

第82卷第3号  
平成17年  
9月

# 慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

## 解説

●重要文化財に指定された塾所蔵の貴重書『解剖存真図』……………安田健次郎……(109)

## 講座

●脳循環代謝に関する最近の知見：

ニューロン-アストロサイト-微小循環のネットワーク……………高橋 愼一……(119)

●最新の腰痛治療……………千葉 一裕……(129)

## 原著論文

●慶應義塾大学病院における35年間の腎生検—概略と膜性腎症例の詳細検討— ……浅井 昌樹……(143)

## 学位論文

●ヒト精漿および精子内のクレアチンキナーゼアイソザイムについての検討……………宮地 系典……(T207)

●子宮内膜症が卵巣明細胞腺癌に与える生物学的影響—Transforming growth factor-beta 1とそのレセプターおよびurokinase type-plasminogen activatorの関与を中心として—  
……………小宮山愼一……(T217)

●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……(T231)

●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……(T245)

●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……(T257)

●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……(T269)

●子宮体癌の糖鎖発現異常におけるフコース転移酵素の関与とその転移能への影響 佐久間雄一……(T285)

## 号外

●博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第177号)……………(別頁)

## 第85回慶應医学会総会・シンポジウム

日 時 平成17年11月11日(金) 15時～18時30分  
場 所 慶應義塾大学病院 新棟11階大会議室  
主 催 慶應医学会  
共 催 慶應義塾大学医学部

15:00 開会の辞 会 長 慶應義塾大学医学部長  
15:05 総会議事, 三四会奨励賞授与式

### シンポジウム『医療提供体制の改革』

司会 池上 直己 (慶應義塾大学医学部医療政策・管理学教授)

16:00～16:40

#### I. 基調講演

岩尾總一郎 (前厚生労働省医政局局長)

16:40～17:00

#### II. 「新医師臨床研修制度施行1年半をすぎて」

宇都宮 啓 (厚生労働省医政局医事課医師臨床研修推進室長)

17:00～17:20

#### III. 「国立病院機構はどうか変わったか」

矢崎 義雄 (独立行政法人国立病院機構理事長)

17:20～17:40

#### IV. 「医療提供体制の改革—日本医師会の立場から」

櫻井 秀也 (日本医師会副会長)

17:40～18:15

発表者間のディスカッションならびに聴衆者との質疑応答

入場無料・参加自由

お問合せ先：慶應医学会事務局

新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部内

電話 03-5363-3736

FAX 03-5361-7091

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

解 説

重要文化財に指定された塾所蔵の貴重書

『解剖存真図』

慶應義塾大学名誉教授

やす だ けんじろう  
安 田 健次郎

Key Words : 人体解剖図譜, 江戸時代後期, 医師自身解剖・描画

はじめに

平成 15 年 4 月に慶應義塾の所蔵する貴重書の中の『解剖存真図』が、文化庁から重要文化財の指定を受けた。人体解剖図の絵巻物であり指定の理由は『本書は実見の成果と蘭書からの知識に基づく総合的な解剖図集で、江戸時代の実証的解剖図の到達点を示す資料として、我が国医学史上大変意義が深い』である。1920 年代に下谷の文行堂から購入した。義塾としては九番目、図書館所蔵の資料としては四番目の重要文化財指定である<sup>1, 2)</sup>。

本図は徳川幕府奥医師である桂川甫賢（桂川家第六代）が所蔵していたものである事が確認されている。そして収納箱の蓋裏書によると大正 14 年（1925）に慶應義塾の所蔵となっている。写本としては西尾市立図書館岩瀬文庫、東北大学狩野文庫、京都大学付属図書館、武田科学振興財団にその存在が知られている<sup>3)</sup>。

著者および図の作製経過

この図譜は文政 2 年（1819）に淀藩（山城国，稲葉藩）の江戸勤め藩医である南小柿寧一（みながきやすかず、天明 5 年・1785～文政 8 年・1825）が描いたもので全 83 図が乾坤二本の巻き物になっている。南小柿寧一は南祐と称す。字は清人、号は西崖、通称は良祐。本図譜の附言の本人署名および師の桂川甫周（桂川家第四代）の記念灯籠に刻まれた門下生としての名は甫祐寧一である。36 才の時この図譜を出版し 41 才でこの世を去った。江戸時代の解剖図譜としては内容が最も豊富で充実し色彩が実物に近いと評価されている<sup>4, 5)</sup>。南小柿は幕府の奥医師桂川甫周（第四代）について蘭方外科を学び、師の奨めによって腑分に参加し、この解剖図集を

作製した。腑分観察の場所は関西の刑場の可能性もあるが、本人は幼少の頃から江戸に住んでいたらしいので、おそらく大部分の絵は小塚原（現南千住）の刑場に通り刑屍 40 体以上の解剖を観察して描いたものであろう<sup>6)</sup>。図譜の作成には十数年かかったと言われる。しかも一屍毎に一臓一腑を見て「一屍毎に必ず真を写す」主義で臨んで詳細に写生し、臓器の色彩が時間の経過にしたがって変化する事を知っており新鮮な臓器を真実に近い色彩で描く事に努めたと伝えられる。一体の解剖につき一臓一腑のみを写生した事は一体の解剖ごとに意識を集中して丁寧に観察し正確に描写しようとした心構えを反映している。同時に、公許の下での活動であっても、刑場に長時間滞在する事は許されないという事情もあったであろうし、また当時、腑分には役人等数人が取り巻いて存在しており、一人だけが時間をかけて観察出来る状況ではないという事情もあったであろう。

図譜の構成

乾坤の二巻よりなる（第 1 図）。

●乾巻

序文

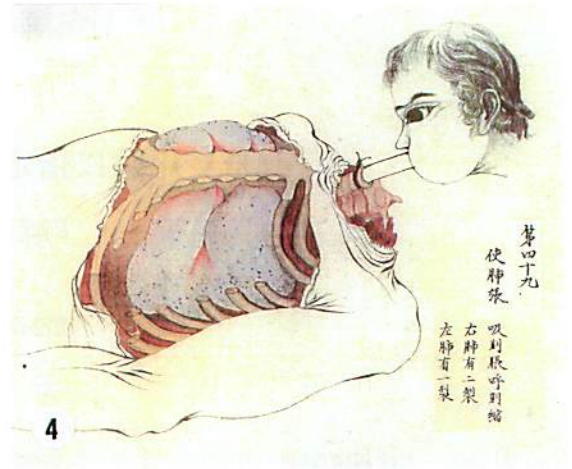
巻頭に桂川甫賢の漢文による解剖存真図引（序文）がある。寧一は若い時から月池先生（桂川家第四代甫周）に師事して外科を修め解剖の術を学んだ事、天文地理にも通じ、多識であり、加えて絵画に長じている事、桂川家にある小石氏の解剖図（註：小石元俊等作、平次郎解剖図と施業院解男体臓図、説明後記）を賞賛したが精微を窮尽くしていない事を惜しんだ事、などが記されている。文末の署名は

Gedaan door Dr. W. Botanicus.

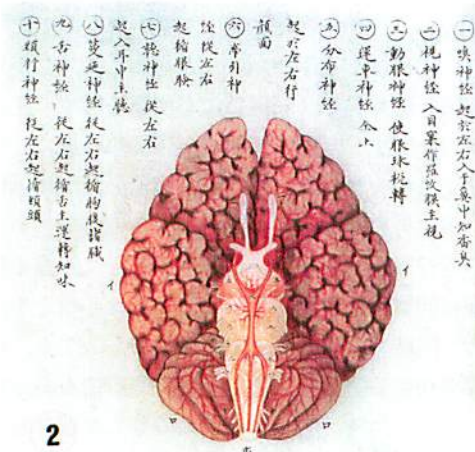




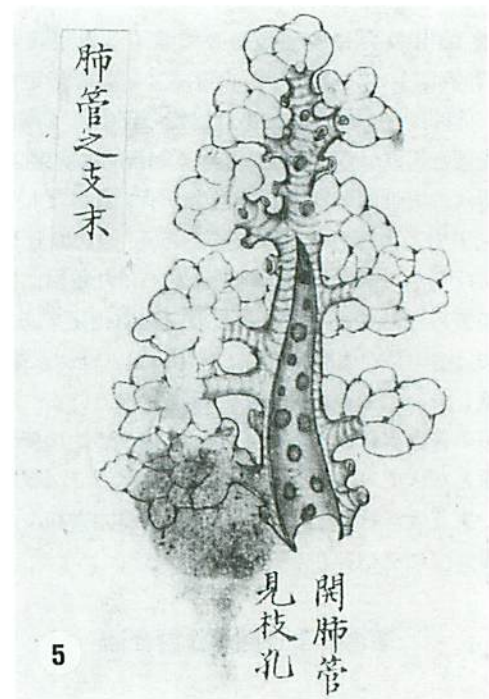
第1図 解剖存真圖 乾坤二卷の外観



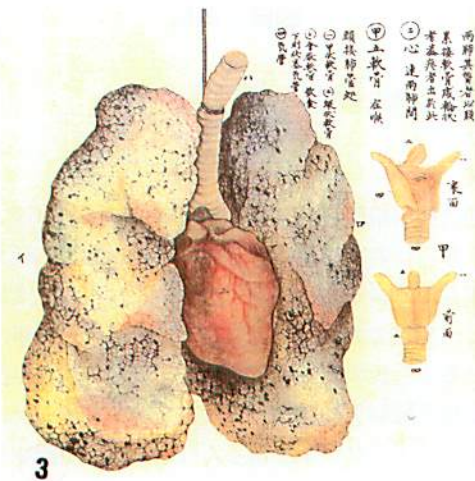
第4図 肺に空気を吹き込む図



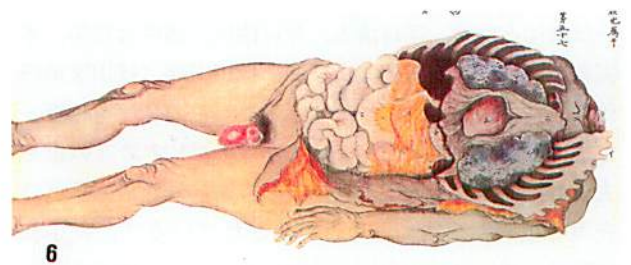
第2図 腦の底面 回と溝, 腦神経の出る部位



第5図 気管支枝と肺胞

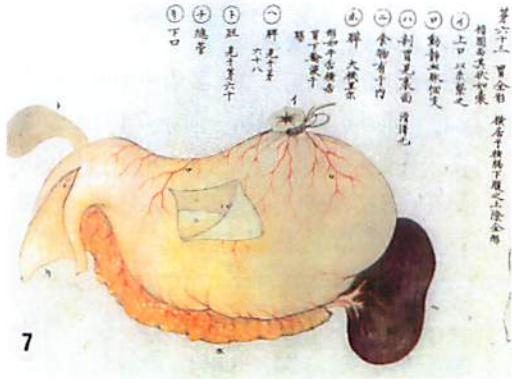


第3図 胸部内蔵前面と喉頭軟骨

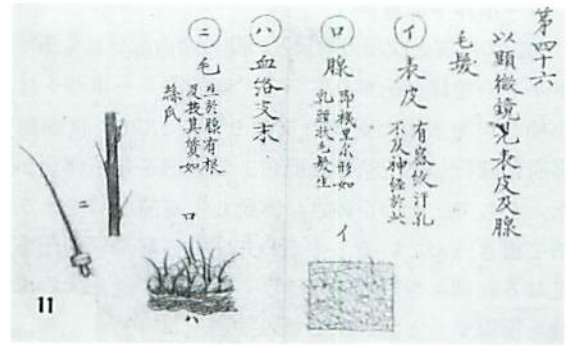


第6図 胸部および腹部内蔵前景

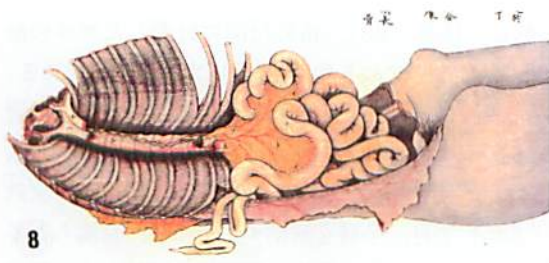




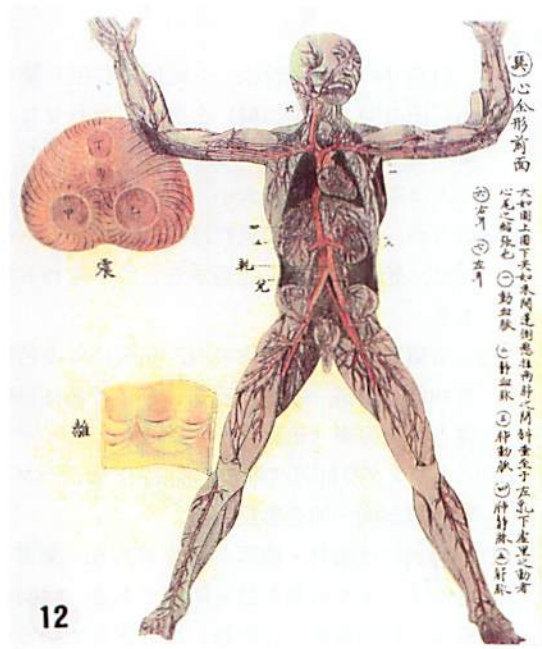
第7図 胃、脾臓と脾臓



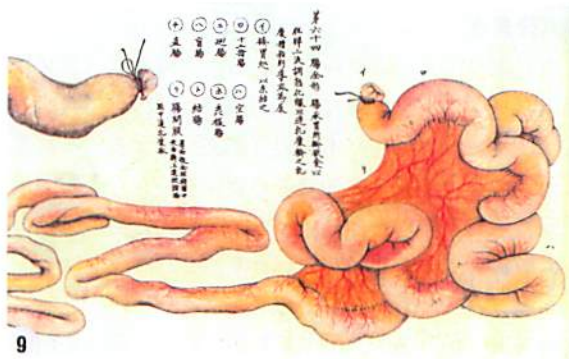
第11図 表皮，毛，皮膚の腺の顯微鏡図



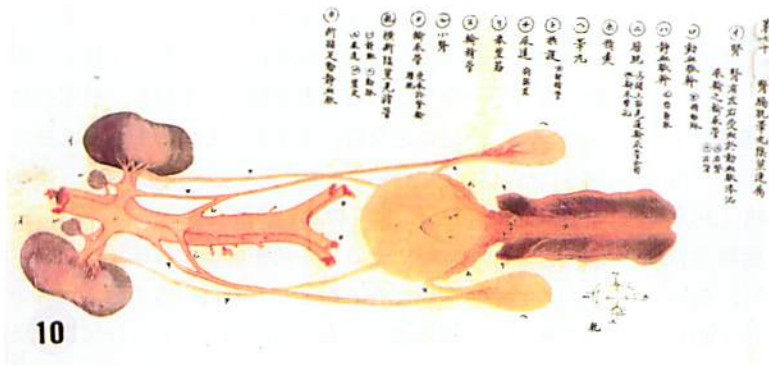
第8図 乳槽，胸管と小腸，大腸の一部



第12図 全身の動脈系



第9図 小腸，小腸間膜と大腸の一部



第10図 男性の泌尿生殖器全景



第13図 女性生殖器と精子の顯微鏡図

### シーボルトの賛辞

前記の序文と次項の附言との間の余白部分に朱筆でシーボルトの賛辞が記されている。商館医シーボルトは、南小柿が世を去った翌年(文政9年、1826)に商館長の参府に随行して上京した際にこの図譜を見る機会があった。そして、その正確さに感動し、賞賛の辞をオランダ語で書き込んでいる。すなわち「この解剖学的仕事は非常なる勤勉さを以て成し遂げられたるが故に大いなる賞賛を獲得す」と記されている。

### 附言

次いで寧一自身の漢文による附言がある。五項目からなる。

- (一) 自ら44屍を解剖し、一屍毎に写生し蘭本及び小石氏の図(前記二編)と照らし合わせた。一屍について一臓一腑を詳しく観察した。
- (二) 人は屍の諸臓器の大小、色は生体とは異なるというが、死後早期に見れば生体とは異ならない。ただ、死後長時間を経過すると色が変わるだけである。
- (三) 諸臓器・組織の名称の内、漢医以外の名称である神経、靭帯、繊維、前綫などの新名は皆解体新書と医範提綱(後記)から採った。
- (四) オランダ解剖図六冊(名称後記)と、ハンガリー着色解剖図一冊を参照した。
- (五) 解剖には道具・機器が必要である。蘭書の中でもヘイステルの書が最も明解である。以前に桂君梅街(桂川家第六代甫賢)が翻訳しているのでそれを記する。

第一次：大卓、直刀及び薙刀、鉗、鉤、消息子など六種類。

第二次：鋸、屠刀、槌など五種類と大小管など。

第三次：顕微鏡、蠟および汞を脈管等に注入する管数本、銅線、気機、血脊による汚染を防ぐ外衣など。

### 次目(図譜の内容の見出し書き)

注：一部の説明には現代の用語を使用した。(以下カッコ内に図の番号のみを記載)

中枢神経系：脳・脳神経(1~10)、末梢神経系：全身神経(11)、感覚器：眼球(12~13)、耳(14)、舌(15)、筋：頭頸部(16~24)、胸部(25)、腰部(26)、手(27~29)、足(30~32)、足の筋、神経、動静血管(32~33)、骨：頭部の全骨(34~36)、手(37)、胸肋骨(38)、胛骨(39)、脊椎(40~41)、足の諸骨(42)、支柱全骨(43)。

### ●坤巻

#### 次目(図譜の内容の見出し書き)

注：一部に現代の用語を使用、また説明を加筆した。

断首の痕(44)、腹部の皮下脂肪・血脈(45)、顕微鏡図(表皮、腺、毛髪)(46)、胸部全景(47)、肺(48~51)、心・脈管(52)、腹筋・腹膜(53)、腸網(大網55、56)、肝・胆(57~60)、門脈(61~62)、胃・脾・腸(63~65)、乳糜(66)と再び乳糜(67、Palfynの解剖書より転写)、脾(68)、腎・膀胱(69~72)、睾丸(73)腎の水脈(リンパ管、74、Palfynの解剖書譜より転写)、婦人陰器全景(75、Smellieの解剖書より転写)、腰骨(76~77、Smellieの解剖書より転写)、子宮(78~80、80の中に精子の顕微鏡図)、胎児(81~82)、胞衣・臍帯(83)。番外付図に妊娠したサル(84)の解剖図四図がある。文政5年(1821)2月の所見である。図譜の完成後に付け加えられた図であり鼓蘭堂主人の署名がある。南小柿寧一と如何なる関係にあるのか、本人であるのか不明である。次のような記事がある。「文政壬午(5年)2月、孕猿を解剖す。その胎、月満ちたる者の如くにして、子宮、胞衣、諸臓器の連続、人と異なる無し。予、細かにその形状を写し、以て巻端に付す鼓蘭堂主人」。

#### 跋(後書き)

次の五編の跋文が寄せられている。大槻玄沢(漢文)、宇田川玄真(オランダ語)、杉田立郷(オランダ語)、大槻玄幹(漢文)及び佐々木中沢(漢文)による。それぞれに医学における解剖の知識の必要性を説き、人体内景を明確に示した図譜を作成した寧一(寧一)の努力とその図譜の優秀さを讃えている。各跋につきそれぞれ一部を次に記す。

◆大槻玄沢(仙台藩医、医学を杉田玄白に、蘭語を前野良沢に学ぶ、重訂解体新書などの著者)：「磐水漫草」にもある解剖存真図跋には次のように記されている。「余嘗て荷蘭解剖諸図を見る。既に数十部に及ぶ。未だ嘗てその精巧緻密に嘆服せざる事あらざるなり。ただ未だ、その諸器を彩って、その真形を存し、人をして親しく実物を視る想いをなさしむる者を見ざるを恨む。桂家の社の南寧一、亦己に之を視、手ずからその図を撫し、且つ補うに他の解剖諸図を以てす。又、自ら新図を製し、屢々諸を解屍に徴し、毎にその本色を改潤す。積年の久しき、解剖存真図成れり。把りてこれを展開すれば、屹然として躬親しく解剖場に在るが如し。其の丹青の妙、篤好の志蔚然として幅に満つ。奇なりと謂うべし。桂家累世英才を教育す。寧一は蓋しその選という。実に欽仰すべきかな」。後略。

◆宇田川玄真（伊勢の医師，医範提綱の著者，緒方洪庵の第二番目の師）：Palfyn の語を引用し，病因を知らないで病気を治す程困難なことはない，しかるに解剖学的知識なしに病因を知ろうとすることは更に困難であると記している。

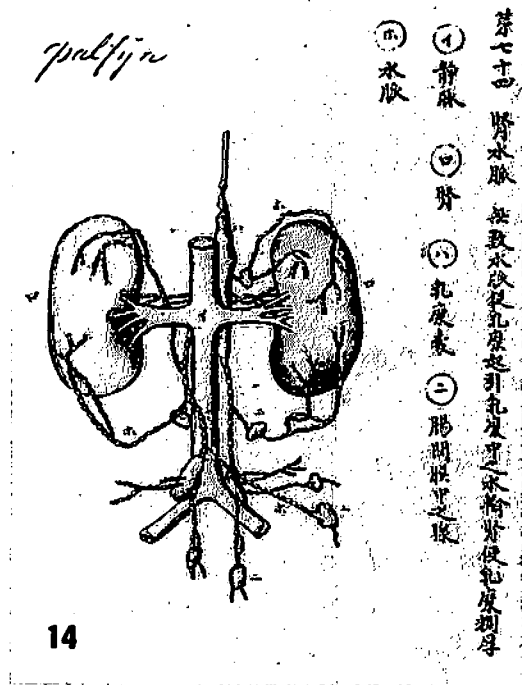
◆杉田立郷（若狭藩医，杉田玄白の子）：医師が解剖学を知らないで病を治すことは，盲人が盲目の馬に乗って夜歩くのと同じであり，外科医も内科医もまず人体の部分を正確に知らなければならない。

◆大槻茂禎（大槻玄沢の子，磐里）：賛辞を大槻如電の「新撰洋学年表」の中にも記している。一部を紹介すると次の通りである。「巻を展いて之を観るに，その畫描する所，人身内外諸部，三腔十器，粲然として備え具す。その大小曲直，幽密陰顕，色彩之濃淡，殆んど真物に逼る。寧一，曾つて西洋の解剖図若干部を挙げ，その善なる者に従ひて校讎繕写し，親しく自ら解屍の場に臨みて照鑒し，その然らざる者は塗抹すること亡慮数十度。嗚呼勤めたりと謂ふべき也。中略。寧一，故月池先生の高足の弟子なり，今都下に於て一家を成す（日本橋にて医業に従事）。後略。

◆佐々木中沢（大槻玄沢の門下，仙台藩，存真図版の著者，詳細後記）：解剖学は医学の根本であり先ず最初に理解するべきものである。中国の最も古い古典である「内経」には既に解剖の必要性が説かれており，前漢の解剖文献を北宋での解剖実施時に参照したことが記載されている。日本では，山脇東洋が初めて公許の下に解剖して「蔵志」を著し，杉田玄白は解剖の後洋書を訳して解剖書を出版した。しかしまだ精巧な解剖図譜がない事だけが心残りの状態であった。南小柿寧一が図譜を作ったのはその時代である。原文の一部を紹介する。「南小柿甫祐は丹青を善くす。嘗て月池先生に侍し親しく解剖の学を受く。乃ち西洋解剖諸図に就いて，精を萃め，華を咀し，又，之を真屍に試むること数十次，精を覃くし思いを積み，以て解剖存真図を成す。最も能くその法を得たる者と謂ふべし。今より後，解剖図譜を以て海の内外に雄視する者，吾れ指を甫祐に屈せん哉。中略。甫祐の丹青の妙，心を用いるの厚きは即ち諸先生之れを尽くせり。余復た何おか賛せん」<sup>4)</sup>。

### 図の特長

江戸時代までの図譜の共通の弱点とされていた脾臓，副腎，神経系，動脈の走行，門脈又小腸と大腸の差なども詳細に描写されている。特に気管に管を挿入し肺に息を吹き込んで肺を拡張した状態として肺を表面から描い



第 14 図 腎臓のリンパ系 左上の文字は本図が Palfyn の解剖書より転写したものである事を示す



第 15 図 平次郎解剖図 抽出した内蔵全景

た図（第 4 図，原図第 49）は臓器の生理的な状態での形態を示そうとしたものであり，また，小腸の係蹄と，後腹壁から剥離した大腸とを連続したまま描いた図（第 9 図，原図第 64）は腸間膜が小腸のみに存在する事を容易に理解させる描写である。この二図のような構図は他の解剖図譜にその例を見ない。





以来既に知られていたが、通詞が蘭語 Zenuw をそのまま世奴（セイニュ）と訳したり、中国語を使って髄筋と訳して使っていた。杉田玄白は神気の神と経脈の経を合わせて神経とした<sup>10)</sup>。すなわち、存在は古くから知られていたがそれに義訳としての名を与えられ書物の中に初めて引用されたのが解体新書であった。この点で軟骨等とは異なる訳され方である。

心臓は漢方では神すなわち精神が宿る場所とのみ説明されているが、蘭方では全身に血液を送り出す源であるとしている。漢字の心臓が蘭語の hart と同一の臓器を示すという根拠は何もないが、両者の位置と形状から、hart は心臓であると言わざるを得なかった<sup>11)</sup>。

◆医範提綱（1805）は宇田川玄真著、三冊からなる。門人の諏訪直徳が玄真の講義を筆記したもの。図譜（第52図・15枚）は三年後に日本初の銅版で出された。平易明瞭な文章で西洋解剖学を説き、生理学を含み、疾病の原因にも言及し、当時の医師に益する事大であったと言われる。脳神経、脊髄神経などの説明もあり、交感神経幹に相当する神経も記載されている。臓器の名称等も今日の用語に基だ近く、わが国の解剖用語は医範提綱に起因するものが多く、宇田川玄真に負うところ大であると言われる。一例を挙げれば大機里爾を脾と訳しており他にも幾つかの字があるがこの字が今日まで使用されている。なお、脾は肉のような腺のようなものが集まった肉様のものを意味している。

宇田川玄信（一部前記）本姓安岡、伊勢生まれ、蘭学を大槻玄沢に学ぶ。一時杉田玄白の養子となったが去る。桂川甫周の弟子宇田川玄随（津山藩医、漢方医後蘭方医）に学び、後に宇田川を襲ぐ。桂川甫周とも交わりがあった<sup>5, 8, 12-14)</sup>。

このように、解剖存真図ではその時代に得られる最も新しい用語が用いられていた。

### 図譜についての考察

この図譜については次のような特長を指摘する事が出来る。

- 1) ほぼ200年以前の図譜でありながら、既に今日の解剖図譜に見られるような構成の図が多い。図柄に関しては西洋解剖図の影響が大きいと考えられる。
- 2) 臓器の色が死後時間の経過と共に変化する事を知っていて死後早期の臓器を見て描いているので色彩が真実のものに近い。
- 3) 医師自ら解剖し描画したので視点が医学的関心に礎いて細部におよんでいる。日本における解剖の例は

歴史的に幾編かの書または図譜として残されているが、初めて公許を得て腑分けを行ったのは山脇東洋であり、蔵志という解剖図録を著した。これが刺激となり杉田玄白等は腑分けを行い、蘭書を翻訳して解体新書を出版した。以後、腑分けおよび解剖に関する書・図の作製は多く行われた。しかし、これまで多くの場合、腑分けを実施する人は特別な解剖担当者であり、図は絵師が描いていた。18世紀後半になり、医師自ら腑分けを行い、図録を記録する書が多く出版され始めた。覬臓図巻（栗山孝庵、1758）から解臓図（中山藍江、1800）までの間にこの二図録を含めて九編が遺されている。更に、19世紀前半になると、解剖学史上特筆すべき六編の解剖書が出版されている。すなわち、解体発蒙（三谷樸、1813）、解剖存真図（南小柿寧一、1819）、解剖図賦（池田冬蔵、1822）、存真図腋（佐々木仲沢、1822）、導竅私録（小出君徳、1836）、南陽館一家言（賀川秀哲、1841）である。この中でも解剖存真図は19世紀前半における日本人が作った最高の解剖図集といわれている。以後、明治になると、江戸時代のような日本固有の解剖図録は消えて行く事になる<sup>5)</sup>。

- 4) 西洋の解剖書を参照しているが本図譜独特の図柄が多々ある（二例前記）。
- 5) 未固定すなわち、ホルマリンやアルコール等で固定処理をしていない状態でありながら臓器相互の位置的関係、臓器内外の脈管・神経の分布とそれらの分布上の立体的な相互関係等の細部を観察し描いている事は特筆に値する。外科医としての経験と優れた観察眼によるものであろう。
- 6) 「一回の解剖に一臓一腑観察」の原則を守りながら、十数年にわたって刑場に通り解剖し描写した事は強い意志と根気の良さを感じさせる。
- 7) 附言の中に解剖用具についての説明がある。蘭書の翻訳であるにせよ、管腔性臓器や脈管等に蠟や色素を注入し、また、肺に空気を送り込む為の各種小管を除いて、記載されている機器は今日使用されている機器・器具と非常に近似している。
- 8) 図の中で乳糜槽（現在は乳ビ槽と記す）と胸管の関係、胸腔内の静脈の走行等やや解り難い部分がある。また、図の説明文の中で今日の理解と異なる部分がある。たとえば脳神経の数は第一頸神経を含めて十対（解体新書も同じ）<sup>15)</sup>、脊髄神経は左右各三十（解体新書も同じ）などの記載である。しかし200年近くも前に、刑場内で限られた時間内に、無固定

の屍体を解剖し、観察し、描写した優れた能力によって得られた成果に影響を与えるものではない。むしろ人体の構造を、その当時、ここまで詳しく調べ図譜として残した努力が賞賛される。

- 9) 顕微鏡による図が二図ある(前述)。原図第49(第11図)表皮及び腺、毛髪と、原図第80(第13図)女性性器の図の欄外に描かれた精子が顕微鏡図である。これらは表面からの観察であり切片標本ではない事がわかる。何処で顕微鏡観察を行ったかは皮膚の一部を刑場外に持ち出せるか否かと顕微鏡を刑場内に運び込めたか否かにかかわる事であり、不明のままに残る。附言には顕微鏡二台を備える事と書かれている。しかしこれはヘイステル解剖書の翻訳内容であるから、実際に南小柿が二台を備えていたか否かはわからない。

顕微鏡はオランダの眼鏡屋ヤンセン父子が創製したとされる(1590)。その後イギリスのロバート・フックは二枚の凸レンズを鏡筒につけた複式レンズ顕微鏡を作成した(1660年頃)。更に、レンズを小さい孔のある二枚の金属板に挿んだ単式ではあるが複式よりも倍率の高く266倍もの倍率を持つ顕微鏡がレーウエンフックにより作成されている(1673年頃)。また、台座、三本の支脚及び反射鏡のついた複式レンズ顕微鏡がロンドンのカルペパー(1725)によって作られている。

その時代に顕微鏡が日本にあった事は確かである。森島中良著「紅毛雑話」(1787)に「顕微鏡」(“むしめがね”と読み仮名付き)と題して「ミコラスコーピユン之図」という挿絵説明のある紅毛渡りの顕微鏡の写生図(司馬江漢作)と、それによるノミ、ボウフラなどの観察図が掲載されている。顕微鏡という名称は中国人の訳語であり日本人は顕微鏡と書いてムシメガネと読んでいた。また、ミコロスカウヒヨム、ミイコロシコウビヨムなどと呼ばれていた。おそらく18世紀の後半にはかなり行き渡った存在であったと考えられる<sup>10, 16)</sup>。

顕微鏡図が最初に掲載された医学書は解体新書であり毛髪の拡大像が示されている(1774)。しかし、これはクルムスの解剖書の転写であり杉田玄白等の著者が観察して描写した顕微鏡図ではない。著者が自ら顕微鏡図を描き掲載した医学書、図譜としては解剖存真図が最初となる。

当時の日本に顕微鏡があった事を示す幾つかの記述がある。たとえばシーボルト(在日1823~1829)が長崎で使っていた顕微鏡は現存し早稲田大学に保管されている<sup>10)</sup>。また、寛政4年(1792)にロシア船が通商を求めて来日したがその折りに日本の漂流民、大黒屋幸太郎

と磯吉とを松前に送り返して来た。この時、幕府の依頼で幸太郎の事情聴取に当たった桂川甫周が幸太郎の持ち帰った顕微鏡を写生した絵がある。挿図説明にはミテレスコッポと記されている<sup>7)</sup>。加えて甫周は享和2年(1802)2月26日に将軍家斉に顕微鏡の使い方を説明している事<sup>7, 18, 19)</sup>などから顕微鏡は既に日本にあり、桂川家が顕微鏡の利用に際して便宜を図れる立場にあった事が想像される。そして甫周は南小柿の師であり解剖図の作成を奨めた点からも、南小柿が顕微鏡を使用したとしたら甫周の支援の下で使用したと推定するのが順当であろう。なお、甫周の写生図から推察すると、顕微鏡は四脚付きのカルペパー型の一つであろうと思われる。また前記の紅毛雑談に掲載されている写生図もそれと類似の構造である。

### 存真という語

存真という語について、酒井(口述)は「物事の在りのままの姿」と説明している。現在の日本の辞書にこの語は無い。南小柿が此の語を図譜の題名の中に用いた根拠に関する記録は見当たらない。解剖存真図以外に存真という語が書名に使われた例は二つある。

◆存真環中図：中国の崇寧年間(1102~06)に泗州の賊を死刑にした時に郡主の李夷行は医師と画工に解剖の結果を図に描かせた。この臓腑図を後に楊介が校定して「存真図」と名付け北宗の時代の政和三年(1113)に他の本を合わせ「存真環中図」と名付けて一つの解剖図譜とした<sup>14, 20)</sup>。酒井によるとこの図譜が日本に来たか否かは明らかではなく、また、来たとしても多くの人の目に触れた記録は無いという。

◆存真図腋：文政5年(1822)に陸中・一ノ関出身の佐々木中沢が著した解剖書。佐々木は建部清庵に医学を学んだ。江戸に出て大槻玄沢等に師事して蘭学を修めた後に仙台に帰り渡辺道可の主催する仙台藩医学の西学教諭となった。文政5年6月29日、仙台北郊七北田において女性の屍を解剖した折に渡辺の奨めにより男性と異なる部分に集中して観察し畠山仙江の筆になる七つの解剖図と詳しい説明を記載した。南小柿の解剖存真図に女性の図が少ないので不足の部分を補う意味で存真図腋と名付けた。ところが、この解剖は仙台の医界に衝撃を与え、漢方医は強く反対し、江戸の漢方医学の名家の多岐元堅も呼応した。結果、本書は版下のみで永く伊達家の書庫に保管されたままとなった<sup>12)</sup>。別の文献によると、佐々木中沢は文政5年3月から仙台藩の医学校養賢堂で蘭方医の教授となった年の5月に、女性刑屍の腑分を



する機会を得た。中略。江戸で同学であった南小柿寧一の『解剖存真図』の不十分である点を補ったと記されている<sup>9)</sup>。また、佐々木の名には中澤、仲澤、中沢、仲沢の記載がある。

(註)

広辞苑によると腋(脇、掖)には「主役の次に位し、それを助けるもの。わき役」という解釈もあるので、存真図腋の腋はこれに該当する意味で使われたのではないかと思われる。また、別々の二冊の図譜に共通の『存真図』という特殊な名称が用いられている事から、南小柿と佐々木との間には何らかの接点があったであろう事が想定される。しかし、前記の「同学」が蘭医としてなのか、桂川家の門下生としてなのか、あるいは他に共通の学の間があったからなのかは不明である。

### 解剖存真図作成の動機

解体新書が出来てから50年近く経過し、既に10種類以上の解剖書や図譜が刊行されている当時の状況下で新たに解剖図譜を作成した動機は、前記の如く南小柿が桂川家にあった平次郎解剖図(1783)(第15, 16図)や施薬院解男体臓図(1798)を見て感嘆はしたが精密度が充分でない事を残念に思い、自ら観察し描写しようと決めた事による。加えて師の桂川甫周(第四代)の奨めもあったと伝えられる<sup>4)</sup>。以下、解剖存真図作成の動機付となった二つの図譜について概要を述べる。

◆平次郎解剖図：作成の主催者は橋南陰であり、小石元俊が伏見で平次郎という40才の刑屍を解剖。図譜は前面を開胸・開腹し臓器を全体として描写したものが主体で、細部では膀胱が異常に大きい事および輸尿管が明瞭でない事などが指摘されている。解体新書の影響はまだ少ないといわれる。写生は吉村蘭洲。蘭洲は円山応挙と共に石田靈汀の門人で西本願寺の画師である。

橋は伊勢の国の藩士宮川保長の五男で医の橋家を継いだ。香川大沖、賀川子玄に学ぶ。解剖の実施には小石の力を借りた。

小石元俊は祖父まで小浜藩の家老であった。父の時代に小浜を去る。大阪にて山脇東洋の高弟淡輪元潜に古医方を学び、淡輪の勧めで同じく東洋の門人であり漢蘭折衷派の永富独嚙庵に学び京都で開業。解体新書を見て実証に基いた蘭医学に心を打たれ、小浜藩の杉田玄白が京都を訪れた時及び江戸においてに蘭医学の教えを乞い、また、江戸で大槻玄沢家に寄寓して蘭医学を論じ蘭学者と交わった。京都において古医方と論じ、腑分を行って蘭医学の実証性を示した。京都火災の後大阪に移るが京

都の医家に蘭医学の道を開いた功績は大きいといわれる。当時の実地解剖学の第一人者であった。加えて、刑死の病者を腑分けし生前の症状との因果関係を明らかにする努力をしたと伝えられ、病理解剖の先駆者でもあった。

◆施薬院解男体臓図：主催者は三雲環善(本姓は施薬院)。山脇東海および小石元俊と共に京都において作兵衛という34才の刑屍を解いた解剖図。解体新書の影響は大きいといわれる。橋本宗吉写が蘭語で各器官の名を記入している。橋本宗吉は大阪出身で他の業についていたが小石元俊が才能を認め、江戸の大槻玄沢の門に入れて蘭医学を学ばせた。後、大阪で医業を開き、又蘭学塾絲漢堂を興し蘭語を教授した。門弟の中天游は緒方洪庵の師である。すなわち、橋本宗吉-中天游-緒方洪庵-福沢諭吉の大阪蘭学の系譜は橋本から始まったのである。写生は再び吉村蘭洲であり、その子吉村孝敬および丸山応挙の子木下應受が助けた。平次郎解剖図よりも15年後に出来た図であり、格段に精密である<sup>5, 12, 21)</sup>。

### 南小柿寧一による重訂解体新書付図の作製

重訂解体新書は大槻玄沢が師の杉田玄白の要請により不完全な解体新書を改訂したものである。新書と同じクルムスの解剖書の完訳である。大槻玄沢は解剖存真図に跋を寄せ南小柿の努力と解剖存真図の内容を賞賛しているが(一部前出)、その最後に、解剖存真図を見ながら自分が著述している重訂解体新書を読めば良く理解出来ると記している。大槻玄沢は南小柿寧一の優れた描写能力を知っており、重訂解体新書の付図の作製を寧一に依頼した。図数は175図である(解体新書は151図)。クルムス解剖書の原典、イギリスの解剖書を主体とし、いろいろな西洋解剖書(後記)から模写して作成した。この時代には既に銅版があり、作成した図はその銅版の下図となった。図は文政4年(1821)に完成したが、寧一は文政8年(1825)に本書の完成(1826)を見届ける事なしにこの世を去った<sup>22)</sup>。

(註)

解体新書は西洋医学における人体の構造及び機能の解釈が東洋とは全く異なる事を初めて伝えた点で大きな意義があった。クルムスの解剖書の翻訳は辞書もなく困難を極めたが大変な努力で乗り越えた。しかし、出版を急いだ事もある誤訳が多い事は杉田玄白自身がよく知っていた。玄白は門人の大槻玄沢に新書の改訂を依頼した。玄沢は寛政元年(1789)、一説には寛政2年(1790)に編纂を開始し36年後の文政9年(1826)に重訂解体新書を完成した。解体新書が出版されてから52年目で

ある。内容はクルムスの解剖学の完訳であるが原典の脚注は訳されていない。解体新書は5冊から成るが重訂解体新書は12冊から成り、南小柿が作成した解剖図は「重訂解体新書付図」として独立して出版された。

参考にした西洋解剖書は次の通りである。Bartholomaeus Eustachius, Steven Blan-kaart, Philip Verhyen, William Cowper, Jean Palfyn, Hendik van Deventer.

これらの内、解剖存真図作製時と重複して参考にした書はBlankaartとPalfynの二冊のみである。用語については解体新書の用語の不完全なものや誤りを改め、加えて玄沢が不適当と思う語や、訳語が出来ていなかったものについては玄沢自身が語を造っている<sup>12, 22)</sup>。

### 終わりに

解剖存真図の出版は南小柿の発意と努力によるものであるが、その背景には桂川家の直接および間接の支援があった。そして同家はやがて福沢諭吉先生の江戸における活躍および咸臨丸による渡米と密接に関係する事になる。更にこの時代が日本における漢方中心の医学から西洋医学への重要な変換期であり、その転換を推進した機運と諸活動が背景にあった事が伺われる。

図は慶應義塾大学信濃町メディアセンター所管の解剖存真図写本より採った。解剖存真図につき調査の過程で順天堂大学医学部酒井シツ 客員教授より多くの御教示をいただいた。また、原図および関係書類の閲覧、図の転写等には、前慶應義塾大学三田メディアセンター貴重書室市古健次課長代理、元慶應義塾大学信濃町メディアセンター武正恒事務長、および現信濃町メディアセンター風間茂彦事務長に大変お世話になった。稿を閉じるに当たり、寄せられた御厚情に深く感謝する。

### 文 献

- 1) 慶應義塾図書館所蔵「解剖存真図」の重要文化財指定について、三田メディアセンターニュース 65, 2003
- 2) 市古健次：解剖存真図、慶應義塾 OPEN 12:2003
- 3) 文化庁文化財部：月刊文化財 477(文化庁文化財部監修) 第一法規出版:2003
- 4) 小川鼎三：解剖存真図、講談社、1975
- 5) 小池猪一：図説「日本の“医学”の歴史」上、大空社、1993
- 6) 酒井シツ：江戸の病と養生、講談社、2003
- 7) 今泉源吉：蘭学の家桂川の人々、篠崎書林、1965
- 8) 片桐一夫：蘭学事始とその時代、日本放送出版協会、1997
- 9) 阿部 泉、蔵方宏昌：複製「解体新書序図の巻」と解説、つくばね舎、1994
- 10) 杉本つとむ：江戸の阿蘭陀流医師、早稲田大学出版部、2002
- 11) 吉良枝郎：「日本の西洋医学の生い立ち」-南蛮人渡来から明治維新まで-、築地書館、2000
- 12) 小川鼎三稿：明治前「日本解剖学史」第一巻、(日本学士会編)日本学術振興会、1955
- 13) 原三信：日本で初めて翻訳した解剖書、六代原三信蘭方医三百年記念奨学会、1995
- 14) 山田慶児、栗山茂久：歴史の中の病と医学、思文閣出版、1997
- 15) 杉田玄白：解体新書、講談社学術文庫 1341(酒井シツ訳)講談社、1998
- 16) 馬場悠男：人体の世界、(坂井建雄編)読売新聞社、1995
- 17) 中央区内散歩・史跡と歴史を訪ねて、(中央区企画部広報課編)1988
- 18) 中央区内散歩・史跡と歴史を訪ねて、(中央区企画部広報課編)1992
- 19) 外川行夫：オランダ流御殿医「桂川家の世界」、築地書館、1994
- 20) ライオンズ・アルバート・S., ベルトセリ・R., ジョセフ：図説「医学の歴史」、(小川鼎三監訳)学習研究社、1984
- 21) 梶田 昭：医学の歴史、講談社学術文庫 1614 講談社、2003
- 22) 酒井シツ：解体新書と重訂解体新書 大槻玄沢の研究、(洋学史研究会編)思文閣出版、1991

講 座

脳循環代謝に関する最近の知見：

ニューロン-アストロサイト-微小循環のネットワーク

慶應義塾大学医学部内科（神経）

高橋 愼一

Key Words：アストログリア, astroglia；グルコース, glucose；グルタミン酸, glutamate；乳酸, lactate；脳血流代謝カップリング, flow-metabolism coupling in the brain

はじめに

障害を受けた脳機能の機能再生を目指す時代が到来している。脳機能の維持と再生の基盤となる脳循環代謝調節におけるニューロン（シナプス）-アストロサイト-微小循環（細動脈と毛細血管）の3者間のネットワークの重要性を提起したい。脳の循環と代謝調節機構は古くて新しい問題である。1950年代に始まったKety, Sokoloffらによる脳循環代謝測定理論の確立と実測から、ヒトの脳がその体重に対する比率（2%）から見て、極めて高いエネルギー消費（全身酸素消費の20%、グルコース消費の25%）を行っていることが知られている。その大部分は、脳の基本的な活動である情報プロセッシング、すなわちアクション・ポテンシャルの発生の母体となるNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>イオン濃度勾配の維持に費やされており、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseは安静時のATP消費の約50%を占める。脳が生理学的条件下でエネルギー基質として使用できるのはグルコースのみであり、少なくとも脳の基礎活動時のグルコース代謝はほぼ完全な酸化反応（C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>+6O<sub>2</sub>→6CO<sub>2</sub>+6H<sub>2</sub>O）である。すなわち酸素消費率（CMRO<sub>2</sub>=156 μmol/100 g brain/min）とグルコース消費率（CMR<sub>glc</sub>=31 μmol/100 g brain/min）の比は、理論値である6に近い実測値5.5を示す。脳機能が正常に維持されるためには、神経回路網の正常な構築が維持されることが必須であるが、その機能活動を支えるための正常なエネルギー代謝の保障が前提である<sup>1)</sup>。そして脳内には酸素の予備はなく、貯蔵型グルコースともいえるグリコーゲン含量はごくわずかであるため、間断ない脳血流（57 mL/100 g brain/min）による供給が必須となる。脳循環障害そのものが本態である脳血管

障害は勿論、近年、アルツハイマー病を例とするようにニューロンの一次変性に病態の主座があると考えられている神経変性疾患においても、脳微小循環障害の関与がクローズアップされている<sup>2)</sup>。また、正常脳機能と神経疾患の病態を理解する上で、もう一つ忘れてならないのはグリア細胞の機能であろう<sup>3, 4, 5)</sup>。ヒトの脳にはグリア細胞がニューロンの約10倍存在するとされ、げっ歯類では同数程度、線虫ではニューロンの2分の1とされていることから類推されるように、脳機能が複雑化するに従いグリア細胞機能が相対的に重要となると考えられる。グリア細胞の中でも、特にエネルギー代謝と微小循環調節の面から注目されているのはアストロサイト（アストログリア）である。アストロサイトはヒト大脳灰白質の33%を占め<sup>6)</sup>、エネルギーの5-20%を消費する<sup>7)</sup>。さらにアストロサイトは、ニューロン（シナプス）と微小血管の間で両者を橋渡しする解剖学的構造を呈し<sup>8)</sup>、ヒト大脳灰白質の50%を占め<sup>6)</sup>、エネルギーの80-95%を消費するニューロン<sup>7)</sup>への酸素、グルコースの供給路として、またシナプス活動を微小循環調節へのフィードバックする構成因子として重要な機能を担っている可能性がある。また、シナプス機能と連動して起こるアストロサイト細胞内のCa<sup>2+</sup>、そしてNa<sup>+</sup>上昇（後述）が、ギャップ・ジャンクションによって連結した多数のアストロサイトによって形成されるシンシチウム内を水面に広がる波紋のように拡大し、ニューロンの機能活動亢進を広く周囲組織に伝達する役割を有していることも明らかにになっている。これらのアストロサイトの担うイオン・ホメオスタシスの異常は、片頭痛、てんかん、脳浮腫といった疾患の病態に重要な関与をしている可能性が指摘されている。脳機能の障害メカニズムを考える上でも、



また、正常な脳機能の修復を図る上でも、ニューロン(シナプス)–アストロサイト–微小循環(細動脈と毛細血管)の3者間のネットワークの機能を理解することが重要である。本稿では、このネットワークにおけるアストロサイトの役割を中心とした最近の知見を紹介したい。

## 歴史的背景

脳が定常状態(steady state)におけるエネルギー産生を好氣的グルコース代謝(酸化的リン酸化)に依存していることに疑いの余地はない。しかし、脳機能活動亢進(functional activation)に際したグルコース代謝については異論がある。測定法による時間的また空間的な分解能による制約から、脳代謝のダイナミックな変化を、数 $\mu\text{m}$ –数 $\text{cm}$ かつ、数 $\text{msec}$ –数 $\text{min}$ のオーダーで同時にそして連続的に捉えることは現在でも困難であり、断片的に観察された結果の解釈に様々な混乱をきたしている<sup>9)</sup>。脳機能活動亢進に際してのエネルギー産生に問題を提起する発端になったのは1980年代後半に発表されたPETを用いた研究の結果による。1986年、FoxとRaichle<sup>10)</sup>はPETを用いてヒト体性感覚野における脳血流量(CBF)と脳酸素消費率( $\text{CMRO}_2$ )を測定し、知覚刺激が29%のCBF増加を惹起したのに対し、 $\text{CMRO}_2$ は5%の増加にとどまったことを報告した。続く1988年、Foxら<sup>11)</sup>はヒト視覚野のCBF、 $\text{CMRO}_2$ に加え、脳グルコース消費率( $\text{CMR}_{\text{glc}}$ )を測定し、視覚刺激において $\text{CMR}_{\text{glc}}$ の増加は $\text{CMRO}_2$ の増加を大きく上回り、結果として酸素/グルコース消費のモル比( $\text{CMRO}_2/\text{CMR}_{\text{glc}}$ )は、安静状態の4.1から0.4に減少したことを報告した。これらのデータは脳の機能活動亢進時のグルコース代謝が、従来信じられていたミトコンドリア内の好氣的代謝ではなく、細胞質内の嫌氣的解糖を主とする証左として大きなインパクトを与えた。これを裏付けるように1991年、Prichardら<sup>12)</sup>は、MRスペクトロスコピー(MRS)を用いて、ヒト視覚野において視覚刺激開始6分以内に嫌氣的解糖の産物である乳酸産生がピークに達し、次第に減少したことを報告した。後の動物実験からも、一般に脳の機能活動亢進は、 $\text{CMRO}_2$ を上回る一過性の過剰な $\text{CMR}_{\text{glc}}$ 増大を来とし、この時ほとんどの場合で脳内の乳酸(産生)量の増加を伴うことが報告された。この後、一定のタイムラグの後 $\text{CMRO}_2$ は遅れて大きく増大し( $\text{CMRO}_2/\text{CMR}_{\text{glc}} > 6$ )、おそらく脳内の乳酸を消費することでグルコース代謝の好氣的収支を合わせていることもわかってきたが、十分な酸素が得られる環境下で起こる乳酸産生現象、“aero-

bic glycolysis”をめぐって、現在にいたるまでのこの10余年、様々な議論が活発に続いている。

## ニューロンは乳酸をエネルギー基質とするか

元来、in vitroでは培養ニューロン、脳スライスともにグルコースのみならず培養液中に加えられた乳酸をエネルギー基質として使用できることが知られてきた。脳はグルコースを唯一のエネルギー源としているものの、潜在的には乳酸等の解糖系産物、さらにはニューロトランスミッター(後述:グルタミン酸)からもエネルギーを産生し得る。脳が生理的条件下でのエネルギー産生をグルコースのみに依存しているという事実は、血液中から脳内への輸送に際し制限があることを意味するに過ぎない。事実、乳酸の血液脳関門における輸送速度はグルコースの1/10以下である為、通常これを血管内に投与しても脳のエネルギー基質にはならないが、脳スライスや培養ニューロンは培養液中の乳酸のみで生存可能である。1994年、PellerinとMagistretti<sup>13)</sup>はグルタミン酸刺激により培養アストログリアが、グルコース消費増加とともにこれに連動して乳酸産生を増大させ培養液中に放出することを報告した。機能活動亢進に伴い、興奮性ニューロトランスミッターであり脳内のシナプスの90%を占めるとされるグルタミン酸作動性ニューロンからグルタミン酸が放出される。シナプス間隙におけるグルタミン酸濃度は約1 $\text{mM}$ に達するが、シナプスを包み込むアストロサイトに豊富に存在する $\text{Na}^+$ 依存性グルタミン酸トランスポーター(GLT-1, GLAST)によって速やかに除去される。その結果、アストロサイトの細胞内 $\text{Na}^+$ 濃度は増加し、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase活性の増大を惹起してアストロサイトのエネルギー産生を増大させる<sup>14)</sup>。これらのアストロサイトは毛細血管にもendfeetを伸ばしており、グルコース・トランスポーター(GLUT1)によってグルコースを取り込み、その後アストロサイト細胞質内の解糖系で産生されたピルビン酸は、アストロサイトに発現するLDH-5型(骨格筋型)アイソザイムによって効率よく乳酸に変換され(aerobic glycolysis)、乳酸はモノカルボン酸・トランスポーター(MCT1 & 4)によってアストロサイト細胞外に放出される。近傍にあるニューロン(シナプス)はここに選択的に発現するモノカルボン酸・トランスポーターのうち高親和型サブタイプ(MCT2)によってこれを取り込み、LDH-1型(心筋型)アイソザイムによって再びピルビン酸に戻された後、ミトコンドリア内の酸化的リン酸化によってエネルギーを得るという仮説が提唱され

た<sup>15, 16, 17, 18, 19)</sup> (ANLSH: astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis). さらに、アストロサイトに取り込まれたグルタミン酸はアストロサイトに特異的な酵素であるグルタミン合成酵素によりグルタミンに転換され、ニューロンにリサイクル・バックされる(グルタミン酸-グルタミン サイクル). 1998年 Sibson ら<sup>20)</sup>は<sup>13</sup>C-NMRを用いて<sup>13</sup>C-グルコース投与後のラットの脳におけるグルタミン酸のリサイクルとグルコース消費を定量し、1分子のグルタミン酸のアストロサイトへの取り込みが、1分子のグルコースの消費と一致して起こることを報告した。元来、Na<sup>+</sup>依存性グルタミン酸トランスポーターは1分子のグルタミン酸とともに3分子のNa<sup>+</sup>を取り込み、これに伴って活性化されるNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseは1分子のATPを消費することでこの3分子のNa<sup>+</sup>を細胞外に排泄、また同時に2分子のK<sup>+</sup>を細胞内に取り込む。さらにアストロサイト内の1分子のグルタミン酸からグルタミンへの転換には1分子のATP消費を伴うため、あわせて2分子のATPが消費され、これは1分子のグルコース消費によって解糖系で合成されるATP量に一致し、ANLSHのin vivoにおける証明とした。その後、アンチセンス・ストラテジー<sup>21)</sup>や遺伝子的<sup>22)</sup>にNa<sup>+</sup>依存性グルタミン酸トランスポーターをノックアウトした動物を用いてCMR<sub>glc</sub>を測定すると、これらのラット、マウスでは、ヒゲ刺激に対する大脳体性感覚野であるbarrel cortexにおけるCMR<sub>glc</sub>増加反応が正常に比して著明に低下していることが証明されている。ノックアウトマウスが成体ではなく、脳のエネルギー代謝がグルコース以外のケトン体に依存している時期であることから結果の解釈に対する批判はあるが、脳のグルコース消費にアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの関与がある点是否定できない。

ANLSHに対する現在までの批判<sup>23, 24, 25, 26, 27)</sup>のポイントと今後明らかにすべきことは、

- ①ニューロンは機能活動亢進時に際して、エネルギー基質としてグルコースより乳酸を選択的に利用するのか。
  - ②アストロサイトはグルタミン酸のトランスポーター取り込みの際に、aerobic glycolysisによって乳酸産生を増大させるのか。
  - ③時間的、空間的にみて神経機能亢進とこれらの現象の間に有意な関連があるのか、の3点についてである。
- グルコース消費の場合、つまりグルコースを取り込み、解糖系の第一ステップであるグルコース→グルコース6リン酸への変化が起こる場となるのはニューロピル(前・後シナプスとアストロサイトを合わせた構造: tripartite synapse)部分であることは<sup>14</sup>C]deoxyglucose法によ

るオートラジオグラム解析結果から間違いないが、その局在がニューロンであるか、これを包み込むアストロサイトであるか、あるいはその双方であるかはオートラジオグラムの空間分解能の制約から長らく解決できなかった。ニューロン自体にも特有のグルコース・トランスポーター(GLUT3)が存在するため、細胞外液中に十分な濃度で存在するグルコース(2.5-3.5 mM)を取り込むことには支障はない。機能活動亢進に際して、GLUT1(アストロサイト)、GLUT3(ニューロン)による細胞へのグルコースの移送速度はいずれもグルコース消費の律速段階にはなりえず、CMR<sub>glc</sub>を規定するのは、非刺激状態(resting state)で97%抑制されている解糖系のキー・エンザイムであるヘキソキナーゼによる。また、解糖酵素はニューロンのシナプス部分に豊富に存在し、例えばシナプトソーム分画には脳内ヘキソキナーゼ活性の50%が存在するとされる。グルコースがアストロサイトを介さず直接ニューロンに取り込まれ、ヘキソキナーゼによるリン酸化を受ける可能性は否定できない。2004年に同時に発表された2編の論文によって、少なくとも安静時のグルコース消費の場がin vivoにおけるニューロンとアストロサイトの双方に存在することが証明された。教室のItohら<sup>28)</sup>は蛍光色素でラベルしたグルコース・アナログ(2-NBDG)の海馬ニューロン、小脳プルキンエ細胞への直接の取り込みを証明し、Nehligら<sup>29)</sup>は、従来の<sup>14</sup>C]deoxyglucose法を改変し、β線の軌跡を利用して細胞レベルでの分解能を得た特殊なオートラジオグラムと免疫染色の重ねあわせ像から、<sup>14</sup>C]deoxyglucose取り込みの60.1%はニューロンのマーカー(MAP2)を示す細胞から、53.0%はアストロサイトのマーカー(GFAP)を示す細胞から得られたこと、すなわち両者ではほぼ同等という結果を報告した。しかし、残念なことに、脳の機能活動亢進時のグルコース消費の増大の場がどこにあるかの結論は出ていない。逆に、現時点では神経機能活動亢進に伴うグルコース消費がアストロサイトのみ存在するという証左もない。

さて一方で、ニューロンがグルコースより乳酸を選択的に取り込み、利用するとする根拠には、<sup>13</sup>Cでラベルした乳酸の脳内での代謝経路を<sup>13</sup>C-NMRによって追跡した研究がある。3-<sup>13</sup>C-乳酸の投与後のラット脳内で合成されるグルタミンのC2位とC3位には同程度の<sup>13</sup>Cラベリングが起こることが観察された。この結果は、ピルビン酸カルボキシラーゼによって生じるはずのC2位有意のラベリング反応がなかったこと、すなわち同酵素が選択的に存在する唯一の細胞群であるアストロサイトによる3-<sup>13</sup>C-乳酸代謝の関与がなかったこと意味し、

乳酸がニューロンで代謝されたことを示す証左とされた<sup>17)</sup>。しかし、この実験結果の解釈にも批判があり、アストロサイト内でもピルビン酸脱水素酵素による乳酸代謝経路や、ピルビン酸カルボキシラーゼによって生じたオキサロ酢酸がフマル酸と速やかに平衡に達することで、グルタミンのC2位とC3位に十分なmixingがおこることが指摘されている。

### アストロサイトは嫌気的な細胞か

アストロサイトのグルコース代謝の経路全般に関して、必ずしも嫌気的解糖のみに依存している訳ではないと考えられている。SilverとErecińskaの総説<sup>30)</sup>に従えば、諸家による実測値の平均をもって計算した場合、非刺激状態ではアストロサイトにおけるATP産生114 nmol/min/mg proteinのうち、解糖系由来が30 nmol/min/mg protein、酸化リン酸化由来が84 nmol/min/mg proteinであり、解糖系が約26%寄与する。哺乳動物の脳全体におけるATP産生において、そのうち解糖系の占める割合が5%未満であることと比較すると、非刺激下におけるアストロサイトのエネルギー産生はglycolytic metabolismであるとも言えるが、74%を占めるoxidative metabolismの関与は無視できないと言わざるを得ない。アストロサイトは培養条件によってエネルギー産生の依存経路が大きく変化し、筆者らの最近のデータ<sup>31)</sup>でも、培養液中のグルコース濃度が正常脳内濃度(2 mM)である場合には、ニューロンに比して、約2分の1程度の乳酸酸化率( $[^{14}\text{C}]\text{lactate} \rightarrow ^{14}\text{CO}_2$ )や、グルコース酸化率( $[^{14}\text{C}]\text{glucose} \rightarrow ^{14}\text{CO}_2$ )を有しているが、グルコース濃度を増加(22 mM)として培養すると、これらは著明に低下しニューロンの約5分の1程度となる。現時点ではアストロサイトがニューロンに比して、グルコースの酸化的代謝では低いものの、決して嫌気性代謝のみに依存しているとは結論できない。神経機能活動が亢進する際にアストロサイトは血管内からグルコースを取り込む以外に、予め細胞内に貯蔵したグリコーゲンを分解し解糖系に合流させて使用している可能性があるため問題はさらに複雑となる。すなわち、ラベルしたCを動物にパルス投与し、これを含む代謝物を測定するだけでは、その時に進んでいる実際の代謝状態の正確な評価は困難である。さらに忘れてならないのは前述のごとく、興奮性ニューロトランスミッターであるグルタミン酸は、アストロサイト内に取り込まれた後、それ自身が $\alpha$ ケトグルタル酸に変換され、TCAサイクル内に合流し酸化的代謝によるエネルギー源となり

うる点である。1994年のPellerinとMagistrettiらによる報告以降、多くのラボでグルタミン酸負荷時のアストロサイトの $\text{CMR}_{\text{glc}}$ 変化に及ぼす影響が検討されたが、増加、不変、もしくは減少する報告があり一定しない。培養条件によって変化するアストロサイトのoxidative metabolismの差異によって説明できるか否かはっきりしない。筆者自身らの実験では、前述した培養液中のグルコース濃度を2 mMもしくは22 mMとしたいずれの条件においても、グルタミン酸(500  $\mu\text{M}$ )による $[^{14}\text{C}]\text{deoxyglucose}$ のリン酸化率の有意な増加反応が認められた。しかし、この時の $[^{14}\text{C}]\text{lactate}$ や $[^{14}\text{C}]\text{glucose}$ の酸化率は大きく抑制され、グルタミン酸自身がアストログリアのoxidative metabolismのエネルギー基質として使用されたことを示唆するものであった。さらに細胞内での非代謝型のグルタミン酸類似物質であるD-アスパラギン酸を用いた $[^{14}\text{C}]\text{lactate}$ 、 $[^{14}\text{C}]\text{glucose}$ 酸化率測定では、アストロサイト内での $^{14}\text{CO}_2$ 産生の増大が確認された。現時点ではグルタミン酸の取り込みに必要なエネルギー源がグルコースなのか、グルタミン酸自身なのか、仮にグルコースであるとした場合の代謝経路(glycolysisか、oxidativeか)は不明である。また、細胞内のミトコンドリアの分布を勘案した際には、in vivoにおいてアストロサイトのendfeetやfilopodiaとよばれる毛細血管やシナプスを包み込む細胞の末端部分では細胞質が非常に薄く物理的にミトコンドリアが存在できないため、単一の細胞内でも局所的にaerobic glycolysisに依存せざるを得ないという可能性も考えなければならないだろう。同様に、ニューロンの中でも、一般にシナプス、特にpostsynaptic density (PSD)やdendriteには解糖系酵素が豊富であるが、小脳プルキンエ細胞では解糖系酵素活性が低いといわれているように、単一ニューロン内、あるいはニューロンの種類によってはグルコースよりも乳酸が選択的にそのエネルギー源として使用されている可能性があることも考えなければならない。

### 行方不明の乳酸

さらに現在もまだ未解決の問題は、脳の機能活動亢進に際して $\text{CMRO}_2/\text{CMR}_{\text{glc}}$ 比が低下し、グルコース消費(利用)の過亢進が生じた後、 $\text{CMRO}_2/\text{CMR}_{\text{glc}}$ 比は6を超えて増加しても、オーバーオール $\text{CMRO}_2$ は $\text{CMR}_{\text{glc}}$ の増加分を説明するには足りないという事実がある。すなわち、常に脳内では機能活動亢進に伴って酸素消費を超える過剰のグルコースが消費されている。



1999年、Madsenら<sup>32)</sup>はラットを用いて感覚刺激時の脳内グルコース代謝関連物質の収支を精密に測定した結果、刺激中、刺激後に脳からの有意な乳酸の出入りはないこと、脳内の乳酸量は増加することを報告した。しかし、この時脳の動静脈の差から算出された脳グルコース消費量の総計はこれを大きく上回っており、乳酸増加総量はそのうちの54%分に過ぎなかった。さらに最近Dienelらはより注意深いプレパレーションの結果、ラットの脳内には従来考えられていた測定量の3-4倍のグリコーゲン貯蔵があることを報告し、この減少量を勘案するとグルコース+グリコーゲンとして消費されている炭水化物はさらに多く、何らかの形（乳酸もしくはそれ以外の中間代謝産物）で、脳内の機能亢進を受けない他の部位に運ばれたと考えざるを得ないという結論に達した。彼らはアストロサイトのシンシチウムを連結するギャップ・ジャンクションに通じて、乳酸が局所から遠隔地に搬出されるのではないかと推定している<sup>36)</sup>。また、アストロサイトに発現するアクアポリンは水チャンネルとして、脳浮腫発生に重大な役割をもつが、乳酸をはじめとするモノカルボン酸の輸送にも関与している可能性も指摘されている。

### アストロサイトによるシナプス・モジュレーション

アストロサイトはシナプス活動に際して、グルタミン酸以外のニューロトランスミッターにも影響を及ぼす<sup>33)</sup>。抑制系ニューロトランスミッターであるGABAもアストロサイトの $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ 依存性トランスポーター（GAT1, GAT3, BGT1）によって取り込みを受ける。抑制系のニューロンの活動亢進が脳のエネルギー消費をどのように変化させるかは興味ある問題である。2003年、Chattonら<sup>34)</sup>は培養アストロサイトをGABA刺激（500  $\mu\text{M}$ ）し、 $[\text{C}^{14}]$ deoxyglucoseの取り込みに変化はないことを報告し、 $\text{Na}^+$ 感受性蛍光色素を用いて同時測定した細胞内 $\text{Na}^+$ 濃度の上昇反応はグルタミン酸刺激に比して乏しいことから、脳内GABA濃度では細胞内 $\text{Na}^+$ 濃度の上昇が小さく $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase活性を増大させるには至らないためであろうと推論した。また、細胞内 $\text{Na}^+$ イオンの増加反応はアストロサイトのエネルギー代謝に大きな影響を与える因子であるが、アストロサイトのシンシチウムを伝播する $\text{Ca}^{2+}$  waveと関連して注目されている。1990年にCornell-Bellら<sup>35)</sup>はアストロサイト刺激が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇を惹起し、これが複数のアストロサイトからなるシンシチウム内を波状に伝播する現象を報告したが、これはアストロサイトによ

る情報伝達がアストロサイトネットワークを介して、遠隔の細胞に及ぶことを示唆する。2004年にBernardinelliら<sup>36)</sup>は細胞内 $\text{Na}^+$ 上昇も同様にシンシチウム内を波状に伝播して広がる現象を報告し、アストロサイトのシンシチウム内でエネルギー消費を規定するシグナルとしての意味を提案している。また、アストロサイトは細胞外 $\text{K}^+$ 濃度調節にも重要な役割を担っている。後述するように、アストロサイト・シンシチウムによる $\text{K}^+$ siphoning仮説（後述）は、既に1980年代にシナプス機能と血管拡張をつなぐ理論的メカニズムとして提唱されたが、測定の困難さから現時点でも実証されていない。これ以外にもアストロサイトから放出されるシナプス機能に影響を与える可能性のある物質として、D-セリンやアセチルコリン結合タンパク等が報告されており、前者はグルタミン酸NMDA受容体の調節機構として、後者は哺乳類ではまだ証明されていないが、いずれもエネルギー代謝や、脳循環調節との関連については全く検討されていない。グルタミン酸の機能として、アストロサイトに発現する代謝型グルタミン酸受容体への作用は、これから述べるアストロサイトを介した血管調節機構で論じる。

### アストロサイトの脳循環調節に及ぼす役割

脳循環は脳機能活動と連動して増減する<sup>37)</sup>が、この脳血流と代謝のカップリング（flow-metabolism coupling）現象は、1890年にRoyとSherrington<sup>38)</sup>によって初めて報告されて100年以上経った今でも、その機序は未だ十分に解明されていない。前述のようにシナプスと微小血管（この場合には細動脈）を橋渡しする形で存在するアストロサイトの解剖学的特長はニューロンで起こる機能活動亢進をアストロサイトがなんらかの形で伝達する可能性を示唆し、アストロサイト機能異常が微小循環障害を基盤とする神経疾患の病因にも関与する可能性がある。近年、この点に関するいくつかの研究報告が注目を集めた。

既に述べてきたように、脳全体のグルコース代謝はほぼ完全な酸化的リン酸化であり、その結果産生される $\text{CO}_2$ は脳血管拡張物質として作動する。したがって $\text{CO}_2$ はflow-metabolism couplingの古典的なメディエーター候補である。機能活動亢進時にニューロンにおいて $\text{CO}_2$ 産生が増加することにほぼ疑いはないが、アストロサイトのグルコース代謝には検討の余地があることは既に述べた。機能活動亢進に際してアストロサイトの酸化的グルコース代謝が亢進する部位においては、 $\text{CO}_2$ が近接す

る細動脈拡張に作用する可能性があるだろう。

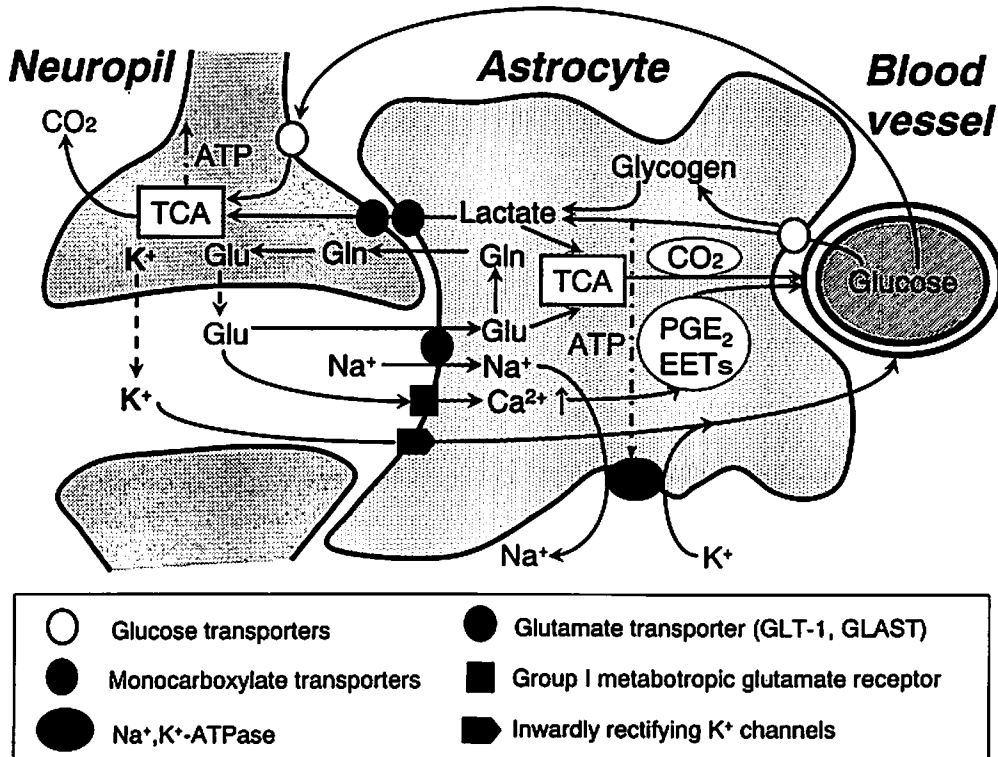
また、脳の機能活動亢進が脳細胞外液中の  $K^+$  濃度の上昇を来すことも良く知られている。安静時の脳細胞外液  $K^+$  濃度はおよそ 3 mM、神経活動時には 10~20 mM、てんかん発作、虚血時には 50~80 mM に達するとされている。アクション・ポテンシャルは必然的に脳細胞外液  $K^+$  濃度の軽度上昇を来すが、ニューロン活動維持の為に直ちに正常脳細胞外液  $K^+$  濃度が復帰される必要がある。この細胞外液からの  $K^+$  のクリアランスに、アストロサイトが大きく関わっていることが古くから知られている。特に、神経活動の亢進した高い脳細胞外液  $K^+$  濃度の部位において  $K^+$  が流入し、遠隔部位(脳血管近傍)で  $K^+$  が流出するとするモデル ( $K^+$  siphoning) は、 $K^+$  が血管拡張物質であるという点から、アストロサイトを介した脳血流の調節機序の可能性を示すものとして注目されたが、実証はされていない<sup>39)</sup>。脳細胞外液  $K^+$  濃度増加時のアストロサイトのエネルギー需要の変化、特にグルコース利用についても検討されているが、~10 mM 程度の上昇はウアバイン感受性のある [ $^{14}C$ ]deoxyglucose リン酸化反応の増加をきたし  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase の関与した能動的輸送を示唆する。しかし、これ以上の病的な  $K^+$  濃度増加は逆に [ $^{14}C$ ]deoxyglucose リン酸化率を抑制する<sup>40)</sup>。筆者らによる同じ実験系では、軽度の脳細胞外液  $K^+$  濃度上昇に際して [ $^{14}C$ ]deoxyglucose リン酸化反応の増加に反映されるグルコース利用率は増加するものの、[ $^{14}C$ ]lactate, [ $^{14}C$ ]glucose の酸化率に増加が観察されず、グルコースの oxidative metabolism への影響が観察されなかった点は興味深い。グルタミン酸刺激と異なり、 $K^+$  濃度上昇はエネルギー産生効率の低い glycolysis のみの亢進であったことは、 $K^+$  の取り込みにはエネルギー消費を伴う能動輸送以外に、内向き整流  $K^+$  チャネル等を介した受動的取り込みが関与していることを示唆するものと解釈される。つまり、アストロサイトの  $K^+$  siphoning がニューロンの機能活動亢進を血管拡張に伝達する目的を持つならば、それ自身に要するエネルギーが少なく済むことは合目的的であると思われる。

さて、神経活動亢進時に興奮性シナプス間隙で増加したグルタミン酸は、アストロサイトに発現する代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) にも作用する。特に PLC $\beta$  と共役する group I mGluR (1 & 5) は IP $_3$  を介して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させる。近年2つのグループが mGluR 刺激によるアストロサイト細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇と近傍の細動脈血管拡張を結び付けるメディエーターとして各々、①cytochrome P450 epoxygenase によ

る epoxyeicosatrienoic acid (EETs)<sup>40)</sup>、②COX による prostaglandin (特に PGE $_2$ )<sup>41)</sup> である可能性を示した。さらにカナダのグループ<sup>42)</sup>が、同様にアストロサイトの mGluR を介した脳血管調節の可能性を示したが、彼らはむしろ mGluR 刺激と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇がアストロサイトの PLA $_2$  を活性化し、ここで産生放出されたアラキドン酸は、続いて細動脈平滑筋内で 20-HETE に変換されて血管収縮を起こす可能性を重視している。シナプスに放出され、アストロサイトに取り込まれるグルタミン酸が mGluR を介してアストロサイト自体の代謝に与える影響も検討すべきであるが、我々のアッセイ系では、mGluR アゴニストである t-ACPD (50  $\mu$ M) はアストログリアの [ $^{14}C$ ]deoxyglucose リン酸化率、[ $^{14}C$ ]lactate 酸化率とも有意な変化を来さなかった。アストロサイトの mGluR を解したエネルギー代謝への直接の影響はないようである。アストロサイトの mGluR 刺激が血管拡張に作動するのか、血管収縮に作動するのかは、さらに詳細な検討が必要であろう。

## まとめ

アストロサイトが脳循環代謝調節において種々の役割を果たしている可能性を述べた。グルコース代謝に関わる仮説 (ANLSH) を支持するデータは断片的であり、総体としてこれをサポートするデータに乏しい。しかし、またこれを否定する証左が十分揃っている訳でもない。両者ともに脳機能の活性化のモダリティや強度によって刻々変化する現象の一断面を見ているだけなのかもしれない。いずれにしても、ニューロン-アストロサイト-微小循環の3者間のネットワークの解明と脳機能再生におけるネットワーク再構築が21世紀の脳疾患治療のキーとなることは間違いないだろう。最後に現時点における3者間のネットワークのモデル(仮説を含む)を図に示す。



図：ニューロン-アストロサイト-微小循環のネットワークのモデル

シナプスと微小血管（毛細血管もしくは細動脈）、これらを橋渡しするアストロサイトによる3者間ネットワークのモデルを示す。血管内から供給されるグルコースは、毛細血管に近接するアストロサイトと近傍のニューロン（前と後シナプスの双方）に取り込まれていると考えられる。興奮性ニューロトランスミッターであるグルタミン酸（Glu）はシナプス間隙に放出後、Na<sup>+</sup>とともにトランスポーター（GLT-1, GLAST）によってアストロサイトに取り込まれ、ATPの消費によってグルタミン（Gln）に変換される。このプロセスに必要なNa<sup>+</sup>イオン濃度勾配の維持のため、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseが作動しATP消費の場となる。現時点ではGluの取り込みにかかわるATPを産生する場が、アストロサイトの解糖系のみか、TCAサイクルも関与するのかは不明である。神経興奮の強度と持続時間によって様々に規定されているのであろう。またGlu自体も一部TCAサイクル内でエネルギー産生基質となっている可能性がある。アストロサイトに取り込まれたグルコースは一部グリコーゲンとしてターン・オーバーしつつ乳酸産生が起こるが、その一部はモノカルボン酸トランスポーター（MCT）によってニューロンに移送され、ニューロンのエネルギー基質となっている可能性がある（ANLSH：astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis）。しかし乳酸の一部は、ギャップ・ジャンクションによって連結したアストロサイト・シンシチウムを拡散し脳内の他の部位（局在は不明）に運び出されている可能性も指摘されている。近年シナプスへのGlu放出は、アストロサイトの代謝型グルタミン酸受容体にも作用し、プロスタグランジン、エイコサノイドの産生を介してアストロサイトから細動脈への血管拡張シグナルになっている可能性が報告された。古典的には神経活動に伴って放出されるK<sup>+</sup>やCO<sub>2</sub>もまた血管拡張物質である。神経機能活動亢進時に、K<sup>+</sup>はアストロサイト・シンシチウムのサイフォン効果を介して細動脈を拡張させ、またGluトランスポーターによって起こるアストロサイト自身のoxidative metabolism 亢進によって産生されたCO<sub>2</sub>は直接細動脈に作用し、これらがアストロサイトを介したflow-metabolism couplingのメカニズムの一部を担っている可能性がある。

文 献

- 1) Clarke DD, Sokoloff L : Circulation and energy metabolism of the brain. In : Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects, 6<sup>th</sup> edition. (Ed) Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, Lippincott-Raven, Philadelphia, p.637-669, 1999
- 2) de la Torre JC : Alzheimer disease as a vascular disorder. Nosological evidence. *Stroke* 33 : 1152-1162, 2002
- 3) Araque A, Parpura V, Sanzgiri R, Haydon PG : Tripartite synapses : glia the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22 : 208-215, 1999
- 4) Haydon PG : Glia : listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2 : 185-193, 2001
- 5) Fields RG, Stevens-Graham B : New insight into neuron-glia communication. *Science* 298 : 556-561, 2002
- 6) Norenberg MD : Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 53 : 213-220, 1994
- 7) Attwell D, Laughlin SB : An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 1133-1145, 2001
- 8) Virgintino D, Monaghan P, Robertson D, Errede M, Bertossi M, Ambrosi G, Roncali L : An immunohistochemical and morphometric study on astrocytes and microvasculature in the human cerebral cortex. *Histochem J* 29 : 655-660, 1997
- 9) 高橋慎一 : 脳の機能活動とエネルギー産生の時間的, 空間的プロファイル。 -ニューロン-アストロサイト連関から見たグルコース代謝-。 *脳循環代謝* 9 : 1-17, 1997
- 10) Fox PT, Raichle ME : Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 1140-1144, 1986
- 11) Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C : Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241 : 462-464, 1988
- 12) Prichard J, Rothman D, Novotny E, Petroff O, Kuwabara T, Avison M, Howseman A, Hanstock C, Shulman RG : Lactate rise detected by <sup>1</sup>H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 5829-5831, 1991
- 13) Pellerin L, Magistretti PJ : Glutamate uptake into astroglia stimulates aerobic glycolysis : a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 10625-10629, 1994
- 14) Takahashi S, Driscoll BF, Law MJ, Sokoloff L : Role of sodium and potassium ions in regulation of glucose metabolism in cultured astroglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 4616-4620, 1995
- 15) Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ : Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 20 : 291-299, 1998
- 16) Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG : Energy on demand. *Science* 283 : 496-497, 1999
- 17) Bouzier-Sore AK, Merle M, Magistretti PJ, Pellerin L : Feeding active neurons : (re)emergence of a nursing role for astrocytes. *J Physiol (Paris)* 96 : 273-282, 2002
- 18) Pellerin L, Magistretti PJ : Food for thought : challenging the dogmas. *J Cereb Blood Flow Metab* 23 : 1282-1286, 2003
- 19) Pellerin L, Magistretti PJ : The central role of astrocytes in neuroenergetics. In : Neuroglia, 2<sup>nd</sup> edition. (Ed) Kettenman H, Ransom BR, Oxford University Press, New York, p.367-376, 2005
- 20) Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG : Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 316-321, 1998
- 21) Cholet N, Pellerin L, Welker E, Lacombe P, Seylaz J, Magistretti P, Bonvento G : Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 404-412, 2001
- 22) Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L : Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37 : 275-286, 2003
- 23) Chih CP, Lipton P, Roberts EL Jr : Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? *Trends Neurosci* 24 : 573-578, 2001
- 24) Chih CP, Roberts EL Jr : Energy substrates for neurons and during neural activity : a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 23 : 1263-1281, 2003
- 25) Mangia S, Garreffa G, Bianciardi M, Giove F, Di Salle F, Maraviglia B : The aerobic brain : lactate decrease at the onset of neural activity. *Neuroscience* 118 : 7-10, 2003
- 26) Dienel GA, Cruz NF : Nutrition during brain activation : does cell-to-cell lactate shuttling contribute significantly to sweet and sour food for thought? *Neurochem Int* 45 : 321-351, 2004
- 27) Hertz L : The astrocyte-neuron lactate shuttle : a challenge of a challenge. *J Cereb Blood Flow Metab* 24 : 1241-1248, 2004
- 28) Itoh Y, Abe T, Takaoka R, Tanahashi N : Fluoro-

- metric Determination of glucose utilization in neurons in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 24 : 993-1003, 2004
- 29) Nehlig A, Wittendorp-Rechenmann E, Lam CD : Selective uptake of [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes : high-resolution microautoradiographic imaging by cellular <sup>14</sup>C-trajectory combined with immunohistochemistry. *J Cereb Blood Flow Metab* 24 : 1004-1014, 2004
- 30) Silver IA, Erecińska M : Energetic demands of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in mammalian astrocytes. *Glia* 21 : 35-45, 1997
- 31) Abe T, Takahashi S, Fukuuchi Y : Limited glucose availability enhances oxidative metabolism of glucose in cultured rat astroglia. Abstract Soc Neurosci Program number 765.4, 2003
- 32) Madsen PL, Cruz NF, Sokoloff L, Dienel GA : Cerebral oxygen/glucose ration is low during sensory stimulation and rises above normal during recovery : excess glucose consumption during stimulation is not accounted for by lactate efflux from or accumulation in brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 : 393-400, 1999
- 33) Newman EA : Glia and synaptic transmission. In : *Neuroglia*, 2<sup>nd</sup> edition. (Ed) Kettenman H, Ransom BR, Oxford University Press, New York, p. 355-366, 2005
- 34) Chatton JY, Pellerin L, Magistretti PJ : GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost : implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 12456-12461, 2003
- 35) Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ : Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes : long-range glial signaling. *Science* 247 : 470-473, 1990
- 36) Bernardinelli Y, Magistretti PJ, Chatton JY : Astrocytes generates Na<sup>+</sup>-mediated metabolic waves. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 14937-14942, 2004
- 37) Sokoloff L : Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system. *Fed Proc* 40 : 2311-2316, 1981
- 38) Roy CW, Sherrington CS : On the regulation of the blood-supply of the brain. *J Physiol (London)* 11 : 85-108, 1890
- 39) Paulson OB, Newman EA : Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237 : 86-898, 1987
- 40) Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D, Roman RJ : Functional hyperemia in the brain. Hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke* 28 : 229-234, 1998
- 41) Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G : Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6 : 43-50, 2003
- 42) Mulligan SJ, MacVicar BA : Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431 : 195-199, 2004



講 座

## 最新の腰痛治療

慶應義塾大学医学部整形外科学教室

ちば かす ひろ  
千 葉 一 裕

Key Words : low back pain, intervertebral disc degeneration, conservative treatment, surgical treatment

### 1. はじめに

腰痛はヒトが進化の過程で二足歩行となり脊柱の生理的湾曲に変化が生じた結果、腰部に負担がかかり発生するようになったとされており、腰痛との付き合いは人類の宿命と言える。事実、人類の8割が一生に一度は腰痛を経験すると言われるほど腰痛の発生率は高く、整形外科を受診する患者の主訴として最も頻度が高い。こうした腰痛の多くは保存療法で軽快するが、時として慢性化したり坐骨神経痛を合併して手術の対象となる。長年にわたる数多くの研究によって腰痛の発生メカニズムの解明が進められ、次々と新たな治療法が開発されてきたにも関わらず、腰痛を訴える患者はむしろ増えており、費やされる医療費も年々増加傾向にある。

近年 evidence based medicine (EBM) が叫ばれているが、腰痛に対し有効性が証明された治療法はあまりにも少ない。最近の臨床疫学的研究より、「解剖学的損傷が腰痛を引き起こす」という従来の概念だけでは病態の説明がつかない事例が多く、腰痛発症には心理的、社会的因子が大きく関与していることが明らかにされつつある<sup>1)</sup>。そこで、本稿では腰痛に対する医療の現状、最新の研究から得られた知見ならびに新たな治療法開発とその可能性につき概説し、腰痛治療の今後の展望を考察したい。

### 2. 腰痛に対する医療の現状

我が国では毎年国民の15-20%が腰痛を訴えていると推測されており、腰痛は高血圧に続いてプライマリーケアを受診する2番目に多い傷病であり、整形外科を受診する原因としては最も頻度が高い(図1)。平成10年度の国民生活基礎調査の筋骨格系の訴えは2470万人に達し、うち腰痛は1160万人と約半数を占めている。

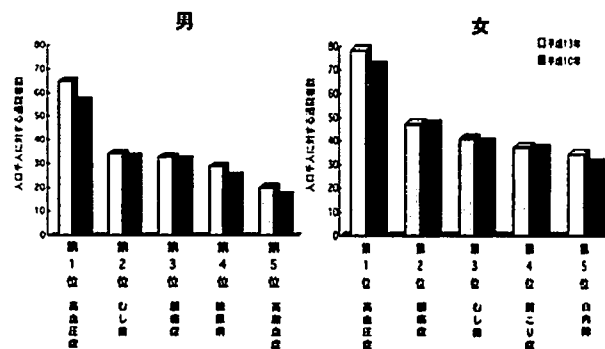


図1：性別でみた通院者率の上位5傷病  
文献3)より引用・改変

また、平成12年の日本整形外科学会学術プロジェクト委員会の疫学調査によると、ある1ヶ月間の腰痛の有病率は男性29.2%、女性31.8%と極めて高く、平成13年度の厚生統計協会による国民の体の不調の訴えでもっとも頻度が高いのも筋骨格系の愁訴であり、その中でも腰痛と肩こりが2大愁訴となっている<sup>2,3,4)</sup>。

腰痛の診療のため多額の医療費が費やされているが、急速な高齢化社会の到来に伴い、さらに増加の一途をたどるものと予測されている。実際、平成13年度の65歳以上の人口1000人に対する腰痛の有訴者率は201.0と第1位であり、通院率も117.2と高血圧に次いで高く、第2位となっている<sup>5)</sup>。

一方、45歳以下の人で就業不能の原因としてもっとも多いのも腰痛であり、腰痛による労災認定も年間6000件を超えている。休業補償と就業不能による労働時間損失を合わせると治療に要する医療費の3倍にも及ぶとの試算もあり、その国家的な経済損失は高齢者による医療費の消費増大と相まって計り知れなく、国民健康

の面のみならず医療経済上の大きな問題として早急な対策が望まれている<sup>6)</sup>。

### 3. 腰痛の原因

腰痛の原因としては内臓性、血管性などさまざまなものが挙げられるが、脊椎そのものに原因がある脊椎性腰痛の頻度がもっとも高い<sup>7)</sup>(表1)。脊椎性腰痛も疲労や姿勢が原因とされる機能的腰痛と、脊柱に何らかの病理組織学的変化のある器質性腰痛に大別される。さらに後者の原因は、加齢による椎間板などの退行変性が基盤となる変性性、側弯症や後弯症などの脊柱変形に続発す

表1：腰痛の原因

<ul style="list-style-type: none"> <li>●脊椎性                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 椎間板、椎骨など脊椎に原因があるもの</li> </ul> </li> <li>●内臓性                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 消化器疾患(胆石、膵炎など)</li> <li>- 泌尿器疾患(腎・尿管結石など)</li> <li>- 婦人科疾患(子宮筋腫、内膜症など)</li> </ul> </li> <li>●血管性                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 大動脈瘤、閉塞性動脈硬化症など</li> </ul> </li> <li>●心因性</li> </ul>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

文献7)より改変

る変形性、骨折や脱臼などによる外傷性、原発性腫瘍や悪性腫瘍転移による腫瘍性、化膿性や結核性脊椎炎などの感染症に加え慢性関節リウマチなどの全身性炎症疾患による炎症性、骨粗鬆症や透析性脊椎症などの代謝性と多岐にわたる<sup>8)</sup>(表2)。このうち最も頻度が高いのは機能的腰痛であるが、器質性では変性性ならびに代謝性の中でも骨粗鬆症に起因する腰痛の頻度が高い。

表2：腰痛をきたす脊椎疾患

<ul style="list-style-type: none"> <li>●機能的(明らかな原因を見い出せないもの)                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 疲労性腰痛、腰部筋々膜炎(ぎっくり腰)</li> </ul> </li> <li>●器質性(骨や椎間板、神経等に何らかの異常があるもの)                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 変性性(椎間板、椎間関節の退行変性が基盤となり発症)</li> <li>- 変形(側弯症、後弯症)</li> <li>- 外傷                             <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 腰椎捻挫、圧迫骨折、破裂骨折、脱臼骨折</li> </ul> </li> <li>- 腫瘍                             <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 脊椎腫瘍(原発性、転移性)、脊髄腫瘍</li> </ul> </li> <li>- 炎症                             <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 感染性：化膿性脊椎炎、結核性脊椎炎</li> <li>・ 非感染性：関節リウマチ、強直性脊椎炎</li> </ul> </li> <li>- 代謝性                             <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 骨粗鬆症、骨軟化症、透析性脊椎症など</li> </ul> </li> <li>- 奇形性                             <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 二分脊椎、脊髄係留症候群</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

文献8)より改変

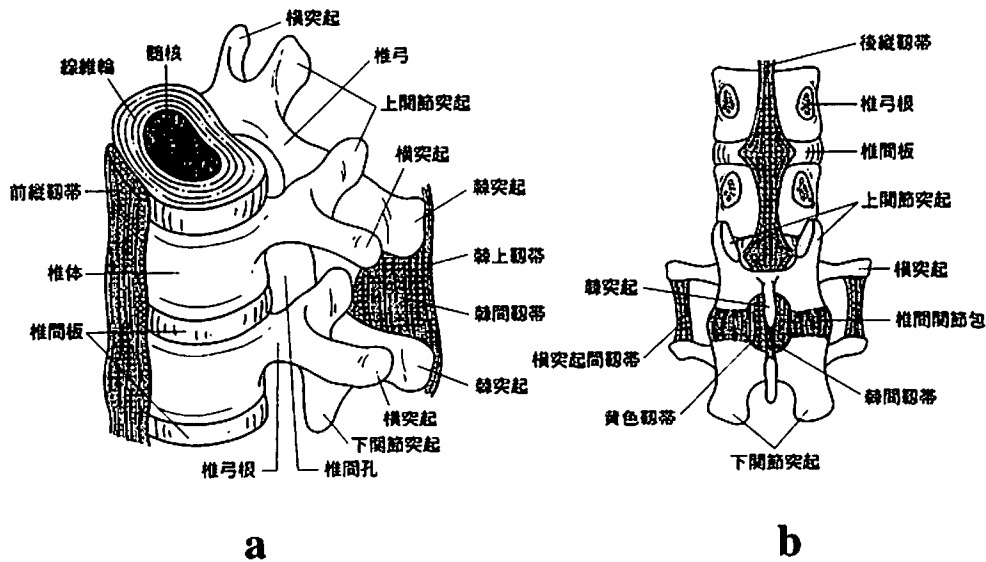


図2：腰椎の解剖

a 腰椎を前側方から見たところ b 腰椎を後方より見たところ(上位2椎は椎弓根を切断し後方要素を除き、椎体後面を見ている)文献9)より引用

#### 4. 腰椎の解剖

腰椎は脊柱を構成する椎骨のうち胸椎と仙椎の間にある5つからなる。脊椎の基本構造はいずれの部位でも共通であるが、腰椎は大きな荷重を受けるため椎体が大きく、筋肉靭帯の付着部である横突起、棘突起も発達している。一つの椎体は椎間板、椎間関節、靭帯を通じて上下の椎体と連結されている。椎間板はゲル状の髄核がコラーゲンの層状構造から成る線維輪および硝子軟骨である終板軟骨によって一定の内圧下に封入された構造をとり、通常の滑膜関節である左右の椎間関節と強調して体幹の支持性、運動性ならびに衝撃吸収能を司る<sup>9)</sup> (図2)。

#### 5. 腰痛発生の病態

##### a) 変性性腰痛

器質性腰痛の原因として最も多い変性性腰痛は、10歳代後半から20歳代前半にはじまる椎間板の退行変性が発症の端緒となる。椎間板は常時強い外力を受け、それに抗するために大きな内圧を有し、かつ人体内最大の無血管組織であるため、腰椎におけるいかなる病理学的

変化にも先んじて椎間板変性が発生するといわれている。まず、髄核細胞の基質産生能低下のため髄核中の抱水性のプロテオグリカン濃度が低下し、水分含有量が減少することで椎間板内圧が減少し、あたかも空気の抜けたタイヤのごとく衝撃吸収能が障害される。それによって負荷がかかる椎間板外層の線維輪に亀裂が入り、椎間板の機能不全が生じる<sup>10)</sup>。椎間板の機能不全は椎間関節にかかるストレスを増大させ、椎間関節にも炎症や変形が生じてくる<sup>11)</sup>。こうした、病的変化自体が脊柱周囲の神経終末を刺激して、いわゆる椎間板性や椎間関節性の疼痛を生じる。機能不全が進行した結果、線維輪の亀裂が拡大したり不安定性が生じると、髄核成分が脱出してヘルニアとなったり、椎体間のズレすなわち「すべり」を生じ、神経組織の圧迫による関連痛や下肢痛が続発することとなる。退行変性がさらに進むと反応性の骨増殖性変化が目立つようになり、椎間板狭小化や椎間関節変形が著明となり、その椎間は再安定化する一方で脊柱管狭窄が生じ、神経障害を来す<sup>12)</sup> (図3)。こうした腰痛・下肢痛のため、患者のADL、特に歩行能が障害され、QOLの低下につながる。

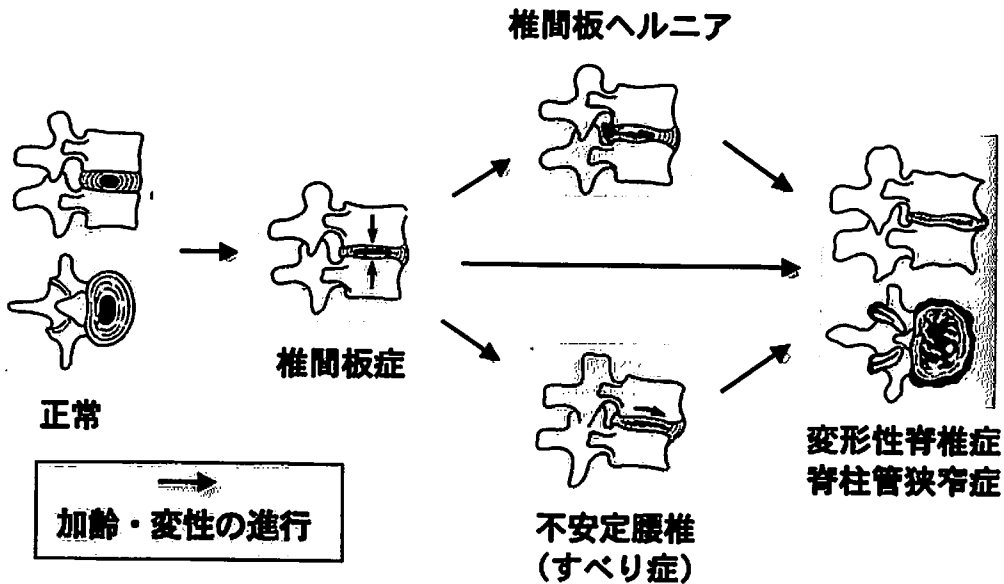


図3：椎間板変性による各種病態の発生機序

椎間板の変性が生じると椎間板内圧の低下による椎間狭小化がみられ、腰痛を自覚するようになり、いわゆる椎間板症と診断される。さらに椎間板変性が進むと時として椎間板ヘルニアや脊椎すべり症を発症する。さらに変性が進むと椎体や椎間関節に変形が生じ、退行変性の週末像として、いわゆる変形性脊椎症と呼ばれる状態となる。本症のうち脊柱管が狭くなり神経症状を呈した場合、脊柱管狭窄症と診断される。文献12)より引用

b) 骨粗鬆症性腰痛

加齢に伴う腰痛のもう一つの主要な原因である骨粗鬆症には、女性ホルモン分泌低下の影響による骨吸収亢進のための閉経後骨粗鬆症と、加齢による骨代謝回転そのものの低下による老人性骨粗鬆症があるが、女性に生じる前者が圧倒的に多い。したがって、男性では年代に関わらず腰痛の有病率は30%前後とほぼ一定であるのに対し、女性は70歳代が42.7%と年齢が上がるほど有病率が高くなるが、それは加齢とともに女性により大きな骨量の低下がみられる結果と考えられている<sup>13)</sup>。骨粗鬆症により大腿骨頸部骨折や橈骨遠位端骨折など様々な脆弱性骨折を生じ易くなるが、中でも最も頻度が高いのは脊椎圧迫骨折であり、欧米では女性の30-50%、男性の20-30%が生涯に1度は脊椎圧迫骨折を経験する

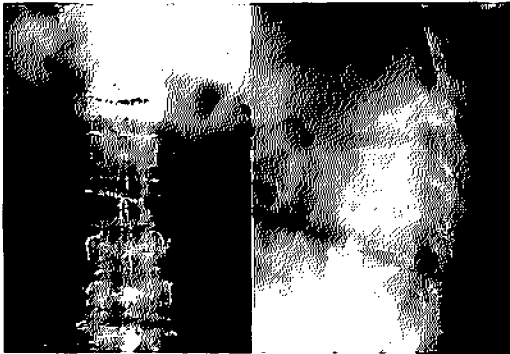


図4：骨粗鬆症性脊椎圧迫骨折

76歳女性、著しい骨粗鬆症のため胸腰椎に多発性の圧迫骨折を認める。強度の腰背部痛に加え、高度の後弯変形を呈し、いわゆる腰曲がりの状態となっている。



図5：化膿性脊椎炎

64歳男性に生じた化膿性脊椎炎。強度の腰痛と両下肢のシビレを主訴として来院した。L4/5椎間板を中心とした骨破壊・骨硬化像を認める。

の報告がある<sup>14)</sup>。本骨折は急性腰背部痛を引き起こし、残存した椎体変形は脊柱の弯曲異常、特に後弯変形を続発させ、それに起因する腰背部痛を生じるという悪循環に陥る(図4)。高度後弯を呈する患者では疼痛や脊椎機能障害のみならず、内臓器の機能障害のためQOLが低下することがある。また、骨折が偽関節となった場合には遅発性の椎体圧潰を生じ、骨片の脊柱管内への突出による脊髄、馬尾の圧迫のための下肢麻痺や膀胱直腸障害を来すこともあり、本骨折が日常生活動作(Activities of daily living: ADL) 障害を引き起こし高齢者の死亡率を増加させている事は明らかである<sup>15, 16)</sup>。

c) その他の腰痛

外傷性腰痛は強い外力による脊柱の構築学的破綻によって、また、腫瘍性、炎症性腰痛は腫瘍や炎症の直接浸潤による椎体破壊に加え、脊柱管への腫瘍、膿瘍や肉芽などの波及によって神経損傷・圧迫を生じ、激しい腰痛と、多くの場合、急性麻痺を呈する(図5, 6)。

以上、さまざまな原因で生じる腰痛ではあるが、その病態は局所の安定性・支持性の破綻と圧迫による神経組織の障害の2つに大別できる。すなわち、椎間板の変性、

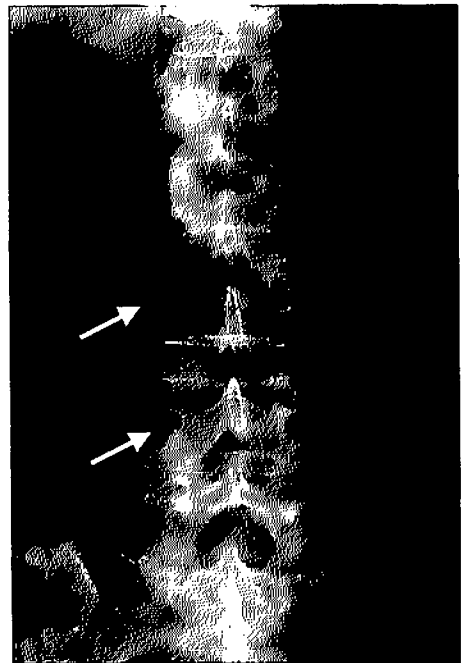


図6：転移性脊椎腫瘍

59歳女性、腰痛を主訴に来院。単純X線にて第3, 4腰椎椎弓根像の消失と骨破壊像をみる(矢印)。生検を施行し、未分化腺癌の病理診断を得たため全身検索を行なったが原発巣は不明であった。

椎体の変形や破壊など、脊椎そのものの安定性が損なわれたため生じる疼痛と、椎間板の突出、骨棘、腫瘍などによる馬尾、神経根の圧迫による神経症状である。

## 6. 腰痛の診断

腰痛を主訴とする患者を診察する際には、まず緊急を要するものか否かの判断が重要となる。特に内臓性や血管性、あるいは脊椎性の中でも感染性や腫瘍性疾患は多くの場合、早期診断と迅速な治療開始が必須となる。常にこうした疾患の可能性を念頭に置き、詳細な病歴の聴取、全身ならびに局所所見、さらには神経学的所見の注意深い観察が要求される。具体的には疼痛の部位や性状、発症様式、増悪の有無などを含めた発症から受診時までの時間的経過を患者から詳しく聞き出すこと、熱発、腹痛、下痢、血尿など脊椎外症状の有無に注意し、背部叩打痛の有無の確認や腹部触診を行なうことが大切である。内臓性や血管性の場合、突然襲う疝痛が多く、姿勢や運動と痛みに関連がない。したがって安静にしても疼痛が軽快しない場合、こうした疾患を考えるべきである。また、嘔気、るいそう、顔色不良、食思不振、血尿など原因となる疾患による症状を伴い、腰痛が唯一の症状であることは少ない。逆に脊椎性の場合、姿勢や運動などの負荷で症状が増悪し、安静で軽快することが特徴的である。

内臓性や血管性腰痛を除外でき、脊椎性腰痛の可能性が高い場合、器質性か非器質性かを鑑別する。その場合、疼痛の性状や神経症状の有無の把握が大切となり、強度の腰・下肢痛や神経症状がある場合、器質的疾患を有する可能性は高く、椎間板ヘルニア、すべり症、脊柱管狭窄症などの変性疾患に加え、腫瘍性あるいは炎症性疾患を疑い、単純 X 線や MRI に CT や骨シンチグラフィを追加して原因を究明する。特に慢性進行性に疼痛や神経障害が悪化する場合や単純 X 線で椎体の破壊、椎間板の狭小化と骨性終板の不整、椎弓根像の消失などをみる場合は、腫瘍性疾患や炎症性疾患を疑い、全身状態、発熱の有無を確認した上で、炎症反応や腫瘍マーカーを含めた血液検査も忘れずに行う（図 5、6）。手術を念頭に置く場合、脊椎造影、椎間板造影や造影後 CT は、手術術式の選択や術前プランニングに有用な情報を提供する。

こうした画像診断技術の進歩によって脊椎疾患の診断精度の著しい向上がもたらされた。一方で腰痛の診断における大きな問題は画像上の変化と臨床症状が必ずしも一致しないことである。すなわち画像上著しい変性性変

化をみても腰痛をみないことや、その逆も稀ではない。特に MRI は極めて鋭敏な検査であるがゆえに臨床的に意義の少ない軽微な変化をもとらえることがあり、その解釈には十分な注意が必要である<sup>17)</sup>。したがって、腰痛の診断は、臨床所見、画像所見、その他の補助診断を適宜組み合わせ、患者の社会的、心理的側面をも念頭に置きつつ慎重に行う必要がある。

神経所見、画像所見いずれにおいても明らかな異常が見られない場合、筋々膜炎など非器質性腰痛やごく初期の椎間板変性、椎間関節症を含む“いわゆる腰痛症”と診断される。著しく長期にわたり非器質性腰痛を訴える患者には何らかの心理的要因の加重を考えるべきである。大方の場合、患者の生活様式、職業、既往歴、過去の受診歴、治療歴などを詳細に聞き出すことで特定できる。

心理的要因の加重を調べる簡単な方法として患者自身に痛みの部位を記入させる疼痛描写の他、flip test、Hoover test などの臨床鑑別テストや MMPI などの心理テストが有用である<sup>18)</sup>。

## 7. 腰痛に対する治療の現状

### a) 腰痛に対する保存療法

腰痛の原因としてもっとも頻度の高い機能性腰痛の真の原因は不明なため保存療法による対症療法が主体となる。また、腫瘍や外傷によるものを除き、多くの器質性腰痛疾患の治療もまずは保存療法が原則となる。しかし、腰痛に対し有効性が科学的に立証された保存療法は少なく、その多くは医師の経験や勘に基づいて行われており、この点でわが国の保存療法や腰痛予防に関する基礎研究は不十分と言わざるを得ない。欧米ではさまざまな randomized control trial (RCT) によって特定の治療法の効果を科学的に検証する試みが数多くなされているが、今のところ急性腰痛に効果があるとされているのは消炎鎮痛剤を含めた薬物療法と一部の脊椎マニピュレーションのみであり、安静、注射、理学療法や運動療法の有効性は証明されていない<sup>19)</sup>。しかし、こうした結果を直ちに医療制度が異なり、正式な脊椎マニピュレーションの教育や資格が確立されていない我が国に当てはめられるかは疑問であり、今後我が国の実態に即した科学的検証が必要と思われる。

#### i. 安静

従来、腰痛に対する治療の基本は安静とされてきたが、過度の安静はむしろ腰痛の回復を遅らせることが欧米のレビューやガイドラインでも明記されている<sup>20)</sup>。最近では臥床安静を勧めることは少なく、疼痛を誘発する姿勢、



運動など日常生活動作上の負担を避けつつ、ある程度活動性を維持させる指導がなされる。また、就業についても痛みを誘発あるいは増悪させる特定の作業や姿勢のみを制限し、可能な限り就業を継続させることが主流である。

ii. 薬物療法

薬物療法は急性腰痛症に対する有効性のエビデンスが示されている数少ない治療法であり、欧米では非ステロイド系消炎鎮痛剤 (non-steroid anti-inflammatory drugs: NSAIDs) あるいは弱オピオイドの短期の、しかも定期的内服が有効とされており、本邦のごとく頓服としては使われない。我が国では、NSAIDs、筋弛緩剤、ビタミン剤の内服、湿布や軟膏の外用、プロスタグランジン製剤の注射や内服などが症状、病態に応じて適宜行われ、特に急性腰痛に対しては NSAIDs の坐剤が頻用されている。NSAIDs は有効である反面、消化管出血を初めとする副作用に十分な注意が必要である<sup>19, 20)</sup>。

iii. 注射療法

その強い鎮痛効果から乱用されることがある一方で、副作用の危険性が必要以上に危惧され、むやみに避けられることもあるなどその適正な使用に関する定説はない。しかし、有効に活用することで治療のみならず診断に関する重要な情報も得られる有用な方法である。疼痛誘発点 (トリガーポイント) に局所麻酔剤とステロイド剤を少量注射する局所ブロック、仙骨裂孔から局所麻酔剤とステロイド剤に生食 10 cc を加え注入する硬膜外ブロック、椎間板ヘルニア、脊柱管狭窄症などによる根性坐骨神経痛に対し、透視下に障害されていると考えられる神経根に直接針を当て、症状の再現性を確認した後、局所麻酔剤とステロイド剤を注入する神経根ブロックがある。

iv. 理学療法

数多くの手技が含まれるが、その有効性に関する科学的検証はほとんどなされていない。唯一運動療法のみが、欧米の RCT において一部の腰痛に対し有効であったと報告されている<sup>21)</sup>。

- 装具療法：軟性、硬性の体幹装具が局所の安静、過度の運動の抑制、低下した筋力の補助などの目的で使用されている。漫然と長期に使用し、腹背筋の萎縮や拘縮、精神的依存を作らないよう配慮する。
- 温熱療法：局所の循環改善、粘弾性増加を目的に行われる。ホットパック、パラフィン浴、赤外線などの表面温熱と極超短波、超音波などの深部温熱がある。
- 牽引療法：その作用機序として安静効果、筋や関節のストレッチ効果などが唱えられているものの十分に説明はされていない。効果がない症例には漫然と長期に

続けるべきではない。

- 運動療法：いわゆる急性期には適応はないが、亜急性期、慢性期腰痛に対する治療として有効であるとの報告がある。筋力増強訓練、腰痛体操などがあり、拘縮した筋、関節のストレッチ、腹背筋力増強、姿勢の矯正などの目的で行われる。心肺機能を含めた全身状態を考慮しながら、個々に適した運動プログラムを作成する必要がある。しかし、どのような運動をどれくらい行えば良いのか、腰痛発症に対する予防効果はあるのか、など多くの点が未解明である。

b) 腰痛に対する主な手術療法

いかなる原因の腰痛にせよ手術に耐え得る全身状態と患者、家族の十分な informed consent が施行の前提となる。腫瘍、化膿性炎症、外傷などによる腰痛ではたとえ神経症状が無くても、腫瘍の増大や膿瘍の形成、外傷後の脊椎不安定性などにより、神経障害の発現や腰痛遺残の危険性が極めて高いと判断される例では、脊椎腫瘍摘出術、掻爬骨移植術、脊椎再建術などの適応となる。変性疾患の場合、MMT3 以下の著しい麻痺や進行性の麻痺をみる場合、膀胱直腸障害が出現した場合、最低6週の徹底した保存療法にも関わらず強度の腰・下肢痛やシビレ、脱力などが持続し、就業、学業、日常生活に支障をきたす場合に手術を考慮する<sup>22)</sup>。しかし、実際には患者の社会的あるいは心理的背景なども十分考慮に入れ、患者との信頼関係、術者の経験や技術、患者、家族の希望などを考慮して症例ごとに手術適応が決められている。理想的には主治医がいくつかの治療選択肢を呈示し、その得失を理解、納得した上で患者自身が選択することが望ましい。

前述のごとく、腰椎疾患の病因は局所の安定性・支持性の破綻と圧迫による神経組織の障害の2つに大別できるため、手術も脊椎安定性の再獲得すなわち固定術と神経組織の圧迫や絞扼の解除すなわち除圧術の2つが基本となる。以下に主な術式につき解説する。

i. 後方除圧術

① 椎弓切除術 (Laminectomy)

棘突起、椎弓ならびに棘上・棘間靭帯、黄色靭帯を含め後方支持組織を全切除し、脊柱管を広範に除圧する術式であり、あらゆる脊椎手術の基本となる術式である (図7a)。しかし、脊柱支持性の低下による不安定性発生の危惧から徐々にその適応は限定されており、特に外傷、脊椎腫瘍、すべり症、変性側弯症などに対しては脊椎固定術が併用されることが多い。しかし、巨大正中ヘルニアや中心性脊柱管狭窄症、脊髄腫瘍摘出などの際に

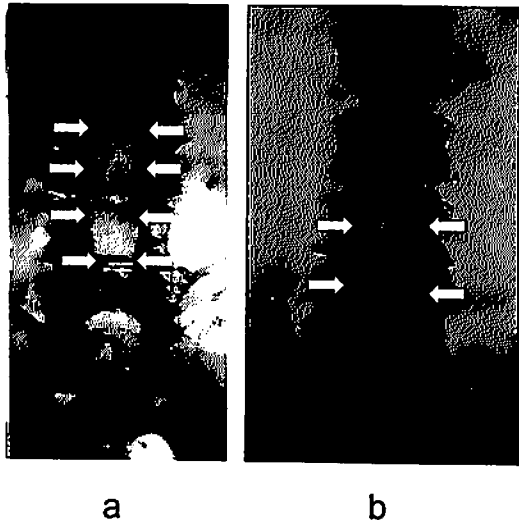


図7：後方除圧術

- a 椎弓切除術：脊椎手術で最も基本となる術式。後方より進入し棘突起、棘上・棘間靭帯、椎弓を切除し脊柱管を広く除圧する。ただし、後方支持組織を全切除するため術後の不安定性を招来する危険性がある。
- b 開窓術（部分椎弓切除術）：棘突起、棘上・棘間靭帯を温存しつつ、椎弓の一部を切除し、椎弓間を中心に除圧する。特に外側陥凹部での神経根の除圧に適している。

は現在でも本術式が常用される。また近年、棘突起基部の骨切り後に椎弓を切除する方法や片側進入により両側除圧を行なう方法など、後方支持組織を可及的に温存する椎弓切除術が開発され、後述する開窓術との厳密な区別が困難となってきた。

②椎弓間開窓術（Laminotomy, fenestration）、部分椎弓切除術（Partial laminectomy）

片側の椎弓間を展開し、上下の椎弓縁を部分的に削除したのち黄色靭帯を摘出し、神経根、硬膜を正中へ排除しつつ椎間板ヘルニア塊を摘出する術式は、本邦ではLove法と呼ばれ、最も多く施行されてきた脊椎手術である<sup>23)</sup>。脊柱管狭窄症に対しては両側性に椎弓間開窓が行われ、上下椎弓の黄色靭帯付着部に加え椎間関節内側部も切除し外側陥凹部まで広く除圧する（図7b）。最近では最小侵襲手術（minimally invasive surgery）として手術用顕微鏡視下（microscopic）あるいは内視鏡視下（endoscopic）にヘルニア摘出や脊柱管除圧を行なう術式が普及している。われわれも現在、椎間板ヘルニアに対しては内視鏡下ヘルニア摘出術（Micro-endoscopic discectomy：MED）を標準術式としている<sup>24)</sup>（図8）。

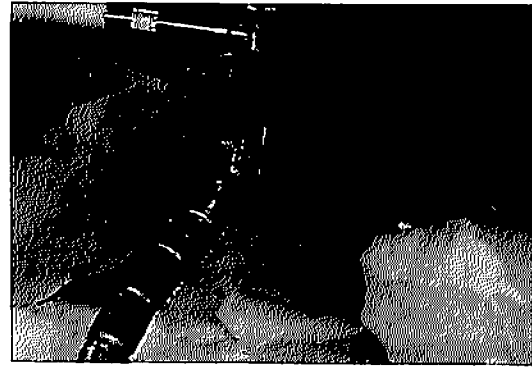


図8：内視鏡下ヘルニア摘出術

MTRx System（Medtronic Sofamore Danek社）による内視鏡下のヘルニア摘出術の実際。約1.5cmの皮切でworking cannulaを椎弓上まで挿入し、内視鏡下に椎弓間開窓、ヘルニア摘出を行なう。術後の創痛が少なく、術翌日より起立歩行、術後3日での退院が可能である。

ii. 脊椎固定術

①前方進入椎体間固定術（Anterior lumbar interbody fusion：ALIF）

仰臥位で腹部に皮切を加え、腹膜を腹腔内臓器とともに一側へ排除し後腹膜腔に達する。大血管を保護しつつ椎柱前面を展開したのちに椎間板を切除・郭清し、椎間開大位で移植骨を打ち込み椎体間を固定する（図9a）。本術式の最大の利点は脊柱管内に侵襲を加えないことであり、再発ヘルニア、術後不安定腰椎などで脊柱管内の

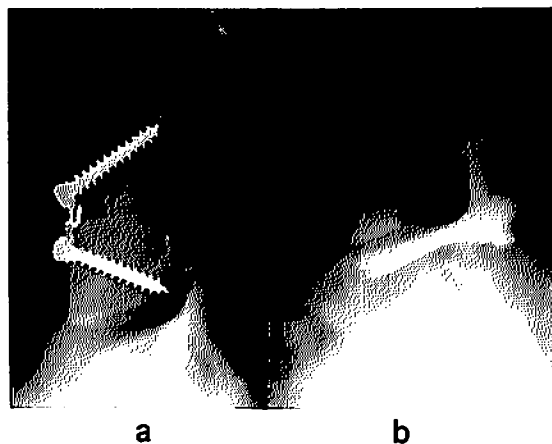


図9：脊椎固定術

- a：前方固定術，b：後方進入椎体間固定術

最近ではいずれの手術も早期の離床と骨癒合率の向上を目指し、様々なinstrumentationとの併用を含めた術式の改良が重ねられている。

癒痕による癒着がある例や脊椎腫瘍、化膿性脊椎炎、脊椎カリエスなど椎体に主病巣がある例が良い適応となる<sup>25)</sup>。一方で、大血管損傷、交感神経叢損傷による逆行性射精、イレウスなど整形外科医が遭遇する機会の少ない合併症が生じることがあり注意を要する。

②後方進入椎体間固定術 (Posterior lumbar interbody fusion : PLIF)

椎弓に加え内側椎間関節切除による完全な神経除圧後に、硬膜管、神経根を一侧に排除しつつ後方より椎間板を郭清し椎体間に骨移植を行なう。従来は固定術後3-4週のギブスベッド上の安静臥床を要していたが、pedicle screw systemや椎体間ケージなど脊椎インストルメンテーションの併用により、すべり、側弯や後弯などの変形矯正と即時かつ強固な固定性が得られ<sup>26)</sup>、術後数日での離床が可能となり、骨癒合率の向上がもたらされた (図9b)。

③後側方固定術 (Posterolateral fusion : PLF)

椎弓切除による神経除圧後に椎間関節外側から横突起にかけ皮質骨を削除し海綿骨を露出 (decortication) した上で、骨移植を行なう。脊柱管内への侵襲は少ないが、側方への展開が大きくなることで筋層への侵襲は大きい。椎体間の固定が得られないため、整復ならびに固定性は PLIF に比し劣るとされている。通常は pedicle screw system が併用される<sup>27)</sup>。

c) 主な腰痛疾患に対する術式選択

i. 腰部椎間板症

3から6ヶ月の保存的治療に抵抗し、学業、就業、日常生活に著しい制限をもたらす腰痛があり、単純X線で著しい椎間不安定性や狭小化、終板の不整等があり、MRIでも椎間板変性や終板、椎体の輝度変化を認め、椎間板造影時に腰痛の再現性がある症例で心因性要因を除外できる場合、ALIFの適応となる<sup>28)</sup>。近年では内視鏡下前方固定術あるいは特殊な開創鉤を用いて小皮切で行う mini ALIFが開発され、われわれも症例に応じて採用している<sup>28)</sup> (図10)。

ii. 腰椎椎間板ヘルニア

大部分の症例でLove法によるヘルニア摘出が行われる。特に最近では内視鏡視を用いる Microendoscopic discectomy (MED) が急速に普及しつつある<sup>23, 24)</sup> (図8)。

iii. 腰椎分離・すべり症

分離のみあるいはすべりが軽度で、保存的治療に抵抗する腰痛が持続する症例のうち椎間板の変性がないか軽度な場合、分離部固定術の適応となる<sup>29)</sup> (図11)。一方、



図10 : Mini-ALIF

特殊な開創器を用い、約5cmの小皮切で行なう前方固定術。本症例は28歳の調理師で著しい腰痛に対し、L2/3のmini-ALIFを施行。術後腰痛は完全に消失し、職場に復帰している。文献2)より引用



図11 : 分離部固定術

脊椎分離に起因、保存療法に抵抗する頑固な腰痛があり、椎間板変性が少ない場合、本術式の適応となることがある。文献2)より引用

椎間板変性が高度ですべりが進行し、下肢症状を呈している例では PLIF の適応となる。

iv. 腰椎変性すべり症

40歳以降の中年女性に多く、先天的な椎間関節の形状に加え、椎間板ならびに椎間関節の退行変性によって発症すると言われている。比較的若年で不安定性による腰痛が主である初期から中期の症例には ALIF を (図9a)、中期から後期で不安定性に脊柱管狭窄による神経症状が加重した症例には PLIF (図9b) を、末期で不安定性が消失し、腰痛は無いが安静時にも下肢症状がある症例には後方除圧術 (図7) と、患者の年齢、活動度、病期に応じて術式が選択される<sup>30)</sup>。

v. 腰部脊柱管狭窄

主に後方除圧術の適応となる。従来、外側狭窄が強い

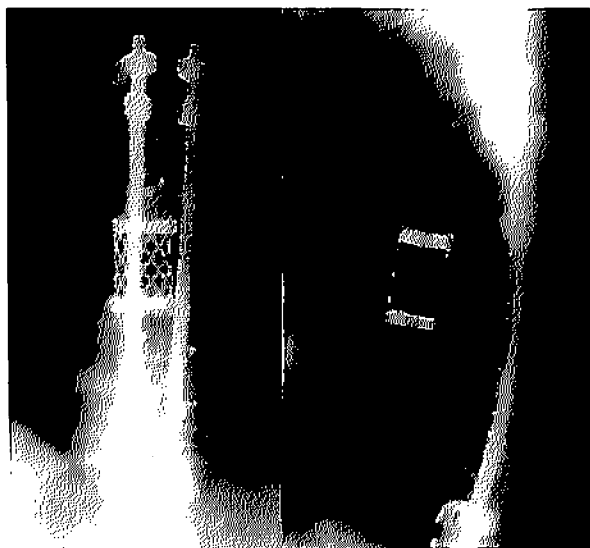


図 12：転移性脊椎腫瘍に対する全脊椎切除術 (total en-bloc spondylectomy)

48 歳男性，第 8 胸椎甲状腺癌転移に対し後方進入による一期的全脊椎切除術とチタン製椎体ケージを用いた脊柱再建術を施行した。術後 8 年の現在，腫瘍の再発もなく，通常の生活を送っている。

例，比較的若年で活動性の高い例では開窓術が，中心性狭窄例や高齢者では椎弓切除術が選択されることが多かったが (図 7)，近年の棘突起温存法や片側進入法などの普及により，両術式の厳密な区分が曖昧となってきた。医原性狭窄例や不安定性が強い例では固定術が追加されることがある<sup>31)</sup>。

vi. 腰椎の外傷，炎症，腫瘍

詳細な術式は他書に譲るが，外傷後の脊柱再建術，感染性疾患に対する搔爬骨移植術，脊椎腫瘍摘出+再建術など一見大掛かりな手術も基本的には除圧術と固定術の組み合わせである。麻酔の進歩に伴う全身管理の向上とインストゥルメンテーション手術の発達により，従来では不可能と考えられていた悪性腫瘍に対する全脊椎切除術 (total en bloc spondylectomy) などの根治的手術も症例によっては可能となり，治療成績の著しい向上が得られている<sup>32)</sup> (図 12)。

d) 最近注目されている新たな治療法

i. レーザー椎間板蒸散法を含めた中間療法

従来から椎間板ヘルニアに対する治療として保存療法と手術療法の間位置する各種の中間療法が開発・施行され注目を浴びてきた (表 3)。化学的髄核融解

表 3：中間療法

- 椎間板内酵素注入法 (Chemonucleolysis)
  - Chymopapain
  - Chondroitinase ABC
  - Collagenase
  - Aprotinin
  - Steroids
- 経皮的髄核摘出術 (Percutaneous nucleotomy)
- レーザー髄核蒸散術 (Laser discectomy)

(chemonucleolysis) は Smith らによって初めて提唱された概念であり，タンパク分解酵素であるカイモパペイン (chymopapain) を椎間板内に注入し，椎間板内圧を減弱させることで突出したヘルニアによる神経への圧迫を減弱せしめ，症状の軽減を図る治療法である<sup>33)</sup>。その簡便性のため 1970 年代から 80 年代前半にかけて欧米を中心に広く普及したが，アナフィラキシーショックによる死亡例や硬膜内への誤注入による神経麻痺などの副作用のため本邦への導入はなされなかった。一方，本邦では椎間板造影に準じたアプローチで椎間板にカニューレを挿入し，特殊な鉗子を用いて髄核を摘出，椎間板内圧を低下させ，ヘルニアによる神経根への圧迫を減じる経皮的椎間板摘出術が土方によって創始され普及した<sup>34)</sup> (図 13)。本法は 1980 年代後半にかけて世界中に広まり，その後のレーザー蒸散法や内視鏡手術開発の基盤となった。レーザー髄核蒸散法は細いガイドカニューレを通してレーザーファイバーを椎間板内へ刺入し，レーザーの照射によって髄核を蒸散することでその容積を減少させ，突出した椎間板の内圧を下げ，ヘルニアによる神経



図 13：経皮的髄核摘出術

1975 年，土方が創始し，世界に先駆けて発表した方法。椎間板造影後の注射針に順次外径が大きくなる dilator を被せつつ刺入路を拡大し，最終的に径 4 mm の外套管を椎間板外縁まで挿入する。髄核パンチを外套管内を通して椎間板へ挿入し，髄核を咬除・摘出することで間接的に突出したヘルニアの減圧を図る。

の圧迫を弱めるのがその原理である<sup>35)</sup>。昨今、その有効性のみが声高に叫ばれ、マスコミを賑わしており、保険適応外にも関わらず比較的短期間に多数の症例に施行されている。本法はその簡便性や低侵襲性のみが注目されているが、最近では有効率が5割にも満たないとの報告もあり、さらには適応の間違いや誤った手技による合併症の報告も増えている<sup>36)</sup>。何れにせよ本法に対する適切な対照群を設定した比較研究が全くなされていない現在、その有効性の科学的検証が強く望まれている。

ii. Intradiscal electrothermal therapy (IDET)

経皮的に椎間板内に特殊な電極を挿入し、約80度の熱を発生させ、椎間板内のコラーゲンを変性させ、線維輪の亀裂を修復することで椎間板性疼痛の軽減を図る方法である<sup>37)</sup>。米国を中心に数年前に爆発的に流行したが、最近はその効果に否定的な基礎研究結果の発表が相次いでおり、やや下火となっている。

iii. 骨移植代用物質 (Bone graft substitutes) を用いた固定術

脊椎固定術の際に移植用の自家腸骨を採取した後にしばしば採骨部痛や外側大腿皮神経障害が問題となる。こうした障害を回避する目的で欧米でさまざまな骨移植代用品 bone graft substitute が開発された。特に米国では従来より同種移植 (allograft) が盛んに用いられてきたが、骨癒合能の点で問題があった。その欠点を補うべく脱灰骨基質 (demineralized bone matrix : DBM)、血小板ゲル (platelet gel)、コラーゲン+ハイドロキシ

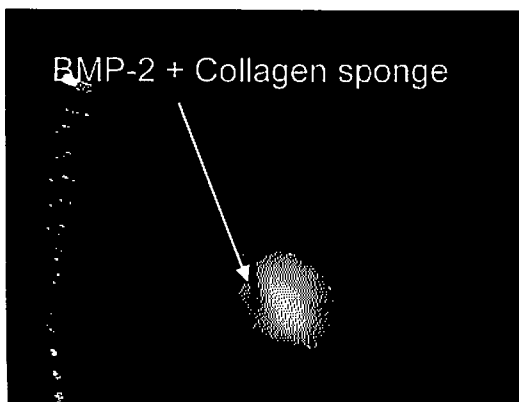


図14 : Infuse Bone Graft + LT cage

米国で脊椎固定術への使用が初めて正式に認可されたBMP製剤。BMP-2をコラーゲンスポンジにしみ込ませ、ねじ山付円筒ケーシング内へ充填し、前方より展開した椎間板腔へ挿入する。(Medtronic Sofamore Danek社より資料提供)

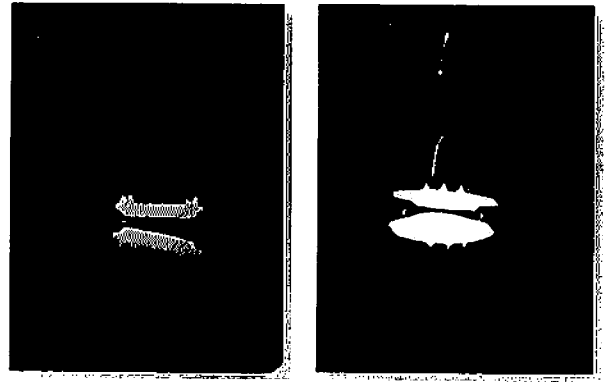


図15 : Charité型人工椎間板

2004年10月、米国FDAによって承認された初めての人工椎間板。既に全世界で3000例以上の臨床例に使用されている。(Depuy Spine社より資料提供)

アバタイト複合体など数多くの製品が市場に出回った。最近では骨形成タンパク bone morphogenetic protein (BMP) の脊椎固定術への臨床応用も開始された<sup>38)</sup>。現在、BMP-2は前方固定術の際に椎間ケージとの併用(図14)で、また、BMP-7(別名Osteogenic Protein-1 : OP-1)も後側方固定術の一部症例での使用が、米国食品衛生局 Food & Drug Administration (FDA)により認可されている。BMPの臨床治験は我が国でも行われており、その結果いかんでは近い将来導入される可能性がある。

iv. 人工椎間板置換術

病因となっている椎間板を固定せず、その可動性を保持する目的で1980年代から東ヨーロッパを中心に人工椎間板の開発と臨床試験が行われてきた。しかし、初期のモデルは脱転や大血管損傷などの合併症のため普及するには至らなかった。1990年代後半より米国で開発が再開され改良が進んだ結果、2004年10月ついにChareite Artificial Disc (Depuy Spine Inc.)がFDAによって認可された<sup>39)</sup>(図15)。現在、椎間板性腰痛に対する最も新しい治療法として注目を浴びている。しかし、まだ一部の症例を除き経過観察期間が短く、脱転、摩耗などの合併症の報告も散見され、今後より長期の厳重な経過観察が必要である。その結果次第では我が国でも普及する可能性がある。

v. 椎間板修復・再生

従来、変性性腰痛に対する治療としては、変性した椎間板を切除し固定あるいは置換するという発想が主流であったが、近年の再生工学的手法の発達に伴い椎間板自体を修復・再生させる試みが始まっている。様々な手



法によって椎間板内の基質代謝を活性化させ、椎間板の変性を遅延させ、修復を促進させようとするものであり、その手法により次の3つに大別される。1) サイトカイン療法 (cytokine therapy)：増殖因子、骨形成因子を椎間板内に直接注入する方法であり、BMP2, 7, TGF-beta, FGF などの注入により椎間板における基質の産生が亢進することが既に実験的に示されている<sup>40)</sup>。しかし、1回の注入ではその効果の持続性に問題があることから、次の遺伝子治療が注目されるに至った。2) 遺伝子導入法 (gene therapy)：遺伝子導入によって椎間板内の細胞自体に増殖因子を発現させる方法が模索されている。神戸大学の西田らは Adenovirus を用いて椎間板内に遺伝子が効率的に導入できることを初めて示した<sup>41)</sup>。その後、数多くのベクターや物理的手法による椎間板細胞内への遺伝子導入が試みられているが、未だに決定的なものはない<sup>42)</sup>。3) 細胞療法 (cell therapy)：賦活化した髄核細胞や間葉系幹細胞など in vitro で操作を加えた細胞を椎間板内へ直接移植する方法であり、最近脚光を浴びはじめている。特に東海大学の持田、酒井らの間葉系間細胞を用いた細胞移植による椎間板再生の一連の研究はその先進性から内外で高い評価を受けている<sup>43)</sup>。

vi. 椎体形成術、後弯形成術

近年、骨粗鬆症性椎体骨折新鮮例に対し、椎弓根から骨セメントを注入する椎体形成術 (vertebroplasty) や

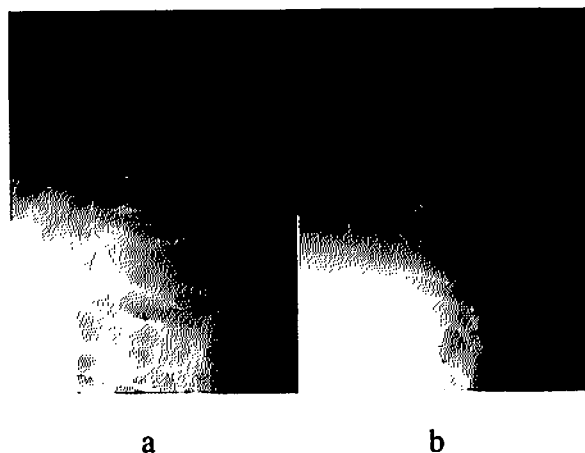


図 16：後弯形成術

76 歳男性、第 12 胸椎の圧迫骨折後偽関節のため著しい腰背部痛を来し、体動困難となった。両側椎弓根より終板エレベーターを挿入し圧潰した椎体の変形を矯正後、ハイドロキシアパタイトブロックを椎体内に充填した。術直後より腰背部痛は軽減し、歩行可能となった。  
文献 2) より引用

バルーンで楔状化した椎体を整復し、空いた間隙に骨セメントを注入する後弯形成術 (kyphoplasty) が吹米を中心に導入され、その高い有効性が報告されている<sup>44)</sup>。本法では即時の除痛と椎体骨折部の固定性が得られ、直ちに離床が可能となり、極めて利点が多い一方で、骨セメントの脊柱管内への漏出による神経麻痺など、重篤な合併症の報告も散見される。我が国では骨セメントの替わりにより安全で生体親和性の高いリン酸カルシウムセメントやハイドロキシアパタイトブロックなどを挿入する方法が行われており、今後の症例の蓄積に伴った有効性の科学的検証が待たれている<sup>45, 46)</sup> (図 16)。

8. おわりに

従来、腰痛に対してはまず対症療法を行い、それが無効の場合、除圧あるいは固定を行なうというきわめて限られた治療選択肢しか存在しなかった。しかし、科学の進歩とともに腰痛に対する治療も著しく変遷し、病態に合わせた細かい治療法選択が可能となってきた。大きな侵襲を伴いながら行われている脊椎固定術や現時点では不可能とされている変性椎間板の再生が近い将来 1 本の注射で行なえるようになる日が訪れるかもしれない。

一方で我々が目指している治療法は全て器質的病変、すなわち画像検査で捉えられる構築上の異常や診察所見で捉えられる機能的異常を解消することを目標としている。その結果、除圧後の神経機能回復に関してはある程度満足すべき成績が安定して得られるようになった。その一方で、こと腰痛に関しては、治療法が進歩し選択肢が増えた現在でも必ずしも満足すべき成績は得られていない。最近の研究より腰痛の発症には心理的、社会的因子の関与が極めて大きいことが判明している。したがって、手術によって解剖学的病変は修復できても、腰痛という個々の患者がもつ身体的精神的問題を全て解決できるわけではないことを常に念頭に置き、謙虚な気持ちで診療に当たるべきである。

文 献

- 1) 菊地臣一：腰痛診療と EBM. 腰痛. 医学書院, 東京, p 17-23, 2003.
- 2) 千葉一裕：腰痛に対する手術療法の意義と適応. Clinical Calcium 15: 343-351, 2005.
- 3) 厚生統計協会：第 2 編 衛生の主要指標 第 4 章 健康状態と受療状況. 厚生指標 (臨時増刊)・国民衛生の動向 50: 71-77, 2003.
- 4) 紺野慎一, 菊地臣一：高齢者の運動機能維持に向けて - 腰痛対策. 関節外科 22: 1524-1527, 2003.

- 5) 佐藤勝彦, 菊地臣一: より効果的な腰部疾患の治療. 整・災外 43: 1487-1492, 2000.
- 6) 厚生統計協会: 第7編 労働衛生 第2章 労働衛生の現状. 厚生の指標 (臨時増刊)・国民衛生の動向 50: 305-308, 2003.
- 7) McCulloch JA, Transfeld EE: Classification of low back pain. Macnab's backache. 3rd. ed. Williams & Wilkins, Baltimore, p 86-89, 1997.
- 8) 千葉一裕: 腰痛疾患に対する各種画像のポイント. 背・関節・靭帯 16: 844-851, 2003.
- 9) 千葉一裕: 運動器官の正常構造と機能 C 脊椎・脊髄の構造と機能 1. 脊椎の構造と機能. 整形外科学・外傷学 (第7版, 岩本幸英他編) 文光堂 p 46-51, 2005.
- 10) Kirkaldy-Willis WH, Mierau D: The three phases and three joints. Managing Low Back Pain, 4<sup>th</sup> ed (Kirkaldy-Willis WH, Bernard TN eds), Churchill Livingstone, New York, p 249-262, 1992.
- 11) 千葉一裕, 戸山芳昭, 外田浩一, 他: 椎間板変性の病態生理学. 脊椎脊髄 12: 471-475, 1999.
- 12) 菊地臣一: 4. 腰椎変性疾患. 28 胸椎, 腰椎 第5編 疾患各論. 標準整形外科 第9版 (鳥巢岳彦, 国分正一総編), 医学書院, 東京, p 476-496, 2005.
- 13) 福原俊一, 鈴鴨よしみ, 高橋奈津子, 他: RDQ (Rolland-Morris Disability Questionnaire) 日本語 JOA 版マニュアル, 日本整形外科学会学術プロジェクト委員会監修, 日本リサーチセンター, 東京, 2003.
- 14) Ross PD: Clinical consequences of vertebral fractures. Am J Med 103: 30S-43S, 1997.
- 15) 宮腰尚久, 井樋栄二: 高齢者の脊柱変形と生活運動機能障害. 整・災外 45: 731-737, 2003.
- 16) 加藤浩三, 芝啓一郎: 骨粗鬆症性椎体骨折による遅発性麻痺の成因と治療. 整・災外 41: 1555-1561, 1998
- 17) Boden SD, Davis DO, Dina TS, et al: Abnormal magnetic-resonance scans of the lumbar spine in asymptomatic subjects. A prospective investigation. J Bone Joint Surg Am 72: 403-408, 1990.
- 18) 千葉一裕: 心因性腰痛. 腰椎の臨床 (戸山芳昭編) メジカルビュー p 294-298, 2001.
- 19) 菊地臣一: 第11章 腰痛の治療. 腰痛 医学書院, 東京, p 225-298, 2003.
- 20) Royal College of General Practitioners, Chartered Society of Physiotherapy, et al: The clinical guidelines for the management of acute low back pain. RCGP, London, 1999.
- 21) Agency for Healthcare Policy and Rerearch: Clinical practice guideline 12-Acute low back pain problems in adults. AHPR, US Dept of Health and Human Service, Washington DC, 1994.
- 22) 辻陽雄: 観血治療の位置決めと適応. 基本腰椎外科手術書, 第3版, 南江堂, 東京, p 10-12, 1997.
- 23) 千葉一裕: 腰椎椎間板ヘルニアに対する髄核摘出術 (いわゆる Love 法). 執刀医のためのサージカルテクニック 脊椎 (徳橋泰明編), メジカルビュー社, 東京, p 6-15, 2004.
- 24) 吉田宗人, 麻殖生和博, 角谷英樹, 他: 後方進入椎管内視鏡視下手術の適応と臨床成績 315 例の検討. 臨整外 39: 563-569, 2004.
- 25) 千葉一裕, 松本守雄, 西澤隆, 他: 腰痛に対する前方固定術. 脊椎・脊髄外科の最前線 (菊池晴彦, 他監) 先端医療技術研究所, 東京, p 253-258, 2002.
- 26) 山本利美雄, 岩崎幹季, 宮内晃: 変性すべり症に対する後方侵入椎体間固定術 (PLIF) の適応と手技. MB Orthopaedics 17: 113-120, 2004.
- 27) Axelsson P, Johnsson R, Stromqvist B, et al: Posterolateral lumbar fusion. Outcome of 71 consecutive operations after 4 (2-7) years. Acta Orthop Scand 65: 309-314, 1994.
- 28) Mayer HA: A new microsurgical technique for minimally invasive anterior lumbar interbody fusion. Spine 22: 691-700, 1997.
- 29) 徳橋泰明: イラストレイテッド・サージェリー 手術編 腰椎分離症に対する分離部固定術. 脊椎脊髄 16: 811-818, 2003.
- 30) 松本守雄, 西澤隆, 中村雅也, 他: 腰椎変性すべり症の治療 腰椎変性すべり症に対する後方手術例の成績 固定・非固定例の分析. 臨整外 38: 271-277, 2003.
- 31) 高橋和久: 高齢者の腰痛—診断から治療まで— 手術療法 法の適応と注意点 2) 脊柱管狭窄症 (Lumbar spinal canal stenosis). MB Orthopaedics 14: 64-69, 2001.
- 32) Tomita K, Kawahara N, Baba H, et al: Total en bloc spondylectomy. A new surgical technique for primary malignant vertebral tumors. Spine 22: 324-333, 1997.
- 33) Smith L, Brown JE: Treatment of lumbar intervertebral disc lesions by direct injection of chymopapain. J Bone Joint Surg Br 49: 502-19, 1967.
- 34) Hijikata S: Percutaneous nucleotomy. A new concept technique and 12 years' experience. Clin Orthop Relat Res 238: 9-23, 1989.
- 35) 米沢卓実, 小野村敏信, 本村喜代二, 他: レーザーによる椎間板ヘルニア髄核の蒸散. 中部整災誌 31: 735-736, 1988.
- 36) 高橋和久, 遠藤友規, 守屋秀繁, 他: 腰椎椎間板レーザー治療後再手術例の検討. 臨整外 37: 813-818, 2002.
- 37) Biyani A, Andersson GB, Chaudhary H, et al: Intradiscal electrothermal therapy: a treatment option in patients with internal disc disruption. Spine 28: S8-14, 2003.
- 38) Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG, et al: Bone grafting alternatives in spinal surgery. Spine J 2: 206-215, 2002.
- 39) Anderson PA, Rouleau JP: Intervertebral disc arthroplasty. Spine 29: 2779-2786, 2004.
- 40) An HS, Takegami K, Kamada H, et al: Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. Spine 30: 25-31, 2005.
- 41) Nishida K, Kang JD, Suh JK, et al: Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implication for treatment of intervertebral disc degeneration. Spine 23: 2437-2442, 1998.

- 42) Shimer AL, Chadderdon RC, Gilbertson LG, et al : Gene therapy approaches for intervertebral disc degeneration. *Spine* 29 : 2770-2778, 2004.
- 43) 酒井大輔, 持田譲治, 山本至宏, 他 : 骨髄間葉系幹細胞移植による椎間板変性抑制. *臨整外* 39 : 497-502, 2004.
- 44) Garfin SR, Yuan HA, Reiley MA : New technologies in spine. Kyphoplasty and vertebroplasty for the treatment of painful osteoporotic compression fractures. *Spine* 26 : 1511-1515, 2001.
- 45) 武政龍一, 山本博司, 谷俊一, 他 : 骨粗鬆症性椎体骨折に対するリン酸カルシウムペースト注入による椎体内修復術. *臨整外* 37 : 457-465, 2002.
- 46) 松崎浩巳, 星野雅洋, 徳橋泰明, 他 : 骨粗鬆症性脊椎骨折の治療. Transpedicular Kyphoplasty による骨粗鬆症性脊椎骨折の治療. *日整会誌* 78 : 243-249, 2004.
-

原 著

慶應義塾大学病院における 35 年間の腎生検  
—概略と膜性腎症例の詳細検討—

<sup>1)</sup>慶應義塾大学医学部内科, <sup>2)</sup>慶應義塾大学医学部病理

あさ い まさ き 樹<sup>1)</sup>・こ にし こうのすけ<sup>1)</sup>・ふく だ せい いち<sup>1)</sup>・うち じら ひで き 輝<sup>1)</sup>・たか せ 瀨 おさむ<sup>1)</sup>  
ちから いし あき ひろ はやし まつ ひこ さる た たか お はし ぐち あきのり<sup>2)</sup>  
力 石 昭 宏<sup>1)</sup>・林 松 彦<sup>1)</sup>・猿 田 享 男<sup>1)</sup>・橋 口 明 典<sup>2)</sup>

ABSTRACT

The results of renal biopsies performed within the past thirty five years at Keio University Hospital, with an analysis in detail of the cases with membranous nephropathy.

*Masaki ASAI<sup>1)</sup>, Kounosuke KONISHI<sup>1)</sup>, Seiichi FUKUDA<sup>1)</sup>, Hideki UCHIMURA<sup>1)</sup>, Osamu TAKASE<sup>1)</sup>, Akihiro CHIKARAISHI<sup>1)</sup>, Matsuhiko HAYASHI<sup>1)</sup>, Takao SARUTA<sup>1)</sup> and Akinori HASHIGUCHI<sup>2)</sup>*

<sup>1)</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

<sup>2)</sup>Department of Pathology, School of Medicine, Keio University

Renal biopsy is an important diagnostic procedure in nephrology useful for therapeutic decision making as well as for estimating prognosis. Definite pathological diagnosis was reached in 752 cases (377 males and 375 females) of the patients who underwent renal biopsy at the Keio University Hospital during the past 35 years, between 1969 and 2003, by light and electron microscopy as well as by immunofluorescence study. There were 519 cases with primary glomerular diseases and 221 with various secondary renal diseases. Twenty-two of 33 (17 males and 16 females) membranous nephropathy (MN) patients, including 20 who presented with nephrotic syndrome, were treated with prednisolone as steroid therapy. After one year of follow up, urinary protein decreased to less than 1 gram per day in 54.5% of those treated with prednisolone, while the comparable figure without steroid therapy was 36.4%. The amount of urinary protein at the end of 2 years of follow-up correlated better with the urinary protein after 1 month of treatment than that of the pretreatment stage, suggesting that short term effect of steroid is an useful predictor of the long term prognosis in MN. Analysis of our clinical data revealed that age above 55, urinary protein greater than 5 grams/day, elevated serum creatinine concentration, and hypertension suggest unfavorable outcome. It is concluded that treatment with steroid aiming at early reduction in urinary protein is indicated, as a rule, in patients with MN.

**Key Words :** renal biopsy, membranous nephropathy, urinary protein, steroid, short term effect

## 緒 言

腎生検は内科的腎疾患の確定診断、治療方針決定ならびに予後推定に重要な検査であり、また分子生物学的に腎炎の発症機序を解明するための検体を集積する観点からも有用である<sup>1)</sup>。対象となる疾患は原発性腎疾患とともに、紫斑病、全身性エリテマトーデス、全身性アミロイドーシス、血管炎などの二次性腎症も含まれ、腎生検による組織診断から全身性疾患の確定診断に至ることもある。

生体腎組織の観察は1943年にCastlemanが手術時に採取した報告が最初であり<sup>2)</sup>、その後、経皮的腎生検は1951年にデンマークのBrunとIversenによって光学顕微鏡(光頭)による観察方法が確立された<sup>3)</sup>。1957年にはFarquharらによる電子顕微鏡的(電頭)な観察の意義に関する報告がされ、1961年のBrukholderによる免疫蛍光抗体法の報告へと続く<sup>4)</sup>。本邦では1954年の木下らの報告が初めてであるが<sup>5)</sup>、以降半世紀に渡って光頭、電頭および免疫蛍光抗体法の3法による診断の発達と普及に伴い、腎臓疾患の臨床病理学的分野に大きな進歩をもたらした。実際に膜性増殖性糸球体腎炎、膜性腎症、およびIgA腎症などは、腎生検によって疾患概念が確立された腎糸球体病変である。

一方、腎生検の手技に関しても、ヨード造影剤を使用するX線透視下での検体採取に代わって、超音波ガイド下の穿刺が主流となり、14GのVim-Silvermann針やTru-Cut針から、侵襲の少ない16GのBiopty-Cut針を装着した自動生検器(Biopty-GunやBard-MAGNUM)などを使用した方法へと変遷し、より確実かつ安全に腎生検を施行することが容易になった<sup>6,7)</sup>。

当院においても2003年までの約35年間に1247例の腎生検が行なわれている。その中で診断の確定している合計752症例の内訳は、一次性糸球体腎炎519例(69.0%)、二次性糸球体腎炎221例(29.4%)、尿細管間質性病変12例(1.6%)である。今回我々は、当院における腎生検施行症例と、その病理診断を集計し、特に成人ネフローゼ症候群の主要な原因疾患の一つである膜性腎症に関して詳細を追跡しえた33症例について臨床的、病理的検討を行った。

## 材料および方法

対象は慶應義塾大学病院腎臓内科で保管されている昭和44年(1969年)からの腎生検台帳記録例のうち、病理診断名や臨床経過を追跡出来る昭和49年(1974

年)から平成15年(2003年)までの752症例とした。生検の目的が糸球体腎炎の診断であるにもかかわらず、採取された検体が髄質のみで糸球体の形態診断が出来ない症例や、糸球体は採取されているが病理学診断が得られなかった症例はデータ整理の対象外とした。一方、病理診断目的が種々の理由から糸球体疾患ではなく、間質性腎炎や腎硬化症などの尿細管間質や血管性病変であった検体はデータ整理の対象に含めた。また、複数の腎生検が実施された症例では、最終の病理診断名を使用した。これらの腎生検データを整理するために、Microsoft社のデータベース管理ソフトウェアであるAccessを用いた腎生検管理システムを当院腎臓内科で独自に作製しデータ解析の一助とした。

観察対象検体は、光頭材料をhematoxylin-eosin染色、periodic acid-Schiff's(PAS)染色、periodic acid silver methenamine染色および必要に応じてCongo-Redなどを用いた特殊染色で観察し、電頭は5000~10000倍での観察を実施した。免疫蛍光抗体法は凍結標本を用いてIgG、IgA、IgM、C1q、C3、C4、fibrinogenなどの染色で行い、これら三種類の検査を総合して診断した病理組織診断名は、1995年のWHO基準に準じて分類した<sup>8)</sup>。IgA腎症は免疫蛍光抗体法でメサンギウム領域にIgAが優位に認められることで診断され<sup>9)</sup>、WHO分類では二次性糸球体疾患に分類されているが、本邦では最も頻度の高い糸球体疾患であり、また、病因も確定されていないことから、本検討では一次性糸球体疾患として集計した。Antineutrophil cytoplasmic antibody(ANCA)陰性であっても光頭で半月体形成性糸球体腎炎と診断しえるものは半月体(管外性)糸球体腎炎として集計した<sup>10)</sup>。

膜性腎症はわが国でも難治性ネフローゼ症候群の原因疾患として重要であり、詳細を追跡出来る33例について、各々の臨床経過、腎生検時の検査データ、治療効果や予後について別途検討を加えた。明らかに薬剤に起因する二次性の膜性腎症は除外したが、悪性腫瘍にともなう膜性腎症は、癌抗原と免疫蛍光抗体法や電子顕微鏡により認められる沈着物との関連性を証明するのが困難であり一次的膜性腎症として扱った<sup>11)</sup>。また生検時からの尿蛋白、血圧、血清クレアチニン値などの推移を追いながら、ステロイド投与の有無やステロイド治療の効果についての検討および諸家の報告との比較を行った。治療効果は、ステロイド治療開始から1ヶ月、1年、2年、5年後のいずれかにおいて1日の尿蛋白が1g以下に改善した症例(有効群)と、1日の尿蛋白が依然1gを越える症例(無効群)とに分けて比較検討を試みた。尿蛋



白の定量評価には24時間蓄尿のデータを用いたが、退院後から数年経過しており、新鮮尿検体を用いて算出した尿蛋白の概算値のみ表示がある場合については、(-)をゼロ、15 mg/dl 相当である(±15)の表示を0.1 g/日、(1+30)~(1+50)を0.5 g/日、(2+70)~(2+100)を1.0 g/日、(3+200)を2.0 g/日、(3+400)を4.0 g/日相当として換算した。膜性腎症の腎組織はEhrenreich & ChurgのStage分類で整理し、PAS染色における糸球体の硬化性変化の割合(%)と、皮質領域における間質線維化と尿細管萎縮を呈する病変領域の割合(%)について比較した。血尿に関しては光学顕微鏡の400倍での強拡大視野(HPF)の観察において、検鏡のHPFで赤血球が無しをゼロ、0~2/HPFを0.5、3~10/HPFを1.0、11~50/HPFを2.0、≥51/HPFを3.0として数値化して比較検討した。

集計結果は平均値±標準誤差(mean±S.E.)で表示した。パラメトリックな2群間の統計処理は対応なしのt検定を用い、3群間以上の各グループ間の検定にはone way ANOVAとFisherの最小有意差法(PLSD)テストを用いた。ノンパラメトリックな3群間の検定はKruskal-Wallis検定と、Post-hoc testとしておのおの2群ずつのデータに対するMann-Whitney U testを実施した。P値が0.05未満を統計学的に有意であるとした。

## 結 果

### (1) 当院における腎生検の概要

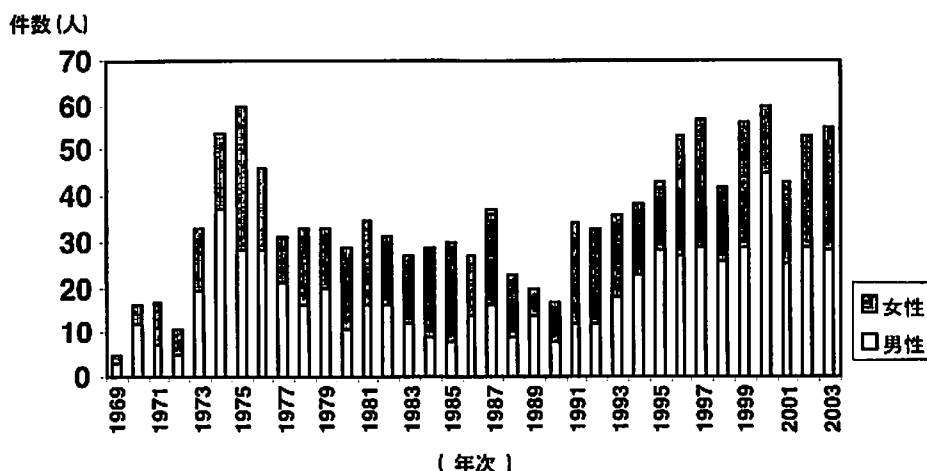
1969年(昭和44年)から2003年(平成15年)ま

での35年間に当院で施行された腎生検は合計1247例(男性660名、女性587名)であり、1988年から1990年の期間で件数の減少が認められるが、その後漸増し年間平均で約40~50件施行されていた。全期間を通して男女比率は、ほぼ同等であった(第1図)。

1247例の中で、カルテや検査記録が保存されており臨床経過や組織診断名を詳しく追跡出来たのは1974年(昭和49年)からの症例であり、2003年(平成15年)までの30年間に施行された1165名の中で確定診断のついた症例の合計は752例で、男性が377名(50.1%)、女性が375名(49.9%)、平均年齢はおのおの41.5歳と37.2歳であった。

752名の内訳は一次性糸球体疾患が519名であり、752例の全対象検体に対して69.0%を占め、ループス腎炎や糖尿病性腎症、ANCA関連血管炎や移植腎などを含む二次性の糸球体疾患が221名、および尿細管間質疾患が12名であった。1995年のWHO分類に準じて8項目に分類したものに加えて、尿細管間質性病変と、その他、の計10項目で整理したものを呈示した(第1表)。血管系疾患における糸球体病変の11名のうち1名が顕微鏡的多発動脈炎でありANCA陽性であった。移植腎糸球体病変は、拒絶反応の評価や原疾患の疑いで採取された13検体であり、そのうち3症例に膜性腎症の所見が認められている。尿細管間質性病変の12名のうち2名に急性尿細管壊死が認められた。

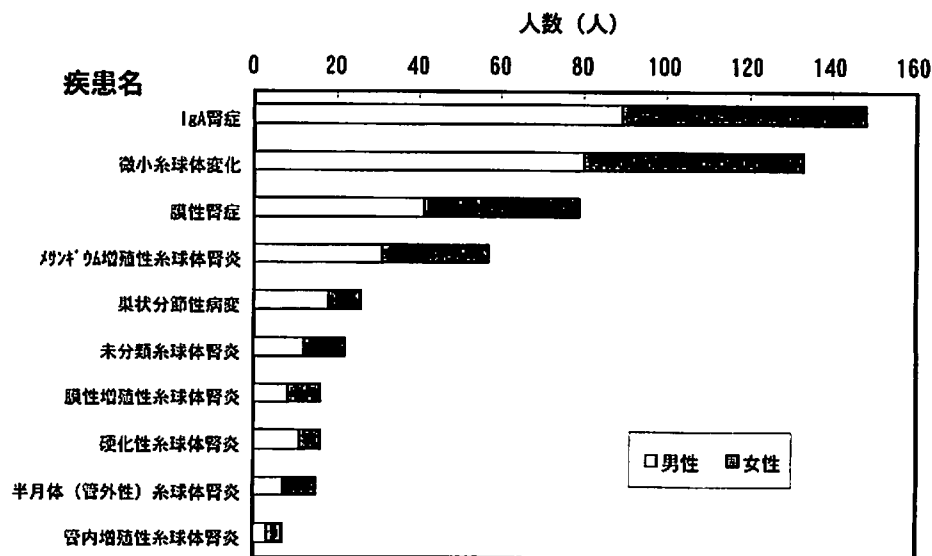
一次性糸球体疾患は全519例のうち、IgA腎症が148名(28.5%)と最も頻度が多く、微小糸球体変化が133名(25.6%)、膜性腎症79名(15.2%)、メサンギウム増殖性腎炎が57名(11.0%)、また巣状分節性病



第1図 当院での腎生検実施件数の年次推移

第1表 WHO分類 (1995年) に準じた腎疾患区分

腎疾患区分	男性 (377人)		女性 (375人)		男女合計	
	人数 (人)	平均年齢 (歳)	人数 (人)	平均年齢 (歳)	人数 (人)	平均年齢 (歳)
1. 原発性糸球体疾患 (糸球体腎炎と関連病態)	300	40.1	219	37.2	519	38.9
2. 系統的疾患における糸球体腎炎	34	41.6	122	33.7	156	35.3
3. 血管性疾患における糸球体病変	5	55.6	6	35.7	11	46.4
4. 代謝性疾患における糸球体病変	18	49.3	10	61.4	28	54.0
5. 遺伝性腎病変 (Alport's Syndrome)	0	-	1	35.0	1	35.0
6. その他の糸球体疾患 (薬剤性腎障害等)	1	57.0	0	-	1	57.0
7. 終末期腎	0	-	1	40.0	1	40.0
8. 移植腎糸球体病変	7	47.9	6	35.2	13	42.1
9. 尿管管間質性病変	5	47.0	7	42.4	12	44.8
10. その他の血管系疾患 (ANCA 関連血管炎等)	7	62.3	3	55.3	10	60.2
合計	377	41.5	375	37.1	752	39.3



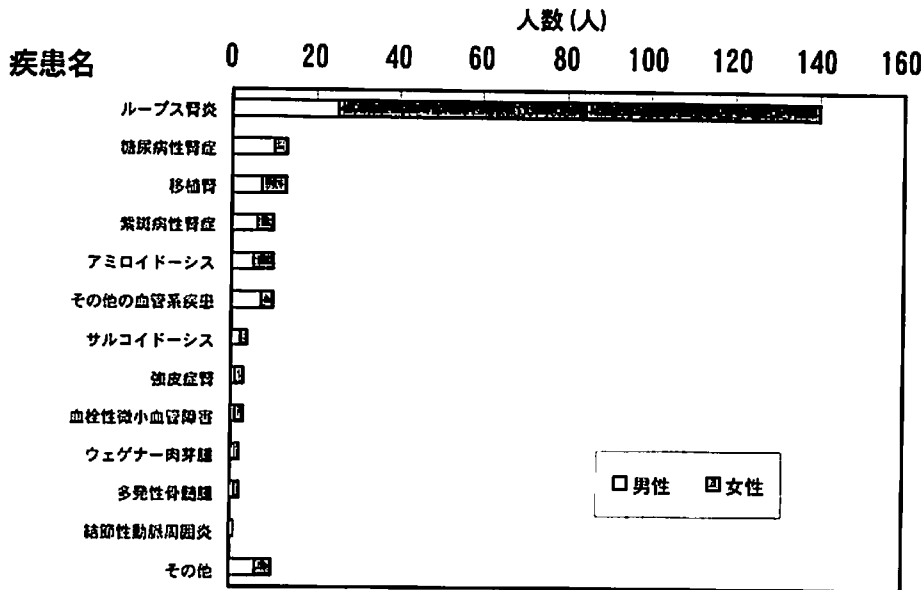
第2図 一次性的糸球体腎炎 (519例)

変 26名 (5.0%, 全例果状糸球体硬化症), 膜性増殖性糸球体腎炎 16名 (3.1%), 管内増殖性糸球体腎炎 7名 (1.3%) であった (第2図). 半月体 (管外性) 糸球体腎炎は 15名 (2.9%) であり, そのうち 6名が ANCA陽性, 2名は陰性で 7名が不明であった.

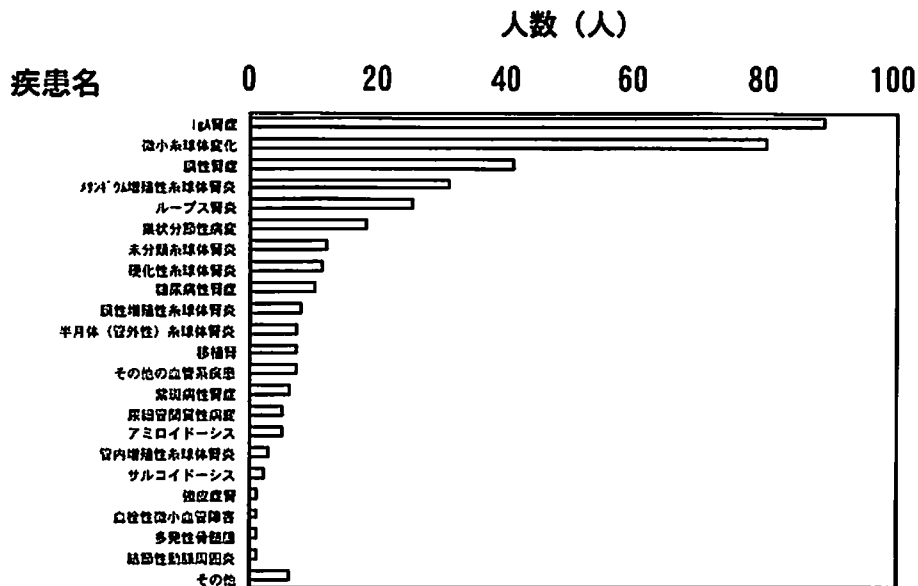
二次性糸球体疾患の 221例のうち, 系統的疾患における糸球体腎炎や代謝性疾患における糸球体病変は 184名認められ, その中でループス腎炎が 140名 (76.1%) と最も多く女性が 82.1% を占めており, 糖尿病性腎症が 13名, 紫斑病性腎症とアミロイドーシスが 10名ず

つであった (第3図).

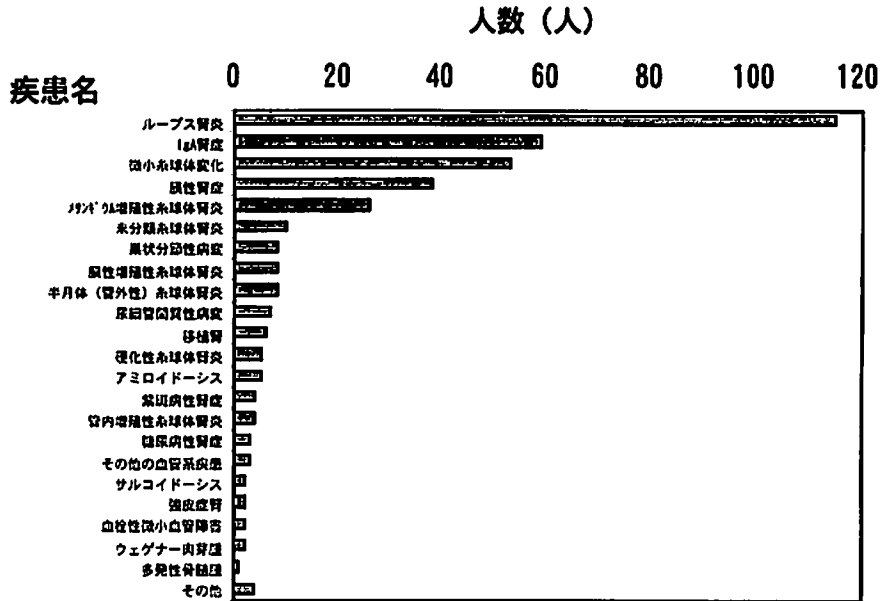
疾患の頻度を男女別に見てみると, 男性では IgA 腎症が 89名 (23.6%) と最も多く, 微小糸球体変化 (21.2%), 膜性腎症 (10.9%) と続いていた (第4図). 女性はループス腎炎が 115名 (30.7%) と最も多く, IgA 腎症 (15.7%) と微小糸球体変化 (14.1%) が続いていた (第5図). また, 年代別の男女比率は, 30歳代と 40歳代はほぼ同等の比率であったが, 20歳代は 203例中で女性の方が 58.6% (119名) を占め, 50歳代と 60歳代は男性がおのおの 63.2% (67名), 67.2% (43



第3図 二次性糸球体腎炎 (221例)



第4図 男性の疾患別頻度 (377例)



第5図 女性の疾患別頻度 (375例)

第2表 年代別および男女別の高頻度疾患

年代	男 女 合計人数	男 性 (症例数)			女 性 (症例数)				
		男性計	1	2	3	女性計	1	2	3
10歳代	49	21	IgA(9)	MC(6)	FGS(2)	28	MC(11)	LN(8)	IgA(3)
20歳代	203	84	MC(28)	IgA(27)	LN(8)	119	LN(34)	IgA(33)	MC(20)
30歳代	169	84	IgA(36)	MC(18)	LN(7)	85	LN(42)	IgA(10)	MC(8)
40歳代	131	63	IgA(10)	MC(10)	Mes(9)	68	LN(22)	MN(10)	IgA(9)
50歳代	106	67	MN(11)	Mes(9)	MC(8)	39	MN(9)	LN(9)	IgA(4)
60歳代	64	43	MN(13)	MC(9)	FGS(3)	21	MN(7)	SCC(2)	Amy(2)
70歳代	29	14	Cres(4)	MN(3)	MC(2)	15	MC(4)	Cres(3)	MN(2)
80歳代	1	1	H-S(1)	-	-	0	-	-	-

<略語> IgA : IgA nephropathy (Berger Disease), MC : minimal change, FGS : focal/segmental lesions, LN : lupus nephritis, Mes : mesangial proliferative glomerulonephritis (GN), MN : membranous nephropathy, SCC : systemic sclerosis, Amy : amyloidosis, Cres : Crescentic (extracapillary) GN, H-S : nephritis of Henoch-Schönlein purpura (anaphylactoid purpura)

名)であり女性より症例が多かった。10~40歳代の男性はIgA腎症と微小糸球体変化が多く、女性はループス腎炎が高頻度でIgA腎症と微小糸球体変化が続いていた。50~60歳代は男女ともに膜性腎症が多く認められ、70歳代では半月体(管外性)糸球体腎炎が全年齢層(15症例)の半数にあたる7症例に認められた(第

2表)。

(2) 膜性腎症生検例の解析

① 症例の内訳と治療(第3表, 第6図)

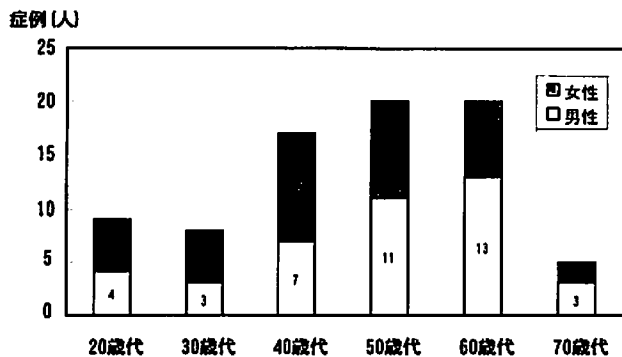
当院で腎生検が施行された膜性腎症の症例は、昭和44年(1969年)からの累計で79例(男性41例, 女

第3表 膜性腎症患者の予後と検査データ

	ステロイド なし：11例		ステロイドあり：22例			
			有効：13例		無効：9例	
平均年齢 (歳)	51.1±4.0		51.9±4.3		55.1±3.0	
性別 (男性：女性)	4：7		6：7		7：2	
平均追跡年数 (年)	8.2±1.6		4.2±0.6		4.8±0.9	
ステロイド初期投与量 (mg)	-		36.7±1.9		33.6±4.5	
ステロイド投与期間 (月)	-		14.8±3.2		9.8±3.1	
ネフローゼ (あり：なし)	4：7		11：2		5：4	
1日尿蛋白量 (g/日)		(n)		(n)		(n)
：生検時	2.78±0.61	11	5.44±0.82	13	5.90±1.57 <sup>a)</sup>	9
：1ヶ月後	3.11±0.67	11	2.10±0.43*	13	4.63±0.88	9
：1年後	2.27±0.89	11	0.56±0.16*	13	4.57±1.52	9
：2年後	1.53±0.54	9	0.53±0.17*	10	5.76±1.23 <sup>a)</sup>	6
：5年後	0.95±0.49	8	0.50±0.18	6	1.52±0.28	4
血清アルブミン (g/dl)						
：生検時	2.91±0.25	11	2.20±0.25	13	2.51±0.37	9
：2年後	3.86±0.14	9	3.91±0.11*	10	3.17±0.38 <sup>a)</sup>	6
：5年後	3.55±0.56	4	4.08±0.40	5	4.15±0.25	4
血清クレアチニン (mg/dl)						
：生検時	0.86±0.12	11	0.90±0.08*	13	1.19±0.27 <sup>a)</sup>	9
：2年後	0.88±0.10	9	0.84±0.08*	11	1.85±0.35 <sup>a)</sup>	6
：5年後	0.86±0.14	8	0.82±0.09	6	1.68±0.40	4
収縮期血圧 (mmHg)						
：生検時	124.4±4.6	11	125.4±4.1*	13	140.6±4.5 <sup>a)</sup>	9
：2年後	127.6±2.1	9	130.2±3.9*	9	144.3±3.2 <sup>a)</sup>	6
：5年後	135.7±4.4	6	124.0±9.3	4	135.0±5.3	4
他剤併用例	抗血小板薬：2, ACEi： 1, ARB：1		抗血小板薬：2, ACEi： 1, ARB：2		抗血小板薬：3, ACEi： 2, 抗血小板薬+ACEi： 1, ARB：2	

\*：p<0.05 vs ステロイド無効 a)：p<0.05 vs ステロイドなし

ACEi：angiotensin converting enzyme inhibitor, ARB：angiotensin II receptor blocker



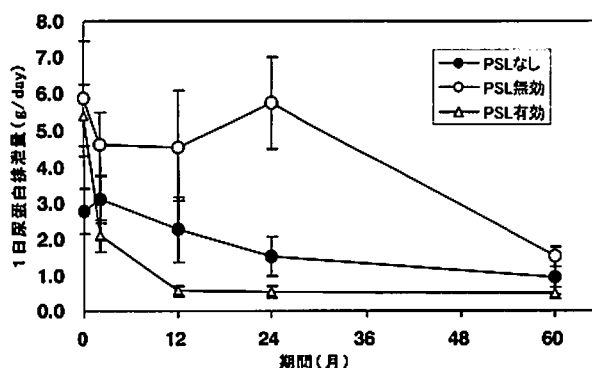
第6図 当院での膜性腎症患者の年齢分布

性38例)であった。そのうち現在カルテが保管されており詳細を追跡できた症例は33例(男性17名、女性16名)であり、生検時の平均年齢は男性が50.1歳、女性が55.1歳であった。33例中、生検後に悪性疾患や慢性関節リウマチなどを併発した症例が9例みられた。33例中、22例では生検後にステロイド治療が行われ(ステロイド投与群)、残り11例はステロイド治療なしに経過観察された(ステロイド非治療群)。ステロイド投与群のうち、治療開始後の1日の尿蛋白が1g以下に減少した症例(有効群)は13例あり、尿蛋白が上記以下に減少しなかった症例(無効群)は9例であった。生検後の追跡年数はステロイド非投与群、ステロイド有効群、ステロイド無効群で、それぞれ8.2±1.6年、4.2±0.6年、4.8±0.9年であった。ステロイド初期投与量は、

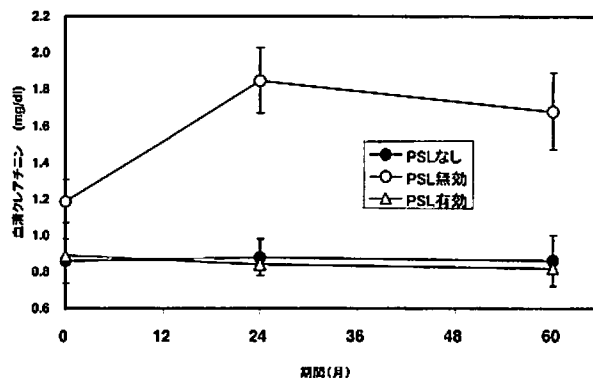
prednisolone 換算で、有効群において  $36.7 \pm 1.9$  mg/日、無効群において  $33.6 \pm 4.5$  mg/日であり、両群間の有意差はなかった。一方、ステロイド投与継続期間は、有効群で  $14.8 \pm 3.2$  ヶ月、無効群で  $9.8 \pm 3.1$  ヶ月であり、有効群の投与期間が無効群に比較して長かった。ネフローゼ症候群を呈した症例は 33 例中の 60.6% にあたる 20 例 (男性 11 名、女性 9 名) であり、そのうち 16 名でステロイド治療が行われた。4 症例においてネフローゼ症候群を呈していたのにも関わらずステロイド治療が行われなかった理由は、本人の意向や糖尿病の合併などであった。

② 尿蛋白 (第3表, 第7図)

腎生検時の1日の尿蛋白は、ステロイド非投与群で  $2.78 \pm 0.61$  g であり、有効群 ( $5.44 \pm 0.82$  g) と比較して少ない傾向が認められ ( $P = 0.057$ )、無効群 ( $5.90 \pm 1.57$  g) と比較して有意に少なかった ( $P = 0.043$ )。生検時、1ヵ月後、1年後、2年後、5年後の1日の尿蛋白の推移をみると、ステロイド非投与群では生検時 ( $2.78 \pm 0.61$  g) と比較して、1ヵ月後 ( $3.11 \pm 0.67$  g)、1年後 ( $2.27 \pm 0.89$  g)、2年後 ( $1.53 \pm 0.54$  g)、5年後 ( $0.95 \pm 0.49$  g) と、尿蛋白の漸減傾向が認められた。一方、有効群は生検時 ( $5.44 \pm 0.82$  g) と比較して、1ヵ月後 ( $2.10 \pm 0.43$  g)、1年後 ( $0.56 \pm 0.16$  g)、2年後 ( $0.53 \pm 0.17$  g)、5年後 ( $0.50 \pm 0.18$  g) と、尿蛋白の減少が認められた。無効群は生検時 ( $5.90 \pm 1.57$  g) と比較して、1ヵ月後 ( $4.63 \pm 0.88$  g)、1年後 ( $4.57 \pm 1.52$  g)、2年後 ( $5.76 \pm 1.23$  g) も尿蛋白の改善が認められず、5年を経過しても  $1.52 \pm 0.28$  g と、依然 1g を超える1日の尿蛋白が認められた。尿蛋白は、投与開始後1ヵ月、1年、2年のいずれにおいても有効群が無効群と比較して有意に減少していた。



第7図 膜性腎症患者の尿蛋白の推移



第8図 膜性腎症患者の血清クレアチニンの推移

③ 血清クレアチニン (第3表, 第8図)

腎生検施行時の血清クレアチニンは、ステロイド非投与群 ( $0.86 \pm 0.12$  mg/dl)、有効群 ( $0.90 \pm 0.08$  mg/dl)、無効群 ( $1.19 \pm 0.27$  mg/dl) の3群間で明らかな差は認められなかった。しかし、2年後は無効群 ( $1.85 \pm 0.35$  mg/dl) がステロイド非投与群 ( $0.88 \pm 0.10$  mg/dl) や有効群 ( $0.84 \pm 0.08$  mg/dl) よりも有意に上昇しており、5年後も無効群 ( $1.68 \pm 0.40$  mg/dl) がステロイド非投与群 ( $0.86 \pm 0.14$  mg/dl) や有効群 ( $0.82 \pm 0.09$  mg/dl) よりも有意に高値であった。また無効群内での血清クレアチニンは、生検時 ( $1.19 \pm 0.27$  mg/dl) と比較して2年後 ( $1.85 \pm 0.35$  mg/dl) と5年後 ( $1.68 \pm 0.40$  mg/dl) に増悪傾向がみられたが、これは有意な上昇ではなかった。

④ 血清アルブミン (第3表)

腎生検時の血清アルブミンは、ステロイド非投与群 ( $2.91 \pm 0.25$  g/dl) が有効群 ( $2.20 \pm 0.25$  g/dl) や無効群 ( $2.51 \pm 0.37$  g/dl) よりも高い傾向にあり、有効群と無効群との間に有意な差異はなかった。しかし治療2年後の有効群 ( $3.91 \pm 0.11$  g/dl) は無効群 ( $3.17 \pm 0.38$  g/dl) と比較して有意 ( $P = 0.012$ ) に血清アルブミン濃度が高く、有効例の血清アルブミンは2年後 ( $3.91 \pm 0.11$  g/dl) と5年後 ( $4.08 \pm 0.40$  g/dl) いずれも、治療に伴う有意な改善効果が認められた。

⑤ 血圧 (第3表)

腎生検施行時ならびに2年後の収縮期血圧は、ステロイド無効群 ( $140.6 \pm 4.5$  mmHg) がステロイド有効群 ( $125.4 \pm 4.1$  mmHg) や非投与群 ( $124.4 \pm 4.6$  mmHg) より有意に高かった。また3群共に、いずれも腎生検から5年後に至るまで有意な血圧の変動は認められなかった。



第4表 膜性腎症患者の組織所見と尿蛋白の選択性指数

検査項目	ステロイド なし：11例	ステロイド あり：22例	
		有効：13例	無効：9例
膜性腎症の組織 Stage 分類	1.8±0.2	1.7±0.2	1.9±0.3
膜性腎症の糸球体硬化度 (%)	6.6±2.4	4.5±2.5	9.6±4.8
膜性腎症の間質尿管変化 (%)	6.1±1.8	4.6±1.9	8.3±3.4
尿蛋白の選択性指数 (Selectivity Index)	0.242±0.081	0.232±0.076	0.256±0.185

⑥ 腎生検組織所見 (第4表)

Ehrenreich & Churg の膜性腎症病期分類は、Stage I が全体の 36.3%，II と III がおのおの 36.3% と 27.4% であり、ステロイド非投与群と有効群および無効群の 3 群間で有意な差は認めなかった。また、糸球体の硬化性変化の割合、ならびに皮質領域における間質線維化と尿管萎縮を呈する病変領域の割合に関しても、3 群間で有意な差は認められなかった。

⑦ 蛋白尿の選択性指数 (Selectivity Index)

ステロイド非投与群 (0.242±0.081)、有効例 (0.232±0.076) と無効例 (0.256±0.185) の 3 群間での有意な差は認められなかった (第4表)。

⑧ 血尿

腎生検施行時の血尿スコアは、ステロイド非投与群 (0.73±0.22) が有効群 (1.19±0.31) と無効群 (1.22±0.35) に比べて軽度な傾向が認められた。治療開始の 1 ヶ月後には有効群 (0.81±0.21) が無効群 (1.50±0.46) よりも改善傾向を認め、5 年後にはステロイド非投与群の 7 症例と有効群 5 症例の全ての血尿が消失したが、無効群 (0.88±0.43) には依然血尿の残存が認められた。

考 察

近年、慢性腎不全から維持透析の導入に至る患者は全国で年間約 3 万人にもおよび、その約 3 割を慢性糸球体腎炎が占めている<sup>12)</sup>。これらの疾患の進展予防のためにも、腎生検による的確な病理組織診断を実施し、適切な治療方針の決定や疾患の予後判定を行うことが重要である。また、長期にわたって腎生検施行数は年間 40 例程度が続いており、他の診断技術の進歩にもかかわらず、腎生検の必要性は決して少なくなる傾向はないと考えられる。

当院で施行された 752 例中、IgA 腎症は全体の 19.7% にあたる 148 例を占め、本邦の他施設 (平均 32.6%)

や<sup>11, 13~17)</sup>、海外の報告 (平均 18.3%)<sup>18~23)</sup> でも高頻度に認められる疾患であり、当院で採取された組織型や当院での治療法および予後などに関しても今後の更なる分析が重要であると考えられた。また、今回詳細な分析を実施した 33 名を含む膜性腎症患者の合計は 79 名で、40~60 代の中老年に多く全対象検体の 10.5% を占めており、頻度としては本邦 (平均 12.6%) および海外の集計結果 (平均 10.4%) とほぼ同等であった<sup>11, 13~23)</sup> (第5表)。巣状分節性病変は合計 25 例で 1990 年代は 13 例だったが、2000 年以降の 4 年間ですでに 11 例認められており、他の文献でも指摘されているように近年増加傾向にあると考えられた<sup>22)</sup>。糖尿病性腎症は頻度的にも腎不全の重要な原因疾患であるにもかかわらず、当院でも 752 例中 13 例と少ないが、これは糖尿病患者に尿蛋白が出現した場合、腎生検を行わずに糖尿病性腎症と診断されている症例が多いことを示唆しており、糖尿病患者に対する腎生検の適応については今後の検討が必要であると考えられた。ループス腎炎は 20~30 歳代がピークであり疫学的にも同等の傾向であったが、当院では全身性エリテマトーデスの症例数が他施設よりも多いことが考えられ、全検体数に占めるループス腎炎の割合は 18.6% と高かった。また、まれな疾患で当院の検体には無かったが、クリオグロブリン腎症や非薄基底膜病には電子顕微鏡による診断が重要であり、当院のアミロイドーシスの症例においては電子顕微鏡によるアミロイド細線維の同定に有用であったと考えられた。

当院での膜性腎症患者 33 症例のうち、治療開始 1 年後に 1 日の尿蛋白が消失を含めて 1g 以下となった寛解症例は、ステロイド投与群が 54.5% であるのに対して非投与群が 36.4% であり、ステロイド治療が短期間での寛解導入に優れていると考えられた。2 年後にはいずれも 50% 台となり、5 年後にはステロイド非投与群が 72.7% とステロイド投与群の 59.1% を上回っていた。しかしステロイド非投与群は治療開始時点で既にステロイド投与群よりも 1 日の尿蛋白が有意に少なく、また血

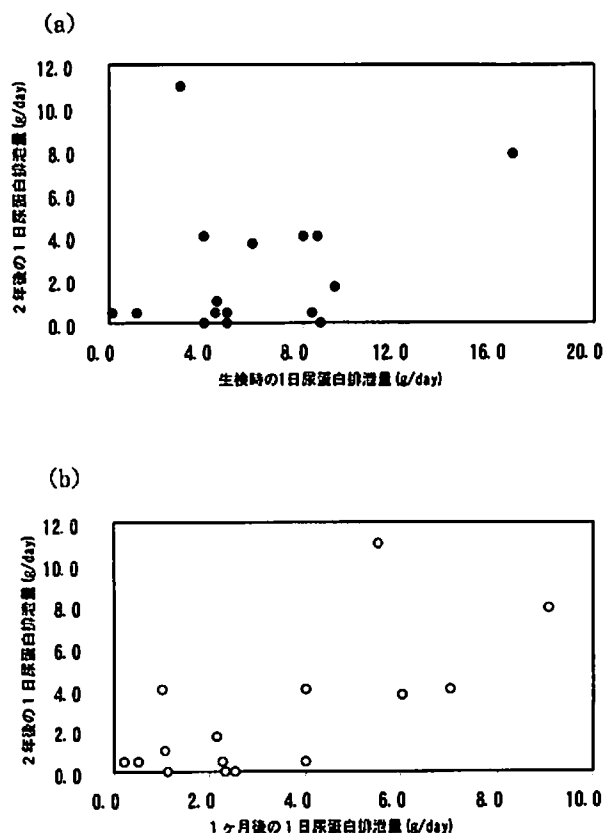
第5表 IgA 腎症と膜性腎症の全検体数に占める割合 (本邦他院および海外)

施設 (報告年度)	IgA 腎症 (%)	膜性腎症 (%)	腎生検の検体総数 (例)
慶應義塾大学病院 (2005)	19.7	10.5	752
国立佐倉病院 (2004)	34.4	8.1	1,158
順天堂大学医学部 (2003)	42.0	12.0	1,150
横浜市立大学医学部 (2000)	29.1	21.4	117
東京女子医科大学 (1999)	37.0	11.0	452
尾道県立病院 (1999)	25.2	13.9	115
和歌山県立医科大学 (1994)	28.0	9.1	580
本邦の平均 (当院は除く)	32.6	12.6	-
中華人民共和国 (2004)	30.5	6.8	13,519
フランス (2004)	15.3	9.8	1,742
スペイン (2004)	14.2	9.4	8,722
イタリア (2004)	22.7	17.7	14,607
ブラジル (2004)	14.8	11.6	943
アメリカ合衆国 (2004)	12.1	7.3	299
海外の平均	18.3	10.4	-
全体の平均 (当院は除く)	25.4	11.5	-

清クレアチニンは治療期間を通じて増悪を認めず、収縮期血圧もステロイド非投与群の方が低値であり、自然寛解した症例が存在した可能性も考えられた。5年の長期予後で見ると、ステロイドを投与せずに他の抗血小板薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬を内服しながら経過観察の方が寛解率が高かったともいえるが<sup>24)</sup>、生検時の尿蛋白が有意に多い症例に対して、ステロイド投与無しで経過観察するのは困難であり、短期間での寛解導入を試みる観点からもステロイド治療を開始することが望ましいと考えられた。

ステロイド投与群内で1日の尿蛋白を、2年後まで追跡したネフローゼ症候群の13例と非ネフローゼ症候群の3例の合計16例を対象にして、生検時と治療2年後、治療1ヶ月後と治療2年後の尿蛋白の相関を比較したところ、相関係数 (r) はそれぞれ0.31と0.71であった (第9図のaとb)。この結果から、治療前よりも治療1ヶ月後の尿蛋白の方が2年後の予後と有意に相関が高く、1ヶ月後の治療効果で2年後の治療効果の予測がつくと考えられた。すなわち、治療1ヶ月後の近接効果を把握することによって治療法の是非の判定材料となり、近接効果が良好でない場合には長期予後の不良が予測されるので、ステロイド治療に加えて免疫抑制剤を使用した治療の検討が重要であると推測された。

膜性腎症患者の血清クレアチニンは、ステロイド非投与群と有効群では5年経過後も平均で1.0 mg/dl 以内



第9図 1日の尿蛋白の排泄量と治療期間の相関関係  
 (a) 生検時と治療開始2年後の1日の尿蛋白の排泄量  
 (b) 治療開始1ヶ月後と治療開始2年後の1日の尿蛋白の排泄量

## 雜 報

### 慶應医学会例会第 1417 回

日 時 平成 17 年 5 月 10 日 (火) 午後 5 時  
場 所 新棟 11 階 大会議室  
演 題 Aberrant P16 Methylation, Gastric Carcinogenesis, and Biomarker  
演 者 Dejun Deng, MD  
Beijing Institute for Cancer Research, Peking University School of Oncology, Beijing, China  
担 当 小児科学教室

### 慶應医学会例会第 1418 回

日 時 平成 17 年 5 月 11 日 (水) 午後 6 時  
場 所 新棟 11 階 中会議室  
演 題 Progress towards a TB subunit vaccine : putting the pieces together  
演 者 Peter L. Andersen, DMSc  
Director, Department of Infectious Disease Immunology Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark  
担 当 内科学教室

### 慶應医学会例会第 1419 回

日 時 平成 17 年 5 月 24 日 (火) 午後 6 時  
場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
演 題 Lymphoseek : A Review of this New Radio-tracer for Sentinel Node Imaging and Ideas for Future Investigation  
演 者 Anne Marie Duquette Wallace MD, FACS  
Department of General Surgery and Division of Plastic Surgery, University of California, San Diego Medical Center, San Diego, CA, USA  
担 当 外科学教室 COE プログラム共催

### 慶應医学会例会第 1420 回

日 時 平成 17 年 6 月 10 日 (金) 午後 4 時 30 分  
場 所 中央棟 5 階カンファレンスルーム  
演 題 Prevention of cardiovascular disease in high risk diabetic patients : Impact of multifactorial intervention  
演 者 Hans-Henrik Parving, MD  
Professor, Chief Physician, Steno Diabetes Center, Copenhagen, Denmark  
担 当 内科学教室

### 慶應医学会例会第 1421 回

日 時 平成 17 年 6 月 10 日 (金) 午後 5 時  
場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
演 題 Water channel proteins : from their discovery in Cluj-Napoca, Romania in 1985, to the 2003 Nobel Prize in chemistry and their implications in molecular medicine  
演 者 Gheorghe Benga, MD, PhD  
Department of Cell and Molecular Biology, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj County University Hospital, Cluj-Napoca, Romania  
担 当 分子生物学教室

### 慶應医学会例会第 1422 回

日 時 平成 17 年 6 月 16 日 (木) 午後 6 時  
場 所 包括先進医療センター 3 階会議室  
演 題 Stem cell regulation : niche and signaling  
演 者 Linheng Li, PhD  
Associate investigator, Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, MO, USA  
担 当 内科学教室

### 慶應医学会例会第 1423 回

日 時 平成 17 年 6 月 21 日 (火) 午後 6 時 30 分  
場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
演 題 Zebrafish Models of Human Digestive Disease  
演 者 Michael Pack, MD  
Assistant Professor, Division of Gastroenterology, Department of Medicine, University of Pennsylvania Health System, Pennsylvania, USA  
担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1424 回

日 時 平成 17 年 6 月 27 日 (月) 午後 6 時  
・ 28 日 (火) 午後 6 時  
場 所 新棟 11 階 中会議室  
演 題 Bioethics : Organ Transplantation (27 日)  
Bioethics : Stem Cell Research (28 日)  
演 者 Jeffery Kahn, PhD  
Professor of Medicine and Director Center for  
Bioethics, University of Minnesota, Minnesota,  
USA  
Anna C. Mastroianni, JD, MPH  
Assistant Professor, University of Washington,  
Schools of Law and Medicine, Washington,  
USA  
担 当 医学教育統轄センター

慶應医学会例会第 1425 回

日 時 平成 17 年 7 月 8 日 (金) 午後 5 時  
場 所 総合医科学研究棟 会議室 6  
演 題 Issues in early intervention and recovery from  
first-episode psychosis  
演 者 Eric YH Chen, MD, MRC Psych  
Department of Psychiatry, Faculty of Medicine,  
University of Hong Kong, Hong Kong, China  
担 当 精神神経科学教室

慶應医学会例会第 1426 回

日 時 平成 17 年 7 月 8 日 (金) 午後 6 時  
場 所 新棟 11 階 中会議室  
演 題 ①Gastric inflammation and oxidative stress  
in the pathogenesis of *H. pylori*-associated dis-  
eases  
②Complement-mediated phagocytosis of *Helico-  
bacter pylori*-infected gastric epithelial cells : A  
novel mechanism for sensing luminal bacterial  
infection  
演 者 ①Sheila Eileen Crowe, MD, FRCPC  
Associate Professor,  
②Peter Bryan Ernst, DVM, PhD  
Professor, Department of Internal Medicine,  
Digestive Health Center of Excellence, Univer-  
sity of Virginia, Charlottesville, VA, USA  
担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1427 回

日 時 平成 17 年 7 月 13 日 (水) 午後 5 時  
場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
演 題 ①Molecular Manipulation of the Antitumor  
Immune Response  
②Immunotherapy of cancer : Lessons learned  
from melanoma  
演 者 ①Drew M. Pardoll, MD, PhD  
Division of Immunology and Hematopoiesis,  
Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center,  
The John Hopkins University School of Medi-  
cine, Baltimore, Maryland, USA  
②Suzanne L. Topalian, MD  
Senior Investigator, Surgery Branch, NCI, NIH  
CRC, Bethesda, Maryland, USA  
担 当 先端医科学研究所教室

慶應医学会例会第 1428 回

日 時 平成 17 年 7 月 19 日 (火) 午後 6 時 30 分  
場 所 臨床講堂  
演 題 Stem Cell Transplantation for Crohn's Disease  
演 者 Richard K. Burt, MD  
Chief, Division of Immunotherapy for Auto-  
immune Diseases, Northwestern University  
Feinberg School of Medicine, Chicago, IL,  
USA  
担 当 内科学教室

## 第14回クリニカル・ビデオフォーラム（CVF）のご案内と演題募集

第14回クリニカル・ビデオフォーラムを下記の通り開催いたします。多数ご参加下さるようお願い申し上げます。

—記—

会 期：2006年2月4日（土）午前9時より午後5時頃まで  
会 場：東京国際フォーラム レセプションホール（A・B）  
東京都千代田区丸の内3-5-1（最寄駅：JR線 有楽町駅、東京駅）  
TEL 03-5221-9000（代表）

主 題：動画による最新画像診断と低侵襲的治療戦略

要 望 演 題：（応募）

1. Integrated PET/CT
2. Navigation Surgery
3. Interventional Radiology

一 般 演 題：（応募）

要望演題以外で本フォーラムに適していると思われるもの。  
テーマは自由です。

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

演題締め切り：2005年9月9日（金）

当番世話人：小須田 茂（防衛医科大学校教授 放射線医学講座）

代表世話人：北島 政樹（慶應義塾大学医学部教授 外科）

常任世話人：今井 裕（東海大学医学部教授 画像診断学）

西元寺克禮（北里大学医学部教授 内科）

幕内 博康（東海大学医学部教授 外科）

宮野 武（順天堂大学医学部教授 小児外科）

（五十音順）

お問い合わせ：防衛医科大学校 放射線医学講座 第14回CVF事務局

〒359-8513

埼玉県所沢市並木3-2

TEL：04-2995-1689

FAX：04-2996-5214

E-mail：cvf2006@ndmc.ac.jp

事務局担当：加地辰美・阿部克己・岩崎善衛・小島忠晴・小林佳子

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

## 慶應医学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け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



## 『慶應医学』投稿規定

本誌は原著論文、学位申請論文、綜説、講座、シンポジウム、症例報告あるいは座談会の記録、学会または研究会の抄録、話題、雑報などを掲載します。原著論文は、その内容が過去に他誌に掲載されたり（ただし、抄録のみの掲載は該当しない）、あるいは現在投稿中もしくは掲載予定でないものに限りません。新知見の所在が明確で、論旨が一貫して明解な論文をお寄せ下さい。記述は簡潔にし、類似する図表は省略して下さい。学位申請論文に関しては「学位申請論文」投稿の手引きを参照して下さい。

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

### 論文の受付

原著、学位申請論文投稿は慶應医学会会員に限りません。掲載の採否は編集委員会にて決定し、採用となった場合は速やかに掲載証明書を発行し掲載巻号を通知いたします。

原稿はオリジナルとコピーを一部ずつ下記あてに届けて下さい。

〒160-0016

東京都新宿区信濃町 35 信濃町煉瓦館 3 階  
財団法人国際医学情報センター学会事務室  
慶應医学会「慶應医学」編集室

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9：00～午後 5：00

(土曜日は受付をしません)

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

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

### 論文原稿の作成上の注意

1. 原稿 文章は現代かなづかいにしたがって平仮名混じりとす。A 4 判の白紙に横書き (35 字/行×23 行の約 800 字詰) で、上下を約 2.5 cm ずつ、左右を約 3 cm ずつあける。外国語の原語綴りは行末で切れないよ

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

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

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

4. 英文抄録 (ABSTRACT) 英語での表示とする。

1) 読者が一読して論文の主旨が明確にわかるもの。

2) 150 語ないし 200 語以内にまとめる。

3) ダブルスペースで A4 判の用紙にタイプする。

4) 題名にすでに表記されているものを最初の文章で繰り返さないこと。

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

6) 数字が文頭にある場合はスペルアウトし、文中ではアラビア数字を用いる。

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

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

略語は各分野を通じて周知のもの以外は使わない。

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

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

9. 見出しの振り方 (参照例)

研究成績

1. 臨床的事項

1) 頻度

a) ……………

(1)……………

(i)……………

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

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

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

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

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

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

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

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

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

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

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付ける（英文投稿規定を希望する者は事務局に申し出ること）。「学位申請論文」についての留意点を以下に説明する。

### 1. 学位取得の十分条件ではない。

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

### 2. 二重投稿が回避できる。

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

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

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

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

### 3. プライオリティーを主張することはできない。

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

## 論文作成上の注意

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

ある。

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT）は不要である。

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

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

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

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

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

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

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

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

なお、ご不明の点については事務局に問い合わせして下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

## 編集後記

暑い日本列島に台風が通過し、巷は総選挙の話題で hot ですが、この「慶應医学」第82巻3号が皆様の手が届く頃には少し cool down しているのでしょうか。

本号には解説1編、講座2編、原著論文1編が掲載され、充実した内容となりました。特に安田健次郎先生の「解剖在真図」は奥深く、楽しく拝読させて頂きました。十年一昔といいますが、医学、医療の分野では10年もたつと病態解明、診断から治療に至まで大きく変わってしまうことも多いようです。研究領域が細分化され、専門外の領域を catch up することが困難となってきた今日、高い医学的レベルを保ちつつ専門外の人々にも解りやすい内容を提供することが「慶應医学」の一つの役割と考えております。引き続き皆様から平易かつ質の高い論文の投稿をお待ちしております。（村田 満）

## 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9月18日 印刷

平成17年9月25日 発行

編集者 北 島 政 樹

発行者

印刷所 学術図書出版株式会社

電話 (3948) 7516 番

印刷者 富 田 進

発行所 慶 應 医 学 会

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

慶應義塾大学医学部企画室

電話(3353)1211(大代)内線62766

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

### 複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写したい方は、財団法人複写センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の方でない限り、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



広範囲経口抗菌製剤

指定医薬品、処方せん医薬品※

**クラビット®錠・細粒**

Cravit® (レボフロキサシン製剤)

薬価基準収載

※注意一医師等の処方せんにより使用すること

★効能・効果、用法・用量、禁忌および使用上の注意等につきましては、  
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/>



The Carbapenem Antibiotic



カルバペネム系抗生物質製剤

薬価基準収載

指定医薬品・登録医薬品 (注意—医師の処方せん—他により使用すること)

**メロペン**<sup>®</sup>

0.25g・0.5g  
点滴用0.5g(キット)

Meropen 注射用メロペネム 略号:MEPM

**住友製薬**

製造発元(資料請求先)

住友製薬株式会社

〒541-8510 大阪市中央区道修町2丁目2番8号

〈製品に関するお問い合わせ先〉  
くすり情報センター

☎0120-03-4389

受付時間/月~金 9:00~17:30(祝・祭日を除く)  
<http://o-medicine.sumitomopharm.co.jp>

■効能・効果、用法・用量、使用上の注意等につきましては添付文書をご参照ください。



住友製薬と大日本製薬は2005年10月1日から「大日本住友製薬」へ

**住友製薬**

慶應医学 第82卷第3号別頁  
平成17年9月25日

# 学位論文

慶應医学会

学位論文

ヒト精漿および精子内の  
クレアチンキナーゼアイソザイムについての検討

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

(指導：村井 勝教授)

宮 地 系 典

(平成 16 年 2 月 17 日受付)

Key Words : male infertility, human sperm, seminal plasma, creatine kinase isozyme

不妊夫婦の数は増加傾向にあり、最近ではおよそ 15% のカップルが不妊であるとの報告がある<sup>1)</sup>。また社会全体に目を向けると約 20 年前より人工構成の少子高齢化が進み、社会問題にまで発展してきた。このような出生率の低下を防ぐために種々の方策がとられているが、その中で不妊治療の充実化を図ることも極めて重要になってきた。不妊治療の中で女性の治療、生殖補助技術に関しては近年急速な進歩がみられるのに対して、不妊原因の約 50% 占める男性不妊では有効な治療法が少ないのが現状である。精子機能の一つである、精子運動は卵への侵入、受精に不可欠であり、精子運動率が 50% 以下の精子無力症は男性不妊に大きな割合を占め、その原因究明が必要である。

クレアチンリン酸塩は高エネルギーリン酸塩として貯蔵され、アデノシン 3 リン酸 (ATP) を補給するためのエネルギー緩衝剤として利用される。筋肉内ではクレアチンリン酸シャトルがミトコンドリアから筋原線維へ高エネルギーリン酸を輸送し、かつ高エネルギーリン酸のレベルを一定に保つために緩衝剤になっていると考えられている<sup>2)</sup>。Tombes らは精子細胞内でも筋肉細胞で提唱されているクレアチンリン酸シャトルによって ATP が輸送されていることを示唆している。すなわち ATP の高エネルギーリン酸結合はミトコンドリアのクレアチンキナーゼ (CK) によりクレアチンに転移されると同時にアデノシン 2 リン酸 (ADP) が生じ、この ADP は酸化的リン酸化によって ATP に変換される。いっぽう、クレアチンリン酸は精子尾部鞭毛の軸系のダイニン-ATPase によって分解され、再び ADP になる<sup>3)</sup>。申請者は精子運動機構および精子無力症へのクレアチン

リン酸シャトルの関与を解明する一端として、精子尾部における ATP 濃度維持に主要な役割を果たす CK に着目した。CK アイソザイムには、CK-MM, CK-BB, CK-MB, CK-MiMi の 4 種類があり、精漿中には精子中と比較して大量の CK-BB が存在するといわれている<sup>4)</sup>。従来、体外受精における受精率とヒト精子内アイソザイムの関連についての報告がなされているが、アイソザイムパターンに関しては諸家によって報告が異なる。本研究では最初に、精子内にはなく精漿に多量に含まれる酸性フォスファターゼ (ACP) 活性を指標として、精子検体に精漿、精液内他細胞が混在しないような精子精製法を検討した。さらにその方法を使って、精子および精漿内の CK アイソザイムの同定とその活性測定を行った。

材料と方法

東京歯科大学市川総合病院泌尿器科および産婦人科における不妊外来患者 112 名の精液を用いた。精液の提供には患者本人に十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得て使用した。精液は患者自身による用手法にて採取され、精液検査施行後の余剰精液を実験に供した。精液検査は液状化後、WHO のガイドラインに沿って施行した<sup>5)</sup>。精子濃度は Makler Counting Chamber (SEFI-MEDICAL INSTRUMENTS, New York, USA) で計測し、精子運動率は 37°C で computer assisted motility analyzer (C-men : Compix, PA, USA) を使用し計測した。精子奇形率は Kruger's strict criteria<sup>6)</sup> に沿って評価した。

1. 精子精製法の検討

(1)Haszar らの精子精製法<sup>10)</sup>, (2)Claus らの精子精製法<sup>11)</sup>, (3)キャピラール攪拌密度勾配法<sup>12-14)</sup>, (4)swim up 法<sup>15)</sup>, (5)キャピラール攪拌密度勾配法および修正 swim up 法を合わせた精製法, をそれぞれ施行し, 精子を精製した。

(1) Huszar らの生理的食塩水による精子精製法<sup>10)</sup>

精液を 15 倍量の 0.03 M イミダゾール加 0.15 M 塩化ナトリウム溶液 (pH 7.0) で希釈し, 2000×g, 4℃で 10 分間遠心分離後上清を除去した。残った精子検体は 0.03 M イミダゾール, 10%グリセリン, 5 mM Dithiothreitol (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), 0.1% Triton X-100 を加えた 0.15 M 塩化ナトリウム溶液 (pH 7.0) 同量に再懸濁し, 20 秒攪拌後, 4℃, 5000×g で 10 分間遠心分離し, 上清を検体とした (n = 5)。

(2) Claus らの生理的食塩水による精子精製法<sup>11)</sup>

精液 200 μl に 0.05 M Tris 緩衝化 0.1 M 塩化ナトリウム溶液 (pH 8.0; 洗浄液) 10 ml を加えて 2000×g,

4℃で 10 分間遠心分離し上清を除去した。沈殿を再度洗浄液 10 ml に混和し, 2000×g, 4℃で 10 分間遠心分離し, 上清を除去した。沈殿を 1% Triton X-100 加洗浄液 (抽出液) に混和して 5 分間攪拌し, 5000×g, 10 分間遠心分離し, 上清を Eppendorf tube に移した (精子抽出液 1)。沈殿は 100 μl の抽出液に混和し 5 分間攪拌後 5000×g, 10 分間遠心分離し, 上清を最初の精子抽出液 1 に加えたものを検体とした (n = 5)。

(3) キャピラール攪拌密度勾配法<sup>12-14)</sup> (図 1)

精液全量に等量の 4.0 mg/ml アルブミン加 20 mM HEPES 緩衝化ハンクス液 (ハンクス液) を加えて 40 μm ナイロンメッシュフィルターで濾過した (以下濾過精液)。20 mg/ml アルブミン加等張化 80%パーコール液 (pH 7.4) 5 ml に濾過精液を 2 ml 層積し, キャピラールを挿入した後に精液とパーコール層を L 型攪拌棒で数度攪拌することにより連続密度勾配を作成し, 4℃, 1000×g で 30 分間遠心分離した。精子は管底に濃

1) 2) 3) 4)

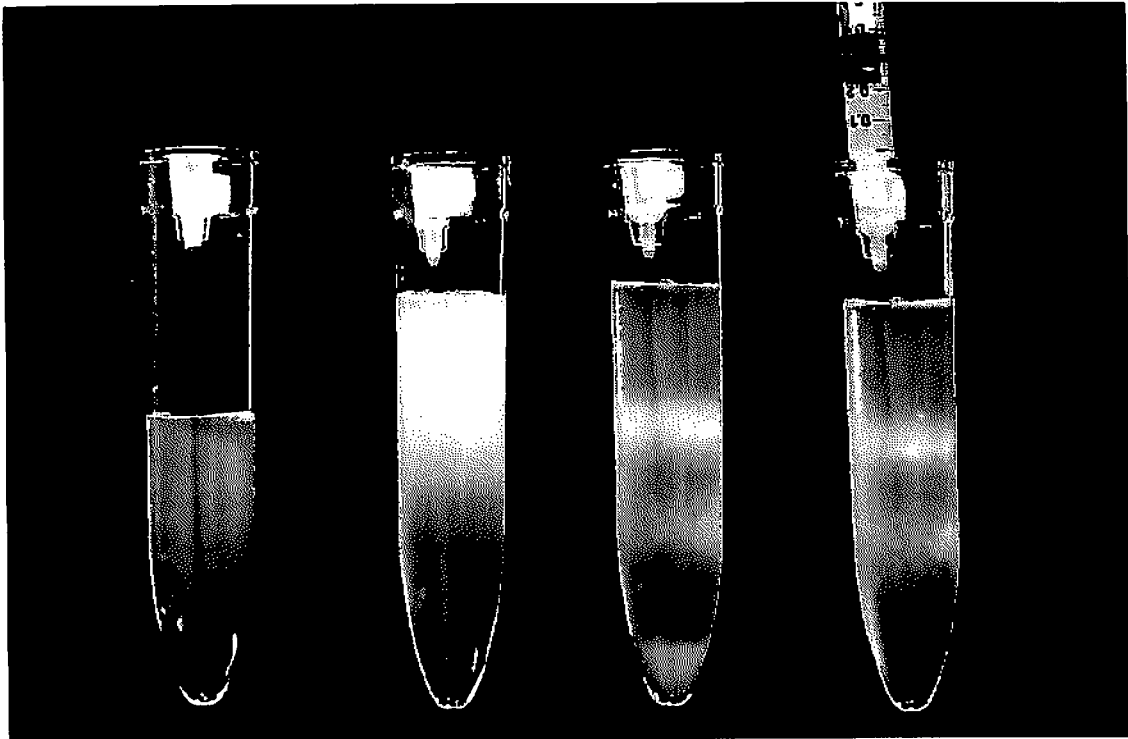


図 1 キャピラール攪拌密度勾配法

写真は, 1) 20 mg/ml アルブミン加等張化 80%パーコール液 (pH 7.4) 5 ml にキャピラールを挿入しているところを示す。2) 40 μm ナイロンメッシュフィルターで濾過した精液 2 ml を層積し, L 字攪拌棒で数回攪拌, 連続密度勾配を作成した。3) 4℃, 1000×g で 30 分遠心分離, 管底に成熟精子が沈殿しているのを示す。4) 管底の精子を吸引, 回収している。

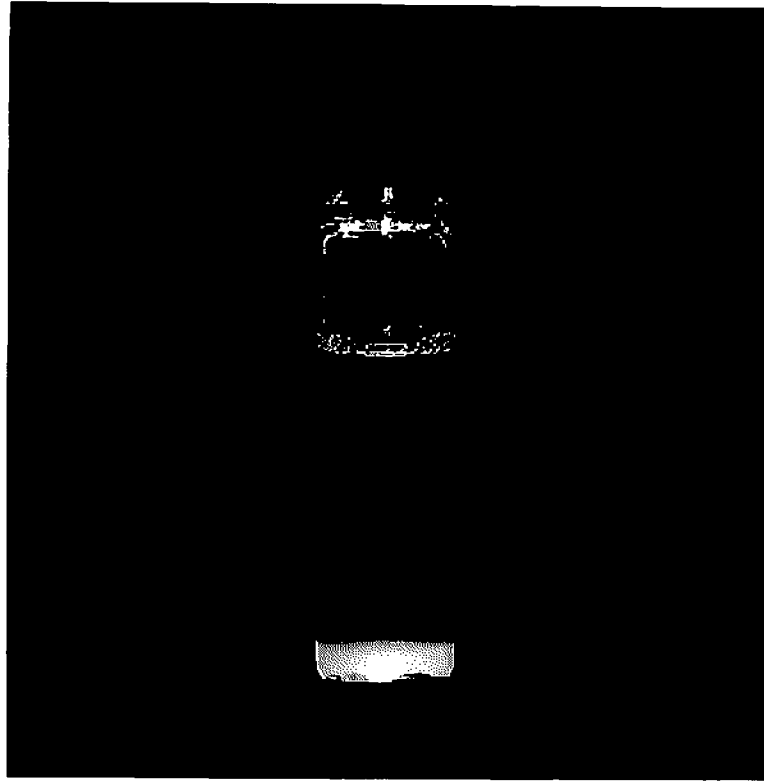


図2 Swim up法

写真は、Swim up法において1%アルブミン加ハックス液10mlの管底に精液を層積した状態を示している。修正swim up法の場合は40%パーコール液を管底に層積し、その下に精液を層積した。

縮され、キャピラールから吸引して0.5 mlに再懸濁して検体とした (n=5)。

#### (4) swim up法<sup>15)</sup> (図2)

1%アルブミン加ハックス液10mlの入ったガラス管底にゆっくりと精液を層積した。2時間後に上層部のハックス液8mlを吸引し、クッション法<sup>16)</sup>で再濃縮後精子を回収して検体とした (n=5)。

#### (5) キャピラール攪拌密度勾配法および修正swim up法を合わせた精子精製法

1%アルブミン加ハックス液3mlの入ったガラス管底にまず40%パーコールを0.3mlゆっくりと注入し、その下層に前述のキャピラール攪拌密度勾配法によって得られた精子混濁液をゆっくりと層積した。2時間後に上層部のハックス液2mlを吸引し、クッション法で再濃縮後精子を回収して検体とした (精製精子, n=5)。

## 2. 各種精製法での精漿残存率の測定および精子精製法の決定

前述の5つの方法で得られた精子懸濁液中のACP活

性を測定し、それによって精漿残存率を求め、精子を最も純粋に精製できる方法を決定し、その方法を以下の検討に用いた。ACP活性はAcid Phospha-K II-test (Wako, Osaka, Japan)を使用した。測定は37℃で、波長500nmの分光光度計1100 spectrophotometer (HITACHI, Tokyo, Japan)を使用した。活性はKing-Armstrong単位 (以下K-A U/ml) で表した。各精子精製法による精子懸濁液中の精漿残存率は、精漿残存率 (%) = 精子懸濁液中 ACP 活性値 × 100 / 原精漿 ACP 活性値として求めた。

## 3. 精製精子からのCKの抽出

採取したの精製精子に0.1%および1%のTriton X-100加0.15M塩化ナトリウム液を加えて総量を1mlとした。攪拌1分間後、液体窒素による凍結融解を2回、7分間の超音波処理後、鏡検上90%以上の精子の頭部と尾部が分離していることを確認した。2000×g, 4℃で10分間遠心分離を行い、上清 (精子抽出液) を採取し実験に供した。

#### 4. 精漿の精製法

液状化した精液 1 ml を取り、4°C、2000×g、10 分間遠心分離して上清を採取し、0.4 μm メンブランフィルターで残存する精液内異物を濾過して実験に供した。

#### 5. CK 活性の計測

精子抽出液 (n = 31) および精漿抽出液 (n = 37) について CK 活性を Iatro set CK-S (Iatron Co. Tokyo, Japan) で測定した。測定には 37°C、波長 560 nm の分光光度計 1100 spectrophotometer (HITACHI, Tokyo, Japan) を使用した。活性値は IU/l で表した。得られた結果は、平均±SD として表した。

#### 6. イオン交換クロマトグラフィーによる精子、精漿の CK アイソザイムの測定

0.02% Tris (hydroxymethyl) aminomethane (以下 Tris) 緩衝液 pH 8.0 に DE23 セルロース (DE23; Whatman Ltd., England) を混和してガラス製円柱筒に滴下し、DEAE セルロースカラム (1.5×10 cm) を作製した。34 検体の精子、精漿それぞれの検体 1 ml を 0.02% Tris 緩衝液 10 ml に混和し、カラムに滴下して吸着させた。0 M~0.6 M 塩化ナトリウムを加えた 0.02% Tris 緩衝液 20 ml を徐々に濃度が上昇するようにカラム内に滴下した。溶出液を 1 ml ずつ試験管に取り、それぞれの CK 活性を計測し、クロマトグラムを作成し CK アイソザイムを求めた。

#### 7. セルロースアセテートメンブラン電気泳動による CK アイソザイムの測定

32 検体の精子および精漿のそれぞれについてセルロースアセテートメンブラン電気泳動を行った。泳動後のセルロースメンブランは Iatro set CK-S (Iatron Co. Tokyo, Japan) を用いて活性染色を行い、発色するまで 37°C で保温した。発色後の電気泳動像は densitometry を行い、標準血清 (CK-MM; 99 IU/l, Iatro set CK-S, Iatron Co. Tokyo, Japan) の泳動パターンとの比較を行い、CK アイソザイムを測定した。

## 結 果

#### 1. 各種精子精製法における精漿残存率の比較

(1) Huszar らの精子精製法、(2) Claus らの精子精製法、(3) キャピラール攪拌密度勾配法、(4) swim up 法、(5) キャピラール攪拌密度勾配法および修正 swim up 法を合わせた精子精製法について、それぞれの精子懸濁液中の残存 ACP 活性値を測定した。精漿の ACP 活性値は  $3.2 \pm 1.6 \times 10^5$  K-A U/ml であり、各精製法で調製した精子懸濁液中の ACP 活性値はそれぞれ (1)  $29.0 \pm 0.7 \times 10^4$  K-A U/ml、(2)  $1.9 \pm 0.2 \times 10^4$  K-A U/ml、(3)  $1.3 \pm 0.3 \times 10^4$  K-A U/ml、(4)  $3.2 \pm 0.2 \times 10^4$  K-A U/ml、(5)  $4.3 \pm 2.1$  K-A U/ml であった。この結果、精漿残存率はそれぞれ (1)  $91.0 \pm 4.6\%$ 、(2)  $5.8 \pm 1.0\%$ 、(3)  $3.9 \pm 1.7\%$ 、(4)  $9.9 \pm 1.2\%$ 、(5)  $1.4 \pm 1.3 \times 10^{-3}\%$  であり、キャピラール攪拌

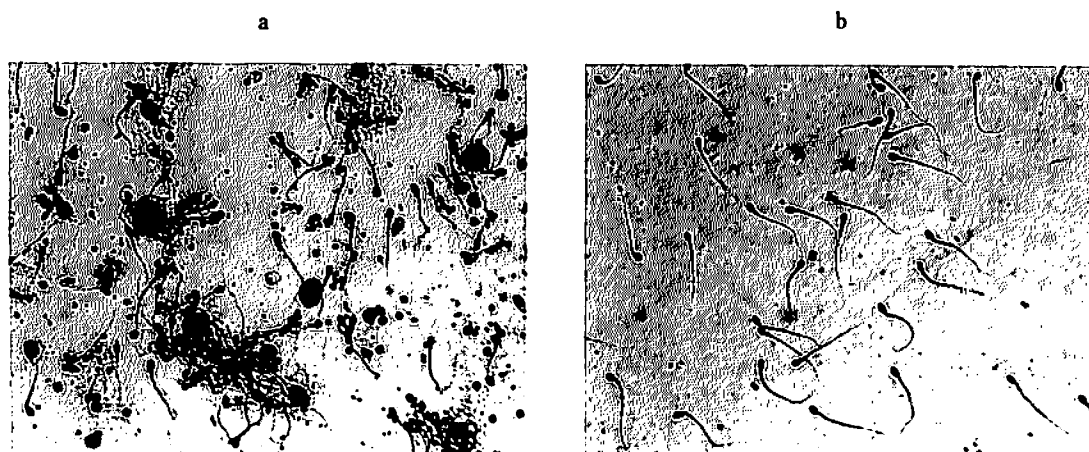


図3 精製後の精液像の比較 (Diff-Quik 染色×400)

a は Claus と Huszar らの方法で得た精子像であり、精子と他細胞が混在している。b はキャピラール攪拌密度勾配法で得られた精子に修正 Swim up 法を行って得た精子像であり、精子のみが観察される。

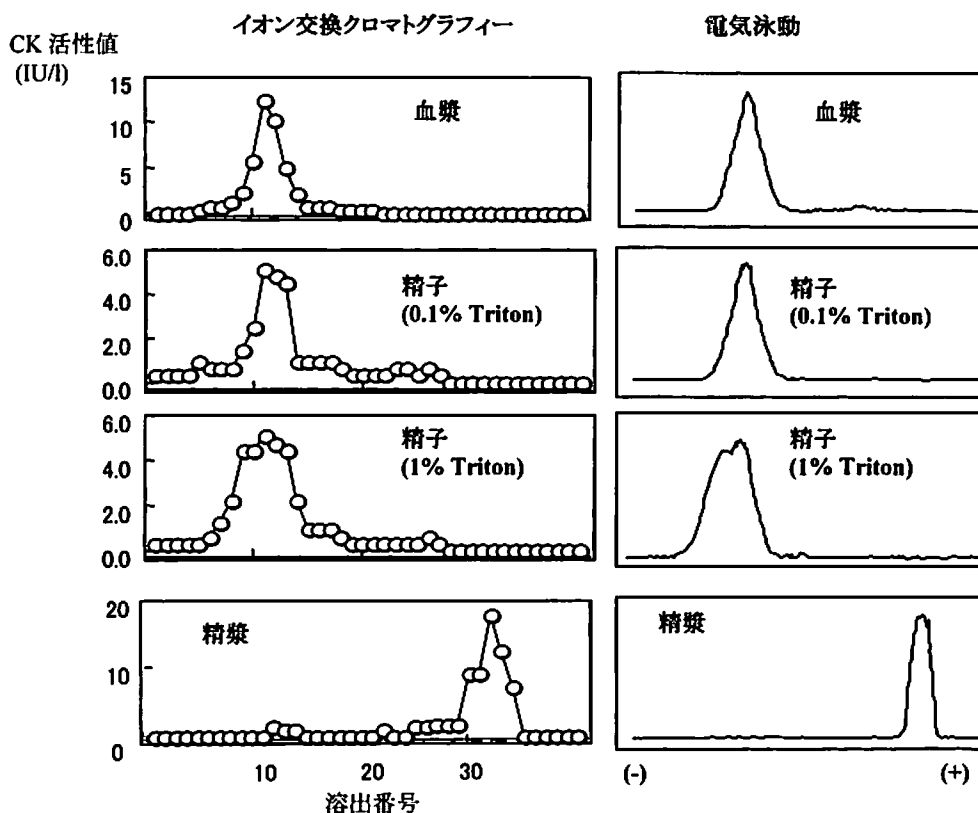


図4 ヒト血漿、精漿、精製精子におけるCKアイソザイムの比較

図左側はイオン交換クロマトグラフィーにおけるCK活性の溶出態度を、図右側は活性染色によるCK電気泳動像を示している。精子内にはCK-MM、MiMiと微量の-MBが認められ、精漿内にはCK-BBが認められた。

(Miyaji K et al : Arch Androl 46 : 127-134, 2001 の Figure 1 を許可を得て転載)

密度勾配法と修正 swim up 法を組み合わせた方法の精漿残存率が最も低値であった。

## 2. 各種精子精製法における精子像の比較 (図3)

Huszar らの精子精製法および Claus らの精子精製法は単なる希釈遠心分離法であり、精液内の細胞は沈澱に回収され、3-a 図に示すように精子のみならず白血球や尿路上皮細胞などの他細胞や異物が観察された。いっぽうキャピラール攪拌密度勾配法および swim up 法では、3-b 図に示すように精子のみが観察された。以上の結果より、精漿をほぼ完全に除去できるとともに精子のみを選択的に採取することができる精子精製法として、キャピラール攪拌密度勾配法および修正 swim up 法を合わせた精子精製法を採用した。

## 3. イオン交換クロマトグラフィーによる精子および精漿のCKアイソザイム測定 (図4)

精子および精漿 34 検体についてのクロマトグラムを標準血清のCKアイソザイムパターン (CK-MM) と比較検討した。精子では、抽出の際に使用した界面活性剤 (Triton X-100) 濃度が 0.1% の場合には、標準血清と同様に溶出番号 11 でピークが認められ、CK-MM であると考えられた。いっぽう、Triton X-100 の濃度を 1% とした場合には、溶出番号 9~11 に二重性のピークが認められ、CK-MM および CK-MiMi であると考えられた。精漿では溶出番号 33 にピークを認め、CK-BB であると考えられた。

## 4. セルロースアセテートメンブラン電気泳動による精子、精漿のCKアイソザイム測定

精子および精漿 32 検体の泳動パターンを標準血清の



精子内CK活性値  
(IU/l)

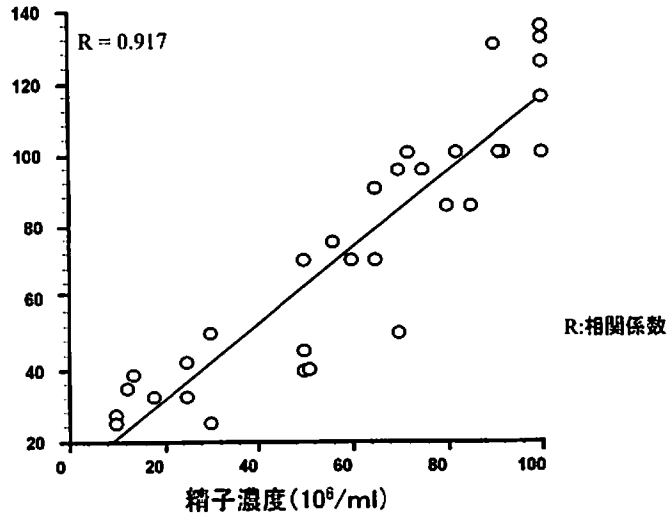
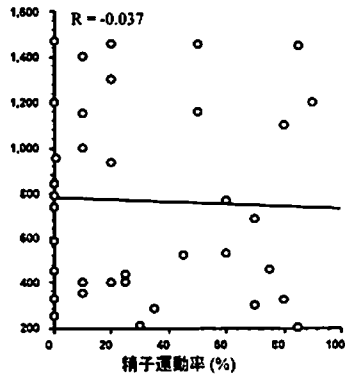


図5 精子内CK活性値と精子濃度との相関

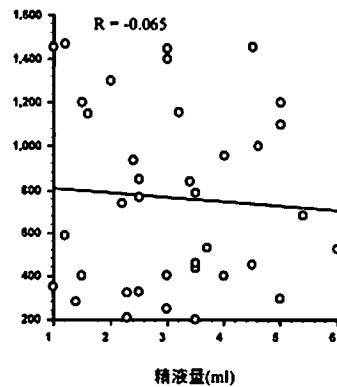
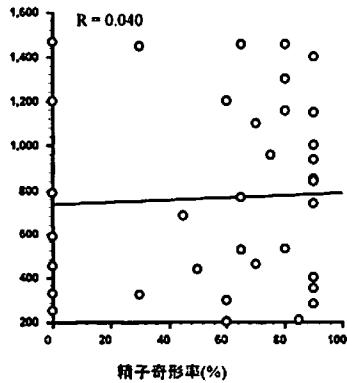
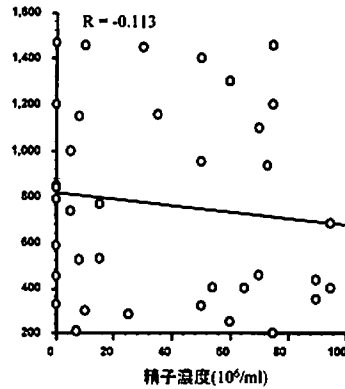
精子内CK活性値と精製精子濃度の間には相関関係が認められた。運動精子中のCK活性はほぼ一定であると思われる。

(Miyaji K et al : Arch Androl 46 : 127-134, 2001 の Figure 2 を許可を得て転載)

精漿CK活性値(IU/l)



精漿CK活性値(IU/l)



R:相関係数

図6 精漿のCK活性値と精液所見(精液量, 精子濃度, 精子運動率, 奇形率)との相関

精漿のCK活性と精液所見の間には相関関係が認められなかった。

(Miyaji K et al : Arch Androl 46 : 127-134, 2001 の Figure 3 を許可を得て転載)

CK アイソザイムパターン (CK-MM) と比較検討した。精子抽出の際、Triton X-100 濃度が 0.1% の場合には精子の CK アイソザイムは 32 例中、30 例で CK-MM だけであったが、2 例では CK-MB がごくわずかに認められた。いっぽう、Triton X-100 の濃度を 1% にした場合には CK-MM と CK-MiMi が等量認められた。精漿中の CK アイソザイムは CK-BB のみであった(図 4)。

#### 5. 精子および精漿の CK 活性

精子内 CK 活性は  $2.0 \pm 0.7 \times 10^6$  IU/ $10^6$  sperm であった。精漿 CK 活性は  $6.6 \pm 3.6 \times 10^2$  IU/l であった。精製精子濃度と精子内 CK 活性には相関関係が認められ、運動精子内の CK 活性はほぼ一定であると思われた(図 5)。原精液の所見(精子濃度、運動率、奇形率、全精子数、全運動精子数、精液量)と精漿 CK 活性値との相関関係はなかった(図 6)。

### 考 察

現在までの知見では精子内に存在する CK アイソザイムについて統一された見解が得られていないのが現状である。そのため本研究では最初に、精子精製法の検討を行った。これまでに報告のあった、Huszar らの方法、Claus らの方法およびキャピラール攪拌密度勾配法、修正 swim up 法、それらの併用法によって精子を精製し、精漿のみに存在する ACP を指標として精子懸濁液中の精漿残存率を算定して精子精製法を検討した。その結果、精漿をほとんど含まない精子精製法はキャピラール攪拌密度勾配法と修正 swim up 法の併用であることが判明した。キャピラール攪拌密度勾配法は、精子が成熟の過程で形態が変化し、その時期によって細胞密度が異なることを利用したものである。すなわち未成熟な精子は細胞小滴が存在するために細胞密度は低いが、成熟精子ではそれが消失しているため密度は上昇する。また死滅した精子では細胞膜の透過性が変わり、細胞外液が細胞内に浸透するために密度は低下する。そこで濃度を調整したパーコール液を添加することによって運動精子と、精漿および非運動精子(または死滅精子)とを分離することができる。また修正 swim up 法は精子自身の運動性を利用したものであり、これら 2 法を併用することにより精漿をほとんど含まない運動精子を選択的に採取することが可能となった<sup>17)</sup>。CK には CK-MM, CK-MB, CK-BB, CK-MiMi と呼ばれている、大きく分けて 4 種類のアイソザイムが存在する。CK-MM は主に筋肉、CK-MB は心筋に特異的で、CK-BB は脳、腎、膀胱にあり、

CK-MM, -MB, -BB は細胞質上清に存在するが、CK-MiMi はミトコンドリア内膜内に存在する<sup>19,21)</sup>。また精漿内には CK-BB が大量に存在し、前立腺由来または精囊由来といわれている<sup>4,7)</sup>。Asseo らは、乏精子症の精漿中 CK 活性は健常者より低いと報告している<sup>18)</sup>が、本研究では精液所見と精漿中 CK 活性値との関連は見られなかった。Claus らはヒト精子内には CK-BB と CK-MiMi が存在すると報告しており<sup>11)</sup>、いっぽう、Huszar らは精子内には CK-BB と CK-MM が存在し、精子内の CK-MM/CK-BB 比が 10% 以上の場合、体外受精における受精率が良好であり<sup>10)</sup>、精液所見と精子内 CK 活性値は反比例し<sup>22)</sup>、CK 活性値によって乏精子症の人工受精率を予測できる<sup>23)</sup>と報告している。これに対して本研究では精子内に CK-BB は認めず、大部分が CK-MM で、微量の CK-MB が認められ、精製条件によって CK-MiMi が併存するという結果であった。このような成績の違いは精子精製法の相違によるものと考えられる。精漿中には CK-BB が大量に存在することが知られており、Claus や Huszar の方法で得られた成績は、精漿の除去が不完全なため、CK-BB を精子内のものとして計測したと考えられる。以上より、申請者の精子精製法を用いて初めて、精子内の CK アイソザイムを測定することが可能となり、大部分が CK-MM であることが確認されたといえる。

CK-MiMi に関しては、精子中片にミトコンドリアが豊富であることが知られており、CK-MM が細胞質に存在するのに対して、CK-MiMi はミトコンドリア内に存在するため、精子の処理法の違いによって成績が異なったものと思われた。すなわち、CK を抽出する際に用いる Triton X-100 の濃度を Claus と同様に 1% にするとミトコンドリア内の CK-MiMi も抽出されるが、0.1% ではそれが起こらず検出されなかったものと考えられる。

精漿内には、大量の ACP および CK-BB が存在しており、両者ともリン酸代謝に関与する。精漿にはクレアチン、クレアチンリン酸が存在し、Lee ら<sup>24)</sup>はこれらの精子内取り込みが細胞内クレアチン濃度維持、ひいては精子運動に関与すると報告し、精漿 CK-BB は精漿内クレアチン濃度維持および精子細胞表面における ATP 再生産に寄与するとしているが、精漿 CK-BB の精子に対する生理的意義は不明な点が多い。ACP についても生理的意義は不明である。

Na-K ATPase の alpha4 アイソフォームは細胞内の H<sup>+</sup> を調節して<sup>25)</sup>精子運動に関与し、乏精子症においてはその酵素活性が低下している<sup>26)</sup>と報告されている。ヒ

ト精子において Ca-ATPase の阻害剤は用量依存的精子運動を低下させることが報告されているが<sup>27)</sup>, Ca<sup>2+</sup> の精子運動に対する作用は動物種により異なり, ヒツジ, マウス, モルモットでは Ca<sup>2+</sup> はほとんど影響を与えない。ウシ, イヌ, チンパンジーでは Ca<sup>2+</sup> は精子運動を阻害し, ハムスター, ラットでは精子運動を活性化する。その作用は阻害的であったり, 促進的であったり種によってさまざまである<sup>28)</sup>。

本研究では, 精子内 CK アイソザイムは大部分が CK-MM であったが, CK-MM は骨格筋において, ATP の産生と輸送を担っており, ミオシンフィラメントに関与する M-band の構成蛋白といわれている<sup>29)</sup>。また, 精子鞭毛の軸糸はチューブリン, ダイニンで構成され, 9本のダブルレット微小管(周辺微小管)と2本の中心微小管(中心小管を)骨格とするいわゆる9+2構造で, ダイニンが中心となり, 2次元, 3次元の周期的な屈曲運動を行う<sup>3)</sup>。Kamimura らは 0.5 mM ATP 存在下で約 300 Hz の鞭毛振幅を観察し, その振幅数は ATP 濃度依存的に変化したと報告しており<sup>30)</sup>, CK-MM は尾部における ATP の局所再生を通して精子運動維持に寄与していると考えられる。

以上より, これらの結果は今後, 精子内の CK 濃度やアイソザイムパターンを調整することによる精子無力症に対する治療法や精子運動についての研究の一助となると考えた。また精子精製法については, 精液中の細菌, ウィルス等の異物除去に応用できるようさらなる改良の検討が必要であると考ええる。

## 総 括

本研究はヒト精子を精漿より高度に分離することにより, 精子内と精漿内の CK のアイソザイムおよび CK 活性値を明らかにした。

1. 精漿に多量に含まれる ACP 活性を指標として, ヒト精子検体に精漿が混ざらないような精子精製法を検討し, キャピラール攪拌密度勾配法と修正 swim up 法を組み合わせた方法が有用であるという結果を得た。本研究で確立したヒト精子精製法は, 非運動精子, 他細胞の排除とともに精漿をほぼ完全に除去し, 運動精子を選択的に分画することができた。
2. この精製法で精子と精漿を分離して, DEAE セルロースカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー, セルロースアセテートメンブラン電気泳動法を用いてヒト精子内, 精漿内の CK アイソザイムおよび活性値を計測したところ, 精子内の CK アイソザイムは,

CK-MM と微量の CK-MB であり, 抽出条件によって CK-MiMi が併存し, CK-BB は検出されなかった。精漿の CK アイソザイムは CK-BB であった。

3. 精子の CK 活性値は,  $2.0 \pm 0.7 \times 10^6$  IU/ $10^6$  sperm で, 精漿の CK 活性値は  $6.6 \pm 3.6 \times 10^2$  IU/l であった。
4. これらの結果は今後, 精子無力症の研究の一助となると考えられた。また精子精製法については, 精液中の細菌, ウィルス等の異物除去に応用できるようさらなる改良の検討が必要であると考ええる。

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御高閣を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室 村井勝教授に深甚なる謝意を表します。また, 貴重な御助言, 御協力をいただきました東京歯科大学市川総合病院泌尿器科, 産婦人科各位に厚く御礼を申し上げます。

本研究の一部は, 第42回 日本不妊学会総会(1997年11月東京), Third Asian and Oceanic Congress Of Andrology(2000年5月幕張)において発表した。

## 文 献

- 1) Howards SS : Treatment of male infertility. *New Eng J Med* 332(5) : 312-317, 1995
- 2) 鈴木範男, 森沢正昭, 屋元紀 : 精子のエネルギー代謝。精子学(毛利秀雄監修)。東京大学出版会, 146-147, 1994
- 3) Tombes RM, Shapiro BM : Metabolite Channeling : A Phosphorylcreatine Shuttle to Mediate High Energy Phosphate Transport between sperm Mitochondion and Tail. *Cell* 41 : 325-334, 1985
- 4) Kavanagh JP, Darby C : Creatine kinase and ATP in human seminal fluid and prostatic fluid. *J Reprod Fert* 68 : 51-56, 1983
- 5) Wallimann T, and Hemmer W : Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133-134 : 193-220, 1994
- 6) Wallimann T, Moser H, Zurbriggen B, Wegmann G, Eppenberger HM : Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J Muscle Res Cell Motil* 7 : 25-34, 1986
- 7) Soufir JC : Creatine kinase in human seminal plasma : activity, origin and isoenzymes. *Clin Chem* 25 : 1183-1184, 1979
- 8) World Health Organization : Laboratory manual for the examination of semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. New York, Cambridge University Press, 1993
- 9) Kruger TF, Menkveld R, Thomas C, Lombard CJ, Franken DR : Sperm morphology : assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fertil Steril* 63 : 135-141, 1995

- 10) Huszar G, Vigue L, Morshedi M : Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men. *Fertil Steril* 57 : 882-888, 1992
- 11) Claus R, Hermann MB, Trevor G, Brigit K, Eberhard N : Creatine kinase activity in human spermatozoa and seminal plasma lacks predictive value for male fertility in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 69 : 727-734, 1998
- 12) Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T, Mohri H, Iizuka R : Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an inner-column. *Biol Reprod* 35 : 1059-1063, 1986
- 13) Kaneko S, Sato H, Kobanawa K, Oshio S, Kobayashi T, Iizuka R : Continuous-step density gradient centrifugation for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen. *Arch Andol* 19 : 75-84, 1987
- 14) Lee K : Studies on human sperm cryopreservation using the dry ice pellet method ; its application to artificial insemination with husbands semen (AIH). *J. Keio Med. Soc.* 66 : 845-856, 1989
- 15) Andolz P, Bielsa MA, Genesca A, Benet J, Egozcue J : Improvement of sperm quality in abnormal semen samples using a modified swim-up procedure. *Hum Reprod* Feb 2 : 99-101, 1987
- 16) 兼子 智, 久慈直昭, 小田高久, 小林俊文, 吉村泰典, 野澤志郎 : ヒト精子凍結保存と不妊症への応用. *低温医学*, 22 : 147-152, 1996
- 17) Miyaji K, Kaneko K, Ishikawa H, Aoyagi T, Hayakawa K, Hata M, Oohashi M, Izawa A, Murai M : Creatine kinase isoforms in the seminal plasma and the purified human sperm. *Arch Andol* 46 : 127-134, 2001
- 18) Asseo PP, Panidis DK, Papadimas JS, Ikkos DG : Creatine kinase in seminal plasma of infertile men : Activity and isoenzymes. *Int J Androl* 4 : 431-439, 1981
- 19) Jacobs H, Heldt HW, Klingenberg M : High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 16 : 516-521, 1964
- 20) Smeitink J, Wevers R, Hulshof J, Lith T, Sengers R, Treijbels F, Korenke C, Wallimann T : A method for quantitative measurement of mitochondrial creatine kinase in human skeletal muscle. *Ann Clin Biochem* 29 : 196-201, 1992
- 21) Kottke M, Adams V, Wallimann T, Nalam VK, Brdizka D : Location and regulation of octameric mitochondrial creatine kinase in the contact sites. *Biochim Biophys Acta* 1061 : 215-225, 1991
- 22) Huszar G, Corrales M, Vigue L : Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normozoospermic and oligozoospermic men. *Gamete Res* 19 : 67-75, 1988
- 23) Huszar G, Vigue L, Corrales M : Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligospermic men. *J Androl* 11 : 40-46, 1990
- 24) Lee J, Fillers W, Iyengar M : Phosphocreatine an intracellular high-energy compound, is found in the extracellular fluid of the seminal vesicles in mice and rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 7265-7269, 1988
- 25) Woo L, James F, Lingrel B : Roles of the Na, K-ATPase alpha 4 isoform and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in sperm motility. *Mol Repro Dev* 62 : 348-356, 2002
- 26) Kocak N, Aktan G, Aykac G : The role of Na, K-ATPase in human sperm motility. *Int J Androl* 25 : 180-185, 2002
- 27) Williams K, Ford W : Effects of Ca-ATPase inhibitors on the intracellular calcium activity and motility of human spermatozoa. *Int J Androl* 26 : 366-371, 2003
- 28) 森沢正昭, 森沢幸子, 星 元紀 : 精子運動の調節. *精子学* (毛利秀雄監修). 東京大学出版会, 104-120, 1994
- 29) Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, Anflous K : Functional coupling of creatine kinases in muscles : Species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* 184 : 231-247, 1998
- 30) Kamimura S, Kamiya R : High-frequency nanometre-scale vibration in 'quiescent' flagellar axonemes. *Nature* 340 : 476-478, 1989

学位論文

子宮内膜症が卵巣明細胞腺癌に与える生物学的影響  
—Transforming growth factor-beta 1 とそのレセプターおよび  
urokinase type-plasminogen activator の関与を中心として—

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

こみやま しん いち  
小宮山 慎 一

(平成 16 年 8 月 17 日受付)

**Key Word** : ovarian clear cell adenocarcinoma, endometriosis, transforming growth factor-beta 1, transforming growth factor-beta receptor, urokinase type-plasminogen activator

卵巣明細胞腺癌は 1939 年に Schiller によって初めて報告され、表層上皮性卵巣癌のおよそ 5~10% を占めると言われている代表的な組織型である<sup>1,2)</sup>。卵巣明細胞腺癌の組織発生は müllerian duct を起源とする多分化能を持つ卵巣表層上皮と考えられ<sup>1),3)</sup>、その生物学的特徴は他の組織型とは大きく異なることが従来から指摘されている。そのひとつに、代表的な婦人科良性疾患のひとつである子宮内膜症と共存する頻度が他の組織型よりも高率であるという特徴がある<sup>1,2)</sup>。卵巣明細胞腺癌と子宮内膜症の関連についてはこれまで、子宮内膜症が明細胞腺癌の前癌病変である、という観点からの報告は数多くあるものの、共存の有無による生物学的特性の差異について検討した報告はない。またこれまで本邦において全表層上皮性卵巣癌に占める明細胞腺癌の割合は 15~22% と、欧米よりも多いと言われており<sup>13,14)</sup>、さらに近年その増加傾向が指摘されつつある。治療戦略とともに臨床的および基礎的検討が急務といえる。

子宮内膜症は子宮内膜ないしはその類似組織が本来の子宮内膜層以外の部分に発生し発育する疾患である。病理組織学的に異所性子宮内膜ととらえられ、いわゆる類腫瘍病変と考えられる。主として骨盤内を中心に多彩な病態を示し、ひいては腹腔内環境のダイナミックな変化を引き起こすことが指摘されている。しかしその病因や

進展のメカニズムは不明な点が多く、様々な分子の関与が考えられており、その中でも各種サイトカインや成長因子、細胞性免疫機能の関与が注目されている<sup>15,25)</sup>。

Transforming growth factor-beta 1 (TGFβ1) は多彩な生理活性作用を有する分泌型のタンパクであるが、その autocrine, paracrine 機構により個々の細胞の増殖や分化、またこれら細胞の足場となる細胞外マトリックスの産生や分解、あるいは血管新生などに直接的ないしは間接的に関与する分子のひとつであり、特に上皮性細胞に対しては強力な増殖抑制作用を有することが知られている<sup>26,29)</sup>。子宮内膜症患者の腹腔内ではこの TGFβ1 が高値を示すことが従来から指摘されており<sup>15,19)</sup>、その病態に対して重要な役割を担っていると予想される。

そこで、子宮内膜症と卵巣明細胞腺癌の共存が生物学的にどのような意義を有しているのか、まずは臨床病理学的に検討した。続いて TGFβ1 を重要な key-molecule と認識し、特にその増殖抑制効果という点に着目し、その動態を検討することによって子宮内膜症が共存する卵巣明細胞腺癌へ直接的な paracrine 作用をおよぼす因子となりうるか、その結果として子宮内膜症共存の有無が卵巣明細胞腺癌の生物学的特徴の相違を生む原因となりうるか、について検討した。

本論文は、Komiya S, Aoki D, Tominaga E, Susumu N, Udagawa Y, and Nozawa S : Prognosis of Japanese patients with ovarian clear cell carcinoma associated with pelvic endometriosis : clinicopathologic evaluation. *Gynecol Oncol* 72 : 342-346, 1999 の一部を含む。

## 対 象

### 1. 卵巣明細胞腺癌症例の臨床情報

1984年から1994年までに慶應義塾大学病院産婦人科において初回手術ならびに platinum 製剤を含む化学療法を施行した卵巣明細胞腺癌全53例 (I期32例, II期3例, III期15例, IV期3例) の臨床情報はすべて患者診療記録より得た。なお臨床進行期は International Federation of Obstetrics and Gynecology (FIGO) の国際進行期分類 (1988)<sup>30)</sup>に基づき決定した。

### 2. 卵巣子宮内膜症性嚢胞内容液および腹水

代表的な子宮内膜症病変であり、本疾患の局所環境を濃厚に反映していると考えられる卵巣子宮内膜症性嚢胞 (チョコレート嚢胞) の内容液およびその腹水を材料とした。これらは開腹手術もしくは腹腔鏡下手術時に採取され、病理組織学的に子宮内膜症と診断された5例の卵巣子宮内膜症性嚢胞内容液および同一患者の腹水を用いた。内容液および腹水は採取後迅速に4℃, 3000 rpmで20分間遠沈し、上清を分離し、以後のアッセイに供するまで-20℃で凍結保存した。

### 3. 卵巣子宮内膜症性嚢胞と正常子宮内膜の新鮮組織

慶應義塾大学病院産婦人科において手術時に採取され、病理組織学的に確認された内膜症性嚢胞組織6例、正常子宮内膜新鮮組織11例 (増殖期内膜6例および分泌期内膜5例) を用いた。これらは無菌的に採取後、以後の実験に供するまで液体窒素中に保存した。

### 4. 卵巣子宮内膜症性嚢胞と正常子宮内膜のホルマリン固定パラフィン包埋組織

慶應義塾大学病院産婦人科において、子宮筋腫の診断で手術時に摘出された子宮より採取された正常子宮内膜組織24例、および子宮内膜症の診断で手術時に摘出され、病理組織学的に腺上皮の確認された内膜症性嚢胞組織38例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより4 μm厚の切片を作成し、材料とした。

### 5. ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株 HUOCA-II, ES-2, KK, RMG-I, RMG-II

HUOCA-II<sup>31)</sup>, ES-2<sup>32)</sup>, KK<sup>33)</sup>, RMG-I<sup>34)</sup>, RMG-II<sup>35)</sup> のいずれもヒト卵巣明細胞腺癌株を用いた。HUOCA-II, ES-2, KKは10%牛胎児血清 (三菱化学, 東京), カナマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 200 ng/ml およびストレプトマイシン (Invitrogen) 200

ng/ml 加 Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen)-Ham's F-12 培地 (Invitrogen), RMG-I, RMG-II は10%牛胎児血清およびカナマイシン 80 ng/ml 加 Ham's F-12 培地を用いて5%CO<sub>2</sub>存在下に37℃で培養し、対数増殖期後期にある細胞を最終濃度0.1%のトリプシン処理にて回収し実験に供した。

### 6. 卵巣明細胞腺癌 I 期症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織

1984年から1994年までに慶應義塾大学病院産婦人科において初回根治手術ならびに術後 platinum 製剤を含む化学療法を施行した I 期症例全32例の初回手術時に採取された腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより4 μm厚の切片を作成し、材料とした。

なお臨床情報、卵巣子宮内膜症性嚢胞内容液および腹水、卵巣子宮内膜症性嚢胞と正常子宮内膜の新鮮組織、ホルマリン固定パラフィン包埋組織、卵巣明細胞腺癌 I 期症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織の研究利用にあたり、患者本人もしくはその家族より同意を得た。

## 方 法

### 1. 臨床病理学的検討

卵巣明細胞腺癌全53例の病理組織標本を鏡検することによって、全53例を子宮内膜症の共存した卵巣明細胞腺癌 (共存群) と共存しない卵巣明細胞腺癌 (非共存群) に分類し、両群間の臨床病理学的因子を比較した。ここでいう子宮内膜症の共存とは「手術の摘出材料の病理学的検索によって子宮の漿膜面、卵巣、骨盤内腹膜に異所性子宮内膜が確認されたもの」のみを共存と定義した。

### 2. 免疫組織化学的染色

#### 1) TGFβ1 ならびに urokinase type-plasminogen activator (uPA)

キシレンによる脱パラフィンおよびエタノールによる親水化後、0.3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行なった。免疫組織染色は ABC (antibody-avidin/biotin complex with horseradish peroxidase) 法で行なった。1次抗体として rabbit 抗 TGFβ1 抗体 (sc-146, Santa cruz biotechnology, Santa cruz, CA, USA) ならびに goat 抗 uPA 抗体 (sc-6830, Santa cruz biotechnology) を100倍希釈で用い、それぞれ4℃で12時間インキュベーションした。

それぞれの2次抗体としてビオチン化 goat 抗 rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ならびにビオチン化 rabbit 抗 goat IgG (Vector Laboratories) を100倍希釈で用い、室温で30分インキュベーションした。最後に avidin-biotin-peroxydase complex (ABC 試薬; Vector Laboratories) にて室温で30分インキュベーションし、diaminobenzidine hydrogen (DAB; DAKO, Carpinteria, CA, USA) で発色させた後、ヘマトキシリンでカウンター染色を行なった。1次抗体を除いて上記行程を行なったものを陰性コントロールとした。標本中の腺上皮細胞もしくは腫瘍細胞の染色強度および染色範囲をそれぞれ3段階に分類し(前者を1+, 2+, 3+, 後者を5%未満, 5~50%, 50%以上), 染色強度が3+かつ染色範囲が50%以上のものを強陽性, それ以外を弱陽性と判定した。これらは同一名により盲目的に鏡検および判定された。

## 2) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

キシレンによる脱パラフィンおよびエタノールによる親水化後、0.3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行なった。PCNAの抗原性の賦活化を図るために、ウォーターバスを用いて0.1Mクエン酸緩衝液(pH6.0)中で120°C, 2時間インキュベーションした。免疫組織染色はABC法で行なった。1次抗体として mouse 抗 PCNA 抗体 clone PC-10 (NCL-PCNA, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) を100倍希釈で用い、4°Cで12時間インキュベーションした。2次抗体としてビオチン化 horse 抗 mouse IgG (Vector Laboratories) を100倍希釈で用い、室温で30分インキュベーションした。最後にABC試薬(Vector Laboratories)にて室温で30分インキュベーションし、DAB(Dako)で発色させた。また、ヘマトキシリンでカウンター染色を行なった。1次抗体を除いて上記行程を行なったものを陰性コントロールとした。染色標本中の任意の視野において腫瘍細胞1000個中の陽性核を示す細胞の割合、すなわち labeling index (L.I.) を算出し、比較した。これらは同一名により盲目的に鏡検および判定された。

## 3. TGFβ1の細胞増殖への影響

既出の血清入り培地で対数増殖期後期にあるHUOC A-II, ES-2, KK, RMG-I, RMG-IIを回収し、24穴プレート中にそれぞれ1×10<sup>3</sup>個播き、さらに同条件下で12時間培養後、各プレートにTGFβ1 (Sigma, St

Louis, MO, USA) を1 ng/mlの最終濃度になるように添加し培養した。なおTGFβ1は4 mM HCl・bovine serum albumin (1 mg/ml) (Sigma) で溶解し、使用時に0.1 volumeの1.44N NaOH・HEPES (10 mM, pH7.0) で中和し、上記濃度で添加した。48時間後に、2.5%グルタルアルデヒド(Wako, 大阪)にてプレート中の細胞を15分間固定し、0.05%クリスタルバイオレット(Wako)で15分染色後、水洗および風乾し、0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/dH<sub>2</sub>O・50%エタノールで抽出後、マイクロプレートリーダー(model 450; BIO-RAD, Hercules, CA, USA)による450 nmにおける吸光度にて細胞数を定量化した。またTGFβ1を加えずに上記行程を行なったものを対照とした。これらの実験を2回施行し、その平均値を算出した。

## 4. RNase protection assay (RPA)

TGFβ1, TGFβレセプターI型(TβRI)およびTGFβレセプターII型(TβRII)のmRNA発現はRiboQuant™ Multi-Probe RNase Protection Assay System (RiboQuant™; Pharmingen, San Diego, CA, USA)を用いて検討した。まず、RNeasy Mini Kit™ (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いてtotal RNAを抽出した。RiboQuant™の提供するプロトコールにのっとり、multi-probe template set (hCK-3; Pharmingen)のTGFβ1ならびにmulti-probe template set (hCR-4; Pharmingen)のTβRIおよびTβRIIの各cDNAを鋳型に、T7 RNAポリメラーゼ(PharMingen)によって*in vitro* transcriptionを行ない、<sup>32</sup>Pで標識したアンチ・センスRNAプローブを作成した。各組織または各培養細胞より抽出したtotal RNAとハイブリダイゼーションし、RNase cocktail (PharMingen)によって過剰なプローブおよび1本鎖RNAを分解し、5%変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、-80°C, 12時間のオートラジオグラフィを行ない、BAS2000(富士フィルム, 東京)でバンドの検出を行なった。この際、housekeeping geneであるglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAとL32 mRNAを内部標準とした。なおTGFβ1 mRNAに関しては、NIH image (free software)を用いて、得られたバンド強度とGAPDH mRNAのバンド強度を定量化し、その比(TGFβ1/GAPDH)を求め図示した。

## 5. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) および latex photometric immunoassay (LPIA)

TGFβ1 は、ヒトサイトカイン測定キット Quanti-  
kine™ (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), uPA  
は TintElize™ uPA (Biopool, Ventura, CA, USA) を  
用い、それぞれの定法による ELISA 法にて測定した。  
また plasmin/alfa-2 plasmin inhibitor complex  
(PIC) は LPIA-ACE PPI™ (Dia-iatron, 東京) を用い  
た LPIA 法にて測定した。

6. 統計学的解析

2 群間の平均値の比較は unpaired Student *t* 検定、  
もしくは  $\chi^2$  検定にて検討し、 $p < 0.05$  をもって有意差  
ありと判定した。

累積生存率は Kaplan-Meier 法により算出し log-  
rank 検定を行ない、 $p < 0.05$  をもって有意差ありと判  
定した。

結 果

1. 卵巣明細胞腺癌症例における子宮内膜症共存の臨床  
的意義

患者背景を第 1 表に示す。両群間の患者背景に有意差  
を認めなかった。全 53 例中共存群は 20 例、非共存群

第 1 表 卵巣明細胞腺癌患者全 53 例の臨床的背景

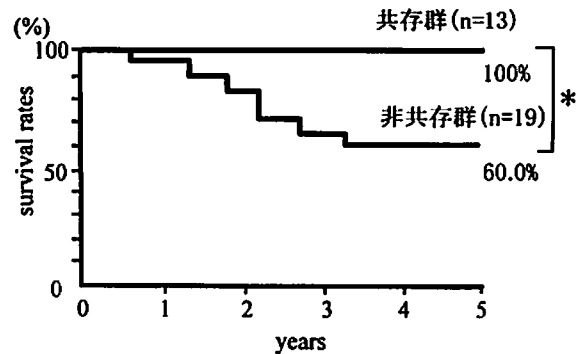
	共存群 (20 例)	非共存群 (33 例)
年齢 (歳)	48.7 ± 9.7	53.5 ± 10.9
主訴:		
下腹部痛	8 例 (40%)	13 例 (39.4%)
腹部膨満	7 例 (35%)	1 例 (3%)
腹部腫瘤	2 例 (10%)	13 例 (39.4%)
不正性器出血	3 例 (15%)	2 例 (6.1%)
帯下異常	0 例	2 例 (6.1%)
その他	0 例	2 例 (6.1%)
妊娠回数	0.8 ± 1.3	1.7 ± 1.4
血清 CA-125 (U/ml)	410.2 ± 798.0	443.8 ± 609.6
腫瘍径 (cm)	16.6 ± 5.1	13.9 ± 3.3
FIGO stage		
I 期	13 例 (65%)	19 例 (57.6%)
Ia	6 例 (30%)	5 例 (15.2%)
Ib	0 例	0 例
Ic	7 例 (35%)	14 例 (42.4%)
II 期	1 例 (5%)	2 例 (6.1%)
III 期	6 例 (30%)	9 例 (27.2%)
IV 期	0 例	3 例 (9.1%)

共存群：子宮内膜症共存卵巣明細胞腺癌例、非共存群：子宮内  
膜症非共存卵巣明細胞腺癌例 (Komiyama et al. Gynecol  
Oncol 72 : 342-346, 1999 の Table. 2 より許可を得て転載、  
一部改変)

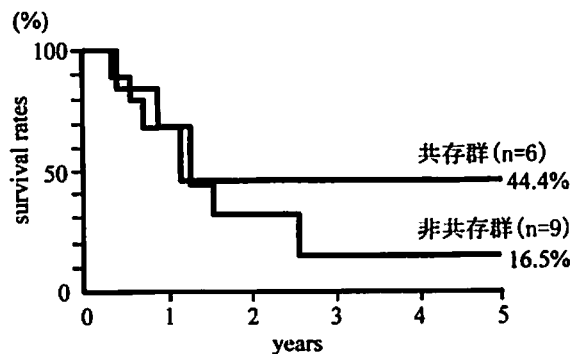
第 2 表 卵巣明細胞腺癌 Ic 期における腹腔内細胞診陽性例の  
頻度

Cytology	共存群	非共存群
陽性 (%)	1 (14.3%)*	9 (64.3%)*
陰性 (%)	6 (85.7%)	5 (35.7%)
計	7 (100%)	14 (100%)

$\chi^2$  test, \* :  $p = 0.023$  共存群：子宮内膜症共存卵巣明細胞腺  
癌例、非共存群：子宮内膜症非共存卵巣明細胞腺癌例  
(Komiyama et al. Gynecol Oncol 72 : 342-346, 1999 の  
Table. 4 より許可を得て転載、一部改変)

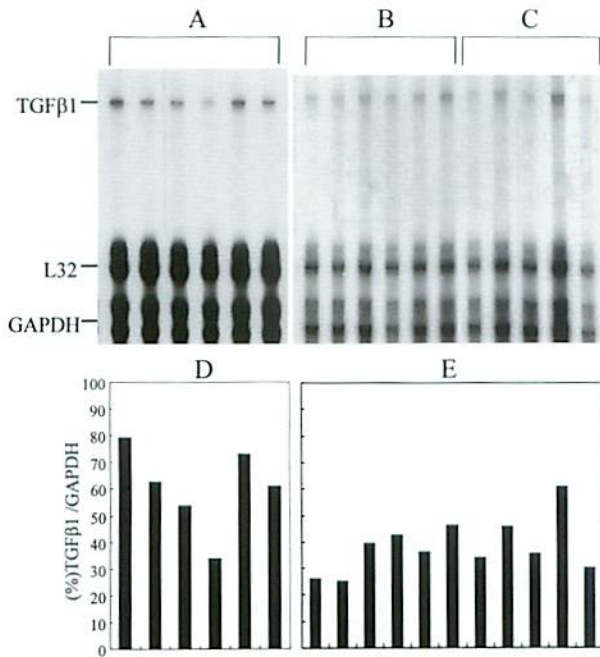


第 1 図 卵巣明細胞腺癌臨床進行期 I 期症例の子宮内膜症  
共存の有無による累積生存率の相違 (Kaplan-Meier 法)。  
子宮内膜症共存群の 5 年生存率 (100%) は非共存群の  
それ (60.0%) より予後良好であった (log-rank 検定、  
\* :  $p < 0.05$ )。共存群：子宮内膜症共存卵巣明細胞腺癌  
例 (13 例)、非共存群：子宮内膜症非共存卵巣明細胞腺癌  
例 (19 例)。(Komiyama et al. Gynecol Oncol 72 : 342-  
346, 1999 の Fig. 1 より許可を得て転載)

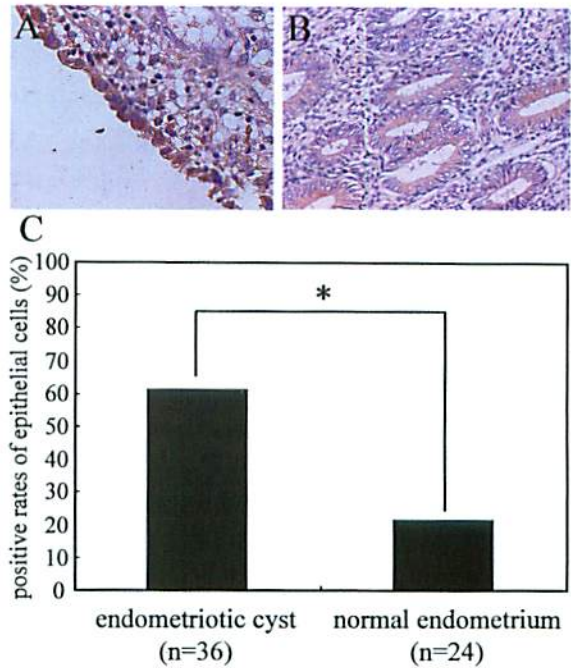


第 2 図 卵巣明細胞腺癌臨床進行期 III 期症例の子宮内膜症  
共存の有無による累積生存率の相違 (Kaplan-Meier 法)。  
子宮内膜症共存群の 5 年生存率 (44.4%) は非共存群の  
それ (16.5%) よりも予後良好の傾向を示した。共存群：  
子宮内膜症共存卵巣明細胞腺癌例 (6 例)、非共存群：子  
宮内膜症非共存卵巣明細胞腺癌例 (9 例)。(Komiyama  
et al. Gynecol Oncol 72 : 342-346, 1999 の Fig. 3 より  
許可を得て転載)

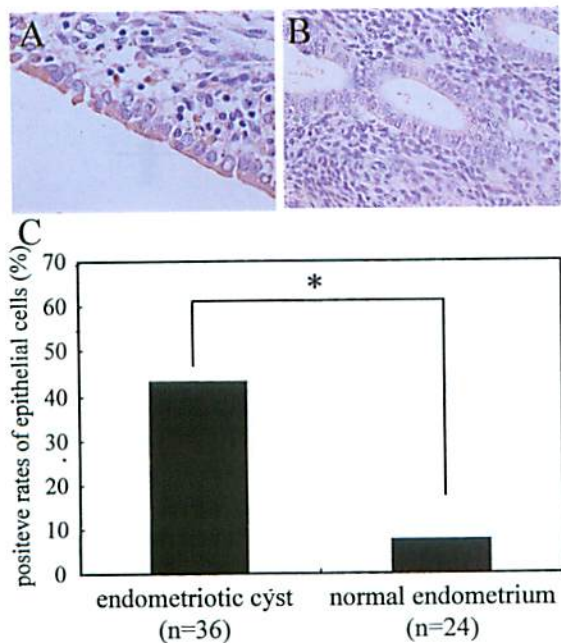




第3図 子宮内膜症性嚢胞および正常子宮内膜における TGFβ1 mRNA の発現 (RPA 法). housekeeping gene である GAPDH mRNA と L32 mRNA を内部標準とした. A. 子宮内膜症性嚢胞, B. 正常増殖期子宮内膜, C. 正常分泌期内膜. NIH image を用いて, 得られた TGFβ1 mRNA のバンド強度と GAPDH mRNA のバンド強度を定量化し, その比を求め図示した. 内膜症性嚢胞組織と正常子宮内膜組織のどちらにもその発現を認め, 内膜症性嚢胞組織での発現が正常内膜組織に比べやや亢進している傾向にあった (D). また増殖期と分泌期ではその発現に相違を認めなかった (E).



第4図 子宮内膜症性嚢胞および正常子宮内膜における TGFβ1 タンパクの発現 (免疫組織化学). 核はヘマトキシリンにて染色した. A. 子宮内膜症性嚢胞, B. 正常子宮内膜. A は強陽性例 (3+, 50%以上), B は弱陽性例 (1+, 5~50%) を示す. 内膜症性嚢胞および正常子宮内膜の両者とも主として腺上皮にその発現を認め, 強陽性である症例の割合は (C), 内膜症性嚢胞で高率であった ( $\chi^2$  検定, \*;  $p < 0.05$ ).



第5図 内膜症性嚢胞および正常正所性子宮内膜における uPA タンパクの発現 (免疫組織化学). 核はヘマトキシリンにて染色した. A. 子宮内膜症性嚢胞, B. 正常子宮内膜. A は強陽性例 (3+, 50%以上), B は弱陽性例 (1+, 5%未満) を示す. 正常子宮内膜腺上皮ではほとんど発現が認められなかったのに対し, 内膜症性嚢胞腺上皮では発現を認め, 強陽性である症例の割合は (C), 内膜症性嚢胞で高値を示した ( $\chi^2$  検定, \*;  $p < 0.05$ ).

は33例であり、子宮内膜症共存率は37.7%であった。特に症例の多いI期およびIII期に着目して、それぞれ両群間の相違を比較すると、症例数が最も多い割合を占めるI期において腹腔内細胞診陽性例の頻度は共存群において1例(14.3%)と有意に少なく(第2表)、さらにI期における共存群の累積5年生存率(100%)は非共存群のそれ(60%)より有意に良好であった(第1図)。また有意差は認めないもののIII期においても共存群が予後良好である傾向を認めた(第2図)。

## 2. 子宮内膜症性嚢胞および正常子宮内膜におけるTGFβ1の発現

TGFβ1 mRNAに関しては、内膜症性嚢胞組織と正常子宮内膜組織のどちらもその発現を認めたが、内膜症性嚢胞組織での発現(平均値±標準偏差; 60.6±16.0)が正常子宮内膜組織(38.4±10.4)に比べやや亢進している傾向にあった。また増殖期と分泌期ではその発現に相違を認めなかった(第3図)。

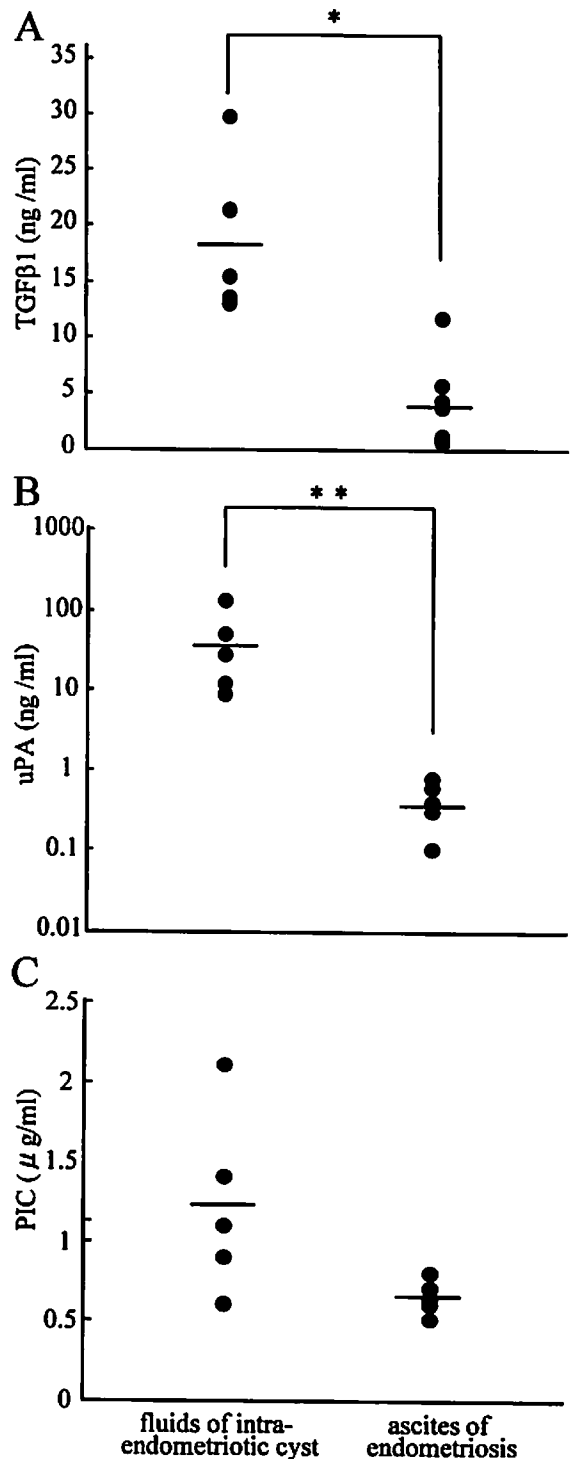
TGFβ1タンパクに関しては、内膜症性嚢胞および正常子宮内膜の両者とも主として腺上皮の細胞質にその発現を認め、さらに前者では間質の一部やマクロファージにも発現を認めた。抗体の免疫組織化学的反応性は正常子宮内膜では弱陽性が多いのに対し、内膜症性嚢胞では強陽性を示すものが多く、強陽性と判定された症例の割合は、それぞれ20.8%と60.5%と内膜症性嚢胞が有意に高率であった(第4図)。なお陰性コントロールでは陽性反応を認めなかった。

## 3. 内膜症性嚢胞および正常子宮内膜におけるuPAの発現

uPAタンパクは正常子宮内膜腺上皮ではほとんど発現が認められなかったのに対し、内膜症性嚢胞では主として腺上皮の細胞質でその発現を認め、染色強度が3+を示すものが多く、間質の一部やマクロファージにも弱い発現を認めた。内膜症性嚢胞腺上皮が強陽性と判定された症例の割合は、正常子宮内膜が7.1%であるのに対し、内膜症性嚢胞は42.9%と有意に後者が高値を示した(第5図)。なお陰性コントロールでは陽性反応を認めなかった。

## 4. 内膜症性嚢胞内容液および内膜症患者腹水中のTGFβ1ならびにuPA, PICの各濃度

内膜症性嚢胞中および内膜症患者腹水中のTGFβ1, uPA, PICの濃度(平均値±標準偏差)はTGFβ1がそれぞれ18.9±7.1 ng/ml, 2.9±2.2 ng/ml, uPAが45.

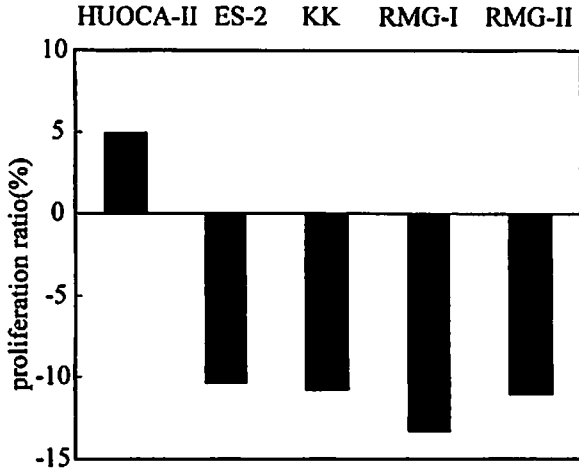


第6図 内膜症性嚢胞内容液および内膜症患者腹水中のTGFβ1ならびにuPA, PICの各濃度(ELISA法およびLPIA法)。A. TGFβ1, B. uPA, C. PIC. uPAは片対数表示した。内膜症性嚢胞内容液中および内膜症患者腹水中のTGFβ1, uPA, PICの濃度はいずれも内膜症性嚢胞内容液で高値を示し、TGFβ1, uPAは有意に高値を示した(unpaired Student *t*検定, \*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ )。

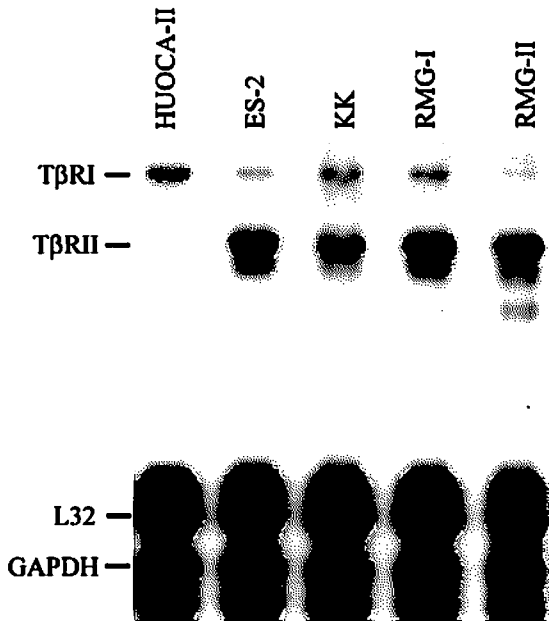
8 ± 49.8 ng/ml, 0.34 ± 0.6 ng/ml, PIC が 1.2 ± 0.67 μg/ml, 0.7 ± 0.2 μg/ml といずれも内膜症性囊胞内容液中の濃度が高値を示し, TGFβ1 と uPA は有意に高値を示した (第6図).

5. ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株 HUOCA-II, ES-2, KK, RMG-I, RMG-II に対する TGFβ1 の作用

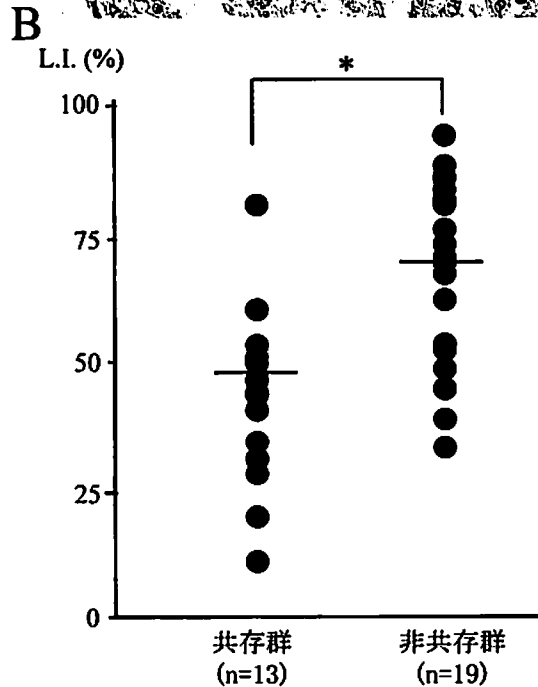
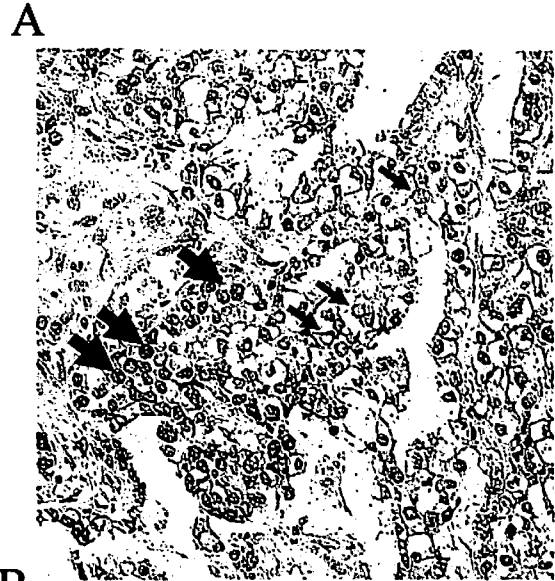
1 ng/ml の TGFβ1 の下で 48 時間培養したときのそれぞれの対照に対する細胞数の増減の割合は, 4.9%,



第7図 ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株 HUOCA-II, ES-2, K K, RMG-I, RMG-II に対する TGFβ1 の作用. 1 ng/ml の TGFβ1 の下で 48 時間培養したときの対照に対する細胞数の増減の割合は, HUOCA-II では増殖促進効果, その他の株では増殖抑制効果を示した.



第8図 ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株 HUOCA-II, ES-2, K K, RMG-I, RMG-II における TGFβレセプター I 型および II 型発現 (RPA 法). housekeeping gene である GAPDH mRNA と L32 mRNA を内部標準とした. TβRI はすべてのヒト卵巣明細胞腺癌細胞株で, TβRII は HUOCA-II を除くすべての細胞株において, その発現が確認された.



第9図 卵巣明細胞腺癌 I 期症例における PCNA 発現 (免疫組織化学). 核はヘマトキシリンにて染色した. A に典型的な染色像を示す (Labeling index 84%). 太矢印は陽性細胞, 細矢印は陰性細胞を示す. 共存群: 子宮内膜症共存卵巣明細胞腺癌例, 非共存群: 子宮内膜症非共存卵巣明細胞腺癌例. B. 共存群の Labeling index (L.I.) は非共存群のそれより低値であった (unpaired Student t 検定, \* : p < 0.05).

-10.3%, -10.7%, -13.2%, -10.9%となり, HUOCA-II では増殖促進効果, その他の株では増殖抑制効果を示した(第7図)。

#### 6. ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株 HUOCA-II, ES-2, KK, RMG-I, RMG-II における TGFβ レセプター I 型 (TβRI) および II 型 (TβRII) の発現

RPA の結果, TβRI はすべてのヒト卵巣明細胞腺癌細胞株で, TβRII は HUOCA-II を除くすべての細胞株において, その発現が確認された(第8図)。

#### 7. 卵巣明細胞腺癌 I 期症例における PCNA 発現

全 32 例で検討可能であった。これらは共存群 13 例, 非共存群 19 例に分類された。L.I. (平均値±標準偏差) の比較の結果, 共存群のそれ (46.4±23.1%) は非共存群のそれ (63.9±20.7%) より有意に低値であった(第9図)。

### 考 察

卵巣明細胞腺癌は表層上皮性卵巣癌の一組織型であるものの, 多くの点で他の表層上皮性卵巣癌と異なることが知られている。その相違点は, (1) 明細胞腺癌症例の多くは I 期で発見されるが, その予後は他の表層上皮性卵巣癌 I 期症例より明らかに不良であること<sup>9, 36, 42)</sup>, (2) platinum 製剤や taxane 製剤を含む卵巣癌一般に対する従来の化学療法に自然耐性を有している症例が少なくないこと<sup>14, 37, 43)</sup>, (3) 良性や境界悪性の範疇に属する例がほとんど存在しないこと<sup>12)</sup>, (4) 他の組織型においては予後を規定する因子と考えられている組織分化度の基準があてはまらないこと<sup>9)</sup>, (5) 血栓塞栓症や高カルシウム血症の合併が多いこと<sup>12)</sup>, (6) 子宮内膜症と共存することが多いこと<sup>12)</sup>, などである。これらは代表的な表層上皮性卵巣癌である, 漿液性腺癌, 粘液性腺癌, 類内膜腺癌とは大きく異なり, とりわけ最も患者数の多い漿液性腺癌とは明らかに異なる特徴といえる。また近年のマイクロアレイ技術を用いた解析により遺伝子発現プロファイルが他の組織型と大きく異なることも報告されており<sup>44)</sup>, その特殊性が示唆される。ここで注目すべき点は子宮内膜症と共存する頻度が他の組織型よりも高率であるという点であり, これまでの諸家の報告によれば卵巣明細胞腺癌における子宮内膜症の共存率は約 20~50%とされ, 漿液性腺癌のそれ (約 3%)<sup>12, 14)</sup> と比較すると著明に高率であり, 看過できない頻度である。

従来から卵巣明細胞腺癌と子宮内膜症の関連については諸家により報告されてきたが, それらは「子宮内膜症が明細胞腺癌の前癌病変である」という histogenetic な観点からの報告であり, 子宮内膜症の共存の有無により生物学的特性が異なるという指摘や両者の共存による相互作用という観点からの報告はない。

そこで卵巣明細胞腺癌と子宮内膜症の共存に関する臨床病理学的検討を行なった結果, 内膜症共存の有無により (1) I 期の微小腹腔内進展と考えられる腹腔内細胞診陽性の頻度が異なる点, (2) 根治手術ならびに術後 platinum 製剤を含む化学療法を施行した I 期症例において共存群の予後は良好である, という結果が得られ, 子宮内膜症共存の有無が卵巣明細胞腺癌の生物学的特徴を規定する因子になりうる可能性を示した<sup>45, 46)</sup>。

一方, 子宮内膜症もその病因病態に関しては不明な点が多いが, 近年の研究により TGFβ1<sup>15, 19)</sup>, tumor necrotic factor-α (TNFα)<sup>18)</sup>, interleukin-6 (IL6)<sup>20, 22)</sup>, interleukin-8 (IL8)<sup>23, 25)</sup>などの各種サイトカインが子宮内膜症の病態に関与していることが多数報告されている。これらは微量であっても, autocrine や paracrine 作用によって腹腔内環境全体におよぶダイナミックな変化を引き起こすことが知られている。

この中でわれわれは TGFβ1 というサイトカインに着目した。われわれの preliminary な実験において, 前述の 4 つの代表的なサイトカイン (TGFβ1, TNFα, IL6, IL8) のうち, 卵巣明細胞腺癌細胞株 RMG-I に対して増殖抑制効果を発揮したのは TGFβ1 と TNFα であり, とりわけ TGFβ1 の増殖抑制作用が顕著であったことと (未発表データ), 加えて TGFβ1 はさまざまな細胞より産生放出され, 上皮性細胞に対して強力な細胞増殖抑制作用を有することが知られているからである。そして TGFβ1 による増殖抑制から逸脱することにより無軌道な細胞増殖を生み, 多段階発癌のひとつのステップになることが広く知られているからである<sup>29), 47, 48)</sup>。

そこで筆者らは子宮内膜症由来の TGFβ1 が卵巣明細胞腺癌に影響をおよぼしているのではないかと, との仮説のもとに本研究を開始した。

まず内膜症性嚢胞組織における TGFβ1 発現を mRNA およびタンパクレベルで検討した。その結果, 正常子宮内膜組織を対照として比較したところ, 内膜症性嚢胞での発現が亢進している傾向にあった。免疫組織化学的にその局在は主として腺上皮に認められ, 腺上皮で発現の亢進している組織の割合は有意に内膜症性嚢胞で多かった。

さらに内膜症性嚢胞内容液中の TGFβ1 を測定し, 同

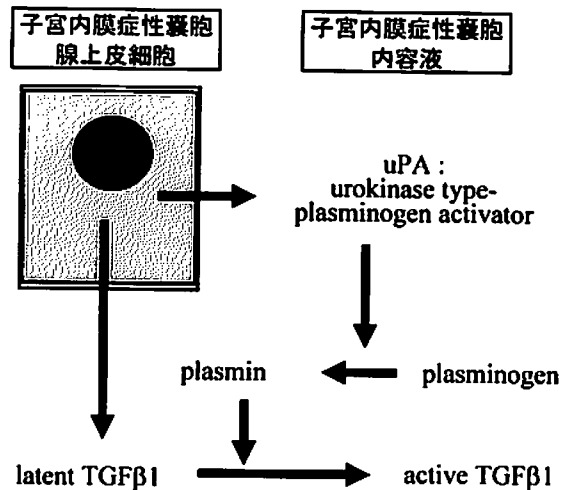
じ内膜症患者腹水中のそれと比較したところ、有意に前者が高値を示した。従来から内膜症性嚢胞における TGFβ1 産生は主として腺上皮細胞という報告とその間質という報告に分かれており、未だ議論の多いところである<sup>49, 50)</sup>。また内膜症患者腹水中の TGFβ1 濃度は正常患者腹水中のそれよりも高値を示すことも知られている<sup>15), 19)</sup>。免疫組織化学的に TGFβ1 は内膜症性嚢胞腺上皮に主たる発現を認め、さらには内膜症性嚢胞内容液中に腹水をはるかに越える濃度の TGFβ1 が存在していることを考慮すれば、やはり腺上皮細胞から産生放出されていると考えてよいと思われる。そして嚢胞内腔のみならず、その間質、さらには嚢胞被膜を越えて腹水中に放出されていると推測できる。

しかしながら、TGFβ1 がその機能を発揮するためには局所における活性化機構の存在が必須である。mRNA から翻訳され細胞から放出されるのは潜在型 TGFβ1 であるが、これは分子量 100 kd の 2 量体で、これが切断されて 25 kd の 2 量体の活性型となり、実際に TGFβ1 としての機能を発揮する<sup>27, 28)</sup>。しかし一般に活性型 (active) TGFβ1 は非常に失活しやすいタンパクであることが知られており、安定した定量化システムが確立されておらず、通常は潜在型 (latent) TGFβ1 と活性型 TGFβ1 の両者、すなわち whole TGFβ1 を測定することが多い。

一方、TGFβ1 の活性化機構に関しては、*in vitro* では酸やアルカリ、高温による活性化機構が、*in vivo* では様々な酵素による活性化機構が存在することが知られている<sup>27, 28)</sup>。その代表的な酵素にプラスミンがある。プラスミンは生体内では安定して存在することができず、α2-plasmin inhibitor との複合体 (PIC: plasmin/α2-plasmin inhibitor complex) を形成する。このプラスミンは uPA によりプラスミノゲンからプラスミンに活性化されることが知られている<sup>31)</sup>。しかしながら、子宮内膜症における TGFβ1 の活性化機構についての報告はこれまでのところない。そこでわれわれは内膜症性嚢胞においてこの uPA とプラスミンの存在を検討した。

その結果、uPA、PIC ともに内膜症性嚢胞内容液中で高値を示し、内容液中での TGFβ1 活性化機構の存在が示唆された。また uPA は主として内膜症性嚢胞の腺上皮細胞で発現しており、正常子宮内膜組織との比較では、腺上皮での発現の亢進している組織の割合は有意に内膜症性嚢胞で多かった。

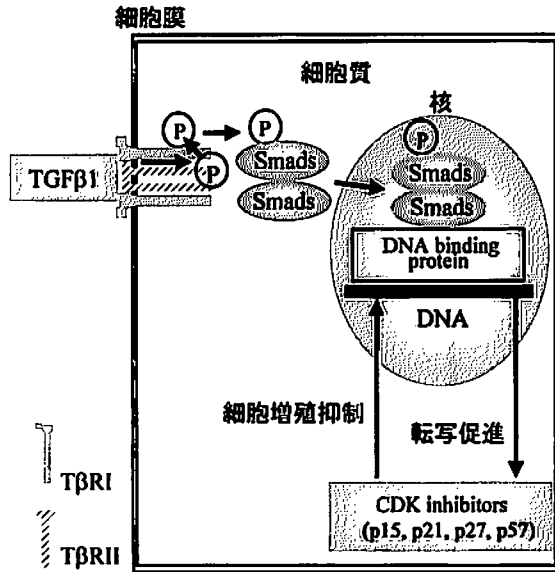
以上の結果より、子宮内膜症の局所環境では腺上皮からの TGFβ1 の産生が亢進するだけでなく uPA の産生も亢進し、プラスミノゲンの活性化を介してプラスミ



第 10 図 子宮内膜症性嚢胞の局所環境における TGFβ1 の活性化機構を中心とした特性。子宮内膜症性嚢胞の腺上皮からの TGFβ1 の産生が亢進するだけでなく uPA の産生も亢進し、プラスミノゲンの活性化を介してプラスミンによる TGFβ1 の活性化がおり、活性型 TGFβ1 が増加しやすい環境にあると考えられた。

ンによる TGFβ1 の活性化がおり、活性型 TGFβ1 が増加しやすい環境にあると考えられた (第 10 図)。

つぎに実際に卵巣明細胞腺癌細胞が TGFβ1 による影響を受けるか否か、卵巣明細胞腺癌細胞株を用いて検討した。ここで重要なのは、活性化された TGFβ1 が機能するためには標的細胞上にレセプターが存在しなければならないことである。一般に TGFβ1 のレセプターは 3 種類知られているが、そのうち細胞表面で直接シグナル伝達機構に関与しているのは TβRI と TβRII の 2 種類のセリン/スレオニン・カイネース型レセプターである。これらはそれぞれが 2 量体を形成したヘテロ 4 量体を形成することによって機能することが知られている<sup>52, 53)</sup>。活性化された TGFβ1 はまず細胞表面の TβRII に結合し、それによって TβRII の細胞内ドメインがリン酸化され、さらに TβRI の細胞内ドメインもリン酸化され細胞内にシグナルを伝える。細胞内ではレセプターからリン酸化のシグナルをうけとり活性化された Smad と呼ばれる一群のタンパク (Smad2, Smad3, Smad4) が複合体を形成して核内に移行し、DNA に結合することによって各種標的遺伝子の転写を促進する<sup>54, 56)</sup>。その結果、TGFβ1 によって誘導される代表的な分子としては、細胞周期を抑制する p15, p21, p27, p57 などをはじめとする各種 cyclin-dependent kinase (CDK) インヒビターが知られている<sup>57-64)</sup>。これらは細胞周期が G1 期



第11図 TGFβ1とそのレセプターを介したシグナル伝達機構と細胞増殖抑制効果。活性化されたTGFβ1はまず細胞表面のTGFβレセプターII型(TβRII)に結合し、それによってTGFβレセプターI型(TβRI)がリン酸化され細胞内にシグナルを伝える。細胞内ではレセプターからリン酸化のシグナルをうけとり活性化されたSmad(Smad2, Smad3, Smad4)が複合体を形成して核内に移行し、DNAに結合することによって、各種cyclin-dependent kinase(CDK)インヒビターなどの標的遺伝子の転写を促進する。その結果、細胞周期がG1期からS期に移行するのを抑制し、細胞増殖抑制効果が発揮される。

からS期に移行するのを抑制し細胞増殖抑制効果を発揮する(第11図)。

5種類の卵巣明細胞腺癌株を用いて検討した結果、HUOCA-IIを除くすべての株で増殖抑制効果を示し、とりわけRMG-Iの増殖抑制効果が顕著であった。そしてこれらの細胞株におけるTβRIおよびTβRIIのmRNA発現を検討したところ、HUOCA-IIを除くすべての株でこれら2つのレセプターの発現が確認され、HUOCA-IIではTβRIのみの発現が確認された。

TGFβレセプターは様々な固形癌においてその発現もしくは機能異常が癌の増殖や進展のearly eventのひとつとなりうると報告され、いわゆる癌抑制遺伝子と認識されている<sup>79), 48)</sup>。とくにTβRIIは各種固形癌での異常が指摘されている<sup>65-71)</sup>。しかしながら、これまで卵巣癌におけるTGFβレセプターの遺伝子異常に関しては否定的な報告が多く<sup>72-75)</sup>、さらにレセプター下流のシグナル伝達系異常も少ないとの報告もある<sup>72), 76)</sup>。HUOCA-II

のようにTβRIIの発現異常を認め、TGFβ1の増殖抑制から逸脱する細胞株も存在していることから、すべての例において本考察が該当するものではないが、卵巣明細胞腺癌細胞ではTβRIおよびTβRIIの両者が発現していた場合、その下流のシグナル伝達が機能しTGFβ1による増殖抑制効果が発揮されることが示唆された。

最後に実際の症例でありかつ臨床病理学的検討によって子宮内膜症の共存の有無によって予後を含む生物学的特性が異なることが指摘されていた卵巣明細胞腺癌I期の組織を用いて、PCNA発現を指標とした癌細胞の細胞増殖能を検討したところ、子宮内膜症共存群では非共存群に比し有意に増殖能が低いことが判明し、これまでの実験結果を裏付ける結果となった。I期ということ踏まえるならば、卵巣明細胞腺癌の早期、すなわち癌が比較的限局している場合、子宮内膜症の共存によって近傍に存在する明細胞腺癌細胞に対するTGFβ1のparacrineを介した細胞増殖抑制効果が発揮され、結果的に共存の有無による生物学的特性の違いが生じていると推察された。

## 総括

卵巣明細胞腺癌患者における子宮内膜症共存の頻度は、他の表層上皮性卵巣癌患者におけるそれに比較し高い。本研究では卵巣明細胞腺癌症例を子宮内膜症共存群と非共存群に分類し、臨床病理学的に比較するとともに、子宮内膜症の共存が卵巣明細胞腺癌の生物学的特性にいかなる影響を与えるか検討した。その結果、

1. 卵巣明細胞腺癌I期症例において、子宮内膜症共存の有無によって累積生存率の相違を比較したところ、共存群が非共存群に比較して有意に予後良好であった。またIII期症例においても同様の傾向が認められた。
2. 子宮内膜症の局所環境においてはTGFβ1の産生が亢進しているだけでなく、uPAの産生も亢進していることにより、プラスミノゲンから活性化されたプラスミンによってTGFβ1が活性化を受け、活性型TGFβ1が増加しやすい環境にあると推察された。
3. 活性化されたTGFβ1は卵巣明細胞腺癌細胞に増殖抑制効果を発揮し、その際にはTβRIおよびTβRII発現、とりわけ後者の重要性が示唆された。
4. 卵巣明細胞腺癌の早期癌症例において、子宮内膜症共存群では癌細胞の増殖が抑制されており、TGFβ1によるparacrine作用の影響である可能性が示唆された。その結果として同患者の予後に影響をおよぼしているも



のと考えられた。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 野澤志朗教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導いただきました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室青木大輔講師に心より感謝致します。

本論文の一部は、第7回 Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (1997年, Fukuoka, Japan), 第50回日本産科婦人科学会学術講演会 (1998年, 仙台), 第57回日本癌学会総会 (1998年, 横浜), 第36回日本癌治療学会総会 (1998年, 福岡), 第51回日本産科婦人科学会学術講演会 (1999年, 東京), 第6回 Japan-China Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (2000年, Tokyo, Japan), 第9回 Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (2001年, Seoul, Korea) において発表した。

## 文 献

- 1) Scully RE, Young RH, Clement PB : Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament. (Ed) Rosai J, Atlas of Tumor Pathology, 3rd series, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., p.141-151, 1996
- 2) Russel P : Surface Epithelial-Stromal Tumor of the Ovary, (Ed) Kurman RJ, Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, 4th ed, Springer-Verlag, New York, p. 752-762, 1995
- 3) Scully RE, Barlos JF : "mesonephroma" of the ovary : tumor of the Mullerian nature related to endometrioid carcinoma. *Cancer* 20 : 1405-1417, 1967
- 4) Aure JC, Hoeg K, Kolstad P : Carcinoma of the ovary and endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 50 : 63-67, 1971
- 5) Kurman RE, Craig JM : Endometrioid and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer* 20 : 1653-1664, 1972
- 6) Mostoufizadeh M, Scully RE : Malignant tumor arising in endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 23 : 951-963, 1980
- 7) Montag AG, Jenison EL, Griffiths CT, Welch WR, Lavin PT, Knapp RC : Ovarian clear cell carcinoma. A clinicopathologic analysis of 44 cases. *Int J Gynecol Pathol* 8 : 85-96, 1989
- 8) Vercellini P, Parazzini F, Bolis G, Carinelli S, Dindelli M, Vendola N, Luchini L, Crosignani PG : Endometriosis and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 169 : 181-182, 1993
- 9) Cuesta RS, Eichhorn JH, Rice LW, Fuller AF, Nikrui N, Goff AG : Histologic transformation of benign endometriosis to early epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 60 : 238-244, 1996
- 10) Goff BA, Sainz de la Cuesta R, Muntz HG, Fleischhacker D, Ek M, Rice LW, Nikrui N, Tamimi HK, Cain JM, Greer BE, Fuller AF Jr : Clear cell carcinoma of the ovary : a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease. *Gynecol Oncol* 60 : 412-417, 1996.
- 11) Erzen M, Rakar S, Klancnik B, Syrjanen K, Klancar B : Endometriosis-associated ovarian carcinoma (EAOC) : an entity distinct from other ovarian carcinomas as suggested by a nested case-control study. *Gynecol Oncol* 83 : 100-108, 2001
- 12) Modesitt SC, Tortolero-Luna G, Robinson JB, Gershenson DM, Wolf JK : Ovarian and extraovarian endometriosis-associated cancer. *Obstet Gynecol* 100 : 788-795, 2002
- 13) Jimbo H, Yoshikawa H, Onda T, Yasugi T, Sakamoto A, Taketani Y : Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 59 : 245-250, 1997
- 14) Fukunaga M, Nomura K, Ishikawa E, Ushigome S : Ovarian atypical endometriosis : its close association with malignant epithelial tumours. *Histopathology* 30 : 249-255, 1997
- 15) Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx P R : Transforming growth factor- $\beta$  activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 83 : 287-292, 1994
- 16) Whitworth CM, Mulholland J, Dunn RC, Glasser SR : Growth factor effects on endometrioid epithelial cell differentiation and protein synthesis *in vitro*. *Fertil Steril* 61 : 91-96, 1994
- 17) Badawy SZ, Cuenca V, Kumar S, Holland J : Effect of chocolate cyst fluid on endometrioma cell growth in culture. *Fertil Steril* 70 : 827-830, 1998
- 18) Terakawa N, Harada T : Effect of medical treatment on active lesions of peritoneal endometriosis, (Ed) Minaguchi H, Endometriosis today, The Parthenon Publishing Group, London, p. 329-333, 1997
- 19) Kupker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K : Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 4 : 719-723, 1998
- 20) Rier SE, Parsons AK, Becker JL : Altered interleukin-6 production by peritoneal leukocytes from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 61 : 294-299, 1994
- 21) Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R : Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 174 : 1522-1526, 1996
- 22) Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock

- ED, Landers DV, Taylor RN : Interleukin-6 secretion *in vitro* is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 1118-1122, 1996
- 23) Ryan IP, Tseng JF, Schriock ED, Khorram O, Landers DV, Taylor RN : Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 63 : 929-932, 1995
- 24) Arici A, Tazuke SI, Attar E, Kliman HJ, Olive DL : Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod* 2 : 40-45, 1996
- 25) Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Onohara Y, Terakawa N : Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 69 : 924-930, 1998
- 26) Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA : TGF- $\beta$  stimulation and inhibition of cell proliferation : New mechanistic insights. *Cell* 63 : 245-247, 1990
- 27) Sporn MB, Roberts AB : Peptide growth factors and their receptors, part I & II. Springer-Verlag, Berlin, 1990
- 28) Miyazano K, Ichijo H, Heldin CH : Transforming growth factor- $\beta$  : latent form, binding proteins and receptors. *Growth Factors* 8 : 11-22, 1993
- 29) Caestecker MP, Piek E, Roberts AB : Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 92 : 1388-1402, 2000
- 30) Behrs OH, Henson DE, Hutter RV, Kennedy BJ : Manual for staging of cancer, 4th ed. JB Lippincott company, Philadelphia, 1992
- 31) Ishiwata I, Ishiwata C, Soma M, Ishikawa H : Establishment of HUOCA-II, a human ovarian clear cell adenocarcinoma cell line, and its angiogenic activity. *J Natl Cancer Inst* 78 : 667-673, 1987
- 32) Lau DH, Lewis AD, Ehsan MN, Sikic BI : Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Res* 51 : 5181-5187, 1991
- 33) Kikuchi Y, Oomori K, Kizawa I, Kato K : Effects of cimetidine on tumor growth and immune function in nude mice bearing human ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 74 : 495-498, 1985
- 34) Nozawa S, Tsukazaki K, Sakayori M, Jeng CH, Iizuka R : Establishment of a human ovarian clear cell carcinoma cell line (RMG-I) and its single cell cloning with special reference to the stem cell of the tumor. *Hum Cell* 1 : 426-435, 1988
- 35) Nozawa S, Yajima M, Sasaki H, Tsukazaki K, Aoki D, Sakayori M, Udagawa Y, Kobayashi T, Sato I, Furusako S : A new CA125-like antigen (CA602) recognized by two monoclonal antibodies against a newly established ovarian clear cell carcinoma cell line (RMG-II). *Jpn J Cancer Res* 82 : 854-61, 1991
- 36) Crozier MA, Copeland LJ, Silva EG, Gershenson DM, Stringer CA : Clear cell carcinoma of the ovary : a study of 59 cases. *Gynecol Oncol* 35 : 199-203, 1989
- 37) O'Brien MER, Schofield JB, Tan S : Clear cell epithelial ovarian cancer (Mesonephroid) : Bad prognosis only in early stages. *Gynecol Oncol* 49 : 250-254, 1993
- 38) Behbakht K, Randall TC, Benjamin I, Morgan MA, King S, Rubin SC : Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 70 : 255-258, 1998
- 39) Kennedy AW, Markman M, Biscotti CV, Emery JD, Rybicki LA : Survival probability in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 74 : 108-114, 1999
- 40) Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K : Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary : a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 88 : 2584-2589, 2000
- 41) Sakuragi N, Yamada H, Oikawa M, Okuyama K, Fujino T, Sagawa T, Fujimoto S : Prognostic significance of lymph node metastasis and clear cell histology in ovarian carcinoma limited to the pelvis (pT1M0 and pT2M0). *Gynecol Oncol* 79 : 251-255, 2000
- 42) Kita T, Kikuchi Y, Kudoh K, Takano M, Goto T, Hirata J, Tode T, Nagata I : Exploratory study of effective chemotherapy to clear cell carcinoma of the ovary. *Oncol Rep* 7 : 327-331, 2000
- 43) Itamochi H, Kigawa J, Sugiyama T, Kikuchi Y, Suzuki M, Terakawa N : Low proliferation activity may be associated with chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol* 100 : 281-287, 2002
- 44) Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Quick R, Michailidis G, Taylor JM, Misek DE, Wu R, Zhai Y, Darrach DM, Reed H, Ellenson LH, Giordano TJ, Fearon ER, Hanash SM, Cho KR : Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res* 62 : 4722-4729, 2002
- 45) Komiyama S, Aoki D, Udagawa Y, Saito E, Tominaga E, Susumu N, Nozawa S : A study on ovarian clear cell carcinoma associated with pelvic endometriosis. *Int J Gynecol Cancer* 7 : 78, 1997
- 46) Komiyama S, Aoki D, Tominaga E, Susumu N, Udagawa Y, Nozawa S : Prognosis of Japanese patients with ovarian clear cell carcinoma associated with pelvic endometriosis : clinicopathologic evaluation. *Gynecol Oncol* 72 : 342-346, 1999
- 47) Massagué J : TGF $\beta$  signaling : receptors, transduc-



- ers, and mad proteins. *Cell* 85 : 947-950, 1996
- 48) Markowitz SD, Roberts AB : Tumor suppressor activity of the TGF- $\beta$  pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 7 : 93-102, 1996
  - 49) Chegini N, Gold LI, Williams RS : Localization of transforming growth factor beta isoforms TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in surgically induced endometriosis in the rat. *Obstet Gynecol* 83 : 455-461, 1994
  - 50) Tamura M, Fukaya T, Enomoto A, Murakami T, Uehara S, Yajima A : Transforming growth factor-beta isoforms and receptors in endometriotic cysts of the human ovary. *Am J Reprod Immunol* 42 : 160-167, 1999
  - 51) Flaumenhaft R, Kojima S, Abe M, Rifkin DB : Activation of latent transforming growth factor  $\beta$ . *Adv Pharmacol* 24 : 51-76, 1993
  - 52) Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF : Expression cloning of the TGF- $\beta$  type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68 : 775-785, 1992
  - 53) Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, Miyazono K : Cloning of a TGF $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF $\beta$  type II receptor. *Cell* 75 : 681-692, 1993
  - 54) Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wraana JL : MADR2 is a substrate of the TGF $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87 : 1215-1224, 1996
  - 55) Zhang Y, Feng XH, Wu RY, Derynck R : Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- $\beta$  response. *Nature* 383 : 168-172, 1996
  - 56) Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P : TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390 : 465-471, 1997
  - 57) Hannon GJ, Beach D : Protein, Nucleotide p15/*INK4B* is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371 : 257-261, 1994
  - 58) Li JM, Nichols MA, Chandrasekharan S, Xiong Y, Wang XF : Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15/*INK4B* through an Sp1 consensus site. *J Biol Chem* 270 : 26750-26753, 1995
  - 59) Li CY, Suardet L, Little JB : Potential role of WAF1/Cip1/p21 as a mediator of TGF-beta cytoinhibitory effect. *J Biol Chem* 270 : 4971-4974, 1995
  - 60) Datto MB, Yu Y, Wang XF : Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* 270 : 28623-28628, 1995
  - 61) Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A : p27*Kip1*, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8 : 9-22, 1994
  - 62) Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J : Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9 : 1831-1845, 1995
  - 63) Urano T, Yashiroda H, Muraoka M, Tanaka K, Hosoi T, Inoue S, Ouchi Y, Toyoshima H : p57(Kip2) is degraded through the proteasome in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor beta1. *J Biol Chem* 274 : 12197-12200, 1999
  - 64) Nagahara H, Ezhevsky SA, Vocero-Akbani AM, Kaldis P, Solomon MJ, Dowdy SF : Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E : cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 14961-14966, 1999
  - 65) Yamada N, Kato M, Yamashita H, Nister M, Miyazono K, Heldin CH, Funahashi K : Enhanced expression of transforming growth factor- $\beta$  and its type-I and type-II receptor in human glioblastoma. *Int J Cancer* 62 : 386-392, 1995
  - 66) Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun LZ, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Willson JKV : Inactivation of the type II TGF- $\beta$  receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268 : 1336-1338, 1995
  - 67) Myeroff LL, Parsons R, Kim S-J, Hedrick L, Cho KR, Orth K, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K, Bang Y-J, Lee HY, Park J-G, Lynch HT, Roberts AB, Vogelstein B, Markowitz SD : A transforming growth factor  $\beta$  receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 55 : 5545-5547, 1995
  - 68) Parsons R, Myeroff L, Liu B, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B : Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 55 : 5548-5550, 1995
  - 69) Garrigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Vellucci VF, Reiss M : Missense mutations of the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 55 : 3982-3987, 1995
  - 70) Takenoshita S, Tani M, Nagashima M, Hagiwara K, Bennett WP, Yokota J, Harris CC : Mutation analysis of coding sequences of the entire transforming growth factor  $\beta$  type II receptor gene in sporadic human colon cancer using genomic DNA and intron primers. *Oncogene* 14 : 1255-1258, 1997
  - 71) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE : Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57 : 1731-1734, 1997

- 72) Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y, Takenoshita S : Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor- $\beta$  signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res* 60 : 4507-4512, 2000
- 73) Hu W, Wu W, Nash MA, Freedman RS, Kavanagh JJ, Verschraegen CF : Anomalies of the TGF- $\beta$  postreceptor signaling pathway in ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res* 20 : 729-733, 2000
- 74) Manderson EN, Mes-Masson AM, Provencher D, Tonin PN : Mutations in a 10-bp polyadenine repeat of transforming growth factor beta-receptor type II gene is an infrequent event in human epithelial ovarian cancer. *Clin Genet* 57 : 151-153, 2000
- 75) Alvi AJ, Rader JS, Broggin M, Latif F, Maher ER : Microsatellite instability and mutational analysis of transforming growth factor beta receptor type II gene (TGFBR2) in sporadic ovarian cancer. *Mol Pathol* 54 : 240-243, 2001
- 76) Wang D, Kanuma T, Mizumuma H, Ibuki Y, Takenoshita S : Mutation analysis of the Smad6 and Smad7 gene in human ovarian cancers. *Int J Oncol* 17 : 1087-1091, 2000
-

学位論文

Single-stranded conformational polymorphism 法を用いた  
高感度 HPV 重感染検出法の開発

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

なか がわ ひろ ゆき  
中 川 博 之

(平成 16 年 10 月 19 日受付)

Key Words : human papillomavirus, cervical neoplasia, single-stranded conformational polymorphism

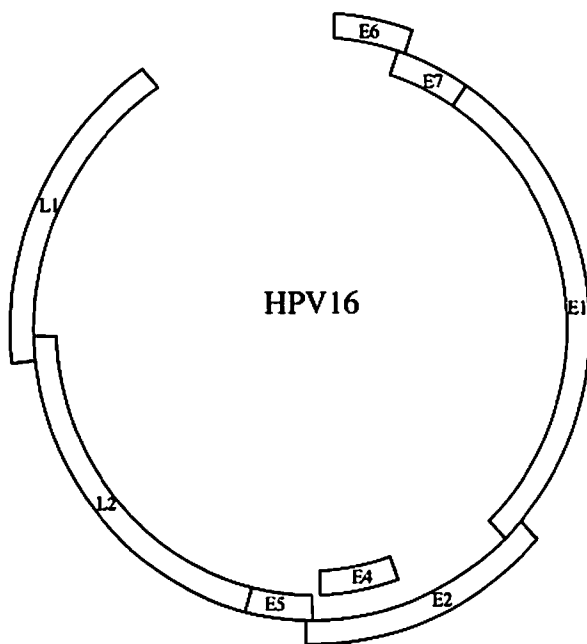
子宮頸癌は、古くからの疫学的検討により、初交年齢が低い、本人あるいは夫の性的パートナーの数が多い、性感染症の既往がある、などの危険因子をもつ女性に多く見られることから、子宮頸部の発癌には性行為によって感染する何らかの因子が関与すると推定されていた。1980 年代になり分子生物学的手法が発達するにつれ、異形成あるいは子宮頸癌組織でヒトパピローマウイルス (human papillomavirus) (以下、HPV) が高率に検出されることが報告され、HPV が子宮頸部における発癌因子の一つとして認識されるようになった<sup>2)~6)</sup>。HPV は、そのゲノムとして約 8000 塩基対の環状 2 本鎖 DNA をもつウイルス (第 1 図) で、皮膚や粘膜の細胞に感染する。ウイルスの遺伝子としては初期遺伝子として E1 から E7 があり、これらはウイルス遺伝子の転写や複製に関与している。一方、後期遺伝子として L1 と L2 があり、ウイルスゲノムを被うカプシドと呼ばれる殻を形成する蛋白質の生成に関与している。HPV には現在 80 種以上の型が報告されており、子宮頸部においては、コンジローマ、異形成、癌などの病変の違いや進行度によって、検出される型に違いがあることが指摘されている<sup>7)</sup>。正常粘膜や軽度異形成では検出されるものの、癌ではほとんど検出されない型もあれば、軽度異形成から扁平上皮癌と病変が進行するにつれ高頻度に検出される型もあることから、癌に対するリスクに応じて HPV を分類する試みがなされている<sup>8)~9)</sup>。癌で検出されるものを high risk 群、癌では検出が稀なものを low

risk 群とする分類法であるが、個々の HPV をどの群に分類するかについては、統一的な見解は現在のところ得られていない。ただし、HPV16 型と 18 型については、high risk 群として取り扱う研究者がほとんどであり、今回の検討でも HPV16 型、18 型、その他の型といった分類を用いている。

high risk 群の中でも、HPV16 型は子宮頸癌において最も高頻度に検出されるため、早くから解析が進められてきた。現在のところ、HPV16 型由来の E6 蛋白質および E7 蛋白質が、それぞれ P53 蛋白質、RB 蛋白質といった癌抑制遺伝子産物を不活化することや、異形成のうち HPV16 型の感染が見られるものは病変が進行あるいは持続しやすいことが指摘されており<sup>10)~15)</sup>、high risk 群の HPV の感染は子宮頸部発癌において非常に重要なリスクファクターのひとつであるといえる。さらに、近年 HPV に対するワクチンの開発が進められているが、ワクチンの効果は型特異的にのみ見られることが指摘されている<sup>16)~19)</sup>。それゆえ、高感度に HPV を検出し、正確に型決定することが臨床的にも重要となってきた。

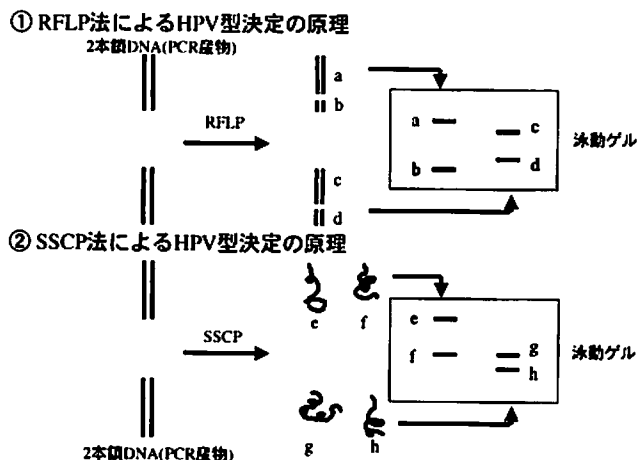
HPV の検出には polymerase chain reaction 法 (以下、PCR 法) を応用した方法が汎用されている。特に L1 領域は HPV 型による差異が少ないため、この領域に共通プライマーを設定し、一回の PCR で未知の型を含め多数の HPV を検出できる L1 PCR 法が広く行われている<sup>20)~23)</sup>。一方、HPV の型決定には、型特異的なプローブを用いたサザンブロット法、型特異的なプライマー

本論文は、Nakagawa H, Sugano K, Fujii T, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S : Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by PCR single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. *Anticancer Res.* 22(3) : 1655-60, 2002 の一部を含む。



第1図 HPV16型の遺伝子配列

E1～E7は初期遺伝子のORF (open reading frame) で、感染の初期 (Early) に発現し、ウイルスの増殖や複製に関与する。L1～L2は後期遺伝子のORFで、感染の後期 (Late) に発現し、ウイルス粒子の表面蛋白質であるカプシドを構成する。



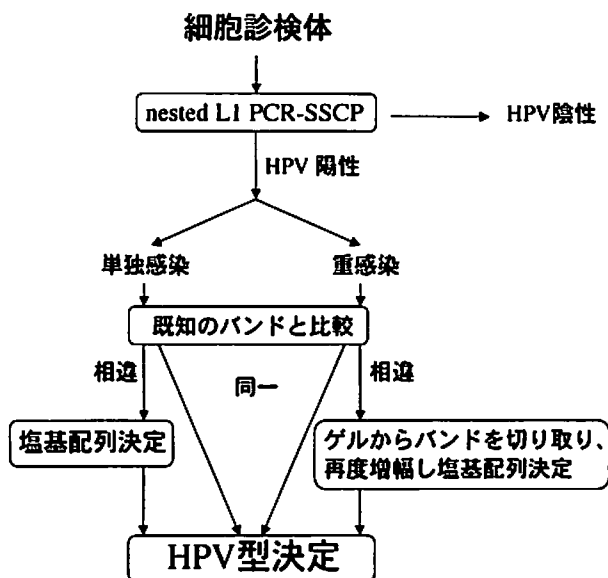
第2図 L1 PCR-RFLP法と nested L1 PCR-SSCP法による HPV 型決定の原理

- ①L1 PCR-RFLP法では、PCR産物を数種類の制限酵素で切断し、その泳動パターンから型決定を行う。
- ②L1 PCR産物はその長さは HPV 型に関わらず約 250 塩基対ではほぼ一定であるが、その塩基配列は異なる。これを非変性ゲル上で1本鎖にすると、その塩基配列により様々な高次構造をとる。この高次構造の違いにより移動度に差がでることを HPV の型決定に応用した。

を用いた PCR 法<sup>24), 25)</sup>、直接塩基配列を決定する方法、ドットプロット法、ハイブリッドキャプチャー法などがある。吉川ら<sup>26)</sup>は L1 PCR 産物にたいして RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析を行い型決定する方法 (以下、L1 PCR-RFLP 法) (第2図①) を報告している。

L1 PCR 法を用いると、異形成症例の 10～30% に HPV の重感染が認められるとする報告<sup>27)～30)</sup>がある。HPV の重感染の病的意義については、HPV の単独感染に比して子宮頸癌の発生リスクを低下させるという報告<sup>31)</sup>もあるが、HPV の持続感染に関わるとする報告<sup>32)</sup>や、より高度の異形成へ進行するリスクを高めるとする報告<sup>27), 30), 33)</sup>もあり、いまだに定説とされるものはない。HPV の重感染の病的意義を検討するためには、重感染を高感度に検出し、かつ正確に型決定することが必要である。そのため、今回我々は PCR-Single-stranded conformational polymorphism 法 (以下、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) を今回新たに開発した<sup>34)</sup>。PCR-SSCP 法は、2本

鎖 DNA である PCR 産物を1本鎖に分離し、非変性ゲルを用いて電気泳動することにより、塩基配列の違いを移動度の違いとして検出する方法である<sup>35), 36)</sup>。この条件下では、1本鎖 DNA が塩基配列の違いを反映した高次構造をとることから、一塩基多型などの微細な塩基配列の違いを移動度の違いとして検出できると考えられている。HPV 型間での L1 領域における塩基配列の相同性は 90% 以下であることから、PCR-SSCP 法は HPV の重感染があった場合に同時に複数の L1 PCR 産物を互いに影響を受けることなく判別が可能だと予想される (第2図②)。今回我々は、PCR-SSCP 法の特性を応用し、より高感度に HPV の重感染を検出する方法として、新たに nested L1 PCR-SSCP 法を開発し、その感度や検出スペクトラムについて検討した。そして、異形成および子宮頸癌症例の細胞診検体に対して nested L1 PCR-SSCP 法を用いて HPV の重感染の頻度について検討した。さらに、異形成 95 例について本法による HPV 検出・型決定の結果と L1 PCR-RFLP 法による結果<sup>37)</sup>とを比較し、nested L1 PCR-SSCP 法が優れた方法であることを明かにした。



第3図 nested L1 PCR-SSCP 法による HPV 検出・型決定の流れ  
今回の検討の流れを図示した。

## 対象と方法

### 1. 対象および方法

慶應義塾大学病院産婦人科およびその関連施設を受診し、それぞれ informed consent を得た患者 283 例より採取した子宮頸部細胞診検体を対象とした。今回の nested L1 PCR-SSCP 法による HPV 検出・型決定の流れを第3図に図示する。

子宮頸癌取扱い規約<sup>38)</sup>に準拠して、それぞれ病理組織診により診断された、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 例について検討した。サイトブラシあるいはサイトピックを用いて子宮頸部より細胞を採取し、1 ml のリン酸 buffer を入れたエッペンドルフチューブ内で洗浄し、4℃、7000 回転、5 分間遠心し、ペレットをマイナス 80℃で保存した。DNA の抽出は、通常の sodium dodecyl sulfate-proteinase K 法を用いた。

### 2. nested L1 PCR

プライマーとして L1C1, L1C2, L1C3 の 3 種を使用した。L1C1 および L1C2 は吉川ら<sup>25)</sup>が報告している。L1C3 (5'-GTT TTC CCT ATT TTT TTT CAG ATG-3') は L1C1 の 7 塩基下流に新たに作成したコンセンサ

L1C1	5'-CGTAAAGCTTTCCCTATTTTTT-3'	相当する塩基配列番号
L1C1	5'-GTTTTCCTATTTTTTTCAGATG-3'	
HPV16	-----A--A-----	5609-5639
HPV18	-----G-----G-----	5595-5615
HPV6	-----A-----TA-----	5761-5791
HPV31	-----G-AT-A-----A-----	5524-5554
HPV33	-----A-----A-----A-----	5566-5596
HPV51	-----A-A-----A-----A-----	5493-5523
HPV52	-----A-----A-----A-----A-----	5615-5645
HPV58	-----A-----A-----G-----	5615-5645

L1C2	3'-GTTATGCTCATAAATCCCAT-5'	
	5'-CAATACAGAGTATTAGGATA-3'	
HPV16	-----G-----AA-----	5841-5861
HPV18	-----T-----G-----G-----	5817-5836
HPV6	-----G-----A-----G-----	5984-6003
HPV31	-----T-G-----T-----	5759-5778
HPV33	-----T-G-T-----C-----	5801-5820
HPV51	-----G-----A-----A-----	5722-5742
HPV52	-----G-----AA-T-----	5857-5876
HPV58	--G--T--G--C-----G-----	5851-5870

第4図 今回使用した L1 共通プライマーと代表的な HPV との比較

コンセンサプライマーとして使用した L1C1, L1C2, L1C3 の塩基配列を代表的な high risk HPV の L1 領域と比較した。塩基配列の異なる部分のみ表示してある。L1C3 は今回新たに作成した L1 コンセンサプライマーである。

プライマーである (第4図)。第1回目の PCR はプライマーとして L1C1 と L1C2 を使用し、以下の条件で行った。2.5 μl の DNA 検体に 22.5 μl の PCR 反応液 (その最終濃度は 50 mM の KCl, 10 mM の Tris-HCl pH 8.4, 1.5 mM の MgCl<sub>2</sub>, 200 μM の dNTP, 1 μM のプライマーセット, 0.625 unit の Taq DNA polymerase) を加え攪拌し、94℃で 5 分間を 1 サイクル; 94℃で 1 分間, 50℃で 1 分間, 72℃で 1 分間を 15 サイクル; 72℃で 7 分間を 1 サイクルとした。第2回目の PCR にはプライマーとして L1C2 と L1C3 を使用し、以下の条件で行った。2.5 μl の第1回目 PCR 産物に 22.5 μl の PCR 反応液 (同上) を加え攪拌し、94℃で 5 分間を 1 サイクル; 94℃で 1 分間, 50℃で 1 分間, 72℃で 1 分間を 30 サイクル; 72℃で 7 分間を 1 サイクルとした。増幅産物は 8% polyacrylamide gel 上で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行い約 250bp のバンドが確認できたものを HPV 陽性、確認できなかったものを HPV 陰性とした。

### 3. HPV の型決定

2 μl の増幅産物を 10 μl の SSCP 反応液 (90% の formamide, 20 mM の EDTA, 0.05% の xylene cyanol, 0.05% の bromphenol blue) と混合し、80℃で 5 分間反応させたのち、10% の polyacrylamide gel (90 mm (高) × 88 mm (幅) × 1 mm (厚), 30 : 1, acrylamide :

bisacrylamide 比, Tris/Glycine buffer (25 mM の Tris, 192 mM の glycine を含む) 上で 200 V, 3 時間泳動した. 泳動 buffer として上記 Tris/Glycine buffer を使用した. 泳動中は恒温槽を用いて polyacrylamide gel の温度を 18°C に保った. 泳動後の gel は, 銀染色キット (2D-silverstain, 第一化学, 東京) を用いて染色し, 検討した. ほとんどの症例で同時に泳動する既知の HPV 型 (16 型と 51 型, 場合によってはその他の型) と比較することにより nested L1 PCR-SSCP 法のみで型決定が可能であったが, 一部の症例では下記のように直接塩基配列を確認することが必要であった.

4. オートシーケンサーによる解析

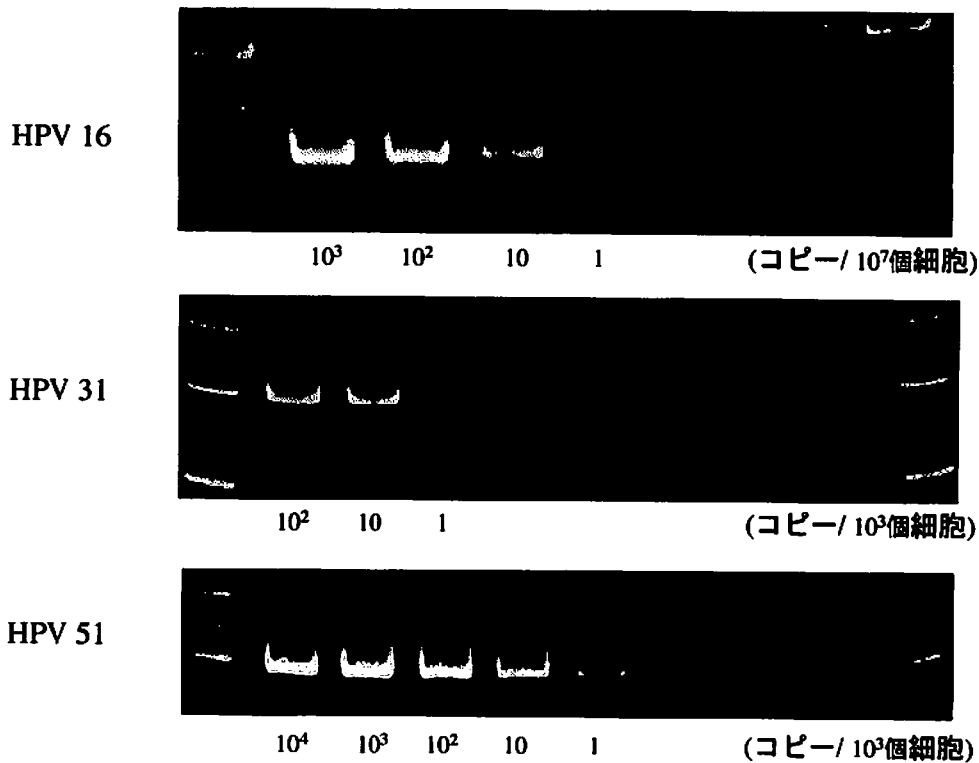
nested L1 PCR-SSCP 法のみでは HPV 型決定が不可能であった症例のうち, 単一の HPV による感染の場合は直接 L1 PCR 産物を鋳型として使用した. 重感染の場合はゲルよりそれぞれのバンドを切り取り, 20  $\mu$ l の TE buffer 内でホモジェナイズし, 95°C で 5 分間加熱

した後, 12000 回転で 10 分間遠心し, 上清を前記 nested PCR の第 2 回目の PCR と同様の条件で増幅したものを鋳型として使用した.

解析の直前に PCR product pre-sequencing kit (Amersham LIFE SCIENCE INC., IL) にて PCR 産物を処理し, Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit™ (PE Applied Biosystems, Inc., CA), を用いてシーケンス反応を行った. オートシーケンサーは, Long-read sequencing capillary™ と POP-6™ sequencing polymer (PE Applied Bio Systems, Inc., CA) を装着した Genetic Analyzer 310™ (PE Applied Biosystems, Inc., CA, USA) を用いた. 塩基配列決定用のプライマーとしては上述の L1C3 を用いた.

5. 異形成 73 例の予後の解析

軽度異形成 32 例, 中等度異形成 41 例の合計 73 例のうち, 1 年以上経過観察可能で, 初回検査時に 1 種類以



第 5 図 nested L1 PCR-SSCP 法の感度

HPV16, 31, 51 各型の PCR 産物 (L1C1, L1C2 により増幅されたもの) を蒸留水を用いて段階的に希釈し, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l の濃度のヒト genomic DNA に混入したものを用いて nested L1 PCR-SSCP 法の検出感度を検討した. HPV16 型では 10<sup>7</sup> 個の細胞あたり 1 コピーまで, HPV 31, 51 の各型では 10<sup>3</sup> 個の細胞あたり 1 コピーまで検出された. (Nakagawa H et al: Anticancer Res 22: 1655-1660, 2002 の Figure 1 を許可を得て転載)

上の high risk HPV の感染が認められた 44 例について HPV の重感染の有無と病変の進展、不変、退縮との関連について  $\chi^2$  検定を用いて後方視的に検討した。その際、病変の進展とは、軽度あるいは中等度異形成が高度異形成あるいは上皮内癌に進行した場合とした。また、病変の退縮とは、異形成が消失した場合とし、不変とは、病変が軽度あるいは中等度異形成のまま持続している場合とした。なお、今回の検討では過去の報告<sup>39), 40)</sup>にならない、16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 56, 58 の各型を high risk HPV とした。

6. nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法の比較

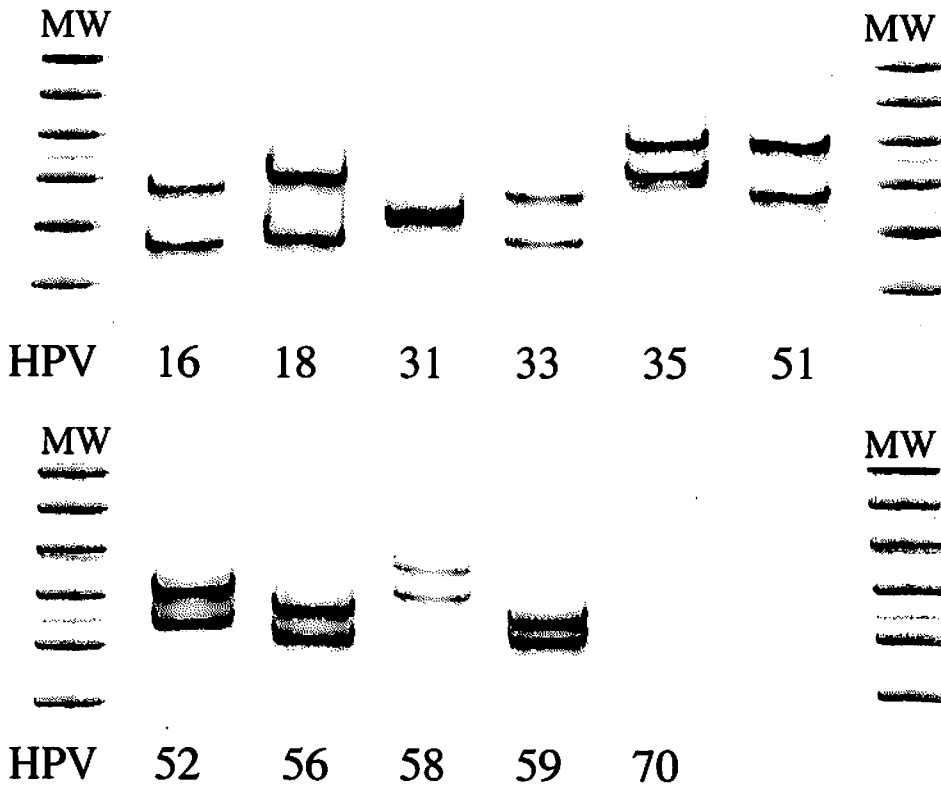
今回検討した異形成 104 例のうち、95 例について本法による HPV 検出・型決定の結果と L1 PCR-RFLP 法による結果<sup>36)</sup>とを比較し、nested L1 PCR-SSCP 法の

特徴について解析した。

結 果

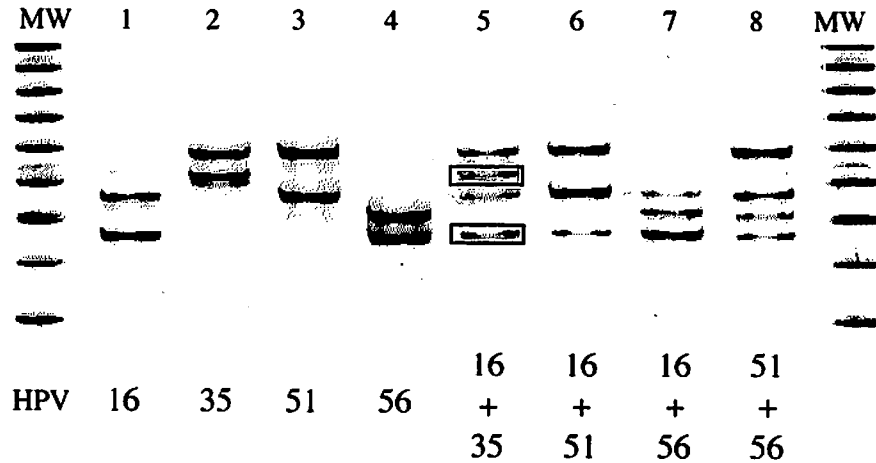
1. nested L1 PCR-SSCP 法の感度

HPV16, 18, 31, 51, 52 各型の PCR 産物 (L1C1, L1C2 により増幅されたもの) を蒸留水を用いて段階的に希釈し、それぞれ 25  $\mu$ l の反応液に 0.25  $\mu$ g のヒト genomic DNA を混入して nested L1 PCR 法の検出感度を検討したところ、HPV16 型では  $10^7$  個の細胞あたり 1 コピーまで、HPV31, 51 の各型では  $10^8$  個の細胞あたり 1 コピーまで検出された (第 5 図)。HPV18, 52 の各型においても  $10^8$  個の細胞あたり 1 コピーまで検出された。



第 6 図 nested L1 PCR-SSCP 法による HPV 検出・型決定解析例

オートシーケンサーにより確認された HPV16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 56, 58, 59, 70 型の L1 PCR 産物を nested L1 PCR-SSCP 法にて解析した。これらは子宮頸部の腫瘍性病変において高頻度に検出される HPV 型であるが、nested L1 PCR-SSCP 法により型決定が可能であることが示された。(Nakagawa H et al : Anticancer Res 22 : 1655-1660, 2002 の Figure 2 を許可を得て転載)



第7図 nested L1 PCR-SSCP 法による単独感染と重感染の解析例

HPV16, 35, 51, 56 各型による4例の単独感染例 (lanes1-4) と、4例の重感染例 (lanes5-8) の移動度を示す。(Nakagawa H et al : Anticancer Res 22 : 1655-1660, 2002 の Figure 3 を許可を得て転載) それぞれの HPV 型の移動度は、重感染例においても、単独感染例における移動度と同一であった。

重感染例で、SSCP 法のみでは型決定できなかった例については SSCP ゲルよりバンドを図のように切り取って再度増幅しオートシーケンサーにより解析した。

2. nested L1 PCR-SSCP 法による HPV 検出スペクトラムと HPV 重感染検出例

オートシーケンサーにより確認された HPV16, 18, 31, 33, 51, 52, 56, 58, 59, 70 型の L1 PCR 産物を nested L1 PCR-SSCP 法にて解析した (第6図)。これらは子宮頸部の腫瘍性病変において高頻度に検出される HPV 型であるが、nested L1 PCR-SSCP 法により型決定が可能であることが示された。第7図には、4例の重感染例と、それぞれの HPV 単独での移動度を示す。それぞれの HPV 型の移動度は、重感染例においても、単独感染例における移動度と同一であった。

3. nested L1 PCR-SSCP 法による細胞診検体からの HPV DNA 検出・型決定

nested L1 PCR-SSCP 法にて 283 例の子宮頸部細胞診検体 (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) を解析したところ、22 種類の HPV 型が検出された。これらの PCR 産物の塩基配列を検討したところ、22 種類中 18 種類 (6, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 70 の各 HPV 型) は既に報告されている HPV 型であり、4 種類は未知の HPV 型であった。HPV の陽性率は、

第1表 nested L1 PCR-SSCP 法による HPV DNA 陽性率 (単独感染あるいは重感染で分類)

病理診断	計	HPV 単独感染	HPV 重感染
正 常	8/64(12.5%)	7(10.9%)	1( 1.6%)
軽度異形成	32/32(100%)	19(58.1%)	13(41.9%)
中等度異形成	40/41(97.6%)	26(63.5%)	14(34.1%)
高度異形成	31/31(100%)	21(67.7%)	10(32.3%)
上皮内癌	65/79(82.3%)	57(72.2%)	8(10.1%)
扁平上皮癌	21/27(77.8%)	20(74.1%)	1( 3.7%)
腺 癌	5/9(55.6%)	5(55.6%)	0( 0%)

\*p<0.0001

nested L1 PCR-SSCP 法にて 283 例の子宮頸部細胞診検体 (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) を解析した結果を第1表, 第2表にまとめた。異形成では、HPV はほとんどの例で検出され、そのうち約 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。さらに、腺癌では重感染は検出されなかった。異形成と子宮頸癌の間で HPV の単独感染あるいは重感染について  $\chi^2$  検定を施行したところ、有意差 (p<0.0001) をもって異形成で重感染が高率に認められた。(Nakagawa H et al : Anticancer Res 22 : 1655-1660, 2002 の Table 1 を許可を得て転載)



第2表 nested L1 PCR-SSCP 法による HPV DNA 陽性率 (HPV16 型, 18 型, その他の型で分類)

病理診断	計	HPV16	HPV18	その他
正 常	8/64(12.5%)	1( 1.6%)	1( 1.6%)	6( 9.4%)
軽 度 異 形 成	32/32(100%)	2( 6.3%)	3( 9.4%)	27(84.4%)
中 等 度 異 形 成	40/41(97.6%)	10(24.4%)	3( 7.3%)	27(65.9%)
高 度 異 形 成	31/31(100%)	10(32.3%)	2( 6.5%)	19(61.3%)
上皮内癌	65/79(82.3%)	35(44.3%)	3( 3.8%)	27(34.1%)
扁平上皮癌	21/27(77.8%)	14(51.9%)	1( 3.7%)	6(22.2%)
腺 癌	5/9(55.6%)	0( 0%)	5(55.6%)	0( 0%)

\*p<0.0001

HPV16 型は病変が進行するにともない検出率が高くなった。HPV18 型は異形成および扁平上皮癌では非常にまれ (12/210, 5.7%) で、腺癌で有意 (p<0.0001) に高頻度に認められた (5/9, 55.6%)。HPV16 型, 18 型の感染率とその他の HPV の感染率とを同様に検討したところ、やはり有意差 (p<0.0001) をもって子宮頸癌で HPV16 型, 18 型の感染が多く、異形成でその他の HPV の感染が高率に認められた。(Nakagawa H et al : Anticancer Res 22 : 1655-1660, 2002 の Table 1 を許可を得て転載)

正常 (8/64, 12.5%)、軽度異形成 (32/32, 100%)、中等度異形成 (40/41, 97.6%)、高度異形成 (31/31, 100%)、上皮内癌 (65/79, 82.3%)、扁平上皮癌 (21/27, 77.8%)、腺癌 (6/9, 66.7%) であった。異形成では、HPV はほとんどの例で検出され、そのうち約 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。さらに、腺癌では重感染は検出されなかった。異形成と子宮頸癌の間で HPV の単独感染あるいは重感染について  $\chi^2$  検定を施行したところ、有意差 (p<0.0001) をもって異形成で重感染が高率に認められた (第 1 表)。HPV16 型は、正常 (1/64, 1.6%)、軽度異形成 (2/32, 6.3%) ではほとんど検出されないが、中等度異形成 (10/41, 24.4%)、高度異形成 (10/31, 32.3%)、上皮内癌 (35/79, 44.3%)、扁平上皮癌 (14/27, 51.9%) と病変が進行するにともない検出率が高くなった。HPV18 型は異形成および扁平上皮癌では非常にまれ (12/210, 5.7%) で、腺癌で有意 (p<0.0001) に高頻度に認められた (5/9, 55.6%)。HPV16 型, 18 型の感染率とその他の HPV の感染率とを同様に検討したところ、やはり有意差 (p<0.0001) をもって子宮頸癌で HPV16

型, 18 型の感染が多く、異形成でその他の HPV の感染が高率に認められた (第 2 表)。

#### 4. 重感染と異形成の予後

今回検討した軽度異形成 32 例, 中等度異形成 41 例の合計 73 例のうち 1 年以上経過観察可能で、high risk の HPV が検出されたものは 44 例あり、16 例に重感染が、28 例に単独感染が検出された。重感染と判定されたものの中では、進展したものが 4 例 (4/16, 25.0%)、不変 5 例 (5/16, 31.3%)、退縮 7 例 (7/16, 43.8%) であった。単独感染と判定されたものの中では、進展したものが 5 例 (5/28, 17.9%)、不変 11 例 (11/28, 39.3%)、退縮 12 例 (12/28, 42.9%) であった。 $\chi^2$  検定を用いて検討したが、HPV の重感染あるいは単独感染と予後との関連は認められなかった。

#### 5. nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法の比較

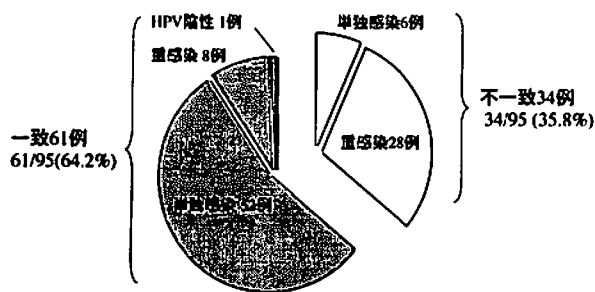
L1 PCR-RFLP 法によると、検討を行った異形成 95 例中 84 例 (88%) で HPV が検出され、9 例 (10.6%) で重感染が認められた。nested L1 PCR-SSCP 法によると、94 例 (99%) で HPV が検出され、36 例 (38.3%) で重感染が認められた (第 3 表)。nested L1 PCR-SSCP 法が HPV の単独感染、重感染の双方ともに、より高感度に検出できることが示された。第 8 図に両法の型決定結果を示す。61 例 (61/95, 64.2%) において結果が一致したが、34 例 (34/95, 35.8%) では結果が相違した。結果が一致した 61 例中、重感染が見られたのは 8 例 (13.1%) で、結果が相違した 34 例中 28

第3表 L1 PCR-RFLP 法と nested L1 PCR-SSCP 法による型決定結果の比較 (異形成 95 例の検討)

	L1 PCR-RFLP 法 <sup>2)</sup>	nested L1 PCR-SSCP 法
単独感染	75 (78.9%)	58 (61.1%)
重感染*	9 ( 9.5%)	36 (37.9%)
未検出	11 (11.6%)	1 ( 1.1%)

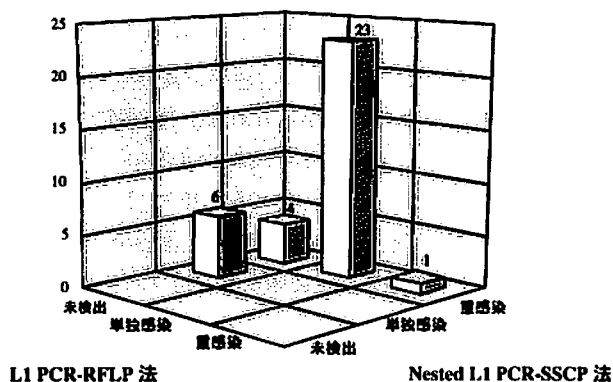
\*p<0.0001

今回検討した異形成 104 例のうち、95 例については吉川らが同一検体を用いて L1 PCR-RFLP 法で解析している<sup>2)</sup>。彼らの報告によると、95 例中 84 例 (88%) で HPV が検出され、9 例 (10.6%) で重感染が認められた。我々が nested L1 PCR-SSCP 法を用いて同一の検体を解析したところ、94 例 (99%) で HPV が検出され、36 例 (38.3%) で重感染が認められた。nested L1 PCR-SSCP 法を用いることにより高感度に HPV の重感染を検出できることが示された。



第8図 nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法の型決定結果の比較

61例 (61/95, 64.2%) において結果が一致したが、34例 (34/95, 35.8%) では結果が相違した。結果が一致した61例中重感染が見られたのは8例 (13.1%) で、結果が相違した34例中28例 (82.4%) は重感染例であった。結果が相違したものについて塩基配列から型決定を行ったところ、nested L1 PCR-SSCP 法による結果と一致した。このことから、nested L1 PCR-SSCP 法は L1 PCR-RFLP 法に比較して、特に重感染例で正確に HPV を検出・型決定可能であることが示された。



第9図 Nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法による HPV 型判定結果不一致例 34 例の検討 (その1)

結果不一致例 34 例について、未感染、単独感染、重感染で区分して検討した。不一致例は L1 PCR-RFLP 法で未検出、あるいは単独感染とされたが、nested L1 PCR-SSCP 法では重感染とされたものが多かった。このことは、nested L1 PCR-SSCP 法の重感染に対する検出感度が高いことを示している。

第4表 nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法による HPV 型判定結果不一致例 34 例の検討 (その2)

HPV 型判定結果	nested L1 PCR-SSCP 法	
	HPV16 陽性	HPV16 陰性
L1 PCR-RFLP 法 <sup>29)</sup> HPV16 陽性	2 例	4 例
L1 PCR-RFLP 法 <sup>29)</sup> HPV16 陰性	2 例	26 例

HPV16 型は、high risk HPV のなかでも代表的なものであり、HPV16 型に対する特異度は非常に重要である。nested L1 PCR-SSCP 法は重感染を検出する感度が優れているだけでなく、とくに HPV の重感染が見られる場合には HPV16 型に対する特異度も優れている。

例 (82.4%) は重感染例であった。nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法とで結果が相違したものについては、直接塩基配列から型決定を行ったところ、nested L1 PCR-SSCP 法による結果が正しいことが判明した。結果不一致例 34 例について、未検出、単独感染、重感染で区分して検討した (第9図)。10 例は L1 PCR-RFLP 法で未検出とされたが、nested L1 PCR-SSCP 法によると6例は単独感染で、4例は重感染であった。23 例は L1 PCR-RFLP 法で単独感染とされたが、nested L1 PCR-SSCP 法では重感染であった。1 例は両法とも重感染であったが、その HPV 型が異なるものであった。さらに、結果不一致例 34 例について、HPV16 型陽性あるいは陰性で区分して検討した (第4表)。L1 PCR-RFLP 法で HPV16 型陽性とされた6例中4例は nested L1 PCR-SSCP 法では HPV16 型陰性であった。L1 PCR-RFLP 法で HPV16 型陰性とされた28例中2例は nested L1 PCR-SSCP 法では HPV16 型陽性であった。

### 考 察

我々は子宮頸部における HPV 重感染の自然史についてより正確に解析するために、新たな HPV 検出・型決定法として nested L1 PCR-SSCP 法を開発した。SSCP 法は非変性 gel 上で一本鎖 DNA を泳動し、その高次構造による移動度の差を利用し、微細な塩基配列の違いを検出する方法である。しかし、一本鎖 DNA の高次構造は泳動条件、特に温度の違いにより容易に変化するため、SSCP 法による移動度は再現性に乏しいという欠点があった。今回の検討では、恒温槽を利用して泳動中の gel の温度を厳密にコントロールすると同時に既知の HPV 型の L1 PCR 産物をマーカーとして使用することにより

再現性を確保した。

通常の解析では、HPV16型と51型をマーカーとして使用した。この理由として以下の2点がある。

- (1) 子宮頸部の腫瘍性病変で検出される HPV のバンドのほとんどが HPV16 型の下方のバンドと HPV51 型の上方のバンドの間にはいるため比較の対象として適している。
- (2) HPV16 型は、子宮頸癌で最も重要かつ高頻度に検出される型である。

nested L1 PCR-SSCP 法をもちいて合計 283 例の子宮頸部細胞診検体を解析した結果を第 1 表にまとめた。HPV の重感染は正常例では 1 例 (1/64, 1.6%)、異形成においては 37 例 (37/104, 35.6%)、上皮内癌では 8 例 (8/79, 10.1%) に認められたが、浸潤癌では微小浸潤癌の 1 例のみであった (1/36, 2.8%)。従来の報告でも、子宮頸部の細胞診検体を L1 PCR を用いて解析し、異形成症例の約 10~30% に HPV の重感染を認めている<sup>27)~30)</sup>。しかしながら、これらの報告では、正常例においても約 20~70% に HPV の感染を認めていることから、特異度に問題があるとする意見もある。これに対し、今回我々が確立した nested L1 PCR-SSCP 法では正常例での HPV 陽性率は 12.5% と比較的少ないにも関わらず、異形成例の 35.6% に HPV の重感染を認めている。このことから、nested L1 PCR-SSCP 法は、従来の方法に比較して HPV の重感染を検出するにあたり、感度、特異度ともに優れているといえる。

第 2 表に本法における解析結果を HPV16 型、18 型、あるいはその他の型の感染に分類して検討した結果を示した。浸潤癌では 16 型、18 型以外の HPV の検出率は 16.7% (6/36) と、異形成 (70.2%, 73/104) と比較し非常に低かった。HPV16 型は、異形成が進行するに伴い検出頻度が高くなり、HPV18 型は扁平上皮系の病変ではまれで、腺癌で有意に多く認められた。HPV16 型と 18 型のこういった傾向は、以前から疫学的には報告されている<sup>41)~44)</sup>が、なぜそういう傾向がみられるのかは現在のところ不明である。

今回の検討では扁平上皮癌 27 例中 6 例 (22.2%)、腺癌 9 例中 4 例 (44.4%) では HPV が検出されなかった。これらは、今回の系で検出されない HPV が関わるためかもしれないし、HPV の関与しない発癌過程が存在するためかもしれない。あるいは、発癌過程において HPV DNA が宿主ゲノム DNA にインテグレートされる際に L1 領域が欠失したために、今回の検討では HPV を検出できなかつたとも考えられる。

HPV 重感染の病的意義については未だに定説はない。Davidson ら<sup>32)</sup>は 1126 人のアラスカ在住女性について検討し、HPV が検出されなかった人に比べ、16 型あるいは 18 型が検出された人は 7.1 倍、16 型、18 型に加えて 31 型、33 型、35 型が重複して検出された人は 14.4 倍高度異形成になるリスクが高かったと報告している。Becker ら<sup>27)</sup>は高度異形成 201 例と正常 337 例について検討し、HPV 重感染例は単独感染あるいは HPV 感染の見られなかった症例に比較して 4.9 倍高度異形成になるリスクが高いと報告している。Sasagawa ら<sup>30)</sup>は正常 1562 例と LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion<sup>45)</sup>、軽度および中等度異形成に相当) 145 例、HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion<sup>45)</sup>、高度異形成および上皮内癌に相当) 137 例、扁平上皮癌 72 例、腺癌 12 例、コンジローマ 16 例について検討し、正常例に比較して HPV 重感染例のオッズ比が、LSIL では 24 倍、HSIL では 16 倍、扁平上皮癌では 13 倍と有意に高いことから、HPV 重感染がこれらの病変と関連があると報告している。一方、Munoz ら<sup>31)</sup>は子宮頸部扁平上皮癌 1918 例と正常 1928 例について検討し、子宮頸部扁平上皮癌になるリスクが、HPV の感染が見られない場合と比較して、HPV 単独感染例では 172.6 倍高く、重感染例では 114.9 倍高いことから、HPV 重感染は子宮頸部扁平上皮癌のリスクとはならないと報告している。

今回の検討では、重感染あるいは単独感染と異形成の予後との相関はみられなかった。その理由としては、症例数が少ないことと、そのために HPV16 型の感染が認められた症例が検討を行った軽度および中等度異形成 44 例中 5 例と少なかったことが考えられる。HPV16 型の感染が認められた 5 例中、単独感染例は 3 例で、うち 2 例が進展し、1 例が退縮した。重感染例は 2 例で、うち 1 例は進展し、1 例は不変であった。今後症例を重ねて検討する必要があると思われる。

また、今回確立した nested L1 PCR-SSCP 法は、既存の方法と比較してより高感度かつ正確に HPV の重感染を検出できる方法であるが、本法をもってしても浸潤癌では HPV の重感染が認められなかった。異形成および浸潤癌における HPV の重感染の頻度についての報告は多くないが、Munoz ら<sup>31)</sup>は浸潤癌 1918 例中 109 例 (5.7%) に HPV の重感染が見られると報告している。Sasagawa ら<sup>30)</sup>は LSIL 145 例中 30 例 (21%)、HSIL 137 例中 21 例 (15%)、扁平上皮癌 72 例中 9 例 (13%)、腺癌 8 例中 1 例 (8%) に HPV の重感染が見られると報告している。彼らの報告と併せて考えると、浸

潤癌でも HPV の重感染は見られるものの、異形成と比較するとその頻度ははるかに低いと考えられる。

子宮頸部における HPV の感染は、ほとんどの場合一時的なものであるが、ごく一部では感染が持続し、細胞の遺伝子の異常が加わるなどして異形成、癌へと病変が進行すると一般に考えられている。この過程における HPV 重感染の意義を考察するにあたり、まず最初の問題点は、重感染は一つの細胞に複数の HPV が感染した状態なのか、あるいは複数の細胞にそれぞれ別々の HPV が感染した状態なのか、という点である。この点に関しては現在のところ明確にはなっていないが、一般には後者の考えが自然だろうと思われる。また、Enomoto ら<sup>46), 47)</sup>は、X 染色体のメチル化による不活化機構と密接に関わるアンドロゲン受容体遺伝子の多型性を利用してクローナリティ解析を行い、高度異形成、上皮内癌、浸潤癌はモノクローナルな病変であり、中等度異形成はポリクローナルな病変であることを明らかにしている。今回の結果と併せて考えると、重感染が見られる病変はポリクローナルであり、重感染が見られない病変はモノクローナル、すなわち真の腫瘍であるといえるかもしれない。

さらに、Gloria ら<sup>33)</sup>は 608 人の女性を 6 ヶ月おきに 3 年間追跡したところ、HPV 重感染は 6 ヶ月以上持続する HPV 感染と関連することを報告している。また、Levi ら<sup>48)</sup>は HIV (human immunodeficiency virus) 感染者に HPV 重感染が高頻度に見られることを報告している。これらのことから、HPV 重感染は、HPV に対する免疫能が弱いことを示しているのかもしれない。

今回確立した nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法とを、異形成 95 例の同一検体の HPV 検出・型判定を行うことにより比較したところ、nested L1 PCR-SSCP 法がより高感度に重感染を検出できた (第 3 表)。95 例中 34 例で両法の結果は一致せず、とくに結果不一致例では HPV の重感染が多かった (第 8 図)。結果不一致例 34 例について、未検出、単独感染、重感染で区分して検討した (第 9 図)。不一致例は L1 PCR-RFLP 法で未検出、あるいは単独感染とされたが、nested L1 PCR-SSCP 法では重感染とされたものが多かった。このことは、nested L1 PCR-SSCP 法の重感染に対する検出感度が高いことを示している。さらに、結果不一致例 34 例について、HPV16 型陽性あるいは陰性で区分して検討した (第 4 表)。L1 PCR-RFLP 法で HPV16 型陽性とされた 6 例中 4 例は nested L1 PCR-SSCP 法では HPV16 型陰性であった。L1 PCR-RFLP 法で HPV16 型陰性とされた 28 例中 2 例は

nested L1 PCR-SSCP 法では HPV16 型陽性であった。これらの不一致例についても直接塩基配列を決定したが、nested L1 PCR-SSCP 法による結果が正しかった。HPV16 型は、high risk 群のなかでも代表的なものであり、HPV16 型に対する特異度は非常に重要である。このことから、nested L1 PCR-SSCP 法は重感染を検出する感度が優れているだけでなく、とくに重感染が見られる場合には HPV16 型に対する特異度も優れていることが示された。

HPV 重感染の病的意義については前述のように様々なことがいわれているが、今回の検討では異形成の予後との相関はなく、浸潤癌では検出されないことから、HPV 重感染が子宮頸部発癌に重要な役割を果たしているとはいえないかもしれない。しかし、HPV 重感染を正確に検出できない方法では型決定結果の信頼性が低くなることも明らかとなった。すなわち、HPV 重感染を正確に検出できる方法を用いることにより、はじめて正確な HPV 感染の自然史が明らかになるといえる。

現在、ウイルス DNA を含まないカプシド成分からなる virus-like particles (VLP) をワクチンとして用いることにより、HPV の感染を防ぎ、子宮頸癌を予防しようとする試みが始まっている<sup>49), 50)</sup>。ただし、この VLP で誘導される中和抗体は HPV のそれぞれの型に特異的であり、ある型に対する中和抗体は他の型の感染を予防できない。子宮頸癌は HPV 感染をきっかけとして発症するものであり、ワクチンは今後の子宮頸癌の治療や予防にあたり重要な手段であることは間違いないが、ワクチンを実際に使用するにあたっては子宮頸部発癌に関与する HPV を正しく型決定することがいっそう重要となってくる。

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いることが明らかとなった。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 の感染を予防するにあたりきわめて重要である。

## 総 括

HPV の重感染をより高感度かつ正確に検出する方法として新たに nested L1 PCR-SSCP 法を確立した。nested L1 PCR-SSCP 法を用いて異形成および子宮頸癌における HPV の単独および重感染について検討した。異形成では約 40% の例に重感染が認められたが、浸潤

癌例では微小浸潤癌の 1 例を認めるのみであった。また、異形成では HPV16 型、18 型以外の型も高頻度に見られたが、浸潤癌では HPV 陽性例のほとんどが 16 型あるいは 18 型であった。さらに、nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法とを比較したところ、nested L1 PCR-SSCP 法がより高感度であり、特に重感染例において nested L1 PCR-SSCP 法が感度、特異度ともに優れていることが示された。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 感染の自然史が解明できると考えられた。このことは、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、非常に重要である。

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、御助言いただきました栃木県立がんセンター菅野康吉先生、慶應義塾大学産婦人科学教室藤井多久磨先生に深謝いたします。また、本研究に御協力、御助言いただきました慶應義塾大学産婦人科学教室塚崎克己助教授、久布白兼行講師および異形成の細胞診検体の L1 PCR-RFLP 法による HPV 型判定を行っていただきました筑波大学医学部産婦人科学教室吉川裕之教授に厚く感謝いたします。

本研究の一部は、第 94 回日本産科婦人科学会関東連合地方部会総会（前橋，1997）、第 50 回日本産科婦人科学会学術講演会（仙台，1998）、第 2 回産婦人科腫瘍マーカー・遺伝子診断学会（東京，1998）、第 39 回日本臨床細胞学会総会（札幌，1998）、第 36 回日本癌治療学会総会（福岡，1998）、第 51 回日本産科婦人科学会学術講演会（東京，1999）において発表した。

本研究の一部は文部省科研費（症例研究(A)課題番号 10770854）によった。

## 文 献

- 1) Mori M, Sagae S : Recent progress in epidemiologic research of uterine cancer. *Jpn. J. Cancer Chemother.* 28 : 174-178, 2001
- 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) zur Hausen H : papillomaviruses in human cancers. *Mol. Carcinog.* 1 : 147-150, 1988
- 4) van den Brule JCA, Claas HCJ, du Maine M, Melchers WJG, Helmerhorst T, Quint WGV, Lindeman J, Meijer CJLM, Walboomers JMM : Use of anticontamination primers in the polymerase chain reaction for the detection of human papilloma virus genotypes in cervical scrapes and biopsies. *J. Med. Virol.* 29 : 20-27, 1989
- 5) Schiffman HM, Bauer MH, Hoover NR, Glass GA, Cadell MD, Rush BB, Scott RD, Sherman EM, Kurman JR, Wacholder S, Stanton KC, Manos MM : Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 85 : 958-964, 1993
- 6) Reeves WC, Rawls WE, Brinton LA : Epidemiology of genital papillomaviruses and cervical cancer. *Rev. Infect. Dis.* 11 : 426-439, 1989
- 7) 笹川 寿之：ヒトパピローマウイルス感染症。産科と婦人科。67(11)：1460-1468, 2000
- 8) Lorincz AT, Reid R : Human papillomavirus infection of the cervix : Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet. Gynecol.* 79 : 328-337, 1992
- 9) Yoshikawa H, Nagata C : Human papilloma virus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *Br. J. Cancer* 80 : 621-624, 1999
- 10) Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H : Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314 : 111-114, 1985
- 11) Pater MM, Pater A : Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145 : 313-318, 1985
- 12) 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. *Gynec. Oncol.* 58 : 210-215, 1995
- 13) Dyson N, Howley MP, Munger K, Harlow Ed : The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243 : 934-937, 1989
- 14) Werness AB, Levine JA, Howley MP : Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 protein with p53. *Science* 248 : 76-79, 1990
- 15) Munger K, Phelps CW, Bubb V, Howley MP, Schlegel R : The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63 : 4417-4421, 1989
- 16) Unckell F, Streeck RE, Sapp M : Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J. Virol.* 71 : 2934-2939, 1997
- 17) White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA. In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human

- papillomavirus type 16. *J. Virol.* 72 : 959-964, 1998
- 18) Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, et al. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.* 70 : 5875-5883, 1996
  - 19) Roden RB, Hubbert NL, Kirnbauer R, Christensen ND, Lowy DR, Schiller JT. Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. *J. Virol.* 70 : 3298-3301, 1996
  - 20) Gregoire L, Arella M, Campione-Piccardo J, Lancaster WD : Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 2660-2665, 1989
  - 21) Manos MM, Ting Y, Wrigth DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM : Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7 : 209-214, 1989
  - 22) van den Brule JCA, Snijders PJF, Gordijn RLJ, Bleker OP, Meijer CJLM, Walboomers JMM : General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int. J. Cancer* 45 : 644-649, 1990
  - 23) Snijders JP, van den Brule JCA, Schrijnemakers FJH, Snow G, Meijer JLMC, Walboomers MMJ : The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 71 : 173-181, 1990
  - 24) Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ : Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 167 : 225-230, 1988
  - 25) Shimada M, Fukushima M, Mukai H, Kato I, Nishikawa A, Fujinaga K : Amplification and specific detection of transforming gene region of human papillomavirus 16, 18 and 33 in cervical carcinoma by means of the polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.* 81 : 1-5, 1990
  - 26) 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
  - 27) Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, Parmenter CA, Jordan SW, Stidley CA, McPherson RS, Dorin MH : Sexually transmitted disease and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern hispanic and non-hispanic white women. *JAMA* 271 : 1181-1188, 1994
  - 28) Kalantari M, Karlsen F, Johansson B, Sigurjonsson T, Warleby B, Hagmar B : Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade. *Hum. Pathol.* 28 : 899-904, 1997
  - 29) Swan DC, Tucker RA, Tortolero-luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP : Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 1030-1034, 1999
  - 30) Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M : High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 10 : 45-52, 2001
  - 31) Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, Herrero R, Castella X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM : Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New Engl. J. Med.* 348 : 518-527, 2003
  - 32) Davidson M, Schnitzer PG, Bulkow LR, Parkinson AJ, Schloss ML, Fitzgerald MA, Knight JA, Murphy CM, Kiviat NB, Toomey KE, Reeves WC, Schmid DS, Stamm WE : The prevalence of cervical infection with human papillomaviruses and cervical dysplasia in Alaska native women. *J. Infect. Dis.* 169 : 792-800, 1994
  - 33) Gloria YF Ho, Bierman R, Leah Beardsley NP, Chang CJ, Burk RD : Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New Engl. J. Med.* 338 : 423-428, 1998
  - 34) Nakagawa H, Sugano K, Fujii T, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S : Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by PCR single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. *Anticancer Res.* 22(3) : 1655-60, 2002
  - 35) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2766-2770, 1989
  - 36) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5 : 874-879, 1989
  - 37) Yoshikawa H, Nagata C, Noda K, Nozawa S, Yajima A, Sekiya S, Sugimori H, Hirai Y, Kanazawa K, Sugase M, Shimizu H, Kawana T : Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *Br. J. Cancer* 80 : 621-624, 1999
  - 38) 子宮頸癌取扱い規約 (改訂第2版) 日本産科婦人科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会編
  - 39) 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 Research* 67 (2) : 127-139, 2000
  - 40) zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer : from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*

- 2(5) : 342-350, 2002
- 41) Cullen AD, Reid R, Campion M, Lorincz AT : Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* 65 : 606-612, 1991
- 42) Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Chitemerere M, Berner A, Hagmar BM : High incidence of human papillomavirus in 146 cervical carcinomas. A study using three different pairs of consensus primers, and detecting viral genomes with putative deletions. *Eur. J. Cancer* 31A : 1511-1516, 1995
- 43) Milde-Langosch K, Schreiber C, Becker G, Loning T, Stegner H : Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction. *Hum. Pathol.* 24 : 590-594, 1993
- 44) Yamanaka Y, Forslund O, Teshima H, Hasumi K, Kitagawa T, Hansson BG : Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix detected by polymerase chain reaction (PCR). *Gynec. Oncol.* 53 : 190-195, 1994
- 45) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Young N : The 2001 Bethesda System. *JAMA.* 287 : 2114-2119, 2002
- 46) Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Nomura T, Shroyer KR : Analysis of clonality by amplification of short tandem repeats. *Diagn. mol. Pathol.* 3 : 292-297, 1994
- 47) Enomoto T, Haba T, Fujita M, Hamada T, Yoshino K, Nakashima R, Wada H, Kurachi H, Wakasa K, Sakurai M, Murata Y, Shroyer KR : Clonal analysis of high-grade squamous intra-epithelial lesions of the uterine cervix. *Int. J. Cancer.* 73 : 339-344, 1997
- 48) Levi JE, Kleter B, Quint WG, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 9 : 3341-3345, 2002
- 49) Crum CP, Rivera MN. Vaccines for cervical cancer. *The Cancer Journal.* 9(5) : 368-376, 2003
- 50) Roden RB, Ling M, Wu TC. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Human Pathol.* 35(8) : 971-982, 2004
-

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

こ だま けい いち  
児 玉 桂 一

(平成 16 年 12 月 14 日受付)

Key Word : type 1 diabetes mellitus, IGF-1, nonobese diabetic mouse

現在、我が国では糖尿病患者数が全国で約 1620 万人に達すると言われ (1)、長期の高血糖状態が虚血性心疾患、脳血管障害などの動脈硬化性疾患や腎不全といった致命的疾患に罹患するリスクを高めることが知られている (2, 3)。このうち、中高年の肥満者に多く発症する 2 型糖尿病が全体の 90% 以上を占め、小児や若年者に多く発症する 1 型糖尿病は数%に過ぎないが、1 型糖尿病患者は年間に少なくとも 500 人が発症しており、その総数は決して少なくない (4)。

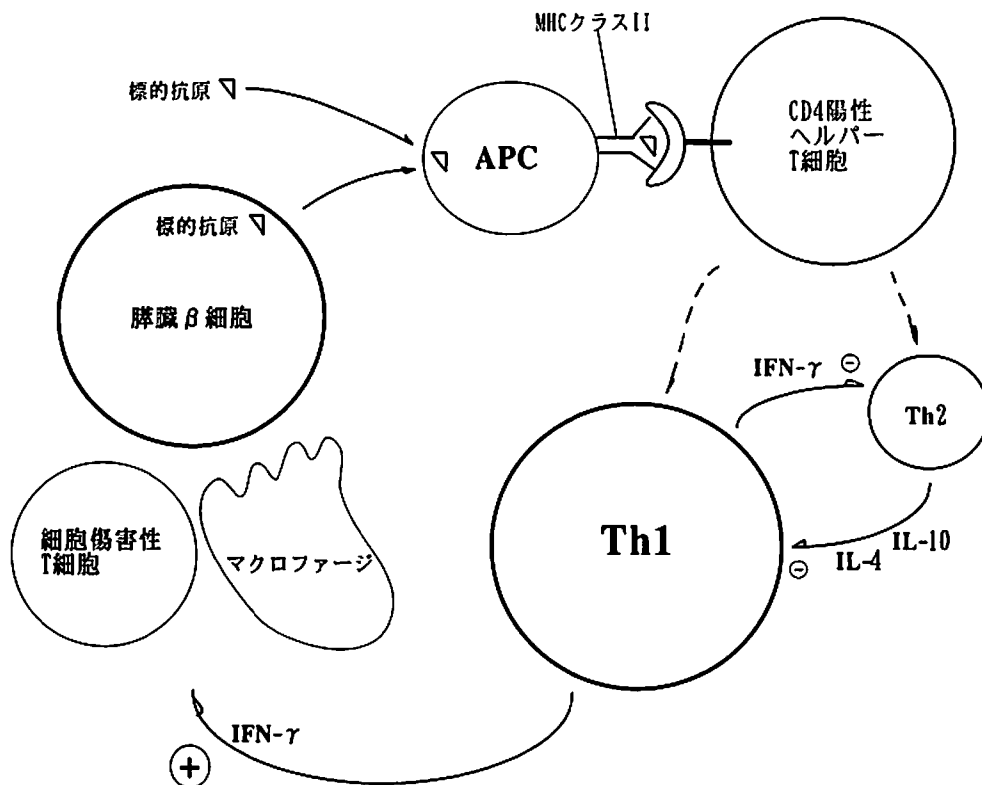
肥満が原因となってインスリン抵抗性を生じ相対的なインスリンの欠乏によって高血糖状態となる 2 型糖尿病と異なり、1 型糖尿病は自己免疫的機序によりインスリンを分泌する膵ランゲルハンス島 (膵島) の  $\beta$  細胞自体が破壊されることによってインスリンの絶対的欠乏が生じ、著明な高血糖状態に陥る疾患である。よって、1 型糖尿病の治療にはインスリンの投与が不可欠であり、適切なインスリン治療を行わなかった場合、代謝失調に至り致命的となるため、かつてはインスリン依存型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus : IDDM) と呼ばれていた (5)。実際、1920 年代に糖尿病患者へのインスリン投与が臨床応用されるまで、多くの 1 型糖尿病患児が発症後数週間で亡くなっていたが、現代ではインスリン治療が一般的に定着し、また、各種の合併症に対する医療、治療技術が進歩したことによりその生命予後は格段に改善された。しかし、最近の 1 型糖尿病患児の累積死亡率を調べた長期予後の報告によれば、依然、急

性合併症や腎症による 1 型糖尿病患児の死亡率は一般人口と比較して 2-7 倍も高く (6, 7)、さらに、生命予後が大幅に改善された反面、慢性的な高血糖状態による合併症の出現が増え、30 歳以上の 1 型糖尿病患者においては、心血管障害によって死亡する例が増加しており、その死亡リスクは一般人口の 10 倍以上になるとされている (8)。このように、小児や若年層に多く発症する 1 型糖尿病は血糖状態を良好に保つため頻回のインスリン注射を長期間必要とするだけでなく、また、そのコントロールが容易でないため、多くの急性、慢性の合併症が出現することから、患者の生活の質 (Quality of Life : QOL) を著しく低下させると言え、1 型糖尿病の発症メカニズムの解明と発症予防法や根本的治療法の確立に向けた取り組みは今後の糖尿病研究において最重要課題のひとつと考えられる。

現在、1 型糖尿病の発症機序として nonobese diabetic (NOD) マウスの研究から得られた知見に基づいた第 1 図のようなモデルが考えられている (9)。すなわち、自己免疫機序による膵島の  $\beta$  細胞破壊の最初のステップは抗原提示細胞 (antigen presenting cell : APC) が  $\beta$  細胞 (もしくはその他の細胞) から抗原を取り込み、それをプロセスした後、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex : MHC) クラス II 分子を介して T 細胞に提示することにより開始される。T 細胞表面には T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) が存在し、MHC クラス II-抗原と結

本論文は、Kodama K, Shimada A, Funae O, Morimoto J, Irie J, Shigihara T, Oikawa Y, Tokui M, Watanabe K, Saruta T : Insulin-like growth factor -1 (IGF-1) - derived peptide protects against diabetes in NOD mice. *Autoimmunity* 37 : 481-7, 2004 の一部を含む (<http://www.tandf.co.uk> を参照)。





第1図 1型糖尿病の発症機序のモデル

合することにより T 細胞が活性化される。活性化される T 細胞は T-ヘルパー (Th) 細胞と呼ばれ、表面マーカーは CD4 陽性を示し、Th1, Th2 といった2つのサブセットに抗原刺激を受けた後、分化することが知られている。一般に Th1 細胞は主にウイルスや細胞内のバクテリアに細胞障害性に反応し、Th2 細胞は IgG, IgM などの抗体産生により細胞外のバクテリアなどに反応する細胞であるとされており、1 型糖尿病の発症前には膵島抗原の刺激を受けたこれらの細胞は膵島周囲に集合し、まず膵島周囲炎の状態が形成され、この時点で初期感作に関わった抗原だけでなく他の多様な膵島内抗原 (総じて標的抗原と呼ぶ) に反応する T 細胞も出現する。しかし、この両 T-ヘルパー (Th) 細胞による膵島周囲炎が直接、膵臓β細胞の破壊に繋がるわけではなく、発症直前に何らかの原因により Th1/Th2 のバランスが Th1 優位になることによりβ細胞の傷害 (膵島内炎) が生じると考えられている (10)。つまり、Th1 細胞は IFN- $\gamma$  (インターフェロン- $\gamma$ )、IL-2 (インターロイキン-2)、TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子) といったサイトカインを分泌することによりマクロファージ、CD8 陽性 T 細胞などの細胞障害性細胞を活性化し、これらの細胞 (マク

ロファージ、CD4 及び CD8 陽性 T 細胞) が膵島内に浸潤することにより  $\beta$  細胞が直接もしくは間接的に破壊されるのだが、これに対し Th2 細胞は IL-4, IL-10 といったサイトカインを産生することにより Th1 細胞の機能を制御して  $\beta$  細胞の破壊 (糖尿病の発症) を抑制しているとされている (11)。

このような 1 型糖尿病の発症機序から糖尿病の予防法を考えた場合、重要なポイントとして 1) マクロファージ、CD8 陽性 T 細胞といったエフェクター細胞の排除、機能抑制、2) 初期感作抗原に対する末梢性免疫寛容の誘導、3) Th2 細胞を初めとするサブプレッサー T 細胞の賦活化、などが挙げられる (9)。1) についてはサイクロスポリン (12) や抗 IFN- $\gamma$  抗体 (13) の投与などが試みられており一定の効果を認めているが、根本的な治療ではなく積極的な抑制効果は期待できないと思われる。これに対し、2) は標的抗原の中でも最初の T 細胞の感作に関わる抗原を、膵島周囲炎が生じる前に、投与することにより T 細胞の抗原に対する反応性の消失 (アナジー) を誘導するものであり、もし、これが成功すれば膵島炎は一切起こることはなく 1 型糖尿病は完全に抑制され、根本的な治療に繋がるものと考えられる (ただし、

現時点では初期感作抗原が何であるかは確定されていない。3)については候補標的抗原を投与することにより抗原反応性のTh2細胞を優位に誘導し、膵島炎の程度にはあまり影響がないものの、β細胞の破壊は免れるという方法である。実際、2)と3)の治療法開発を目指してIDDMの第一近親者にインスリンを発症前に投与して糖尿病の発症を予防する大規模試験(14)がアメリカで実施されており、今後、1型糖尿病の根本的治療や発症予防に繋がると考えられる標的抗原の確定に関する研究はさらに重要性を増してくるものと思われる。

これまでの1型糖尿病における標的抗原(マクロファージに貪食されT細胞に提示されるペプチド)を検索する研究ではグルタミン酸脱炭酸酵素(glutamic acid decarboxylase: GAD)(以下、GADと略す)(15, 16)、インスリン(とくにB鎖の9-23)(17-19)、熱ショック蛋白(heat shock protein)(20-22)などの膵島β細胞内の蛋白とその中の特定のミノ酸配列が候補抗原として提唱されてきたが、未だこれが確定されるまでには至っていない。そこで、著者は視点を変え、T細胞の初期の感作が膵島の外で起こり、これが膵島へのT細胞(リンパ球)の浸潤(膵島炎)と膵島β細胞の破壊の原因となる可能性を考え、その膵島外標的抗原の候補としてインスリン様成長因子(Insulin-like growth factor-1: IGF-1)(以下、IGF-1と略す)の可能性に着目した。IGF-1は主に肝臓で産生され、インスリンにホモロジー(相同性)を持つ70個のミノ酸からなるペプチドであるが、その内容は高度にインスリンとホモロジーのある部分とホモロジーのない部分に分かれている。著者はIGF-1こそ最初の標的抗原であり、IGF-1に対するT細胞の感作は最初このインスリンとホモロジーのない部分で生じ、それが膵島炎における免疫反応の過程でT細胞の反応性がインスリンと高度にホモロジーのある部分に移行(エピトープ拡大)し、これが糖尿病の発症(インスリン反応性のヘルパーT細胞の出現及びβ細胞の破壊)に繋がっていくのではないかと推察し、今回の実験系を立案した。

著者は、今回の実験でヒト1型糖尿病の病因研究のため繁用されてきたモデル動物の一つであるNODマウスを使用した。NODマウスは膵島細胞抗体に代表される種々の1型糖尿病と同様の自己抗体が血清中から検出されており、ヒト1型糖尿病に類似した性質を数多く持つ優れたモデル動物である。NODマウスでは生後5~6週頃より、膵島へのリンパ球(T細胞、マクロファージ)の浸潤(膵島炎)を認め、生後12週齢以降に顕性糖尿病を発症し、累積糖尿病発症率は雌性で30週齢頃まで

に約70%に達する。著者はこの雌性マウスを使用して、膵島炎の出現する前の4週齢の段階でIGF-1、GAD、インスリンといった候補抗原を免疫賦活剤のアジュバント(incomplete Freund's adjuvant: IFA)(以下、アジュバントと略す)とともに皮下投与し、その後の糖尿病の発症抑制効果、膵島炎の程度を観察し、脾細胞の各種抗原蛋白に対するTh1タイプのサイトカイン反応(IFN-γ)とTh2タイプのサイトカイン反応(IL-4)を検討し、膵島炎の起こっている膵臓局所のサイトカイン発現(IFN-γ(Th1タイプ)及びIL-4、IL-10(Th2タイプ))を検討した。

## 対象および方法

### 動物

4週齢の雌性NODマウスを日本クレア(東京)から購入し、慶應義塾大学医学部動物センターにて、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、本実験は動物実験委員会の承認を得た(承認番号021017(2002年))。

### 実験1: 1型糖尿病の標的抗原としてのIGF-1の検討

#### (1) 糖尿病発症率

4週齢の雌性NODマウスを4群に分け、IGF-1(n=13; 藤沢薬品工業の大熊博士より供与、70個の全てのミノ酸配列を含む)(以下、whole IGF-1と称す)、GAD(n=15; RSR社、英国)、レギュラーインスリン(n=12; ノボノルディスクファーマ社、デンマーク)といった候補抗原蛋白(12.5 μg/匹)を免疫賦活剤であるアジュバントと混和して皮下に注射した。対照として抗原を何も加えないもの(アジュバント(IFA)のみ)を皮下注射した群(n=21)を用意した。全てのマウスにおいて尿糖が12週齢より36週齢まで、週に2回テステープ(塩野義、大阪)にて検査され、この中から尿糖陽性のものについてさらに血糖が簡易血糖測定器(グルテストエース: 三和科学、名古屋)を用いて測定され、血糖値が250 mg/dl以上となったものを糖尿病と判定し、各投与群における36週齢までの糖尿病発症率が検討された。

#### (2) 膵組織における膵島炎の評価

糖尿病の発症経過を観察後、36週齢で糖尿病未発症マウスを屠殺して、膵組織を摘出し、10%ホルマリンに固定してパラフィンに包埋した。標本は各検体につき

5片作製され、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、光学顕微鏡下で膵島炎の程度を下記の基準に従い評価した。各マウスにつき少なくとも33個の膵島が盲目的に検査された。

<膵島炎の評価基準>

正常膵島：膵島内およびその周囲にリンパ球浸潤を認めない。

膵島周囲炎：膵島周囲にリンパ球の浸潤を認めるが、膵島内には認めない。

膵島内炎：膵島内にリンパ球の浸潤を認める。

(3) フローサイトメーターによる脾細胞のサイトカイン反応の評価

4週齢の雌性 NOD マウスを4群に分け、候補抗原蛋白 (12.5 µg/匹) (whole IGF-1 (n=3), GAD (n=3), インスリン (n=3)) をアジュバントと混和して皮下投与し、対照としてアジュバントのみを投与した群 (n=2) を用意した。

これらのマウスを8週齢で屠殺して無菌的に脾臓を摘出し、ピンセットを用いて遊離細胞に単離し、5%仔牛胎児血清、ペニシリン 100 万 U/ml, ストレプトマイシン 100 mg/l を含んだ RPMI-1640 (Gibco 社, 米国) (以下、メジウム) に浮遊させた。この遊離脾細胞をメジウム 200 µl あたり  $1 \times 10^6$  個に調整後、96 穴マイクロプレート (コーニング, 米国) に分注し、さらに、これを刺激するため whole IGF-1, GAD, もしくはインスリンを最終濃度がそれぞれ 10 µg/ml になるようにして加えた。対照として刺激ペプチドを何も加えないものを用意した。その後、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下で、72 時間培養し、終了4時間前にプレファルジン A (Sigma 社, 米国) を最終濃度が 10 µg/ml になるようにして添加し、培養終了後、各穴より 150 µl の検体を 5 ml の試験管に採取し、さらに、CYchrome 標識抗 CD4 抗体 (H129.19; Pharmingen 社, 米国) を加えて、室温で 15 分間反応させた。この後、FACS lysing solution (Becton-Dickinson 社, 米国) を 4 ml 添加、10 分間静置し、0.1%仔牛胎児血清加リン酸緩衝生理食塩水にて洗浄後、500 µl の FACS permeabilizing solution (Becton-Dickinson 社) を加え室温暗所で 10 分間反応させた。さらに、0.1%仔牛胎児血清加リン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した後、細胞内サイトカインを染色するため、FITC 標識抗 IFN-γ 抗体 (IgG1; Pharmingen 社) と PE (phycoerythrin) 標識抗 IL-4 抗体 (IgG2b; Pharmingen 社) を各 3 µl 添加して、暗所、室温下で 30 分間反応させた。対照として FITC 標識 IgG1 と PE 標識 IgG2b を加えたものを別に用意した。

これらの染色された細胞からフローサイトメーター (FACScan, Becton-Dickinson 社) を用いて生細胞表面の CD4 抗原をもとに CD4 陽性 T 細胞を選定し、その中でさらに細胞内サイトカインの蛍光強度を測定して、カットオフ値に基づいて IFN-γ 陽性細胞、IL-4 陽性細胞を特定した。各群において少なくとも 50,000 個の CD4 陽性 T 細胞がカウントされ、各サイトカインの陽性細胞率を 50,000 個の CD4 陽性 T 細胞のうちに含まれる陽性細胞の数で表現した。

(4) 膵臓局所のサイトカイン発現の半定量的リアルタイム PCR 解析

前述の脾細胞のサイトカイン反応の評価実験 (実験 1 (3)) で使用されたマウス (8 週齢で屠殺) より脾臓と同時に膵臓が分離された。この膵臓から RNA が Rneasy Mini Kit (Qiagen 社) にて抽出され、それらの RNA は全て *Not I*-d (T) と First-Strand cDNA synthesis kit (ファーストストランド cDNA 合成キット; Pharmacia Biotech 社, 英国) を用いて逆転写され、ファーストストランド cDNA が作成され、サイトカイン mRNA (メッセンジャー RNA) の半定量 PCR 解析に供されるまで -80°C で冷凍保存された。

次に、得られたファーストストランド cDNA を鋳型として IFN-γ, IL-4, IL-10 の3つのサイトカインについて mRNA の半定量的測定が TaqMan Fluorogenic Detection System (PE Applied Biosystems, 米国) によるリアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて行われた (23)。すなわち、これらのサイトカインに対するプローブの 5'側は蛍光リポーターの 6-carboxylfluorescein (FAM) で、3'側はクエンチャー (消光分子) の carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) で修飾されており (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 (Takara, 大津) 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という仕組みになっている。この蛍光量を ABI Prism 7700 sequence detector (PE Applied Biosystems) を用いて測定することにより、目的遺伝子の増幅の程度をリアルタイムに定量し、目的の mRNA 量を間接的に同定するのが半定量的リアルタイム PCR 解析の原理である。この実験では、対照として β-actin の mRNA 量も同時に測定され、各

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

遺伝子名	5'プライマー	3'プライマー	TaqMan プローブ
β-アクチン	5'-CAACGTC ACACTTCAT GATGGA-3'	5'-TCCAGCCT TCCTTCTTG GGTA-3'	5'-TGTAGTT TCATGGATG CCACAGGAT TCC-3'
IFN-γ	5'-CAGCAAC AGCAAGGCG AAA-3'	5'-GCTTCCTG AGGCTGGAT TCC-3'	5'-AGGTCAA CAACCCACA GGTCCAGCG- 3'
IL-10	5'-CACAAAG CAGCCTTGC AGA-3'	5'-GTAAGAG CAGGCAGCA TAGCA-3'	5'-AAGAGAG CTCCATCAT GCCTGGCTC A-3'
IL-4	5'-TCTCATG GAGCTGCAG AGACTCT-3'	5'-GCTCTTT AGGCTTTCC AGGAAGT-3'	5'-CTGCACCA TGAATGAGT CCAAGTCCA CA-3'

サイトカイン mRNA のレベルは β-actin の mRNA 量に対する比で補正して示された (尚, 本研究で使用したプライマーと TaqMan プローブを第1表に示した)。

#### 実験2：IGF-1 内エピトープ同定の試み

実験1にて1型糖尿病におけるIGF-1の標的抗原としての可能性が示唆されたが、本実験ではIGF-1のどの部位がエピトープ(マクロファージのMHCクラスII分子に結合してヘルパーT細胞に提示されるペプチド)として機能しているのかを明らかにするためIGF-1をインスリンとホモロジー(相同性)のある部分(IGF-1 8-23: AELVDALQFVCGDRGF)とホモロジーのない部分(IGF-1 24-41: YFNKPTGYGSSRRAPQT, IGF-1 50-70: RSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA)に分け、3種類のペプチドを合成し(旭テクノグラス、千葉)、これらの合成ペプチドを各々NODマウスに投与して実験1と同様に糖尿病発症率、膵島炎、脾細胞のサイトカイン反応、膵局所のサイトカイン発現等を評価した。

##### (1) 糖尿病発症率

4週齢の雌性NODマウスを4群に分け、IGF-1 8-23 (n=15)、IGF-1 24-41 (n=15)、IGF-1 50-70 (n=15)といったIGF-1の一部を構成するペプチド(12.5 μg/匹)をアジュバントと混和して皮下投与した。対照として抗原を何も加えないもの(アジュバントのみ)

を皮下注射した群(n=21)を用意した。実験1と同様に糖尿病の発症を判定し、各投与群における37週齢までの糖尿病発症率を検討した。

##### (2) 膵組織における膵島炎の評価

各群で糖尿病の発症経過を観察後、37週齢で糖尿病未発症マウスを屠殺して、膵組織を摘出し、実験1と同様に膵島炎の程度を評価した。

##### (3) フローサイトメーターによる脾細胞のサイトカイン反応の評価

4週齢の雌性NODマウスを4群に分け、IGF-1合成ペプチド(12.5 μg/匹)(IGF-1 8-23 (n=3)、IGF-1 24-41 (n=3)、IGF-1 50-70 (n=3))をアジュバントと混和して皮下投与し、対照としてアジュバントのみを投与した群(n=2)を用意した。

これらのマウスを8週齢で屠殺して無菌的に脾臓を摘出、遊離細胞に単離し、実験1と同様の方法でwhole IGF-1, GAD, インスリン, IGF-1合成ペプチド(IGF-1 8-23, IGF-1 24-41もしくはIGF-1 50-70)といった各刺激に対するサイトカイン反応がフローサイトメーターを用いて評価された。

##### (4) 膵臓局所のサイトカイン発現の半定量的リアルタイムPCR解析

前実験(実験2(3))で使用されたマウスから膵臓も同時に分離され、IFN-γ, IL-4, IL-10といったサイトカインのmRNAのレベルが実験1と同様に半定量的リアルタイムPCR解析を用いて測定された。

#### 統計処理

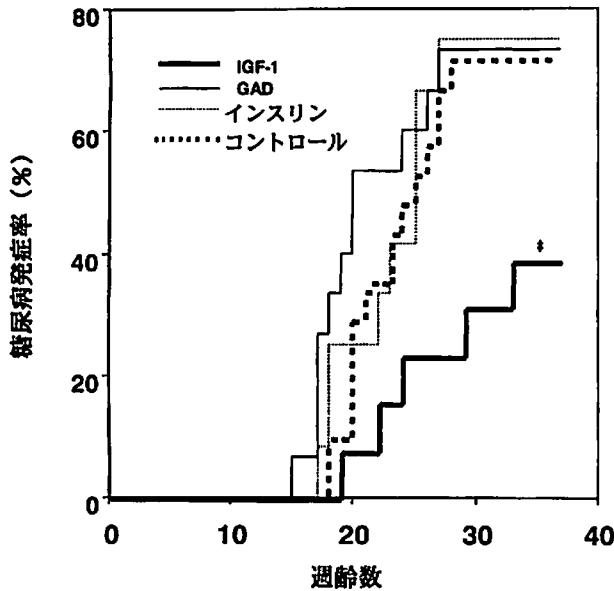
全ての結果は、平均値±標準誤差で表示した。糖尿病発症率の各群間の比較にはKaplan-Meier testを用い、膵島炎の程度、脾細胞のサイトカイン反応、膵局所のサイトカイン発現の各群間比較にはMann-Whitney U testを使用した。p値<0.05を統計学的に有意差があると判定した。

## 成 績

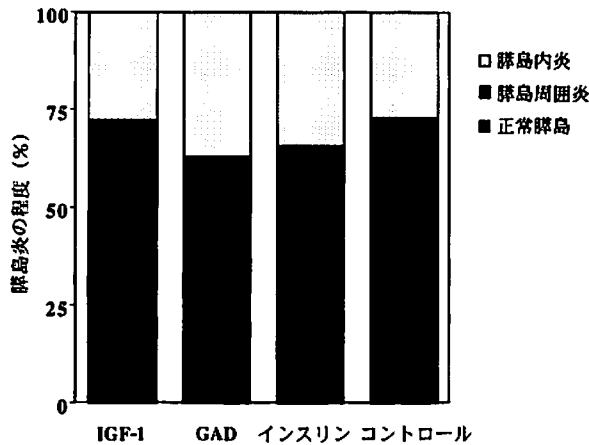
#### 実験1：1型糖尿病の標的抗原としてのIGF-1の検討

##### (1) whole IGF-1投与による糖尿病発症抑制効果の検討

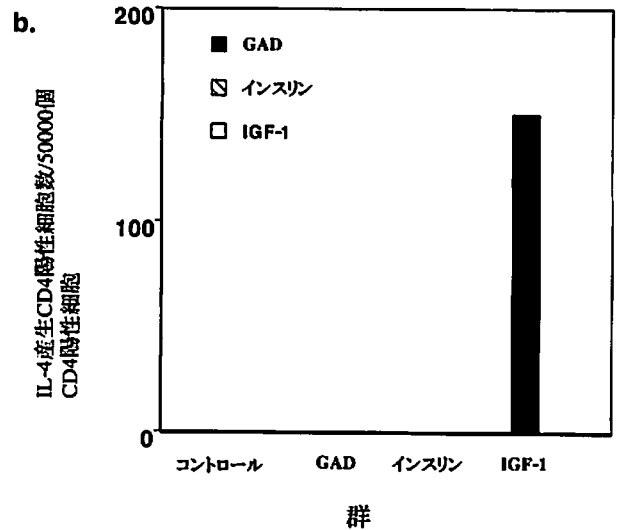
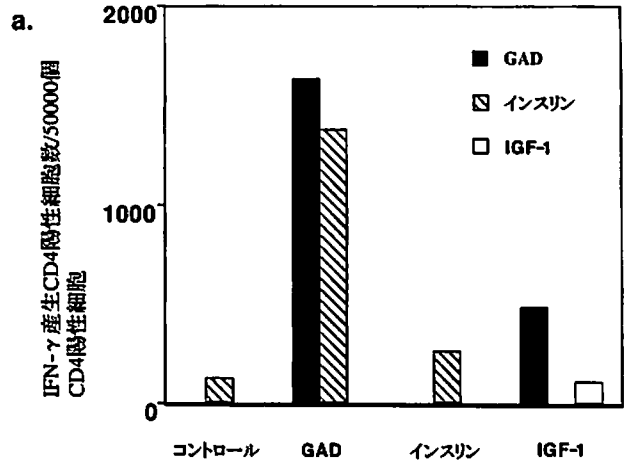
1型糖尿病の候補抗原であるwhole IGF-1 (n=13)、GAD (n=15)、インスリン (n=12)を4週齢の雌性NODマウスに投与したところ、36週齢までの糖尿病の累積発症率はwhole IGF-1投与群で38.5% (5/13)、GAD投与群で73.3% (11/15)、インスリン投与群で



第2図 IGF-1, GAD, インスリン, IFA (コントロール) の各投与群における36週齢までの累積糖尿病発症率。  
\* $p < 0.05$  vs. GAD, インスリン, コントロール群 (Kaplan-Meier test).



第3図 IGF-1, GAD, インスリン, IFA (コントロール) の各投与群の36週齢の時点での糖尿病未発症マウスにおける膵島炎の有無と程度 (IGF-1投与群 (n=8): 正常膵島 67.7%, 膵島周囲炎 4.8%, 膵島内炎 27.5%; GAD投与群 (n=4): 正常膵島 50.0%, 膵島周囲炎 13.2%, 膵島内炎 36.8%; インスリン投与群 (n=3): 正常膵島 56.6%, 膵島周囲炎 9.4%, 膵島内炎 34.0%; コントロール群 (n=6): 正常膵島 61.2%, 膵島周囲炎 11.9%, 膵島内炎 26.9%).



第4図 IGF-1, GAD, インスリン, IFA (コントロール) の各投与群における脾細胞の抗原特異的サイトカイン反応。(a) IFN-γ産生 CD4陽性細胞数, (b) IL-4産生 CD4陽性細胞数.

75.0% (9/12), 対照群で71.4% (15/21)とIGF-1投与群で他群と比較して有意に糖尿病発症率が抑制されていた (第2図: Kaplan-Meier test;  $p < 0.05$ ).

(2) 膵島炎の評価

36週齢で各群の糖尿病未発症のマウスについて膵島炎の有無と程度を評価したところ, 統計学的に有意な差は認められなかったが, IGF-1投与群で膵島炎が他群と比較して抑制されている (正常膵島が多い) 傾向が認められた (第3図).

第2表 IGF-1, GAD の各投与群における膵臓局所の Th1/Th2 サイトカイン発現比

群	IFN $\gamma$ /IL-4	IFN $\gamma$ /IL-10
IGF-1	2.8 $\times 10^5$	4.2 $\times 10^3$
GAD	7.8	28.6

(3) 脾細胞の候補抗原刺激に対するサイトカイン反応の検討

1型糖尿病の候補抗原 (whole IGF-1 (n=3), GAD (n=3), インスリン (n=3)) を皮下投与されたマウスから脾細胞を8週齢で分離し, 各々の候補抗原 (whole IGF-1, GAD もしくはインスリン) によって刺激したのち, フローサイトメーターを用いて CD4 陽性 IFN- $\gamma$  産生ヘルパー T 細胞 (Th1 タイプ) と CD4 陽性 IL-4 産生ヘルパー T 細胞 (Th2 タイプ) の数を測定し, 候補抗原刺激に対するサイトカイン反応を検討した.

第4図に示すように whole IGF-1 投与群において GAD 刺激に対する IL-4 産生 CD4 陽性細胞 (Th2 タイプのヘルパー T 細胞) が多く認められ (150/50,000 CD4 陽性細胞), GAD 投与群では GAD 刺激 (1,625/50,000 CD4 陽性細胞) とインスリン刺激 (1,375/50,000 CD4 陽性細胞) に対して IFN- $\gamma$  を産生する CD4 陽性細胞 (Th1 タイプのヘルパー T 細胞) が多数出現し, インスリン投与群でもインスリン刺激 (260/50,000 CD4 陽性細胞) に対して IFN- $\gamma$  を産生する CD4 陽性細胞 (Th1 タイプのヘルパー T 細胞) が認められた.

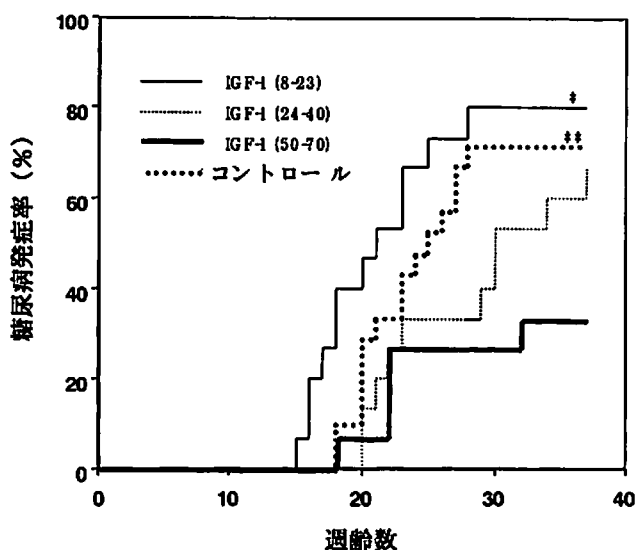
(4) 膵臓局所におけるサイトカイン発現の検討

実験1(3)で使用された各群のマウスから膵臓を同時に採取し, 膵臓 (局所) における Th1 タイプ (IFN- $\gamma$ ) と Th2 タイプ (IL-4, IL-10) のサイトカイン mRNA レベルを測定した. IGF-1 投与群において Th1/Th2 サイトカイン比の低下 (Th2 タイプのサイトカインの発現が優位の状態) が GAD 投与群と比較して認められた (第2表参照).

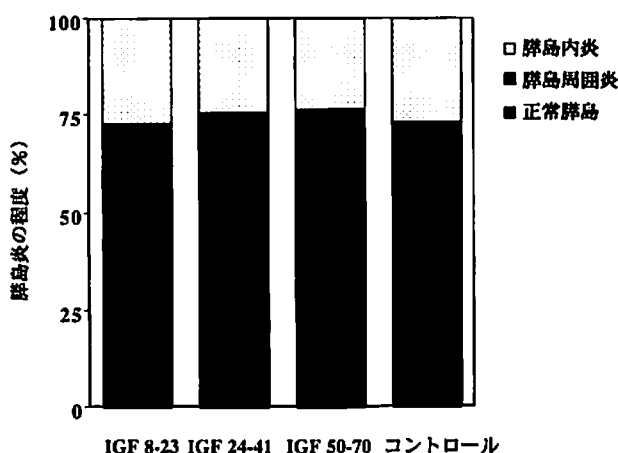
実験2: IGF-1 内エピトープ同定の試み

(1) IGF-1 構成ペプチド投与による糖尿病発症抑制効果の検討

実験1において著者は IGF-1 の皮下投与によって Th2 タイプのサイトカイン反応が誘導されることにより糖尿病の発症が抑制される可能性を示した. そこで, IGF-1 のどの部位のペプチド鎖が実際にエピトープとし



第5図 IGF-1 8-23, 24-41, 50-70 の各合成ペプチド, IFA (コントロール) の投与群における36週齢までの累積糖尿病発症率. \*p<0.01 vs. IGF-1 50-70 合成ペプチド投与群, \*\*p<0.02 vs. IGF-1 50-70 合成ペプチド投与群 (Kaplan-Meier test).



第6図 IGF-1 8-23, 24-41, 50-70 の各合成ペプチド, IFA (コントロール) の投与群の糖尿病未発症マウスにおける膵島炎の有無と程度 (IGF-1 8-23 投与群 (n=3): 正常膵島 53.8%, 膵島周囲炎 19.2%, 膵島内炎 26.9%; IGF-1 24-41 投与群 (n=5): 正常膵島 54.5%, 膵島周囲炎 21.2%, 膵島内炎 24.2%; IGF-1 50-70 投与群 (n=10): 正常膵島 68.3%, 膵島周囲炎 8.3%, 膵島内炎 23.3%; コントロール群 (n=6): 正常膵島 61.2%, 膵島周囲炎 11.9%, 膵島内炎 26.9%).

て発症抑制に関わっているのか検討するため、IGF-1をインスリンとホモロジーのある部分 (IGF-1 8-23) とない部分 (IGF-1 24-41 と IGF-1 50-70) に分割して3種類のペプチドを合成して4週齢の雌性 NOD マウスに投与した。各群の37週までの糖尿病の累積発症率は IGF-1 50-70 投与群で 33.3% (5/15), IGF-1 8-23 投与群で 80.0% (12/15), IGF-1 24-41 投与群で 66.6% (10/15), 対照群で 71.4% (15/21) と IGF-1 50-70 投与群で他群と比較して有意に糖尿病発症率が抑制された (第5図: Kaplan-Meire test;  $p < 0.01$ )。

(2) 膵島炎の評価

37週齢で各群の糖尿病未発症のマウスについて膵島炎の有無と程度を評価したところ、統計学的に有意な差は認められなかったが、IGF-1 50-70 投与群で膵島炎が他群と比較して抑制されている (正常膵島が多い) 傾向が認められた (第6図)。

(3) 脾細胞の候補抗原刺激に対するサイトカイン反応の検討

IGF-1 構成ペプチド (IGF-1 8-23 (n=3), 24-41 (n=3), 50-70 (n=3)) を皮下投与されたマウスから脾細胞を8週齢で分離し、各々の候補抗原 (whole IGF-1, GAD, インスリン, IGF-1 8-23, 24-41, 50-70) によって刺激したのち、フローサイトメーターを用いて

第3表 IGF-1 8-23, 50-70の各合成ペプチド投与群における膵臓局所の Th1/Th2 サイトカイン発現比

群	IFN $\gamma$ /IL-4	IFN $\gamma$ /IL-10
IGF-1 8-23	2.8	2.6
IGF-1 50-70	1.3	1.6

CD4 陽性 IFN- $\gamma$  産生ヘルパー T 細胞もしくは CD4 陽性 IL-4 産生ヘルパー T 細胞の数を測定した。

第7図に示すように、IGF-1 50-70 投与群において GAD 刺激 (2,705/50,000 CD4 陽性細胞), インスリン刺激 (1,865/50,000 CD4 陽性細胞), IGF-1 8-23 刺激 (2,320/50,000 CD4 陽性細胞), IGF-1 50-70 刺激 (2,605/50,000 CD4 陽性細胞) に対して IL-4 を産生する CD4 陽性細胞 (Th2 タイプのヘルパー T 細胞) が数多く認められた。

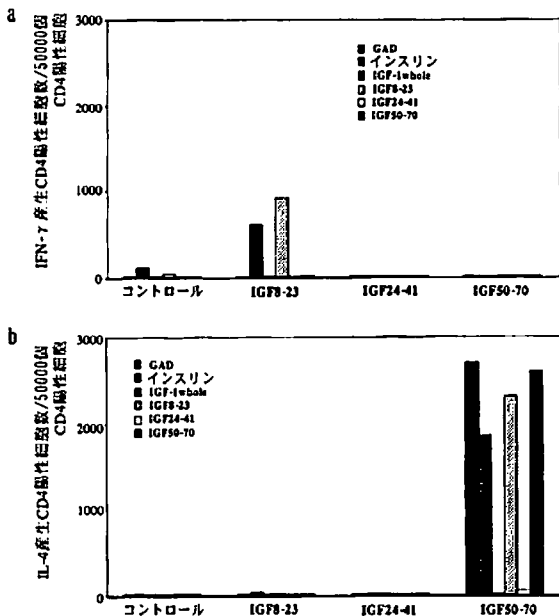
IFN- $\gamma$  を産生する CD4 陽性細胞 (Th1 タイプのヘルパー T 細胞) に関しては IGF-1 8-23 投与群においてインスリン刺激 (610/50,000 CD4 陽性細胞) と IGF-1 8-23 刺激 (930/50,000 CD4 陽性細胞) に対して比較的多く認められ、コントロール群においてはインスリン刺激 (125/50,000 CD4 陽性細胞) と IGF-1 8-23 刺激 (45/50,000 CD4 陽性細胞) に対して少数認められた。

(4) 膵臓局所におけるサイトカイン発現の検討

実験2(3)で使用された各群のマウスから膵臓も同時に採取され、膵臓 (局所) における Th1 タイプ (IFN- $\gamma$ ) と Th2 タイプ (IL-4, IL-10) のサイトカイン mRNA レベルを測定した。IGF-1 50-70 投与群において Th1/Th2 サイトカイン比の低下 (Th2 優位の状態) が IGF-1 8-23 投与群と比較して認められた (第3表参照)。

考 察

これまでの1型糖尿病の研究において、糖尿病発症プロセスの最初のトリガーとなる標的抗原 (マクロファージに貪食され MHC クラス II 分子を介してヘルパー T 細胞に提示されるペプチド) の候補として、GAD (15, 16), インスリン (17, 18), 熱ショック蛋白 (20-22) などの  $\beta$  細胞内の蛋白質が提唱されてきたが、未だその全容が解明されるには至っていない。そこで、著者は仮説として、膵島 ( $\beta$  細胞) の外でヘルパー T 細胞の初期の感作が起こり、これが膵島周囲へのリンパ球の浸潤 (膵島周囲炎) の最初の原因となり、ヘルパー T 細



第7図 IGF-1 8-23, 24-41, 50-70の各合成ペプチド, IFA (コントロール)の投与群における脾細胞の抗原特異的サイトカイン反応。(a) IFN- $\gamma$ 産生 CD4 陽性細胞数。(b) IL-4 産生 CD4 陽性細胞数。

胞の反応性が膵島(β細胞)の中の蛋白にエピトープ拡大することによって糖尿病の発症(β細胞の破壊)に至るという可能性を提唱し、その候補として膵島外(肝臓)で主に産生されインスリンと高度なホモロジーを有するIGF-1に着目した。もし、IGF-1が1型糖尿病における最初の標的抗原として機能しているならば、1型糖尿病のハイリスク者へのIGF-1の先行投与により糖尿病の発症を免疫寛容(アナジー)の誘導により完全に予防できる可能性があり、1型糖尿病の根本的治療への道を開くものと思われた。

1型糖尿病のモデル動物であるNODマウスに対する予防的IGF-1投与について、これまでいくつかの研究が報告されているが、そのどれもが長期にわたり(2~3週間)、頻回に、高用量(100 μg/匹以上)のIGF-1を投与し続けており、その生理学的な効果については検討されているものの、免疫学的な意義については評価されておらず、標的抗原としての可能性を推察するには不十分なものであった(24-26)。そこで、今回、著者はIGF-1の1型糖尿病における標的抗原としての可能性を検討する目的でIGF-1を免疫賦活剤アジュバントと混合して若齢の、未だ膵島炎の起こっていないNODマウスに1回だけ少量皮下投与する実験を行った(実験1)。IGF-1が実際に初期のヘルパーT細胞の感作に関わっているなら、IGF-1投与により免疫寛容(アナジー)が誘導され膵島炎と糖尿病の発症が完全に抑制されると考えられたが、著者の実験では糖尿病の発症は他群(GAD投与群、インスリン投与群)と比較して有意に抑制されたものの、膵島炎の程度に関しては有意な差は認められなかった。また、IGF-1投与マウスにおける脾細胞のサイトカイン反応の実験では、GAD刺激に対するTh2タイプのサイトカイン反応(IL-4の放出)が誘導され、膵組織におけるサイトカイン発現の実験では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の状態が8週齢(膵島周囲炎が明らかになる頃)の段階で認められた。これらのことは、NODマウスに対する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(とくにGAD)に対して反応する免疫抑制性細胞(Th2タイプのサイトカインを放出しTh1を制御するヘルパーT細胞)を誘導することによって糖尿病の発症(Th1によるβ細胞の免疫学的破壊)を膵島周囲炎の段階で抑制していると考えられた。つまり、当初の著者の仮説に反して1型糖尿病の発症においてIGF-1は最初の標的抗原としては機能していないが、IGF-1はβ細胞内でも産生されているという報告もあり(26)、IGF-1がヘルパー

T細胞のエピトープ拡大の過程における抗原カスケードのひとつとして重要である可能性が示唆された。また、以前、Funaeら(27)がNODマウスの自然経過の中での糖尿病の発症とGAD刺激に対する脾細胞のTh2タイプのサイトカイン反応の低下が相関していることを示したが、これは今回の著者の実験結果と合致するものであると考えられ、GADに対して反応する免疫抑制細胞が誘導されることが糖尿病の発症抑制にとって重要である可能性が示唆された。このことは取りも直さずGADの1型糖尿病発症における標的抗原としての重要性を示しているが、一方で、今回の実験ではGADともうひとつの候補抗原インスリンの皮下投与群のマウスにおいて糖尿病の発症抑制が起こらず、GADについてはむしろ促進されている傾向を認めた。この結果は、これまでの多くの研究者によって行われたGAD(28, 29)、やインスリン(30-33)のNODマウスへの投与実験において糖尿病発症抑制効果を認めたことと論を異にしているが、著者は、この結果の相違はGADやインスリンの候補抗原としての可能性を決して否定するものではないと考えている。つまり、これらの発症に与える効果の不一致は投与用量(高容量か、低容量か)や投与経路(皮下注射か、腹腔内注射か、胸腺内投与か)、あるいは投与時期(膵島炎出現前か、後か)の違いによってTh1もしくはTh2優位のTリンパ球が誘導されたことにより生じたものであり(34)、GADやインスリンの抗原性とは関わりのないことと推察された。また、特に、他の研究者がGADの高用量投与(100 μg/匹)で発症抑制を認めていることに反して、我々の実験系の低容量投与(12.5 μg/匹)ではGADによって発症が促進されている傾向が認められたことを考えると、今後GADやインスリンなどの候補抗原を1型糖尿病の発症リスクの高い若年者に予防的に投与する臨床試験に応用する上でその投与量によっては糖尿病の発症を促進する可能性が示唆されたと言え、今後この種の介入試験では、その投与方法に細心の注意を払う必要があると思われた。

次に、著者は、このIGF-1投与による糖尿病の発症抑制がIGF-1のインスリンに対するホモロジーによるものなのかIGF-1に特異的なものなのかを検討するために実験2を行った。以前、ある研究グループが自己免疫糖尿病の細胞移入モデルにおけるインスリン、IGF-1投与による糖尿病発症抑制の実験系で、IGF-1の糖尿病発症抑制効果の成因として1)β細胞の再生促進、2)胸腺上皮細胞の機能変化、3)胸腺細胞の分化に与える影響などの生理学的効果を挙げていたが、その標的抗原としての役割について免疫学的に論じられてはいなかった



(35). 一方、今回の実験系では IGF-1 はアジュバントとともに皮下に1回しか投与しておらず、また、インスリンの同量、同経路の投与では発症抑制を認めていないことから、IGF-1 独自の免疫学的な効果によって発症が抑制されている可能性が高いと考えられた。そこで、著者は IGF-1 を、インスリン内の糖尿病の発症に関わるエピトープとして重要とされる B 鎖の 9-23 ペプチド鎖 (30-34) とホモロジーを有する IGF-1 8-23 とインスリンと全くホモロジーを有しない IGF-1 24-41 と IGF-1 50-70 の3つのペプチド群に分類し、それぞれを NOD マウスに投与して糖尿病の発症抑制効果、脾細胞の抗原特異的なサイトカイン反応、膵組織におけるサイトカイン発現について検討した。その結果、インスリンとホモロジーのない IGF-1 50-70 投与により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、IGF-1 8-23 と IGF-1 50-70 刺激に対しても脾細胞 Th2 タイプの反応が誘導され、膵局所においては Th1/Th2 サイトカイン比の低下 (Th2 優位の状態) が認められていることが示された。一方、インスリンとホモロジーのある IGF-1 8-23 投与では糖尿病の発症が促進されインスリンと IGF-1 8-23 刺激に対する脾細胞の Th1 タイプの反応が誘導された。これらの結果は IGF-1 8-23 投与群ではインスリンとのホモロジー (インスリン様の効果) によって発症促進効果が認められたことを示唆していると思われるが、IGF-1 50-70 投与群では IGF-1 に特異的なアミノ酸配列が NOD マウスにおける糖尿病発症抑制に重要な役割を演じていると考えられた。このことは IGF-1 50-70 のペプチドが Th2 タイプの反応 (膵島内抗原反応性の免疫抑制性細胞の誘導) を介して糖尿病の発症予防をもたらすペプチドとして重要であるだけでなく、1型糖尿病の候補抗原のアミノ酸配列のひとつとして検討されるに値するものであることを示しているものと思われた。ただし、抗原特異的な T 細胞の反応性が IGF-1 50-70 皮下投与群と whole IGF-1 投与群において一致しない部分があるため、糖尿病発症抑制効果のメカニズムが両者において異なる可能性は否定できない。

当初、膵島の外で T 細胞の初期感作が IGF-1 のインスリンとホモロジーのない部分によって生じていると想定し、この実験系を計画したが、結果的には、IGF-1 が直接、初期の段階で糖尿病の発症に関わっている可能性は低いということが示された。しかし、whole IGF-1 もしくは IGF-1 50-70 投与によって膵島炎の程度は有意に減少しないものの、GAD に対する Th2 タイプの反応性が増大することにより糖尿病の発症が抑制される

ことから、

1) IGF-1 は糖尿病発症の最初のヘルパー T 細胞の感作には関わっていないが、1型糖尿病の発症過程における抗原カスケードの途中の段階に存在する。

2) IGF-1 の全配列の中でも IGF-1 50-70 ペプチドのアミノ酸配列が IGF-1 に特異的で1型糖尿病の発症過程における抗原として重要である。

という二つの可能性が示唆されたと言える。今後、IGF-1 50-70 のどの部分が MHC クラス II 抗原と強い親和性を有しているかなどを明らかにすることにより、IGF-1 もしくは IGF-1 50-70 の1型糖尿病発症のリスクを有する若年者への投与が免疫学的に発症を予防する手段として臨床応用される道が開けるものと期待している。

## 総括

1. 1型糖尿病における標的抗原としての IGF-1 の可能性を検討する目的で4週齢 (糖尿病発症以前) の雌性 NOD マウス (1型糖尿病のモデルマウス) に whole IGF-1 を皮下に注射し、その糖尿病発症に及ぼす影響を検討し、whole IGF-1 投与群において糖尿病発症率が他の候補抗原 (GAD, insulin) 投与群やコントロール群に比して有意に低いことが示された。

2. 次に、IGF-1 のどの部分が糖尿病の発症抑制に関与しているのか明らかにする目的で IGF-1 を構成する3種類のペプチド (8-23: AELVDALQFVCGDRGF 24-41: YFNKPTGYGSSRRAPQT, 50-70: RSCDLRR LEMYCAPLKPAKSA) を皮下に注射し、その糖尿病の発症に及ぼす影響を検討し、IGF-1 50-70 投与群において糖尿病発症率が他の2種類のペプチド (8-23, 24-41) 投与群やコントロール群に比して有意に低いことが示された。

3. IGF-1 の一部を構成する3種類の各ペプチド (8-23, 24-41, 50-70) を投与され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 ペプチド投与群において GAD, インスリン, IGF-1 ペプチド (8-23, 50-70) 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示された。

以上のことより IGF-1 を構成するペプチドのうち、特に 50-70 のペプチドが1型糖尿病の発症に関与する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的手段として

IGF-1 50-70 の投与が有効である可能性が示された。

## 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嶋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嶋田朗博士に深謝いたします。また、最後に本研究に御助言、御協力を賜りました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。

なお、本研究のうち、膵臓局所のサイトカインの検討については慶應義塾大学医学部内科学教室嶋原寿一先生が著者と同等の貢献者である。

## 文 献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室：平成14年糖尿病実態調査。2003。
- 2) Gu K, Cowie CC, Harris MI : Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care* 21 : 1138-45, 1998
- 3) 佐々木陽, 上原ます子ほか：15年間にわたるインスリン非依存型糖尿病の追跡調査。(1) 糖尿病患者の生命予後と死因の変化。 *糖尿病* 39 : 31-38, 1996
- 4) Matsuura N, Fukuda K, Okuno A, Harada S, Fukushima N, Koike A, et al : Descriptive epidemiology of IDDM in Hokkaido, Japan : the Childhood IDDM Hokkaido Registry. *Diabetes Care* 21 : 1632-6, 1998
- 5) 葛谷健, 中川昌一, 佐藤謙, 金澤康徳, 岩本安彦, 小林正, 南條輝志男, 佐々木陽, 清野裕, 伊藤千賀子, 島健二, 野中共平, 門脇孝：糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告。 *糖尿病* 42 : 385-404, 1999
- 6) International analysis of insulin-dependent diabetes mellitus mortality : a preventable mortality perspective. The Diabetes Epidemiology Research International (DERI) Study. *Am J Epidemiol* 142 : 612-8, 1995
- 7) 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 : 758-60, 1996
- 8) Dorman JS, LaPorte RE, Kuller LH, Cruickshanks KJ, Orchard TJ, Wagener DK, et al : The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. Mortality results. *Diabetes* 33 : 271-6, 1984
- 9) 小林哲郎：インスリン依存型糖尿病の予防。 *分子糖尿病学の進歩* : 144-150, 1997
- 10) Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathman CG : Beta-cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45 : 1063-7, 1996
- 11) 嶋田朗：IDDM 発症への免疫学的アプローチ。 *分子糖尿病学の進歩* : 89-93, 1996
- 12) Mori Y, Suko M, Okudaira H, Matsuba I, Tsuruoka A, Sasaki A, et al : Preventive effects of cyclosporin on diabetes in NOD mice. *Diabetologia* 29 : 244-7, 1986
- 13) Debray-Sachs M, Carnaud C, Boitard C, Cohen H, Gresser I, Bedossa P, et al : Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J Autoimmunity* 4 : 237-48, 1991
- 14) Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346 : 1685-91, 2002
- 15) Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, et al : Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366 : 69-72, 1993
- 16) Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO : Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366 : 72-5, 1993
- 17) Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R : Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes* 39 : 933-7, 1990
- 18) Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL : Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 10252-6, 1991
- 19) Daniel D, Gill GR, Schloot N, Wegmann D : Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 25 : 1056-1062, 1995
- 20) Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR : Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1576-80, 1990
- 21) Elias D, Reshef T, Birk OS, van der Zee R, Walker MD, Cohen IR : Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 3088-91, 1991
- 22) Elias D, Cohen IR : Peptide therapy for diabetes in NOD mice. *Lancet* 343 : 704-6, 1994
- 23) Overbergh L VD, Waer M, Mathieu C : Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11 : 305-312, 1999
- 24) Kaino Y, Hirai H, Ito T, Kida K : Prevention of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice by short-term

- and high-dose IGF-I treatment. *J Pediatr Endocrinol Metab* 11 : 267-72, 1998
- 25) Kaino Y, Hirai, H, Ito, T, Kida, K : Insulin-like growth factor I (IGF-I) delays the onset of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Res Clin Pract* 34 : 7-11, 1996
- 26) Bergerot I, Fabien, N, Maguer, V, Thivole, C : Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) protects NOD mice from insulinitis and diabetes. *Clin Exp Immunol* 102 : 335-40, 1995
- 27) Funae O, Shimada, A, Tokui, M, Takei, I, Saruta, T : Balance of GAD65-specific IL-10 production and polyclonal Th1-type response in type 1 diabetes. *J. Autoimmunity* 34 : 45-52, 2001
- 28) Quinn A, McInerney, B, Reich, EP, Kim, O, Jensen, KP, Sercarz, EE : Regulatory and effector CD4 T cells in nonobese diabetic mice recognize overlapping determinants on glutamic acid decarboxylase and use distinct V beta genes. *J Immunol* 166 : 2982-91, 2001
- 29) Sai P, Rivereau, AS, Granier, C, Haertle, T, Martignat, L : Immunization of non-obese diabetic (NOD) mice with glutamic acid decarboxylase-derived peptide 524-543 reduces cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Clin Exp Immunol* 105 : 330-7, 1996
- 30) Urbanek-Ruiz I, Ruiz, PJ, Paragas, V, Garren, H, Steinman, L, Fathman, CG : Immunization with DNA encoding an immunodominant peptide of insulin prevents diabetes in NOD mice. *Clin Immunol* 100 : 164-71, 2001
- 31) Heath V, Hutchings, P, Fowell, DJ, Cooke, A, Mason, DW : Peptides derived from murine insulin are diabetogenic in both rats and mice, but the disease-inducing epitopes are different : evidence against a common environmental cross-reactivity in the pathogenicity of type 1 diabetes. *Diabetes* 48 : 2157-65, 1999
- 32) Ramiya V, Shang, XZ, Pharis, PG, Wasserfall, CH, Stabler, TV, Muir, AB, Schatz, DA, Maclaren, NK : Antigen based therapies to prevent diabetes in NOD mice. *J Autoimmun* 9 : 349-56, 1996
- 33) Daniel D, Wegmann, DR : Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 956-60, 1996
- 34) Hutchings P, Cooke, A : Protection from insulin dependent diabetes mellitus afforded by insulin antigens in incomplete Freund's adjuvant depends on route of administration. *J. Autoimmunity* 11 : 127-30, 1998
- 35) Bergerot I, Fabien, N, Thivolet, C : Effects of insulin like growth factor-1 and insulin on effector T cells generating autoimmune diabetes. *Diabetes Metab* 22 : 235-9, 1996

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

にし ざわ まさ ひこ  
西 澤 雅 彦

(平成 16 年 12 月 15 日受付)

Key Word : arterial baroreflex, myocardial infarction, hypertension, angiotensin II receptor blocker, angiotensin converting enzyme inhibitor

高血圧では動脈圧受容器反射をはじめとする神経性循環調節が障害されているため<sup>1)</sup>、腎交感神経活動 (renal sympathetic nerve activity, RSNA) などの末梢交感神経活動が亢進している。また心筋梗塞および心不全患者では、動脈圧受容器反射が障害され、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<sup>2)</sup>。交感神経活動の亢進は心血管イベントの危険因子であるため、圧受容器反射の障害は、患者の予後を悪くする<sup>3)</sup>。それゆえ、もし何らかの薬剤により動脈圧受容器反射を改善させることができるならば、高血圧や心不全患者の予後が改善されると考えられる。

頸動脈洞や大動脈弓などにある動脈圧受容器は、血圧変化という伸展刺激を神経信号に変換する。もし血圧が上昇すると圧受容器がこれを感じ、求心性神経の電気活動が増加して延髄背側の孤束核の活動を亢進させる<sup>4)</sup>。孤束核の活動亢進は遠心性迷走神経を興奮させ心拍数を減少させる。一方、血圧上昇による孤束核の興奮により、延髄腹外側の尾側領域 (caudal ventrolateral medulla, CVLM) の電気活動が亢進する。CVLM から延髄腹外側の吻側領域 (rostral ventrolateral medulla, RVLM) へのシナプス伝達は、抑制性アミノ酸である GABA が用いられるので、RVLM の

活動は抑制される。それにより RVLM から下行性に向かう交感神経の信号が減少して、血圧は瞬時にもとの値に復する。この調節機序は圧受容器反射とよばれる。

腎交感神経は、腎尿細管、細動脈、緻密斑などに分布している<sup>5)</sup>。腎交感神経活動の亢進はナトリウム再吸収の増加、腎血流量の減少、糸球体濾過率の低下をもたらす。またレニン-アンジオテンシン系を亢進させる。レニン-アンジオテンシン系の亢進は圧受容器反射を悪化させ、腎交感神経活動を亢進させることにより<sup>6)</sup>、ナトリウム再吸収の増加と腎細動脈の収縮を引き起こす。

近年アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬の投与が、心筋梗塞患者の予後改善に有効であることが判明してきている<sup>7)</sup>。心筋梗塞患者における動脈圧受容器反射障害の程度と不整脈の発生頻度との間には正の相関関係があることから<sup>8)</sup>、心筋梗塞に対する ACE 阻害薬の予後改善効果の一部が動脈圧受容器反射の改善によることが示唆される。アンジオテンシン II 受容体遮断薬 (ARB) も、心筋梗塞を生じた正常血圧ラットの圧受容器反射を改善させる<sup>9)</sup>。ことから、心筋梗塞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。さらに、正常血圧患者よりも高血圧患者の方が心筋梗塞による死亡率が高いことから<sup>10)</sup>、高血圧患者が心筋梗塞

本論文は、Nishizawa M, Kumagai H, Ichikawa M, Oshima N, Suzuki H, Saruta T : Improvement in baroreflex function by an oral angiotensin receptor antagonist in rats with myocardial infarction. *Hypertension* 29 [part 2] : 458-463, 1997. および西澤雅彦、熊谷裕生、大島直紀、佐方克史、松浦友一、市川雅、猿田享男：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 受容体拮抗薬と ACE 阻害薬の効果の比較。血圧 6 : 104-107, 1999 の一部を含む。

を合併した際の圧受容器反射機能の評価は、予後を検討するうえで重要と考えられる。著者は、3週間経口で投与したARBカンデサルタンが、高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat, SHR)の障害された動脈圧受容器反射を改善させることを報告した<sup>14)</sup>。

そこで本研究は、心筋梗塞を合併した高血圧ラットの動脈圧受容器反射に対する、ARBとACE阻害薬の効果を比較検討した。

## 方 法

### 1. 対象

対象として、日本チャールス・リバー社(厚木, 神奈川県)より購入した15週齢オス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を発症させて研究に用いた。ラットはそれぞれ単独で個々のケージに入れ、室温22±2度、12時間毎の明暗照明条件下で、自由飲水とした。

### 2. 心筋梗塞の作製<sup>15,17)</sup>

エーテル吸入麻酔下に左第4肋骨を切断後心臓を胸腔外へ露出させ、左前下行枝を肺動脈本幹と左心耳との間で、8-0の絹糸で結紮して心筋梗塞を作製した。心臓を胸腔内へ戻した後、脱気して閉胸した。左冠動脈の結紮以外は同様の処置を行ったラットをシャム手術群とした。術後、ラットをケージに戻し、通常の飼料(CE-2, 食塩0.38%, 日本クレア社, 東京)と水分を与えた。

### 3. 心筋梗塞モデルでの圧受容器反射の検討

WKYとSHRをそれぞれ各群6匹ずつ全6群に分け、計12群を解析した。すなわち、(1)シャム手術+vehicle群(sham-veh)、(2)シャム手術+カンデサルタン(ARB, CANと略す)治療群(sham-CAN)、(3)シャム手術+エナラプリル(ACE阻害薬, ENAと略す)治療群(sham-ENA)、(4)心筋梗塞+vehicle群(MI-veh)、(5)心筋梗塞+カンデサルタン治療群(MI-CAN)、(6)心筋梗塞+エナラプリル治療群(MI-ENA)。Vehicle群には心筋梗塞後4週間、通常の飼料を与えた。カンデサルタンは1mg/kg/日を、エナラプリルは10mg/kg/日をおのおの心筋梗塞作製1週間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の評価した。

### 4. 動静脈カテーテル挿入

心筋梗塞作製手術あるいはシャム手術4週後に動脈圧受容器反射の感受性の定量を行った。エーテル吸入麻酔下に、左右大腿静脈に薬剤投与用のカテーテルを挿入した。カテーテルは、PE-10チューブ(Clay Adams, 米国)にPE-50チューブ(Clay Adams, 米国)を接続したものを使用した。同様のチューブを血圧と心拍数を測定する目的で左大腿動脈にも挿入した。カテーテルは皮下を通して後頭部より露出させた。

### 5. 腎交感神経活動記録用の電極装着

ラットをベントバルビタール(30mg/kg 静脈内投与、10mg/kg 静脈内投与を約1時間ごとに適宜追加、Abbott Lab., 米国)にて麻酔し、実験台に右側臥位で固定した。左側腹部を切開し、後腹膜アプローチにて左腎臓を露出させた。実体顕微鏡(SMZ, Nikon, 東京)を用いて腎交感神経束を同定し、慎重に剥離した。7本のステンレスワイヤーで編まれた電極(直径0.1mm, AM system Inc., 米国)2本を神経束にかけた。神経組織の乾燥と電極の移動を防ぐためにシリコンゲル(604Aおよび604B, Wacker Chemie, ドイツ)にて固定した<sup>13), 14), 18)</sup>。側腹部を閉じ、電極は皮下を通して後頭部より露出させた。その後、ラットを各々のケージにもどした。

### 6. 腎交感神経活動の記録

腎交感神経活動の電位(アンプリチュード)は30-50μVときわめて微小であるため、すべての実験はノイズの混入を防ぐ目的でシールド・ルーム(ファラデー・ケージ)内にて施行した。外科的処置の後24時間以上経過し、覚醒している状態のラットを実験用ホルダーに移した。動脈カテーテルを血圧、平均血圧(MAP)、心拍数(HR)測定のためにトランスデューサー(TP-200T, 日本光電)に接続した。神経活動電極を高インピーダンスプローブ(JB101J, 日本光電)を通じて差動アンプ(AVB-10, 日本光電, band-pass filter; 50Hzから3000Hz)に接続して神経活動を増幅した<sup>13), 14), 18)</sup>。増幅した神経活動を時定数28msecのroot mean squareインテグレーター(EI-601G, 日本光電)で整流・積分し、さらに0.08Hzのフィルターをかけて平均化したものを腎交感神経活動(RSNA)の平均値と定義した。神経活動のノイズ・レベルは、十分量のフェニレフリン静注による昇圧で神経活動がほぼ消失した際の電位で定義し、オシロスコープ上の神経活動からノイズ・レベルを差し引いた(subtract)ものをRSNAの定量に用い

た。

血圧, MAP, HR, RSNA, および RSNA の平均値は, サーマル・アレイ・レコーダー (RTA-1300, 日本光電) を用いて無麻酔の状態ですべて同時記録した。MAP, HR, および RSNA の平均値は, アナログ/デジタル変換システム (MacLab/8s, AD Instruments Pty Ltd) を用いてデジタルデータとして保存しておき, オフ・ラインにて解析した。

## 7. 圧受容器反射の感受性の算出

無麻酔状態のラットを 60 分間安静状態においた後に, 血圧, MAP, HR, および RSNA を測定した。著者の研究室では, 腎交感神経活動を指標とする動脈圧受容器反射の感受性と, 心拍数を指標とする動脈圧受容器反射の感受性は, 異なる場合があることを示してきた<sup>2)</sup>。それゆえ本研究でも, 圧受容器反射の感受性を定量する際に, 心拍数を指標とする簡便な方法だけでなく, 腎交感神経活動を指標とする方法も用いた。

平均血圧と腎交感神経活動との関係 (MAP-RSNA 関係), および平均血圧と心拍数との関係 (MAP-HR 関係) を表す圧受容器反射曲線は, フェニレフリンあるいはニトロプルシドを静脈内投与することで MAP を上昇あるいは下降させ, 対応する RSNA および HR の減少あるいは増加を記録することによって作成した<sup>2), 14), 18)</sup>。昇圧は, フェニレフリン (4.9 mmol/L) をハーバードポンプにより 2.34 から 6.43  $\mu$ L/分 の速度で静脈内投与し, 1-2 分間に 40 mmHg を可及的に一定の速度で上昇させることによっておこなった。降圧は, ニトロプルシド (2.2 mmol/L) を 0.10 から 0.39  $\mu$ L/分 の速度で静脈内投与し, 10-20 秒間に 30 から 40 mmHg を可及的に一定の速度で下降させることによっておこなった。薬剤投与は少なくとも 30 分の間隔を空けてランダムにおこなった。フェニレフリンおよびニトロプルシドを投与する前の状態の RSNA の値を 100% と定義した。

12 群のラットの MAP-RSNA 関係および MAP-HR 関係を表す曲線は, 非線形回帰プログラム (JMP version 3.0 for Macintosh computer) を用いてロジスティック・ファンクション・カーブにそれぞれ近似させた。近似は最小二乗法によって行い, 以下の式で表されるロジスティック・ファンクション・カーブの 4 つのパラメータ ( $P_1, P_2, P_3, P_4$ ) を求めた<sup>2)</sup>。

$$RSNA \text{ または } HR = P_1 / [1 + \exp \{P_2 (MAP - P_3)\}] + P_4$$

この式において,  $P_1$  は RSNA または HR の応答範囲,  $P_2$  は傾きの係数 (応答範囲に非依存性),  $P_3$  は曲線の中央に対応する平均血圧値,  $P_4$  は曲線の下限を表わす。以

上のパラメータから求められるロジスティック・ファンクション・カーブの傾きの最大値 (maximal gain, 以下  $G_{max}$  と略す) を「圧受容器反射の感受性」を表わす指標と考え, 次式により計算した<sup>2)</sup>。

$$G_{max} = -P_1 \times P_2 / 4.$$

本研究におけるロジスティック・ファンクション・カーブへの近似の適合性は 95% 以上であった。

## 8. 左室拡張末期圧, 心筋重量, および心筋梗塞範囲の測定

圧受容器反射機能測定の実験後, ラットをペントバルビタールで麻酔して仰臥位に固定した。右頸動脈を経由して左室内に動脈カテーテルを挿入し, 左室拡張末期圧 (LVEDP) を測定した。

その後ラットを過剰量のペントバルビタールで sacrifice し, 心臓を摘出した。摘出した心臓を, 右室筋と, 中隔を含む左室筋とに分離して各々の重量を測定した。左室筋を長軸と垂直に 4 つにスライスし, それを 37°C, 1% の triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma Chemical Co.) 溶液に 4~7 分間放置して染色した。正常心筋は TTC によって赤く染色され, 壊死心筋は染色されないことを利用して<sup>14), 19), 20)</sup>, すべてのスライス心筋の心筋梗塞範囲を計測器により定量した。

## 9. 統計

有意差の検定は, 対応のないデータに対しては Student's unpaired *t* test を, グループ間比較に対しては one-way analysis of variance およびそれに続き Scheffe's *F* test を用いた。図表の数値はすべて平均 ± 標準誤差で表記した。以上の解析において  $p < 0.05$  の場合を統計学的に有意差ありとみなした。

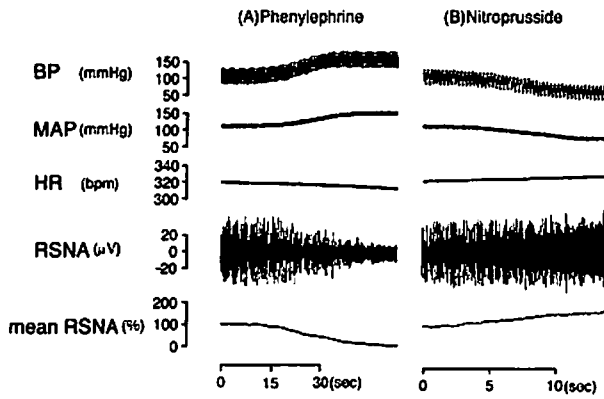
## 結 果

### 1. 基礎的なパラメーター

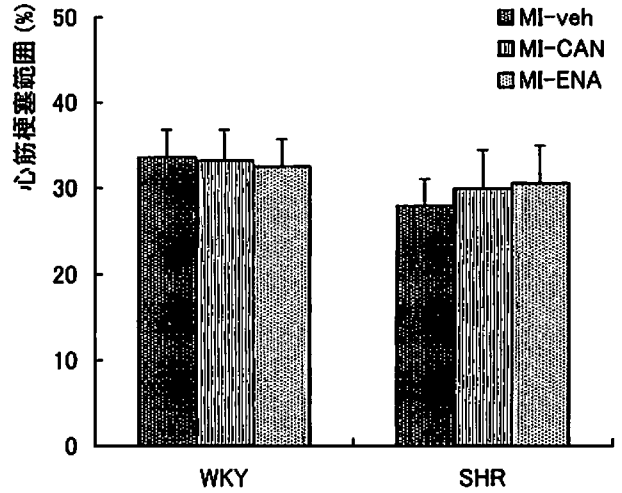
図 1 に, 無麻酔で血圧を変化させた時の心拍数および腎交感神経活動の変化の実記録を示す。フェニレフリン静注による昇圧にともない心拍数と腎交感神経活動は減少し (A), ニトロプルシド静注による降圧にともない, 心拍数と腎交感神経活動は増加した (B)。

SHR および WKY の基礎データを表 1 に示す。心筋梗塞を作製したラットの梗塞範囲を TTC により定量すると 25% から 40% であり, 各群の間に有意差はなかった (表 1, 図 2)。

WKY ではシャム手術群と心筋梗塞群, および薬剤投



第1図 心筋梗塞+カンデサルタン治療群の高血圧自然発症ラットにおけるフェニレフリン (A) またはニトロプルシド (B) を静脈内投与した時の、無麻酔で記録した血圧 (BP), 平均血圧 (MAP), 心拍数 (HR), 腎交感神経活動の原波形 (RSNA), 腎交感神経活動の平均値 (mean RSNA) の変化。フェニレフリン静注による昇圧にともない、心拍数と腎交感神経活動は減少し (A), ニトロプルシド静注による降圧にともない、心拍数と腎交感神経活動は増加した (B)。



第2図 triphenyltetrazolium chloride (TTC) により定量した心筋梗塞ラットの梗塞範囲。各群間で有意差はなかった。

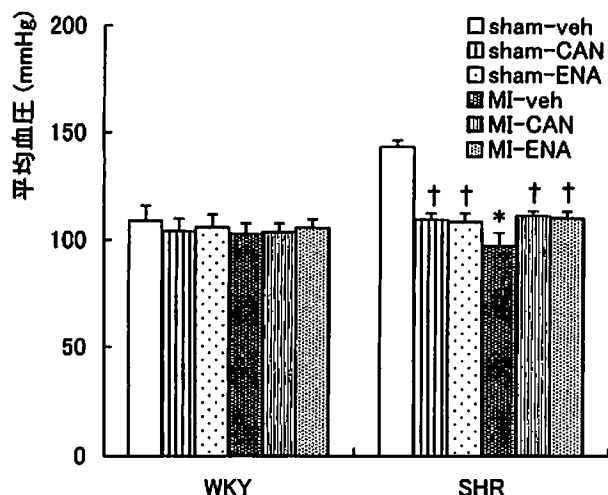
第1表 ウィスター京都ラットおよび高血圧自然発症ラットの基礎データ

		MAP (mmHg)	HR (bpm)	MI size (%)	LVEDP (mmHg)	BW (g)	LV/BW ( $\times 10^{-3}$ )	RV/BW ( $\times 10^{-4}$ )
WKY	sham-veh	109 $\pm$ 7	320 $\pm$ 12		2.6 $\pm$ 1.0	434 $\pm$ 5	1.84 $\pm$ 0.07	4.72 $\pm$ 0.47
	sham-CAN	104 $\pm$ 6	338 $\pm$ 11		3.2 $\pm$ 1.3	419 $\pm$ 18	1.84 $\pm$ 0.08	4.85 $\pm$ 0.37
	sham-ENA	106 $\pm$ 6	334 $\pm$ 14		2.3 $\pm$ 0.6	422 $\pm$ 7	1.82 $\pm$ 0.07	4.84 $\pm$ 0.38
	MI-veh	103 $\pm$ 5	328 $\pm$ 10	33.6 $\pm$ 3.2	16.8 $\pm$ 3.1*	426 $\pm$ 7	2.19 $\pm$ 0.09†	6.71 $\pm$ 0.25*
	MI-CAN	104 $\pm$ 4	334 $\pm$ 11	33.2 $\pm$ 3.6	4.2 $\pm$ 1.7	427 $\pm$ 9	1.80 $\pm$ 0.08§	4.92 $\pm$ 0.23§
	MI-ENA	106 $\pm$ 4	336 $\pm$ 14	32.5 $\pm$ 3.2	4.3 $\pm$ 6.5	423 $\pm$ 7	1.82 $\pm$ 0.07§	4.90 $\pm$ 0.21§
SHR	sham-veh	144 $\pm$ 3	324 $\pm$ 9		4.3 $\pm$ 0.8	330 $\pm$ 7	2.32 $\pm$ 0.04	6.31 $\pm$ 0.10
	sham-CAN	110 $\pm$ 3§	342 $\pm$ 11		4.2 $\pm$ 1.1	312 $\pm$ 20	2.09 $\pm$ 0.04	5.97 $\pm$ 0.09
	sham-ENA	109 $\pm$ 4§	345 $\pm$ 6		4.0 $\pm$ 1.1	311 $\pm$ 23	2.11 $\pm$ 0.05	5.98 $\pm$ 0.09
	MI-veh	98 $\pm$ 6*	324 $\pm$ 8	27.9 $\pm$ 3.1	21.3 $\pm$ 1.2*	331 $\pm$ 7	2.73 $\pm$ 0.05†	7.98 $\pm$ 0.23†
	MI-CAN	112 $\pm$ 2§	332 $\pm$ 10	29.9 $\pm$ 4.5	6.4 $\pm$ 1.2	329 $\pm$ 9	2.35 $\pm$ 0.06§	5.92 $\pm$ 0.27‡
	MI-ENA	111 $\pm$ 3§	331 $\pm$ 11	30.5 $\pm$ 4.4	6.3 $\pm$ 0.8	327 $\pm$ 5	2.35 $\pm$ 0.04§	5.85 $\pm$ 0.26‡

Veh は vehicle, CAN はカンデサルタン, ENA はエナラプリルを表す。

MAP: 平均血圧, HR: 心拍数, MI size: 心筋梗塞範囲, LVEDP: 左室拡張末期圧, BW: 体重, LV/BW: 左心筋重量比, RV/BW: 右心筋重量比

\*p<0.01 対 sham-veh, †p<0.05 対 sham-veh, ‡p<0.01 対 MI-veh, §p<0.05 対 MI-veh



第3図 フェニレフリンあるいはニトロプルシドを投与する前の、安静時の平均血圧。\* $p < 0.01$  対 sham-veh,  $+p < 0.05$  対 MI-veh. SHR では MI-veh の平均血圧は sham-veh と比べて有意に低かった。また、MI-CAN および MI-ENA の平均血圧はシャム手術群 (sham-CAN, sham-ENA) と同等であった。心筋梗塞の SHR において、MI-CAN 群あるいは MI-ENA 群では、MI-veh 群と比べて血圧がむしろ高かった。

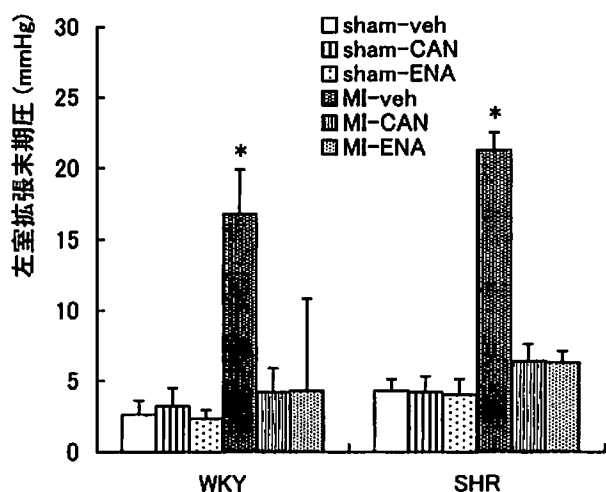
与群と vehicle 群にかかわらず、6群の間に平均血圧の差はなかった(表1, 図3)。一方, SHR では MI-veh の平均血圧は sham-veh と比べて有意に低かった。また, MI-CAN および MI-ENA の平均血圧はシャム手術群 (sham-CAN, sham-ENA) と同等であった。SHR において, カンデサルタンとエナラプリルとの間で降圧効果に差はなかった。興味深いことに, 心筋梗塞の SHR において, MI-CAN 群あるいは MI-ENA 群では, MI-veh 群と比べて血圧がむしろ高かった(表1, 図3)。

## 2. 左室拡張末期圧, 心筋重量, および心筋梗塞範囲の測定

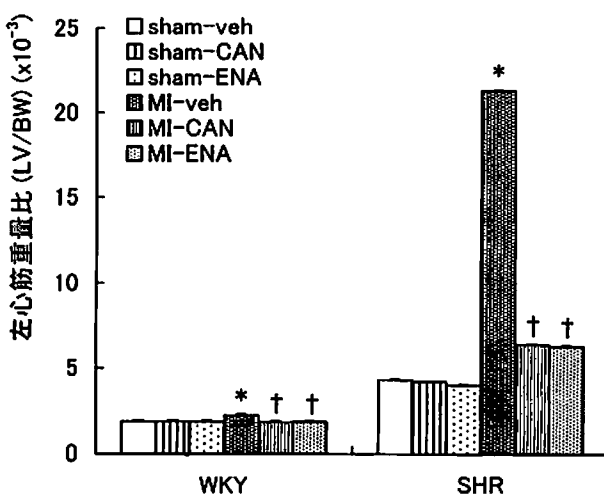
左室拡張末期圧は, WKY でも SHR でも心筋梗塞 (MI-veh) 群で著明に高かった(図4, 表1)。カンデサルタンあるいはエナラプリル投与群の左室拡張末期圧は, シャム手術群と同程度であった。左室重量比 (LV/BW) は MI-CAN 群と MI-ENA 群において, MI-veh 群よりも有意に小さかった(表1, 図5)。カンデサルタン投与群とエナラプリル投与群との間に差はなかった。

## 3. 腎交感神経活動を指標とする圧受容器反射

昇圧および降圧により得られた MAP-RSNA 関係の実際のデータを丸印でプロットし, ロジスティック・ファンクシオン・カーブで近似させたグラフの実例を図6に



第4図 左室拡張末期圧。\* $p < 0.01$  対 sham-veh. 左室拡張末期圧は, WKY でも SHR でも心筋梗塞 (MI-veh) 群で著明に高かった。カンデサルタン (MI-CAN) あるいはエナラプリル (MI-ENA) 投与群の左室拡張末期圧は, シャム手術群と同程度であった。



第5図 体重当りの左室重量比。\* $p < 0.05$  対 sham-veh,  $+p < 0.05$  対 MI-veh. 左室重量比 (LV/BW) は MI-CAN 群と MI-ENA 群において, MI-veh 群よりも有意に小さかった。カンデサルタン投与群とエナラプリル投与群との間に差はなかった。



第2表 ウィスター京都ラットにおけるロジスティック・ファンクション・カーブのパラメーター

			P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
WKY	RSNA	sham-veh	210±7	-0.089±0.006	110±7	3.0±2.1
		sham-CAN	215±4	-0.087±0.003	102±5	1.3±0.9
		sham-ENA	216±3	-0.088±0.003	103±2	0.4±1.2
		MI-veh	168±5*	-0.078±0.005*	105±6	0.5±2.8
		MI-CAN	209±7†	-0.089±0.003†	102±5	1.1±0.6
		MI-ENA	210±6†	-0.088±0.004†	105±5	1.4±1.0
		HR	sham-veh	159±6	-0.086±0.004	110±4
	sham-CAN	160±8	-0.086±0.003	108±3	214±4	
	sham-ENA	163±2	-0.087±0.003	109±4	218±2	
	MI-veh	82±2‡	-0.084±0.008*	109±6	241±6‡	
	MI-CAN	153±6§	-0.087±0.004†	109±4	214±4§	
	MI-ENA	155±4§	-0.088±0.004†	109±4	213±3§	

Veh は vehicle, CAN はカンデサルタン, ENA はエナラプリルを表す.

\*p<0.05 対 sham-veh, †p<0.05 対 MI-veh, ‡p<0.01 対 sham-veh, §p<0.01 対 MI-veh

第3表 高血圧自然発症ラットにおけるロジスティック・ファンクション・カーブのパラメーター

			P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
SHR	RSNA	sham-veh	134±2	-0.066±0.002	159±4	0.8±0.4
		sham-CAN	133±4	-0.077±0.001	124±1	0.6±0.4
		sham-ENA	139±2	-0.079±0.001	121±2	0.1±0.3
		MI-veh	125±4*	-0.054±0.003*	120±4*	2.0±0.4
		MI-CAN	135±2†	-0.068±0.002†	127±4	1.1±0.5
		MI-ENA	133±3†	-0.069±0.004†	124±3	0.4±0.4
		HR	sham-veh	124±6	-0.074±0.003	146±4
	sham-CAN	132±6	-0.082±0.005	126±3	289±22	
	sham-ENA	137±4	-0.083±0.005	115±3	280±14	
	MI-veh	19±4‡	-0.052±0.008*	124±4§	312±16*	
	MI-CAN	83±6*	-0.074±0.003†	126±1	276±21†	
	MI-ENA	89±3*	0.075±0.003†	116±2	274±14†	

Veh は vehicle, CAN はカンデサルタン, ENA はエナラプリルを表す.

\*p<0.05 対 sham-veh, †p<0.05 対 MI-veh, ‡p<0.005 対 sham-veh, §p<0.01 対 sham-veh, || p<0.01 対 MI-veh

示す (MI-veh のラットと MI-CAN のラット).

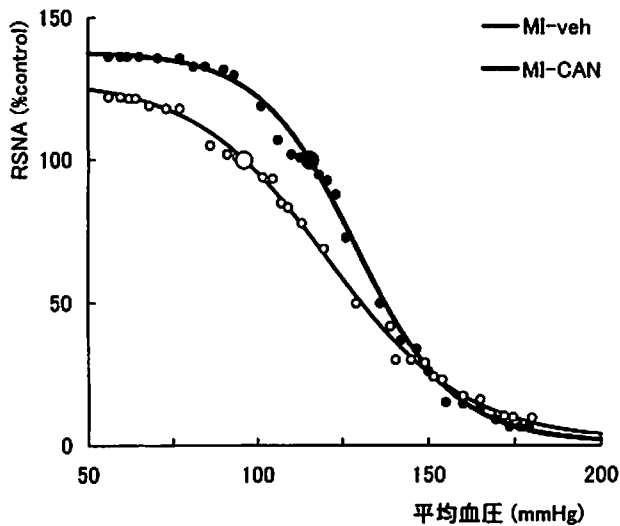
図7はRSNAを指標とする圧受容器反射の曲線を、図8はその感受性(Gmax)を示したものである。ロジスティック・ファンクション・カーブの4つのパラメータを、WKY, SHRに分けて表2, 表3に示す。

図7, 8に示すように、WKYでもSHRでも、RSNAを指標とする圧受容器反射に関して、MI-veh群の感受性(Gmax)はsham-veh群と比べて有意に低下していた(WKY: MI-veh 3.3±0.3 対 sham-veh 4.7±0.4, p<0.05. SHR: MI-veh 1.7±0.1 対 sham-veh 2.2±0.1

%control/mmHg, p<0.05). カンデサルタンあるいはエナラプリルを3週間経口投与した群のGmaxは、WKY, SHRともにシャム手術群と同等であった。カンデサルタンとエナラプリルとの間に、圧受容器反射の感受性の差はみられなかった(図8)。

#### 4. 心拍数を指標とする圧受容器反射

図9にはHRを指標とする圧受容器反射曲線を、図10にはその感受性(Gmax)を示す。図9, 図10のように、SHRはシャム手術群でもGmaxがWKYに比べ

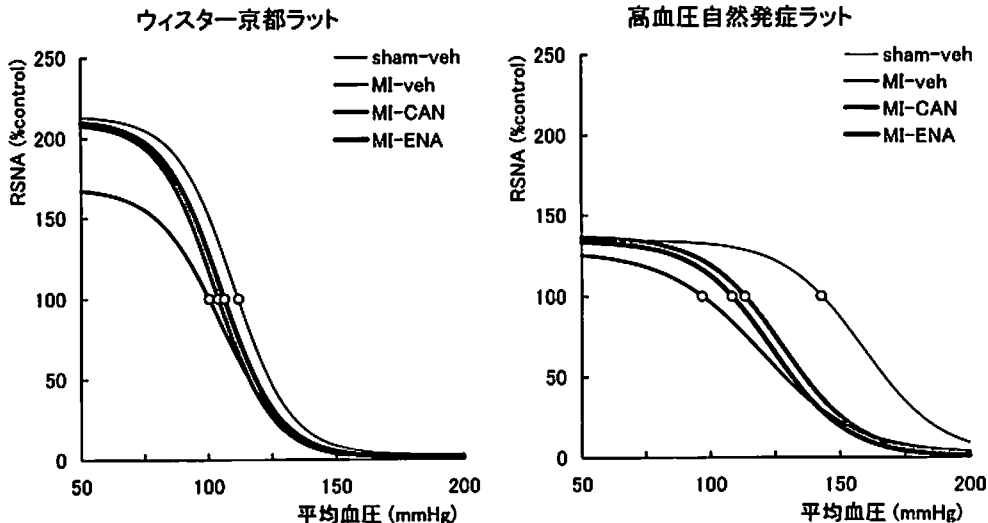


第6図 心筋梗塞+vehicle投与(MI-veh)された1匹の高血圧自然発症ラット(SHR), および心筋梗塞+カンデサルタン投与(MI-CAN)された1匹のSHRの, 平均血圧・腎交感神経活動(MAP-RSNA)関係, 実測データをプロットし, ロジスティック・ファンクション・カーブで近似させた。大きい○あるいは●は安静時の血圧で, その時の腎交感神経活動を100%とした。

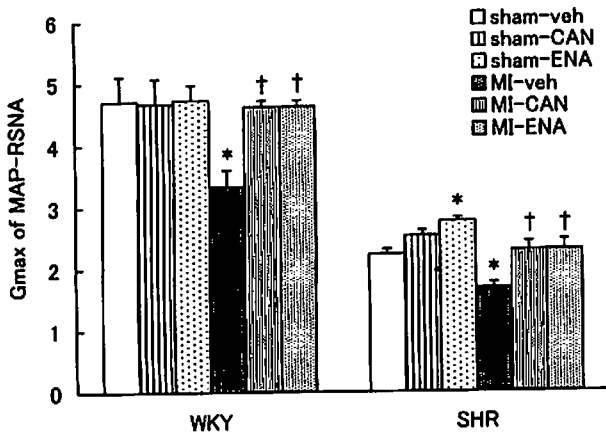
て低下していた (SHR  $2.3 \pm 0.1$ , WKY  $3.5 \pm 0.3$  bpm/mmHg,  $p < 0.01$ )。心筋梗塞を合併することで, さらに高度に低下した (SHRのMI-veh  $0.3 \pm 0.1$  bpm/mmHg)。WKYにおいて, カンデサルタン(MI-CAN)あるいはエナラプリル(MI-ENA)を経口投与した群では,  $G_{max}$ はシャム手術群と差がなかった。しかし, SHRにおいては, MI-CANとMI-ENAの $G_{max}$ は, シャム手術群(sham-veh, sham-CAN, sham-ENA)のレベルより有意に低かった(図10の\*)。カンデサルタンとエナラプリルとの間に差はみられなかった。

### 5. 腎交感神経活動を指標とする圧受容器反射と心拍数を指標とする反射との比較

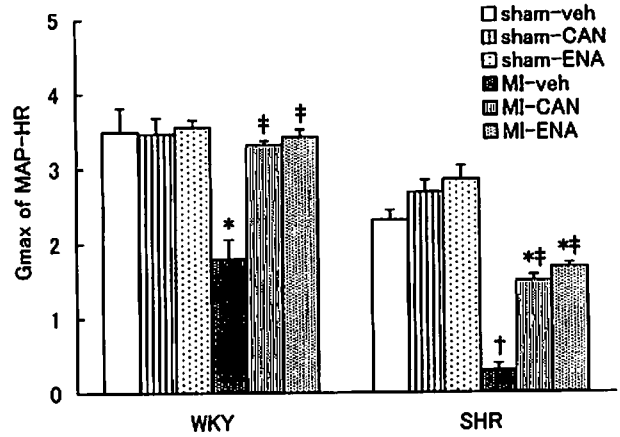
図8と図10を比較すると, WKY, SHRともに, 心筋梗塞のvehicle群において, RSNAを指標とする圧受容器反射の障害(図8)よりも, HRを指標とする圧受容器反射の障害(図10)の方が, シャム手術-vehicle群と比較して有意差が大きく, 障害の程度がより高度であった。すなわちWKYにおいて, HRを指標とする反射についてMI群対シャム群の差は $p < 0.01$ であり,



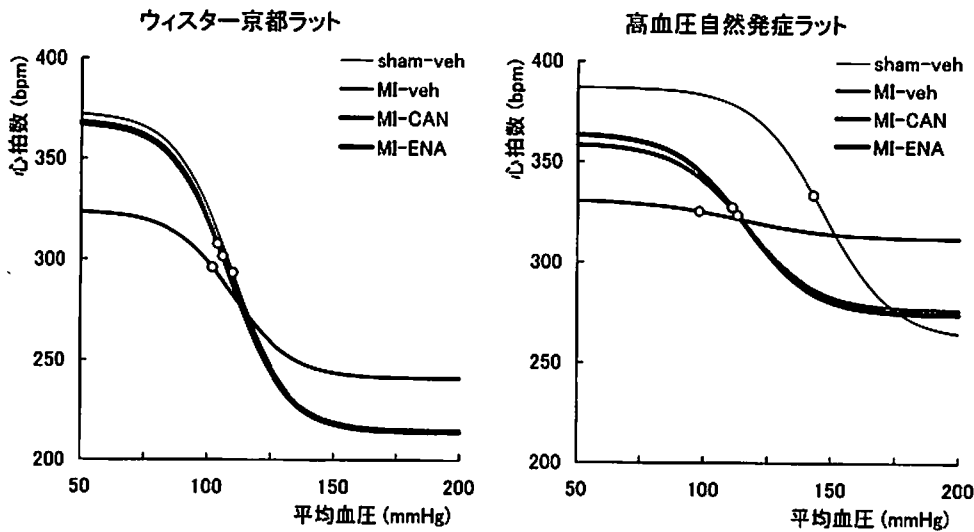
第7図 ウイスター京都ラットおよび高血圧自然発症ラットの腎交感神経活動(RSNA)を指標とする動脈圧受容器反射。すなわち平均血圧・腎交感神経活動(MAP-RSNA)関係を表すロジスティック・ファンクション・カーブ。○は安静時の平均血圧で, その時の腎交感神経活動を100%とする。シャム手術+カンデサルタン治療群(sham-CAN)およびシャム手術+エナラプリル治療群(sham-ENA)のカーブは, 簡略化のために省いてある。



第8図 ウィスター京都ラット (WKY) および高血圧自然発症ラット (SHR) における、腎交感神経活動 (RSNA) を指標とする圧受容器反射の感受性 (曲線の傾きの最大値  $G_{max} = -P_1 \times P_2 / 4$ , 表2および表3の  $P_1$ ,  $P_2$  を用いて計算). \* $p < 0.05$  対 sham-veh, † $p < 0.05$  対 MI-veh. WKY でも SHR でも, RSNA を指標とする圧受容器反射に関して, MI-veh 群の感受性 ( $G_{max}$ ) は sham-veh 群と比べて有意に低下していた. カンデサルタン (MI-CAN) あるいはエナラプリル (MI-ENA) を3週間経口投与した群の  $G_{max}$  は, WKY, SHR とともにシャム手術群と同等であった. カンデサルタンとエナラプリルとの間に差はみられなかった.



第10図 ウィスター京都ラット (WKY) および高血圧自然発症ラット (SHR) における、心拍数 (HR) を指標とする圧受容器反射の感受性. \* $p < 0.01$  対 sham-veh, † $p < 0.005$  対 sham-veh, ‡ $p < 0.01$  対 MI-veh. HR を指標とする圧受容器反射に関しては, SHR はシャム手術群でも  $G_{max}$  が WKY に比べて低下していた. 心筋梗塞を合併することで, さらに高度に低下した (SHR の MI-veh  $0.3 \pm 0.1$  bpm/mmHg). WKY において, カンデサルタンあるいはエナラプリルを投与した群では,  $G_{max}$  はシャム手術群と差がなかった. しかし, SHR においては, MI-CAN と MI-ENA の  $G_{max}$  は, シャム手術群 (sham-veh, sham-CAN, sham-ENA) のレベルより有意に低かった (\*). カンデサルタンとエナラプリルとの間に差はみられなかった.



第9図 ウィスター京都ラットおよび高血圧自然発症ラットの心拍数 (HR) を指標とする動脈圧受容器反射. すなわち平均血圧-心拍数 (MAP-HR) 関係を表すロジスティック・ファンクション・カーブ. ○は安静時の平均血圧を示す. シャム手術+カンデサルタン治療群 (sham-CAN) およびシャム手術+エナラプリル治療群 (sham-ENA) のカーブは, 簡略化のために省いてある.

RSNA を指標とする反射について MI 群対 sham 群の差は  $p < 0.05$  であった。SHR においても、HR を指標とする反射について MI 群対 sham 群の差は  $p < 0.005$  であり、RSNA を指標とする反射について MI 群対 sham 群の差は  $p < 0.05$  であった。

さらに図 10 のごとく、HR を指標とする圧受容器反射の障害に関して、SHR における MI-veh 対 sham-veh の差は  $p < 0.005$  であり、WKY における MI-veh 対 sham-veh の差は  $p < 0.01$  であることから、SHR の障害がより高度であった。

## 考 察

ロジスティック・ファンクション・カーブを用いて、心筋梗塞を合併した SHR および WKY における、RSNA あるいは HR を指標とする動脈圧受容器反射を解析した。さらに、圧受容器反射の感受性に対する、ARB (カンデサルタン) または ACE 阻害薬 (エナラプリル) の 3 週間の経口投与の効果と比較した。12 群のラットのデータから得られた知見は次の通りである。

- (1) WKY, SHR ともに、RSNA を指標とする場合も HR を指標とする場合も、圧受容器反射の感受性 (Gmax) は、sham-veh よりも MI-veh で低かった。
- (2) WKY, SHR ともに、HR を指標とする圧受容器反射の方が、RSNA を指標とする圧受容器反射よりも、心筋梗塞によってより高度に障害された。
- (3) WKY において、心筋梗塞によって障害された RSNA あるいは HR を指標とする圧受容器反射は、ARB または ACE 阻害薬による治療で sham 手術群と同等のレベルまで改善した。
- (4) SHR においては、心筋梗塞によって障害された、RSNA を指標とする圧受容器反射は、ARB または ACE 阻害薬による治療で sham-veh のレベルまで改善した。
- (5) しかし、心拍数を指標とする圧受容器反射の障害は、ARB または ACE 阻害薬による治療により sham 手術群のレベルまでは改善しなかった。
- (6) ARB と ACE 阻害薬の治療効果はほぼ同等だった。

著者の研究室は、高血圧動物において圧受容器反射が障害されていることを示してきた<sup>1, 3)</sup>。また心筋梗塞や心不全によって動物やヒトの圧受容器反射が障害されることが報告されている<sup>4-7), 14), 16), 21), 22)</sup>。Schwartz<sup>5)</sup>らは、心筋梗塞患者における圧受容器反射障害の程度と致死的不整脈の発生との間に密接な関連性があることを示した。

それに対する治療として、ACE 阻害薬あるいは ARB

を心筋梗塞後に投与することで心筋リモデリングの抑制や心機能の改善が認められたとする報告<sup>23, 25)</sup>や、ACE 阻害薬の投与で心筋梗塞患者の長期予後が改善したとする報告がある<sup>11), 12), 23)</sup>。Deck<sup>26)</sup>らは、ACE 阻害薬カプトプリルによる治療が、心筋梗塞を伴う正常血圧ラットの、HR を指標とする圧受容器反射を改善させたと報告した。これらの結果から、圧受容器反射障害は心筋梗塞患者の長期予後に対する増悪因子として重要であり、内因性アンジオテンシン II が圧受容器反射障害に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに心筋梗塞ラットの圧受容器反射の改善にはアンジオテンシン II 抑制が重要であることが示された。

本研究で、心筋梗塞を合併した SHR における、HR を指標とする圧受容器反射の障害は WKY の障害より高度であることが示された。心筋梗塞による圧受容器反射障害が高血圧によって増強され、このことが正常血圧者よりも高血圧患者の方が心筋梗塞後の予後が悪い理由の一つといえる<sup>13), 27)</sup>。

心筋梗塞や心筋虚血では交感神経系が興奮しており、副交感神経系の抑制と交感神経系の興奮は心室細動や突然死をひき起こす要因となる<sup>5), 6), 21), 28), 29)</sup>。また、ヒトや動物における心筋梗塞後の HR を指標とする圧受容器反射を評価した報告で、圧受容器反射障害の程度と不整脈の発生率や死亡率の間には明らかな関連性が見いだされている<sup>4), 5), 29)</sup>。本研究の結果は、これらの報告と合致している。さらに、心筋梗塞ラットでは RSNA を指標とする圧受容器反射より HR を指標とする圧受容器反射の障害の方が高度であったとする本研究のデータから、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、より強く作用したと推察される。

3 週間の ARB あるいは ACE 阻害薬の経口投与により、RSNA を指標とする圧受容器反射は sham 手術群と同レベルまで改善したが、HR を指標とする圧受容器反射は sham 手術群のレベルにまで改善しなかった (図 8 と 10)。カンデサルタンまたはエナラプリルでレニン-アンジオテンシン系を遮断したにもかかわらず、なぜ心筋梗塞を合併した高血圧ラット (SHR) で、RSNA を指標とする圧受容器反射とは異なり、HR を指標とする圧受容器反射障害が完全には回復しなかったのかを考察してみたい。心筋梗塞を生じた WKY においても HR を指標とする圧受容器反射の障害が RSNA を指標とする圧受容器反射の障害より高度であったこと、および心筋梗塞を合併した SHR の RSNA を指標とする圧受容器反射がレニン-アンジオテンシン系遮断薬で回復していることを考慮すると、圧受容器反射弓の求心路<sup>14), 16)</sup>だ

けでなく、心臓へ向かう遠心性交感神経および遠心性迷走神経にも障害が存在していると考えられる。また、内因性アンジオテンシン II およびそれ以外の血管作動物質が遠心性心臓迷走神経に対して何らかの役割をはたしている可能性も推察される。

圧受容器反射を改善することは、腎交感神経活動を抑制することにつながる。著者の研究室の Sakata らは<sup>30)</sup>、SHR に2週間経口投与したカンデサルタンが、有意な降圧と腎血流量の増加にもかかわらず、腎交感神経活動を抑制することを報告した。また彼らは、WKY と比較して SHR では血圧と腎交感神経活動との相関の線形性が亢進し、非線形性が低下していること、カンデサルタンは線形性を低下させ、非線形性を増加させることを明らかにした<sup>30), 31)</sup>。また Matsuura らは<sup>32)</sup>、SHR の摘出脳幹-脊髄標本という新しい実験系を用いて、カンデサルタンが RVLM ニューロン(交感神経中枢)の電気活動を抑制することを報告した。

初期の実験報告では、ARB はブラジキニンや一酸化窒素増加作用がないためうっ血性心不全や心肥大に対する治療効果が ACE 阻害薬よりも劣るとされていた<sup>33)</sup>。予想に反して、本研究においては心筋梗塞ラットに対する圧受容器反射の改善効果は ARB と ACE 阻害薬とでほぼ同等であった。その理由として次のことが考えられる。

- (1)内因性アンジオテンシン II はアンジオテンシン・タイプ 1 (AT1) 受容体を介して圧受容器反射を障害する。ARB は、ACE を介して産生されたアンジオテンシン II のみならず ACE を介さずに(たとえばキマーゼを介して)産生されたアンジオテンシン II の作用も十分に抑制した。
  - (2)ARB の慢性投与に伴い増加した内因性アンジオテンシン II が、心筋梗塞後に発現するといわれるアンジオテンシン・タイプ 2 (AT2) 受容体<sup>34)</sup> に作用した。AT2 受容体を介する作用としては心筋肥大やリモデリングの抑制が報告されている<sup>35)</sup>。本研究においても MI-CAN 群および MI-ENA 群の左室重量は、MI-veh 群と比べて有意に小であった(表 1, 図 5)。
  - (3)*in vitro* の実験において、ARB が存在すると AT1 受容体に結合できないアンジオテンシン II は AT2 受容体に結合し、ブラジキニンや一酸化窒素を増加させる<sup>35)</sup>。これらの物質は血行動態や圧受容器反射を改善させる効果があると考えられる。
- Liu<sup>36)</sup> らは、心不全ラットの血行動態に対する ARB と ACE 阻害薬の効果を比較し、同程度の効果がみられ

たと報告した。また、左室拡張末期容量と駆出率に対する ARB の効果が、ブラジキニン受容体拮抗薬と AT2 受容体拮抗薬の投与で減弱したことから、Liu<sup>36)</sup> らの研究は上記の (2), (3) の機序を支持している。

本研究の結果から、ARB は AT1 受容体を遮断する以外の付加的効果を持っていると推定されるが、その機序の解明にはさらなる検討が必要である。

2000 年に報告された ELITE II という大規模臨床試験<sup>37)</sup>で、心不全患者に対する ARB と ACE 阻害薬との間に治療効果の差がないことが示された。60 歳以上の心不全患者を対象にロサルタンあるいはカプトプリルを平均 555 日間投与したところ、両群間で死亡率、および突然死あるいは心停止後蘇生ともに有意差がなかった。これは本研究を支持する結果といえる。

2003 年に発表された VALIANT という二重盲検試験では、心筋梗塞発症の 10 日以内という早期から、1 万 4 千人の患者に ARB バルサルタンまたは ACE 阻害薬カプトプリルを投与し、2 年間追跡したところ、死亡率や心血管イベントの発症率について、2 つの薬剤は同等だった<sup>38)</sup>。本研究から得られたカンデサルタンがエナラプリルと同等に心筋梗塞後ラットの圧受容器反射を改善したという結果は、これら大規模臨床試験の結果を一部説明するものと考えられる。慢性心不全患者 2028 例に本研究と同じくカンデサルタンを投与した CHARM-Alternative 試験では、プラセボ群と比較して、カンデサルタン群では心血管イベントによる死亡および心不全による入院が有意に少なかった<sup>39)</sup>。

心筋梗塞後の患者 1071 例の予後と圧受容器反射の関係の評価した ATRAMI 試験では、心機能が同等でも、心拍数を指標とする圧受容器反射障害が強い患者ほど突然死や致死的不整脈の発症頻度が高く、明らかに長期生存率が悪かった<sup>40)</sup>。この臨床試験の結果も本研究の結果を支持している。

## 総 括

SHR および WKY ラットに心筋梗塞を発症させた際の圧受容器反射の変化、およびアンジオテンシン受容体遮断薬あるいはアンジオテンシン変換酵素阻害薬の圧受容器反射に対する効果を比較検討した。

1. 心筋梗塞により圧受容器反射は障害されたが、腎交感神経活動よりも心拍数を指標とする圧受容器反射の方がより高度に障害された。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。

2. アンジオテンシン受容体遮断薬あるいはアンジオテンシン変換酵素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、シャ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。

3. 障害された圧受容器反射に対し、アンジオテンシン受容体遮断薬とアンジオテンシン変換酵素阻害薬とは、ほぼ同等の改善効果を示した。このことから、アンジオテンシン受容体遮断薬にはアンジオテンシン・タイプ 1 受容体を阻害する以外の有用な効果があることが推測された。

以上の結果から、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。

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く感謝いたします。直接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に心から感謝します。本研究に御協力と御助言をいただきました研究室各位に感謝いたします。

本研究の一部は平成 7 年度文部省科学研究費補助金(奨励研究 A) による。

## 文 献

- 1) Ichikawa M, Suzuki H, Kumagai K, Kumagai H, Ryuzaki M, Nishizawa M, Saruta T : Differential modulation of baroreceptor sensitivity by long-term antihypertensive treatment. *Hypertension* 26 : 425-431, 1995.
- 2) Kumagai H, Suzuki H, Ryuzaki M, Matsukawa S, Saruta T : Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity is potentiated in early phase of two-kidney, one clip Goldblatt hypertension in conscious rabbits. *Circulation Research* 67 : 1309-1322, 1990.
- 3) Kumagai H, Averill DB, Ferrario CM : Renal nerve activity in rats with spontaneous hypertension : Effect of converting enzyme inhibitor. *Am J Physiol* 263 : R109-R115, 1992.
- 4) Rovere MTL, Mortara A, Specchia G, Schwartz PJ : Myocardial infarction and baroreflex sensitivity. Clinical studies. *G Ital Cardiol* 22 : 639-645, 1992.
- 5) Schwartz PJ, Rovere MTL, Vanoli E : Autonomic nervous system and sudden cardiac death ; experimental basis and clinical observation for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation* 85 (suppl I) : I-77-I-91, 1992.
- 6) Farrell TG, Paul V, Cripps TR, Malik M, Bennett ED, Ward D, Camm AJ : Baroreflex sensitivity and electrophysiological correlates in patients after acute myocardial infarction. *Circulation* 83 : 945-952, 1991.
- 7) DiBona GF, Jones SY, Brooks VL : ANG II receptor blockade and arterial baroreflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure. *Am J Physiol* 269 : R1189-R1196, 1995.
- 8) Pilowsky PM, Goodchild AK : Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters : 10 years on. *J Hypertens*. 20 : 1675-1688, 2002.
- 9) DiBona GF, Jones SY : Sodium intake influences hemodynamic and neural responses to angiotensin receptor blockade in rostral ventrolateral medulla. *Hypertension* 37 : 1114-1123, 2001.
- 10) DiBona GF : Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 36 : 1083-1088, 2000.
- 11) The SAVE Investigators : Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 327 : 669-677, 1992.
- 12) Fourth International Study of Infarct Survival (ISIS-4) Collaborative Group. ISIS-4 : A randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 345 : 669-685, 1995.
- 13) Flack JM, Neaton J, Grimm Jr R, Shih J, Cutler J, Ensrud K, MacMahon S : Blood pressure and mortality among men with prior myocardial infarction. *Circulation* 92 : 2437-2445, 1995.
- 14) Nishizawa M, Kumagai H, Ichikawa M, Oshima N, Suzuki H, Saruta T : Improvement in baroreflex function by an oral angiotensin receptor antagonist in rats with myocardial infarction. *Hypertension* 29 [part 2] : 458-463, 1997.
- 15) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E : Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44 : 503-512, 1979.
- 16) DiBona GF, Sawin LL : Reflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure. *Am J Physiol* 266 : R27-R39, 1994.
- 17) Selye H, Brajusz E, Grasso S, Mendell P : Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 11 : 394-407, 1960.
- 18) Kumagai H, Suzuki H, Matsumura Y, Ryuzaki M, Saruta T : Differential effects of captopril and nifedipine on baroreflex control of sympathetic nerve activity and heart rate in renal hypertension. *Journal of Hypertension* 10 : 1485-1491, 1992.

- 19) Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ : Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* 121 : 522-530, 1985.
- 20) Greve G, Soetersdal T : Problems related to infarct size measurements in the rat heart. *Acta Anat* 142 : 366-373, 1991.
- 21) Creager MA : Baroreceptor reflex function in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 69 : 10G-16G, 1992.
- 22) Kjellgren O, Gomes JA : Heart rate variability and sensitivity in myocardial infarction. *Am Heart J* 125 : 204-215, 1993.
- 23) Beckwith C, Munger MA : Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on ventricular remodeling and survival following myocardial infarction. *Ann Pharmacother* 27 : 755-766, 1993.
- 24) Schieffer B, Wireas A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, Drexler H : Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation* 89 : 2273-2282, 1994.
- 25) Rush JE, Rajfer S : Theoretical basis for the use of angiotensin II antagonists in the treatment of heart failure. *J Hypertens* 11(suppl 3) : S69-S71, 1993.
- 26) Deck CC, Raya TE, Gaballa MA, Goldman S : Baroreflex control of heart rate in rats with heart failure after myocardial infarction : effects of captopril. *J Pharmacol Exp Ther* 263 : 1424-1431, 1992.
- 27) Kambara H, Nakagawa M, Kinoshita M, Kawai C : Long-term prognosis after myocardial infarction : univariate and multivariate analysis of clinical characteristics in 1000 patients. *Clin Cardiol* 16 : 872-878, 1993.
- 28) Hofnloser SH, Klingenheben T, Loo A, Hablawetz E, Just H, Schwartz PJ : Reflex versus tonic vagal activity as a prognostic parameter in patients with sustained ventricular fibrillation. *Circulation* 89 : 1068-1073, 1994.
- 29) Vanoli E, Ferrari GMD, Stramba-Bdiale M, Hull Jr SS, Foreman RD, Schwartz PJ : Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res* 68 : 1471-1481, 1991.
- 30) Sakata K, Kumagai H, Osaka M, Onami T, Matsuura T, Imai M, Saruta T : Potentiated sympathetic nervous and renin-angiotensin systems reduce nonlinear correlation between sympathetic activity and blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 106 : 620-625, 2002.
- 31) Kumagai H, Onami T, Iigaya K, Takimoto C, Imai M, Matsuura T, Sakata K, Oshima N, Hayashi K, Saruta T : Involvement of renal sympathetic nerve in pathogenesis of hypertension. *Kidney and Blood Pressure Regulation. In Contributions to Nephrology* 143 : 32-45, 2004.
- 32) Matsuura T, Kumagai H, Kawai A, Onimaru H, Imai M, Oshima N, Sakata K, Saruta T : Rostral ventrolateral medulla neurons of neonatal Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 40 : 560-565, 2002.
- 33) Linz W, Henning R, Scholkens BA : Role of angiotensin II receptor antagonism and converting enzyme inhibition in the progression and regression of cardiac hypertrophy in rats. *J Hypertens* 9 (suppl 6) : S400-S40, 1991.
- 34) Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M : Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 95 : 46-54, 1995.
- 35) Gohlke P, Pees C, Unger T : AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 31 [part 2] : 349-355, 1998.
- 36) Liu Y-H, Yang XP, Shaw VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA : Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. *J Clin Invest* 99 : 1926-1935, 1997.
- 37) Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klingner GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B : Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure : randomised trial-the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 355 : 1582-1587, 2000.
- 38) Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau J-L, Lars K, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Steven DO, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM : Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 349 : 1893-1906, 2003.
- 39) Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Pfeffer MA, Swedberg K : Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors : the CHARM-Alternative trial. *Lancet* 362 : 772-776, 2003.
- 40) Rovere MT, Pinna GD, Hohnloser SH, Marcus FI, Mortara A, Nohara R, Bigger JT, Camm AJ, Schwartz PJ : Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 103 : 2072-2077, 2001.

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

ひろ た のぶ ひさ  
廣 田 展 久

(平成 16 年 12 月 17 日受付)

Key Words : renin, juxtaglomerular cells, transmural pressure, phospholipase, streptozotocin

レニンは、343 個のアミノ酸からなる蛋白であり、肝臓で主に産生されるアンジオテンシノーゲンをアンジオテンシン I に変換する酵素である。アンジオテンシン I はさらに、主に肺に存在するアンジオテンシン変換酵素によって生理活性を有するアンジオテンシン II に変換されるが、レニンはこれら一連のレニン・アンジオテンシン系の活性を規定する最も重要な酵素である。レニンは、腎臓の傍糸球体 (JG) 細胞に存在するレニン遺伝子より産生された 406 個のアミノ酸からなるプレプロレニンが細胞内顆粒中で splicing enzymes の作用により 386 個のアミノ酸からなるプロレニンになり、さらには 43 個のアミノ酸がはずれて活性レニンとなる。活性レニンを有する細胞内顆粒は成熟顆粒と呼ばれ、exocytosis により活性レニンを細胞外へ分泌し、循環血中のレニン・アンジオテンシン系の賦活化に関与する。したがって、JG 細胞でレニン前駆体が産生されて活性レニンとして循環血中で作用するまでには、大きく分けて 2 つの段階、つまりプレプロレニン・プロレニンから活性レニンへのプロセッシングと活性レニンの細胞外への分泌が存在する。

1959 年に Tobian ら<sup>1)</sup>は、腎灌流圧と JG 細胞内成熟顆粒の間に、負の相関関係が存在することを発見した (圧負荷をかけた JG 細胞では、細胞内成熟顆粒の減少を認めた)。それ以来、圧負荷とレニン産生・分泌に関する研究が行われ、急速な動脈圧の上昇 (急性圧負荷) は、JG 細胞からのレニン分泌を抑制し、慢性圧負荷は JG 細胞からのレニン分泌のみならず、細胞内プロレニンの活性レニンへのプロセッシングも抑制することが示された<sup>2)</sup>。さらに、慢性圧負荷による JG 細胞における

レニン産生・分泌調節機序に細胞内カルシウム動員に関連する機構が重要な役割を担うことが示唆されている<sup>2)</sup>。

本研究では、正常または糖尿病ラットより採取した JG 細胞において、慢性圧負荷がレニン産生・分泌に与える影響とそれに関与するカルシウム関連機序について検討した。糖尿病患者におけるレニン・アンジオテンシン系の最も顕著な異常は、血中レニンの減少と血中プロレニンの増加であり<sup>3)</sup>、血中プロレニンの増加は糖尿病性微小血管障害の発症に関与する可能性を示唆する報告がある<sup>4)5)</sup>。一方、糖尿病患者では、降圧薬の種類に関係無く降圧そのものが血管合併症のリスクを減じることが明らかにされている<sup>6)7)8)</sup>。したがって、糖尿病病態において、慢性圧負荷のレニン産生・分泌への影響とその機序を解析することは、十分な降圧が糖尿病性血管合併症の発症を抑制するかを解明する鍵となる可能性がある。

腎動脈圧の上昇は、血管壁に対し垂直方向および正接方向の機械的圧力を生じ、各々 transmural pressure, shear stress (ずり応力) と呼ばれる。Shear stress は血管内皮細胞の nitric oxide 産生・放出を刺激する<sup>9)10)11)12)</sup>。Nitric oxide は、急性期にはレニン分泌を抑制するが、慢性期にはレニン分泌を刺激する<sup>13)</sup>。ゆえに、shear stress による nitric oxide 増加は圧によるレニン分泌調節に関与していると考えられた<sup>14)15)</sup>。一方、transmural pressure は培養血管内皮細胞からの nitric oxide 放出を抑制することが示されている<sup>16)</sup>ので、この機構を介してレニン分泌を調節すると考えられた。しかし、transmural pressure は血管壁に対し正接した緊張を引き起こす。この結果 stretch (伸展力) を生じさせる。現在までに、培養ラット JG 細胞において、20 時



間の伸展刺激がレニン分泌を抑制したことが描かれている<sup>17)</sup>。しかしながら、伸展刺激より分離された trans-mural pressure を得ることが技術的に困難であったため、純粋な trans-mural pressure によるレニン分泌調節への直接影響は解明されていない。

本研究では、shear stress や stretch の影響を極力除いた、壁に垂直に働く圧力 (trans-mural pressure) が JG 細胞のレニン産生・分泌におよぼす影響を検討した。さらに、phospholipase C (以下 PLC と略す) や phospholipase D (以下 PLD と略す) は血管作動性物質による細胞内カルシウム動員の second messenger であることが知られているので<sup>18)19)</sup>、本研究ではこの機序を PLC 阻害薬・PLD 阻害薬を用いて検討した。

## 方 法

本研究は慶應義塾大学医学部動物実験委員会のガイドラインに準拠し、これを遵守した。

### 1. 糖尿病および正常対照ラットの作成

糖尿病モデルおよびその正常対照モデルの作成のために、4週齢の雄 Sprague-Dawley ラットにストレプトゾトシン (Wako, Osaka, Japan) 65 mg/kg を含むクエン酸緩衝液 10 mmol/L またはストレプトゾトシンを含まないクエン酸緩衝液 10 mmol/L をそれぞれ腹腔内注射した。腹腔内注射後 7 日または 28 日経過した時点で早期および慢性期糖尿病モデルとして実験に供した。全てのラットは、温度管理され 12 時間明暗周期のあるケージ内で、飲水制限無く 110 μmol/g のナトリウムを含む研究室用飼料にて飼育され、糖尿病の発症は腹腔内注射後、7 日目と 28 日目における血糖値 300 mg/dl 以上をもって確認した。

### 2. JG 細胞の分離と初代培養

1 回の初代培養細胞作成に付き、10 匹の雄 Sprague-Dawley ラット (体重 100-150 g) の腎臓を 15 ml の緩衝液 A (1 g glucose, 12.11 g sucrose, 2.2 g NaHCO<sub>3</sub>, 2.6 mmol/L L-glutamine, 0.84 g sodium citrate, 10 mg/L bovine serum albumin を含む Hank's balanced salt solution) で灌流した後摘出した。その髄質を取り除き、皮質を 1 mm<sup>3</sup> 大にスライスして 0.25% trypsin (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) と 0.1% の collagenase A (from Clostridium histolyticum, Boehringer, Mannheim, Germany) を含む緩衝液 B (sodium citrate を含まない緩衝液 A) 内に置き、ゆっ

くり攪拌しながら 5%CO<sub>2</sub>, 37°C に保たれた培養器内に 120 分置いた。それを 22 μm のナイロンメッシュで濾過し、分離された細胞を収集した。これを 50 G で 10 分間 5 mmol/L N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (以下 HEPES と略す) 緩衝液と L-glutamine を含む RPMI1640 にて遠心し 2 度洗浄した。さらに JG 細胞収集のため 35 ml の 25% Percoll 液にて 20000 G, 20 分間遠心し JG 細胞を分離した<sup>20)21)</sup>。分離した JG 細胞は、その細胞数を血球算定盤 (Coulter counter; Coulter, Miami, USA) を用いて算定した後、8 ウェル培養スライドに 1 ウェル当たり 10<sup>6</sup> cells/ml になるように分注され、実験前 48 時間を 37°C で、25 mmol/L HEPES 緩衝液, 0.3 g/L L-glutamine, 100 μg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 0.66 U/L insulin, 10% fetal bovine serum を含む RPMI1640 下で培養された。本研究で用いられた初代培養 JG 細胞のレニン陽性率は、細胞分離 60 時間後において 92±2% であった (n=6)。

### 3. 細胞への圧負荷

あらかじめ 37°C に加温された圧負荷装置 (model DV-5-ST; Advantec Toyo) 内に、分離後 48 時間初代培養された JG 細胞を含む 8 ウェル培養スライドを置いた。圧負荷装置を密閉後、バルブに接続した三方活栓を通してヘリウムガスで加圧し、三方活栓の另一端に接続した水銀柱で内圧を監視し圧負荷を一定に保った。最後に圧負荷装置全体を 37°C に保たれた培養器内に静置し、ずり応力 (shear stress) や伸展力 (stretch) の影響を極力除いた、壁に垂直に働く圧力 (trans-mural pressure) を 12 時間負荷することにより、慢性的な圧負荷効果を評価した。なぜならば、予備実験において 3 時間の大気圧 (atmospheric pressure: 以下 AP と略す) および AP+40 mmHg の加圧では、レニン分泌率に有意差を認めなかった (7.9±3.2%, 7.2±3.5%, n=4) 一方、12 時間圧負荷は有意な変化を起こしたからである。加圧の間、培養液酸素分圧および pH は各々 155±4 mmHg, 7.4±0.1 に保たれていた。本研究において、trans-mural pressure 負荷は、AP および AP+40 mmHg にて行った。0 mmHg の加圧は大気圧を意味し、培養細胞にかけられた trans-mural pressure は *in vivo* での腎灌流圧を反映するものではない。ゆえに本研究は、大気圧下での trans-mural pressure 負荷が、JG 細胞のレニン産生・分泌に与える影響を検討したものである。また、圧の増加量 40 mmHg は、正常血圧者 (120/80 mmHg) と明らかな高血圧患者 (180/100

mmHg)における平均血圧の差(約 40 mmHg)が腎輸入細動脈レベルまで維持されたと仮定して設定され、実際に分離された腎臓において、腎灌流圧を 40 mmHg から 80 mmHg へ 40 mmHg 上昇させたとき、レニン分泌が著明に減少し、灌流圧を更に上昇させても、それ以上の減少を認めなかった。また、初代培養されたラット JG 細胞は confluent でないため、stretch や shear stress は技術上困難であり、transmural pressure を用いて圧による影響を検討した。各群は少なくとも 2 ウェル以上で構成され、測定された指標の平均値を結果として採用した。

#### 4. 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の測定

分離後 48 時間培養した JG 細胞は、培養液を除去し加温されたリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: 以下 PBS と略す)で 2 度洗浄を行った後、1 ml の  $\text{Ca}^{2+}$  含有 PBS と共に圧負荷装置内に置かれた。この際、実験開始前(0 hr)と後(12 hr)の細胞を含む緩衝液は採取・遠心され、上清はレニン分泌率(renin secretion rate: 以下 RSR と略す)、プロレニン分泌率(prorenin secretion rate: 以下 PRSR と略す)算出のために  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存された。また、12 時間圧負荷装置内に置かれた細胞は PBS で洗浄された後、細胞内活性レニン濃度(active renin content: 以下 ARC と略す)・細胞内プロレニン濃度(不活性レニン; prorenin content: 以下 PRC と略す)・細胞内総レニン濃度(活性+不活性レニン; total renin content: 以下 TRC と略す)測定のため、液体窒素で凍結し  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存された。凍結細胞は 1 ml の緩衝液(pH: 6.0; 2.6 mmol/L ethylenediaminetetraacetate, 1.6 mmol/L dimercaprol, 3.4 mmol/L 8-hydroxyquinoline sulfate, 0.2 mmol/L phenylmethyl sulfonyl fluoride, 5 mmol/L ammonium acetate を含む)で溶解され 12000 G で 30 分遠心後、上清が採取された。TRC は検体内の不活性レニンを活性化し、全レニン活性を測定することにより求めた。実際には、上清検体(900  $\mu\text{l}$ )を  $0^{\circ}\text{C}$  下で、4 mg/ml trypsin を含む 500 mmol/L Tris 緩衝液(pH: 7.5; 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 0.1% NaCl azide, 1% bovine serum albumin を含む) 100  $\mu\text{l}$  で処理し、60 分後に trypsin inhibitor(最終濃度 8 mg/ml; Sigma Chemical Co.)を加え反応を停止した。レニン活性は、両側腎摘出術後 24 時間経過した Sprague-Dawley ラットの血漿をレニン基質として検

体に加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間静置し、アンジオテンシノーゲンをアンジオテンシン I に変換する酵素活性をもって測定し、アンジオテンシン I は、radioimmunoassay (Dinabott Radioisotope Institute, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

RSR (%) は、以下の式を用いて、細胞に由来した全活性レニンのうち緩衝液中に分泌された活性レニンの比率を計算し求めた; (12 時間後の緩衝液中レニン活性 - 0 時間での緩衝液中レニン活性)/(12 時間後の細胞内活性レニン濃度 + 12 時間後の緩衝液中レニン活性 - 0 時間での緩衝液中レニン活性)。PRSR (%) は、以下の式を用いて、細胞に由来した不活性レニンのうち緩衝液中に分泌された不活性レニンの比率を計算し求めた; (12 時間後の緩衝液中不活性レニン活性 - 0 時間の緩衝液中不活性レニン活性)/(12 時間後の細胞内不活性レニン濃度 + 12 時間後の緩衝液中不活性レニン活性 - 0 時間の緩衝液中不活性レニン活性)。緩衝液中不活性レニン活性は、緩衝液中総レニン活性から活性レニン活性を引いた値として算出し、細胞内不活性レニン濃度は、細胞内総レニン濃度から活性レニン濃度を引いた値として算出した。

#### 5. 実験プロトコール

実験 1. 正常および早期糖尿病モデルから分離した JG 細胞において慢性圧負荷がレニン産生・分泌におよぼす影響。

クエン酸緩衝液またはストレプトゾトシン (65 mg/kg) を腹腔内注射し、7 日経過した正常対照または糖尿病ラットより採取した JG 細胞を、12 時間の AP および AP+40 mmHg の環境下に置き、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRC を測定した。

実験 2. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞において慢性圧負荷がレニン産生・分泌におよぼす影響。

クエン酸緩衝液またはストレプトゾトシン (65 mg/kg) を腹腔内注射し、28 日経過した正常対照または糖尿病ラットより採取した JG 細胞を、12 時間の AP および AP+40 mmHg の環境下に置き、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRC を測定した。

実験 3. インスリン治療された慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞において慢性圧負荷がレニン産生・分泌におよぼす影響。

血糖上昇効果以外のストレプトゾトシンの直接作用が、

慢性圧負荷によるプロレニン活性化・分泌調節に影響をおよぼした可能性を検討するため、浸透圧ミニポンプ (model 2004; Alzet, Palo Alto, USA) を頸部背側と腹部の皮下に移植し、レギュラーインスリン (9 U/kg/day, Novolin R; Novo Nordisc Pharma, Tokyo, Japan) による治療を4週間行った。血糖コントロール状況を確認するため、血糖値を週2回測定した。28日経過後、同ラットより採取したJG細胞を、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの環境下に置き、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。

実験4. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離したJG細胞において慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節におけるPLC依存性経路の検討。

クエン酸緩衝液を腹腔内注射し28日経過した正常対照モデルラットより採取したJG細胞を、PLC阻害薬であるU73122 (10 μmol/L; Sigma Chemical Co.) と不活性アナログであるU73343 (10 μmol/L; Sigma Chemical Co.) を含む緩衝液に置き、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの負荷の後、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。また同細胞を、別のPLC阻害薬である2-nitro-4-carboxyphenyl-N, N-diphenyl-carbamate 200 μmol/L (以下NCDCと略す, Sigma Chemical Co.) を含む緩衝液に置き、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの負荷の後、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。さらに、ストレプトゾトシン (65 mg/kg) を腹腔内注射し28日経過した糖尿病モデルラットより採取したJG細胞においても同様に、200 μmol/LのNCDCを含む緩衝液に細胞を置き、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの負荷の後、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。本実験で用いた濃度のNCDCおよびU73122は、アンジオテンシン

II負荷や灌流圧上昇に対する輸入細動脈収縮反応を有意に抑制した<sup>22) 23)</sup>。

実験5. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離したJG細胞において慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節におけるPLD依存性経路の検討。

生理食塩水またはストレプトゾトシン (65 mg/kg) を腹腔内注射し、28日経過した正常対照および糖尿病モデルラットより採取したJG細胞を、PLD阻害薬である4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride 100 μmol/L (以下AEBSFと略す, Sigma Chemical Co.) を含む緩衝液またはコントロール緩衝液に置き、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの負荷の後、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。In vitroの研究で、AEBSFはPLC, phospholipase A2活性に影響を及ぼすことなくPLD活性を阻害し、そのIC50は75 μmol/Lであることが示されている<sup>24)</sup>。

## 6. 統計学的解析

すべての測定値は、平均±標準誤差で表した。統計学的解析にはtwo-way ANOVAを用いて群間比較を行った後、Scheffe's F-testを行った。P<0.05を統計学的有意差ありとした。

## 結 果

1. 正常および早期糖尿病モデルから分離したJG細胞への慢性圧負荷のレニン産生・分泌におよぼす影響。

表1で示すように、ストレプトゾトシン腹腔内注射7日後の早期糖尿病モデルラットは、正常対照ラットに比べ低体重・高血糖であったが、収縮期血圧・尿蛋白量は両群間で差を認めなかった。

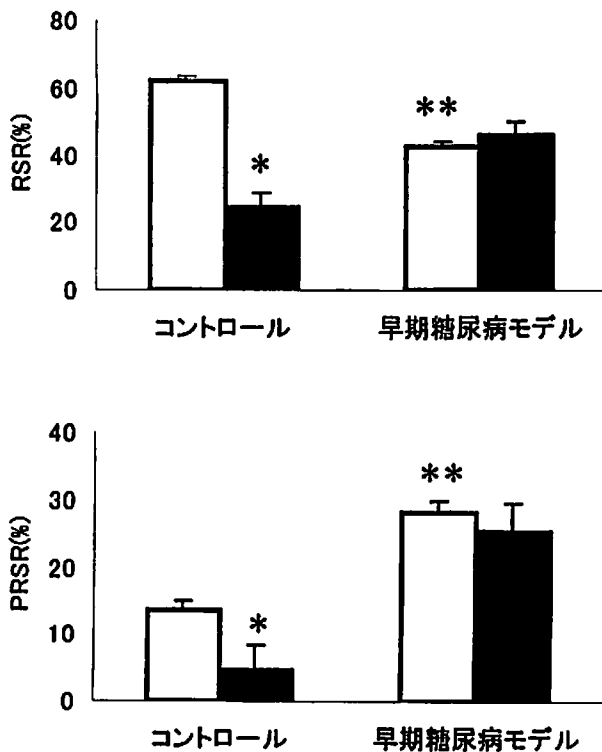
第1表 コントロールおよびストレプトゾトシン注射による糖尿病モデルラットの体重, 血圧, 尿蛋白量, 血糖値

モデル	体重 (g)	血圧 (mmHg)	尿蛋白量 (mg/day)	血糖 (mg/dl)
腹腔内注射後7日				
コントロール (n=6)	149±5	120±2	11.3±3.3	122±7
糖尿病 (n=6)	120±12*	116±2	14.9±0.8	362±24*
腹腔内注射後28日				
コントロール (n=6)	294±6	119±2	15.5±1.4	122±6
糖尿病 (n=6)	211±9*	118±2	34.8±4.0*	370±16*

平均±標準誤差で表した。\*p<0.05 vs. コントロール

(Hirota N et al: Hypertens Res 26: 493-501, 2003のTable1.を許可を得て改変, 転載)

第1図は、正常対照ラットおよび早期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷による RSR, PRSR の変化を示したものである。正常対照ラット JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷により、RSR が  $61.8 \pm 1.3$  から  $24.4 \pm 4.4\%$  へ、PRSR が  $13.6 \pm 1.5$  から  $4.5 \pm 1.5\%$  へ有意に減少した。一方、早期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の RSR は  $42.5 \pm 3.5\%$  であり、正常対照ラット JG 細胞と比較し、有意に低値であった。また、大気圧下の PRSR は  $28.3 \pm 4.0\%$  であり、正常対照ラット JG 細胞と比較し、有意に高値であった。早期糖尿病モデルラット JG 細胞の RSR, PRSR は共に、40 mmHg の慢性圧負荷によって変化せず、圧負荷後の RSR, PRSR はそれぞれ  $45.9 \pm 3.7\%$  と  $25.5 \pm 3.1\%$  であった。以上より、早期糖尿病モデルラットにおいて、慢性圧負荷による RSR, PRSR



第1図 正常対照ラットおよび早期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate : RSR)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate : PRSR) におよぼす影響。

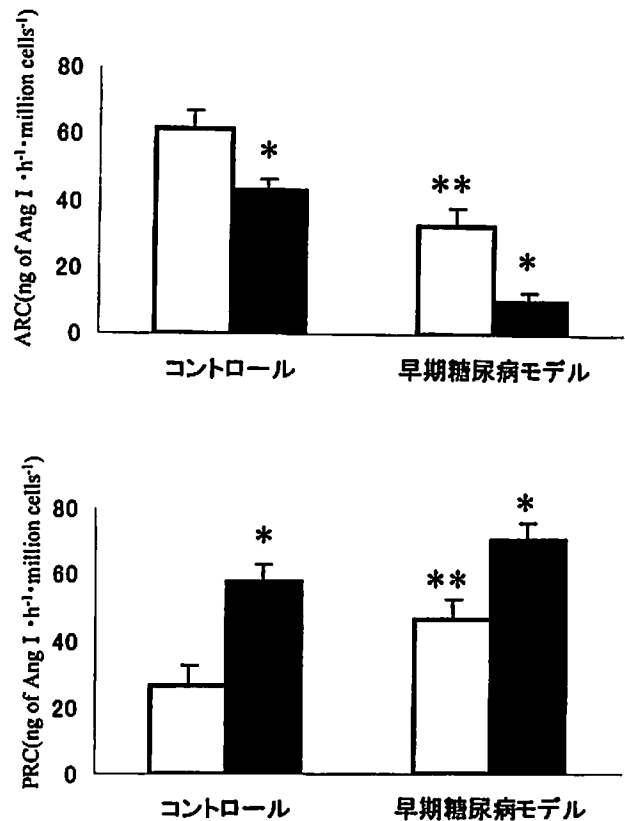
□大気圧 ■大気圧 + 40 mmHg. 平均 ± 標準誤差で表した。

\* $p < 0.05$  vs. 大気圧. \*\* $p < 0.05$  vs. コントロール大気圧.

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 1. を許可を得て改変, 転載)

減少反応が阻害されていることが明らかにされた。

第2図は、正常対照ラットおよび早期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷による ARC, PRC の変化を示したものである。正常対照ラット JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷により、ARC が  $61.8 \pm 4.9$  から  $43.3 \pm 4.1$  ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup> へと有意に減少し、PRC は  $26.7 \pm 5.9$  から  $57.3 \pm 7.0$  ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup> へと有意に増加した。早期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の ARC は  $32.7 \pm 3.1$  ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup> と、正常対照ラット JG 細胞と比較し有意に低値



第2図 正常対照ラットおよび早期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷が細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC)、細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

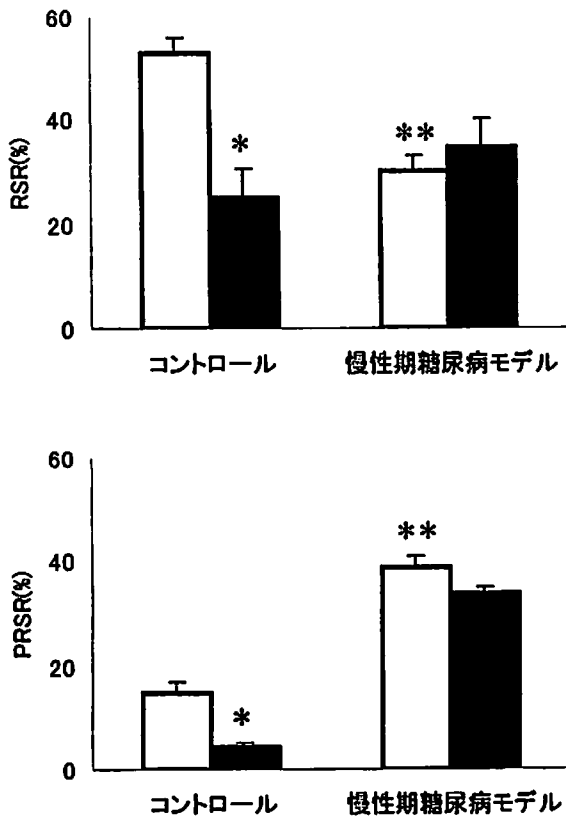
□大気圧 ■大気圧 + 40 mmHg. 平均 ± 標準誤差で表した。

\* $p < 0.05$  vs. 大気圧. \*\* $p < 0.05$  vs. コントロール大気圧.

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 2. を許可を得て改変, 転載)

であり、大気圧下の PRC は  $46.4 \pm 5.5$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> と、正常対照ラット JG 細胞と比較し有意に高値であった。大気圧に加えた 40 mmHg の慢性圧負荷は、ARC を  $9.6 \pm 1.4$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へと有意に減少させた。この慢性圧負荷による ARC の減少度 ( $23.8 \pm 3.1$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup>) は、正常対照ラット JG 細胞における ARC の減少度 ( $19.2 \pm 5.2$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup>) と同様であった。早期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧に加えた 40 mmHg の慢性圧負荷は、PRC を  $70.1 \pm 4.2$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へと有意に増加させ、この圧負荷による PRC の増加度

( $23.7 \pm 3.5$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup>) は、正常対照ラット JG 細胞における PRC の増加度 ( $30.7 \pm 6.3$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup>) と同様であった。また、正常対照および早期糖尿病モデルラット JG 細胞間で、大気圧下の TRC に差はなく、いずれの JG 細胞においても 40 mmHg の慢性圧負荷によって TRC は変化しなかった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、早期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

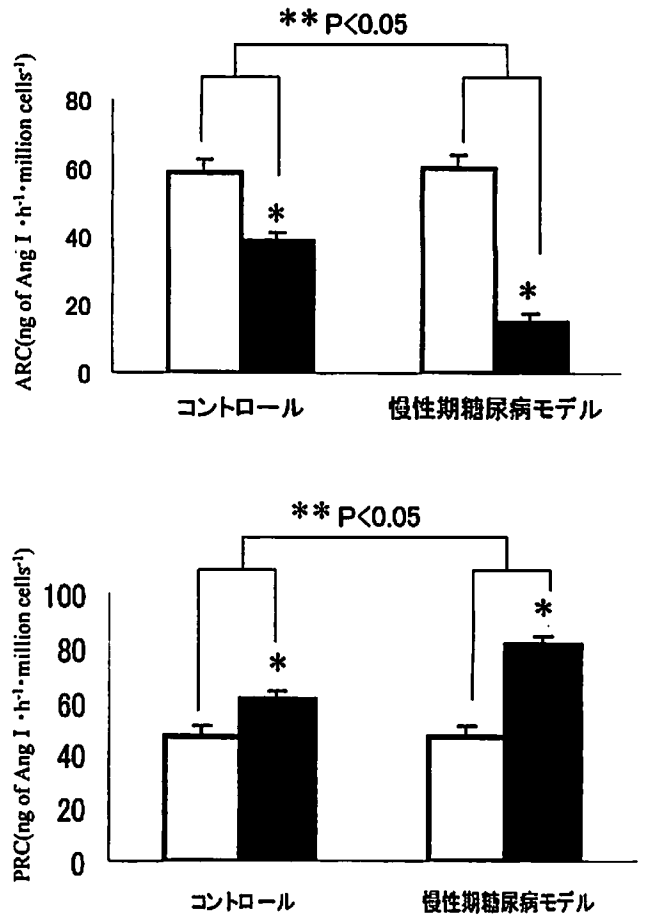


第3図 正常対照ラットおよび慢性糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate : RSR)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate : PRSR) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。

\*p<0.05 vs. 大気圧. \*\*p<0.05 vs. コントロール大気圧.

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 3. を許可を得て改変, 転載)



第4図 正常対照ラットおよび慢性糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷が細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC)、細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。

\*p<0.05 vs. 大気圧. \*\*p<0.05 vs. コントロールにおける圧負荷変化量.

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 4. を許可を得て改変, 転載)

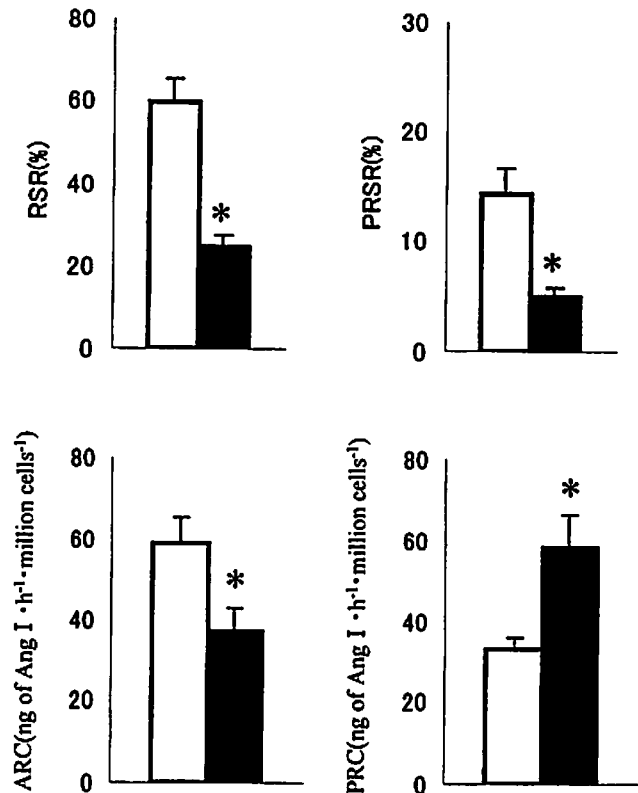
2. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞への慢性圧負荷のレニン産生・分泌におよぼす影響。

表 1 で示すように、ストレプトゾトシン腹腔内注射 28 日後の慢性期糖尿病モデルラットは、正常対照ラットに比べ低体重・高血糖・高蛋白尿であったが、収縮期血圧は両群間で差を認めなかった。

第 3 図は、正常対照ラットおよび慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷による RSR, PRSR の変化を示したものである。正常対照ラット JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷により、RSR が  $52.8 \pm 2.9$  から  $24.9 \pm 5.4\%$  へ、PRSR が  $14.9 \pm 2.2$  から  $4.1 \pm 1.0\%$  へ有意に減少した。一方、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の RSR は  $29.9 \pm 3.1\%$  とコントロールラット JG 細胞と比較し有意に低値であり、大気圧下の PRSR は  $38.7 \pm 4.0\%$  と正常対照ラット JG 細胞と比較し、有意に高値であった。慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、RSR, PRSR は共に 40 mmHg の慢性圧負荷によって変化せず、負荷後それぞれ  $34.7 \pm 5.2\%$ ,  $34.0 \pm 4.4\%$  であった。以上より、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞においても、慢性圧負荷による RSR, PRSR 減少反応が抑制されていることが示された。

第 4 図は、正常対照ラットおよび慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷による ARC, PRC への影響を示したものである。正常対照ラット JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷により、ARC が  $58.5 \pm 4.2$  から  $38.9 \pm 2.2$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へと有意に減少し、PRC は  $46.7 \pm 4.4$  から  $60.7 \pm 3.5$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へと有意に増加した。慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の ARC は  $59.7 \pm 6.2$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> であり、正常対照ラット JG 細胞と有意差を認めなかった。大気圧に加えた 40 mmHg の慢性圧負荷は、ARC を  $15.1 \pm 1.6$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へと有意に減少させ、この ARC の減少度 ( $44.5 \pm 5.1$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup>) は、正常対照ラット JG 細胞における ARC の減少度 ( $19.5 \pm 4.2$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup>) と比較し有意に大きかった。また、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の PRC は  $46.7 \pm 12.2$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> であり、正常対照ラット JG 細胞と同様であった。大気圧に加えた 40 mmHg の慢性圧負荷は、PRC を  $80.7 \pm 18.5$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へと有意に増加させ、この PRC の増加度 ( $34.1 \pm 4.6$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup>) は、正常対照

ラット JG 細胞における PRC の増加度 ( $14.0 \pm 2.6$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup>) と比較し有意に大きかった。以上より、慢性期糖尿病モデル JG 細胞では、慢性圧負荷による ARC の減少と PRC の増加が増強されていることが示された。また、大気圧下の TRC は、コントロールおよび慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞間に差を認めなかった。また、正常対照および慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞間で、大気圧下の TRC に差はなく、いずれの JG 細胞においても 40 mmHg の慢性圧負荷によって TRC は変化しなかった。トリパンプルー染色による生存細胞数の検討では、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。



第 5 図 インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate : RSR), プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate : PRSR), 細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。\* $p < 0.05$  vs. 大気圧。

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 5. を許可を得て改変, 転載)

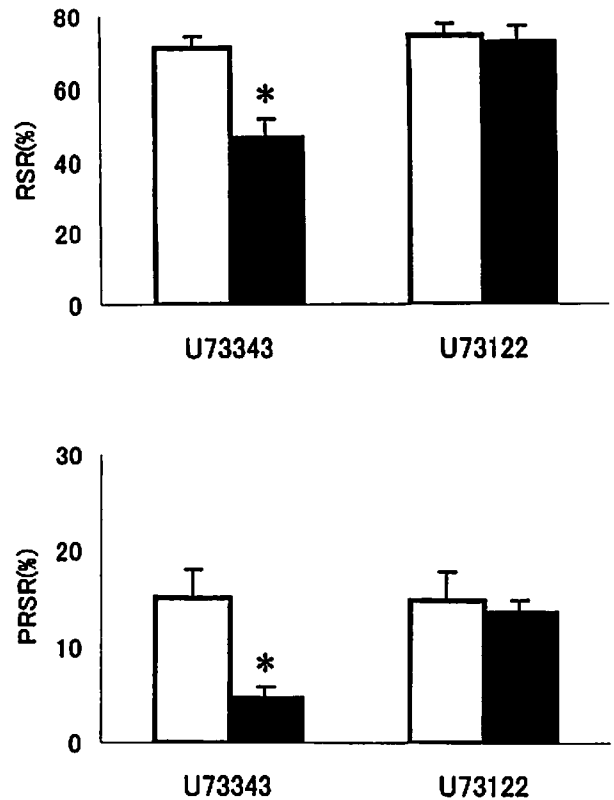
3. インスリン治療された慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞への慢性圧負荷のレニン産生・分泌におよぼす影響。

インスリンで治療された慢性期糖尿病モデルラットの血糖値は、4 週の間  $124 \pm 5$  mg/dl (85-171 mg/dl に分布) であり、正常対照ラットの血糖値  $108 \pm 7$  mg/dl (89-133 mg/dl に分布) と差を認めなかった。また、その体重・収縮期血圧・尿蛋白量は、それぞれ  $280 \pm 4$  g,  $115 \pm 3$  mmHg,  $14.4 \pm 1.4$  mg/day であった。

第5図は、インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷が RSR, PRSR, ARC, PRC に及ぼす影響を示したものである。インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、大気圧に加えた 40 mmHg の 12 時間圧負荷は、RSR を  $59.8 \pm 5.2$  から  $24.5 \pm 2.8\%$  へ減少させ、PRSR を  $14.3 \pm 2.2$  から  $4.8 \pm 0.9\%$  へ減少させ、ARC を  $58.5 \pm 6.7$  から  $36.8 \pm 5.7$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へ減少させ、PRC を  $32.8 \pm 2.6$  から  $58.0 \pm 7.9$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へ増加させた。また、インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、慢性圧負荷は TRC に影響をおよぼさなかった。トリバンプルー染色による生存細胞数の検討では、インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

4. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞への慢性圧負荷のレニン産生・分泌調節における PLC 依存性経路の検討。

第6図は、正常ラットから採取した JG 細胞において、細胞を PLC 阻害薬である U73122 およびこの不活性アナログである U73343 (各 10  $\mu$ mol/L) で前処置した後、12 時間の圧負荷による RSR, PRSR を示したものである。大気圧下の RSR は U73122 および U73343 処置間で有意差を認めず、U73343 で前処置した JG 細胞では、40 mmHg の圧負荷により、RSR が  $70.8 \pm 3.2\%$  から  $46.5 \pm 4.6\%$  へ有意に減少した。一方、U73122 で前処置した JG 細胞では、RSR は 40 mmHg の慢性圧負荷による影響を受けず、大気圧下で  $73.9 \pm 3.9\%$ 、大気圧+40 mmHg 下で  $72.4 \pm 3.5\%$  であった。また、大気圧下の PRSR は U73122 および U73343 処置間で有意差を認めず、U73343 で前処置した JG 細胞では、40 mmHg の圧負荷により、PRSR が  $15.1 \pm 2.9\%$  から  $4.7 \pm 1.2\%$  へ有意に減少した。一方、U73122 で前処置した JG 細胞では、PRSR は 40 mmHg の慢性圧負荷に



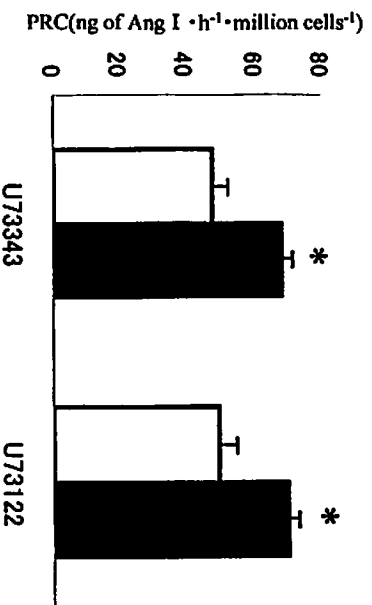
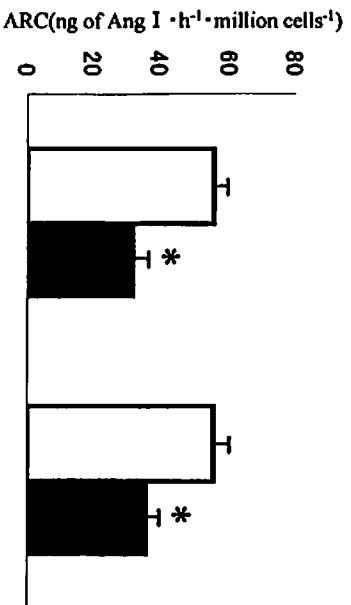
第6図 正常ラットより採取した JG 細胞において、PLC 阻害薬である U73122、および不活性アナログである U73343 存在下で、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate: RSR)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: PRSR) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。\* $p < 0.05$  vs. 大気圧。

(Hirota N et al: Hypertension 39[part 2]: 363-367, 2002 の Fig. 2. の一部を許可を得て改変、転載)

よる影響を受けず、大気圧下で  $14.9 \pm 3.1\%$ 、大気圧+40 mmHg 下で  $13.6 \pm 2.8\%$  であった。これら結果から、U73122 前処置による PLC 阻害は、慢性圧負荷によるレニンやプロレニンの分泌抑制を阻害すると考えられた。

第7図は、正常ラットから採取した JG 細胞において、細胞を PLC 阻害薬である U73122 およびこの不活性アナログである U73343 (各 10  $\mu$ mol/L) で前処置した後、12 時間の圧負荷による ARC, PRC を示したものである。U73343 前処置 JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷は、ARC を  $55.4 \pm 4.4$  から  $31.9 \pm 4.3$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へ減少させ、U73122 前処置 JG 細胞においても  $55.5 \pm 1.9$  から  $35.6 \pm 2.0$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へ減少させた。これら慢性



第7図 正常ラットより採取したJG細胞において、PLC阻害薬であるU73122, および不活性アナログであるU73343の存在下で、12時間の圧負荷が細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

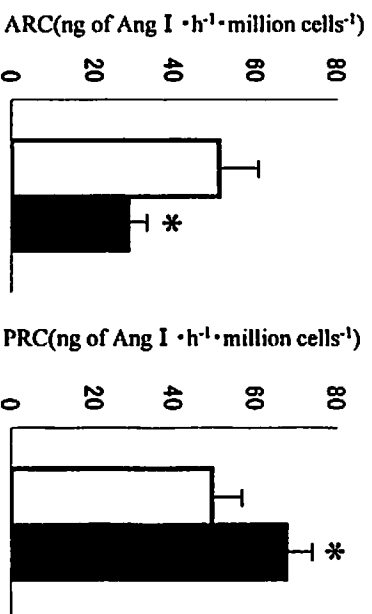
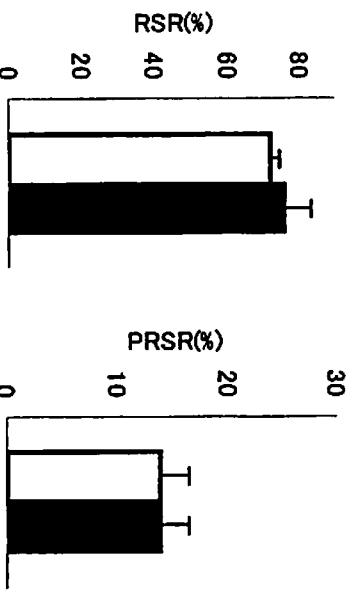
□大気圧 ■大気圧+40 mmHg, 平均±標準誤差で表した。\*p<0.05 vs. 大気圧。

(Hirota N et al : Hypertension 39[part 2] : 363-367, 2002 の Fig. 2. の一部を許可を得て改変, 転載)

圧負荷によるARCの減少度に、両処置間で差を認めなかった。さらに、U73343前処置JG細胞では、40 mmHgの慢性圧負荷は、PRCを47.6±4.8から68.2±5.9 ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup>へ増加させ、U73122前処置JG細胞においても49.8±4.4から70.2±6.1 ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup>へ増加させた。これら慢性圧負荷によるPRCの増加度に、両処置間で差を認めなかった。また、U73122処置およびU73343処置は、慢性圧負荷前後でのTRCに影響を及ぼさず、U73343前処置JG細胞のTRCは圧負荷前後でそれぞれ106.1±6.6と104.8±6.4 ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup>であり、U73122前処置JG細胞のTRCは圧負

荷前後でそれぞれ107.0±11.1と109.4±17.1 ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup>であった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、U73343前処置またはU73122前処置JG細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

第8図は、正常ラットから採取したJG細胞において、200 μmol/L NCDCで前処置した際の12時間の圧負荷によるJG細胞のRSR, PRSR, ARC, PRCを示したものである。NCDC前処置JG細胞では、RSRは40 mmHgの慢性圧負荷による影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ71.6±2.9%と75.7±7.6%であった。また、PRSRも40 mmHgの慢性圧負荷による影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ13.9±2.4%と13.8±2.6%であっ



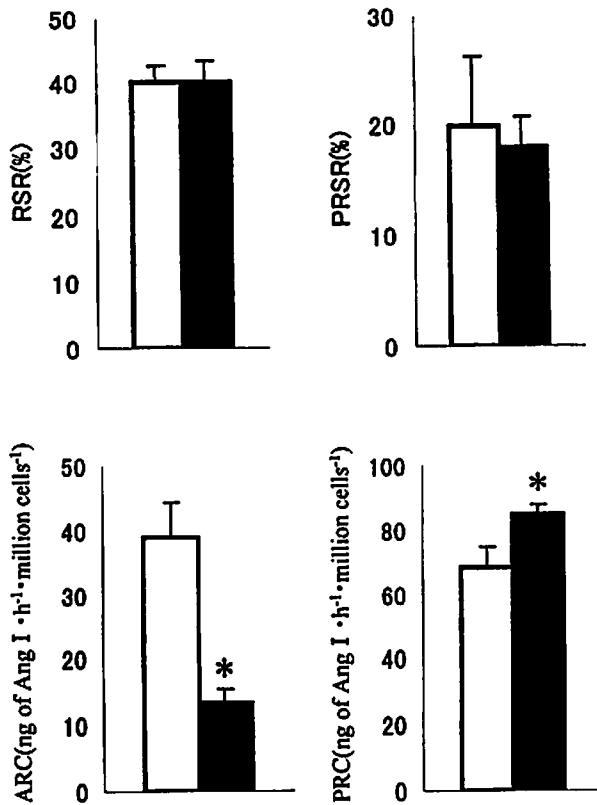
第8図 正常ラットより採取したJG細胞において、PLC阻害薬であるNCDCの存在下で、12時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate : RSR), プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate : PRSR), 細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg, 平均±標準誤差で表した。\*p<0.05 vs. 大気圧。

(Hirota N et al : Hypertension 39[part 2] : 363-367, 2002 の Fig. 1. の一部を許可を得て改変, 転載)



た。以上より、NCDC 前処置による PLC 阻害も、慢性圧負荷によるレニンやプロレニンの分泌抑制を阻害することから、PLC が慢性圧負荷によるレニンやプロレニンの分泌抑制機序に関与すると考えられた。NCDC 前処置 JG 細胞において、ARC は慢性圧負荷によって  $50.8 \pm 9.5$  から  $28.0 \pm 5.0$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へ減少した。また、PRC も慢性圧負荷によって  $48.9 \pm 7.6$  から  $67.2 \pm 6.7$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へ増加した。NCDC 前処置 JG 細胞の TRC は、慢性圧負荷によって影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ  $107.8 \pm 8.9$  と  $93.5 \pm 5.9$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> であった。これら ARC, PRC の変化の傾向は、



第9図 慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、PLC 阻害薬である NCDC の存在下で、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate: RSR)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: PRSR)、細胞内活性レニン濃度 (active renin content: ARC)、細胞内プロレニン濃度 (prorenin content: PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg。平均±標準誤差で表した。\*p<0.05 vs. 大気圧。

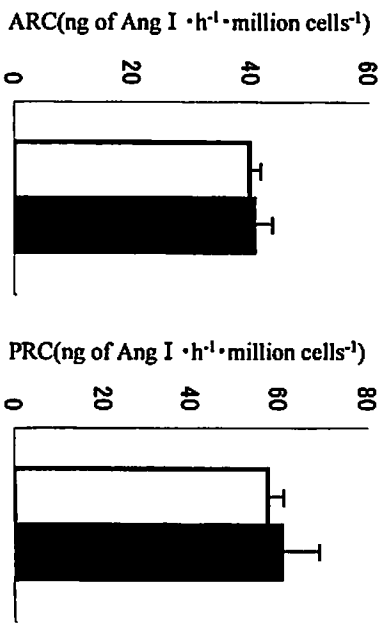
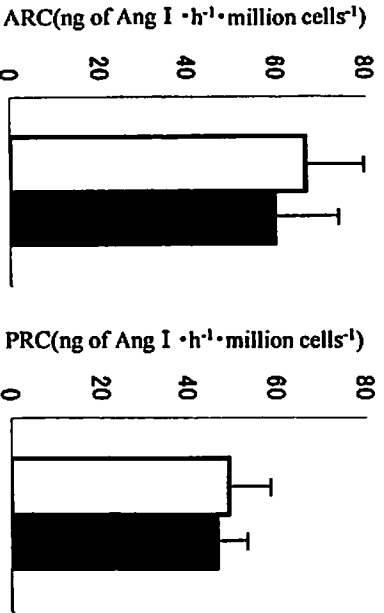
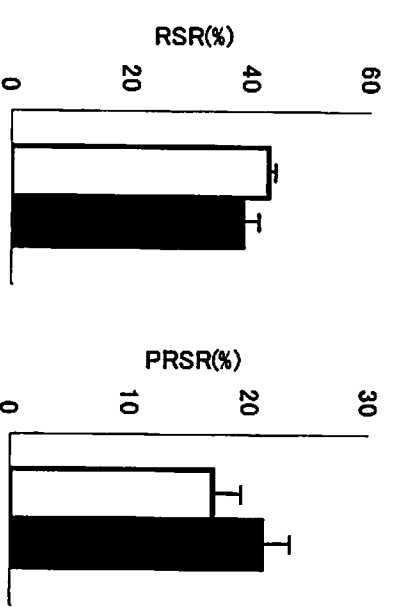
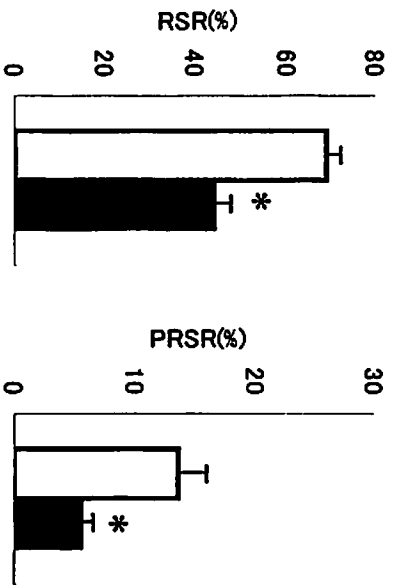
(Hirota N et al: Hypertension Res 26: 493-501, 2003 の Fig. 6. の一部を許可を得て改変, 転載)

NCDC で処置しなかった正常ラット JG 細胞におけるものと同様であった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、NCDC 前処置 JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

第9図は、慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞を NCDC (200  $\mu$ mol/L) で前処置し 12 時間の圧を負荷した際の RSR, PRSR, ARC, PRC の変化を示したものである。NCDC 前処置した慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、12 時間圧負荷前後の RSR はそれぞれ  $40.2 \pm 2.4\%$  と  $40.2 \pm 3.2\%$  であり、12 時間圧負荷前後の PRSR はそれぞれ  $19.8 \pm 0.8$  と  $17.9 \pm 2.3\%$  であった。これらから、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞においても、NCDC 処置による PLC 阻害は慢性圧負荷による RSR, PRSR 減少反応を抑制することが示された。NCDC 前処置した慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、40 mmHg の慢性圧負荷は、ARC を  $38.8 \pm 5.5$  から  $13.4 \pm 2.0$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へと有意に減少させ、PRC を  $68.3 \pm 6.4$  から  $85.0 \pm 2.8$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> へと有意に増加させ、TRC には影響をおよぼさなかった。これら ARC, PRC の変化の傾向は、NCDC で処置しなかった慢性期糖尿病ラット JG 細胞におけるものや NCDC 前処置した正常ラット JG 細胞におけるものと同様であった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、NCDC で前処置された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

5. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞への慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節における PLD 依存性経路の検討。

第10図は、PLD 阻害薬である 100  $\mu$ mol/L の AEBSF で前処置した正常ラット由来 JG 細胞に 12 時間の圧を負荷した際の RSR, PRSR, ARC, PRC を示したものである。AEBSF 前処置 JG 細胞において、40 mmHg の慢性圧負荷により、RSR は  $68.8 \pm 3.4$  から  $43.9 \pm 3.5\%$  へ有意に減少し、PRSR も  $13.6 \pm 2.3\%$  から  $5.4 \pm 1.0\%$  へ有意に減少した。また、ARC は 40 mmHg の慢性圧負荷によって影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ  $66.4 \pm 13.2$  と  $59.4 \pm 14.4$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> であった。PRC も 40 mmHg の慢性圧負荷によって影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ  $48.6 \pm 9.8$  と  $45.9 \pm 7.2$  ng of Ang I  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  million cells<sup>-1</sup> であった。TRC は AEBSF 処置による影響を受けず、40 mmHg の慢性圧負荷前後でそれぞれ  $115.2 \pm 8.4$  と



第10図 正常ラットより採取したJG細胞において、PLD阻害薬であるAEBSFの存在下で、12時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate: RSR), プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: PRSR), 細胞内活性レニン濃度 (active renin content: ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content: PRC) におよぼす影響。  
□大気圧 ■大気圧+40 mmHg, 平均±標準誤差で表した。\*p<0.05 vs. 大気圧。

(Hirota N et al: Hypertension 39[part 2]: 363-367, 2002 の Fig. 3. の一部を許可を得て改変, 転載)

第11図 慢性期糖尿病モデルラットより採取したJG細胞において、PLD阻害薬であるAEBSFの存在下で、12時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate: RSR), プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: PRSR), 細胞内活性レニン濃度 (active renin content: ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content: PRC) におよぼす影響。  
□大気圧 ■大気圧+40 mmHg, 平均±標準誤差で表した。

(Hirota N et al: Hypertens Res 26: 493-501, 2003 の Fig. 7. の一部を許可を得て改変, 転載)

105.6±5.1 ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup>であった。これらの結果より、正常ラット JG細胞において、AEBSF による PLD 阻害は、慢性圧負荷による ARC 減少反応や PRC 増加反応を抑制することが示された。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、AEBSF 前処置された正常ラット JG細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

第11図は、慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG細胞を AEBSF (100 μmol/L) で前処置し 12時間の圧を負荷した際の RSR, PRSR, ARC, PRC の変化を示したものである。AEBSF 前処置した慢性期糖尿病モデルラット JG細胞において、慢性圧負荷は RSR や

PRSR に影響を与えず、圧負荷前後の RSR はそれぞれ 42.7±1.4%と 38.5±2.8%であり、圧負荷前後の PRSR はそれぞれ 16.9±2.3%と 21.0±2.3%であった。また、慢性圧負荷は ARC や PRC にも影響せず、圧負荷前後の ARC はそれぞれ 39.7±2.1 と 40.4±3.4 ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup>であり、圧負荷前後の PRC はそれぞれ 57.1±4.0 と 60.2±8.5 ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup>であった。AEBSF 前処置した慢性期糖尿病モデルラット JG細胞において、慢性圧負荷は TRC にも影響しなかった。これらの結果より、慢性期糖尿病モデル JG細胞において、AEBSF による PLD 阻害は、慢性圧負荷による RSR 減少反応、PRSR 減少反応、

ARC 減少反応, PRC 増加反応を抑制することが示された。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では, AEBSF で前処置された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

## 考 察

正常対照ラット JG 細胞において, 12 時間の圧負荷は TRC に影響をおよぼすことなく RSR, PRSR, ARC を減少させ, PRC を増加させた。細胞内で既に活性化したレニンの再不活性化が起こらないならば, JG 細胞において慢性圧負荷はレニン分泌, プロレニン分泌, プロレニンからレニンへのプロセッシングを抑制すると考えられた。一方, 早期および慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において, 12 時間の圧負荷は, RSR, PRSR, TRC に影響をおよぼすことなく ARC を減少させ, PRC を増加させた。この PRC 増加反応は, 正常対照ラット JG 細胞と比べ, 早期糖尿病モデルラット JG 細胞で差を認めなかったが, 慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では, 有意に増強していた。さらに, インスリンによる糖尿病治療で血糖を正常化させた場合には, 慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞における, 慢性圧負荷によるレニン・プロレニン調節の障害を改善した。これら結果より, 糖尿病の進行に連れて, 慢性圧負荷による JG 細胞からのレニン分泌抑制やプロレニン分泌抑制は減弱し, 慢性圧負荷による JG 細胞内のプロレニンからレニンへのプロセッシング抑制は増強することが示された。また, 本研究の予備実験において, 0.1 μg/ml のストレプトゾトシンの JG 細胞への 12 時間暴露は, TRC を有意に減少させた (ストレプトゾトシン存在下・非存在下各々  $50.2 \pm 7.0, 98.2 \pm 2.1$  ng of Ang I · h<sup>-1</sup> · million cells<sup>-1</sup>, n=4) が, 早期または慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞における大気圧下 TRC は, 各々の正常対照と同様であったため, 本研究の実験結果にストレプトゾトシンの急性毒性効果は関連が無いと考えられた。

従来の研究<sup>2)</sup>より, 慢性圧負荷による RSR の抑制は, 細胞外カルシウム濃度とカルシウムチャンネルに依存し, 細胞内カルシウム貯蔵の枯渇は慢性圧負荷による RSR, ARC 減少反応を抑制することが明らかにされている。これらの実験結果より, 慢性圧負荷は, JG 細胞においてカルシウムの細胞内流入を刺激するだけでなく細胞内カルシウム貯蔵に依存した機構で, レニン分泌・プロレニン活性化調節に関与することが示唆されていた。PLC は, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate を加水分解

し, イノシトール 3 リン酸と 1,2-diacylglycerol を産生することが知られており, これらは細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を促し, protein kinase C を活性化する<sup>25)</sup>。また, PLD は, phosphatidylcholine を choline と phosphatidic acid に加水分解し, phosphatidic acid はイノシトール 3 リン酸産生を刺激し, 細胞内カルシウムを動員する<sup>26)27)</sup>。したがって, JG 細胞への慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節機序において, PLC または PLD 依存性経路が関与する可能性が考えられ, 本研究ではこれら機序についても検討を加えた。正常ラット JG 細胞において, PLC 阻害薬である NCDC, U73122 の存在下で, 12 時間の圧負荷は ARC 減少反応や PRC 増加反応に影響を与えずに RSR 減少反応や PRSR 減少反応を抑制した。したがって, 慢性圧負荷による JG 細胞からのレニン・プロレニン分泌調節に, PLC 依存性のカルシウムチャンネルが関与することが示唆された。一方, 糖尿病モデル JG 細胞において, 慢性圧負荷によるレニン・プロレニン分泌調節は障害されており, NCDC による PLC 阻害は既に障害されたレニン・プロレニン分泌調節に影響を与えなかった。また, 輸入細動脈平滑筋細胞が発生過程で変異したものが JG 細胞であるから<sup>28)29)</sup>, その圧負荷による細胞内カルシウム動員のメカニズムは JG 細胞においても維持されていると考えられるが, 以前の研究で<sup>30)31)</sup>, ストレプトゾトシン誘発糖尿病において認められる圧負荷による輸入細動脈収縮障害は, 電位依存性カルシウムチャンネルの機能異常が原因であることが報告されていた。さらにこの機能異常の原因の一つとして protein kinase C が関与するチャンネル活性の低下が考えられ<sup>32)</sup>, 糖尿病ラット JG 細胞では, PLC 依存性カルシウムシグナルが障害されることが示唆された。また, 慢性圧負荷によるプロレニン分泌調節障害が, 既に糖尿病早期から認められ慢性期まで維持されていたことより, 高血糖そのものが PLC 依存性のカルシウムシグナルを障害し, それにより JG 細胞の慢性圧負荷による細胞外分泌調節を障害している可能性が考えられた。この推測は, 細胞を高糖濃度環境下に置くと, 細胞縮小によって伸展受容体が活性化し細胞内カルシウム濃度基礎値が上昇することによって各種刺激による細胞内カルシウム動員が障害されるといふ従来<sup>33)</sup>の報告により支持される。

PLD 阻害薬である AEBSF の存在下では, 12 時間の圧負荷は RSR 減少反応や PRSR 減少反応に影響を与えずに ARC 減少反応や PRC 増加反応を抑制した。この慢性圧負荷による細胞内プロレニンの蓄積は, 正常対照・糖尿病モデルラット JG 細胞で同様に認められた

ことより、慢性圧負荷は PLD に依存する機序でプロレニンからレニンへの変換を抑制し、細胞内プロレニンを蓄積させたと考えられた。その機序としては、細胞内プロレニン顆粒の輸送が関与する可能性が示唆される。PLD およびその脂質産生物である phosphatidic acid は、endoplasmic reticulum からゴルジ装置への小胞体輸送に必須であることが知られている<sup>34)</sup>。ゴルジ装置はプロレニン活性化の場であるので<sup>35)</sup>、慢性圧負荷によるプロレニン活性化抑制機序に、プロレニンを含む小胞体の PLD 依存性輸送が関与している可能性がある。その他の機序として、phosphatidic acid は DNA 合成調節作用を有することから<sup>36)</sup><sup>37)</sup>、慢性圧負荷によって刺激された PLD 由来の phosphatidic acid が、プロレニン活性化酵素の酵素活性に関連した遺伝子の発現調節を行っている可能性も考えられた。

慢性圧負荷による細胞内プロレニンの蓄積は、早期糖尿病モデルラット JG 細胞に比べ、慢性期糖尿病ラットモデル JG 細胞で有意に増強していた。したがって、この増強反応は細胞が慢性的に高濃度の糖質にさらされた結果、二次的に生じた変化であることが推測された。従来の研究では、高血糖は細胞内ミトコンドリアにおける reactive oxygen species (ROS) の産生過多を引き起こすことが報告されている<sup>38)</sup>。Transmural pressure は、血管平滑筋細胞において ROS 生成を刺激し<sup>39)</sup>、PLD 依存性経路もまた血管平滑筋細胞において NADPH oxidase 依存性に ROS を産生するので<sup>19)</sup><sup>40)</sup>、JG 細胞が慢性的に高血糖に暴露されると、産生された ROS によるネガティブフィードバックを介して圧依存性 PLD 経路の抑制が起こる可能性も考えられる。また ROS は、レニンとレニン結合蛋白の複合体である不活性高分子量レニンの形成を刺激することが報告されており<sup>35)</sup>、慢性圧負荷および糖尿病による高血糖は、ROS 活性を増加させることによって JG 細胞における活性レニンから不活性レニンへの変換を引き起こす可能性も考えられた。さらに ROS は、血管平滑筋細胞において cyclic GMP 形成を阻害する<sup>41)</sup>。cyclic GMP は活性レニンの形成を刺激するため<sup>21)</sup>、JG 細胞における圧依存性 PLD 経路は、ROS 産生を介して細胞内 cyclic GMP レベルを抑制することにより活性レニン形成を抑制することも考えられる。

## 総 括

正常対照ラットの腎臓およびストレプトゾトシン腹腔内注射により作成した糖尿病の早期・慢性期における腎

臓より採取した JG 細胞の初代培養において、12 時間の圧負荷がレニン・プロレニンの分泌と細胞内におけるプロレニンからレニンへのプロセッシングに及ぼす影響とその機序を検討し、以下の結果を得た。

1. 12 時間の圧負荷は正常対照ラット JG 細胞において、レニン分泌・プロレニン分泌・プロレニンからレニンへのプロセッシングをいずれも抑制した<sup>42)</sup>。
2. 早期糖尿病ラット JG 細胞では、12 時間の圧負荷はレニン分泌・プロレニン分泌を抑制せず、プロレニンからレニンへのプロセッシングのみ正常対照ラット JG 細胞と同程度に抑制した<sup>42)</sup>。
3. 慢性期糖尿病ラット JG 細胞では、12 時間の圧負荷はレニン分泌・プロレニン分泌を抑制せず、プロレニンからレニンへのプロセッシングのみ抑制したが、その抑制度は、正常対照ラット JG 細胞や早期糖尿病ラット JG 細胞のそれよりも有意に大きかった<sup>42)</sup>。
4. インスリン治療により血糖を正常域にコントロールした慢性期糖尿病ラットより採取した JG 細胞では、12 時間の圧負荷がレニン・プロレニンの分泌とプロセッシングに与える影響は、正常対照ラット JG 細胞におけるそれと同様であった<sup>42)</sup>。
5. PLC 阻害薬である NCDC, U73122 は、正常対照ラット JG 細胞において、12 時間の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、12 時間の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<sup>42)</sup><sup>43)</sup>。
6. PLD 阻害薬である AEBSF は、正常対照ラット JG 細胞・糖尿病ラット JG 細胞いずれにおいても、12 時間の圧負荷によるプロレニンからレニンへのプロセッシング抑制反応を抑制した<sup>42)</sup><sup>43)</sup>。

以上の結果より、JG 細胞において慢性圧負荷は、PLC 依存性経路でレニン分泌・プロレニン分泌を抑制し、PLD 依存性経路でプロレニンからレニンへのプロセッシングを抑制することが示された。この PLD 依存性経路によるプロレニンからレニンへのプロセッシング抑制は、糖尿病の進行とともに増強し、さらに糖尿病ラットの JG 細胞では圧によって分泌が抑制されないため、糖尿病における血中プロレニン濃度増加の原因の一つである可能性が考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導、御高閲いただきました慶應義塾大学医学部内科学教室市原淳弘博士に深謝い

たします。さらに、本研究に御協力いただきました内科学教室腎臓研究室の諸先生方に感謝いたします。

本研究の要旨の一部は、第74回日本内分泌学会(2001年横浜)、第24・25回日本高血圧学会総会(2001年大阪、2002年東京)、33rd Annual Meeting and Scientific Exposition of American Society of Nephrology (Toronto, 2000)、55th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research of American Heart Association (Chicago, 2001)、The 2001 ASN/ISN World Congress of Nephrology (San Francisco, 2001)において発表した。

また本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(奨励研究(A), No12770590)の援助を受けた。

## 文 献

- 1) Tobian L, Tomboulian A, Janecek J : The effect of high perfusion pressures on the granulation of juxtaglomerular cells in an isolated kidney. *J Clin Invest* 38 : 605-610, 1959
- 2) Ichihara A, Suzuki H, Miyashita Y, Naitoh M, Hayashi M, Saruta T : Transmural pressure inhibits prorenin processing in juxtaglomerular cell. *Am J Physiol* 277 : R220-R228, 1999
- 3) DUBYAK GR, El-Moatassim C : Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265 : C577-C606, 1993
- 4) Deinum J, Ronn B, Mathiesen E, Derkx FHM, Hop WCJ, Schalekamp MADH : Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 42 : 1006-1010, 1999
- 5) Franken AAM, Derkx FHM, Man-in't-Veld AJ, et al : High plasma prorenin in diabetes mellitus and its correlation with some complications. *J Clin Endocrinol Metab* 71 : 1008-1015, 1990
- 6) Davies L, Fulcher GR, Atkins A, et al : The relationship of prorenin values to microvascular complications in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabet Complications* 13 : 45-51, 1999
- 7) UK prospective diabetes study group : Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *UKPDS 38. BMJ* 317 : 703-713, 1998
- 8) UK prospective diabetes study group : Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *UKPDS 39. BMJ* 317 : 713-720, 1998
- 9) Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A : Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 76 : 536-543, 1995
- 10) Ranjan V, Xiao Z, Diamond SL : Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. *Am J Physiol* 269 : H550-555, 1995
- 11) Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ : Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17 : 187-193, 1991
- 12) Cooke JP, Rossitch E, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ : Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 88 : 1663-1671, 1991
- 13) Schricker K, Kurtz A : Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 265 : F180-186, 1993
- 14) Knoblich PR, Freeman RH, Villarreal D : Pressure-dependent renin release during chronic blockade of nitric oxide synthase. *Hypertension* 28 : 738-742, 1996
- 15) Scholz H, Kurtz A : Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfusion kidney. *J Clin Invest* 91 : 1088-1094, 1993
- 16) Hishikawa K, Nakai T, Suzuki H, Saruta T, Kato R : Transmural pressure inhibits nitric oxide release from human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 215 : 329-331, 1992
- 17) Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ : Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100 : 1566-1574, 1997
- 18) Freeman EJ : The Ang II-induced growth of vascular smooth muscle cells involves a phospholipase D-mediated signaling mechanism. *Arch Biochem Biophys* 374 : 363-370, 2000
- 19) Touyz RM, Schiffrin EL : Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34 : 976-982, 1999
- 20) Ichihara A, Suzuki H, Murakami M, Naitoh M, Matsumoto A, Saruta T : Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *Eur J Endocrinol* 133 : 569-577, 1995
- 21) Ichihara A, Kobori H, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T : Differential effects of thyroid hormone on renin secretion, content, and mRNA in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 274 : E224-E237, 1998
- 22) Inscho EW, Cook AK, Mui V, Imig JD : Calcium mobilization contributes to pressure-mediated afferent arteriolar vasoconstriction. *Hypertension* 31 : 421-428, 1998
- 23) Takenaka T, Suzuki H, Fujiwara K, Kanno Y, Ohno

- Y, Hayashi K, Nagahama T, Saruta T : Cellular mechanisms mediating rat renal microvascular constriction by angiotensin II. *J Clin Invest* 100 : 2107-2114, 1997
- 24) Andrews B, Bond K, Lehman JA, Horn JM, Dugan A, Gomez-Cambronero J : Direct inhibition of *in vitro* PLD activity by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride. *Biochem Biophys Res Commun* 273 : 302-311, 2000
- 25) Narayanan J, Imig M, Roman RJ, Harder DR : Pressurization of isolated renal arteries increases inositol triphosphate and diacylglycerol. *Am J Physiol* 266 : H1840-H1845, 1994
- 26) Abe J, Kusahara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD : Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 273 : 16586-16590, 1996
- 27) Kurz T, Wolf RA, Corr PB : Phosphatidic acid stimulates inositol 1,4,5-triphosphate production in adult cardiac myocytes. *Circ Res* 72 : 701-706, 1993
- 28) Barajas L : Anatomy of juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 237 : F333-F343, 1979
- 29) Taugner R, Bührle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R : Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. *Contrib Nephrol* 43 : 76-101, 1984
- 30) Takenaka T, Suzuki H, Okada H, Hayashi K, Kanno Y, Saruta T : Mechanosensitive cation channel mediate afferent arteriolar myogenic constriction in the isolated rat kidney. *J Physiol* 511 : 245-253, 1998
- 31) Carmines PK, Ohishi K, Ikenaga H : Functional impairment of renal afferent arteriolar voltage-gated calcium channels in rats with diabetes mellitus. *J Clin Invest* 98 : 2564-2571, 1996
- 32) Schuhmann K, Groschner K : Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type  $Ca^{2+}$  channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Lett* 341 : 208-212, 1994
- 33) Symonian M, Smogorzewski M, Marcinkowski W, Krol E, Massry SG : Mechanisms through which high glucose concentration raises  $[Ca^{2+}]_i$  renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 54 : 1206-1213, 1998
- 34) Bi K, Roth MG, Ktistakis NT : Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Curr Biol* 7 : 301-307, 1997
- 35) King JA, Lush DJ, Fray JCS : Regulation of renin processing and secretion : chemiosmotic control and novel secretory pathway. *Am J Physiol* 265 : C305-320, 1993
- 36) Moolenaar WH, Kruijer W, Tilly BC, Verlaan I, Bierman AJ, deLaat SW : Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 323 : 171-173, 1986
- 37) Knauss TC, Jaffer FE, Abboud HE : Phosphatidic acid modulates DNA synthesis, phospholipase C, and platelet-derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells. *J Biol Chem* 265 : 14457-14463, 1990
- 38) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al : Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature* 404 : 787-790, 2000
- 39) Nowicki PT, Flavahan S, Hassanain H, et al : Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res* 89 : 114-116, 2001
- 40) Bellavite P, Corso F, Dusi S, Grzeskowiak M, Della Bianca V, Rossi F : Activation of NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane extracts of pig neutrophils by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 263 : 8210-8214, 1988
- 41) Wu L, de Champlain J : Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats. *Hypertension* 34 : 1247-1253, 1999
- 42) Hirota N, Ichihara A, Koura U, Tada Y, Hayashi M, Saruta T. Transmural Pressure Control of Prorenin Processing and Secretion in Diabetic Rat Juxtaglomerular Cells. *Hypertens Res* 26 : 493-501, 2003
- 43) Hirota N, Ichihara A, Koura U, Hayashi M, Saruta T. Phospholipase D Contributes to Transmural Pressure Control of Prorenin Processing in Juxtaglomerular Cell. *Hypertension* 39[part2] : 363-367, 2002

学位論文

子宮体癌の糖鎖発現異常における  
フコース転移酵素の関与とその転移能への影響

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

さくま ゆういち  
佐久間 雄 一

(平成17年2月21日受付)

Key Word : fucosyltransferase, uterine endometrial cancer, adhesion, H type 1 carbohydrate antigen, Lewis<sup>b</sup> carbohydrate antigen

近年、婦人科悪性腫瘍のなかでも子宮体癌（以下体癌と略す）は増加傾向にあるが、その細胞生物学的特性については未だ不明な点が多く解明が急がれている。

一方、細胞膜上に存在する複合糖質（糖蛋白と糖脂質の総称）が、細胞の癌化にともない発現異常をきたし有用な腫瘍マーカーとなり得る事、又その発現が患者の予後、さらに癌細胞の浸潤、転移能に関与する事などが報告されている<sup>1)5)</sup>。

複合糖質の中でも、血液型関連糖鎖はその構造や合成経路が詳細に判明しており、非還元末端ガラクトースとN-アセチルグルコサミンが $\beta$ 1-3で結合するI型糖鎖と $\beta$ 1-4で結合するII型糖鎖に分類される。それらの中には、末端に一つまたは二つのフコースが $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4で結合したフコシル化糖鎖が存在し、I型フコシル化糖鎖にはLewis<sup>a</sup>型、Lewis<sup>b</sup>型、H1型糖鎖等が属し、II型フコシル化糖鎖にはLewis<sup>a</sup>型、Lewis<sup>x</sup>型、H2型糖鎖等が属する。そしてその合成には $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4Fucosyltransferase（以下FTと略す）が関与している。

これら血液型関連フコシル化糖鎖については、特にシアル酸を有する糖鎖を中心に、従来より基礎的ならびに臨床的研究が種々の臓器の癌について進められ、いくつかの知見が得られている。すでに、癌化にともなう血液型関連糖鎖の発現異常には臓器特異性がある事が知られており<sup>1)15)</sup>、また患者の予後との関連については、大腸癌や乳癌において腫瘍マーカーであるCA19-9（糖鎖構造はシアリルLewis<sup>a</sup>)<sup>1)</sup>、SLX（シアリルLewis<sup>x</sup>)<sup>6)</sup>を強く発現する患者の予後が不良であるという臨床的成績が報告されている。また、これら癌細胞に発現されるシアリルLewis<sup>a</sup>やシアリルLewis<sup>x</sup>等の糖鎖が血管内皮に発現する接着分子であるE-セレクトインのリガンド糖鎖となり、癌の転移過程で重要な役割を担っている事が明らかとなっている<sup>16)</sup>。

当研究室ではすでに、体癌において、I型糖鎖の異常な発現が見られる事、なかでもLewis<sup>b</sup>型糖鎖は体癌で特異的に高率に発現する事を明らかにしている<sup>17)</sup>。又、高分化型体癌由来培養細胞株SNG-II<sup>18)</sup>を免疫原として、体癌と特異的に反応するマウス型モノクローナル抗体

本論文は、Sakuma Y, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S : Involvement of H Type 1 Carbohydrate Antigen in Cell Adhesion to Vascular Endothelial Cells of Human Endometrial Cancer. *Anticancer Res* 23(2B) : 1277-1282, 2003 の1部, Kubushiro K, Tsukazaki K, Sakuma Y, Akiba Y, Sakayori M, Aoki R, Yazawa S, Nozawa S : Expression mechanism of human uterine endometrial cancer-specific fucosylated carbohydrate chains : Aberrant  $\alpha$ 1-4 fucosyltransferases in uterine endometrial cancer-derived cell lines with type I carbohydrate chain. *Int J Oncol* 6 : 93-97, 1995 の1部, Kubushiro K, Tsukazaki K, Sakuma Y, Sakayori M, Yazawa S, Nozawa S : Enzymatic basis for the accumulation of Lewis<sup>b</sup> antigen in uterine endometrial cancer. *Jpn J Cancer Res* 86 : 361-367, 1995 の1部, 及び Kubushiro K, Sakuma Y, Yamashita H, Fukuchi T, Banno K, Tsukazaki K, Nozawa S : Biological Characteristics of Human Uterine Endometrial Cancer Variant Cells Selected for Blood Group H Type 1 Antigen : Adhesion to Vascular Endothelial Cells. *Acta Histochem.Cytochem* 33(3) : 209-213, 2000 の1部を含む。

MSN-I<sup>19)</sup>を作製し、その認識抗原が主として Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖であることを確認している<sup>19)</sup>。さらに、患者体癌組織中に、MSN-I 認識抗原を発現していない症例の5年生存率が、発現している症例に比べ有意に低いという臨床統計上の成績を得ており<sup>20)</sup>、体癌におけるフコシル化糖鎖の発現異常が、癌の細胞生物学的特性に強く関与する事が推定されている。

そこで、本研究ではまず体癌におけるフコシル化糖鎖の発現異常の機序を明らかにする目的で、その合成に関与すると考えられる FT の活性を測定するとともに、SNG-II を MSN-I 認識抗原強発現株 (SNG-S) と弱発現株 (SNG-W) とに分別し、各々におけるフコシル化糖鎖の発現とその細胞生物学的特性への関与を特に血行性転移能を中心に検討した。

## 材料と方法

### 1. α-FT 活性の測定

子宮内膜組織及び培養細胞のα-FT 活性の測定は、矢澤らの方法<sup>21, 22)</sup>によった。すなわち、1 g の細胞又は組織に 2% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) を含む PBS を加え、4°C でソニケート後、10,000 rpm で 30 分遠心し酵素液とした。α1-2, α1-3, α1-4 FT の基質にはそれぞれ phenyl β-galactoside (Sigma, St. Louis, MO), 2'OMeGalβ1-4GlcNAcβBn, 2'OMeGalβ1-3GlcNAcβBn (Edmonton, Canada) を使用した。糖供与体としてはトリチウムでラベルした GDP-fucose (Sigma, St. Louis, MO) 70 pmol を用い、酵素液 10 μl とともに基質 10 nmol と 37°C で 4 時間インキュベートし、エタノールで反応停止後、Sep-Pak plus C<sub>18</sub> 逆相カラム (Waters, Milford, CT) を用いて基質に取り込まれた放射活性を測定することにより、α1-2, α1-3, α1-4 FT 活性を測定した。なお、正常子宮内膜及び体癌組織は慶応義塾大学病院にて手術を受けた患者の同意を得た上で、その抽出標本より採取した。

### 2. MSN-I 認識抗原発現量の差による SNG-II 細胞の分別

高分化型体癌由来培養細胞株 SNG-II<sup>19)</sup> をトリプシン-ethylene diamine tetraacetate (EDTA) にて剥離し、FCS 添加 phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁、これに MSN-I<sup>19)</sup> 20 μg/ml を添加し室温で 30 分反応させた。PBS で洗浄後、この細胞懸濁液をヤギ抗マウス抗体付着マイクロセクター (AIS, CA)<sup>23)</sup> に添加し、室温で 1 時間静置した。これによりマウス型モノクロー

ナル抗体である MSN-I と反応した SNG-II 細胞のみがマイクロセクター容器に付着する。その結果得られた上清を非付着細胞の懸濁液として回収した。又、マイクロセクターを PBS で数回洗浄後、トリプシン-EDTA にて付着細胞を剥離、回収した。この選別を付着細胞、非付着細胞それぞれについて 3 回ずつ繰り返した。これらの処理で得られた付着細胞すなわち MSN-I 認識抗原強発現細胞を SNG-S、非付着細胞すなわち MSN-I 認識抗原弱発現細胞を SNG-W と名付けた。両者の分別状態はフローサイトメトリー及び免疫細胞化学染色で確認した。フローサイトメトリーは Epics profile flowcytometer (Counter Corporation, FL) を使用した。

### 3. モノクローナル抗体

MSN-I<sup>19)</sup> は当研究室にて作成したマウス型モノクローナル抗体で、イムノグロブリンクラスは IgM、認識抗原は主として末端に 2 個のフコースを有する Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖であることを確認している<sup>19)</sup>。抗 H1 型モノクローナル抗体は Signet Laboratories, Inc (Massachusetts, U.S.A) より、抗 H2 型モノクローナル抗体は DAKO Corporation (Glostrup, Denmark)、抗 Lewis<sup>a</sup> 型、抗 Lewis<sup>b</sup> 型モノクローナル抗体はミドリ十字株式会社 (大阪) より購入した。抗 Lewis<sup>a</sup> 型および抗 Lewis<sup>b</sup> 型モノクローナル抗体<sup>25)</sup> は、国立がんセンター研究所広橋説雄所長より供与を受けた。抗 Lactotetraosyl ceramide (Lc4) 型モノクローナル抗体 HMST-I<sup>26)</sup> は当研究室で作成したもので、Lc4 と特異的に反応する事を確認している。抗 neolactotetraosyl ceramide (nLc4) 型モノクローナル抗体<sup>27)</sup> は国立成育医療センター研究所秦順一研究所長より供与を受けた。

### 4. 免疫組織 (細胞) 化学染色

免疫組織 (細胞) 化学染色は avidine-biotin complex 法により行った<sup>17)</sup>。各種モノクローナル抗体との反応は室温で 1 時間とした。また、染色性の判定基準は、すでに塚崎らにより報告されている方法によった<sup>17)</sup>。すなわち、全細胞の中で陽性細胞の占める染色頻度を 10% 未満、10-50%、51% 以上の 3 段階に、又染色強度を主観的に弱、中、強の 3 段階に分類し、両者の組み合わせで染色反応性を (-), (+), (++)、(+++) の 4 段階で判定した。

### 5. Cell Analysis System (CAS) による DNA ploidy 及び細胞増殖能の検討

SNG-S と SNG-W の DNA ploidy を、CAS200



Image Cytometer (Cell Analysis System, Inc., IL) で分析した。DNA は Foylugen 反応を用いて染色した。細胞増殖能は、Ki67 との免疫細胞化学的反応性により検討した。

6. ノードマウス肺転移モデルの作製

ノードマウス (BALB/C, nu/nu, 6weeks old, female) を用い、SNG-S, SNG-W の尾静注及び子宮正所性移植による肺転移モデルを作製した。腫瘍細胞を  $1.0 \times 10^6$  個/0.1 ml PBS とし、尾静注又は開腹下に子宮へ局注した。注入 8 週間後にノードマウスを解剖し、肺転移の有無を顕微鏡下に検討した。

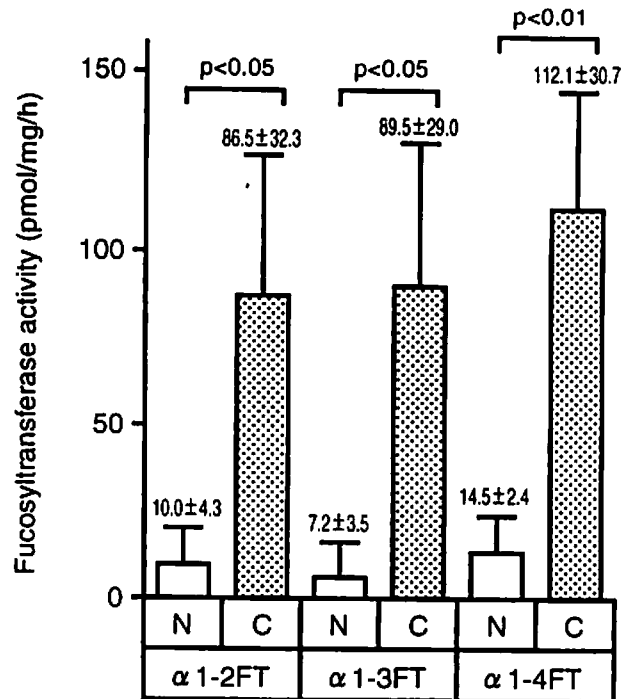
7. SNG-S と SNG-W の血管内皮細胞に対する接着試験

血管内皮細胞はヒト臍帯静脈よりコラゲナーゼ処理で得たものを、96-well multiwell plate で semi-confluent となるまで静置培養して使用した。サイトカイン処理は human Interleukin-1 $\beta$  (rIL-1 $\beta$ ) 2.5 U/ml で 4 時間行った。SNG-S, SNG-W 細胞は 0.02% EDTA と 0.05% トリプシンで剥離後、10% FCS + Ham'S F12 培地で洗浄し、さらに PBS で洗浄し、 $1 \times 10^5$  個/1 ml PBS の細胞懸濁液とし、血管内皮細胞上に 50  $\mu$ l/well ずつマウントした。37°C で 30 分培養後、接着していない細胞を 150 g 5 分間の遠心にて除去し、位相差顕微鏡下に 200 倍 1 視野あたりの血管内皮細胞への接着細胞数をカウントした。

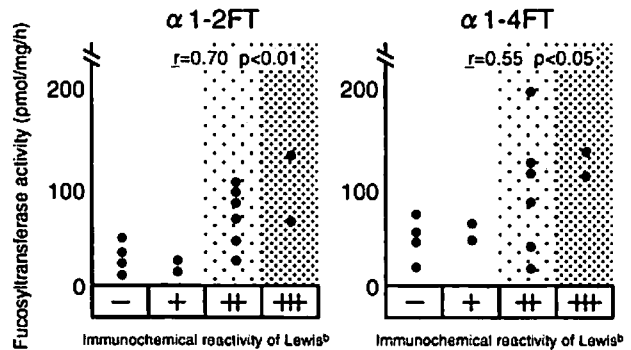
SNG-W の血管内皮細胞への接着阻害試験は各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いて行なった。SNG-W の PBS 懸濁液に 100  $\mu$ l/ml のモノクローナル抗体を添加し、室温で 30 分間反応後、PBS で洗浄して使用した。なお、コントロール抗体として、マウス IgG 1 Kappa (Sigma, St. Louis, MO) を用いた。

8. フローサイトメトリーによる、単一糖鎖付着蛍光ビーズと血管内皮細胞との接着性の検討

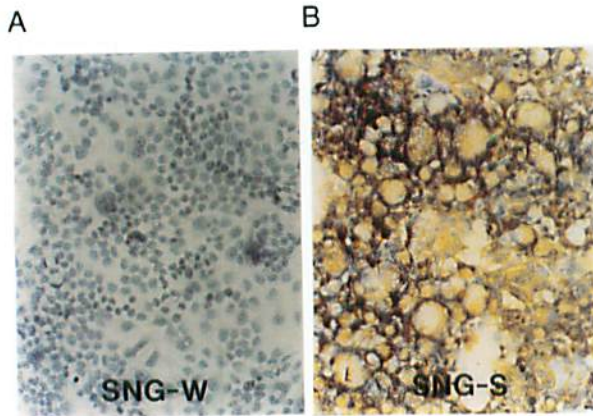
蛍光ラテックスビーズ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, California, U.S.A.) に phosphatidyl ethanol amine を介して Lewis<sup>a</sup> 型, Lewis<sup>b</sup> 型, H1 型, H2 型糖鎖を結合させた単一糖鎖付着蛍光ビーズは、日本抗体研究所 矢澤伸副所長より供与されたものを使用した<sup>21-23)</sup>。サイトカイン処理した血管内皮細胞  $10^5$  個/1 ml PBS に単一糖鎖付着蛍光ビーズ  $10^7$  個を添加し、37°C 30 分間反応後、150 g で 2 分間遠沈し、非付着ビーズを含む上清を除去、さらに PBS



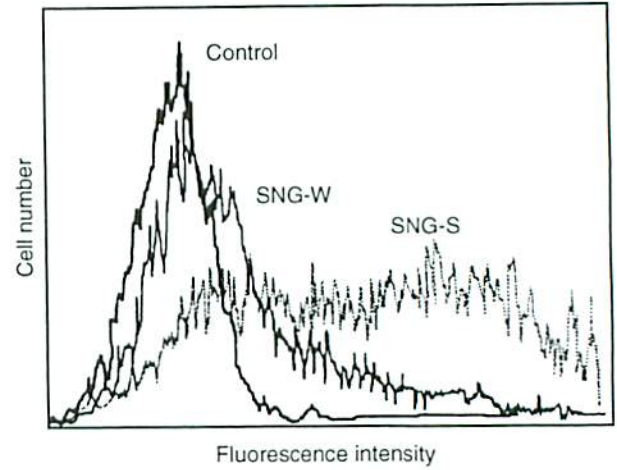
第1図 正常子宮内膜及び体癌組織における  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4 Fucosyltransferase 活性。本文中に記載された方法で、正常子宮内膜組織 (N) 8 例、体癌組織 (C) 14 例における Fucosyltransferase (FT) 活性を測定した。平均値  $\pm$  標準偏差を示す。  
(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Jpn J Cancer Res 86 : 361-367, 1995 の第1図を、許可を得て転載)



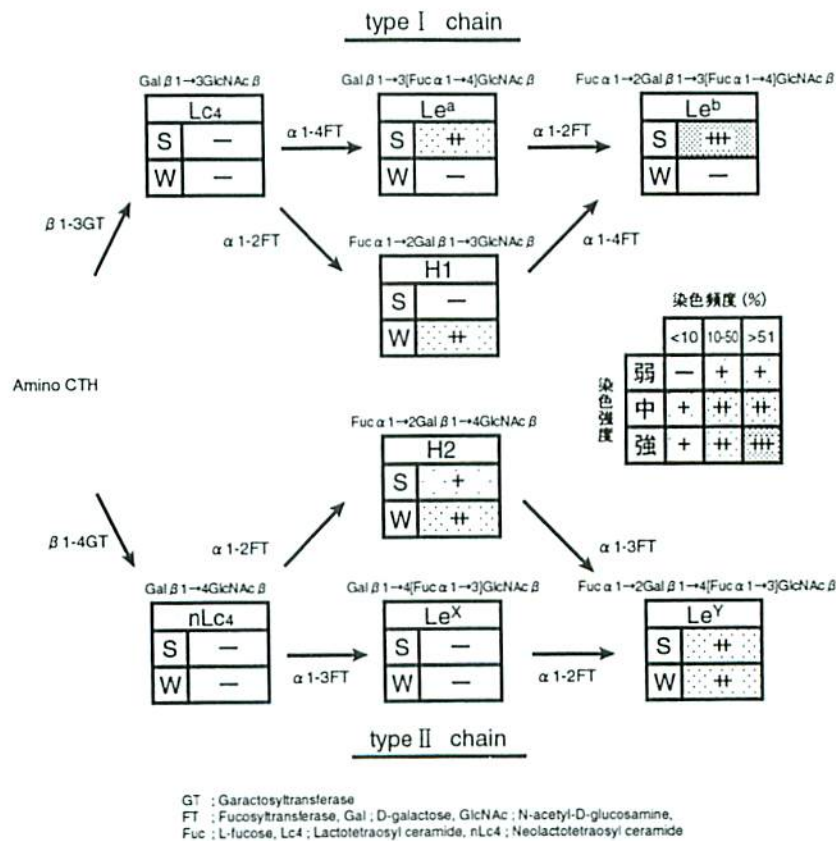
第2図 体癌組織における Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖の免疫組織化学的反応性と  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-4 Fucosyltransferase 活性との関連。両者の間に正の相関関係を認める。r : Spearman の順位相関係数。  
(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Jpn J Cancer Res 86 : 361-367, 1995 の第2図を、許可を得て転載)



第3図 SNG-W と SNG-S の MSN-1 免疫細胞化学染色。  
SNG-W (A) は MSN-1 でほとんど染色されないのに対し、SNG-S (B) では強い染色性を認める。×100。  
(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Int J Oncol 6 : 93-97, 1995 の第1図を、許可を得て転載)



第4図 SNG-W と SNG-S の MSN-1 に対する反応性のフローサイトメトリーによるヒストグラム。SNG-W に比べ SNG-S で高い蛍光強度を示す。  
(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Int J Oncol 6 : 93-97, 1995 の第2図を許可を得て転載)



第5図 SNG-S と SNG-W における各種血液型関連糖鎖の発現と合成経路。免疫細胞化学染色の反応性は、本文中に記載した判定基準により、(-), (+), (++) , (+++) の4段階で示した。S, SNG-S, MSN-1 認識抗原強発現株; W, SNG-W, MSN-1 認識抗原弱発現株。  
(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Int J Oncol 6 : 93-97, 1995 の第5図を許可を得て改変、転載)

で洗浄後 50 μm ナイロンメッシュでろ過し、フローサイトメトリーで解析した。コントロールには糖鎖非付着蛍光ビーズを使用した。

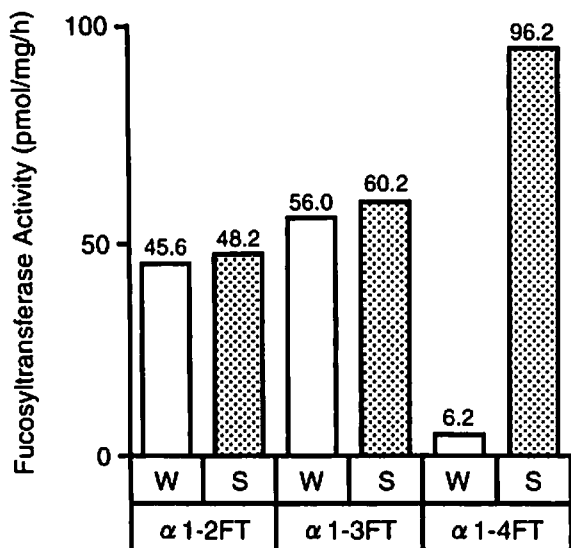
## 結 果

### 1. 正常子宮内膜及び体癌組織における α-FT 活性

正常子宮内膜 8 例における α1-2FT, α1-3FT, α1-4 FT の酵素活性は、それぞれ 10.0±4.3, 7.2±3.5, 14.5 ±2.4 pmol/mg/hr であった。それに対し、体癌組織 14 例ではそれぞれ 86.5±32.3 (p<0.05), 89.5±29.0 (p<0.05), 112.1±30.7 (p<0.01) pmol/mg/hr と、すべての α-FT 活性が有意に増加している事が判明した (第 1 図)。また、体癌において特異的に発現する Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖の免疫組織化学的反応性と、その合成に関与すると考えられる α1-2FT, α1-4FT 活性には、正の相関関係が存在する事が明らかとなった (第 2 図)。尚、α1-3FT については相関は認められなかった。

### 2. SNG-II 細胞の SNG-S と SNG-W 細胞への分別

SNG-S と SNG-W の分別状態は、MSN-1 認識抗原発現量の差を免疫細胞化学染色及びフローサイトメトリーで比較する事により確認した。その結果、免疫細胞化学染色で SNG-S が MSN-1 染色で強陽性を示したのに対

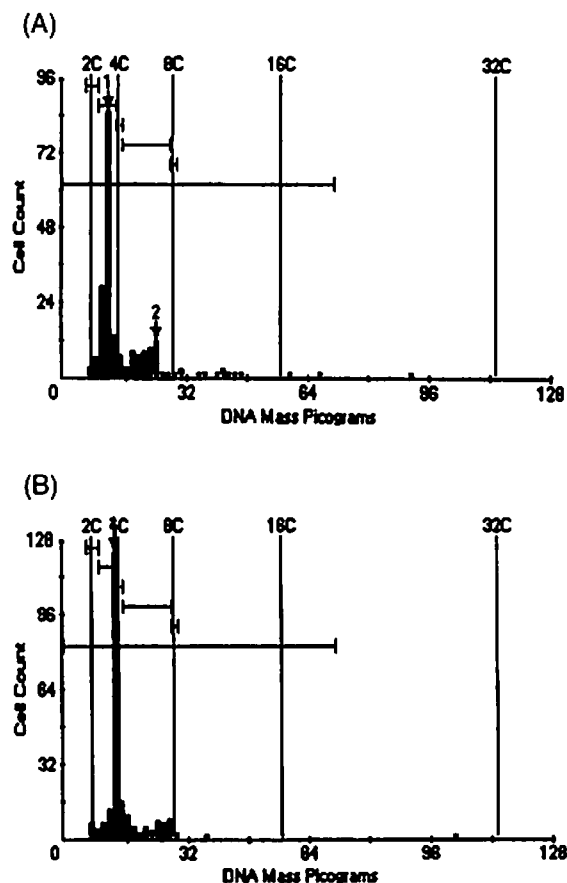


第 6 図 SNG-W と SNG-S における α1-2, α1-3, α1-4 Fucosyl-transferase 活性。W, SNG-W ; S, SNG-S。1 g の細胞あたりの活性を測定した。(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Int J Oncol 6 : 93-97, 1995 の第 4 図を許可を得て転載)

し、SNG-W ではほとんど染色されなかった (第 3 図)。また、フローサイトメトリーによるヒストグラムの解析でも、SNG-S では SNG-W に比べ強い蛍光強度を示す細胞が多数認められた (第 4 図)。これらにより、SNG-S と SNG-W の間には MSN-1 認識抗原発現量に大きな差のある事が明らかになった。

### 3. SNG-S と SNG-W における血液型関連糖鎖の発現

SNG-S と SNG-W の血液型関連糖鎖の発現を免疫細胞化学染色により検討した。その結果、SNG-S では SNG-W に比べ Lewis<sup>a</sup> 型, Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖の強い発現が見られたのに対し、SNG-W では H 型糖鎖, 中でも Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖の前駆糖鎖である H1 型糖鎖が強く発現している事が判明した。一方, Lc4, nLc4, Lewis<sup>a</sup> 型, Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖の発現には差のない事が明らかとなった (第 5 図)。



第 7 図 SNG-S と SNG-W における DNA ploidy の CAS による分析。(A), SNG-S, DNA index 1.66 ; (B), SNG-W, DNA index 1.89。両者に明らかな差を認めない。(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Int J Oncol 6 : 93-97, 1995 の第 3 図を許可を得て転載)

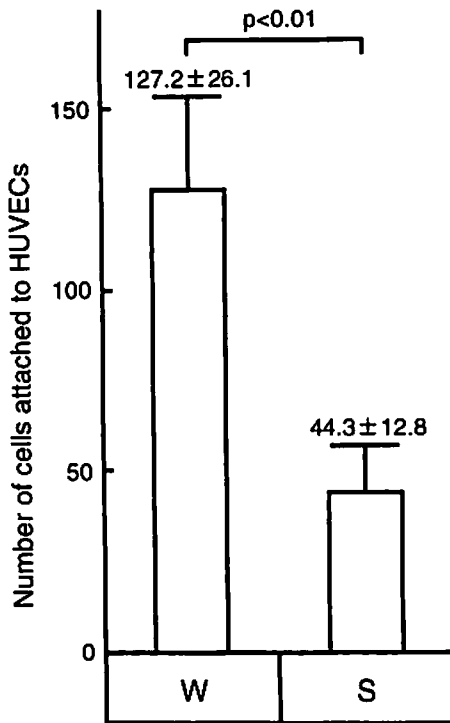
4. SNG-S と SNG-W の $\alpha$ -FT 活性

SNG-S と SNG-W の  $\alpha$ 1-2FT 活性ならびに  $\alpha$ 1-3FT 活性にはほとんど差が認められないのに対し、 $\alpha$ 1-4FT 活性はそれぞれ 96.2 pmol/mg/hr, 6.2 pmol/mg/hr

第1 SNG-W と SNG-S のヌードマウス尾静注, 子宮正所性移植モデルを用いた肺転移能の比較

Cells	Incidence (number of mice)	
	Injection into tail vein	Intrauterine transplantation
SNG-W	26.7% (8/30)	63.6% (14/22)
SNG-S	0.0% (0/27)	23.8% (5/21)

細胞を尾静注または開腹下に子宮へ局注し, 8週間後の肺転移の有無を顕微鏡下に検討した。両モデルとも SNG-W では SNG-S 比べ有意に高い肺転移率を認めた。(\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.01$ ) (Sakuma Y et al : Anticancer Res 23(2B) : 1277-1282, 2003 の第1表を許可を得て転載)



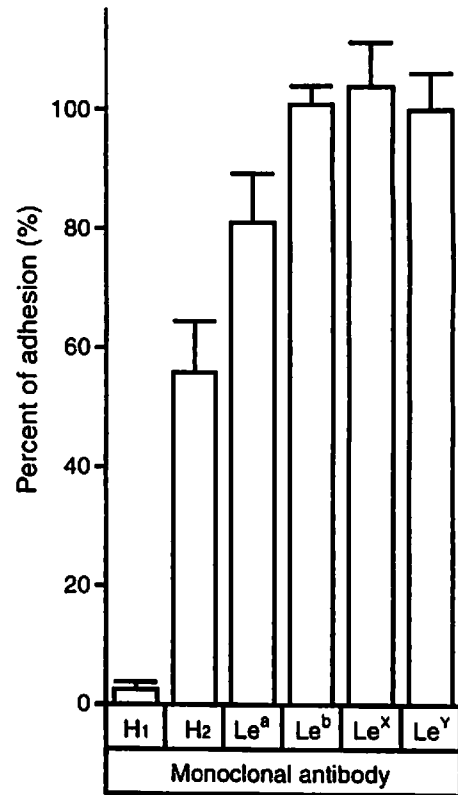
第8図 SNG-W と SNG-S のヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞に対する接着性。rIL-1 $\beta$ で刺激した血管内皮細胞に対する顕微鏡 200 倍 1 視野あたりの接着細胞数をカウントした。W, SNG-W ; S, SNG-S。平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Acta Histochem. Cytochem 33(3) : 209-213, 2000 の第2図を許可を得て改変, 転載)

であり, SNG-S における $\alpha$ 1-4FT 活性は SNG-W に比べ著明に高い事が判明した (第6図)。

5. SNG-S と SNG-W の DNA ploidy および細胞増殖能

CAS による解析の結果, SNG-S と SNG-W の DNA index はそれぞれ 1.66, 1.89 で, 両者の DNA ploidy には差のないことが明らかとなった (第7図)。又, 細胞増殖能を反映する Ki67 の免疫細胞化学的反応性は, SNG-S と SNG-W でそれぞれ 36.9% (93/252), 30.2% (77/255) で, 細胞増殖能にも有意な差のない事が判明した ( $P > 0.1$ )。

6. SNG-S と SNG-W の *in vivo* における遠隔転移能  
ヌードマウスへの SNG-S と SNG-W の尾静脈モデル

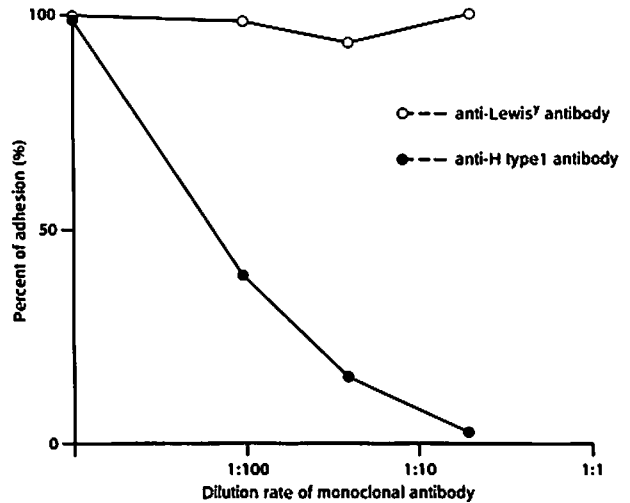


第9図 各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた, SNG-W のサイトカイン処理ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞への接着阻害試験。コントロール抗体(マウス IgG)の接着率を100とする%表示の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。抗 H1 型モノクローナル抗体による明らかな接着阻害を認めた。(Kubushiro K, Sakuma Y et al : Acta Histochem. Cytochem 33(3) : 209-213, 2000 の第4図を許可を得て改変, 転載)

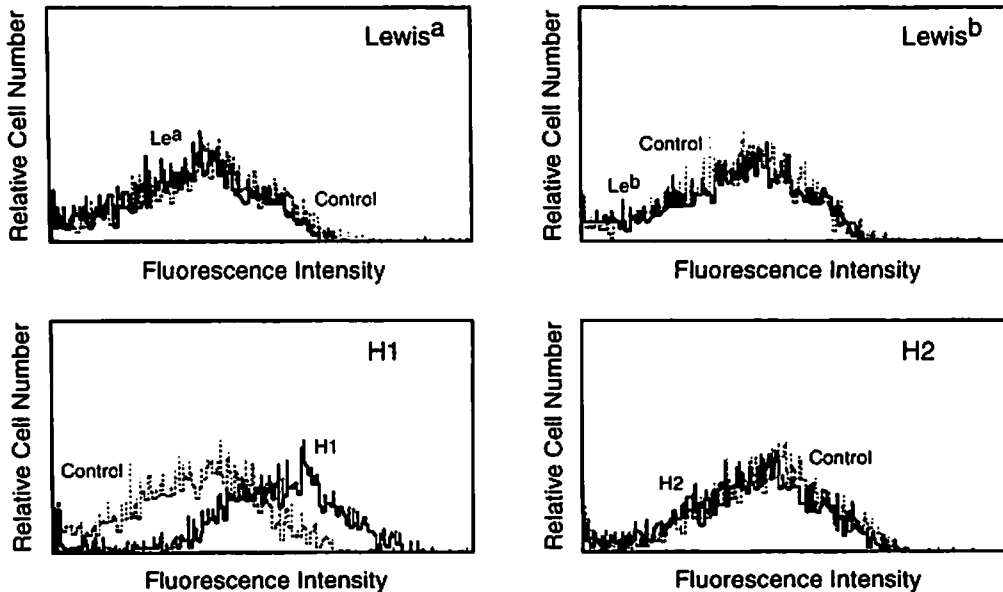
における肺転移率はそれぞれ 0.0% (0/27), 26.7% (8/30) であり, SNG-W で有意に高かった ( $p < 0.01$ ). 又, 子宮正所性移植モデルにおける肺転移率も, それぞれ 23.8% (5/21), 63.6% (14/22) と, SNG-W で有意に高く ( $p < 0.01$ ), SNG-W は SNG-S に比べ高い遠隔転移能を有する事が判明した (第 1 表).

7. SNG-S と SNG-W の血管内皮細胞に対する接着能

SNG-W のサイトカイン処理した血管内皮細胞に対する接着細胞数は  $127.2 \pm 26.1$  個/1 視野と, SNG-S の  $44.3 \pm 12.8$  個/1 視野に比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に多かった (第 8 図). また, 各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻害試験の結果, 抗 H1 型モノクローナル抗体処理した SNG-W の, サイトカイン処理した血管内皮細胞に対する接着率は, コントロールに比べ  $2.4 \pm 0.5\%$  と明らかに阻害されている事が判明した. 一方, 抗 H2 型, 抗 Lewis<sup>a</sup> 型モノクローナル抗体処理では, それぞれ  $56.1 \pm 8.2\%$ ,  $81.2 \pm 8.2\%$  と若干の阻害が認められたが, 他の Lewis<sup>b</sup>, Lewis<sup>s</sup>, Lewis<sup>x</sup> 型糖鎖に対するモノクローナル抗体では全く阻害されない事が明らかとなった (第 9 図). また, 抗 H1 型モノクローナル抗体による接着阻害には, 濃度依存性が認められた. (第 10 図)



第 10 図 SNG-W のサイトカイン処理ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞に対するモノクローナル抗体による濃度依存性接着阻害試験. SNG-W の接着は抗 H1 型モノクローナル抗体により濃度依存性に阻害された. 一方, 抗 Lewis<sup>a</sup> 型モノクローナル抗体による阻害は認めなかった. (Sakuma Y et al : Anticancer Res 23(2B) : 1277-1282, 2003 の第 1 図を許可を得て転載)



第 11 図 単一糖鎖付着蛍光ビーズのサイトカイン処理ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞に対する接着性のフローサイトメトリーによる検討. コントロールとして糖鎖非付着蛍光ビーズを用いた. H1 型糖鎖付着ビーズのみで血管内皮細胞への接着性を認めた. (Sakuma Y et al : Anticancer Res 23(2B) : 1277-1282, 2003 の第 2 図を許可を得て転載)

8. 単一糖鎖付着蛍光ビーズの血管内皮細胞への接着性

単一糖鎖付着蛍光ビーズのサイトカイン処理した血管内皮細胞への接着性を、フローサイトメトリーを用いて検討した。その結果、H1型糖鎖付着ビーズを用いた検討では、コントロールに比べ高い蛍光強度を示す血管内皮細胞が多数認められ、H1型糖鎖が血管内皮細胞へ多数接着したことが判明した。一方、Lewis<sup>a</sup>型、Lewis<sup>x</sup>型、H2型糖鎖付着ビーズについては、血管内皮細胞への接着性は認められない事が明らかとなった(第11図)。

考 察

細胞の癌化に伴う複合糖質、中でも血液型関連糖鎖の発現異常については種々の臓器についての報告がなされているが、臍や遠位大腸の様に、I型糖鎖の発現異常を生ずるものと<sup>14), 15)</sup>膀胱や肺などII型糖鎖の発現異常を生ずるもの<sup>11), 12)</sup>が有る。I型糖鎖、II型糖鎖の発現には、その合成経路から、Galactosyltransferase (GT) およびFT、なかでもI型フコシル化糖鎖の合成にはβ1-3GT、α1-2FT、α1-4FT、II型フコシル化糖鎖の合成にはβ1-4GT、α1-2FT、α1-3FTが関与すると考えられる(第5図)。実際、FTについては、遠位大腸癌組織におけるI型糖鎖の異常発現とα1-4FT活性の亢進についての報告がみられる<sup>15)</sup>。

また、これら血液型関連糖鎖の癌細胞の生物学的特性に対する関与についても、特にシアル酸を有する糖鎖であるシアリルLewis<sup>x</sup>、シアリルLewis<sup>a</sup>を中心に検討されている。臨床的には、これらのシアル酸を有する糖鎖の強い発現の見られる大腸癌や乳癌患者の予後が不良である事<sup>1), 6)</sup>が報告されている。また癌の血行性転移における重要なステップ<sup>28)</sup>、すなわち、①癌細胞の原発巣からの離脱、②血管内への侵入、③血管内移動と腫瘍血栓の形成、④遠隔臓器の血管内皮細胞への接着、⑤血管外への脱出、⑥転移巣における増殖のうち、シアル酸を有する糖鎖が癌細胞の血管内皮細胞への接着に関与する事が明らかにされている。例えば、肺癌由来培養細胞株QG56の血管内皮細胞への接着がシアリルLewis<sup>x</sup>依存性である事、又大腸癌由来培養細胞株Colo201の血管内皮細胞への接着がシアリルLewis<sup>x</sup>依存性である事、しかもサイトカインで刺激した血管内皮細胞上に出現する種々の接着分子のうち、E-セレクトインがリガンドである事が示されている<sup>16)</sup>。しかしながら、これらのシアル酸を有する糖鎖以外の糖鎖については、異常発現の報告があるだけで、その機能に関してはほとんど解明されていない。

当研究室ではすでに体癌においてI型糖鎖の発現異常が見られ、なかでもLewis<sup>b</sup>型糖鎖は体癌に特異的に強い発現が見られる事<sup>17)</sup>、また体癌と特異的に反応するモノクローナル抗体MSN-1<sup>18)</sup>を作成し、その認識抗原が主としてLewis<sup>b</sup>型糖鎖である事<sup>19)</sup>を明らかにしている。また、臨床統計上、体癌組織でMSN-1と反応しない症例の予後が、反応する症例に比べ有意に不良である事を報告し<sup>20)</sup>、これまでその機能がほとんど明らかにされていないLewis<sup>b</sup>型をはじめとするシアル酸を持たないフコシル化糖鎖が、体癌細胞の生物学的特性に何らかの関与を有する可能性を示唆してきた。

そこでまず、体癌におけるフコシル化糖鎖の発現異常の機序を解明する目的で、FT活性の測定を行ったところ、体癌組織ではすべてのα-FT活性が正常内膜に比べ高くなっており、また体癌で特異的に発現するLewis<sup>b</sup>型糖鎖の発現と、その合成に関与するα1-2、α1-4FT活性の間には正の相関関係が存在していた。さらに、MSN-1認識抗原(主としてLewis<sup>b</sup>型糖鎖)強発現株であるSNG-Sにおけるα1-4FT活性が弱発現株であるSNG-Wに比べ明らかに高いという結果が得られた。SNG-WにおけるH1型糖鎖の強い発現は、α1-4FT活性が低いことによるH1型糖鎖からのLewis<sup>b</sup>型糖鎖の合成が阻害され、H1型糖鎖の蓄積を生じているものと説明できる。以上の事実より、体癌における血液型関連糖鎖の発現異常の機序として、α1-2FT、α1-4FT活性が強く関与する事が示唆された<sup>29), 30)</sup>。当研究室ではすでに、体癌におけるβ1-3GT活性の亢進を報告しているが<sup>31)</sup>、子宮体内膜の癌化にともなう血液型関連糖鎖の発現異常が、その合成に関与する糖転移酵素活性の支配を受けていることが、本研究においても明らかとなった。

今回、SNG-SとSNG-Wという垂株樹立に用いたマイクロセクター<sup>24)</sup>による細胞分別法は、single cell cloning法と異なり、特定の糖鎖抗原の有無によってのみ細胞の分別を行えるため、純粋に糖鎖の発現機序や機能を検討するのに適した方法と言える。実際、SNG-SとSNG-WにおけるDNA ploidyや増殖能には差がなく、SNG-IIをMSN-1認識抗原の有無という特性によってのみ分別することができたと考えられる。

次にこのSNG-SとSNG-Wについて、その細胞生物学的特性の差異を検討したところ、*in vivo*のヌードマウス肺転移モデルにおいて、SNG-WはSNG-Sに比べ高い血行性転移能を有していた<sup>32)</sup>。さらに*in vitro*での血管内皮細胞との接着性を検討した所、SNG-WではSNG-Sに比べ血管内皮細胞に対して高い接着性を認め<sup>33)</sup>、これが*in vivo*におけるSNG-Wの高い遠隔転移

能の一因であると考えられた。従来、癌細胞膜上のシアル酸を含む糖鎖が血管内皮細胞との接着に関与する事が報告されている。そこで、SNG-W 上に発現している糖鎖が、血管内皮細胞に対する接着因子として機能しているか否かを明らかにするため、各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻害試験を行った所、SNG-W でのみ強く発現し、SNG-S では発現の見られない H1 型糖鎖が、血管内皮細胞との接着に強く関与する事が判明した<sup>32), 33)</sup>。この事は、H1 型糖鎖付着蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーによる検討でも確認された<sup>32)</sup>。この単一糖鎖付着ビーズを用いた実験法では純粋にその糖鎖抗原と血管内皮上のリガンドとの相互反応を見る事が出来るという利点を有している。H1 型糖鎖付着ビーズが血管内皮細胞に接着性を有するという結果は、SNG-W においてだけでなく、H1 型糖鎖を発現する他の培養細胞株においても、H1 型糖鎖が血管内皮細胞に対する接着因子のひとつとして機能する可能性を示唆している。一方、SNG-W の血管内皮細胞に対する接着は、H1 型糖鎖以外にも H2 型、Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖に対するモノクローナル抗体でも若干の阻害を受けた。しかし、H2 型と Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖については、単一糖鎖付着ビーズを用いた検討では血管内皮細胞に対する接着性を有していなかった。この解釈として、実際の癌細胞の血管内皮細胞への接着が、単一糖鎖と血管内皮細胞上のリガンドとの直接の相互反応のみによるとは限らない可能性も考えられる。例えば、癌細胞上の糖鎖にさらに他の物質が結合し、その物質が血管内皮細胞に対する接着因子として機能するという間接的関与も考えられる。また、ある糖鎖単独の血管内皮細胞への接着力が極めて弱い場合、その糖鎖を発現する癌細胞同士がまず結合し、極めて多数の糖鎖抗原となつてはじめて接着性を生ずる可能性等も考えられ、これらについても更なる検討を要する。

本研究における以上の結果は、これまで不明とされていた体癌におけるフコシル化糖鎖発現異常の機序、及びその機能を明らかにするとともに、患者体癌組織が MSN-1 と反応しない症例の予後が、反応する症例に比べ有意に不良であるという臨床統計上の成績を裏付けるものである。すなわち、MSN-1 認識抗原を発現していない体癌では、 $\alpha$ 1-4FT 活性の低下等により、前駆糖鎖である H1 型糖鎖の蓄積が生じており、その血管内皮細胞に対する接着因子としての機能から、血行性転移能が高まり、予後不良の一因となる可能性が示唆される。

今後は、SNG-W 細胞に  $\alpha$ 1-4FT の cDNA をトランスフェクションする事による転移能の変化等、分子生物

学的手法を用いた検討を要するとともに、H1 型糖鎖のリガンドの解明、さらには、*in vivo* における転移抑制への応用の可能性についての検討が急務であると考えられる。

## 総 括

本研究では、子宮体癌におけるフコシル化糖鎖、中でも血液型関連糖鎖の発現異常における糖転移酵素の関与を明らかにする目的で  $\alpha$ -FT 活性の測定を行なうとともに、その細胞生物学的特性への関与について血管内皮細胞への接着性を中心に検討し、以下の知見を得た。

1. 体癌組織では正常内膜に比べ  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4FT のすべての活性が亢進していた。また、体癌に特異的に発現する Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖の免疫組織化学的反応性と  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-4FT 活性には正の相関関係を認めた。ついで、体癌に特異的に発現し、臨床統計上患者の予後と関連を有するフコシル化糖鎖である MSN-1 認識抗原(主として Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖)の発現量の差により、体癌由来培養細胞株 SNG-II を、マイクロセクターを用いて SNG-S (強発現株)と SNG-W (弱発現株)に分別し、各々の  $\alpha$ -FT 活性を測定した。その結果、SNG-S では SNG-W に比べ  $\alpha$ 1-4FT 活性が著明に亢進していた。また、両者における血液型関連糖鎖の発現の差を検討した所、SNG-S では Lewis<sup>a</sup> 型、Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖の強い発現が見られたのに対し、SNG-W では、Lewis<sup>b</sup> 型糖鎖の前駆糖鎖である H1 型糖鎖の強い発現が見られた。この糖鎖の発現の差は、 $\alpha$ 1-4FT 活性の差により生じていると考えられた。以上より、体癌における血液型関連糖鎖の発現異常の機序として、 $\alpha$ 1-2FT,  $\alpha$ 1-4FT 活性が強く関与する事が判明した。

2. SNG-S と SNG-W の細胞生物学的特性の差を検討したところ、DNA ploidy や増殖能には差が見られなかったが、ヌードマウス肺転移モデルを用いた *in vivo* での検討では SNG-W が有意に高い血行性転移能を有していた。また、*in vitro* における血管内皮細胞との接着性を検討したところ、SNG-W は SNG-S に比べ有意に高い血管内皮細胞への接着能を認めた。さらに、各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻害試験や、単一糖鎖付着蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーによる検討の結果、SNG-W の血管内皮細胞に対する高い接着能には、H1 型糖鎖が強く関与する事が判明した。以上より、癌細胞膜上の H1 型糖鎖が血管

内皮細胞に対する接着因子のひとつとして機能している事が明らかとなった。そして、MSN-1 認識抗原を発現しない体癌症例の予後不良の一因として、 $\alpha$ 1-4FT 活性の低下等による H1 型糖鎖の蓄積と、それにとまう血行性転移能の亢進という細胞特性が関与している事が示唆された。

本稿を追えるにあたり、御指導御校閲を賜りました慶応義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深謝いたします。また、直接御指導いただいた慶応義塾大学医学部産婦人科学教室塚崎克己助教授、久布白兼行講師に深く感謝の意を表します。また、実験に関するご協力、御援助をいただいた日本抗体研究所矢澤伸副所長、婦人科病理研究室諸兄に感謝いたします。尚第 1-9 図は久布白兼行講師の論文から引用したがこのデータは佐久間雄一が主たる貢献者であり、共著者の同意を得て転載した。

本研究の一部は第 52 回日本癌学会総会 (1993, 仙台)、第 46 回日本産科婦人科学会総会 (1994, 東京)、第 35 回日本臨床細胞学会総会 (1994, 島根)、International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 22nd Meeting (1994, Netherland) で発表した。

#### 文 献

- 1) Wang WS, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM : CA19-9 as the most significant prognostic indicator of metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 49 : 160-164, 2002
- 2) Steplewska-Mazur K, Gabriel A, Zajecki W, Wylezol M, Gluck M : Breast cancer progression and expression of blood group-related tumor-associated antigens. *Hybridoma* 19 : 129-133, 2000
- 3) Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Jibiki MA, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Arisawa K, Ishikawa H : Predictive factors for preoperative serum levels of sialyl Lewis X, sialyl Lewis A and sialyl Tn antigens in gastric cancer patients. *Anticancer Res* 22 : 451-458, 2002
- 4) Sanders DS, Kerr MA : Lewis blood group and CEA related antigens : coexpressed cell-cell adhesion molecules with roles in the biological progression and dissemination of tumors. *Mol Pathol* 52 : 174-178, 1999
- 5) Takada A, Ohmori K, Takahashi N, Tsuyuoka K, Yago A, Zenita K, Hasegawa A, Kannagi R : Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochem Biophys Res Commun* 179 : 713-719, 1991
- 6) Nakagoe T, Fukushima K, Itoyanagi N, Ikuta Y, Oka T, Nagayasu T, Ayabe H, Hara S, Ishikawa H, Minami H : Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 128 : 257-264, 2002
- 7) Matsusako T, Muramatsu H, Shirahama T, Muramatsu T, Ohi Y : Expression of a carbohydrate signal, sialyl dimeric Le (x) antigen, is associated with metastatic potential of transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Biochem Biophys Res Commun* 181 : 1218-1222, 1991
- 8) Polley MJ, Phillips ML, Wayner E, Nudelman E, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC : CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule I (E LAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 6224-6228, 1991
- 9) Handa K, Nudelman ED, Stroud MR, Shiozawa T, Hakomori S : Selectin GMP-140 (CD 62 ; PADGEM) binds to sialosyl-Le (a) and sialosyl-Le (x), and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem Biophys Res Commun* 181 : 1223-1230, 1991
- 10) Nakagoe T, Fukushima K, Nanashima A, Sawai T, Tsuji T, Jibiki M, Yamaguchi H, Yasutake T, Ayabe H, Matsuo T, Tagawa Y, Arisawa K : Expression of Lewis (a), sialyl Lewis (a), Lewis (x) and sialyl Lewis (x) antigens as prognostic factors in patients with colorectal cancer. *Can J Gastroenterol* 14(9) : 753-760, 2000
- 11) Sheinfeld J, Reuter VE, Fair WR, Cordon-Cardo C : Expression of blood group antigens in bladder cancer : current concepts. *Semin Surg Oncol* 8(5) : 308-315, 1992
- 12) Shimizu T, Yonezawa S, Tanaka S, Sato E : Expression of Lewis X-related antigens in adenocarcinomas of lung. *Histopathology* 22(6) : 549-555, 1993
- 13) Zhang S, Zhang HS, Cordon-Cardo C, Reuter VE, Singhal AK, Lloyd KO, Livingston PO : Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry : II. Blood group-related antigens. *Int J Cancer* 73(1) : 50-56, 1997
- 14) Ianisch FG, Auerbach B, Bosslet K, Kolbe K, Karsten U, Nakahara Y, Ogawa T, Uhlenbruck G : Monoclonal antibody BW494 defines a blood group Lewis a/type1 chain-related antigen on carcinoma-associated mucins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374(12) : 1083-1091, 1993
- 15) Ørntoft TF, Holmes EH, Johnson P, Hakomori S, Clausen H : Differential tissue expression of the Lewis blood group antigens : Enzymatic immunohistologic and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen. *Blood* 77 : 1389-1396, 1991
- 16) Takada A, Omori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R : Contribution of



- carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res* 53 : 354-361, 1993
- 17) Tsukazaki K, Sakayori M, Arai H, Yamaoka K, Kurihara S, Nozawa S : Abnormal expression of blood group related antigens in uterine endometrial cancers. *Jpn J Cancer Res* 82 : 934-941, 1991
  - 18) Nozawa S, Sakayori M, Ohta K, Iizuka R, Mochizuki H, Soma M, Fujimoto J, Hata J, Iwamori M, Nagai Y : A monoclonal antibody (MSN-1) against a newly established uterine endometrial cancer cell line (SNG-II) and its application to immunohistochemistry and flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol* 161 : 1079-1086, 1989
  - 19) Iwamori M, Sakayori M, Nozawa S, Yamamoto T, Yago M, Noguchi M, Nagai Y : Monoclonal antibody-defined antigen of human uterine endometrial carcinoma is Le<sup>b</sup>. *J Biochem* 105 : 718-722, 1989
  - 20) 塚崎克己：子宮体癌の発生に伴う複合糖質発現異常に関する基礎的研究とその臨床へのフィードバック。日産婦誌 45 : 789-801, 1993
  - 21) Yazawa S, Nakamura J, Asao T, Nagamachi Y, Sagi M, Matta K. L, Tachikawa T, Akamatsu M : Aberrant  $\alpha 1 \rightarrow 2$  fucosyltransferases found in human colorectal carcinoma involved in the accumulation of Leb and Y<sub>1</sub> antigens in colorectal tumors. *Jpn J Cancer Res* 84 : 989-995, 1993
  - 22) Yazawa S, Madiyalakan R, Jain R K, Shimoda N, Matta K. L : Use of benzyl 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2-O-methyl- $\beta$ -D-galactosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside [2'-O-methyl-lacto-N-biose 1 $\beta$ Bn] as a specific acceptor for GDP-fucose : N-acetylglucosaminide  $\alpha(1-4)$ -L-fucosyl-transferase. *Anal Biochem* 187 : 374-378, 1990
  - 23) Yazawa S, Takeya A, Hosomi A, Nakajima T, Shimada N, Ohi H, Tachikawa T, Piscorz C.F, Jain R.K, Matta K.L : Use of synthetic H disaccharides as acceptors for detecting activities of UDP-GalNAc : Fuca1 $\rightarrow$ 2Gal $\beta$ -Ra1 $\rightarrow$ 3-N acetylgalactosaminyltransferase in plasma sample from blood group A subgroups. *Clin Chem* 38 : 2392-2395, 1992
  - 24) Negler A, Peacock M, Tantoco M, Lamons D, Okarma TB, Okrongly DA : Separation of hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *J Hematotherapy* 2 : 243-245, 1993
  - 25) Watanabe M, Hirohashi S, Shimosato Y, Ino Y, Yamada T, Teshima S, Sekine T, Abe O : Carbohydrate antigen defined by a monoclonal antibody raised against a gastric cancer xenograft. *Jpn J Cancer Res* 76 : 43-52, 1985
  - 26) Nozawa S, Narisawa S, Kojima K, Sakayori M, Iizuka R, Mochizuki H, Yamauchi T, Iwamori M, Nagai Y : Human monoclonal antibody (HMST-1) against lacto-series type I chain and expression of the chain in uterine endometrial cancers. *Cancer Res* 49 : 6401-6406, 1989
  - 27) Fujimoto J, Hata J, Ishii E, Tanaka R, Kannagi R, Ueyama Y, Tamaoki N : Differentiation antigens defined by mouse monoclonal antibodies against human germ cell tumors. *Lab Invest* 57 : 350-358, 1987
  - 28) Liotta, L.A. : Cancer cell invasion and metastasis. *Sci. Am* 266 : 54-63, 1992
  - 29) Kubushiro K, Tsukazaki K, Sakuma Y, Akiba Y, Sakayori M, Aoki R, Yazawa S, Nozawa S : Expression mechanism of human uterine endometrial cancer-specific fucosylated carbohydrate chains : Aberrant  $\alpha 1-4$  fucosyltransferases in uterine endometrial cancer-derived cell lines with type I carbohydrate chain. *Int J Oncol* 6 : 93-97, 1995
  - 30) Kubushiro K, Tsukazaki K, Sakuma Y, Sakayori M, Yazawa S, Nozawa S : Enzymatic basis for the accumulation of Lewis<sup>b</sup> antigen in uterine endometrial cancer. *Jpn J Cancer Res* 86 : 361-367, 1995
  - 31) Yoshiki J, Kubushiro K, Tsukazaki K, Udagawa Y, Nozawa S, Iwamori M : High expression of uridine diphosphate-galactose : Lc<sub>3</sub>Cer  $\beta 1-3$  galactosyltransferase in human uterine endometrial cancer-derived cells as measured by enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography-immunostaining. *Jpn J Cancer Res* 88 : 669-677, 1997
  - 32) Sakuma Y, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S : Involvement of H Type I Carbohydrate Antigen in Cell Adhesion to Vascular Endothelial Cells of Human Endometrial Cancer. *Anticancer Res* 23(2B) : 1277-1282, 2003
  - 33) Kubushiro K, Sakuma Y, Yamashita H, Fukuchi T, Banno K, Tsukazaki K, Nozawa S : Biological Characteristics of Human Uterine Endometrial Cancer Variant Cells Selected for Blood Group H Type I Antigen : Adhesion to Vascular Endothelial Cells. *Acta Histochem. Cytochem* 33(3) : 209-213, 2000

慶應医学 第82卷第3号号外  
平成 17 年 9 月 25 日

# 博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第177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 6月13日 慶大博士甲第2453号	太田 賢一	昭和47年 2月12日
同 同 第2454号	児玉 隆秀	昭和49年10月14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 6月13日 慶大博士乙第3942号	石井 健嗣	昭和36年 9月19日
同 同 第3943号	瀧川 穰	昭和44年 7月 8日
同 同 第3944号	福田 正彦	昭和41年 6月 8日
同 同 第3945号	北東 功	昭和45年 6月 3日
同 同 第3946号	渡邊 航太	昭和47年 5月11日
平成17年 7月11日 慶大博士乙第3947号	一色 聡一郎	昭和44年 3月16日
同 同 第3948号	内田 尚哉	昭和42年 9月23日
同 同 第3949号	小池 創一	昭和44年 3月12日
同 同 第3950号	後藤 太一郎	昭和46年10月 8日
同 同 第3951号	佐久間 雄一	昭和39年 9月10日
同 同 第3952号	本間 桂子	昭和32年 5月 9日
同 同 第3953号	和田 徳昭	昭和39年12月19日

## 目 次

太田 賢一	イヌ心房筋組織における活動電位交代現象と伝導ブロック	3
児玉 隆秀	ADAM12 Is Selectively Overexpressed in Human Glioblastomas and Is Associated with Glioblastoma Cell Proliferation and Shedding of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor. (ADAM12はヒト神経膠芽腫で選択的に過剰発現し、神経膠芽腫の細胞増殖とヘパリン結合性上皮増殖因子の切断に関与している)	4
石井 健嗣	Biochemical modulation of 5-fluorouracil with interferon $\alpha/\beta$ and $\gamma$ on murine renal cell carcinoma (マウス腎癌における5-FUのインターフェロン $\alpha/\beta$ および $\gamma$ による生化学的修飾)	5
瀧川 穰	Antitumor effect induced by dendritic cell (DC)-based immunotherapy against peritoneal dissemination of the hamster pancreatic cancer. (ハムスター膵臓癌の腹膜播種に対する、樹状細胞を用いた免疫療法の抗腫瘍効果について)	6
福田 正彦	Kupffer cell depletion attenuates superoxide anion release into the hepatic sinusoids after lipopolysaccharide treatment. (エンドトキシンによる肝類洞への活性酸素放出に対するKupffer細胞の役割; Kupffer細胞枯渇モデルを用いた検討)	7
北東 功	Prenatal, but Not Postnatal, Inhibition of Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Causes Emphysema. (FGFレセプターを介したシグナル伝達を胎児期に阻害することによる肺気腫の形成)	8
渡邊 航太	Comparison between Fetal Spinal-Cord- and Forebrain-Derived Neural Stem/Progenitor Cells as a Source of Transplantation for Spinal Cord Injury. (ラット胎児脊髄由来神経幹細胞と前脳由来神経幹細胞の損傷脊髄内への移植効果の比較)	9
一色聡一郎	Lewis Type 1 Antigen Synthase ( $\beta$ 3Gal-T5) Is Transcriptionally Regulated by Homeoproteins. (ルイス1型抗原合成酵素 $\beta$ 3Gal-T5はホメオボックス蛋白により転写調節されている)	10
内田 尚哉	Stress deprivation simultaneously induces over-expression of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta in fibroblasts and mechanical deterioration of the tissue in the patellar tendon. (除負荷は膝蓋腱線維芽細胞におけるIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ の発現亢進と、膝蓋腱の力学的特性の低下を同時に来たす)	11
小池 創一	介護保険制度の導入前後における市町村の介護サービスに関する研究	12
後藤 太郎	Importance of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Cleavage Process in Post-Transplantation Lung Injury in Rats. (ラットの肺移植後急性肺損傷におけるTNF- $\alpha$ 分解過程の重要性)	13
佐久間雄一	子宮体癌の糖鎖発現異常におけるフォース転移酵素の関与とその転移能への影響	14
本間 桂子	Elevated Urine Pregnenetriolone Definitely Establishes the Diagnosis of Classical 21-Hydroxylase Deficiency in Term and Preterm Neonates. (尿中プレグナントリオロンによる新生児古典型21-水酸化酵素欠損症の確定診断)	15
和田 徳昭	乳癌骨転移におけるpamidronateの効果と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼの骨転移マーカーとしての有用性に関する研究	16

# イヌ心房筋組織における活動電位交代現象と伝導ブロック

太田 賢一

## 内容の要旨

心室細動等の重症心室性不整脈の発生前に先行する心電図上のT波交代現象は、不応期を規定する活動電位持続時間 (action potential duration : APD) の交代現象によって発生すると考えられている。活動電位交代現象はその空間的分布から2種類に分類され、観察領域全体にAPDの長短交代が同じ時相で認められるconcordant alternansと観察領域において異なる時相で認められるdiscordant alternansが存在する。特にconcordant alternansからdiscordant alternansへの移行の際に生ずる局所心筋における不応期不均一性の増大が伝導ブロックを誘発しリエントリー性不整脈発生につながると説明されているが、その移行機序については明確に言及されていない。一方、心房筋組織においても高頻度心房刺激中に心筋線維走行に関連した伝導ブロックが生じ、心室筋と同様に活動電位交代現象が観察されている。この現象は心房細動の発生機序として注目されている。

本研究では、イヌ心房筋単離灌流標本において高分解能光計測法を用い1) 活動電位交代現象と伝導ブロック発現の関連性と、2) concordant alternansからdiscordant alternansへ移行する機序の解明を目的とした。

生後6年以上のビーグル犬の右心房筋自由壁約3×4cmを切除し、電位感受性色素di-4-ANEPPSで染色し、高速CCDカメラMiCAM01および蛍光顕微鏡を用いて、心外膜面約2.8×4.2mmの範囲から60×90点の活動電位波形の変化と興奮伝播様式を同時解析した(時間解像度2ms、空間解像度45μm)。APD交代現象が周期200ms未満の定常周期刺激下で認められた。心筋線維走行に直行する方向での伝導ブロックは必ずconcordant alternans中に発生し、伝導ブロックは長いAPDを示す心拍後の短い拡張期間隔で出現する次心拍で生じた。伝導ブロックの結果、ブロックラインの遠位端を興奮伝播が迂回するために生じた極端な局所興奮時間の遅れが原因となって、ブロックラインの反対側で、交代現象の時相がリセットされdiscordant alternansが成立した。Discordant alternansの出現と同時にブロックラインを境にしたAPDの長短が逆転し、APDの空間的な差が生じ、この結果concordant alternans中に生じたブロックラインとは別の部位に新たな伝導ブロック誘発が観察された。

以上よりconcordant alternansからdiscordant alternansに移行する新たなメカニズムを解明しえた。高齢者における心房細動などのリエントリー性不整脈発生メカニズムに関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

リエントリー性不整脈発生には、活動電位持続時間 (action potential duration : APD) の交代現象であるconcordant alternansからdiscordant alternansへの移行の際に生ずる局所心筋における不応期不均一性の増大が関与するとされ、心房細動の発生機序としても注目されている。本研究では、生後6年以上の老犬の右心房筋自由壁組織において光計測法を用いて、活動電位波形の変化と興奮伝播様式を同時解析しconcordant alternansからdiscordant alternansへの移行機序の解明を主目的とした。周期200ms未満の定常周期刺激下でAPD交代現象が認められ、心筋線維走行に関連する伝導ブロックは必ずconcordant alternans中に発生し、長いAPD心拍の次心拍で生じた。Discordant alternans成立には伝導ブロックラインの遠位端を興奮伝播が迂回するために生じた極端な局所興奮時間の遅れが必要とされた。Discordant alternansの出現と同時にブロックラインを境にしたAPDの長短が逆転し、新たな伝導ブロック誘発に必要な空間的に十分なAPDの差が生じた。以上よりconcordant alternansからdiscordant alternansに移行する新たなメカニズムを解明しえ、高齢者における心房細動などのリエントリー性不整脈発生メカニズムに関与している可能性が示唆された。

審査では、まず細胞レベルでのAPD交代現象の機序についての質問がなされた。本研究では高頻度刺激下において交代現象が観察されており、内向きCa電流増強による細胞内Ca過負荷とそれに伴うNa-Ca交換機構の活性化などがその主因であると回答された。次いで、伝導ブロック後の活動電位立上がり相にノッチが形成される現象の解釈について質問がなされた。前半のノッチ部分はブロックライン近位部の活動電位を反映し、後半部はブロックライン遠位端を迂回して伝播した活動電位を反映し、狭いブロック領域を挟む二つの興奮が電気緊密的に記録されたものと回答された。本研究の臨床的意義については、高齢者で頻度の増す心房細動の成因として、心筋線維間の間質線維組織の増成に伴う伝導ブロックが報告されてきたが、この伝導ブロックの結果生じるAPD交代現象、特にconcordant alternansからdiscordant alternansへの変化が新たな局所的興奮回路現象を惹起すると言う、新しい機序を明らかとし、APDを規定する活動電位再分極過程が抗不整脈薬療法の新しい標的となることを示した点である、と回答された。

以上のように、本研究には今後の課題が残されているものの、活動電位交代現象と心筋線維走行に関連した伝導ブロック発現の関連性を解明しえた点で、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 小川 聡  
外科学 四津 良平 生理学 柚崎 通介  
臨床麻酔学 武田 純三  
学術確認担当者:  
審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年 4月18日

# ADAM12 Is Selectively Overexpressed in Human Glioblastomas and Is Associated with Glioblastoma Cell Proliferation and Shedding of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor.

(ADAM12はヒト神経膠芽腫で選択的に過剰発現し、  
神経膠芽腫の細胞増殖とヘパリン結合性上皮増殖因子の切断に関与している)

児 玉 隆 秀

## 内容の要旨

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) は細胞融合、細胞-細胞外マトリックス接着、細胞膜蛋白の切断、種々の蛋白質分解などに関する多機能分子である。我々はヒト神経膠腫、他の頭蓋内腫瘍および非腫瘍部の脳組織を検体として、メタロプロテアーゼ活性を有すると予想される13種類のADAM分子についてreverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) によりmRNAの発現をスクリーニングした。その結果、膜型ADAM12 (ADAM12m) がヒト神経膠芽腫で高頻度に発現していることが判明した。定量PCRにより発現量を測定したところ、ADAM12mはヒト神経膠芽腫 (n=16) において非腫瘍部脳組織 (n=6)、低悪性度神経膠腫 (n=7)、退形成神経膠腫 (n=9)、頭蓋内神経鞘腫 (n=5) と比較し少なくとも5.7倍以上有意に高発現していた。In situ hybridizationでは神経膠芽腫細胞そのものがADAM12mを発現しており、免疫組織染色によりADAM12mは神経膠芽腫細胞の細胞膜を主体として分布していた。また、イムノブロット法によりADAM12mは神経膠芽腫組織において~90kDaの活性型として存在しており、糖鎖による修飾を受けていた。ADAM12mの発現量と、MIB1陽性細胞指数は正の相関を示し ( $r=0.791$ ,  $p<0.0001$ ;  $n=32$ )、ADAM12mが神経膠腫の増殖に関わる可能性が示唆された。そこでADAM12mの基質であるヘパリン結合性上皮増殖因子 (HB-EGF) が、組織検体でどのような形で存在するかをイムノブロット法を用いて解析した。その結果、ADAM12mの発現が強く認められた神経膠芽腫の組織検体ではHB-EGFは切断された可溶性として存在しており、可溶性HB-EGF量はADAM12mの発現レベルと相関していた。さらに、神経膠芽腫組織や神経膠芽腫培養細胞株 (U251) をADAMインヒビター (KB-R7785) で処理すると、HB-EGFは膜型から可溶性への変換が抑制された。

以上の結果は、13種類のADAM分子のうちADAM12mがヒト神経膠芽腫細胞で選択的に過剰発現していることを示しており、ADAM12mはHB-EGFの膜型から可溶性への切断を介して神経膠芽腫の増殖に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

本研究では、ヒト神経膠腫、他の頭蓋内腫瘍および非腫瘍部の脳組織を材料として、13種類のメタロプロテアーゼ型ADAMファミリー分子の発現を検討し、膜型ADAM12 (ADAM12m) がヒト神経膠芽腫の腫瘍細胞によって特異的に高発現していることを証明した。また、ADAM12mの遺伝子発現量と神経膠腫組織のMIB1陽性細胞指数は正の相関を示すことから、ADAM12mが本腫瘍の増殖に関わる可能性が示唆された。ADAM12mの基質であるヘパリン結合性上皮増殖因子 (HB-EGF) は、神経膠芽腫でのADAM12m発現量と相関して可溶性HB-EGFとして存在しており、ADAMインヒビター処理によりHB-EGFの膜型から可溶性へのsheddingが抑制された。以上の結果は、ADAM12mがヒト神経膠芽腫細胞で選択的に過剰発現していることを示しており、神経膠芽腫の増殖因子として知られてい

るHB-EGFのsheddingを介して本腫瘍細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

審査では、HB-EGFを基質とし得るADAM9の発現と神経膠腫との関係について質問されたが、ADAM9は非腫瘍部脳組織でも発現することから腫瘍特異的な発現ではないと回答された。一方、ADAM19の発現パターンがADAM12mと似ていることから、神経膠腫との関係について質問された。これについては、論文には示されていないが、定量PCRにより神経膠芽腫と非腫瘍部脳組織との間に発現量の差がなかった事が報告された。次に、神経膠腫以外の悪性腫瘍におけるADAMの発現や機能について質問があり、ADAM12がヒト乳癌、ADAM9, 12, 15がヒト胃癌で非腫瘍部組織より高発現するとの報告はあるが、機能についての解析は未だないと回答された。一方、我々の研究室のデータでは、ADAM28が肺癌に特異的に高発現しており、増殖にかかわっている可能性が解明されつつあると説明された。神経膠芽腫においてはADAM12m発現の低い検体が存在しており、その意義について説明を求められた。これについては、神経膠芽腫はde novoで発生する場合と低悪性度の腫瘍からprogressionする症例があり、EGF受容体の異常やp53の異常などgenetic backgroundの違いを反映している可能性があるが、今回はその検討をしていないと回答された。この回答に対しては、免疫学的手法などで解明でき、それにより神経膠芽腫におけるADAM分子のより詳細な意義を見出せると助言された。ADAMインヒビターによりHB-EGFのsheddingは抑制されるが、腫瘍細胞の増殖が変化するか否かが問われた。これについては、神経膠芽腫細胞での増殖実験を行っておらず確認できていないが、教室の乳癌細胞での実験においては増殖抑制されると回答された。最後に、本研究成果をどのように利用するかとの質問があった。これに対しては、臨床的には腫瘍に対するインヒビター治療の可能性について述べたが、インヒビターのADAM12mへの特異性の問題や多機能分子であるADAMの詳細な機能解析なくして臨床応用は困難であるとの現状が説明された。

以上のように、本研究はADAM12mの詳細な機能について更なる検討の必要性があるとの指摘を受けたが、神経膠芽腫の増殖機構の一端を解明し、今後臨床的応用に発展し得る可能性をもつ興味深い研究と評価された。

論文審査担当者 主査 病理学 岡田 保典  
病理学 坂元 亨字 先端医科学 河上 裕  
外科学 河瀬 斌  
学力確認担当者：  
審査委員長：坂元 亨字

試問日：平成17年 5月24日

# Biochemical modulation of 5-fluorouracil with interferon $\alpha/\beta$ and $\gamma$ on murine renal cell carcinoma

(マウス腎癌における5-FUのインターフェロン $\alpha/\beta$ および $\gamma$ による生化学的修飾)

石井 健嗣

## 内容の要旨

進行性腎癌に通常用いられるインターフェロン(IFN)単独療法の奏効率は約15%で、必ずしも満足すべきものではなく、より優れた治療法が望まれている。申請者は、異なるタイプのIFNと、IFNが生化学的修飾を有することが知られている5-フルオロウラシル(5-FU)を併用し、マウス腎癌をモデルとして、抗腫瘍効果と生化学的修飾の機序を検討した。

(方法) (用量設定実験) 雌性6週齢BALB/cマウスの皮下に同系腎癌株RENCAを移植後14日目より5-FUを連日11回、マウスIFN $\alpha/\beta$ または $\gamma$ を隔日に6回、腹腔内投与し、腫瘍容積を測定した。(治療実験) プラセボ投与によるコントロール群と、5-FUおよび異なるタイプのIFNを単独あるいは併用投与した7群に分けて薬剤投与をおこなった。それぞれの薬剤用量は用量設定実験の結果により単独では有意な抗腫瘍効果を示さない量(5-FU 0.1mg、IFN $\alpha/\beta$   $5.0 \times 10^4$  IU、IFN $\gamma$   $5.0 \times 10^4$  IU/mouse)を投与した。薬剤投与後、摘出した腫瘍について、チミジル酸合成酵素(TS)をRadio-binding assay法により、チミジンキナーゼ(TK)はPaperdisk法により測定した。また、腫瘍組織から抽出したRNA中の5-FU濃度はGas-chromatography/mass spectrometryを用いて測定した。

(結果) 治療実験では5-FU・IFN $\alpha/\beta$ ・IFN $\gamma$  3剤併用群と5-FU・IFN $\gamma$ 併用群が、他のすべての治療群に比較して、有意に腫瘍の増殖を抑制した。また、5-FU・IFN $\alpha/\beta$ ・IFN $\gamma$  3剤併用群は5-FU・IFN $\gamma$ 併用群と比較して、有意ではないものの、より強い増殖抑制効果を認めた。腫瘍組織中の総TS量は5-FU・IFN $\alpha/\beta$ 併用群ではコントロールである5-FU群に比較して有意な差を認めなかったが、5-FU・IFN $\gamma$ 併用群では5-FU群に比較して有意な減少を示し、5-FU投与時の治療耐性の原因と考えられているTSの増加をIFN $\gamma$ が抑制して、抗腫瘍効果を増強したと考えられた。腫瘍組織中のTKは5-FU・IFN $\gamma$ 併用群ではコントロールである5-FU群に比較して有意な差を認めなかったが、5-FU・IFN $\alpha/\beta$ 併用群では5-FU群に比較して有意に抑制され、IFN $\alpha/\beta$ がDNA合成のサルベージ酵素であるTKを抑制することにより、抗腫瘍効果を増強したと考えられた。腫瘍RNA中の5-FU濃度は5-FU・IFN $\gamma$ 併用群ではコントロールである5-FU群に比較して有意な差を認めなかったが、5-FU・IFN $\alpha/\beta$ 併用群では5-FU群に比較して有意な増加を認め、IFN $\alpha/\beta$ が腫瘍RNAへの5-FUの取り込みを増加し、抗腫瘍効果が増強したと考えられた。

以上の結果から、5-FUに異なる機序の生化学的修飾を有する2種のIFNを併用することにより、3剤の併用が最も強い抗腫瘍効果をもたらしたと考え、腎細胞癌の治療においてIFN $\alpha/\beta$ 、IFN $\gamma$ および5-FU併用により優れた治療効果が期待できると結論した。

## 論文審査の要旨

進行性腎癌に対するインターフェロン(IFN)の奏効率は15%程度であり、新たな治療法確立が望まれている。本研究では、臨床的に用いられているIFNのサブタイプ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ と化学療法剤の併用による抗腫瘍効果の増強の可能性について検討した。まず、BALB/cマウスの皮下に同系腎癌株RENCAを移植したモデルに5-FU、IFN $\alpha/\beta$ 、IFN $\gamma$ を投与し、抗腫瘍効果とチミジル酸合成酵素(TS)、チミジンキナーゼ(TK)、腫瘍RNA中の5-FU濃度(F-RNA)を測定した。その結果、5-FU・IFN $\gamma$ 併用群において総TS量が減少し、5-FU・IFN $\alpha/\beta$ 併用群においてTK活性の抑制とF-RNAの増加がみとめられ、5-FU・IFN $\alpha/\beta$ ・IFN $\gamma$ 併用群が、最も強い増殖抑制効果を示したことから、5-FU・IFN $\alpha/\beta$ ・IFN $\gamma$ 併用療法が、新たな腎癌の治療となる可能性が示唆された。

審査ではヌードマウスにヒト腎癌株を移植したモデルの方が、適切ではないかと指摘された。本研究に用いられたマウス腎癌RENCAは病理組織学的に未分化で悪性度が高く、ヒト腎癌において多く見られる一般的な淡明細胞癌とは異なるものの、マウス自然発生腎癌のため正常免疫能を有するマウスにも移植可能であり、IFNの直接的、間接的抗腫瘍効果の両者を評価でき、より臨床に即したモデルであると回答した。5-FUに着目した理由については、*in vitro*および*in vivo*で5-FU・IFN併用による抗腫瘍効果の増強を示唆する報告があり、IFNの5-FUに及ぼす生化学的修飾をTS、TK、F-RNAを指標として検討するためと回答した。IFN $\gamma$ の投与量が治療実験では $5.0 \times 10^4$  IU/マウスであったものが、生化学的実験では $1.0 \times 10^4$  IU/マウスに変更された理由については、治療実験で5-FU・IFN $\gamma$ 併用群が5-FU・IFN $\alpha/\beta$ 併用群よりも有意にRENCAの増殖を抑制したこと、文献的にIFN $\gamma$ は5-FUの抗腫瘍効果をIFN $\alpha/\beta$ との比較で2倍以上増強させるため、生化学的実験ではIFN $\gamma$ の投与量を減じたと回答した。5-FUの耐性機序については、文献的にはTS遺伝子多型の関与が指摘されるが、本研究でも遺伝子レベルの検討を行なうことによりその詳細が解明される可能性が残された。また本研究において、5-FU・IFN投与前後のRENCAの病理組織学的変化の検討が機序の解明の一助になったのではとの指摘を受けた。

以上のように、本研究ではなお検討すべき点は残るものの、*in vivo*において5-FUに異なる生化学的修飾を有するIFN $\alpha/\beta$ とIFN $\gamma$ を併用することによる、3剤の併用がより優れた抗腫瘍効果を示すことを証明したことが、今後の進行性腎癌の治療に結びつく有意な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
先端医科学 河上 裕 病理学 坂元 亨亨  
薬剤学 谷川原祐介

学力確認担当者: 北島 政樹、河上 裕  
審査委員長: 河上 裕

試問日: 平成17年 4月12日

# Antitumor effect induced by dendritic cell (DC)-based immunotherapy against peritoneal dissemination of the hamster pancreatic cancer.

(ハムスター膵臓癌の腹膜播種に対する、樹状細胞を用いた免疫療法の抗腫瘍効果について)

瀧川 稔

## 内容の要旨

膵臓癌手術後の腹膜播種に対する治療は、有効なものが少なく、その確立が早急に望まれる。最近一部の進行癌に対する樹状細胞(dendritic cell; DC)を用いた免疫療法で、その有効性が報告されている。以前我々はハムスターの膵臓癌を皮下移植したモデルで、腫瘍抽出物にて処理をした骨髄由来DCが腫瘍特異的な細胞障害性T細胞(cytotoxic T cell; CTL)を誘導すると共に著明な抗腫瘍効果を示すことを報告した。今回の研究では膵臓癌腹膜播種の治療として、樹状細胞を用いた免疫療法の効果を検討した。

3-4週の雌性シリアンハムスターの膵臓内に $2 \times 10^7$  PGHAM-1細胞(ハムスター膵臓癌細胞)を移植し、腹膜播種モデルを作成した。ハムスター骨髄細胞をmGM-CSFとmIL-4存在下に培養後DCを採取し、PGHAM-1由来の腫瘍融解産物(lysate)で処理し腹腔内に投与した。腫瘍投与後から3日目、各群9匹に $1 \times 10^7$  DC+lysate、 $1 \times 10^7$  DC、コントロールとしてPBSを一週間隔で合計3回腹腔内投与した。24日目に3匹ずつを抽出しその腫瘍量を検討した。DC群、DC+lysate群では、PBS群と比較して腫瘍重量、転移個数共に有意に減少していた。明らかに血性腹水量も減少していた。また生存期間の検討においてもDC+lysate群では中央値48.8日、DC群では35.0日とPBS群の25.0日に比較して有意に生存期間の延長を認めた。また24日目に各群3匹の脾細胞を用いてCTL活性を検討した。陰性コントロールとしてのハムスター肉腫細胞DDT<sub>1</sub>MF-2に対するCTL活性は認めず、NK細胞の標的であるYAC-1細胞に対しても活性を認めなかった。PGHAM-1に対してはDC+lysate群において最も強い活性を認めた。以上の結果よりPGHAM-1特異的なCTLが誘導されたことが示され、抗腫瘍効果の機序として働いていることが推察された。

GFP遺伝子を導入したDCの追跡実験の結果から、腹腔内投与されたDCは大網のリンパ組織に取り込まれ、そこで免疫応答を誘導することが推測された。さらに治療群の腫瘍では組織学的に高度の壊死が認められ、多数の単核球と多核白血球が浸潤していた。これらの知見を考慮すれば、腫瘍抽出物で処理されたDCは腹腔内に投与されると、主して大網のリンパ組織へ移動し、腫瘍特異的なCTLを誘導、増幅させて抗腫瘍活性をもつというシナリオが想定される。しかし、現時点ではこれらCTLが直接腫瘍局所に動員され、機能しているという確証はまだ得られておらず、今後の課題であると思われる。

以上より樹状細胞を用いた免疫療法は膵臓癌腹膜播種の治療の一手段として有効である可能性が示唆された。現在腹膜播種治療に有効なものが皆無に近く、今後は本研究成果を臨床研究として発展させ、早期にphase Iの臨床試験として試されるべきであると考えられた。

## 論文審査の要旨

膵臓癌は早期に腹膜播種を発症し非常に予後が悪いにもかかわらず、その治療法としては現在ではほとんど有効なものがない。著者らはハムスター膵臓癌を皮下移植したモデルで、樹状細胞(DC)療法が腫瘍特異的な細胞障害性T細胞(CTL)を誘導すると共に著明な抗腫瘍効果を示すことを報告した。今回の研究ではより臨床に近づけるべく膵臓癌腹膜播種の治療として樹状細胞を用いた免疫療法の可能性について検討した。

ハムスターの膵臓に同系の膵臓癌細胞PGHAM-1を移植し腹膜播種モデルを作成した。骨髄由来のDCを腫瘍融解産物で刺激し、合計3回の腹腔内投与を行った。この結果、腫瘍特異的なCTLの誘導が認められ、DC投与後1週間の時点での腫瘍量が減少し、また生存期間の検討においても有意に延長を示し、抗腫瘍効果が認められた。

審査では、まず実験系としてハムスターを使用した理由について質問された。今回用いたPGHAM-1細胞は、化学発癌によりハムスターに発生した膵臓癌由来であり、組織学的、病理学的な特徴から、人間の高分化型腺癌に近いということ、またマウス等のモデルが無いことが大きな理由であると説明された。また原発(膵臓)および転移巣での病理組織学的な抗腫瘍効果についての質問に対し、今回の検討では主腫瘍と播種巣とが密接しており、その区別はされていないが、組織学的には一部に単核のリンパ球と考えられる炎症細胞浸潤を認めており、これに対する免疫組織学的な検討は今後の課題であると述べられた。DCの投与方法についての質問に対し、今回は腹腔内投与しか行われていないが、今後は静脈やリンパ節投与も検討したい旨が述べられた。使用した癌細胞の特異抗原や誘導されたCTLの免疫学的な検討についての質問に対しては、現時点でハムスター免疫系の分子レベルでの同定がなされていない状態であり、本研究では抗原として腫瘍融解産物を用いてDCを刺激しているものの、それ以上の検討が困難であると回答された。これに対し抗CD8抗体を用いた阻害試験や、各細胞レベルでの免疫学的機能評価の重要性の指摘がなされた。臨床応用の点で樹状細胞の投与量として至適であるのかとの質問に対し、今回の検討では動物の体重あたりの投与量は人間の投与量として換算すると大量であると認識しており、今後は投与量の検討が必要であることが回答された。

以上のように本研究はさらなる検討課題を残しているものの、樹状細胞療法の膵臓癌腹膜播種に対する効果が示唆された点で、将来の臨床応用を考えた場合に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 日比 紀文 先端医学 河上 裕  
病理学 坂元 亨宇  
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 4月27日



# Kupffer cell depletion attenuates superoxide anion release into the hepatic sinusoids after lipopolysaccharide treatment.

(エンドトキシンによる肝類洞への活性酸素放出に対するKupffer細胞の役割；  
Kupffer細胞枯渇モデルを用いた検討)

福田 正彦

## 内容の要旨

種々の肝障害の発症機序にエンドトキシンが関与していることが知られているが、その中でエンドトキシンの主成分のlipopolysaccharide (LPS) がKupffer細胞からTNF $\alpha$ 産生を促し、肝類洞への活性酸素放出をもたらすことが示されている。著者は、ラットを用いてKupffer細胞から肝類洞へ放出される活性酸素が肝類洞内皮細胞障害を起こすことを報告した。本研究ではGadolinium Chloride (GdCl $_3$ ) によりKupffer細胞を枯渇させることによりLPS投与時のTNF $\alpha$ 産生、肝類洞内への活性酸素放出、肝類洞内皮細胞障害の程度を検討した。また、好中球、IL-8の動態も併せて検討した。方法としてまずWistar系雄性ラットに10mg/kg体重のGdCl $_3$ を2回投与した後、2mg/kg体重のLPSを投与した。また別の群では、GdCl $_3$ 投与の後5000U/kg体重のTNF $\alpha$ を門脈より持続投与した。上述の処置後Bautistaらの方法により灌流肝を用いて肝類洞内の活性酸素を測定した。またLPS投与後、肝組織でのKupffer細胞、肝マクロファージ、好中球の観察、血清TNF $\alpha$ 、IL-8の経時的測定、灌流液中のPurine nucleoside phosphorylase (PNP)/GPT比測定による肝類洞内皮細胞障害も検討した。

その結果ED2抗体を用いた免疫組織化学では、GdCl $_3$ 投与により肝臓のKupffer細胞がほぼ枯渇されることを示した。しかし、Mar1抗体を用いた免疫組織化学では、GdCl $_3$ は肝臓に浸潤するマクロファージを完全に枯渇はしなかった。LPS投与により肝類洞内の活性酸素産生は増加したが、その増加はGdCl $_3$ により抑制された。しかし、肝臓のKupffer細胞がほぼ枯渇されていたにも関わらず、その産生は完全には抑制されなかった。LPSをTNF $\alpha$ に変えた実験でも同様の結果が得られた。LPS投与により増加した肝灌流液中のPNP/GPT比の増加もGdCl $_3$ により抑制された。しかし、GdCl $_3$ 投与はLPS投与後のTNF $\alpha$ の増加を抑制しなかった。LPS投与により肝臓への好中球浸潤、血清IL-8は増加したがGdCl $_3$ により抑制された。

以上、GdCl $_3$ はKupffer細胞を枯渇し、LPS投与後に起こる肝類洞内への活性酸素産生と、引き続き肝類洞内皮細胞障害を抑制した。GdCl $_3$ はTNF $\alpha$ 投与による活性酸素放出も抑制した。これらは、Kupffer細胞が肝類洞内への活性酸素産生源として重要であることを示唆する。しかし、GdCl $_3$ はLPSまたはTNF $\alpha$ による活性酸素産生は完全には抑制しなかった。これはKupffer細胞以外の活性酸素産生源の存在が示唆された。

以上の結果よりLPSは肝類洞内へのTNF $\alpha$ と活性酸素の放出を促すとともに、IL-8産生、それに引き続く好中球浸潤を惹起し、肝類洞内皮細胞障害を悪化させる可能性が示唆された。その過程には、Kupffer細胞が重要な役割を果たしており、Kupffer細胞を枯渇させることでその障害が軽減される可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

種々の肝障害の発症の機序にエンドトキシン (ET) が関与していると報告されている。ET投与は肝類洞への活性酸素放出を惹起するが、申請者らはその活性酸素が肝類洞内皮細胞障害を引き起こす可能性を示した。近年、その活性酸素の産生源としてクッパー細胞が着目されている。本研究では、その点を明確にするために、クッパー細胞を枯渇させるとET投与による活性酸素産生、肝類洞内皮細胞障害が抑制されるかどうかを検討した。まずGdCl $_3$ 投与により肝臓のクッパー細胞が枯渇されることを確認した。その動物ではET投与による肝類洞内への活性酸素産生の減少と肝類洞内皮細胞障害の軽減が観察された。しかし、クッパー細胞をほぼ完全に枯渇しても活性酸素産生の完全な抑制には至らず、本モデルの活性酸素産生には肝臓へ浸潤する好中球、マクロファージなども関与していると結論した。

本研究の結論に至るためには、肝臓におけるクッパー細胞、マクロファージ、好中球などの動態を明確にする必要があった。そのことに対し、本研究でクッパー細胞とマクロファージを識別するために用いたED2抗体、Mar1抗体の認識抗原が現在も確立されていないことから、本研究の結果の解釈には十分注意する必要があると指摘を受けた。また、本研究では、好中球動態をHE染色像で観察したが、免疫染色も併せて行うべきであったと指摘を受けた。また、種々の免疫組織染色には、核染色も併せて行い、より鮮明な画像を提供すべきとの指摘を受けた。また、すべての審査員から、肝小葉内の各細胞の分布と肝障害部位の局在の関係についての質問があった。本研究では、灌流肝モデルを用いて肝類洞内皮細胞障害を検討したが、このモデルでは、小葉内局在を同定することは難しかった。今後、組織学的な検討などを加え、本モデルにおける障害部位の同定を行う必要があると考えられた。一方、近年GdCl $_3$ によりクッパー細胞が枯渇しないとする報告もあり、本研究の結果との乖離が指摘された。今後、*in situ*でのクッパー細胞の食食能などの検討を加え、GdCl $_3$ のクッパー細胞動態への影響をさらに詳細に検討するべきと考えられた。申請者らは、すでにET投与による肝内皮細胞障害が、活性酸素除去酵素 (SOD) を投与することで抑制されることを示しており、本モデルでも、肝類洞内皮細胞障害はクッパー細胞などから産生された活性酸素に起因していると推測している。これに対し、本モデルでもSOD投与が肝細胞障害軽減するかどうかを追試し、その点をより明確にするべきであったと指摘を受けた。

以上の如く、本研究には今後検討されるべき課題が含まれているものの、ETによる肝障害におけるクッパー細胞の役割に新知見を加えたものであり、肝臓病学、特にアルコール性肝障害、非アルコール性脂肪肝炎などの病態解明にとって有意義な研究であるとの評価を受けた。

論文審査担当者 主査 内科学 日比 紀文  
外科学 北島 政樹 医化学 末松 誠  
病理学 坂元 亨宇  
学力確認担当者：北島 政樹  
審査委員長：北島 政樹

試問日：平成17年 4月25日

# Prenatal, but Not Postnatal, Inhibition of Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Causes Emphysema.

(FGFレセプターを介したシグナル伝達を胎児期に阻害することによる肺気腫の形成)

北 東 功

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

肺原基は、内胚葉由来の前腸から腹側に出芽し2分岐を繰り返しながら気管支、肺胞を形成する。肺形成過程において、様々な転写因子、成長因子が重要な役割を果たしていることが*in vitro*、*in vivo*の研究で明らかにされている。Fibroblast Growth Factor (FGF)は低分子量成長因子で、肺を含む多くの器官形成に重要な役割を果たしている。肺においては、6種のFGF、5種のFGF受容体が時間的、空間的に異なるパターンで発現し、肺発生をコントロールしている。これらのFGFの一部については、肺の形態形成における機能が明らかにされている。胎児肺でのFGF-7過剰発現は先天性嚢胞性腺腫様肺奇形様の異常をきたし、成熟肺での過剰発現は2型肺上皮細胞の過形成を生じる。また、FGF-10やその受容体であるFGFR-2のノックアウトマウスは肺無形成を呈することが明らかになっている。一方、FGF機能喪失マウスが致死性であるため、肺胞形成(後期肺発生)におけるFGFシグナルの役割については解明されていない。例外的に、FGFR-3/FGFR-4ダブルノックアウトマウスは致死性ではなく、生後、肺胞形成不全による気腫化を認める。

本研究では、可溶性FGFレセプター(FGFR-HFc)を、SP-Cプロモーターを用いて肺特異的に、かつドキシサイクリン依存性に発現させることにより、時期特異的にFGFシグナル伝達を阻害することが可能なトランスジェニックマウスを作成、肺胞形成におけるFGFシグナルの役割について検討した。

胎齢14.5日からドキシサイクリンを投与しFGFR-HFcを発現させたところ、胎齢18.5日には気道スペースの増大と細胞増殖指数の有意な低下を認め、日齢25には重度の気腫化を認めた。気腫化を呈した肺組織においてはII型肺上皮細胞の減少と肺血管数の減少を認めた。これらの変化は、ドキシサイクリン非投与群(FGFR-HFc非発現群)では認められなかった。ドキシサイクリン投与によるFGFR-HFc強制発現を胎齢16.5日からとしたところ、日齢25における気腫化は軽度で局所的であった。ドキシサイクリン投与をさらに遅らせ出生後からとした場合には、肺のサイズ、組織所見に異常を認めなかった。

以上の結果から生後の正常な肺胞形成、肺血管形成に、胎児後期のFGFシグナル伝達が重要な役割を果たしていることと結論した。

肺発生においてFGFシグナルが重要であることは知られていたが、FGFに関するトランスジェニックマウスのほとんどが致死性であるなどの理由から、生後に起こる肺胞形成とFGFシグナルの関連については未解明であった。本研究は、ドミナントネガティブFGF受容体を肺でのみ発現させるシステムを開発し、①発生時期特異的にFGFシグナルを阻害すると、肺胞形成、気管支分岐が抑制されること、②FGF-7による嚢胞形成がFGFシグナルを遮断することにより阻止されることを明らかにした。

審査ではまず実験方法について質疑応答がなされた。FGF受容体のリン酸化について質問され、リン酸化抑制を確認しておらず、FGFシグナルを完全遮断したとは立証されていない、と回答された。ドキシサイクリン投与と標的遺伝子発現のタイムラグについて質問され、約24時間の誤差があるためFGFシグナルが遮断された時期を正確に把握することは困難である、と回答された。ドミナントネガティブFGF受容体の特異性に関する質問がなされ、肺に発現するすべてのFGFが同受容体に結合する、と回答された。ドキシサイクリンの毒性による肺胞形成への直接影響について質問され、コントロール群の肺発生が全く正常であったことから考えにくい、と回答された。換気状態が肺動脈へのバリウム充填に影響するのでは、との質問に対して、拡張固定を行っており問題ない、と回答された。

続いて、結果に関する質疑応答がなされた。本研究において認められた気腫状変化を肺気腫と呼んで良いのか、という質問に対して、肺気腫とは正常に形成された肺胞構造が破壊される病態を指すものであるのに対して、本研究における気腫状変化は二次中隔発生異常によるものであるため、肺気腫という表現には再検討の余地がある、と回答された。また、気腫化の原因が肺血管数の減少にある可能性、さらに血管数の減少がFGFシグナル阻害によるものであった可能性について質問された。血管数減少は肺組織の減少による二次的な変化が主でありFGFシグナルの関与については今後の検討課題である、と回答された。審査委員から、FGF-2が血管新生に関与することから、気腫状変化が血管発生障害による二次的なものであった可能性について検討の余地がある、と指摘された。気管支分岐におけるFGFシグナルの役割について質問され、上皮細胞には2IIIb、間葉細胞には2IIIc受容体が発現しているが分布に差は無いこと、分岐部先端でFGF-10が強く発現している点が重要と考えられる、と回答された。ヒト肺疾患におけるFGFの関与について質問され、先天性嚢胞性腺腫様肺奇形におけるFGF-7の関与、高濃度酸素による肺障害におけるFGFシグナルの関与が本研究の結果と関連する重要な病態である、と回答された。

以上、本研究では、気管支分岐や血管発生メカニズムについてさらに解明されるべき点が残されているものの、FGFシグナルが肺胞形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 幸雄

外科学 小林 絃一 解剖学 相磯 貞和

発生・分化生物学 須田 年生

学術確認担当者: 北島 政樹、小林 絃一

審査委員長: 小林 絃一

試問日: 平成17年 5月26日

# Comparison between Fetal Spinal-Cord- and Forebrain-Derived Neural Stem/Progenitor Cells as a Source of Transplantation for Spinal Cord Injury.

(ラット胎児脊髄由来神経幹細胞と前脳由来神経幹細胞の損傷脊髄内への移植効果の比較)

渡邊 航太

## 内容の要旨

【緒言】われわれはラットやサル脊髄損傷に対する胎児脊髄由来神経幹細胞 (SpNeural Stem/Progenitor Cell: NSPC) 移植の有効性を報告してきた。今後この成果を臨床応用するためにはNSPCの大量供給が重要な課題である。本研究の目的は、ラット脊髄損傷に対しラットSpNSPCとより増殖能の高い前脳由来 (Fb) NSPCを移植し、組織学的ならびに機能的評価を行い、FbNSPC移植の損傷脊髄治療に対する有効性を検討することである。

【材料・方法】NSPCはGFPトランスジェニックラットの胎齢14日の胎児前脳および脊髄より、WeissらのNeurosphere法に基づきNSPCを培養した。3回の継代後のNSPCを実験に使用した。1) *In vitro* Differentiation assay: Neurosphereを5日間分化培養しphenotypeを検討した。2) *In vivo* 脊髄損傷作製とNSPC移植: S-Dラット (230-250g) に対し脊髄圧挫損傷を作製し (Th10, 10g, 25mm)、損傷9日後に損傷部にNSPC ( $1 \times 10^6$ /ml, 5 $\mu$ l) を移植した。SpNSPC移植群 (N=20)、FbNSPC移植群 (N=18)、コントロール群 (medium注入) (N=10) を作製した。3) 組織学的検討: 移植後12週の時点で、免疫組織学的評価を行った。一次抗体はGFP、Hu、GFAP、APC、RT97抗体、ニューロンのtransmitter phenotype決定のためGABA、Glutamate、Glycine抗体を使用した。4) 運動機能評価: BBBスコアとInclined plane testを用いて移植後12週まで機能評価を行った。

【結果】1) *In vitro*: 分化誘導後、ニューロンの割合はSpNSPCで31.6%、FbNSPCで43.6%、オリゴデンドロサイトの割合は23.9%、12.4%で両群間に有意差を認め、アストロサイトの割合は43.3%、44.0%で両群間に有意差は認めなかった。2) *In vivo*: 損傷脊髄に移植したSpおよびFbNSPCは良好に生着した。ニューロンの割合はSpNSPCで7.9%、FbNSPCで17.8%、オリゴデンドロサイトの割合は39.3%、13.9%で両群間に有意差を認め、アストロサイトの割合は53.0%、65.5%と有意差はなかった。さらに、両群でGABA陽性細胞、Glutamate陽性細胞、Glycine陽性細胞を認めた。機能評価ではBBBスコア、Inclined plane testにおいて、両NSPC移植群ともコントロール群に比べ、有意な機能回復を認めた。しかし、FbNSPC群とSpNSPC群間に有意差は認めなかった。

【考察】移植した両NSPCはいずれも良好に生着し、3つのphenotypeに分化していた。興味深いことにin vivoとin vitroの分化特徴は一致していた。さらに、本来脳では認められないGlycine陽性ニューロンがFbNSPC移植群より認められ、損傷脊髄内の微小環境により脊髄ニューロンへ誘導されたと考えられた。機能評価で両NSPC移植群はコントロール群に比べ良好な回復が認められた。損傷脊髄に対する胎児由来NSPC移植を臨床応用するための大量供給の問題を、増殖能が高いFbNSPCを用いることで解決できる可能性を示唆しており、非常に意義深いものと考えている。

## 論文審査の要旨

今まで不可能とされてきた損傷脊髄の再生研究において、我々はラットやサル脊髄損傷に対する胎児脊髄由来神経幹細胞 (NSPC) 移植の有効性を報告してきた。今後この成果を臨床応用するためにはNSPCの大量供給が重要な課題である。そこで本研究では、ラット脊髄損傷に対しラット脊髄由来 (Sp) NSPCとより増殖能の高い前脳由来 (Fb) NSPCを移植し、組織学的ならびに機能的評価を行い、FbNSPC移植の損傷脊髄治療における有効性を検討した。NSPCをGFPトランスジェニックラットの胎児前脳および脊髄より培養し、成体ラット胸髄圧挫損傷を作製し、損傷9日後に損傷部に移植した。移植後12週で組織学的評価を行った。運動機能評価はBBBスコアとInclined plane testを用いて移植後12週まで行った。移植した両NSPCはいずれも良好に生着し、3つのphenotypeに分化していたが、ニューロンの割合はSpNSPCで、オリゴデンドロサイトの割合はFbNSPCで有意に高い結果となった。さらに両NSPCはGABA陽性ニューロンとGlutamate陽性ニューロン、そして本来前脳ではほとんど認められないGlycine陽性ニューロンに分化した。機能評価では両NSPC移植群ともコントロール群に比べ、良好な機能回復を認めた。しかし、両NSPC群間に有意差は認めなかった。

審査では、損傷脊髄へFbNSPCを移植した場合にGlycine陽性細胞を認めた理由を質問された。これに対し、移植細胞の採取部位、採取の時期による影響が考えられるが、一番の原因は損傷脊髄内の微小環境にあると考えられる。しかしその詳細は不明なので、SpNSPCを前脳に移植するなどの方法で検討していく必要があると回答された。次に、移植細胞のphenotypeの分化率と細胞の採取時期について質問がなされた。これに対し、今回は胎生14日目に採取した細胞しか検討していないが、採取時期により比率は変化する可能性もある。しかし、損傷脊髄内の微小環境の影響が強ければ比率は変わらない可能性もあると回答された。次に、移植細胞のphenotypeの分化率は両群間で異なるのに、運動機能評価で両NSPC群間に有意差を認めなかった理由を質問された。これに対し、未だどの細胞が機能回復に最も寄与しているかは不明であり、阻害因子と考えられているアストロサイトも機能回復に大きな役割を演じている可能性がある。もう少し鋭敏な機能評価法を開発すれば差を検出できる可能性があるが、現在のところ本実験で使用した方法以上に信頼性のある評価法は無く、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、より増殖能の高いFbNSPCを脊髄損傷の移植材料として使用できることを証明することにより、将来の臨床応用における移植細胞の大量供給の問題を解決できる可能性を示唆し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 戸山 芳昭  
内科 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範  
外科学 河瀬 斌  
学力随認担当者: 北島 政樹、鈴木 則宏  
審査委員長: 鈴木 則宏

試問日: 平成17年 5月18日

# Lewis Type 1 Antigen Synthase ( $\beta$ 3Gal-T5) Is Transcriptionally Regulated by Homeoproteins.

(ルイス 1 型抗原合成酵素 $\beta$ 3Gal-T5はホメオボックス蛋白により転写調節されている)

— 色 聡 — 郎

## 内容の要旨

1 型糖鎖 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) は $\beta$ 1,3ガラクトース転移酵素 ( $\beta$ 3Gal-T) により合成され、主に消化管上皮に発現してその分化および癌化に関与すると考えられており、消化器癌組織に高頻度に発現するCA19-9 抗原 (シアリル・ルイスA抗原) も 1 型糖鎖の構造を有している。 $\beta$ 3Gal-Tは既に 5 種類が報告されているが、そのうちわれわれが以前にクローニングした $\beta$ 3Gal-T5が消化管上皮における 1 型糖鎖構造の合成を担っていると考えられている。本研究においては、 $\beta$ 3Gal-T5遺伝子の転写制御が腸上皮に特異的なホメオボックス遺伝子であるCdxおよびHNF1ファミリーにより調節されていることを見いだしたので報告する。

まずレポーターアッセイにより $\beta$ 3Gal-T5の転写開始点の上流-151~-121bpの部位に本遺伝子の転写に必須の領域があることを示し、この領域をGCE (Gal-T5 Control Element) と名付けた。GCEはCdxおよびHNF1ファミリーの結合配列を有しており、この部位に変異配列を導入するとプロモーター活性は消失した。ゲルシフトアッセイでは、GCEは 4 種の転写因子タンパク (Cdx1, Cdx2, HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$ ) のいずれとも結合しうることが分かった。またこれらの転写因子cDNAを共発現させると $\beta$ 3Gal-T5プロモーター活性は増大した。また $\beta$ 3Gal-T5を高発現するヒト大腸癌細胞株SW1116の核抽出液をゲルシフトアッセイにより検討したところ、HNF1 $\alpha$ およびCdxタンパク質の高発現が認められた。

Caco-2細胞は腸上皮細胞の分化モデルに頻用されるヒト大腸癌細胞株であり、本細胞株の分化誘導により $\beta$ 3Gal-T酵素活性が上昇し、結果として 1 型糖鎖構造が増大することがすでに示されている。本研究においてはCdx2およびHNF1 $\alpha$ の転写量がこの過程で増大し、同時に $\beta$ 3Gal-T5の転写量も上昇することが見いだされた。

大腸癌では正常組織に比して $\beta$ 3Gal-T活性が減少することがすでに示されているが、手術切除検体の検討でも $\beta$ 3Gal-T5の転写量が癌組織において減少することが示された。また抗 $\beta$ 3Gal-T5モノクローナル抗体を作製して免疫組織染色を行ったところ、正常小腸・大腸のほか胃に発生する腸上皮化生においても本タンパクが高発現すること、また大腸癌では正常上皮に比して発現が低下することが示された。

以上、本研究においては $\beta$ 3Gal-T5が腸上皮における 1 型糖鎖の合成量を調節していること、また腸管特異的なホメオボックス遺伝子により転写制御を受けていることが示され、 $\beta$ 3Gal-T5が腸上皮細胞の分化や癌化に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

従来より糖鎖は生体において各種の生理現象に密接に関与していると考えられ、特に消化管上皮や神経細胞に豊富に発現することから、これらの細胞での分化や癌化における糖鎖構造の変化が観察されてきた。しかし糖鎖のもつ高度の多様性から生化学的手法による分析には限界があり、特に発現制御機構の解析は困難であった。近年になり糖鎖の合成に関わる各種の糖転移酵素群がクローニングされ、糖鎖の変化を分子生物学的手法を用いて解析することが可能となった。申請者らは以前、ヒト消化管上皮細胞に発現する主要な糖鎖の一つであるルイス 1 型抗原群を合成する糖転移酵素UDP-galactose :  $\beta$ -N-acetylglucosamine  $\beta$ 1,3 galactosyltransferase-5 ( $\beta$ 3Gal-T5) の新規クローニングに成功した。本研究では本遺伝子の主要な転写調節領域を同定し、同部位にホメオボックス蛋白であるCDXおよびHNF1ファミリーが結合して転写調節に直接関わっていることを示した。さらにCaco-2細胞を用いた消化管上皮細胞の分化モデルや大腸癌組織における転写産物の定量により、消化管上皮の分化や癌化において本遺伝子の発現が大きく変化すること、またその変化にはCDXおよびHNF1ファミリーが直接的に関与することを示した。また $\beta$ 3Gal-T5に対するモノクローナル抗体を作製し、大腸癌組織ではその発現が減弱すること、また胃における腸上皮化生腺管に多く発現することを示した。また、これらの発現変化はすでに報告されているルイス 1 型糖鎖抗原および $\beta$ 1,3ガラクトース転移酵素活性レベルでの観察結果を裏付けるものであった。

審査では、まず本研究の前半部において $\beta$ 3Gal-T5の発現制御機構を分子生物学的な転写研究の手法を用いて解析し、ホメオボックス遺伝子が直接的に関与することを示した点が評価された。しかしCaco-2細胞の分化モデルと大腸癌組織での結果に乖離がある点、すなわち変化する転写因子が異なる点に疑問が示され、分化と癌化で作用する転写因子が異なる可能性がある旨の回答があった。また組織検体での転写因子の変化が $\beta$ 3Gal-T5の変化に比べて少ない点に疑問が示されたが、個々の細胞レベルで大きな変化があっても組織検体では細胞集団全体として評価されるため、差が出にくいのではないかの回答があった。また腫瘍マーカーCA19-9の発現量と $\beta$ 3Gal-T5の発現量との関連について質問があり、 $\beta$ 3Gal-T5を含め既知の糖転移酵素の発現量との関連は証明されておらず、CA19-9の発現量を制御する因子については依然説明されていない旨の返答があった。また、組織染色に用いられたモノクローナル抗体について、特異性の証明のため免疫吸収試験や細胞染色が行われることが望ましいとの指摘があった。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、糖転移酵素 $\beta$ 3Gal-T5の転写調節機構を分子生物学的手法を用いて明らかにし、さらに消化管上皮細胞の癌化および分化において実際に機能してい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 外科学 北島 政樹  
先端医科学 河上 裕 病理学 坂元 亨宇  
内科学 日比 紀文  
学力確認担当者：北島 政樹、河上 裕  
審査委員長：河上 裕

試問日：平成17年 5月25日

# Stress deprivation simultaneously induces over-expression of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta in fibroblasts and mechanical deterioration of the tissue in the patellar tendon.

(除負荷は膝蓋腱線維芽細胞におけるIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ の発現亢進と、膝蓋腱の力学的特性の低下を同時に来す)

内 田 尚 哉

## 内容の要旨

腱・靭帯組織はこれを取り囲む力学的環境の影響を受けることが知られている。我々は、関節運動を維持したまま膝蓋腱を除負荷させる方法を家兎において開発し、除負荷膝蓋腱の力学的特性は数週以内に著明に低下することを報告した。しかし、除負荷による膝蓋腱の力学的特性の低下に関する発生機序に関しては未だ明らかではない。一方、力学的環境の変化は種々の培養細胞において種々のサイトカインの発現亢進を来すことが知られている。また、種々のサイトカインは腱・靭帯組織の線維芽細胞におけるコラーゲンおよびコラーゲナーゼ合成を制御することが知られている。本研究の目的は、除負荷が膝蓋腱線維芽細胞におけるサイトカインの発現と、膝蓋腱の力学的特性に及ぼす影響について検討することである。

実験動物として成熟雄Wistar系ラットを用い、Group 1 (除負荷群)とGroup 2 (対照群)に分けた。Group 1では右膝蓋腱に除負荷処置を行い、Group 2では右膝にsham手術を行った。Group 1およびGroup 2とも術後2週および6週で屠殺し、力学的検討および免疫組織化学的検討に供した。力学的検討には、断面積の測定と、膝蓋骨-膝蓋腱-脛骨複合体の引張試験を行い、応力-歪み曲線を作成して弾性率を算出した。免疫組織化学的検討には、間接酵素抗体法による免疫染色を施行した組織像より、全細胞数に対する染色陽性細胞の割合(陽性細胞率)を算出して定量的検討を行った。

断面積に関しては、Group 1はGroup 2に比し有意に高値を示した。弾性率に関しては、Group 1はGroup 2に比し有意に低値であった。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ に関しては、陽性細胞率はいずれもGroup 1はGroup 2に比し有意に高値であった。

本研究より、除負荷は膝蓋腱の断面積の増加と弾性率の低下をもたらすと同時に、膝蓋腱線維芽細胞におけるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ の発現亢進を生じることが明らかとなった。過去の報告より、in vitroにおいて種々の線維芽細胞に繰り返し応力を作用させると、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ の発現が亢進することが知られており、またIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ は線維芽細胞のmatrix metalloproteinase (MMP)-1およびMMP-3の発現を亢進させることが知られている。本研究の力学的特性低下の機序として、細胞に作用する力学的環境の変化がIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等のサイトカイン分泌を誘導してコラーゲンマトリックスの分解に作用する酵素産生を刺激し、これが腱マトリックスの構造を破壊して力学的強度を低下させる、ということが推測される。本研究の結果は除負荷による腱・靭帯組織の力学的特性の低下へのIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の関与を直接的に示唆するものではないものの、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の制御は除負荷による腱・靭帯組織の力学的特性の低下を抑制できる可能性が考えられる。以上の結果から、抗IL-1 $\beta$ 抗体、抗TNF- $\alpha$ 抗体の投与により腱・靭帯組織の力学的特性の低下を予防しうる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

腱・靭帯組織はこれを取り囲む力学的環境の影響を受けることが知られており、除負荷家兎膝蓋腱の力学的特性は数週以内に著明に低下するとの報告がなされているが、その発生機序は不明である。そこで今回、ラットモデルを用いて除負荷膝蓋腱の線維芽細胞におけるサイトカインの発現と、膝蓋腱の力学的特性の低下を同時に検証した。実験動物として成熟雄Wistar系ラットを用い、除負荷群と対照群に分けた。除負荷群では右膝蓋腱に除負荷処置を行い、対照群ではsham手術を行った。除負荷群および対照群とも術後2週および6週で屠殺し、力学的検討および免疫組織化学的検討に供した。免疫組織化学的検討には、間接酵素抗体法による免疫染色を施行した組織像より、全細胞数に対する染色陽性細胞の割合(陽性細胞率)を算出して定量的検討を行った。力学的検討には断面積の測定と引張試験を行い、応力-歪み曲線を作成して弾性率を算出した。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ に関しては、陽性細胞率はいずれも除負荷群は対照群に比し有意に高値であった。断面積に関しては、除負荷群は対照群に比し有意に高値を示した。弾性率に関しては、除負荷群は対照群に比し有意に低値であった。本研究の力学的特性低下の機序として、細胞に作用する力学的環境の変化がIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等のサイトカイン分泌を誘導してコラーゲンマトリックスの分解に作用する酵素産生を刺激し、これが腱マトリックスの構造を破壊して力学的強度を低下させる、ということが推測された。本研究の結果は除負荷による腱・靭帯組織の力学的特性の低下へのIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の関与を直接的に示唆するものではないものの、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の制御は除負荷による腱組織の力学的特性の低下を抑制できる可能性が示唆された。

審査では、まず免疫染色の組織像において除負荷群で細胞密度の著明な増加を来す機序につき質問がなされ、内在性細胞の増殖とともに外来性細胞の浸潤によることが証明されているとの回答がなされた。さらにこの除負荷モデルが臨床に対応するものについての質問がなされ、膝前十字靭帯再建術における靭帯の負荷張力が発想の原点であり、ギプス固定による腱・靭帯の脆弱化に対応するとの回答がなされた。また、免疫染色による評価のみではサイトカインの発現量の亢進を直接示すものではないこと、サイトカインの発現に関連したMMPの発現の検証を要すること、コラーゲンマトリックスの分解を示す直接的な評価が必要であることなど、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残しているものの、除負荷により腱組織に生じる力学的特性低下の発生機序の一部を明らかにした点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭  
リハビリテーション医学 里宇 明元 病理学 岡田 保典  
微生物学・免疫学 小安 重夫  
学力確認担当者: 北島 政樹、里宇 明元  
審査委員長: 里宇 明元

試問日: 平成17年 6月21日

# 介護保険制度の導入前後における市町村の介護サービスに関する研究

小池 創一

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

### 目的・方法

介護保険制度の導入前後の要介護認定状況の変化とその特徴などについて明らかにすることを目的として平成11年（介護保険制度導入前）および平成13年（介護保険制度導入後）の11月に全国の全市区町村の介護保険担当者に対して行った質問票調査の結果を分析した。分析対象となったのは両年とも要介護度の記載がある265市町村（80市、142町、43村、全市区町村に対する割合8.1%）である。調査票から得られた市町村ごとの要介護認定状況に関するデータに加え、医療施設調査など既存の調査データも分析に加えた。

### 結果

分析対象となった市町村の総人口、老年人口割合、介護保険料の平均値を全国平均と比較したところ、老年人口割合が全国平均に比較して有意に低かった（有意水準5%）ものの、総人口、介護保険料に関しては有意な差を認めなかった。

平成11年に対して平成13年では、老年人口に占める要介護者割合、平均要介護度、在宅および施設入所要介護者に占める要介護5割合は、平成11年に対し平成13年の方が標準偏差は縮小し、その分布も平成13年の方が全体として市町村格差が縮小する方向にあることが確認された。老年人口に占める要介護認定を受けた者の割合、平均要介護度、老年人口に占める要介護5割合により市町村を3群に分類し、平成13年の各種指標を比較した結果からも、同様の所見が得られた。

老年人口に占める要介護5割合が大きい市町村において平均要介護度が他の群に比べて大きく上昇せず、老年人口に占める要介護5割合が、平成11年における老年人口に占める要介護5割合が小さい市町村で増加が大きかったことから、介護保険制度の導入により、従来介護サービスへのアクセスが少なかった市町村でのサービス提供量の伸びが大きかったことを示唆する所見が得られた。

平成11年と平成13年の介護保険関連施設整備状況と要介護者の状況を示す各種指標との間のSpearmanの順位相関係数を算出したところ、その相関が介護保険制度導入後により強まるなど、介護保険制度からみた施設類型別機能がより明確になったことを示唆する所見が得られた。

### 結論

介護保険制度導入による市町村の格差が平準化、施設類型別機能の明確化の背景には、介護の必要の程度という概念が「要介護認定等基準時間」という形で一元的に整理されたこと、介護給付費交付金制度が設けられたこと、などの制度的な背景もあったものと考えられる。また、介護保険制度の導入によって、従来は介護関連サービスの利用が少なかった市町村におけるサービスへのアクセスが改善した可能性が示唆されるなど、本研究により介護保険制度導入前後の市町村の変化と、制度導入の効果の一端を示すことができたものと考えられる。

介護保険制度導入前後での要介護認定状況の変化とその特徴について明らかにすることを目的として、平成11年および平成13年に全国の全市区町村の介護保険担当者に対して行った質問票調査の結果を分析した。分析対象となったのは双方の調査年に正しく回答した265市町村（全市区町村に対する割合8.1%）である。調査票から得られた市町村ごとの要介護認定状況に関するデータに加え、医療施設調査など既存の調査データも分析に用いた。その結果、介護保険制度導入後には、介護サービスの拡大と、要介護者の状況に関する指標に関して市町村格差が縮小の傾向を示している点が明らかとなった。また、単位老年人口あたり施設入居者数・病床数と要介護者の状況を表す各種指標との相関が、介護保険制度導入後により強まり、施設類型別機能がより明確になってきたことを示唆する所見が得られた。これらの背景には、介護の必要の程度という概念が「要介護認定等基準時間」という形で一元的に整理されたこと、介護給付費交付金制度が設けられたこと等、制度的な背景がある点、介護保険制度の導入により従来は介護関連サービスの利用が少なかった市町村におけるサービスへのアクセスが重点的に改善した可能性が示唆された。

審査ではまず、市町村でのサービス拡大と市町村格差の縮小に関する地域特性について質問がなされた。都道府県別比較、東西比較を行ったが、明確な所見は得られなかったとの回答がなされた。次に、介護保険制度導入後に生じた利用者、被保険者の意識の変化を示すデータの有無について質問が出された。本調査からは意識についてのデータを得ることはできなかったものの、先行研究には、要介護認定制度の導入により一律の基準で認定がなされるようになったこと、福祉制度から社会保険制度に移行したことで負担と給付の関係がより明確になったことが、サービス利用者の権利意識の強化につながったことが示唆されている点が回答された。さらに、分析対象市町村のデータの代表性について質問がなされた。調査対象市町村は全国平均と比べて老年人口割合がやや低いが、総人口、保険料の平均という点では大きな偏りが見られなかった点ではほぼ全国状況を反映しているものと考えられるものの、平成11年調査回答市町村のうち、平成11年10月時点で要介護認定を開始している市町村のみが分析対象となっていることから、分析対象市町村は介護対策に熱心な市町村である可能性は否定できない点が回答された。制度導入後に取得可能となった市町村のデータを加え、比較を行えばより説得力のあるデータとなったのではないかとの助言がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、介護保険制度導入前後の市町村の変化と、制度導入の効果の一端について実証的なデータを示すことが出来たという点で、有意義な研究であったと評価された。

論文審査担当者 主査 衛生学公衆衛生学 大前 和幸  
医療政策・管理学 池上 直己 内科学 鈴木 則宏  
リハビリテーション医学 里宇 明元  
学力確認担当者：北島 政樹、池上 直己  
審査委員長：池上 直己

試問日：平成17年 6月21日

# Importance of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Cleavage Process in Post-Transplantation Lung Injury in Rats.

(ラットの肺移植後急性肺損傷におけるTNF- $\alpha$ 分解過程の重要性)

後藤 太一郎

## 内容の要旨

肺移植後急性肺損傷におけるTNF- $\alpha$ の関与に関しては、現在まで一定の見解を見ない。TNF- $\alpha$ 変換酵素 (TACE) は、TNF- $\alpha$ の主たる産生細胞であるマクロファージの表面に存在し、炎症性刺激等に応じて膜表面に発現してきた膜型TNF- $\alpha$ を分解する。分解に伴い組織中・血漿中に遊離する遊離型TNF- $\alpha$ は、組織障害の原因となる。一方、TACE阻害剤の存在下では、膜型TNF- $\alpha$ の分解が特異的に阻害され、遊離型TNF- $\alpha$ が産生されず、マクロファージ表面に、膜型TNF- $\alpha$ が残存する。膜型TNF- $\alpha$ には、感染防御や抗腫瘍効果等の個体保護的役割があることが示されている。すなわち、TACE阻害剤は、遊離型TNF- $\alpha$ に起因する組織障害を防止する一方、TNF- $\alpha$ の生理的作用を維持すると考えられる。今回、ラット肺移植モデルにおいて、TACE阻害剤を用いて、移植後急性肺損傷における遊離型TNF- $\alpha$ の関与を検討した。

動物モデルとして、近交系Lewis ratをドナー・レシピエント双方に用いて、同所性左肺移植を行った。虚血時間は6時間、再灌流開始から犠牲死までを4時間とした。肺保存液としてEuro-Collins液を使用する群と、TACE阻害剤添加Euro-Collins液を使用する群を作成し、再灌流後の急性肺損傷を比較検討した。<sup>125</sup>I標識したアルブミンをトレーサーとして肺血管透過性を算出し、グラフト肺の肺損傷を評価した。

TACE阻害剤添加Euro-Collins液使用群では、Euro-Collins液使用群に比し、肺胞洗浄液 (BALF) 中のTNF- $\alpha$ が有意に低下し、同時に、グラフト肺急性肺損傷の有意な抑制を認めた。また、同群では、グラフト肺BALF中の好中球数・マクロファージ数も減少し、CINC-1・MCP-1・好中球エラスターゼ・HMGB-1といった炎症性メディエーターも有意に低下していた。TACE阻害剤の投与により、グラフト肺の血管内皮のICAM-1発現も減弱していた。また、肺透過性亢進の程度に応じ、BALF中へのEカドヘリンの分解遊離を認めた。

以上より、移植後急性肺損傷では、遊離型TNF- $\alpha$ が、ケモカイン (CINC-1/MCP-1) やICAM-1の誘導を介して好中球やマクロファージの集積を調節し、病態に関与すると考えられた。

## 論文審査の要旨

近年、肺移植はある種の肺疾患の治療手段として確立されつつあるが、肺移植後急性期の虚血再灌流肺障害は依然未解決の重大な問題である。本研究では、TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) 阻害剤をラット肺移植モデルに投与し、移植後急性肺損傷における遊離型TNF- $\alpha$ の関与を検討した。近交系Lewisラットを用いて同所性左肺移植を行い、TACE阻害剤投与群と非投与群とで、再灌流後の急性肺損傷を比較検討した。TACE阻害剤投与群では、非投与群に比して、肺胞洗浄液中のTNF- $\alpha$ が有意に低下し、同時に、グラフト肺急性肺損傷の有意な抑制を認めた。

審査ではまず、TACEの生理機能につき質問がなされた。これに対して、TACEはADAM17に属し、主として膜型TNF $\alpha$ の分解機能をもつ膜型ADAMであるとの回答がなされた。さらに、TACE阻害剤の特異性につき質問がなされた。これに対して、実験で使用したTACE阻害剤の阻害作用は他のMMPにも及び、TACEのみに特異的ではないとの回答がなされた。これに伴い、他のprotease阻害剤とTACE阻害剤とで、肺損傷抑制のメカニズムに差異があるかを今後検討するよう助言がなされた。次いで、TNF- $\alpha$ の免疫染色像につきその局在に関して質問がなされ、現時点では、細胞膜上のTNF- $\alpha$ の局在は推測を含み、その局在を証明するには、confocal microscopyや培養細胞を用いたFACS scanが必要であるとの回答がなされた。審査委員からは、この点は興味深い研究課題であると指摘された。TACE阻害剤によるTNF- $\alpha$ の抑制効果に比してグラフト肺の肺損傷改善が軽微であること、また、対側肺での肺損傷改善を認めないことに関して、説明が求められ、TNF- $\alpha$ 以外の種々のmediatorの関与が考えられると回答された。TACE阻害剤を持続静注せず、肺保存液にのみ混じた場合の肺損傷について、今後の検討課題として指摘された。最後に、E-cadherinの分解に直接関与するproteaseにつき質問がなされた。これに対して、各種MMPや好中球エラスターゼなど種々のproteaseがその分解に関与している可能性があり、また、TACEは遊離型TNF- $\alpha$ 産生や肺胞上皮細胞内情報伝達系を介して、E-cadherinを不活化し、間接的にE-cadherinの分解に関与している可能性があるとの回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、移植後急性肺損傷におけるTACEの重要性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 外科学 小林 紘一  
内科学 小川 聡 医化学 末松 誠  
病理学 坂元 亨宇  
学術確認担当者：北島 政樹、小川 聡  
審査委員長：小川 聡

試問日：平成17年 4月25日

# 子宮体癌の糖鎖発現異常におけるフコース転移酵素の関与と その転移能への影響

佐久間 雄一

## 内容の要旨

近年、癌化に伴う細胞膜上の血液型関連糖鎖の発現異常と、患者の予後との関連が報告されている。当研究室ではすでに、フコシル化糖鎖であるMSN-I（主としてLewis<sup>b</sup>型糖鎖）が子宮体癌に特異的に発現し、臨床統計上患者の予後と関連する事を明らかにしている。そこで本研究では、まず体癌におけるフコシル化糖鎖の発現異常の機序を明らかにする目的で、その合成に関与すると考えられる Fucosyl transferase（以下FTと略す）の活性を測定するとともに、体癌由来培養細胞株SNG-IIをMSN-I認識抗原強発現株（SNG-S）と弱発現株（SNG-W）とに分別し、各々におけるフコシル化糖鎖の発現とその細胞生物学的特性への関与を、特に血行性転移能を中心に検討し以下の知見を得た。1. 体癌組織では正常内臓に比べ $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4FTのすべての活性が亢進していた。また、体癌に特異的に発現するLewis<sup>b</sup>型糖鎖の免疫組織化学的反応性と $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-4FT活性には正の相関関係を認めた。ついで、マイクロセクターを用いて分別したSNG-SとSNG-Wの $\alpha$ -FT活性を測定した結果、SNG-SではSNG-Wに比べ $\alpha$ 1-4FT活性が著明に亢進していた。また、両者における血液型関連糖鎖の発現の差を検討した所、SNG-SではLewis<sup>a</sup>型、Lewis<sup>b</sup>型糖鎖の強い発現が見られたのに対し、SNG-Wでは、Lewis<sup>b</sup>型糖鎖の前駆糖鎖であるH1型糖鎖の強い発現が見られた。この糖鎖の発現の差は、 $\alpha$ 1-4FT活性の差により生じていると考えられた。以上より、体癌における血液型関連糖鎖の発現異常の機序として、 $\alpha$ 1-2FT,  $\alpha$ 1-4FT活性が強く関与する事が判明した。

2. SNG-SとSNG-Wの細胞生物学的特性の差を検討した所、DNA ploidyや増殖能には差が見られなかったが、ヌードマウス肺転移モデルを用いたin vivoでの検討では、SNG-Wが有意に高い血行性転移能を有していた。また、in vitroにおける血管内皮細胞との接着性を検討した所、SNG-WはSNG-Sに比べ有意に高い血管内皮細胞への接着能を認めた。さらに、各種血液型関連糖鎖に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻害試験や、単一糖鎖付着蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーによる検討の結果、SNG-Wの血管内皮細胞に対する高い接着能には、H1型糖鎖が強く関与する事が判明した。以上より、癌細胞膜上のH1型糖鎖が、血管内皮細胞に対する接着因子のひとつとして機能している事が明らかとなった。そして、MSN-I認識抗原を発現しない体癌症例の予後不良の一因として、 $\alpha$ 1-4FT活性の低下等によるH1型糖鎖の蓄積と、それにとまう血行性転移能の亢進が示唆された。

## 論文審査の要旨

癌細胞膜上の糖鎖発現異常が、患者の予後と関連する事が報告されている。当研究室では抗子宮体癌モノクローナル抗体MSN-Iを作成し、その認識抗原（主としてLewis<sup>b</sup>型糖鎖）を発現しない症例の予後が有意に不良である事を明らかにしている。本研究はこの様なフコシル化糖鎖の発現機序と生物機能を解明する事を目的とした。まず子宮体癌由来培養細胞株SNG-IIをMSN-I認識抗原強発現株（SNG-S）と弱発現株（SNG-W）とにマイクロセクターを用いて分別し、血液型関連糖鎖の発現を検討するとともにフコース転移酵素（FT）活性を測定した。その結果、SNG-Sでは $\alpha$ 1-4FT活性が著明に高いのに対し、SNG-Wではその活性低下によりLewis<sup>b</sup>型糖鎖の前駆糖鎖であるH-1型糖鎖が強く発現している事が判明した。次いで両者のin vivoにおける遠隔転移能をヌードマウス肺転移モデルで検討したところ、SNG-WはSNG-Sに比べ有意に高い転移能を有していた。またin vitroにおいても、SNG-Wは血管内皮細胞に対し有意に高い接着能を認め、抗糖鎖抗体を用いた接着阻害試験や単一糖鎖付着ビーズを用いたフローサイトメトリーによる検討の結果、H-1型糖鎖が接着因子として機能している事が明らかとなった。以上より子宮体癌細胞の血行性転移に、 $\alpha$ 1-4FT活性の低下によるH-1型糖鎖の発現が強く関与する事が判明した。

審査では、Lewis<sup>b</sup>型やH-1型糖鎖の発現異常と接着因子としての機能が体癌に特異的であるか否かについて質問があり、糖鎖発現には臓器特異性がある事、複数の接着因子を発現する癌細胞では必ずしもH-1型糖鎖が優位に機能するとは限らず、体癌に特異的な現象である可能性が高いと回答された。また接着阻害試験に用いた抗体のブロッキング抗体としての適否について質問があり、これまで接着因子としての報告のない糖鎖についての検討のためポジティブコントロールをとる事は困難であり、複数の抗体での検討を行う事で確認したと回答された。ついでH-1型糖鎖のリガンドについての質問があり、サイトカインで血管内皮上に発現が増強する物質である事は判明しているが、特定には至っておらず検討中であると回答された。H-1型糖鎖を臨床応用できるかとの質問に対しては、予後判定マーカーや抗イディオタイプモノクローナル抗体による転移抑制などの可能性があるかと回答された。最後にH-1型糖鎖が接着だけでなく、マクロファージなどの免疫応答からの忌避に関与している可能性の検討もしてみたらどうかとの助言がなされた。

以上のように、本研究は今後検討すべき点を残しているものの、H-1型糖鎖の血管内皮細胞に対する接着因子としての機能を初めて明らかにするとともに、その発現機序が $\alpha$ 1-4FT活性の低下である事を示し、子宮体癌細胞の高転移能獲得の一因を解明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 産婦人科学 吉村 泰典  
病理学 坂元 亨宇 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、坂元 亨宇  
審査委員長：坂元 亨宇  
研究指導者：野澤 志朗（産婦人科学）

試問日：平成17年 5月24日



# Elevated Urine Pregnenetriolone Definitively Establishes the Diagnosis of Classical 21-Hydroxylase Deficiency in Term and Preterm Neonates.

(尿中プレグナントリオロンによる新生児古典型21-水酸化酵素欠損症の確定診断)

本 間 桂 子

## 内容の要旨

古典型21-水酸化酵素欠損症 (21OHD) は、コルチゾール・アルドステロン合成障害による副腎不全、副腎性アンドロゲン過剰による男性化をきたす疾患である。日本および欧米諸国では、21-水酸化酵素の基質である17 $\alpha$ -ヒドロキシprogesteron (17OHP) を診断マーカーとして、ELISA法を用いた新生児マススクリーニングが行われている。しかし、新生児にしばしば認められる一過性高17OHP血症は、17OHPをマーカーとする古典型21OHDの確定診断を困難なものとする。

近年、ガスクロマトグラフ質量分析-選択的イオンモニタリング (GC/MS-SIM) 法により測定された21-デオキシコルチゾール (21DOF) 代謝物のプレグナントリオロン (Ptl) の尿中排泄が、古典型21OHD新生児において特徴的に増加することが報告された (Caulfield et al. 2002)。本研究では、尿中Ptlが古典型21OHD新生児の特異的診断マーカーか否かを明らかにするために、GC/MS-SIM法により一過性を含む高17OHP血症新生児の尿中Ptlを測定し、Ptlの感度・特異度を検討した。

対象は、1) 古典型21OHD新生児59例 (満期産50、早期産9)、2) 一過性高17OHP血症新生児83例 (満期産49、早期産34)、3) 対照62例 (満期産62) で、前二者は新生児マススクリーニングにより、高17OHP血症が見出された症例である。古典型21OHDの診断は、1) 典型的な臨床症状、2) 血中17OHPの持続的高値、3) CYP21遺伝子解析 (22例) により、一過性高17OHP血症の診断は、無治療にもかかわらず、血中17OHP濃度の正常化が確認されたことによる。尿Ptlは、これらの対象の生後3-28日の随時尿について、著者が確立した尿ステロイドプロファイル分析 (GC/MS-SIM) 法により測定した。

尿Ptlは、古典型21OHDと一過性高17OHP血症の間、および古典型21OHDと対照の間で重複しなかった。尿Ptlの感度、特異度は、0.1mg/g creatinineをカットオフ値とすると満期産、早期産のいずれにおいても100%であった。

今回の研究から、GC/MS-SIMにより測定した随時尿Ptlが、古典型21OHD新生児と一過性高17OHP血症新生児の鑑別において、診断特異的マーカーであることが明らかにされた。尿Ptlの特異度が高い理由について、筆者は、古典型21OHDでは、ACTH持続高値により、副腎11 $\beta$ -hydroxylase活性が亢進し、17OHPから21DOFへの副代謝経路が活性化されるが、一過性高17OHP血症では、このような副代謝経路の活性化がないためと推測した。

## 論文審査の要旨

古典型21-hydroxylase欠損症 (21OHD) は、副腎不全をきたすステロイド合成酵素異常症で、新生児早期に診断・治療を要する疾患である。現在、本症について、濾紙血を用いたマススクリーニング法は存在するが、生化学的確定診断法は確立されていない。申請者は、ガスクロマトグラフ質量分析-選択的イオンモニタリング (GC/MS-SIM) による尿中21-deoxycortisol代謝物 (Pregnenetriolone ; Ptl) の定量が、古典型21OHDと非21OHD (いわゆる一過性高17OHP血症) の鑑別診断において100%の感度と特異度を有し、古典型21OHDの生化学的確定診断法として極めて有用であることを示した。

審査では、第一に、新生児古典型21OHDの生化学的確定診断法として現在広く用いられているACTH負荷後17-hydroxyprogesterone (17OHP) 値に対する、尿中Ptl値の優位性について質問された。各々の方法による新生児期診断と最終診断の相関に関する臨床研究が紹介され、尿中Ptl値はACTH負荷後17OHP値に比し診断特異度が高い、と回答された。

第二に、非21OHD群に非古典型21OHDが含まれる可能性について質問された。非21OHDの最終診断は臨床的に行っており、全例に遺伝子解析を行ったわけではない。したがって非古典型21OHDが含まれる可能性を完全には否定できない、と回答された。

第三に、尿ステロイド解析において、通常のクレアチニン比に加えて、コルチゾール代謝物比 (Ptl/Tetrahydrocortisone比) を用いた検討も行った理由について質問された。ストレスによるステロイド産生増加を補正するために用いた、と回答された。

第四に、1回の検査でステロイドメタボロームが得られるというGC/MS-SIM法の利点に関連して、副腎腫瘍等、他の疾患への臨床応用の可能性について質問された。GC/MS-SIM法により63種の尿中ステロイド代謝物の一括解析が可能であること、ステロイド代謝異常のパターン認識を容易にするため一覧表を用いた報告方法が開発されていること、既に、小児科、泌尿器科、内科において高度先進医療として臨床応用されていること、が回答された。

以上、本研究は、非古典型21OHDの診断において、さらに検討すべき点はあるものの、尿中Ptl値により古典型21OHDの生化学的確定診断が新生児早期に可能であることを示した点で有意義な研究であり、情報工学の技術による自動化が達成されれば更に発展が期待される、と評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 孝雄  
医化学 末松 誠 産婦人科学 吉村 泰典  
泌尿器科学 村井 勝  
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 6月 2日

# 乳癌骨転移におけるpamidronateの効果と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼの骨転移マーカーとしての有用性に関する研究

和田 徳昭

## 内容の要旨

乳癌は高頻度に骨転移を起こすが、その成立、進展過程には破骨細胞の存在が極めて重要である。骨転移による骨破壊は腫瘍自体が直接関与するのではなく、活性化された破骨細胞により溶骨が促進される、bisphosphonate (BP) は強力な破骨細胞抑制剤であり、骨転移の治療に有効とされる。また、臨床的には骨転移評価として様々な骨代謝マーカーが応用されている。本研究は、BPの1つであるpamidronateによる骨転移制御の基礎的検討を行い、骨転移の状態と破骨細胞活性化の指標となる酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP) を中心とした骨代謝マーカーとの関係を臨床的に検討した。

まず、動物実験として自然発生高血圧ラットに同乳癌細胞株c-SST-2を頸動脈から投与、骨転移を成立させるモデルにおいて、pamidronateの腫瘍接種前治療、腫瘍接種1週後治療は対照群に比べ骨転移発生を抑制し、骨破壊への進展を阻止しえることを証明した。病理組織検査で、対照群の骨転移巣内にはTRACP染色により赤染した多数の破骨細胞が認められ積極的に骨吸収を行っている様子が観察され、微小骨髄転移から骨破壊まで多彩な像がみられた。一方治療群には骨破壊を伴う転移は全く認めず、対照群に比べ小さな転移巣であり、破骨細胞数もより少なかった。治療により骨代謝マーカーである尿中ピリジノリン (Pyr)、デオキシピリジノリン (Dpyr) の平均値は骨転移の有無に関係なく対照群に比べ有意に低下し、骨吸収の抑制が示唆された。対象群の中で骨転移を有するラットのPyr、Dpyr平均値に有意な上昇は認められなかったが、腫瘍接種3週後では骨破壊を伴う進行した骨転移が少ないためと思われる。

次に臨床研究として、乳癌患者における血清TRACPを中心に、Pyr、Dpyr、血中I型コラーゲンC端テロペプチド (ICTP)、尿中I型コラーゲン架橋Nテロペプチド (NTx) の骨転移の診断、治療効果判定に対する有用性を検討した。健存症例よりTRACPは、閉経前に比べ閉経後で有意に上昇したため、閉経状況に応じて正常値を設定した。これによりTRACPの骨転移診断の感度、特異度、正診率はそれぞれ91.0%、65.7%、83.2%であった。どのマーカーも骨転移を有する群にて有意に上昇し、骨転移の程度に応じて上昇傾向を示した。特にTRACPは骨シンチグラフィでホットスポット数が他のマーカーより少なくても、健存群と比べ有意に上昇した。またTRACPは骨病変の病勢を反映するように変動し、初再発骨転移例の多くが平均値以上を示すことから、診断や経時的な治療効果判定に有用であると思われる。

以上により、動物実験にてpamidronateはPyr、Dpyr値を下げ、骨転移を抑制した。Pamidronate投与にてマーカーを低く保つことは、骨転移の発生と進展を予防する指標となるかもしれない。臨床的にTRACPは他の骨代謝マーカーよりも優れた点が認められ、破骨細胞の活性を直接反映するユニークな性質であることから他と違った乳癌骨転移マーカーとして有望であることが示唆された。

## 論文審査の要旨

乳癌骨転移の成立、進展過程には破骨細胞が主要な役割を担う。活性化した破骨細胞による骨吸収の抑制が骨転移治療の鍵となり、骨吸収による骨代謝マーカーの変動を捉えることで、骨転移の診断、治療効果判定に役立つ可能性がある。本研究では、まずラット骨転移モデルを用いて、破骨細胞抑制作用のあるbisphosphonateの一種、pamidronateの骨転移抑制効果を検討した。その結果、治療群では骨転移数の低下が見られ、骨破壊を認めなかった。骨吸収マーカーであるピリジノリン、デオキシピリジノリン値も治療群で有意に低下を示した。一方、臨床研究として、乳癌骨転移患者から破骨細胞活性化の指標となる血清酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP) を測定すると、骨転移群で健存群、骨以外の転移群に比べ有意に上昇しており、TRACPは骨転移に特異的なマーカーであることが示された。健常人からTRACPの正常値を求めると、特異度の高いマーカーになることが判明した。また、他の骨吸収マーカーと比べても骨転移の程度や病勢を反映する優れた骨吸収マーカーであることが明らかになった。

審査において、まず動物実験での骨転移発生率に関する質問があり、母数が少ないものの腫瘍接種から屠殺までの期間を延長すれば、対照群で骨転移数の増加や骨転移程度も高度になり差が出る可能性があるとして説明された。また、対照群の転移組織とその中の破骨細胞像しか提示されてないが、治療群の転移像との違いがどうか示すべきとの指摘がなされた。これに対しHE染色とTRACP染色標本上では両群の転移巣に面積以外の形態的な差を見いだせなかったと説明された。さらにpamidronateの投与時期と投与量に関する質問に対して、半減期が極めて長い薬剤のため投与時期の影響は低いと考えられるが、腫瘍接種前投与は腫瘍細胞の骨への接着を抑制する可能性があること、接種後投与ではpamidronateの直接的な抗腫瘍効果も考えられるとされた。投与量を変えて実験はなされていないが、副作用がほとんどないことから十分な量を使用したとの説明がなされた。

次に臨床研究に関してTRACPは実際どのように臨床で使用されるのが適切かと質問された。マーカーは骨病変の総和がわかるだけで、感度が低い、特異度は高い、骨シンチグラフィの性質と逆である。被曝、コストも考えて組み合わせた使用がよいとの説明がなされた。最後に、骨シンチグラフィに写らない骨転移の存在やTRACP偽陽性、閉経状況の分類、骨粗鬆症の存在などより詳細な解析が今後望まれるとの指摘がなされた。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているものの、乳癌骨転移において破骨細胞を中心とする病態に即した診断、治療の方向性を示しており、基礎から臨床まで一貫性のある有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
整形外科学 戸山 芳昭 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、戸山 芳昭  
審査委員長：戸山 芳昭

試問日：平成17年 6月14日

- 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、お年寄りや嚥下困難な  
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、サラツ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。



# ハルナールD錠、 口腔内崩壊錠で 新登場。

**【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、クエン酸シルденаフィール 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きましては、製品添付文書をご参照ください。

**薬価基準収載**

前立腺肥大症の排尿障害改善剤(塩酸タムスロシン口腔内崩壊錠)

# ハルナール<sup>®</sup>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) Harnal<sup>®</sup>D



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