岡田 保典
医化学 末松 誠
学力確認担当者: 北島 政樹、日比 紀文
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成17年 3月 1日

尋常性天疱瘡皮膚病変の画像解析による客観的病勢判定

小林 誠 一 郎

内容の要旨

天疱瘡 (pemphigus) は、表皮細胞の最も重要な接着機構であるデスマゾームを構成する膜蛋白に対して自己抗体が生じる自己免疫性水疱性疾患であり、臨床的に尋常性天疱瘡と落葉状天疱瘡に大別される。水疱発生のメカニズムは解明されたが、抗体産生を制御する治療方法については未だ不十分であり、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が依然として治療の主流である。個人の抗体産生量や抗体が認識するエピトープの違いも加わり、その治療法を、画一化することはできない。病勢・治療効果は主として病変範囲を観察する医師の主観によって判定されている。病勢判断をより客観的に定量することができれば治療法を標準化することも容易になる。また、症例間の客観的比較ができれば、治療効果の比較もできるようになる。そこで著者は、客観的な病勢判定法としてコンピュータを利用した病変面積の数値化を行い、病勢の検討を行った。

研究目的は、適切な画像解析を用いた病変定量により病勢を客観的に判定し、合わせてELISAによる血中抗体価の変動との比較を行うこととした。既存の臨床写真およびELISAによる抗体価のデータを使い病勢の判定するためには以下の検討が必要であった。皮膚病変は水疱・びらん・痂皮・色素沈着など多様であるため、明度のみの単純な画像認識では正確に病変抽出ができない。肉眼的判断に近い病変境界判定を行うため、赤色系の情報をCIE L*a*b*表色系とガウスフィルタおよび色差を用いて背部臨床写真から病変占有率を定量した。1993年から1998年までに慶應義塾大学病院皮膚科を受診した尋常性天疱瘡患者すべての臨床写真を検討し、最終的に5例の背部臨床写真を使用した。

その結果、色差13以上で明らかな赤色系皮膚病変のみが抽出されたが、約0.3%の誤差があり、占有率が小さいとその影響が大きかった。CIE表色系は、赤色系皮膚病変の活動性の評価に有用であると考えた。ELISAによるDsgI抗体価は病初期には病変面積と平行するが、治癒期には必ずしも平行しないと判断された。

論文審査の要旨

自己免疫性水疱性疾患である尋常性天疱瘡 (PV) に限らず皮膚病変の判定は主治医の主観に依存している。本研究では他覚的な皮膚病変判定を標準化することを最終目的としてコンピュータを利用したPV病変面積の数値化を行い、病勢との関連を検討した。慶應義塾大学病院を受診したPV患者の既存の臨床写真をCIE L*a*b*表色系とガウスフィルタおよび色差を用いて背部臨床写真から病変占有率を定量したところ、温度環境に左右されない病変面積抽出には色差13以上が適切と考えられた。占有率は約0.3%の誤差があり、値が小さいと誤差の影響が大きかった。CIE表色系は、赤色系皮膚病変の活動性評価に有用であると示唆された。またELISAによるDsgI抗体価は病初期には病変面積と平行するが、治癒期には必ずしも平行しないと判断された。

審査では、抽出病変にびらんの紅斑のみで病勢を判定できるのか、新生皮疹の数は病勢の判定に考慮しなくてよいのか質問があったが、重症度判定基準にあるように病勢については新生皮疹数も含めて総合的に判断するのが正しいこと、今回の抽出では新生時の赤色紅斑に関しては判定が可能と説明された。5年で5症例のみにしか検討材料とし得なかった点については、当疾患が稀少なうえに撮影条件の標準化が乏しいなかで使用できるものを選定しなくてはならなかったと回答された。標準化は、撮影時にスケールをいれること、局面に対してはパントモ撮影時のごとく機器を工夫すればよいとの助言があった。写真の色についての評価は、温度変化にともなう血流が変化し同一個人でも標準化は難しい点が指摘され、メラニン系と赤色系と一緒の評価は難しいのではないかと質問があったが、メラニン系は明度の情報に入るため除外できると回答された。色差7以上13未満における抽出病変は病勢の判定に意義はないのかについては、温度差により変動する範囲であるため除外したと回答された。背部の1~4%の病変の変化で病勢を把握できるのかについては全体の面積が確かに必要であり、数値としての客観化に意義があると回答された。また、誤差値を判断するにはN値が少ない点、Dsg抗体価と病勢の上昇期が相関するが数学的判定が必要である点などについて議論された。

以上のように、本研究は精度および機器に関して今後検討されるべき課題を残しているものの、皮膚病変の抽出および面積を既存の臨床写真から他覚的に判定する新しい手法であり、このような手法によって時系列比較も可能となることを示唆したものである。また、今後のデータの標準化における問題点を提起した点においても皮膚病変診断上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 皮膚科学 西川 武二

病理学 岡田 保典 放射線医学 栗林 幸夫

形成外科学 中島 龍夫

学力確認担当者：北島 政樹、岡田 保典

審査委員長：岡田 保典

試問日：平成17年 2月 7日

Pyk2 activation is integral to acid stimulation of sodium/hydrogen exchanger 3.

(酸による腎臓NHE-3活性化系に果たすPyk2の役割の検討)

佐藤 聡 一 郎

内容の要旨

生体の酸塩基平衡は恒常性を保たれており、アシドーシスでは種々の臓器が協調して細胞外のpHを正常化する方向に働く。中でも腎臓の役割は重要で、近位尿細管上皮細胞由来の培養細胞系OKP (opossum kidney P) ではsodium/hydrogen exchanger 3 (NHE-3) を介して細胞膜内外のNa⁺-H⁺交換がなされる。アシドーシスのOKP細胞では、c-Src、ERK (extracellular-regulated kinase) が活性化され、その下流で*c-fos*、*c-jun*、*junB*、*egr-1*の発現が増加して、結果としてNHE-3の活性化がおり、特にc-SrcはERKおよびNHE-3活性化に必要であることが分かっている。本研究の目的は、アシドーシスにおける細胞内情報伝達系でのPyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) が果たす役割を明らかにしようとするものである。

(方法)

酸性培養液に暴露したOKP細胞から免疫沈降法でPyk2を単離し、イムノブロットによりそのリン酸化を定量化し、酸刺激によるPyk2活性調節を検討した。Pyk2活性が阻害された系を検討するため、dominant negative (DN) Pyk2変異および、small interfering pyk2 RNAを発現させたOKP細胞を酸で刺激しNHE-3活性を観察した。次にOKP細胞から単離したPyk2を種々のpH条件のcell-free systemで反応させ、Pyk2の自己リン酸化および*in vitro*キナーゼ活性を観察した。活性化されたPyk2とc-Srcとの結合を検討するため、酸で刺激したOKP細胞を抗Pyk2抗体および抗Src抗体で共沈降し、イムノブロットを行った。c-Srcとの結合能を阻害させた変異pyk2を一過性に発現したOKP細胞を観察することにより、この結合がNHE-3活性化に必要なかどうかを検討した。DNPyk2発現OKP細胞のSrcキナーゼ活性を観察することで、Pyk2活性が酸によるSrc活性に必要なかどうかを検討した。

(結果と考察)

OKP細胞を酸で刺激すると、Pyk2は一過性にリン酸化をうけて活性化され、30秒後に最大となった。またPyk2とc-Srcとの結合も増加し、刺激後90秒に最大となった。cell-free systemでの観察では、酸性pH条件下でPyk2の自己リン酸化とPyk2キナーゼ活性化を認めた。さらに、Pyk2阻害系OKP細胞では、酸によるNHE-3活性化およびc-Srcキナーゼ活性化は阻害された。

以上から、本研究では、1) アシドーシスの腎近位尿細管細胞においてPyk2は一過性に活性化されること、2) Pyk2活性化はc-SrcおよびNHE-3活性化に必要であり特異的であること、3) cell-free systemでの観察から、Pyk2が他の因子に依存せず、pHセンサーとして働き、酸によるNHE-3活性制御系の細胞内伝達カスケードを開始する因子(イニシエータ)になりうることを示された。

論文審査の要旨

腎臓は酸塩基調節において重要な役割を果たしており、アシドーシスでは、近位尿細管細胞に存在するprotein-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) が、細胞内情報伝達にきわめて重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細は明らかでない。そこで腎臓の近位尿細管上皮細胞由来の培養細胞であるopossum kidney (OKP) 細胞を用いて、細胞内アシドーシスにおいてPyk2が酸で活性化されるか、活性化された場合にc-Srcキナーゼ活性化とNa⁺/H⁺交換体3型 (NHE-3) の活性化に特異的に重要であるのかなどを検討した。その結果、Pyk2の活性化は細胞内アシドーシスによって制御されていること、Pyk2の活性化は細胞内情報伝達因子であるc-SrcからNHE-3に至る経過において必要であること、さらにPyk2は細胞内で直ちにプロトン濃度を感知して活性化されており、細胞内pHセンサーとして、酸刺激に誘導される情報伝達機構の開始因子の候補であること等を明らかにした。

このような研究に関して、まずFAKチロシキナーゼ・ファミリーの中でPyk2に着目した理由が問われた。腎臓の近位尿細管細胞にかなり存在し、c-Srcの上流にあって酸により活性化されるという報告が出されたことから、Pyk2に注目したとされた。Pyk2の生体内における存在部位に関しても質疑があり、現在のところ腎臓のほか、中枢神経系や血液系の細胞さらに心血管系の細胞にも存在する事が判明してきたとされた。

最も注目された点は、OKP細胞内のPyk2がpH0.2というわずかな酸性化で、30秒間でリン酸化を受けて活性化されることである。この点がPyk2が酸刺激に誘導される情報伝達機構の開始因子の1つと考えられる点であるとされた。なおリン酸化による活性化機序の詳細な検討は今後の研究課題とされた。

このほかPyk2の酸による活性化がcell-free systemでみられ、そのリン酸化の増加の程度が細胞内での変化とかなり異なることも興味もたれた。この差は、細胞内のPyk2の周囲にはc-Srcが存在して活性化するために、cell-free systemのPyk2よりもなお自己リン酸化とその結果としてさらなる残基のリン酸化が起こりやすいためと考えた。Cell-free systemでのPyk2キナーゼ活性化はpHで制御され、またATP親和性の増加も関連づけられるが、Michaelis-Mentenの式によるKmの実験値が、実際のwhole cellでのATP濃度値と相違していることについて質疑があった。この点に関しては、*in vivo*と*in vitro*でのATPの局在や濃度が異なるためではないかとされた。さらにPyk2の構造上において、pHが感知される部位についても興味もたれたが、今後の検討課題とされた。

本研究は学位申請論文としてまとめられたが、その書き方にいくつかの問題点が指摘され、その訂正が求められたが、研究内容は、腎臓における酸塩基調節における細胞内pHセンサーの候補蛋白としてPyk2を明らかにした点で、大変重要な研究であると高く評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 幸男
医化学 末松 誠 泌尿器科学 村井 勝
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 3月 5日

The Influence of Platelets on the Promotion of Invasion by Tumor Cells and Inhibition by Antiplatelet Agents

(血小板による腫瘍細胞浸潤能促進作用と抗血小板剤の効果)

鈴木 慶一

内容の要旨

【目的】腫瘍細胞は血小板凝集を促進し、一方、活性化された血小板は腫瘍細胞の浸潤能に対して促進的に働くことが以前より指摘されてきた。そこで、血小板が腫瘍細胞と共存することで浸潤能が増強するメカニズムを、chemoinvasion assayおよびmatrix metalloprotease (MMP) 産生量の点から考察すべく以下の実験を計画した。さらに抗血小板剤が、血小板による腫瘍細胞浸潤能促進作用に対して抑制効果を持つかどうかについて検討した。

【方法】実験1：Chemoinvasion assayにより、血小板存在の有無による腫瘍細胞浸潤能の変化を観察した。腫瘍細胞はSW1990、SU86.86、Capan-2、BxPC-3、AsPC-1の5種のヒト膵癌株を用いた。腫瘍細胞のみ、腫瘍細胞+非活性化型血小板、腫瘍細胞+活性化型血小板の3群に分け、それぞれを共培養しマトリゲル内を移動した腫瘍細胞の数を測定した。実験2：血小板存在下で腫瘍細胞からのMMP-9産生量の増加をgelatin zymography法を用いて確認した。上記3種の共培養上清を用いて比較検討した。実験3：実験2で検出されたバンドがMMP-9であることを確認するためにWestern Blot法を行った。腫瘍細胞は実験1で最も浸潤能を促進したBxPC-3を用いた。実験4：抗血小板剤の浸潤能抑制作用を観察するため、血小板と腫瘍細胞との共培養にさらにprostacyclin、EPA製剤、cylostazolの3種の抗血小板剤を加えそれぞれ共培養し、実験1と同様にchemoinvasion assayを行った。実験5：さらに血小板、腫瘍細胞、cylostazolの共培養上清を用い、ELISA法により腫瘍細胞から産生されるMMP-9を定量した。

【結果】実験1：Chemoinvasion assayでは全ての腫瘍細胞で、血小板を加えた群は腫瘍細胞のみの群に比べ有意に浸潤細胞数が増加していた。実験2：Gelatin zymographyでは、全ての腫瘍細胞において血小板と共培養した上清の方が腫瘍細胞のみの上清よりMMP-9のバンドが高濃度に検出された。実験3：抗ヒトMMP-9抗体を用いて、検出されたバンドがMMP-9であることが確認された。実験4：EPA製剤、cylostazolを加えて共培養すると、これらの抗血小板剤非添加群より有意に浸潤細胞数は減少した。実験5：MMP-9の生産量はcylostazolを添加することによって有意に減少しており、抗血小板剤の濃度に依存する傾向を示した。

【結論】血小板がヒト膵癌細胞の浸潤能を促進し、これはMMP-9の分泌量が増加することが示唆された。さらに抗血小板剤の添加により、MMP-9の分泌量は減少し、浸潤能は低下した。膵癌性腫瘍の浸潤は抗血小板剤によって抑制される可能性が示唆された。

論文審査の要旨

血小板と腫瘍細胞との相互作用については以前から指摘され着目されていたが、その多くは腫瘍細胞によって血小板がいかに活性化されるかという点が問題とされていた。本研究では活性化血小板が腫瘍細胞に及ぼす影響に着目し、そのメカニズムの一つを解明した。さらに抗血小板剤による腫瘍細胞浸潤能抑制と旨う新しい側面を明らかにした。

審査ではまず、ヒト膵癌株を実験に選んだ理由と浸潤能に着目した理由について質問があり、一般外科領域では浸潤性膵管癌が最も臨床的悪性度が高く高浸潤性であるためと説明され、さらに当科での検討で、膵管癌切除例のうち術前術後の血小板数が $40 \times 10^4/\mu\text{l}$ 以上の症例は $40 \times 10^4/\mu\text{l}$ 未満の症例に比べ有意に予後不良であるとの成績について回答された。次に、浸潤能の評価においてMMPに着目した理由を求められ、MMPが腫瘍細胞の浸潤、転移過程において極めて重要な役割を演じていることは広く認められている。膵癌患者からの腫瘍切片より活性化MMP-2が発現していたとの報告があり、さらに血小板の存在下でヒト乳癌株腫瘍細胞からのMMP-9分泌が増加し、浸潤能に促進的に作用するとの報告があるとの説明がなされた。

次にchemoinvasion assayで高浸潤性を示した腫瘍細胞が必ずしもMMP-9を多く産生しているわけではないとの指摘があり、本実験系では細胞の遊走能やchemoattractantとの親和性など様々な要因によって浸潤能に影響を受けるため、MMP産生の多寡と浸潤能とは必ずしも相関せず、MMP-9は多くの浸潤能促進作用メカニズムの一つであると説明された。Gelatin zymographyにおけるMMP-9の上昇は腫瘍細胞内のMMP-9が放出されたためか、産生能が上昇したためかとの議論があったが、蛋白合成阻害剤であるcycloheximideを加えることによりMMP-9の産生は80-90%阻害されとの報告があることから、血小板によるMMP-9合成促進により発現が増加したと想定された。

次に、抗血小板剤を用いた実験系においてトロンビンと抗血小板剤とを添加した時期について質問され、まずトロンビンで血小板を活性化し、ヒルディンで中和した後に各種抗血小板剤を添加し、共培養したと回答された。

最後に、血小板の腫瘍細胞浸潤能促進作用のメカニズムについて質問があった。腫瘍細胞に作用するのは活性化血小板から放出されたsoluble factorsではなく、活性化した血小板の細胞表面に発現するgranular membraneの一つが関与していると考えられているが、それはP-selectinやGP IIb-IIIaではないことが確認されている。しかしその膜抗原はいまだ同定されていないと説明された。さらに今後はこの膜表面に発現する原因物質の同定を行なう必要性があることが助言された。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき課題は残されているものの、今までは異なった観点より血小板と腫瘍細胞との相互作用を研究し、そのメカニズムの一つを追求することにより今後の新たな治療戦略の端緒を開いたともいえ、更なる発展を期待し有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 池田 康夫 病理学 岡田 保典
病理学 坂元 亨宇
学術確認担当者：北島 政樹、鈴木 則宏
審査委員長：池田 康夫

試問日：平成17年 2月 1日

Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid.

(ステロイド投与気管支喘息患者の重症度判定における血漿エオタキシン値測定の意義)

館野 博喜

内容の要旨

エオタキシンは、好酸球に特異的な遊走活性化能を有するCC chemokineであり、気管支喘息患者の気道で発現が亢進している。喘息の重症度判定においては、臨床症状と肺機能の維持に必要なステロイド投与量が重要な指標と考えられてきた。さらに、末梢血好酸球数、IgE値、IL-5値、%FEV₁などのパラメーターも重症度を予測する上で有用とされてきたが、これらのパラメーターのステロイド投与下での有用性は十分に解析されていない。血漿エオタキシン値はステロイド投与を受けていない喘息患者において一秒量と逆相関することが報告されている。さらに急性期患者では発作前から全身的ステロイド投与を要していた重症例ほど血漿エオタキシン値は高値を示す傾向がある。これらの知見より、血漿エオタキシン値がステロイド治療の有無にかかわらず喘息重症度の指標になり得るかどうかを検討した。外来通院中の安定期喘息患者 (n=79) をステロイド投与量により4群に分け、末梢血好酸球数、血漿エオタキシン値、IL-5値、IgE値などのバイオマーカー、肺機能を比較した (N群: ステロイド非投与群, n=25; L群: 低用量吸入群, n=27; MH群: 中から高用量吸入群, n=19; O群: 吸入内服併用群, n=8)。次いで急性期喘息患者 (n=22) において、以上のバイオマーカーとピークフロー値 (peak expiratory flow rate, PEFR) をステロイド治療前後で比較検討した。

血漿エオタキシン値は喘息群 (n=101) で健常対照群 (n=41) より高値であり (p<0.0001)、ステロイド治療群の方がステロイド治療を要しない患者群に比べて高値であった (p<0.05)。またO群のエオタキシン値はN群およびMH群より高値であった (p<0.05)。ロジスティック回帰分析において血漿エオタキシン値は、治療内容ならびに%FEV₁に基づく喘息の重症度と相関していた。この傾向は他のバイオマーカーでは明確でなかった。急性期喘息患者のステロイド治療後では、好酸球数とIL-5値がPEFRと平行して減少したがエオタキシン値は不変であった。血漿エオタキシン値は高用量のステロイド投与を要する喘息患者ほど高値であり、重症度の指標として有用である可能性が示唆された。急性期喘息患者において治療前エオタキシン値と治療後の肺機能改善度が相関していたことから、血漿エオタキシン値は急性期喘息患者の疾患活動性の指標となるものと考えられた。好酸球数やIL-5値が経口ステロイド治療により減少するのに比し、血漿エオタキシン値は吸入および経口ステロイド治療の影響を受けにくく、ステロイド治療中の患者においても喘息重症度と疾患活動性の指標として有用と考えられた。

論文審査の要旨

気管支喘息の治療は吸入ステロイド療法の導入により劇的に改善し、今日では維持療法の基礎となっている。それにともない喘息の重症度判定においても投与ステロイド量が重要なパラメーターとなっているが、重症度判定に有用性が示されている種々のバイオマーカーはステロイド投与下での有用性について十分に検討されていない。エオタキシンは近年同定された好酸球特異的な遊走因子であり、気管支喘息の病態への関与が報告されている。本研究ではステロイド投与喘息患者の重症度判定における血漿エオタキシン値の有用性を検討することを目的とした。安定期喘息患者を投与ステロイド量により4群に重症度分類し、血漿エオタキシン値などの各種バイオマーカーと肺機能を横断的に比較検討した。また急性期喘息患者においても、発作前の治療内容と発作時に投与されたステロイド量により分類し、各種バイオマーカーと肺機能の治療前後での検討を行った。安定期喘息患者において血漿エオタキシン値は高用量のステロイド投与を要する喘息患者ほど高値であり、重症度の指標として有用である可能性が示唆された。急性期喘息患者においては治療前エオタキシン値と治療後の肺機能改善度が相関していたことから、血漿エオタキシン値は急性期喘息の疾患活動性の指標となるものと考えられた。このことから血漿エオタキシン値は、他のバイオマーカーと異なりステロイド治療の影響を受けにくく、喘息重症度と疾患活動性の指標としてより有用と考えられた。

審査ではエオタキシンの産生細胞について質問があり、気管支喘息においてはin vitroの検討等からも気道上皮細胞、線維芽細胞、気道平滑筋細胞、気道内炎症細胞など肺局所での産生が重要と考えられ、今回の横断的検討ではアトピー素因などを除外していないものの顕著な他所産生例は含まないと考えられる旨が回答された。また、血中におけるエオタキシンの存在形態や代謝について質問があり、赤血球Duffy抗原と結合能を有し、同抗原のノックアウトマウスでは投与エオタキシンの消失が速まること、血管内皮細胞ECMとも結合し固相化されて存在すること等が説明され、今後の課題として動脈脈管や採取部位間での比較検討を行い、肺局所での産生についての洞察を深めることも有意義ではないかとの指摘がなされた。In vitroでの報告と今回の検討とでエオタキシンに対するステロイドの影響について乖離が存在することに対して質問があり、in vivoでは介在因子の影響やステロイドの到達効果が異なる可能性、投与ステロイド量のin vitroとの相違などが回答され、PPAR γ とPGJ2を介する経路のステロイドによる抑制の可能性について、今後の研究課題の一つとして提起された。

以上、本研究は今後縦断的検討やin vitroにおけるさらに踏み込んだメカニズムの解析が望まれるものの、ステロイド投与下における気管支喘息の重症度判定と血漿エオタキシン値の関連について新しい知見を与え、気管支喘息の診療において今後有用性を増す可能性があるものと評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
外科学 小林 紘一 臨床麻酔学 武田 純三
医化学 末松 誠
学力確認担当者: 北島 政樹、小林 紘一
審査委員長: 小林 紘一

試問日: 平成17年 1月18日

Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene.

(ムーコル症の主要病原菌、*Rhizopus*属のmultiplex PCR法を用いた同定および検出)

永尾 圭介

内容の要旨

【目的】ムーコル症は真菌による日和見感染症で、死後剖検にて診断されることが多い。本研究の目的は、主要病原菌*Rhizopus*属のmultiplex PCR法での同定と臨床検体からの遺伝子検出を行うことである。

【材料・方法】以下の*Rhizopus*属5菌種を対象とした：*R. oryzae*, *R. azygosporus* (RA)、*R. microsporus* (RM) var. *microsporus* (RMM)、var. *oligosporus* (RMO)、var. *rhizopodiformis* (RMR)、*R. stolonifer*, *R. schipperae*. rRNA遺伝子ITS領域の塩基配列を決定し、特異的プライマーを作成した。PCR法はmultiplex PCR法で行った。菌種の相違は走査型電顕 (SEM) にて確定した。臨床応用として皮膚ムーコル症3例より分離させた菌株、検体 (病理組織切片3例、血清1例) を使用した。

【結果】*Rhizopus*属5菌種に対して4ペアの特異的プライマーを作成することが出来た。RAとRMのITS領域および表現型は極めて類似しており、これらは同じプライマーセットで同定した。Multiplex PCR法を試行したところ、一度の反応で菌種の鑑別を行うことが出来た。RAとRMが鑑別できなかったため、詳細な塩基配列の解析を行ったところ、RAのITS領域には特徴的な遺伝子多形が数箇所存在することが分かりこれらは塩基配列で鑑別することが可能であった。臨床分離株3株についても検討を加えた。その結果、*R. oryzae* (2株)、RA/RM (1株) と同定し、SEMによる形態学もこれに合致するものであった。臨床検体として、皮膚ムーコル症のパラフィン切片3例、血清2本をPCR法にて評価したところ、それぞれ分離株に合致した菌種の遺伝子が検出された。

【考察と結語】RAとRMはSEMやPCR法で区別することが出来なかったが、RAの塩基配列には特徴的な遺伝子多型が存在し、それぞれの配列はRMMかRMRと完全に一致していた。RMMとRMRの交配でRA様の株が得られることより、RAはRMの変種間交配より生じたものと推測されている。本研究の結果もこれを支持するものであった。過去のPCR法による*Rhizopus*属の同定は18S・28S rRNA遺伝子などを用い、2菌種のみで成功している。本研究では変異に富むITS領域を標的にし、*Rhizopus*属5菌種を4つに区別することができた。アスペルギルス症でも報告されているとおり、血清を含めた臨床検体に真菌遺伝子を検出することが出来たことはPCR法が菌株の同定のみならず、スクリーニング法としての可能性が示唆された。

論文審査の要旨

本研究は、日和見感染症であるムーコル症の主要病原菌である*Rhizopus*属のmultiplex PCR法による同定と検出を試みたものである。すなわち、人に病原性を示したことのある*Rhizopus*属5菌種を研究の対象とし従来からの孢子嚢胞子の走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察と真菌のrRNA遺伝子ITS (internal transcribed spacer) 領域を増幅し塩基配列を決定する方法を用いた。得られた塩基配列およびGenbankに登録されているデータより各菌種に対する特異的プライマーを設計した。孢子嚢胞子の形態は概ね過去の記載と合致するものであった。しかし、形態およびITS領域の塩基配列では*R. microsporus*と*R. azygosporus*を鑑別することができず、これらに関しては同一のプライマーで同定を行った。5菌種に対して作成した4セットのプライマーを混合し、multiplex PCR法を行ったところ、一度の反応で対象菌種を同定することができた。臨床分離株に応用し、形態学的所見と合致する結果を得た。ムーコル症3例からの臨床検体 (病理組織切片および血清) についても検討したところ病理組織切片から各分離菌と合致するPCRの結果を得ることが出来た。ある症例では未治療時、ならびに治療後の血清を得ることができ、その両方から*Rhizopus*属の遺伝子を検出することが出来た。血清から真菌遺伝子を検出出来たことから、今後PCR法が内臓ムーコル症などのスクリーニングにも応用出来る可能性が示唆された。本研究では*R. azygosporus*と*R. microsporus*をPCR法で鑑別することは出来なかったが、詳細な遺伝子解析で*R. azygosporus*の特徴的な遺伝子多型はこの菌種が*R. microsporus* var. *rhizopodiformis*と*R. microsporus* var. *microsporus*の自然界で交配したことによって生じた可能性が示唆された。

審査ではまず真菌感染症の分子生物学的手法による原因菌同定の意義が問われた。近年抗真菌剤の開発も積極的に行われており、類似した病態を示しうる*Aspergillus*属と接合菌属は薬剤感受性が異なるため、同定は適切な治療戦略を組み立てる上で必要と回答された。また、菌種レベルまで鑑別することは現段階で治療戦略におよぼす影響は少ないが、今後臨床分離株に対する薬剤感受性の確認を行う必要がある。さらに、臨床検体より真菌遺伝子を検出したことは臨床上有意義なことであるが、検討出来た血清が1症例のみだったことを指摘された。疾患の稀さ故に今後症例の蓄積と多くの血清で検討することが今後の課題であると回答され了解された。*R. azygosporus*の特徴的な遺伝子多型についても興味深い現象であるが、このような現象が他の微生物で知られているかが問われた。現在のところ、ある菌種の亜種同士が交配し、安定した菌種が得られている可能性があるのは今回報告した*R. azygosporus*のみであると回答された。

以上のように、本研究には今後さらに検討すべき点を残しているものの、診断が困難な深在性真菌感染症であるムーコル症ならびにその原因菌同定に関して新しい分子生物学的手法が診断に導入しうる可能性を検討した研究として意義あるものと評価された。

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 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、石川 博通

審査委員長：石川 博通

読問日：平成17年 2月 8日

Single-stranded conformational polymorphism法を用いた 高感度HPV重感染検出法の開発

中 川 博 之

内容の要旨

ヒトパピローマウイルス (HPV) は、そのゲノムとして約8000塩基対の環状2本鎖DNAをもち、初期遺伝子としてE1からE7があり、後期遺伝子としてL1とL2がある。HPVには現在80種以上の型が報告されており、子宮頸癌で検出されるものをハイリスク群、癌では検出が稀なものをローリスク群とする分類法がある。16型や18型を代表としたハイリスク群HPVの感染は子宮頸癌の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。近年HPV感染に対する予防ワクチンの開発が進められているが、その効果は型特異的に認められることが報告されている。したがって正確なHPVの型を決定することがますます重要となってきている。HPVの検出にはL1領域に対してpolymerase chain reaction法にて遺伝子増幅の後restriction fragment length polymorphism法にて解析する方法 (L1 PCR-RFLP法) が汎用されているが、この方法では技術的にHPVの重感染を正確に判定することが困難であり、HPVの重感染の正確な頻度は不明であった。

今回我々はPCR-single-stranded conformational polymorphism法 (PCR-SSCP法) に着目し、L1 PCR法と組み合わせてより高感度にHPVの重感染を検出する方法 (nested L1 PCR-SSCP法) を新たに開発し、子宮頸部細胞診検体283例 (正常64例、軽度異形成32例、中等度異形成41例、高度異形成31例、上皮内癌79例、扁平上皮癌27例、腺癌9例) を解析した。異形成ではHPVはほぼ全例に検出され、約40%に重感染が見られた。上皮内癌、扁平上皮癌では、約80%でHPVが検出され、重感染は上皮内癌の8例と微小浸潤癌の1例を除いて検出されなかった。腺癌では重感染は検出されなかった。また、HPVの重感染と異形成症例の予後との関連を検討したが、有意の相関は認められなかった。さらに、異形成95例に対して今回確立したnested L1 PCR-SSCP法と、従来からあるL1 PCR-RFLP法を組み合わせた方法とで同時にHPV検出・型決定を行い、結果不一致例についてはPCR産物を直接塩基配列決定した。nested L1 PCR-SSCP法はHPV重感染を高感度に検出できるだけでなく、とくに重感染が見られる場合にはHPV16型検出に関する特異度も優れていた。これらのことから、HPVの重感染は、異形成で約4割にみられるが浸潤癌では稀であり、異形成症例の予後との関連はみられないことが示された。今回確立したnested L1 PCR-SSCP法は重感染を含めたHPV感染の検出・型決定法として優れており、本法を用いて多数例を検討することにより、重感染を含めたHPV感染の自然史をより正確に捉えることができると思われる。このことは将来ワクチンを用いてHPVの感染を予防し、子宮頸癌の罹患を減少させるにあたりきわめて重要である。

論文審査の要旨

HPV感染は、子宮頸部発癌に関する最も重要なリスク因子の一つであり、今後ワクチンを用いた予防・治療を実用化するにあたって、HPVの正確な検出・型決定がますます重要となってきている。また、L1 PCR法を用いると、HPVの重感染が検出されるが、その頻度や病的意義については一定の見解はない。さらに日本ではL1 PCR-RFLP法が汎用されてきたが、この方法ではHPVの重感染を正確に検出することは技術的に困難である。本研究では、新たなHPV重感染高感度検出法としてnested L1PCR-SSCP法を確立し、重感染は異形成の約4割に見られるが浸潤癌では稀であることを明らかにした。また、本法はL1 PCR-RFLP法と比較して重感染を高感度に検出できるだけでなく、より正確に型決定できることが示された。

審査では、まず、nested L1 PCR-SSCP法だけでなくオートシーケンサーを要したのどのような例か、との質問があった。これに対し、検出頻度のまれな型は移動度を比較する既出の検体がなく、オートシーケンサーによる確認を要したとの説明があった。次に、正常で12.5%のHPV陽性率は妥当か、との質問に対して、過去の文献と比較し、妥当と思われるとの回答があった。また、nested L1 PCRの感度測定法について、PCR産物でなく、培養細胞株から抽出したDNAを段階的に希釈して用いたほうが理解しやすいとの助言があった。重感染をSSCP法で分離した際に、どのバンドがどの型に対応するのかの判断法について質問があった。これに対し、バンドの濃度の違いから判断するが、わかりにくいときはシーケンシング解析を行なうとの回答があった。一つの細胞に複数の型のHPVが感染しうるかとの質問に対し、in situ hybridization法を用いた研究ではそのような例はないとの説明があった。さらに、HPV重感染が異形成で多く、浸潤癌で少ない理由について質問があった。これに対し、異形成はHPV感染細胞からなるポリクローナルな病態であり、浸潤癌は腫瘍細胞からなるモノクローナルな病態であるからとの推論が述べられた。次に、HPV18型が腺癌で多く見られる理由について質問があった。これに対し、いまだに不明であるとの回答があった。L1だけでなく、E6、E7領域も検討の対象としたほうがインテグレーションによりL1領域の欠失した場合も検出できるのではないかと助言があった。

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が、自然環境下に存在しているのみで感染を起こしていないウイルスまで検出するほど検出率を上げることなく高感度に重感染を検出する方法を確立したこと、さらには重感染が異形成で高頻度に見られるものの、浸潤癌では稀であることを明らかにした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
微生物学・免疫学 小安 重夫 先端医科学 河上 裕
分子生物学 清水 信義

学力確認担当者: 北島 政樹、小安 重夫
審査委員長: 小安 重夫
研究指導者: 野澤 志朗 (産婦人科学)

試問日: 平成17年 2月 3日

HDLコレステロールに関する遺伝子研究

—日本人女性におけるCETP遺伝子Taq IB多型とApo A-I遺伝子Msp I多型の意義—

中 村 佳 子

内容の要旨

低high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) 血症は心血管イベントの重大な危険因子であることは国内外の多くの疫学調査で明らかにされている。血清HDL-C値は様々な環境因子と遺伝子因子の影響を受けると考えられている。HDL-C代謝の中でcholesteryl ester transfer protein (CETP) はコレステロール逆転送系に関与し、apolipoprotein A-I (Apo A-I) はHDL-Cの主要なアポ蛋白であり、いずれも血清HDL-C値に影響している可能性があると考えられる。この2つの遺伝子多型がHDL-Cを中心とした血清脂質レベルにどのように影響するか、また一つの遺伝子多型の影響だけでなく、この二つの遺伝子多型を組み合わせた血清脂質レベルへの影響を検討した。

(対象と方法)

30～69歳の日本人女性270名を対象とした。対象全てに対して身長、体重、血圧を測定し、空腹時採血を行い血清脂質、糖代謝について調べた。PCR-RFLP法にてCETP遺伝子Taq IB多型とApo A-I遺伝子Msp I (-75bp : M1, +83bp : M2) 多型を調べ、遺伝子多型と各種パラメーターとの関係を検討し、血清HDL-C値に対するこの2つの遺伝子多型の組み合わせの影響を検討した。

(結果と考察)

CETP遺伝子Taq IB多型とApo A-I遺伝子Msp I (M1) 多型が血清HDL-C値に関連しており、CETP遺伝子Taq IB多型のB1 alleleとApo A-I遺伝子Msp I (M1) 多型のM1+ (M1+/+) 群が低HDL-C血症と関係していることが示唆され、さらにステップワイズ重回帰分析の結果、CETP遺伝子Taq IB多型とApo A-I遺伝子Msp I (M1) 多型は有意な説明変数と考えられた。また、BMIも血清HDL-C値に対して独立した説明変数であるが、BMIが遺伝子と血清HDL-C値の間に影響を与えることが示唆された。遺伝子多型の組み合わせの解析ではB1B1とM1+ (M1+/+) 群の組み合わせで、最も血清HDL-C値は低値であり、B2B2とM1- (M1+/-, M1-/-) 群の組み合わせで、最も血清HDL-C値は高値であった。この2つの遺伝子多型の組み合わせについて、リスクファクター数として検討した結果、リスクファクター数と血清HDL-C値は関係することも示唆された。以上より日本人女性において、二つの遺伝子多型の組み合わせが血清HDL-C値に影響しており、また、遺伝子と血清HDL-C値の関係が環境因子の影響を受けることが示唆された。これらは冠動脈疾患の発症にとって高リスクとなる低HDL-C血症を呈する群の検出や治療法の決定に役立つものと考えられた。

論文審査の要旨

動脈硬化の発症・進展と密接に関係するHDL-コレステロール (HDL-C) の血清レベルは、環境因子と遺伝子因子により調節されている。HDL-C代謝の中で、コレステロール逆転送系に関与するcholesteryl ester transfer protein (CETP) とHDL-Cの主要なアポ蛋白であるapolipoprotein A-I (Apo A-I) は、血清HDLの調節に重要な役割を果たしている。本研究では、CETPおよびApo A-Iの遺伝子多型の血清HDL-Cへの影響を検討し、HDL-Cの変化が関連する諸疾患の検出や治療法の決定にどれだけ役立つか検討した。

30～69歳の三重県の主婦270名を対象とした検討で、CETP遺伝子Taq IB多型とApo A-I遺伝子Msp I (M1) 多型が血清HDL-C値に関連しており、CETP遺伝子Taq IB多型のB1とApo A-I遺伝子Msp I (M1) 多型のM1+ (M1+/+) 群が低HDL-C血症と関係していることを明らかにした。また環境因子との関連が強いBMIが血清HDL-C値に影響を与えるとともに、BMIが遺伝子と血清HDL-C値の間に影響を与えることも明らかにした。さらに遺伝子多型の組み合わせで、CETP遺伝子のB1B1とApo A-I遺伝子のM1+ (+/+) 群の組み合わせで、血清HDL-C値は最も低値であり、B₂B₂とM1- (M1+/-, M1-/-) の組み合わせで血清HDL-C値が最も高値であったとし、このような2つの遺伝子多型の検討が、冠疾患発症の高リスクとなる低HDL-C血症を呈する群の発見および治療法の確立に有用であるとされた。

このような研究に関して、まず対象とされた三重県の主婦の血清総コレステロールやHDL-C値等が、全体として正規分布をしていたか否かが問題とされたが、ほぼ正規分布であったとされた。またBMI等、環境因子を考慮した研究であることから、対象者の運動量など生活習慣が類似した主婦が対象となっていたかが議論となったが、その点に関しても家庭の主婦が対象で、アンケート等で運動等、生活習慣も類似した対象であったとされた。

次に本研究における遺伝子多型の検討において血清HDL-C値の調節に最も重要と考えられる遺伝子因子として、CETP遺伝子とApo A-I遺伝子多型に注目し、その組み合わせにより冠疾患等の予後予測が可能としたが、これらの遺伝子以外に検討すべき遺伝子があり、さらにHDL-Cの場合には、色々な環境因子や生化学因子を含め、幅広く検討する必要があったと助言された。また10数年にわたって築きあげてきた疫学研究の対象母体での研究であることから、今回検討された対象者に関して観察を継続し、冠疾患や脳血管障害の発症率がどうなっていくのか注意深く観察していく必要があるとされた。

このほか論文中の結果の記載ミス、統計処理や図表の説明の不備が指摘されたが、血清HDL-C値の調節に果たすCETP遺伝子多型とApo A-I遺伝子多型の重要性を明らかにし、これらの多型の検討が、冠疾患等の予後予測や治療法の決定に有用であることを示し、この領域の研究に価値ある示唆を与え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

分子生物学 清水 信義 衛生学公衆衛生学 大前 和幸

医化学 末松 誠

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 2月15日

心筋梗塞後ラットの動脈圧受容器反射に対する、アンジオテンシンⅡ受容体遮断薬とアンジオテンシン変換酵素阻害薬の効果の比較

西澤 雅彦

内容の要旨

論文審査の要旨

緒言：高血圧のみならず心筋梗塞、心不全においても動脈圧受容器反射は障害されている。また、この障害が致死的不整脈の発生や突然死と密接に関連している。一方、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬が、心筋梗塞後の予後改善に有効であること、およびアンジオテンシンⅡ受容体遮断薬（ARB）が、心筋梗塞により障害された圧受容器反射を回復させ、長期予後を改善させる効果があることが示されている。すなわち、心筋梗塞患者の予後と圧受容器反射との間の密接な関連性が推察される。本研究では、(1) 高血圧で障害されている動脈圧受容器反射が、心筋梗塞の合併によりどのような影響を受けるか、

(2) ARB（カンデサルタン・シレキセチル、CANと略す）の経口投与は、ACE阻害薬（エナラプリル、ENAと略す）と同等に、心筋梗塞を合併した高血圧ラットの動脈圧受容器反射を改善させるか、を検討した。

対象・方法：15週齢の高血圧自然発症ラット（SHR）および同週齢の正常血圧ウィスター京都ラット（WKY）に、左冠動脈を結紮することで心筋梗塞およびうっ血性心不全を発症させて研究に用いた。WKYとSHRをそれぞれ全6群に分け、計12群を解析した。すなわち、(1) シヤム手術+vehicle群、(2) シヤム手術+CAN治療群、(3) シヤム手術+ENA治療群、(4) 心筋梗塞+vehicle群、(5) 心筋梗塞+CAN治療群、(6) 心筋梗塞+ENA治療群。Vehicle群には心筋梗塞後4週間、通常の飼料を与えた。CANは1 mg/kg/日を、ENAは10mg/kg/日をおのの心筋梗塞作製1週間後から飼料に混合して、3週間投与した。以上の12群とも、19週齢時に圧受容器反射機能を評価した。

結果および考察：心筋梗塞により圧受容器反射は障害されたが、腎交感神経活動を指標とするよりも心拍数を指標とする圧受容器反射の方が高度に障害された。つまり、心筋梗塞による影響は交感神経系よりも副交感神経系の方により強く及んだと考えられた。

ARBあるいはACE阻害薬はともに心筋梗塞群の腎交感神経活動を指標とする圧受容器反射を、シヤム手術群のレベルまで回復させた。一方、SHRの心筋梗塞群において、心拍数を指標とする圧受容器反射の障害は、いずれの降圧薬でも十分には回復しなかった。

障害された圧受容器反射に対し、ARBとACE阻害薬とは、ほぼ同等の改善効果を示した。このことから、ARBにはアンジオテンシン・タイプ1受容体を遮断する以外にも有用な効果があることが推測された。

結論：SHRに心筋梗塞を生じた場合の方がWKYに心筋梗塞を生じた場合に比し、圧受容器反射の障害が高度であること、その障害に対してARBとACE阻害薬はほぼ同等の改善効果を示すことが明らかになった。

高血圧のみならず心筋梗塞においても動脈圧受容器反射が障害されており、その障害が心筋梗塞の予後と関係していると考えられているが、その詳細は明らかでない。本研究では心筋梗塞による圧受容器反射の障害が、高血圧の有無で相違があるのか、さらにこのような障害に対するアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬とアンジオテンシンⅡ受容体遮断薬（ARB）の効果と比較検討した。

高血圧自然発症ラット（SHR）と対照のウィスター京都ラット（WKY）とを用いて、冠動脈を結紮することにより心筋梗塞を発症させた。心筋梗塞作製1週間後から、ACE阻害薬あるいはARBを3週間投与して圧受容器反射を評価した。その結果、心筋梗塞により圧受容器反射は障害され、その際、腎交感神経活動を指標とするより、心拍数を指標とする圧受容器反射の方が高度に障害されたことから、交感神経系より副交感神経系の方が強く障害されているとした。ACE阻害薬とARBの投与により、圧受容器反射の障害は明らかに改善したが、両薬剤の効果には明らかな差はみられなかった。

このような研究に関して、まず実験的に心筋梗塞を惹起させて本実験のプロトコール通りに実験できたラット数が問題とされた。SHRはWKYに比して衰弱し、実験が完了できたのは20%程度とされた。なお心筋梗塞を惹起させて血圧が低下した状態に、ACE阻害薬あるいはARBが投与され、さらに血圧が低下すると考えられたが実際には逆に血圧が上昇するラットが多く、その機序が問題となったが、これらの薬剤が心機能を改善させたことにより血圧が上昇したとされた。

本研究で圧受容器反射の評価にロジスティック・ファンクションカーブが用いられ、そのカーブの傾きの最大値（maximal gain）を「圧受容器反射の感受性」の指標と考えたが、この値の信頼性と有用性について議論があった。各実験における圧受容器反射曲線を見て、各薬剤投与における曲線の傾きの差が明らかであれば問題ないが、軽度の差を確認するためにはmaximal gainが必要とされ、現在のところこの評価法が認められているとされた。

本研究では圧受容器反射障害の判定を、交感神経活動を指標とした場合と、心拍数を指標とした場合との両方で行ったことが重要な点であるが、実験成績では心拍数を指標とした場合に一層明瞭な差がみられている。このことは、心筋梗塞による圧受容器反射の障害では迷走神経の障害が重要であるとされ、結果的には測定操作が大変な交感神経活動を用いた評価よりも、心拍数の変化を指標とする方が意義があるとされた。

本研究は心筋梗塞を発症させたラットで無麻酔下で交感神経活動を記録するなど、この領域で価値ある貴重な論文であるが、もっと早く学位申請論文がまとめられるべきであったと助言があった。最新の論文を考察して申請論文が訂正されることが求められた。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
内科学 小川 聡 薬剤学 谷川原 祐介
外科学 四津 良平
学力確認担当者：北島 政樹、小川 聡
審査委員長：小川 聡

試問日：平成17年 2月28日

Six year observational cohort study of the effect of carbon disulphide on brain MRI in rayon manufacturing workers.

(レーヨン製造作業における二硫化炭素の脳MRIへの影響に関する6年間コホート研究)

西 脇 祐 司

内容の要旨

二硫化炭素(以下CS₂)曝露により動脈硬化、冠動脈疾患、網膜微小動脈瘤のリスクが増加することについては多くの報告がみられる。しかしCS₂曝露の脳血管への影響に関してはこれまであまり注目されてきたとはいえない。とくに曝露と脳画像との関連について包括的に疫学研究を実施した論文は見当たらない。現在CS₂の許容濃度(日本産業衛生学会、米国産業衛生専門家会議)は10ppmであるが、現行の曝露レベルが健康障害を予防するに十分なほど低いかにについては結論が出ていない。そこで現行のCS₂曝露による血管系、神経系への影響の有無を検出するために、日本におけるビスコースレーヨン製造工場の作業員(曝露作業員432名、対照者402名)を対象に6年間のコホート研究を実施した。本研究はこのうち、曝露による脳血管へのサブクリニカルな影響を脳MRIを用いて評価することを目的とした。

脳MRIはベースライン時(1992-1993)、追跡時(1998-1999)の2回、各会社近隣の医療機関で撮影した。医療機関、撮影機器の相違による誤差を最小にするために、放射線専門医の指示によりqualityの管理を行った。撮影は、曝露をはじめ諸情報をブラインドにした状態ですべて一人の放射線専門医が行った。評価した項目は、(a)大脳、脳幹、小脳のT2強調画像上の高信号スポット、(b)大脳領域の萎縮であった。ここで高信号スポットは、厚生省循環器病研究班「無症候性脳血管障害の病態と対策に関する研究」班の診断基準に準じ、いわゆる無症候性脳梗塞をさしている。さらに放射線専門医はベースライン時と追跡時のMRIを比較し、6年間に高信号スポットの数が増加したか、不変かを総合的に判断した。統計学的解析は、曝露群217名、曝露中止群125名、対照群324名の3群、あるいはCS₂曝露群を作業内容や調査期間中の曝露レベルによって分類した群間で比較した。

時間断面的に見た場合には、ベースライン時、追跡調査時ともに高信号スポット、大脳領域の萎縮の有所見率に群間で有意差を認めなかった。しかしながら、高信号スポットの数が6年間に増加した者の割合は、曝露群24.0%、曝露中止群15.2%、対照群12.4%と曝露群で高かった。年齢およびその他の交絡要因を調整後のオッズ比は、対照群を1.0とすると曝露群2.27(95%信頼区間:1.37-3.76)、曝露中止群1.33(95%信頼区間:0.70-2.54)と曝露群で有意な上昇を認めた。しかしながら、曝露レベル、曝露年数との量反応関係は明らかでなかった。

本コホート研究の結果、CS₂曝露作業員ではMRI-T2強調画像上の高信号スポットの数が増加していることが示され、高信号スポットの予防医学的意義はまだ十分に解明されていないものの、現行のCS₂許容濃度を見直す必要性が示唆された。

論文審査の要旨

二硫化炭素(CS₂)による中毒は産業衛生上長い歴史を有している。今日では労働環境の改善により明らかな中毒患者は見られなくなったものの、現行レベルの曝露(産業衛生学会許容濃度:10ppm)で健康影響を十分に予防できるかどうかについてはいまだ結論が出ていない。本研究は、CS₂による脳血管へのサブクリニカルな影響をMRIを用いて評価した6年間コホート研究であり、曝露の測定も詳細に実施した。その結果、CS₂曝露作業員ではMRI-T2強調画像上の高信号スポットの数が増加していることが示され、高信号スポットの予防医学的意義はまだ十分に解明されていないものの、現行のCS₂許容濃度を見直す必要性が示唆された。

審査では、まずMRI画像のquality controlについての質問がなされた。それに対し、あらかじめマニュアルを病院に送り撮像法を徹底したこと、さらに試験的に撮影した数枚を放射線診断専門医がチェックし必要な場合は各病院に適切な指示を出した旨回答された。また、脳萎縮の評価法について質問があり、本研究では定性判断であったことから、脳volume測定等の定量評価が望ましいとの助言があった。

次に、本研究で観察されたT2強調画像上の高信号スポットの解釈について疑問がされた。近年の報告によるといわゆる無症候性脳梗塞とされているものの中に、動脈硬化性の変化に基づく髄鞘の淡明化、グリオーシス、血管腔の拡大などを含んでいるとのことから、あくまで画像上の名称を用いた旨説明があった。必ずしも基底核にあまり多くなかった点、梗塞等の虚血性病変では過去に報告されているような脳症がおきにくい点、若年者でも観察されている点を考慮すると、虚血性の血管病変だけでなく脱髄性変化である可能性も検討すべきとの示唆があった。また、もし血管性変化であるとした場合、そのメカニズムは何かについて質問がなされた。脂質代謝、糖代謝の異常、血圧の上昇などを介する仮説があること、しかしながら本研究集団ではこれらの変化は明らかでなかったことが回答された。近年CS₂によりLDLの架橋形成が促進され、これらのLDLはマクロファージに取り込まれやすくなり、粥状硬化がすすむ仮説がある旨も紹介された。

最後に本研究結果を受けての予防医学上必要なアクションについて質問がなされた。現行の曝露濃度においても高信号スポットの増加が観察され、高信号スポットの予防医学的解釈は必ずしも結論的ではないものの、他の影響をエンドポイントとした研究結果も総合的に考慮しながら、現在の許容濃度10ppmを引き下げる必要があるとの回答がされた。

以上より、本研究はCS₂曝露による脳血管へのサブクリニカルな影響を適切な疫学デザインにより6年間にわたり追跡評価した点で大変価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 衛生学公衆衛生学 大前 和幸
内科学 鈴木 則宏 放射線医学 栗林 幸夫
外科学 河瀬 斌
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 2月16日

A Neo-Esophagus Reconstructed by Cultured Human Esophageal Epithelial Cells, Smooth Muscle Cells, Fibroblasts, and Collagen.

(ヒト培養食道上皮細胞, 平滑筋細胞, 線維芽細胞, コラーゲンを用いた組織再構築型人工食道)

林 浩 二

内容の要旨

我々は細胞培養法を用いて増殖させた自己の細胞と細胞外マトリックスにより再構築する人工食道の開発を行ってきた。これまでに、ヌードラットにおいて、培養食道上皮細胞、線維芽細胞を用いて重層化した上皮の管腔の再構築に成功した。今回、管腔壁の柔軟性の獲得と支持力増強のために、平滑筋細胞を管腔壁へ導入することが必要と考え、ヒト食道上皮細胞、真皮由来線維芽細胞、大動脈中膜由来の平滑筋細胞を用い構成する人工食道の構築を試みた。直径35mmのdish上で、 15×10^5 個の平滑筋細胞をtype 1 コラーゲン1.5mlに包埋した。次に 6×10^5 個のヒト線維芽細胞を0.7mlのtype 1 コラーゲンに包埋し、上述のコラーゲン層に重層した。さらにヒト食道上皮細胞 2×10^5 個/cm²を線維芽細胞のコラーゲン層上で培養した。構築したコラーゲンシートをin vitroで1週間培養し、ヌードラットの広背筋上に移植した。シートは移植1週後、2週後にH.E.染色と抗アクチン抗体による免疫染色で病理組織学的に検討した。移植後1週目にヌードラットより摘出したシートの組織学的特徴は、1. シートの下層において紡錘形の平滑筋細胞が粗な細胞密度で、ヌードラットの胸壁の弯曲の方向に一致して配列しており、また、この層には新生血管も認められた。2. また上皮の重層化は6~8層であった。移植後2週目に摘出したシートの組織学的特徴は、1. シートの下層における紡錘形の平滑筋細胞の細胞密度は密であり、それらはヌードラットの胸壁の弯曲の方向に一致して配列していた。2. シートの上層は結合組織に類似し、平滑筋層、繊維芽細胞層の両層に血管新生を認めた。3. 上皮の重層化は10~13層であり、形態学的に上皮層、粘膜下層、固有筋層が再構築されていた。

さらに、我々は将来の臨床応用を見越し、インフォームドコンセントを得た上で、摘出した手術検体の左胃動脈中膜を移植片培養法を用いて培養したところ、平滑筋細胞の分離培養に成功した。

以上より、手術検体より採取した組織から分離培養したヒト平滑筋細胞、線維芽細胞、食道上皮細胞を用い構築する人工食道の臨床応用への可能性が示唆された。

論文審査の要旨

われわれは、従来より、自家生体材料から細胞培養法により管腔を作製する組織再構築型人工食道の開発を行ってきた。今回、人工食道壁の弾性獲得と支持力増強のためには平滑筋細胞を壁構成成分に加えることが重要であると考え、筋層成分として平滑筋細胞を人工食道壁に導入することが可能か否かを検討した。食道上皮細胞、新生児真皮由来線維芽細胞包埋コラーゲン、ヒト大動脈中膜由来平滑筋細胞包埋コラーゲンを階層状にしたシートを作製し、ヌードラット広背筋上に移植することにより食道上皮層、粘膜下層、固有筋層に類似した層構造の再構築に成功した。さらに、手術検体の左胃動脈中膜から移植片培養法により、平滑筋細胞の分離培養に成功した。以上の結果、手術検体より採取した組織から分離培養したヒト平滑筋細胞、線維芽細胞、食道上皮細胞を用い構築する人工食道の臨床応用への可能性が示唆された。

審査ではまず、in vivoでの組織構築のメカニズムについての質問がなされた。ヌードラット広背筋上におかれた平滑筋細胞包埋コラーゲン層に呼吸に伴う胸郭の運動のため、肋骨の方向にストレスが加わり、同方向にコラーゲンファイバー、平滑筋細胞が配列すること、それに伴い平滑筋細胞の形態もin vitroでの多角形の合成型から紡錘形の収縮型に変化していくことが説明された。次にシート中に存在するヌードラット由来の細胞の割合についての質問があり、in vitroの培養細胞シートの構築とin vivoでの組織構築を対比するとin vivoの上皮層とラット広背筋の間にヒト線維芽細胞包埋コラーゲン層とヒト平滑筋細胞包埋コラーゲン層が存在するはずであり、in vivoではH.E.染色、抗アクチン抗体による免疫染色でそれらの層が明瞭に境界され、シート中に存在する細胞は概ねヒト由来細胞と考えられると回答された。この点についてヒト由来の細胞をhuman nuclear antigenの免疫染色で確認すべきとの助言がなされた。さらにコラーゲンに包埋した細胞密度の根拠についての質問があり、平滑筋細胞の 10×10^5 /mlという密度は平滑筋細胞、コラーゲンゲルから輪走筋類似構造の構築に成功した人工血管分野の研究を参考にしたものであり、線維芽細胞は上皮の重層化をもっとも促進した 8×10^5 /mlの密度を用いたと説明した。臨床応用を考えた場合、コラーゲンに厚さがないと食道と胃の間を吻合できないのではとの質問があり、内径の異なる2本のガラス管の間で細胞を包埋したコラーゲンをゲル化させチューブを作製することにより、厚さの調整は可能であることが回答された。この他移植後7日目のシートの間質に異物反応があり、使用するマトリックスの検討を要するとの指摘があった。

以上、本研究は今後検討されるべき課題を残してはいるものの、手術検体から分離培養したヒト平滑筋細胞、線維芽細胞、食道上皮細胞を用い構築される人工食道の臨床応用への可能性が示唆された点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 日比 紀文 病理学 岡田 保典
生理学 岡野 栄之
学力確認担当者: 北島 政樹、日比 紀文
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成17年 1月19日

正常および糖尿病モデルラットの傍糸球体細胞における レニン産生・分泌に及ぼす圧負荷の影響

廣 田 展 久

内容の要旨

傍糸球体 (JG) 細胞において、急性圧負荷はレニン分泌を抑制するが、慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節については十分に解明されていない。また、糖尿病モデル動物の循環血液中ではレニンの減少とプロレニンの増加が観察されており、プロレニンからレニンへの成熟過程 (プロセッシング) の障害が疑われていたが、その詳細については明らかでなかった。本研究では、正常および糖尿病状態において、慢性圧負荷がJG細胞のレニン産生・分泌に及ぼす影響とその機構における細胞内second messengerであるphospholipase C (PLC) やphospholipase D (PLD) の関与を検討した。

【対象と方法】

雄SDラット (100-150g) の腎臓から分離した初代培養JG細胞を用い、PLC阻害薬であるU73122 10 μmol/L, NCDC (2-nitro-4-carboxyphenyl-*N,N*-diphenyl-carbamate) 200 μmol/L, PLD阻害薬であるAEBSF (4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride) 100 μmol/Lの存在下で慢性圧負荷を行い、レニン分泌率、プロレニン分泌率、細胞内活性レニン濃度、細胞内プロレニン濃度、細胞内総レニン濃度を測定した。また、ストレプトゾトシン (65mg/kg) を前投与 (早期: 7日前・慢性期: 28日前) した糖尿病ラット、インスリンで治療した糖尿病ラットから分離したJG細胞でも同様に検討した。

【検討と考察】

慢性圧負荷は正常ラットJG細胞において、レニン分泌・プロレニン分泌・プロセッシングをいずれも抑制した。早期糖尿病ラットJG細胞では、プロセッシングのみ正常ラットと同程度に抑制した。慢性期糖尿病ラットJG細胞においても、プロセッシングのみ抑制したが、その抑制度は、正常ラット・早期糖尿病ラットよりも有意に大きかった。インスリン治療した慢性期糖尿病ラットJG細胞では、正常ラットと同様の結果を得た。NCDC, U73122は、正常ラットJG細胞において、慢性圧負荷によるレニン分泌・プロレニン分泌の減少反応を抑制した。しかしながら、慢性圧負荷によるレニン分泌・プロレニン分泌が既に抑制されている糖尿病ラットJG細胞において、NCDCは影響を及ぼさなかった。AEBSFは、正常ラットJG細胞・糖尿病ラットJG細胞いずれにおいても、慢性圧負荷によるプロセッシング抑制反応を抑制した。

以上より、JG細胞において慢性圧負荷は、PLC依存性にレニン分泌・プロレニン分泌を抑制し、PLD依存性にプロセッシングを抑制することが示された。プロセッシング抑制は、糖尿病の進行により増強し、糖尿病ラットJG細胞では圧によって分泌が抑制されないため、糖尿病で血中プロレニンが増加する原因の一つであることが考えられた。

論文審査の要旨

腎臓の傍糸球体 (JG) 細胞においてレニンが産生・分泌されるが、JG細胞においてプロレニンからレニンへの成熟過程 (プロセッシング) さらにレニンの分泌機構の詳細は未だ明らかでない。本研究では、正常および糖尿病状態において、慢性圧負荷がレニンの産生・分泌にどのような影響を与え、その機構にsecond messengerであるphospholipase C (PLC) 阻害薬やphospholipase D (PLD) 阻害薬がどう関与するのか検討した。

本研究は雄のSDラットを用い、腎臓から分離した初代培養JG細胞を用いて研究した。まず、慢性圧負荷試験において、正常ラットのJG細胞のレニン・プロレニン分泌は抑制された。早期糖尿病におけるJG細胞では、プロセッシングのみが抑制され、慢性期糖尿病ではプロセッシングの抑制の程度がさらに大きかった。糖尿病ラットにインスリン治療をすると、プロセッシングの障害は改善された。次にPLC阻害薬とPLD阻害薬の投与実験では、PLC阻害薬は圧負荷によるレニン・プロレニン分泌の減少反応を抑制した。

以上の結果から、JG細胞への圧負荷において、PLC依存性経路でレニン・プロレニン分泌が抑制され、PLD依存性経路でプロセッシングが抑制されると結論した。また、糖尿病では圧負荷でプロレニン分泌が抑制されないため、血中に放出されて高値になっているとされた。

このような研究に関して実験方法はしっかりしており、得られた結果が興味深い。なぜtransmural pressureに特に注目し、生体内で通常みられている“ずり応力”と分けて実験したことに関して議論がなされた。生体内では輸入細動脈への圧と“ずり応力”がレニン分泌にきわめて重要であるが、分離して培養されたJG細胞は破壊されやすく、JG細胞へのtransmural pressureのみの影響でレニンへのプロセッシングや分泌への影響をみなかったためとされた。なお、圧負荷として大気圧+40mmHgとした点が大切な点であるとされ、この圧を用いた理由は、予備実験を色々な圧を用いて行ったところ、40mmHg以上の強い圧ではレニンが著明に低下してしまうため、妥当な圧として40mmHgを選んだことと、通常脈圧は40mmHg程度であることも考慮したとされた。このほか圧のかけ方として、static pressureとocillatory pressureとどちらが強く働くかが検討されるべきであったと助言された。

この研究の臨床的な意義についても議論があり、プロレニンが血中に沢山放出された場合の悪影響が問題となった。プロレニンは網膜や腎の細動脈に増加し、そこでnonproteolytic conformationを生じてレニンを放出して血管障害を惹起すると推測された。

論文として、考察が練れていない部分の訂正と語句の訂正が数カ所必要とされたが、研究は新規な点が多く糖尿病とレニンの関係について大変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 猿田 享男
泌尿器科学 村井 勝 医化学 末松 誠
内科学 小川 聡

学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成17年 3月 1日

Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.

(心筋梗塞後における間葉系幹細胞の動員および心筋細胞への分化)

藤田 淳

内容の要旨

骨髄幹細胞は、心筋梗塞後の心筋組織を再生することが報告されている。しかし、いかなる骨髄幹細胞が再生に関与するかは同定されていない。本研究では、生体内における骨髄幹細胞由来の心筋細胞の起源を明らかにするために2つの独立した実験を行った。第一にEGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) トランスジェニックマウス由来の造血幹細胞 (CD34陰性、c-kit陽性、Sca-1陽性、lineage陰性のtip SP (side population) 細胞) あるいは全骨髄細胞をドナーとして致死量の放射線 (1050Gy) を照射したレシピエントマウスに骨髄移植した。8週間後にドナー細胞の生着を確認した上で心筋梗塞を作製した。傷害部位に幹細胞をより動員させるために心筋梗塞作製後にG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) を10日間連日投与した。心筋梗塞作製8週間後にレシピエントマウスの心臓を組織学的に解析した。心筋組織100切片中、造血幹細胞移植群ではわずかに3個のEGFP陽性かつアクチニン陽性の心筋細胞を認めただけであったが、全骨髄移植群では5000個以上の心筋細胞を認めた。第二に細胞株化した間葉系幹細胞であるCMG (cardiomyogenic) 細胞をEGFPを組み込んだ遺伝子組み換えレトロウイルスのMSCVあるいは心筋細胞に特異的なプロモーターであるMLC-2v (Myosin Light Chain-2v) にEGFPを結合させたプラスミドを用いて形質転換した。これらの細胞を致死量放射線を照射したレシピエントマウスに直接骨髄腔内に骨髄移植した。MSCV-EGFPで遺伝子導入したCMG細胞は、多系統の細胞に分化することを確認した。酵素抗体法染色とPCRによって骨髄内にはEGFP陽性の細胞が確認され、その多くが脂肪細胞と芽芽細胞へ分化し一部は骨髄内で未分化状態で存在した。MLC-2v-EGFPを遺伝子導入したCMG細胞 (CMG-ME細胞) は、5-アザシチジン処理の10日後より6%の細胞が心筋細胞に分化しEGFP陽性となった。3週間後よりEGFP陽性細胞のほとんどがアクチニン陽性となり、4週間後より自発的な拍動を示す心筋細胞へ分化した。未分化なCMG-ME細胞を骨髄内骨髄移植したマウスに心筋梗塞を作製しG-CSFを10日間連日投与した。心筋梗塞作製8週間後の虚血心筋組織において100切片中1034個のEGFP陽性心筋細胞が観察された。CMG細胞が心筋梗塞後にG-CSFによって虚血心筋組織に動員され心筋細胞に分化したことがあきらかとなった。これらの結果より骨髄由来の心筋細胞は造血幹細胞起源の細胞ではなく、間葉系幹細胞由来であると考えられた。

論文審査の要旨

骨髄幹細胞は、心筋梗塞後の心筋組織を再生することが報告されているが、どの骨髄幹細胞が再生に関与するかは同定されていない。本研究では、生体内における骨髄幹細胞由来の心筋細胞の起源を明らかにするためにEGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) トランスジェニックマウス由来の造血幹細胞あるいは全骨髄細胞をドナーとして骨髄移植した。傷害部位に幹細胞をより動員させるために心筋梗塞作製後にG-CSF (granulocyte-colony stimulate factor) を投与し、8週間後にレシピエントマウスの心臓を組織学的に解析した。心筋組織100切片中、造血幹細胞移植群ではわずかに3個のEGFP陽性かつアクチニン陽性の心筋細胞を認めただけであったが、全骨髄移植群では5000個以上の心筋細胞を認めた。この実験より造血幹細胞の心筋細胞への可塑性は低いと考えられた。次に細胞株化した間葉系幹細胞であるCMG (cardiomyogenic) 細胞をEGFPを組み

込んだレトロウイルスあるいは心筋細胞に特異的なプロモーターであるMLC-2v (Myosin Light Chain-2v) にEGFPを結合させたプラスミドを用いて形質転換した。骨髄移植後にEGFPを発言したCMG細胞は、多系統の細胞に分化することを確認した。また、MLC-2v-EGFPを遺伝子導入したCMG細胞 (CMG-ME細胞) では心筋梗塞後慢性期の虚血心筋組織において100切片中1034個のEGFP陽性心筋細胞が観察され、CMG細胞が心筋梗塞後にG-CSFによって虚血心筋組織に動員され心筋細胞に分化したことがあきらかとなった。これらの結果より骨髄由来の心筋細胞は造血幹細胞起源の細胞ではなく、間葉系幹細胞由来であると考えられた。

審査では、マウス心筋梗塞モデル作成の具体的方法について質問がなされ、挿管、人工呼吸下で開胸し左冠動脈を結紮するモデルであり、人の心筋梗塞と機序は違うものの梗塞領域は人の心筋梗塞と同様の病理組織像を示し、心筋梗塞の病態生理の解析として有用なモデルであるとの回答がなされた。また、傷害モデルが骨髄幹細胞の分化にあたる影響についての質疑がなされ、骨髄移植モデルを用いた正常心筋組織の解析では骨髄由来の心筋細胞はほとんど認められず、傷害にともなう各種サイトカインが分化に必須であるとの回答がなされた。

G-CSF投与により血中に動員される細胞の種類、梗塞巣近辺に浸潤する骨髄由来細胞の種類について抗好中球抗体をはじめとする各種マーカーによって細胞の同定をする必要があるとの指摘がなされた。また、梗塞領域に慢性期においても多数浸潤している心筋細胞以外の細胞の性質についても詳細に検討する必要があるとの指摘がなされた。

次に骨髄幹細胞が梗塞巣へ浸潤する機序についての質疑がなされ、G-CSFによる間葉系幹細胞動員の機序はあきらかでないものの、MMPなどの液性因子が骨髄からの間葉系幹細胞動員に関与している可能性、血中に動員された骨髄由来の細胞が梗塞心筋からの各種サイトカインによって心臓へ誘導される可能性が高いとの回答がなされた。また、特異的なマーカーを用いて間葉系幹細胞の同定をし、間葉系幹細胞の可塑性について同様の実験を行う必要性を指摘された。

最後にG-CSFを用いた臨床応用への今後の課題についての質疑がなされた。今回の実験でG-CSF投与群では有意に骨髄由来心筋細胞の増加を認めたものの、その数は生存率および心機能の改善の点からは不十分であり、血管新生や抗炎症効果など他の作用の関与について詳細に研究する必要があること、およびマウス的心筋梗塞と違い動脈硬化の進んだ人ではG-CSFの投与によって血液の粘度が上がる可能性が示唆され、梗塞後の最適な使用時期を検討する必要があるとの回答がなされた。また、心筋梗塞後の機能改善のためにはより多くの心筋細胞を再生させる必要があると指摘された。

以上のように本研究は今後さらに検討すべき点はあるものの、傷害モデルにおける骨髄細胞からの心筋細胞への分化の機序における詳細な研究を行っており、心筋梗塞患者に対する幹細胞を用いた再生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 内科学 小川 聡
外科学 四津 良平 発生・分化生物学 須田 年生
病理学 岡田 保典
学力確認担当者: 北島 政樹、四津 良平
審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年 1月26日

Papanicolaou tests and molecular analyses using new fluid-based specimen collection technology in 3000 Japanese women.

(本邦3000例における液状検体を用いた細胞診と分子生物学的解析の有用性の検討)

舩 本 暢 生

内容の要旨

子宮頸癌スクリーニングの向上を目的に、子宮頸部擦過細胞浮遊液（液状検体）を用いた検体採取法が注目されている。液状検体は細胞診標本の質的向上を目的としたモノレーヤー標本の作製や子宮頸癌の発生に關与するヒトパピローマウイルス（HPV）の検出に用いられ、海外ではその有用性が報告されている。しかしながら、子宮頸癌スクリーニングにおけるモノレーヤー標本や液状検体を用いたHPV検出の有用性は本邦ではいまだ報告されていない。そこで本研究では本邦におけるこれらの有用性の有無を明らかにすることを目的とした。

対象は当科を受診した患者3000例とした。子宮頸部擦過細胞を採取、塗抹標本作製した後、採取器具であるサーベックスブラシを保存液に攪拌し液状検体を作製した。液状検体の一部からモノレーヤー標本作製し、塗抹標本と精度を比較した。組織診を施行した477例に対し簡便なHPV検出法であるハイブリッドキャプチャー2法（HC2法）にてハイリスク型HPVの検索を行い、組織診にて子宮頸部腫瘍が検出された146例に対しPCR法にてHPVの検出・型判定を行った。

塗抹標本とモノレーヤー標本の細胞診一致率は96.8%と良好であった。モノレーヤー標本の子宮頸部腫瘍に対する感度（73.9%）は、塗抹標本（75.7%、 $P=0.22$ ）やHC2法（76.3%、 $P=0.56$ ）と有意な差を認めなかった。型判定の検討の結果、高度異形成以上の病変においてHPV16型、HPV52型は他の型より高頻度に検出された（ $P<0.00001$ 、 $P<0.01$ ）。また腺癌病変においてはHPV18型が高頻度に検出された（ $P<0.001$ ）。

モノレーヤー標本は塗抹標本と同等の感度を示し、塗抹標本と同様に子宮頸部腫瘍のスクリーニングに有用であると考えられた。しかしながら、HC2法単独による子宮頸部腫瘍に対する感度の向上は認められなかったことから、本邦においては細胞診が組織型の推定などの情報が得られる点でHC2法より有用であると考えられた。一方、PCR法による型判定では、HPV16型、HPV52型が高度異形成以上の病変で、高頻度に検出されることが判明した。従って、これらのHPVが検出された患者においては、より綿密な経過観察が必要であることが示唆された。しかしながらPCR法は手技が煩雑であるため、簡便なHPV検出法であるHC2法がPCR法施行前のHPVのスクリーニングに有用と考えられた。

本研究は液状検体による細胞診、HPV検索の有用性を評価した本邦で初の大規模な研究である。液状検体は従来の塗抹細胞診標本と同等な細胞診標本を提供でき、さらには必要に応じてHPVの検出に利用することが可能であった。この検体採取法は、HPV感染を検出するだけでなく、必要に応じてHPVの型判定を行うなど子宮頸部腫瘍の高危険群の抽出にも有用となる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

近年欧米では、子宮頸癌スクリーニングの向上を目的として、子宮頸部擦過細胞浮遊液（液状検体）から作製されるモノレーヤー標本が導入され、従来の塗抹標本と比較し感度が高いと報告されている。一方子宮頸部腫瘍で高頻度に検出されるヒトパピローマウイルス（HPV）はハイリスク型のHPVで、このハイリスク型HPVを簡便に検出するハイブリッドキャプチャー2法も、すでに米国で子宮頸癌スクリーニングに導入されている。本邦ではスクリーニングに塗抹標本を用いており、モノレーヤー標本や液状検体を用いたHPV検査法の有用性についてはいまだ報告されていない。そこで本研究では、子宮頸癌スクリーニングにおけるこれらの方法の有用性について検討した。モノレーヤー標本は鏡検しやすいう上に従来の塗抹標本と同等のスクリーニング感度を有した。ハイブリッドキャプチャー2法は細胞診標本と同等のスクリーニング感度を有し、HPVの簡便な検出法としての有用性が有ると考えられた。PCR法によるHPVの型判定では子宮頸部腫瘍の上位病変でHPV16型、HPV52型が多く検出されることが判明した。

審査ではまずモノレーヤー標本に関する世界と本邦の現況についての質問がなされ、米国では細胞診の60%程度でモノレーヤー標本が使用され、1996年にFDAで認可されて以来すでに1億検体以上が判定されているが、本邦ではモノレーヤー標本はいまだ導入されていないと回答された。また各スクリーニング法の特異度についての質問がなされ、モノレーヤー標本（84.6%）や塗抹標本（84.6%）がハイブリッドキャプチャー2法（72.1%）より有意に高値を示したと回答された。さらにHPVと腺癌病変との関連についての質問がなされ、これまでの報告と同様に本研究でもHPV18型が多く検出されたと回答された。一方液状検体のゲノムDNAの断片化の意義については、断片化の程度とPCRにおける至適template量についての関係の検討は評価できるものの断片化の原因についてさらに検討するよう助言がなされた。またPCR法とハイブリッドキャプチャー2法の一致率がCINIで低い背景について質問がなされ、HPV-DNAのコピー数が少ない症例が含まれる可能性があることやPCR法がより感度の高いHPV検出法であることが原因として考えられると回答された。これに対し、腫瘍細胞と比較してHPV-DNAのコピー数の少ない症例におけるHPV感染と病変との関連についてin situ hybridizationなどを行い検討するべきであるとの助言がなされた。

以上のように本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、本邦で初めて子宮頸癌スクリーニングにおけるモノレーヤー標本や液状検体を用いたHPV-DNA検査の有用性を検討した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
病理学 坂元 享宇 病理学 岡田 保典
臨床検査医学 渡辺 清明
学力確認担当者：北島 政樹、坂元 享宇
審査委員長：坂元 享宇
研究指導者：野澤 志朗（産婦人科学）

試問日：平成17年 1月24日

Bernard-Soulier syndrome with a homozygous 13 base pair deletion in the signal peptide-coding region of the platelet glycoprotein Ib β gene.

(血小板膜糖蛋白GPIb β 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域に13塩基のホモ接合性欠失を認めたBernard-Soulier症候群)

渡部 玲子

内容の要旨

Bernard-Soulier症候群(BSS)は、稀な遺伝性出血性疾患のひとつであり、病因としては、血小板膜表面蛋白GPIb/IX複合体の質的、量的な異常が考えられている。今回我々は、著明な出血のエピソードを繰り返すBSSの一家系の、蛋白、mRNA、遺伝子の解析を行い、GPIb/IX複合体の受容体としての機能のみならず、血小板産生や形態形成における役割について考察した。

発端者は24歳男性で幼少時より皮下出血、鼻出血を繰り返していた。血小板数は3.5万/ μ lと減少し、鏡検で巨大血小板を認め、出血時間延長、血小板機能検査でリストセチン凝集の欠如を認めた。姉にも同様の出血症状を認めたが、父母には認められなかった。

電顕による解析では、発端者血小板の内部構造の異常(巨大 α 顆粒の存在)を認めた。特異抗体を用いたフローサイトメトリー法では、GPIXの血小板膜表面への発現が著減し、GPIb α とGPVもやや減少していた。免疫プロット法による解析では、血小板GPIb β /GPIXは検出されず、GPVも減少し、GPI α はごくわずかに検出された。またELISA法による発端者血漿中の可溶性GPIb α 量は著減していた。

単核球から分離したゲノムDNA解析ではGPIb β 遺伝子のシグナルペプチドをコードするアミノ酸-9の部位に13塩基の欠失が認められた。この欠失によりフレームシフトが生じ、異なる22アミノ酸配列の後停止コドンが生じ、GPIb β の完全欠損を生じたと考えられる。PCR法によりこの欠失部位を含んだ部位を増幅したところ、発端者と姉では236塩基、健常者では249塩基のDNA産物が得られたが、両親の検体では両者が得られ、ヘテロ接合性にこの欠失を保因していると考えられた。血小板mRNAのRT-PCRを行なったが、同様の欠失を認めた。

GPIb/IX/V複合体におけるGPIb β の機能は詳細には知られていない。ジスルフィド結合によってGPIb α と結合すること、細胞内領域のI66Serのprotein kinase Aリン酸化部位が、刺激に対する血小板細胞骨格の変化に関与することが想定されている。GPIb β の欠損した本例において、電顕所見での巨大な α 顆粒の存在が認められたことは興味深い。これまでのBSS症例で、GPIb α 、GPIXの異常は多いが、GPIb β の異常は4例のみ報告されている。いずれも本症例とは異なる遺伝子異常であるが、血小板膜表面への特にGPIXの発現にGPIb β は必須である可能性が示唆されている。本例でもGPIX発現量は高度に、GPIb α はやや減少していたことがこれまでの報告と一致する。

本研究においてGPIb β 遺伝子に新たな変異を認めたBSS患者の血小板を解析することにより、血小板造血、形態形成や機能発現におけるGPIb β の役割を探求する上で重要な知見を得た。

論文審査の要旨

稀な遺伝性出血性疾患であるBernard-Soulier症候群(BSS)の一家系の遺伝子解析を行った。BSSは血小板膜糖蛋白GPIb/IX/V複合体の量的、あるいは質的異常を認め、巨大血小板の出現、リストセチン凝集や血小板粘着能の欠如を来す。GPIb/IX/Vを構成する4つのサブユニットのなかで、本例ではGPIb β 遺伝子異常(シグナル遺伝子の欠失)により、GPIb β 蛋白を完全に欠損していることが明らかになった。他のサブユニット蛋白発現を検討したところGPIXの発現が認められず、GPIb α の著減、GPVの減少を認めた。GPIb β の機能については未だに不明な点が多いが、GPIb/IX/V複合体の血小板膜上への発現に必須であることが明らかとなった。また発端者血小板の電子顕微鏡観察では α 顆粒の巨大化が認められ、血小板顆粒形成にもGPIb β が重要な役割を果たすことが示唆された。発端者とその姉はホモ接合体でBSSを発症しているが、両親はヘテロ接合体で血液学的異常を認めなかった。

審査ではまず、BSS症例での血小板数の減少、巨大化は、産生過程が問題なのか、破壊が亢進するのかなどの質問がなされた。稀な疾患であり、血小板の体内動態について検討されていないが、脾摘後にも血小板数の改善の見られない例が散見され、GPIb/IX/V複合体が細胞骨格蛋白に結合し形態保持に重要な役割を果たしていることを考えると、血小板生成過程の異常が主に推測されると回答された。発端者の血小板膜表面のGPIb α が一部血小板で正常に発現しているように認められる理由について質問があった。その理由は明らかではないが、発端者血漿中の可溶性GPIb α が微量に検出されており、GPIb α が単独でも血小板膜上へ発現し得る可能性も考えられると回答された。GPIb β 遺伝子は染色体22q11.1に位置するが、BSSでは他にごのような異常が生じる可能性があるか、との質問がなされた。22q11.1の微小欠失によりDiGeorge症候群を発症し、胸腺形成不全、外表奇形、精神神経異常などを生じることが知られ、これまでに複合ヘテロ接合体にてDiGeorge症候群とBSSを合併した報告があると回答された。また α 顆粒の巨大化はなぜ生じたのかなどの質問がなされた。GPIb β 遺伝子のN末端近傍にあるSeptin遺伝子が血小板の放出反応に関係し、GPIb β 遺伝子のノックアウトマウスのモデルにおいて形態学的に血小板 α 顆粒が大型化するという報告があることから、本例においてもこのSeptinの関与の可能性が考えられ今後さらに検討が必要であると回答された。

以上のように本研究では今後検討されるべき課題を残しているものの、稀な症例の遺伝子解析を通して血小板生成過程・機能発現におけるGPIb β の役割の一部を解明した点で、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 池田 康夫
分子生物学 清水 信義 医化学 末松 誠
先端医科学 河上 裕
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 3月 1日

Establishment of an immortalized porcine granulosa cell line (PGV) and the study on the potential mechanisms of PGV cell proliferation.

(不死化ブタ顆粒膜細胞 (PGV) の樹立とPGV細胞の増殖機序の研究)

林 明 徳

内容の要旨

妊娠が成立するためには卵巣における卵胞発育および排卵が必須であり、さらに卵胞発育にとっては卵胞刺激ホルモン (FSH) による顆粒膜細胞の増殖が不可欠である。しかし、顆粒膜細胞を培養すると程度の差はあれ機能的・形態的に黄体化し、また培養顆粒膜細胞の細胞分裂は1回程度しか起きないため、顆粒膜細胞の増殖機序の研究はprimaryの培養顆粒膜細胞では困難である。さらに顆粒膜細胞の培養実験のためには、実験の都度卵巣より顆粒膜細胞を採取しなければならず、またcell populationが異なるためか実験成績が一定しないことがしばしば経験される。従って、顆粒膜細胞の研究にはcell lineがあれば非常に有用である。そこで本研究は、SV40を用いて不死化ブタ顆粒膜細胞株を樹立し、さらに得られた不死化ブタ顆粒膜細胞の増殖に関する細胞内刺激伝達系を検討することを目的とした。

実験方法としては、ブタ卵巣の小卵胞 (直径1~2 mm) より顆粒膜細胞を吸引採取し、培養後種々の濃度のSV40を感染させた。その結果4週後に1コロニーが発育し、それを以後2日毎に植え継いだところ、300日以上培養しても生き続ける不死化ブタ顆粒膜細胞株 (PGV) を樹立できた。そしてPGV細胞にはSV40 large T antigen遺伝子とその蛋白が発現していることを確認した。しかしPGV細胞はFSHやforskolinにて刺激してもプロゲステロンを産生せず、その原因としてステロイド生合成の律速酵素であるチトクロームP450側鎖切断酵素が発現していないことが明らかになった。なおPGV細胞のプロゲステロン産生能はレチノイン酸によっては回復しなかった。しかしながらPGV細胞数は血清 (ウシ胎児血清とウマ血清) およびprotein kinase C (PKC) 促進剤 (phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と1-oleoyl-2-acetyl-glycerol) によって濃度依存性に有意に促進され、これらはPKC抑制剤 (staurosporineとcalphostin C) によって濃度依存性に抑制された。ゴナドトロピン、増殖因子、PKA促進剤、カルシウムイオノフォア等によっては、実験した範囲ではPGV細胞数は影響を受けなかった。PKCはdiacylglycerol (DAG) によって活性化されることから、DAG合成酵素であるphospholipase C (PLC) の抑制剤U73122とphosphatidic acid phosphataseの抑制剤propranololによって共にPGV細胞数は有意に減少し、これらのPGV細胞増殖の抑制はPMAの同時添加によって有意に回復した。

以上の成績より、PGV細胞の増殖に関する細胞内刺激伝達系としてはPKCが重要な役割を果たしていること、さらにPGV細胞ではPKC活性化物質であるDAGはPLC系と共にPLD系によっても産生されていることが強く示唆された。

このように不死化ブタ顆粒膜細胞 (PGV) はcell populationが一様であり、かつ実験したいときにはたくさん手に入る、顆粒膜細胞増殖の研究にとっては非常に有用な細胞であると考えられた。

論文審査の要旨

本研究では、SV40を用いて不死化ブタ顆粒膜細胞株 (PGV) を樹立し、得られたPGV細胞の増殖に関する細胞内刺激伝達系を検討した。その結果PGV細胞はプロゲステロンを産生せず、ステロイド生合成の律速酵素であるチトクロームP450側鎖切断酵素が発現していないことが明らかになった。しかし、PGV細胞増殖は血清やprotein kinase C (PKC) 促進剤によって濃度依存性に促進され、この増殖促進はPKC抑制剤によって濃度依存性に抑制された。ゴナドトロピン、増殖因子、PKA促進剤、カルシウムイオノフォア等によっては、検討した範囲では、PGV細胞数は影響を受けなかった。さらに、diacylglycerol (DAG) 合成酵素であるphospholipase C (PLC) 抑制剤とphosphatidic acid phosphatase抑制剤によってPGV細胞数は有意に減少し、これらのPGV細胞増殖の抑制はPKC促進剤の同時添加によって有意に回復した。以上の成績より、PGV細胞の増殖に関する細胞内刺激伝達系としてはPKC系が重要な役割を果たしていること、さらにPGV細胞ではPKC活性化物質であるDAGはPLC系と共にPLD系によっても産生されていることが強く示唆された。

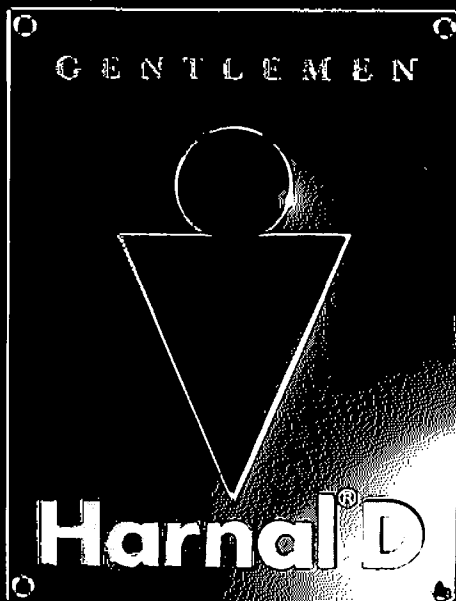
審査では、PGV細胞がステロイドホルモンを産生しないため、顆粒膜細胞由来であるか否かが問題となった。ステロイド産生能を有していれば顆粒膜細胞由来である可能性が非常に高いが、本研究では比較的顆粒膜細胞の膜抗原に対する特異的な抗体によって染色されること、卵胞より吸引して得られる細胞は顆粒膜細胞であることから、得られたPGV細胞は顆粒膜細胞由来である可能性が高いことが推測されているが、さらなる検討が必要である旨指摘された。次いで、PLC抑制剤によって細胞が減少する結果は細胞増殖の抑制ではなく、細胞が死滅している可能性はないかが問題となった。これに対しては細胞数を算定する際には死細胞の割合等を常に注意して実験していること、さらには抑制された細胞数を増殖刺激により細胞数を回復できることなどから、細胞死ではないと考えられると回答された。また、プロゲステロンを分泌しない理由については、他の酵素 (そのmRNAを含む) の発現に関する質問があったが、今後の課題とされた。なお、他の研究者が不死化した顆粒膜細胞の使用経験に関する質問が出されたが、提供された不死化顆粒膜細胞で本研究と同様の実験を行ったところ、ほぼ同様の結果が得られている旨回答した。なお、審査当日は回答が不十分であったので、後日書面にて説明文を提出し、了解された。

本研究はさらに検討すべき課題を残しているものの、不死化ブタ顆粒膜細胞 (PGV) はcell populationが一様であり、かつ実験の希望時に入手できるといったことより、顆粒膜細胞増殖の研究にとっては有用な細胞であると考えられ、困難であった顆粒膜細胞の増殖の研究に対する一つの手がかりを与える有意義な研究と評価された。

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

試問日: 平成17年 3月15日

ハルナールD錠、 口腔内崩壊錠で 新登場。



- ◎のみやすい口腔内崩壊錠なので、
これまで以上の服薬コンプライアンスが期待できます。
- ◎水なしでも服用できるので、お年寄りでも嚥下困難な
患者さんや、水分制限のある患者さんにも適しています。
- ◎微小な徐放性粒子の開発で、サラッとした服用感を実現しました。
- ◎ハルナールカプセルと生物学的に同等で、有効性・安全性は同じです。

【禁忌(次の患者には投与しないこと)】(抜粋)

- (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

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

【使用上の注意】(抜粋)
1. 慎重投与(次の患者には慎重に投与すること) (1) 起立性低血圧のある患者(症状が悪化するおそれがある。)(2) 重篤な肝機能障害のある患者(血漿中濃度が上昇するおそれがある。)(3) 重篤な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)

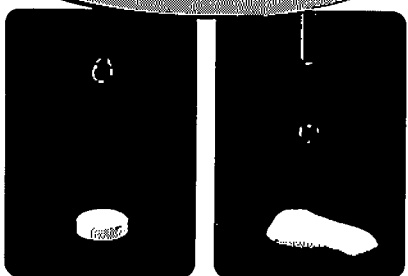
2. 重要な基本的注意 (1) 本剤が口腔内で崩壊するが、口腔の粘膜から吸収されることはないため、唾液又は水で飲み込ませること。(2) 本剤の過剰投与により血圧低下が予想されるので、投与量には注意すること。(3) 立位血圧が低下することがあるので、体位変換による血圧変化に注意すること。(4) 本剤による治療は原因療法ではなく、対症療法であることに留意し、本剤投与により期待する効果が得られない場合は、手術療法等、他の適切な処置を考慮すること。(5) めまい等があらわれることが

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。(6) 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、クエン酸シトルデナフィル
4. 副作用 ハルナールカプセル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、ハルナールカプセル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。(ハルナールカプセル再審査終了時) (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。

■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。

近日発売



前立腺肥大症の排尿障害改善剤(α₁受容体遮断剤)

ハルナール[®]D錠 0.1mg / 0.2mg

指定医薬品、処方せん医薬品(注意-医師等の処方せんにより使用すること)

塩酸タムスロシン口腔内崩壊錠

薬価未収載

製造販売 アステラス製薬株式会社
東京都板橋区蓮根3-17-1

【資料請求先】本社/東京都中央区日本橋本町2-3-11

05/4作成.A4.A.01

2005年4月1日、山之内製薬と藤沢薬品は、アステラス製薬になりました。