

第82卷第4号

平成17年

12月

## 慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

綜 説	
●難治性神経疾患に対する治療法の開発と実用化へ向けて	戸田 正博……(167)
講 座	
●不妊治療—生殖補助医療技術の可能性と限界—	小田 高久……(181)
話 題	
●医師と業務上のストレス	篠原 保……(189)
●大学医師会・東京都医師会連絡協議会について	近藤 太郎……(190)
学 会 展 望	
●第85回慶應医学会総会・シンポジウム	……(192)
第82巻総目次	……(195)
Key Word 索引	……(199)
著者名索引	……(202)
学 位 論 文	
●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 …(T297)
新規ピンカアルカロイド conophylline の子宮体癌細胞に対する抗腫瘍効果に関する検討	入江 琢也 …(T313)
号 外	
●博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第178号)	……(別頁)

Vol. 82 No. 4  
December 25, 2005

慶應醫學會

綜 説

難治性神経疾患に対する治療法の開発と実用化へ向けて

慶應義塾大学医学部 外科学教室

戸 田 正 博

中枢神経系は、外敵から身を守り、組織修復に重要な免疫系から隔離された特殊な環境にある。なぜ、二つの重要なシステムが分離されたのかは未だに不明であるが、進化の過程で、高等生物の中枢神経系の秩序を守るために、必然的に生じた結果なのかもしれない。しかし、ひとたび何らかの異常が発生したときには、この特殊な環境がマイナスに働いているのではないかという仮説を立て、免疫系を利用した疾患治療の研究を進めてきた。現在、3つのテーマを重点的に進めることにより、新しい治療技術、治療薬の実用化を目指している。

第一は、中枢神経再生を目指した免疫治療アプローチである。免疫制御に最も重要である樹状細胞を損傷部に移植する治療法を考案し、成熟哺乳類の脊髄において、本治療法により神経細胞が新生しうることを証明した。現在、臨床応用を目指して、サルモデルでの実験を進めている。第二は、単純ヘルペスウイルス (HSV) を用いた癌ワクチン療法である。腫瘍内に HSV を投与すると、樹状細胞を活性化して、癌ワクチンとして働くことが明らかになった。脳腫瘍をはじめとする様々なマウス腫瘍モデルにおいて本治療法の有効性を証明し、現在、臨床応用へ向けたウイルス作製の準備を進めている。第三は、疾患特異的な抗原分子を用いた免疫治療アプローチである。これまでに、脳腫瘍特異的な抗原遺伝子を同定し、抗原ペプチドを用いた免疫療法の臨床応用を検討している。

我々は、臨床医学へ応用される研究を推進させるために、バイオベンチャー企業 (株式会社 GBS 研究所) を設立して、研究成果の実用化という明確な方向性のもと、目標の達成を目指している。本稿では、現在進めている3つのテーマの基盤的な研究内容を紹介し、さらに大学発ベンチャーとの産学連携研究体制について概説する。

Key Words : regeneration, DC, cancer vaccine, HSV, antigen

1. 中枢神経損傷に対する免疫療法

成熟中枢神経系において、自己複製能及び多分化能を有する神経幹細胞の存在が明らかにされたことから、内在性の神経幹細胞を分化誘導させて中枢神経を再生させる治療法に期待が寄せられている<sup>1)</sup>。実際に、胎児神経組織や神経幹細胞の移植実験の結果から、適切な環境下においては、中枢神経系も再生しうる可能性が示されている。我々は、損傷後の中枢神経再生が困難である原因の一つが、組織修復に重要な免疫系から隔絶された環境特異性にあるという仮説のもと、内在性神経幹細胞を分化誘導させるため、神経損傷時に免疫系を導入する新しい治療アプローチを進めている。

1) 正常中枢神経系の免疫学的環境

中枢神経系は免疫学的に寛容な組織であり、その理由として、①BBB (Blood Brain Barrier ; 血液脳関門) が血中の免疫細胞の流入を妨げていること、②リンパ球がほとんど存在しないこと、③MHC (Major Histocompatibility Complex ; 主要組織適合遺伝子複合体) クラス I, クラス II 分子の発現が乏しく、抗原提示細胞が充分働いていないこと、④免疫細胞を不活性化するサイトカインが産生されていること、などが挙げられている。すなわち、中枢神経系は正常な状態では、免疫細胞の流入及び内在性の免疫系細胞の活動が極端に制限されている。以下、BBB および中枢神経系の抗原提示細胞に関して概説する。

a) 血液脳関門 (BBB)

中枢神経系の毛細管は内皮細胞が非常に密に配列することにより tight junction を形成し、これらが BBB の基本構造として抗体や細胞の侵入を防いでいる。また、中枢神経系以外ではこのような特殊な構造を形成しないことから、アストロサイトが BBB の形成に重要であると考えられている。BBB の維持には様々な因子が関与しているが、中枢神経系で恒常的に産生されている transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が、内皮細胞の接着因子の発現を抑制することにより、リンパ球の脳内流入を抑制し、免疫寛容状態の維持に関与しているという報告がある<sup>2)</sup>。

一方、正常神経系に活性化 T 細胞が存在していたという報告から<sup>3)</sup>、T 細胞は中枢神経系に侵入しうることが明らかになった。しかし、ナイーブ T 細胞や休止期 T 細胞は BBB を通過できず、活性化して芽球化した T 細胞のみ中枢神経系に侵入しうると考えられている (第 1 図)。また、脳内では、T 細胞は Fas/FasL によりアポトーシスが誘起されるという報告<sup>4)</sup>や、ガングリオンドが T 細胞を不活性化するという報告<sup>5)</sup>があり、中枢神経系には T 細胞を不活化する機構が存在する。

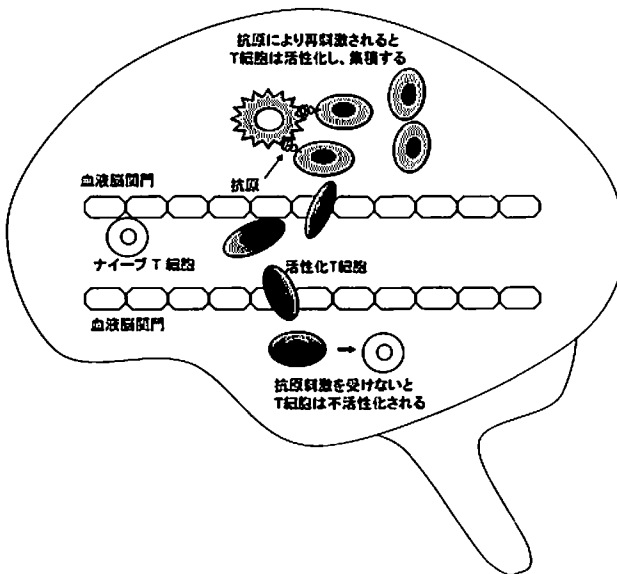


図 1 : 中枢神経系における T 細胞による免疫反応

ナイーブ T 細胞は脳内へ入ることができないが、活性化 T 細胞は血液脳関門 (BBB) を通過して脳内に侵入しうる。しかし、脳内において抗原刺激を受けない場合、T 細胞は不活性化される。一方、脳内で再度抗原刺激を受けることにより、局所で増殖、集積して免疫反応が惹起される。

b) 抗原提示細胞

中枢神経系の抗原提示細胞として、アストロサイト、マイクログリア、および血管周囲マクロファージなどが候補として挙げられている<sup>6)</sup>。アストロサイトやマイクログリアは MHC class II を発現し、食作用や *in vitro* での抗原提示能力を有することが報告されているが、*in vivo* における抗原提示細胞としての機能については明らかでない。血管周囲マクロファージは抗原提示細胞としての機能を有し、かつその解剖学的位置関係から、脳内の抗原提示細胞として最も有力な候補の一つである。また、脳内血管の内皮細胞が細胞内で蛋白を処理して、T 細胞に抗原提示することが示唆されている<sup>7)</sup>。内皮細胞は *in vitro* および *in vivo* で MHC class II を発現する細胞であり、共刺激因子や接着分子の発現も認められる。血中の T 細胞と脳内の抗原提示細胞との間に介在する血管内皮細胞特有の解剖学的位置関係から、神経系と免疫系との接点としての重要な役割を担っているかもしれない。

2) 損傷中枢神経系における免疫学的環境

中枢神経系には損傷された神経軸索の伸展を阻害する蛋白が存在し、神経前駆細胞の分化を阻害する抑制的環境が形成されている<sup>8), 9)</sup>。したがって、中枢神経系の修復には、軸索伸展阻害因子を含めた損傷組織の速やかな排除が重要である。しかし、中枢神経系においては、損傷後早期のマイクログリアの貪食能は乏しく、また末梢神経損傷と比較して、貪食能を有するマクロファージの浸潤も限られている<sup>10)</sup>。さらに、マクロファージの貪食能は末梢神経断端と共培養した場合に増強されるが、脊髓断端と共培養した場合は減弱するという報告<sup>11)</sup>があり、中枢神経系に浸潤したマクロファージは、他の組織中に存在するマクロファージと性格が異なることが示唆されている。また、末梢神経損傷周囲には、中枢神経である視神経損傷と比較して、多くの T 細胞が集積していたという報告がある<sup>12)</sup>。以上の様に、中枢神経系は、正常時のみならず損傷時においても組織修復につながる免疫反応が起きにくい組織である。

3) 樹状細胞移植による中枢神経再生

樹状細胞 (dendritic cells, DC) は、抗原提示細胞として近年注目されている細胞であり、マクロファージや B 細胞などの他の抗原提示細胞と比較して、MHC や共刺激分子 (co-stimulatory molecules) を高く発現し、ナイーブ T 細胞を活性化しうる唯一の細胞である<sup>13)</sup>。形態学的に樹枝状の突起を持つことが特徴であるが、中

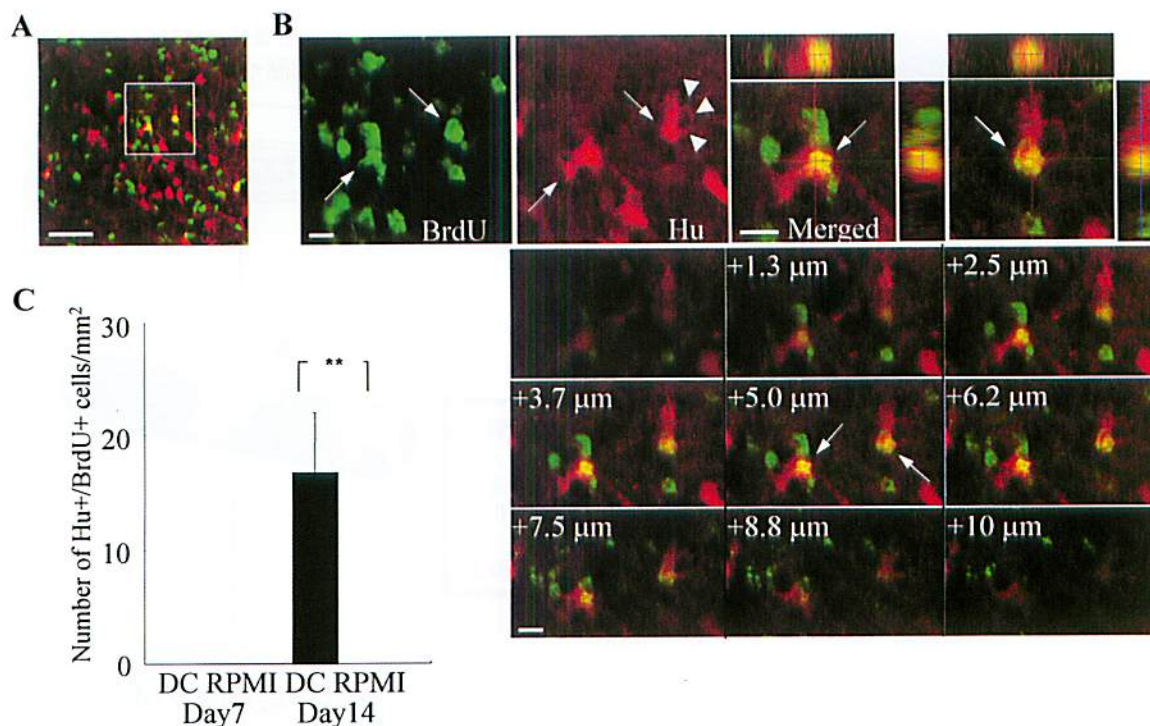


図2：樹状細胞移植による神経新生

A：樹状細胞移植後14日目の脊髄損傷部近傍のHu抗体（赤）およびBrdU抗体（緑）染色像。

B：図A中に示された範囲のConfocal画像。矢印はHu抗体、BrdU抗体二重陽性の新生ニューロンを示す。矢頭は神経突起を示す。

C：樹状細胞（DC）移植後7日、14日目の脊髄損傷部近傍のHu、BrdU二重陽性細胞数。DC移植後14日目に、Hu、BrdU二重陽性の新生ニューロンを認めたが、コントロール（RPMI）では、Hu、BrdU二重陽性細胞を認めない。（Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M: Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. J Neurosci Res 76: 453-465, 2004 の図を、許可を得て改編、転載）

中枢神経系以外の生体内に広く分布し、それぞれの組織・器官に存在する樹状細胞は、表現型のみならず機能的にも多様な細胞集団である。我々は、中枢神経系に存在しない樹状細胞を損傷部位へ移植して、中枢神経系の特殊な環境を変えることによる損傷組織の修復を試みた。

マウス脊髄損傷モデルを作製し、同種の脾臓由来樹状細胞を損傷部位に移植したところ、損傷部位周辺の活性化マイクログリア・マクロファージの細胞数が増加して、損傷神経軸索の再生が観察された<sup>14)</sup>。我々は、軸索再生のメカニズムの一つとして、樹状細胞自身が軸索再生効果の高い神経栄養因子であるNT-3 (neurotrophin-3) を分泌することを明らかにした。また、活性化マイクログリアは様々な神経栄養因子を分泌する細胞であり、軸索伸展の阻害因子を貪食する活性も有する<sup>15)</sup>。さらに、

nestin enhancer 制御下にEGFP (enhanced green fluorescent protein) を発現するトランスジェニックマウスを用いて内在性神経幹細胞の反応を解析したところ、興味深い結果を得ている。樹状細胞移植により、脊髄損傷部周辺の内在性神経幹細胞が活性化され、新しい神経細胞が分化誘導された（第2図）。したがって、これまで神経新生が起きないと考えられていた成熟哺乳類脊髄において、新たな神経細胞が分化誘導されることが明らかになった。また、樹状細胞移植後の運動機能を様々な評価法<sup>16)</sup>により解析したところ、2系統（Balb/c および C57BL/6）のマウスにおいて有意な運動機能の回復がみられた。樹状細胞は患者自身の末梢血から調整可能であり、その分離・培養法は確立され、すでに癌免疫療法へ臨床応用されている。今後、神経再生へ向けた

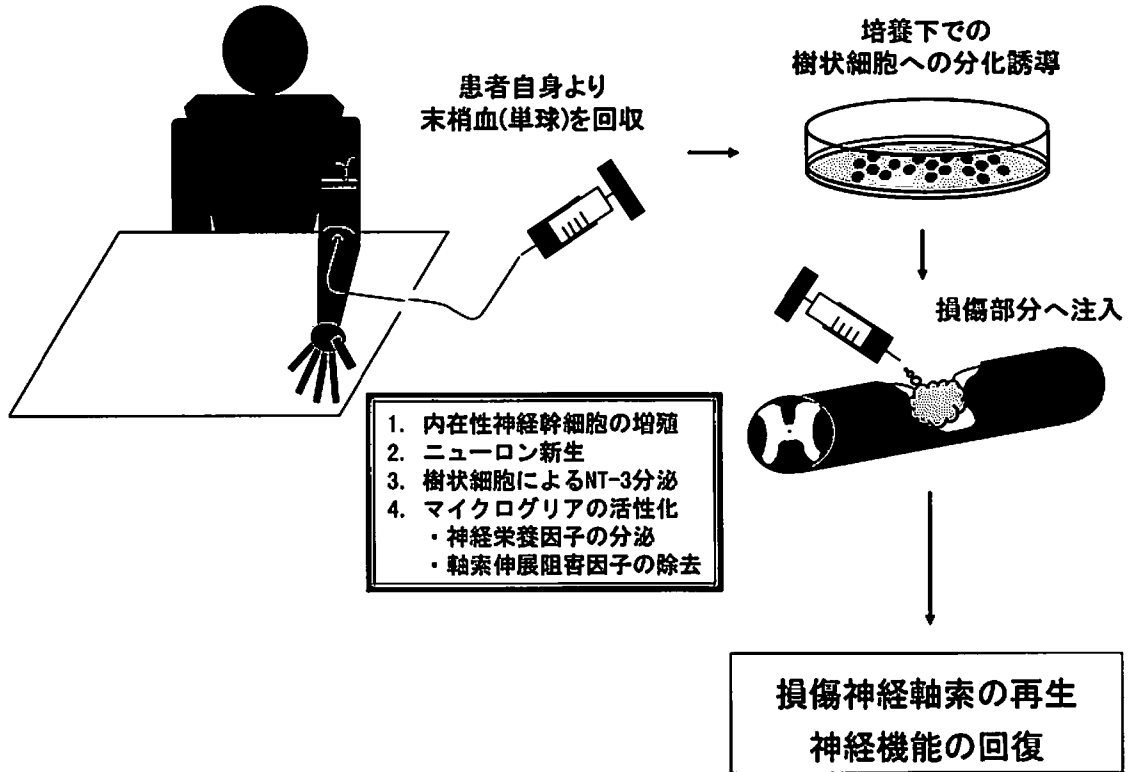


図3：自己樹状細胞移植による神経損傷治療

神経損傷患者の末梢血から単球を分離し、培養下で樹状細胞へ分化誘導する。得られた自己樹状細胞を損傷部位へ移植する神経損傷治療法を考案した。樹状細胞を移植することにより、内在性神経幹細胞を活性化して、ニューロン新生を誘導する。さらに、樹状細胞自身によるNT-3の分泌やマイクログリア活性化による神経栄養因子の分泌、軸索伸展阻害因子の除去が期待される。

免疫療法(第3図)が新しい治療法として確立されるために、樹状細胞の調整法や治療時期の検討が重要である。また、安全性の確認は最も重要な課題であり、現在、サル脊髄損傷モデルを用いて、樹状細胞治療の安全性および有効性の解析を行っている。

次に、胎仔脊髄より培養したニューロスフェアと様々な細胞との共培養を行ない、*in vitro*における神経幹細胞の増殖活性を調べた。その結果、*in vitro*において既知の神経幹細胞増殖因子や他の免疫系細胞と比較して、樹状細胞は神経幹細胞を著明に増殖させた。さらに、樹状細胞は胎仔脳の線状体由来のニューロスフェアに対しても、同様な活性を示したことから、多様な神経幹細胞に対して増殖活性を有することが明らかとなった(未発表データ)。現在、サブタイプの異なる樹状細胞による神経幹細胞増殖活性の違いを解析しており、移植治療への応用のみならず、*in vitro*で神経幹細胞を増殖させる支持細胞として、樹状細胞の有用性の検討を行っている。

#### 4) サイトカインを用いた神経損傷治療

樹状細胞移植により神経再生効果が認められたことから、我々は、末梢血中の単球から樹状細胞への分化誘導に必須のサイトカイン、GM-CSF<sup>17), 18)</sup>を用いた神経再生治療について検討を行っている。マウス脊髄損傷モデルにおいて、GM-CSFを損傷部位へ投与したところ、損傷部位周囲に樹状細胞、活性化マイクログリア・マクロファージの集積が観察され、神経機能が改善された(論文準備中)。また、中大脳動脈閉塞によるラット脳梗塞モデルにおいて、頸動脈からGM-CSFを投与することにより、脳梗塞巣の縮小と神経機能の改善が認められた(論文投稿中)。脳梗塞周囲には、活性化マイクログリア・マクロファージの集積が観察され、同部位の細胞死が抑制された。今後、治療効果の詳細な機序の解明が必要であるが、GM-CSFは薬剤としてヒトへの投与が可能であり、新しい神経損傷治療薬として臨床応用を目指して準備を進めている。

## 2. ヘルペスウイルスを用いた癌ワクチン療法

脳腫瘍に対する遺伝子治療のひとつとして、組換え単純ヘルペスウイルス I 型 (herpes simplex virus type 1; HSV-1) ベクターの臨床応用が進められている。組み換え HSV ベクターは、HSV ゲノム全長を有し、ウイルス遺伝子に変異が加えられたり、目的の挿入遺伝子によって置換されたウイルスベクターである。とくに腫瘍選択的な増殖性組換え HSV ベクターは、安全性のみならず有効性の面から期待され、現在、脳腫瘍に対する臨床試験が行われている。一方、我々は HSV を用いて、癌特異的な免疫を誘導する癌ワクチン療法への応用を進めている。

### 1) 単純ヘルペスウイルス

HSV は 2 本鎖 DNA ウイルスで、核内で増殖する DNA ウイルスの中で最大長のゲノム (153 kb) を有し、少なくとも 75 種の遺伝子をコードする。ゲノムは L (long) 領域と S (short) 領域から構成され、各ユニーク配列の両側に倒置反復配列がはさむ形で存在する (第 4 図)。ウイルスゲノムの全塩基配列が決定され<sup>19)</sup>、ほとんどのウイルス遺伝子の機能は解明されている。他の多くのウイルスと同様、HSV 遺伝子も感染細胞における発現の順序にしたがって、3つのグループ ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) に分類される。Immediate early 遺伝子 (IE,  $\alpha$ ) は、感染直後に発現し、2~4 時間でピークに達し、early 遺伝子 (E,  $\beta$ )、late 遺伝子 (L,  $\gamma$ ) の発現および  $\alpha$  遺伝子群自身に対する転写制御因子として働く。 $\beta$  遺伝子群は  $\alpha$  遺伝子群に引き続いて発現し、感染後 5~7 時間でピークに達するが、DNA 複製蛋白質およびヌクレオチド、DNA 代謝に関与する酵素群である。ウイルス DNA 合成が始まると  $\gamma$  遺伝子群が発現し、ほとんどの  $\gamma$  遺伝子はウイルス粒子構成蛋白質をコードする。

HSV の複製により、24 時間以内に宿主細胞は死に至る。このウイルス複製 (*in vivo* および *in vitro*) に必須な遺伝子を“essential 遺伝子”と呼ぶ。非複製型組み換え HSV では、この essential 遺伝子が不活化されているが、主な遺伝子として  $\alpha$  群に属する ICP4, ICP0, ICP27, ウイルス粒子蛋白である VP16 などがあげられる。一方、基本的に *in vivo* におけるウイルス複製に必須であるが、*in vitro* (培養下) での複製には必須でない遺伝子を“nonessential 遺伝子”と呼ぶ。主な遺伝子として、神経毒性に関与する遺伝子である  $\gamma$ 34.5 および UL5, ウイルス DNA 合成酵素である ribonucleotide reductase (RR), UTPase, thymidine kinase (TK)

などがある。ベクターとして HSV は、効率は様々ではあるが、ほとんどのヒト由来細胞に感染可能である。

### 2) 組換え HSV ベクター

組換え HSV ベクターは目的挿入遺伝子を HSV ゲノム中に組み込んだウイルスで、典型的には目的挿入遺伝子を組み込んだプラスミドベクター (相同組換えのための HSV DNA 配列を含む) と HSV DNA を Vero 細胞へ同時に遺伝子導入するか、あるいはプラスミドを Vero 細胞へ遺伝子導入した後、HSV を感染させて作製する。目的遺伝子を HSV に挿入可能な領域は多数存在し、現在まで、目的遺伝子が挿入された nonessential 遺伝子領域には TK, ICP0, gC, RR などが挙げられる<sup>20)</sup>。一方、essential 遺伝子領域にも目的遺伝子を挿入可能であり、essential 遺伝子を導入した細胞株、D5 細胞 (ICP4), V27 細胞 (ICP27), D6 細胞 (gB) などの中でのみベクターは複製される。組換え HSV ベクターは、主に細胞毒性を利用した癌の遺伝子治療に应用されているが<sup>21), 22)</sup>、神経細胞などへの遺伝子導入ベクターとしても利用されている<sup>23)</sup>。これまで、再発悪性グリオーマ患者を対象とした遺伝子治療のため、2つの組換え HSV ベクター、G207 および 1716 が臨床応用されている。

G207 は、2 種の nonessential 遺伝子 (ICP6, ICP34.5) 内に計 3ヶ所の変異が施され (第 4 図)、ICP6 遺伝子の不活化と ICP34.5 遺伝子欠損により、ウイルスは分裂細胞中でのみ複製し、神経毒性が極めて減弱された安全性の高い組換え HSV である<sup>22), 24), 25)</sup>。すなわち、癌の遺伝子治療に应用する場合、ウイルス増殖が腫瘍選択的にコントロールされた組換え HSV ベクターである。米国で、再発悪性グリオーマ患者に対する第 1 相臨床試験として、 $1 \times 10^6$  pfu から  $3 \times 10^9$  pfu のウイルス力価で定位的に脳腫瘍内投与 (21 症例) が行われ、安全性の確認が行われた<sup>26)</sup>。脳炎を含む重篤な有害事象は認められず、画像解析上 8 例に腫瘍の縮小を認め、2 例で 4 年以上の生存が確認された。現在、開頭腫瘍摘出時に高力価の G207 を投与する臨床試験が行われており、詳細な報告が待たれる。

1716 は  $\gamma$ 34.5 遺伝子を欠失する組換え HSV であり (第 4 図)、比較的強い殺細胞作用を有し、正常脳組織に対する病原性も残存している<sup>27)</sup>。再発悪性グリオーマ患者 9 例を対象にした第 1 相臨床試験が英国で行われ、 $10^3$  pfu から  $10^6$  pfu の低いウイルス力価で定位的に脳腫瘍内投与が行われた。重篤な有害事象は認められず、4 例で 14 ヶ月以上の生存が確認された<sup>28)</sup>。さらに、悪性

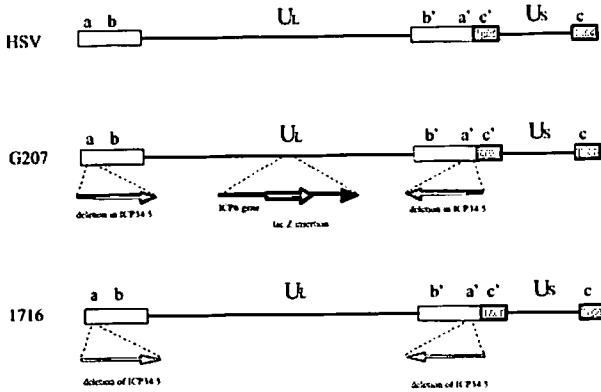


図4：HSVのDNA構造と組換えHSVベクター

HSVのDNAはL (long) 領域とS (short) 領域から構成され、それぞれのユニーク配列 (unique long : UL および unique short : US) の両側に倒置反復配列 (ab, b' a' および c, c') が位置する。G207はHSV-1 F株に由来し、DNA複製に関与するICP6遺伝子内にlacZ遺伝子が挿入され、神経毒性に関与するICP34.5遺伝子内には1.0kbの欠損をもつ。1716はHSV-1 17株に由来し、ICP34.5遺伝子を欠失する。

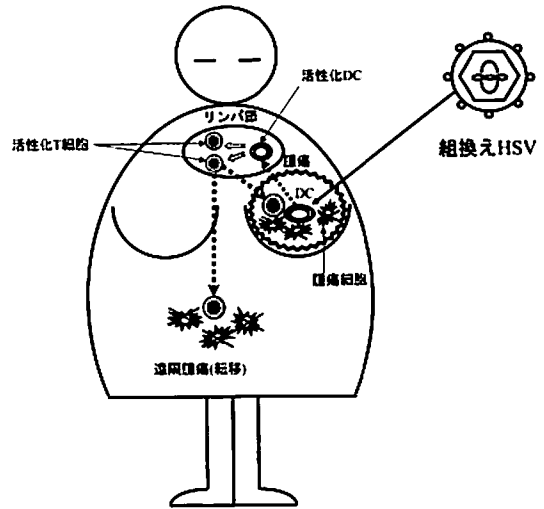


図5：組換えHSVを用いたin situ癌ワクチン療法

腫瘍内に組換えHSVを投与することにより、腫瘍局所および周辺に存在する樹状細胞 (DC) が活性化される。活性化DCは腫瘍抗原をプロセスして、リンパ節へ移動してT細胞に抗原を提示する。その結果、腫瘍特異的な活性化T細胞が誘導され、HSV投与側腫瘍のみならず遠隔腫瘍を攻撃する。

グリオーマ患者12例 (再発11例) を対象として、 $10^5$  pfuのウイルス力価での脳腫瘍内投与が行われ、安全性と生体内におけるウイルス複製が組織学的に確認された<sup>29)</sup>。

### 3) HSVベクターを用いた癌ワクチン療法への応用

癌ワクチン療法は、腫瘍細胞自身あるいは同定された腫瘍抗原を用いて、癌患者体内で抗腫瘍免疫を誘導、あるいは増強する能動的な免疫療法である。体外で細胞障害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte ; CTL) や natural killer (NK) 細胞などの抗腫瘍免疫に重要な細胞を調製し、これを癌患者へ投与する受動的な免疫療法とは異なる。近年、腫瘍抗原が同定されたことから、腫瘍抗原特異的な免疫を誘導する癌ワクチン療法に期待が寄せられている。

#### a) in situ癌ワクチン療法

1970~80年代には、細胞融解性ウイルスである Newcastle disease virus<sup>30)</sup>, parainfluenza virus<sup>31)</sup>, vaccinia virus<sup>32)</sup>などを用いて、腫瘍細胞の抗原性を変えて、癌に対する免疫を誘導する試みが行われた。多くの場合は、ウイルス感染細胞 "oncolysates" をワクチンとして投与されていたが、結果は様々で、ウイルス毒

性が観察された報告もあり、詳細な解析はなされていない。そこで、我々は、安全性の高い組換えHSVベクター、G207を用いて癌特異的な免疫を誘導する "in situ癌ワクチン療法" を考案した<sup>33)</sup> (第5図)。過去の細胞融解性ウイルスを用いた癌ワクチン療法と異なり、組換えHSVベクターを用いるため、安全性が高められ、高力価のウイルスベクターを生体内へ直接投与可能である。マウスモデルでの具体例を以下に概説する。

大腸癌細胞株CT26を同種のBalb/cマウス両側腹部皮下に移植して約1週間後、両側腫瘍直径が約5mm程度になった時点で、治療を開始した。コントロールとして、ウイルス調整に用いるVero細胞の抽出液 (以下、mock) を用いた。G207あるいはmockを右側腫瘍内のみ投与し、実験によってさらにウイルス投与を追加し、以後両側腫瘍体積を経時的に計測した。その結果、ウイルス投与側腫瘍のみならず、対側腫瘍に対しても著明な抗腫瘍効果が認められた。ウイルス投与後の組織学的解析を行ったところ、投与側腫瘍のみウイルスが検出され、対側の腫瘍内にウイルスは認められず、一方、両側腫瘍内に著明なCD4およびCD8陽性のリンパ球浸潤を認めた。また、G207を腫瘍内ではなく皮内投与した場合は、対側腫瘍に対する明らかな抗腫瘍効果は認められなかった。以上より、遠隔腫瘍に対する抗腫瘍効果

は、腫瘍内に G207 を投与することにより誘導されること、ウイルスによる直接細胞融解効果ではないことが明らかとなった。さらに、この抗腫瘍効果は、異なる組換え HSV ベクターを用いても誘導され、また他の腫瘍、系統の異なるマウス、異なる腫瘍モデルにおいても、*in situ* 癌ワクチン療法による抗腫瘍効果が確認された<sup>34, 36)</sup>。

次に HSV を用いた *in situ* 癌ワクチンにおける T 細胞の関与を調べるため、ヌードマウスを用いて同様の治療実験を行ったところ、ウイルス投与側においてのみ増殖抑制効果が認められ、対側腫瘍に対しては明らかな抗腫瘍効果を認めなかった。また、CD4, CD8 抗体を用いたリンパ球サブセットの depletion 後に治療解析を行ったところ、遠隔腫瘍に対する抗腫瘍効果にはおもに CD8 陽性 T 細胞が関与していることが明らかになった。さらに、G207 投与後のマウス脾細胞のリンパ球反応を解析したところ、CT26 細胞に対する腫瘍抗原ペプチドである AH1 に特異的な CTL の誘導が認められた<sup>33, 37)</sup>。AH1 は、マウス白血病ウイルスの膜タンパク、gp70 由来の MHC class I 拘束性のペプチドで、gp70 が正常

組織で発現せず、大腸癌 CT26 において高発現しているため、腫瘍特異抗原として CTL に認識される。皮内に G207 を投与した場合や mock を腫瘍内投与した場合は、腫瘍特異的な CTL は誘導されず、G207 を腫瘍内投与することにより、腫瘍抗原特異的な CTL が誘導された。

果たしてどのようなメカニズムで、腫瘍特異的な免疫が誘導されるのであろうか。樹状細胞は外来抗原を MHC class I に提示して、CTL を活性化しうる<sup>38), 39)</sup>。ごく最近の結果から、HSV を腫瘍内へ投与することにより、腫瘍周囲の樹状細胞を活性化して、腫瘍特異的な CTL を誘導することが明らかになった(未発表データ)。また樹状細胞が、腫瘍特異的 T 細胞および HSV 特異的 T 細胞 (CTL のみならずヘルパー T 細胞) を同時に誘導することにより、それぞれが協調的に働き、高い抗腫瘍免疫を誘導するのではないかと考えている<sup>40)</sup>。以上、組換え HSV は、細胞融解効果を利用した遺伝子治療のみならず、抗原特異的な免疫を誘導する癌ワクチン療法においても有効なウイルスベクターである。

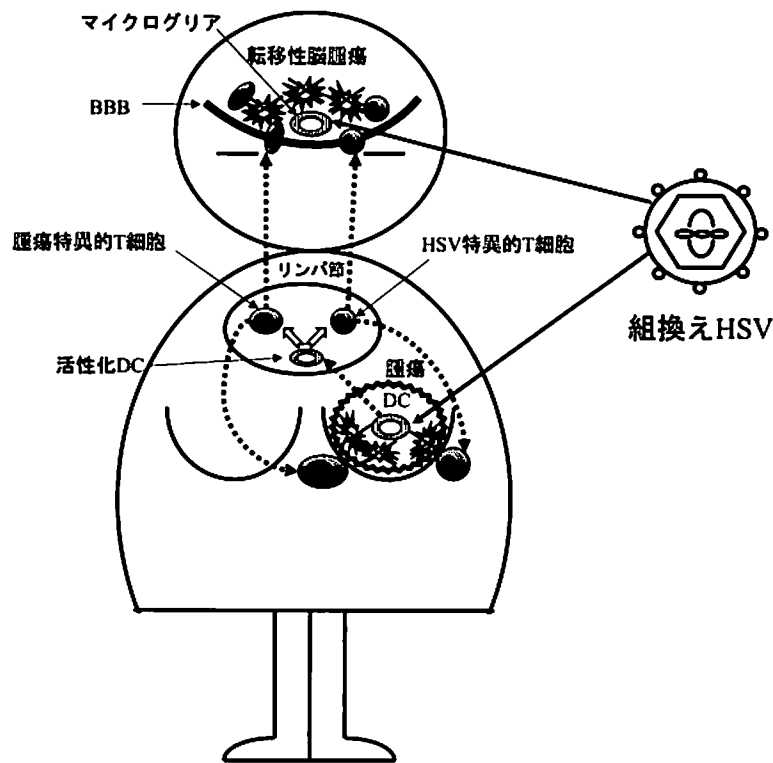


図6：脳腫瘍に対する組換え HSV を用いた免疫療法

転移性脳腫瘍に対する治療法として、原発腫瘍内のみならず転移性脳腫瘍内へ組換え HSV を投与すると、脳腫瘍は体内で誘導された腫瘍特異的 T 細胞に加えて、HSV 特異的 T 細胞の標的となりうる。



b) 脳腫瘍に対する癌ワクチン療法

脳は免疫学的寛容な組織であり、樹状細胞などの抗原提示細胞が十分に働けないため、脳腫瘍抗原を免疫系に提示することは容易でない。しかし、活性化T細胞がBBBを通過して脳内に侵入することが明らかになったことから、脳腫瘍抗原に対する全身の免疫を誘導して、脳腫瘍を治療する試みが行われている。米国で施行された神経膠腫（グリオーマ）に対する樹状細胞ワクチン療法の臨床試験では、延命効果が認められ、重篤な有害事象は報告されていない<sup>41), 42)</sup>。本治療法の有効性は今後の臨床試験の結果を待たなければならないが、グリオーマに対する癌ワクチン療法の安全性が証明された。

一方、我々は組換えHSVベクター、G207を用いた癌ワクチン療法の脳腫瘍治療への応用を試みた<sup>43)</sup>。転移性脳腫瘍モデルを作製し、皮下腫瘍（原発腫瘍を想定）内へG207を投与したところ、HSV特異的なT細胞のみならず腫瘍特異的なT細胞が誘導され、生存期間の延長が認められた。しかし治癒例が認められなかったことから、原発腫瘍内に加えて転移性脳腫瘍内へもG207を投与したところ、高い治療効果が得られた。この複合治療においては、脳腫瘍内にG207を投与したことにより、脳腫瘍が、腫瘍特異的なT細胞に加えて、HSV特異的なT細胞の標的となり、高い治療効果が得られたと考えられている（第6図<sup>44)</sup>。これらの研究結果から、脳腫瘍に対する癌ワクチン療法は、標的となる脳腫瘍の抗原性を高める工夫や局所環境を変える必要があることが示唆された。

増殖性の組換えHSVベクターは、腫瘍細胞を選択的に破壊する局所治療のベクターとして研究が進み、実際に脳腫瘍の遺伝子治療へ臨床応用された。一方、HSVベクターは体内（脳組織以外）で腫瘍内投与すると、全身の抗腫瘍免疫を誘導することから、我々は癌ワクチンのベクターとして臨床応用を検討してきた。しかし、最近、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターによる死亡例を含む重篤な有害事象が報告され、ウイルスベクターの安全性の検証が重要な課題として再認識されている。そこで、癌ワクチンとしての有効性を保持しながら、安全性を高めるため、現在、感染性を失わせた不活性化HSVの臨床応用を検討している。幸い、COE（低侵襲・新治療開発による個別化癌医療確立）を中心とした研究計画の一つとしてベクタープロセッシングセンター（Keio University Vector Processing Center；KVPC）が設立された。今後は、早期の臨床応用へ向け、環境管理されたベクタープロセッシングセンター内で不活性化HSVの作製を行う予定である。

3. 脳腫瘍抗原の同定と抗原特異的な免疫療法

T細胞に認識されるヒト腫瘍抗原が同定されたことにより、癌に対する免疫応答を人為的に操作することが可能となった。またT細胞が腫瘍拒絶に重要であることが証明され、抗原特異的に増殖する能力とメモリー機構を有することから、T細胞は癌ワクチン療法における中心的な役割を担っている。これまでグリオーマに対する治療として、手術療法、放射線療法、化学療法による集学的治療が行われ、それぞれは飛躍的な進歩を遂げているにもかかわらず、治療成績は未だに向上しない。そこで、我々はグリオーマに対する新たな治療法の開発を目的として、特異的な免疫療法の標的となる腫瘍抗原の同定を積極的に進めている。

1) ヒト腫瘍抗原

腫瘍抗原のクローニング法が開発され、CTLに認識されるヒト腫瘍抗原としてMAGE-1遺伝子<sup>45)</sup>が同定されて以来、様々なヒト腫瘍抗原が同定されている<sup>46)</sup>。これらの腫瘍抗原は、以下のような代表的カテゴリーに分けられる。a) Cancer-testis (CT) 抗原：各種癌組織と正常組織において精巣、卵巣、胎盤のみに発現する抗原群であり、MAGE 遺伝子群に代表される。生殖系の細胞はMHC分子の発現が極めて低いため、CT抗原に対するCTLは生殖系細胞を攻撃せず、癌細胞のみを選択的に攻撃する。発現パターンから理想的なターゲットであり、実際にCT抗原を用いた多くの臨床試験が進められている。これまで、MAGE, NY-ESO-1などがCT抗原として同定されている<sup>47)</sup>。b) 組織特異的な抗原：腫瘍の発生母地である正常組織にも発現しているが、腫瘍での発現が増強し、CTLに認識される腫瘍抗原である。正常メラノサイトとメラノーマに共通して発現しているtyrosinase, MART-1, gp100などの抗原が同定されている。自己抗原であり、正常組織もCTLの標的となりうるが、メラノーマに対する癌ワクチン療法に応用され、これらの抗原の有用性が示されている<sup>48)</sup>。c) 遺伝子異常に由来する抗原：腫瘍は多くの遺伝子変異に基づき発生するため、腫瘍特異的な遺伝子変異に由来する変異ペプチドが腫瘍抗原としてCTLに認識される。β-cateninおよびCDK4は1アミノ酸変異により、またMUM-1ではイントロン部分が翻訳され、それぞれ腫瘍抗原としてCTLに認識される<sup>49)</sup>。

2) SEREX法によるヒトグリオーマ抗原の同定

腫瘍抗原の同定法として、autologous typingに分

子生物学的手法を取り入れた SEREX 法 (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) が開発された<sup>49)</sup>。患者血清中の IgG を利用して抗原を同定する方法で、技術的に難易度の高い CTL の樹立を必要とせず、また実際に SEREX 法により同定された腫瘍抗原の中で、CTL エピトープが同定され、癌ワクチンへ応用された抗原の報告もある<sup>50)</sup>。そこで、我々は、患者血清を利用した SEREX 法を用いてグリオーマ抗原の同定を試みた。

SEREX 法は基本的に同一患者の腫瘍組織と血清を用いた解析法であるが、精巣組織由来の cDNA library を、複数のグリオーマ患者血清 (アロ血清) を用いて SEREX スクリーニングを行なったところ、新規のグリオーマ抗原、SOX6 が同定された<sup>51)</sup>。SOX (sry-related HMG box) 遺伝子群は、性決定因子の DNA 結合部位である HMG (high-mobility-group) ドメインを有する転写調節因子のファミリーであり、胚発生過程において組織特異的に発現され、細胞の運命決定に重要な役割を担っている<sup>52)</sup>。マウス SOX6 は、胎生期の中樞神経系や軟骨細胞にのみ発現し、SOX5 や SOX9 と共発現することにより軟骨形成に関与することが報告されているが<sup>53)</sup>、中樞神経系における機能はいまだに不明である。ヒト SOX6 の組織発現を解析したところ、胎児脳組織において発現を認めたが、成人正常組織では精巣を除いて発現を認めなかった。一方、グリオーマ組織において高い SOX6 の発現が観察され、免疫組織学的解析において、グリオーマ組織 (Glioblastoma 8 例, Anaplastic astrocytoma 5 例, Diffuse astrocytoma 1 例, Oligoastrocytoma 4 例) 全例において SOX6 陽性細胞が観察され、正常成人脳組織では明らかな SOX6 陽性細胞を認めなかった<sup>54), 55)</sup>。

つぎに、SOX6 の免疫原性について解析を行った。36 人のグリオーマ患者、14 人の他の脳疾患患者 (髄膜腫、悪性リンパ腫、転移性脳腫瘍、パーキンソン病、頭蓋咽頭腫、脳膿瘍、およびくも膜下出血)、54 人の脳腫瘍以外の癌患者、および 37 人の健康人血清中の SOX6 抗体を解析したところ、36 人中 12 人 (33%) のグリオーマ患者が SOX6 抗体陽性であったのに対し、グリオーマ以外の脳疾患患者では 14 人中 0 人 (0%)、他の癌患者では 54 人中 2 人 (4%)、健康人では 37 人中 1 人 (3%) のみ抗体が検出された。さらに SEREX 法により単離された完全長より短い SOX6 抗原分子も、完全長の抗原と同様の免疫反応を示したことから、その共通部分に含まれる HMG domain (SOX6 の DNA 結合部位: SOX6-HMG) が抗体認識部位の一つではないかと

推測し、SOX6-HMG 組換え蛋白を作製して、抗原性の解析を行った。Western blot 解析により、グリオーマ患者血清中の抗体が SOX6-HMG 蛋白を認識することを確認後、ELISA 法により SOX6-HMG 蛋白に対する血清中 IgG の抗体価を解析したところ、グリオーマ患者血清は健康人の血清と比較して有意に高い抗体価を示した (第 7 図)。したがって、SOX6 の HMG domain は、グリオーマ患者血清中の抗体認識部位の一つであることが示された。

現在まで、SEREX 法により単離された数種のグリオーマ抗原の報告があるが、発現特異性や遺伝子変異は認められていない<sup>56)</sup>。なぜこれらの抗原に対する抗体反応がグリオーマ患者にのみ検出されたのか、機序は不明であ

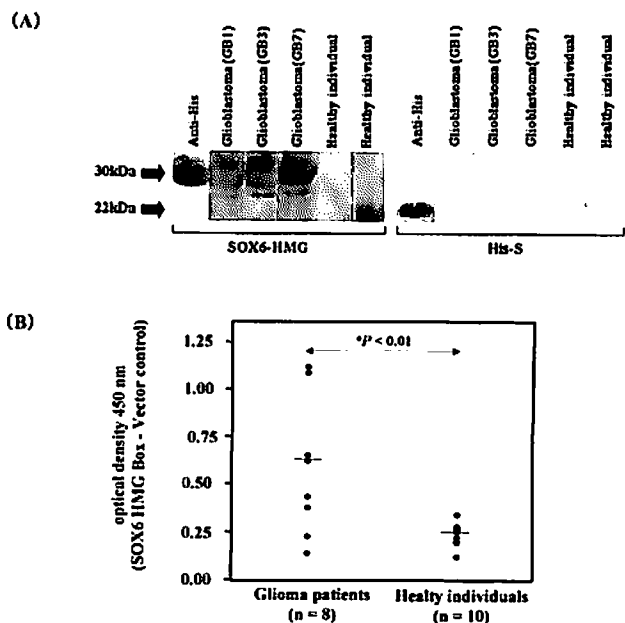


図 7：グリオーマ患者における SOX6 抗体反応

A：SOX6 抗原の HMG ドメインに対するグリオーマ患者血清反応

SOX6-HMG 蛋白 (SOX-HMG) に対して、グリオーマ患者血清 (GB1, GB3, および GB7) は反応するが、健康人血清は反応しない。His 蛋白 (His-S) に対して、グリオーマ患者血清およびコントロール血清はともに反応しない。His 結合の SOX-HMG および His-S は、陽性コントロールである His 抗体に反応する。

B：ELISA 法による SOX6-HMG 抗体価の解析

グリオーマ患者血清中の SOX6-HMG 抗体価は健康人血清中の同抗体価と比較して、有意に高い。(Ueda R, Iizuka Y, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Toda M: Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. *Oncogene* 23: 1420-1427, 2004 の図を、許可を得て改編、転載)

り、したがって、これらの抗原を用いた癌免疫療法への応用は困難である。一方、SOX6は精巣以外の成人正常組織では明らかな発現を認めず、グリオーマ組織における高い発現が観察された。さらに、グリオーマ患者選択的かつ3分の1という高頻度でSOX6に対する抗体反応が検出され、抗原特異的にヘルパーT細胞が活性化されていることが明らかになった。T細胞に認識される腫瘍抗原には、CTLに認識されるMHC class I結合性の抗原ペプチドと、ヘルパーT細胞に認識されるMHC class II結合性の抗原ペプチドが存在する。現在まで同定された腫瘍抗原は、技術的な理由などにより、ほとんどはCTLを活性化するMHC class I結合性の抗原ペプチドであるが、効率的にCTLを誘導するためには、ヘルパーT細胞の活性化が重要である。そこで、我々はSOX6抗原のCTLエпитープペプチドの解析と平行して、ヘルパーT細胞を活性化するSOX6抗原タンパクの合成および解析を行っている。ごく最近、SOX6抗原由来のHLA-A24およびHLA-A2に結合するCTLエピトープペプチドを同定することができた(論文準備中)。現在、これらの抗原ペプチドを用いたグリオーマに対する臨床研究の準備を進めている。

### 3) CTLに認識されるグリオーマ抗原

現在までCTLに認識されるグリオーマ抗原の報告は数少ない。上皮性腫瘍の抗原として同定されたSART1

およびSART3がグリオーマにおいても発現し、SART1およびSART3抗原特異的なCTLがグリオーマ細胞を障害することが報告されている<sup>57)</sup>。最近では、メラノーマ抗原であるgp100やMART-1がグリオーマ抗原としてCTLに認識され<sup>58)</sup>、メチル化による遺伝子発現調節が重要である<sup>59)</sup>ことから、脱メチル化剤を処理して、抗原性を高める工夫が行なわれている。一方、我々は、HSVを用いた免疫誘導法を利用して、T細胞に認識されるグリオーマ抗原の同定を試みた<sup>60)</sup>。グリオーマ細胞をマウスに移植後、HSVを腫瘍内に投与して、腫瘍特異的な免疫が誘導されたマウスの脾細胞からCTL細胞株を樹立した。このCTLはMHC拘束性にかつ特異的にグリオーマを障害することから、抗原遺伝子のスクリーニングを行ったところ、新規遺伝子が同定された<sup>61)</sup>。この分子の機能は不明であるが、グリオーマにおいて数カ所の遺伝子変異が存在し、この変異部分を含むペプチドが抗原としてCTLに認識されることが明らかになった。現在、この抗原ペプチドを用いて、マウスグリオーマモデルにおける抗原特異的な免疫療法の解析を行っている。また、腫瘍において高い発現を示す分子がCTLに認識される抗原エピトープを有していたことから<sup>62)</sup>、今後は、グリオーマにおいて高発現を呈する分子<sup>63)</sup>のCTLエピトープの検索を進めてゆく予定である。BBBが抗体の侵入を防御しているのに対して、活性化T細胞はBBBを通過して脳内を移動可能であり、選択

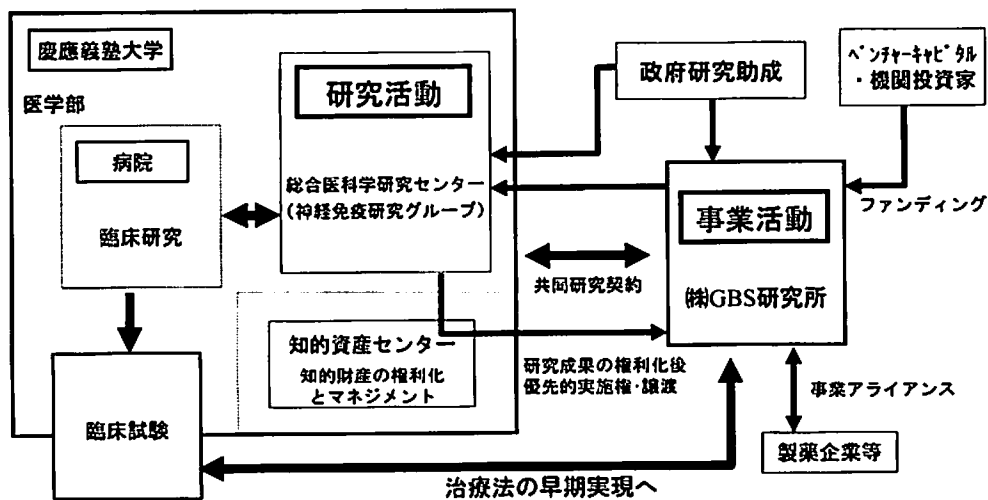


図8：大学発ベンチャーと慶應義塾

大学発ベンチャーの主な事業活動は、投資家や政府などから研究資金を調達し、得られた研究成果に基づく特許を慶應義塾から譲り受け、医薬品企業との提携や特許実施権の付与により対価を得ることである。

的に標的の脳腫瘍を攻撃しうる。細胞性免疫を誘導する抗原特異的な免疫療法は、浸潤性のグリオーマに対する新しい治療戦略として今後の展開が期待される。

#### 4. おわりに

GBS 研究所は、ベンチャーキャピタルからの出資により慶應義塾大学医学部を基盤として設立され、慶應義塾大学知的資産センターのもとで、知的財産の保護や権利化というスキームを描いていただいた(第8図)。大学内で行ってきた我々の研究を臨床研究へ移行するのがこれからの課題であり、この移行部分が非常に重要な点である。大学発ベンチャーの利点として、企業側の立場では、大学の研究基盤を利用して、密な情報ネットワークを使い、研究が推進される点が挙げられる。大学側から考えると、臨床応用を目指して続けられていた研究を大きく推進させるきっかけになる。一方、問題点は大学側と企業側の研究の方向性は、常に一致するわけではない点である。また、創業のベンチャーモデルは、大学からバイオベンチャーがつないで、製薬会社へ移行するというスキームが来ているが、再生医療に関しては、バイオベンチャーの先のスキームがなかなか描けない。しかし、我々の役割として、研究を推進させることが最も重要であり、産業化へ向けた企業としての問題点を克服しつつ、今後も医療へ貢献するための研究を前向きに進めてゆきたい。

#### 謝 辞

研究の遂行にあたり、ご指導、ご協力頂きました植村慶一先生、河瀬斌先生、河上裕先生、岡野栄之先生、戸山芳昭先生、ならびに共同研究者の諸先生方に心より感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD : Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75 : 321-341, 2005
- 2) Hickey WF : Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36 : 118-124, 2001
- 3) Hickey WF : Leukocyte traffic in the central nervous system : the participants and their roles. *Semin Immunol* 11 : 125-137, 1999
- 4) Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller

- SD : Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 105 : 223-231, 2000
- 5) Irani DN : Brain-derived gangliosides induce cell cycle arrest in a murine T cell line. *J Neuroimmunol* 87 : 11-16, 1998
- 6) Hart MN, Fabry Z : CNS antigen presentation. *Trends Neurosci* 18 : 475-481, 1995
- 7) Santambrogio L, Pakaski M, Wong ML, Cipriani B, Brosnan CF, Lees MB, Dorf ME : Antigen presenting capacity of brain microvasculature in altered peptide ligand modulation of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 93 : 81-91, 1999
- 8) GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM : Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403 : 439-444, 2000
- 9) Ishii K, Toda M, Nakai Y, Asou H, Watanabe M, Nakamura M, Yato Y, Fujimura Y, Kawakami Y, Toyama Y, Uyemura K : Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 65 : 500-507, 2001
- 10) Perry VH, Brown MC, Gordon S : The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med* 165 : 1218-1223, 1987
- 11) Zeev-Brann AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T, Schwartz M : Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. *Glia* 23 : 181-190, 1998
- 12) Moalem G, Monsonogo A, Shani Y, Cohen IR, Schwartz M : Differential T cell response in central and peripheral nerve injury : connection with immune privilege. *Faseb J* 13 : 1207-1217, 1999
- 13) Banchereau J, Steinman RM : Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 : 245-252, 1998
- 14) Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M : Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *J Neurosci Res* 76 : 453-465, 2004
- 15) Marchetti B : Cross-talk signals in the CNS : role of neurotrophic and hormonal factors, adhesion molecules and intercellular signaling agents in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-astroglial interactive network. *Front Biosci* 2 : d88-125, 1997
- 16) Mikami Y, Toda M, Watanabe M, Nakamura M, Toyama Y, Kawakami Y : A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. Technical note. *J Neurosurg Spine* 97 : 142-147, 2002
- 17) Celluzzi CM, Welbon C : Dendritic cell culture : a simple closed culture system using ficoll, monocytes, and a table-top centrifuge. *J Hematother Stem Cell*

- Res 12 : 575-585, 2003
- 18) Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J : Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods* 288 : 123-134, 2004
  - 19) McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P : The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 69 : 1531-1574, 1988
  - 20) Breakefield XO, DeLuca NA : Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. *New Biol* 3 : 203-218, 1991
  - 21) Martuza RL : Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. *J Clin Invest* 105 : 841-846, 2000
  - 22) Toda M, Rabkin SD, Martuza RL : Treatment of human breast cancer in a brain metastatic model by G207, a replication-competent multmutated herpes simplex virus 1. *Hum. Gene Ther.* 9 : 2177-2185, 1998
  - 23) Glorioso JC, Bender MA, Goins WF, Fink DJ, DeLuca N : HSV as a gene transfer vector for the nervous system. *Mol Biotechnol* 4 : 87-99, 1995
  - 24) Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL : Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nature Medicine* 1 : 938-943, 1995
  - 25) Hunter WD, Martuza RL, Feigenbaum F, Todo T, Mineta T, Yazaki T, Toda M, Newsome JT, Platenberg RC, Manz HJ, Rabkin SD : Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207 : safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. *J Virol* 73 : 6319-6326, 1999
  - 26) Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL : Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma : results of a phase I trial. *Gene Ther* 7 : 867-874, 2000
  - 27) MacLean AR, ul-Fareed M, Robertson L, Harland J, Brown SM : Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. *J Gen Virol* 72 (Pt 3) : 631-639, 1991
  - 28) Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R, Brown M : Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther* 7 : 859-866, 2000
  - 29) Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, Petty R, Hadley D, Nicoll J, Harland J, Mabbs R, Brown M : The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5 (-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma : a proof of principle study. *Gene Ther* 9 : 398-406, 2002
  - 30) Cassel WA, Murray DR, Phillips HS : A phase II study on the postsurgical management of Stage II malignant melanoma with a Newcastle disease virus oncolysate. *Cancer* 52 : 856-860, 1983
  - 31) Freedman RS, Bowen JM, Herson JH, Wharton JT, Edwards CL, Rutledge FN : Immunotherapy for vulvar carcinoma with virus-modified homologous extracts. *Obstet Gynecol* 62 : 707-714, 1983
  - 32) Boone CW, Paranjpe M, Orme T, Gillette R : Virus-augmented tumor transplantation antigens : evidence for a Helper antigen mechanism. *Int J Cancer* 13 : 543-551, 1974
  - 33) Toda M, Rabkin SD, Kojima H, Martuza RL : Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther* 10 : 385-393, 1999
  - 34) Endo T, Toda M, Watanabe M, Iizuka Y, Kubota T, Kitajima M, Kawakami Y : In situ cancer vaccination with a replication-conditional HSV for the treatment of liver metastasis of colon cancer. *Cancer Gene Ther* 9 : 142-148, 2002
  - 35) Toda M, Martuza RL, Rabkin SD : Combination suicide/cytokine gene therapy as adjuvants to a defective herpes simplex virus-based cancer vaccine. *Gene Ther* 8 : 332-339, 2001
  - 36) Toda M, Martuza RL, Rabkin SD : Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Ther* 2 : 324-329, 2000
  - 37) Toda M, Martuza RL, Kojima H, Rabkin SD : In situ cancer vaccination : an IL-12 defective vector/replication-competent herpes simplex virus combination induces local and systemic antitumor activity. *J. Immunol.* 160 : 4457-4464, 1998
  - 38) Kovacsovic-Bankowski M, Rock KL : A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267 : 243-246, 1995
  - 39) Reis e Sousa C, Germain RN : Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp. Med.* 182 : 841-851, 1995
  - 40) Toda M, Kawakami Y : Cancer vaccination using herpes simplex virus vectors. *Current Topics in Biochemical Research* 1 : 135-143, 1999
  - 41) Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, Ying H, Finger DN,

- Lee PK, Yong WH, Incardona F, Thompson RC, Riedinger MS, Zhang W, Prins RM, Black KL : Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* 61 : 842-847, 2001
- 42) Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ : Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 64 : 4973-4979, 2004
- 43) Toda M, Iizuka Y, Kawase T, Uyemura K, Kawakami Y : Immuno-viral therapy of brain tumors by combination of viral therapy with cancer vaccination using a replication-conditional HSV. *Cancer Gene Ther* 9 : 356-364, 2002
- 44) Toda M : Immuno-viral therapy as a new approach for the treatment of brain tumors. *Drug News Perspect* 16 : 223-229, 2003
- 45) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 : 1643-1647, 1991
- 46) Kawakami Y, Rosenberg SA : Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 16 : 313-339, 1997
- 47) Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A : Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12 : 337-365, 1994
- 48) Rosenberg SA : A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10 : 281-287, 1999
- 49) Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ : A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 : 1914-1918, 1997
- 50) Preuss KD, Zwick C, Bormann C, Neumann F, Pfreundschuh M : Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev* 188 : 43-50, 2002
- 51) Ueda R, Iizuka Y, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Toda M : Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. *Oncogene* 23 : 1420-1427, 2004
- 52) Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H : Pairing SOX off : with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 16 : 182-187, 2000
- 53) Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B : A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J* 17 : 5718-5733, 1998
- 54) Ueda R, Yoshida K, Kawakami Y, Kawase T, Toda M : Immunohistochemical analysis of SOX6 expression in human brain tumors. *Brain Tumor Pathol* 21 : 117-120, 2004
- 55) Ueda R, Yoshida K, Kawakami Y, Kawase T, Toda M : Expression of a transcriptional factor, SOX6, in human gliomas. *Brain Tumor Pathol* 21 : 35-38, 2004
- 56) Toda M : Cancer vaccine for brain tumors and brain tumor antigens. *Cancer Therapy* 2 : 21-26, 2004
- 57) Imaizumi T, Kuramoto T, Matsunaga K, Shichijo S, Yutani S, Shigemori M, Oizumi K, Itoh K : Expression of the tumor-rejection antigen SART1 in brain tumors. *Int J Cancer* 83 : 760-764, 1999
- 58) Liu G, Ying H, Zeng G, Wheeler CJ, Black KL, Yu JS : HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Res* 64 : 4980-4986, 2004
- 59) Ohashi Y, Ueda M, Kawase T, Kawakami Y, Toda M : Identification of an epigenetically silenced gene, RFX1, in human glioma cells using restriction landmark genomic scanning. *Oncogene* 23 : 7772-7779, 2004
- 60) Iizuka Y, Suzuki A, Kawakami Y, Toda M : Augmentation of antitumor immune responses by multiple intratumoral inoculations of replication-conditional HSV and interleukin-12. *J Immunother* 27 : 92-98, 2004
- 61) Iizuka Y, Kojima H, Kobata T, Kawase T, Kawakami Y, Toda M : Identification of a glioma antigen, GARC-1, using cytotoxic T lymphocytes induced by HSV cancer vaccine. *Int J Cancer*, (in press)
- 62) Uchida N, Tsunoda T, Wada S, Furukawa Y, Nakamura Y, Tahara H : Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 10 : 8577-8586, 2004
- 63) Toda M, Iizuka Y, Yu W, Imai T, Ikeda E, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Okano H, Uyemura K : Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas. *Glia* 34 : 1-7, 2001

講 座

## 不妊治療

### —生殖補助医療技術の可能性と限界—

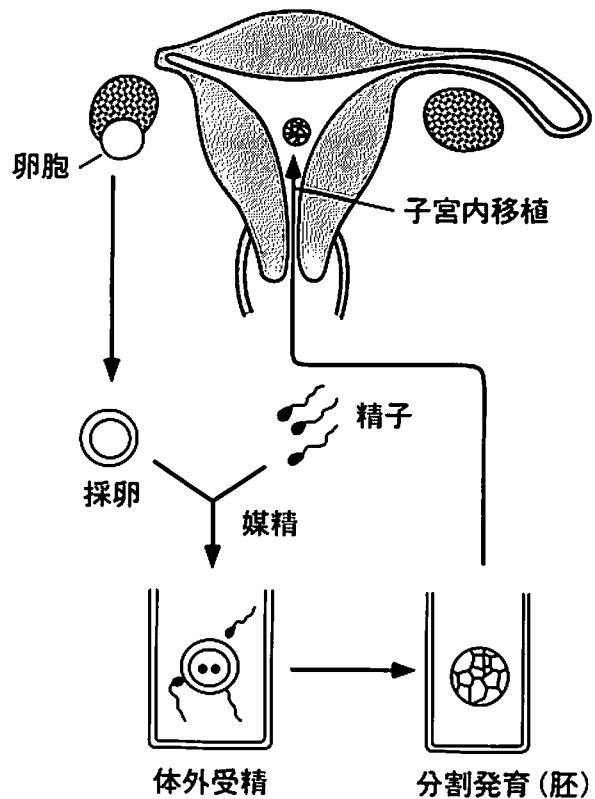
市川 ART クリニック

お だ たか ひさ  
小 田 高 久

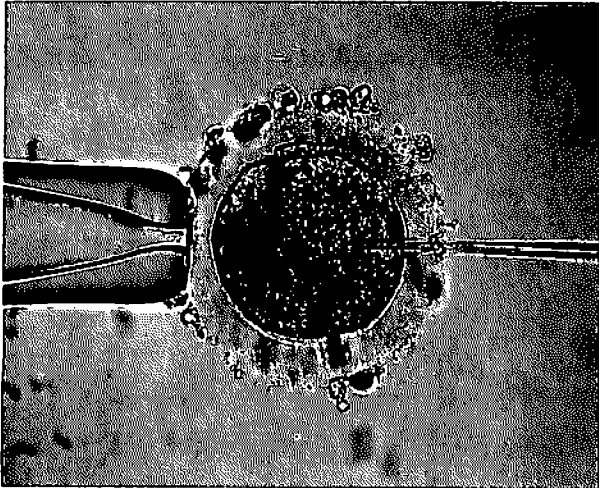
**Key Words :** infertility, aging, assisted reproductive technology, *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection

1978年、英国において世界で最初の体外受精 (*in vitro* fertilization ; IVF) による児が出生した。本邦では1982年に東北大学において、次いで慶應義塾大学・東京歯科大学グループによる体外受精児が誕生し、その後、1988年に慶應義塾大学・東京歯科大学グループが日本で最初に凍結受精卵(胚)による妊娠・出産に成功した。体外受精とは、受精と胚発育の場である卵管が機能を失った場合に、体外のいわゆる試験管(実際には培養皿)の中で受精させ、受精卵(胚)を子宮腔に直接移植するものである(第1図)。すなわち卵管性不妊が第一義的な適応であったが、その後の目覚ましい技術の進歩に伴い、ほとんど全ての不妊症の最終的治療法として応用されるに至った。しかし高度乏精子症などの重症男性不妊は体外受精によっても受精は期待できず、顕微授精法、特に1個の精子を直接卵細胞質内に注入する卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection ; ICSI)の確立まで待つこととなった(第2図)。

体外受精とその関連技術は生殖補助医療技術(assisted reproductive technology ; ART)と総称されるが、このARTの確立はやはり不妊診療の革命であったといえる。ART以前の不妊治療の成績は悲惨なもので、ただ根気だけが頼りの、ストレスに満ちた、希望の見えない時代が続いた。男性不妊の代表的治療法であった子宮内人工授精(intrauterine insemination : IUI)の成績は報告によりかなり異なるが、授精周期あたりの妊娠率は、自然排卵周期で0~21%であり、排卵卵子の



第1図 体外受精・胚移植  
排卵直前の卵胞を穿刺・吸引して卵子を採取する(採卵)。体外において媒精(授精)し、培養する(体外受精)。胚を子宮腔内に移植する(胚移植)。



第2図 卵細胞質内精子注入法 (ICSI)

中央にあるのが卵子 (直径 0.1 mm) で、卵細胞は透明帯に囲まれており、12時の位置に極体がある。透明帯には顆粒膜細胞が付着している。左からのホールディングピペット (外形 95 μm) により卵子を固定し、右から精子を注入するインジェクションピペット (内径 4~6 μm) を卵細胞質に穿刺している。

機能を高めるために排卵誘発剤であるクエン酸クロミフェン (clomiphene citrate) やヒト閉経性性腺刺激ホルモン (human menopausal gonadotropin ; hMG) を併用しても、前者が3~12%、後者が3~25%に過ぎなかった<sup>1)</sup>。市川 ART クリニック (以下当院) の705症例・1686周期の IUI の妊娠率は、授精周期あたり 5.6%、患者あたり 13.5%であり (第1表)、精液所見が WHO の基準 (精子濃度 2000×10<sup>6</sup>/ml, 精子運動率 50%)

を満たさない不良症例に限ると、授精周期あたり 3.5%、患者あたり 8.0%と極めて低かった。これは著者の1984年の成績 (授精周期あたり 5.7%)<sup>2)</sup>と変わらず、対象患者の年齢がかなり高くなった点を考慮しても、20年近くほとんど向上がみられていない。一方、日本産科婦人科学会の集計による本邦の体外受精の採卵周期あたりの妊娠率は、1985年までは5.4%に過ぎなかったが<sup>3)</sup>、1990年代には15.8~19.7%となり、2003年には23.0%に達した<sup>4)</sup>。

従来の不妊治療と異なり、ARTは一定の成績が期待できることから急速に普及した。1986年の1年間では日本全体で622人がARTによる治療を受けたに過ぎなかったが、2003年には患者数52,049人、治療回数77,446周期、採卵回数73,143回に及んだ。これはARTが技術の進歩により確実に安全な治療法として確立されたためだけでなく、この20年の間に「試験管ベビー」というSF的なものから、当たり前の治療として多くの人に認知されたことによる。このような背景から、児を望むカップルは希望に満ちて不妊専門医院の扉をたたたくが、ARTの現実と接したとき少なからず落胆する。そこには加齢による妊孕性の低下という、先進医療でも打ち破れない壁が待ち受けている。

### 妊娠成立の条件

性成熟期の女性は、約1カ月に1回、1個の成熟した卵子を排卵する。排卵卵子は直ちに卵管に取り込まれ、腔から子宮腔内を上行して卵管に到達した精子と接触し、受精が成立する。受精とは、母親となる女性の遺伝情報を持った卵子と、父親となる男性の遺伝情報を持った精

第1表：配偶者間子宮内人工授精 (IUI) と卵巣刺激

卵巣刺激法	症例数	IUI 周期数	妊 娠 周期数	妊 娠 率 (%) 症例当たり	妊 娠 率 (%) 周期当たり
無し (自然排卵)	164	306	9	5.5	2.9
CC	295	714	38	12.9	5.3
CC-hMG	246	666	48	19.5	7.2
全体	705	1686	95	13.5	5.6

市川 ART クリニック 2000年1月~2003年2月

IUI : intrauterine insemination

CC : clomiphene citrate

hMG : human menopausal gonadotropin



子が融合し、接合子を形成することであり、精子と卵子が接触することに始まり、精子と卵子の核が融合して両者の染色体が混合して終了する。卵管膨大部で受精した受精卵は、細胞分裂（分割発育）を繰り返しながら子宮腔内に達し、受精後6～7日には胞胚となり子宮内膜に侵入する。このように子宮壁との間に器質的な結合が成立した状態を着床といい、妊娠は着床の成立をもって開始する。この一連の過程が正常に進行して初めて妊娠が成立するが、そのための条件には以下のようなものがある。

- ①良好な運動能と受精能を有する十分な数の精子が腔内に射精される。
- ②卵胞および卵子が正常に発育し、十分な機能（受精発育能）を有する卵が排卵する。排卵があっても、その卵子が十分に成熟し、受精分割能を有しているとは限らない。また腔に射精された精子は、卵胞ホルモンの作用により子宮頸管から分泌される粘液を通して子宮腔に達する。卵胞成熟が不十分で卵胞ホルモンが不足すると、頸管粘液の減少により精子の上行が妨げられる。
- ③卵管の形態および機能が正常に保たれている。精子が卵管を上行し、受精卵が子宮に運ばれるためには、卵管の疎通性が不可欠である。また癒着などにより卵管の運動が障害されれば、排卵卵子を捕獲することができない。さらに卵管内が受精および分割発育に適した環境に保たれていなければならない。
- ④胚の着床とその維持のために、子宮の形態および機能が正常である。着床の場である子宮内膜は周期的変化を繰り返しており、卵胞ホルモンや黄体ホルモンのダイナミックな変化を反映して、組織学的および機能的変化を遂げる。着床は胚と子宮内膜の相互作用を基本として成立するが、そこには多くの因子が関与している。

## ヒトの妊孕性

妊娠成立の条件が全て満たされ、性交のタイミングが合えば必ず妊娠するのであろうか。その答はNOである。ヒトは非常に生殖効率の低い種であり、排卵卵子が精子と遭遇しても、着床前に40%が、着床後に37%が淘汰され、出産に至るのは23%に過ぎない<sup>9)</sup>。この生殖効率の低さは、主に配偶子および受精卵の機能異常と染色体異常に起因している。染色体異常出現率は、ヒト未受精卵では20～26%、精子では11～16%、初期胚では31～61%（正常発育胚31～55%、発育異常胚61%）と報告されている。

そして女性の年齢と卵の染色体異常の発生頻度には正の相関があり、40歳以上では70～90%にまで達するとの報告もある。さらに加齢により卵子の機能が低下し、受精・胚発育が障害される。不妊治療の中で1治療周期の妊娠率が最も高いのが体外受精および顕微授精であるが、本院のその年齢別成績では（第2表）、32歳、36歳、43歳に妊娠率低下のターニングポイントが認められた。この成績より推測すると、1個の形態学的に良好な胚の着床の可能性は、20歳代では約40%、30歳代前半では30%、後半では20%程度であり、40歳代では10%以下となる。加齢に伴う妊孕性の低下は、ovarian reserve（卵巣に存在する卵胞・卵子の数）の減少、異常卵の増加、卵の機能低下に起因している。

## 不妊の原因

前記の妊娠成立の条件が継続して満たされないと不妊症となるが、挙児を希望して1年以内に妊娠するカップルは3/4、次の1年間では残りの1/2に過ぎず、10%以上が2年を経過しても妊娠に至らない。不妊の原因を大きく分けると、女性側の因子が40%、男性側の因子

第2表：体外受精/顕微授精の成績

年齢 (歳)	採卵 周期数	移植 周期数	妊娠 周期数	妊娠率(%) 採卵当たり	妊娠率(%) 胚移植当たり
26～31	71	64	45	63.4	70.3
32～35	144	123	69	47.9	56.1
36～42	302	252	84	27.8	33.3
43～46	48	40	6	12.5	15.0
全体	565	479	204	36.1	42.6

市川ARTクリニック 2000年1月～2005年3月（移植胚は2個以下）

第3表：不妊原因と体外受精/顕微授精の成績

不妊原因*	採卵当たり妊娠率 (%)
卵管因子単独	48.9
卵管因子+卵巣機能障害 <sup>†</sup>	20.0
卵管因子+男性因子 <sup>‡</sup>	25.0
男性因子単独	41.2
男性因子+卵巣機能障害 <sup>†</sup>	22.5
子宮内膜症±卵管因子	27.8
精子不動化抗体陽性	80.0
原因不明±卵巣機能障害 <sup>†</sup>	27.6

市川 ART クリニック 2000年1月～2003年4月

\*10周期以下の原因は除外

<sup>†</sup>無排卵・遅発排卵・黄体機能不全

<sup>‡</sup>全て顕微授精によらない体外受精

が25%、両者に原因がある場合が25%、原因不明が10%である。近年のARTの進歩により、以前は拳児を諦めていた重症不妊の多くが治療可能となった。両側の卵管を摘出したものは、20年前までは絶対的不妊であったが、体外受精により児を得ることができるようになった。さらに高度男性不妊であっても、僅かでも造精機能があれば顕微授精により妊娠が可能となった。

治療周期あたりの妊娠率が最も高い体外受精/顕微授精の成績から、不妊の原因と妊娠の可能性を検討してみた(第3表)。表の「卵管因子単独」とは、不妊の原因と考えられる因子が卵管障害のみで、他には異常が認められない例を指す。卵巣機能障害とは、無排卵・遅発排卵・黄体機能不全などの卵巣機能不全と加齢によると思われる卵巣機能低下を意味し、「卵管因子+卵巣機能障害」は卵管障害に卵巣機能障害が合併しているものである。精子不動化抗体とは抗精子抗体の一種で、この抗体を有する女性は不妊となり、有効な治療は体外受精のみである。表のように不妊原因が単一で明らかなもの(卵管因子単独、男性因子単独、抗精子抗体陽性)では高い妊娠率が得られているが、卵巣機能障害や子宮内膜症などを合併すると成績は不良となる。これは体外受精による妊娠の可能性は、良好な発育能を有する胚(受精卵)を移植できるか否かにかかっているためである。このような胚は十分な機能をもった成熟卵からのみ由来するが、もともと卵胞発育や排卵の異常があると、良好な成熟卵を採取できない頻度が高くなる。子宮内膜症は、進行すると卵管癒着などにより不妊となるだけでなく、初期の段階でも卵胞・卵子の発育・成熟が障害される。そのため採取される良好卵子の数が減少し、妊娠の可能性が低下する。なお「男性因子単独」のほとんどが顕微授精に

よるものであり、「卵管因子+男性因子」は全て顕微授精によらない普通の体外受精の症例である。後者は卵管因子を適応として体外受精を行ったが、乏精子症・精子無力症があったため受精率が低下し、その結果として「卵管因子単独」や「男性因子単独」よりも妊娠率が低くなったと考えられる。

体外受精/顕微授精では複数の成熟卵子を採取するために、排卵誘発剤による過排卵刺激を行う。この方法には様々なものがあり、加齢によらない卵巣機能障害例では過排卵刺激法を工夫することにより良好な卵子を採取できるようになることが多い。しかし加齢による採取卵数の減少と卵子の機能低下は、いかなる方法でもそれを改善することは困難である。すなわち不妊の原因によらず、治療として最終段階の体外受精/顕微授精などのARTまで選択するなら、妊娠の可能性は女性の年齢に依存する。

今まで述べなかったが、不妊原因にはもう一つ「着床障害」がある。子宮筋腫などにより子宮内腔に変形がある場合には着床の障害が疑われ、手術療法により改善が期待できる。しかし着床の機序はいまだブラックボックスであり、機能的な着床障害というものが存在するか否かは不明である。ARTにより発育良好胚を4～5回子宮内に移植しても妊娠しない場合に、初めて着床障害の可能性が浮かび上がる。そしてもしこのような機能的な着床障害があったとしても、現時点では有効な治療法は存在しない。

### 不妊治療の基本

治療には大きく分けて、「異常に対する治療」と「妊娠の確率を高めるための治療」の2種類がある。例えば排卵がない場合には(無排卵症)、排卵を起こさなければ絶対に妊娠せず、これに対する治療(排卵誘発)は「異常に対する治療」となる。前述したようにヒトは非常に生殖効率の低い種であり、異常のない夫婦が妊娠を望んで排卵の時期に性交をもつようにした場合、妊娠するまでに平均6ヶ月かかる。また全く異常のないカップルはほとんどなく、例えばある程度規則的に排卵のある女性でも、卵巣の機能が常に十分に保たれているわけではなく、不十分な周期が必ず混在する。もし卵巣機能が十分な周期とそうでない周期が1ヶ月おきにあるとすると、妊娠の可能性は1/2になり、前に述べた平均6ヶ月の倍、すなわち妊娠するまでに1年かかることになる。もし精子の運動が不十分で妊娠の可能性が正常の1/2だとすると、妊娠までにさらに倍の期間、2年かかる。

また例えば右の卵管が正常で、左の卵管に異常があるとすると、妊娠の可能性はさらに半分に、妊娠まで4年かかることになる。このような場合、卵巣・卵子の機能を常に良好にする治療を行えば妊娠までの期間を半分に短縮することができ、さらに精子の運動不良に対する補助的な治療として人工授精を併用すれば、妊娠の確率はさらに高まる。このような治療が「妊娠の確率を高めるための治療」である。

治療には排卵のタイミングを合わせる簡単なものから、最終的な治療法である体外受精/顕微授精まで様々なものがあり、負担の少ない方法から始めて、妊娠しなければ次の段階の治療へとステップ・アップしていくのが一般的である。ただ異常がなくとも妊娠するまでに平均6ヶ月かかるという点から、一つの治療が有効か否かを判定するには6周期くらい行わなければならない。治療にはかなり根気がいるのはヒトの生殖効率の低さに由来している。

### 治療方法と成績

当院において不妊症患者がどのような治療により妊娠したかを第4表にまとめた。表の治療法は妊娠成立した周期の治療法を示したもので、それ以前に行った子宮筋腫や子宮内膜症などの手術療法、男性不妊に対する薬物療法などは考慮していない。治療は、卵胞の発育を促進して卵子の機能を改善するための卵巣刺激法と授精・受精のための手技によって分けられる。

妊娠成立の最大のポイントは卵子の機能である。卵巣

刺激法「無し」とはいわゆる排卵誘発剤を投与しない自然の排卵周期であり、排卵卵子の機能が保たれている場合のみ妊娠が期待できる。他は排卵誘発剤を投与した周期であり、無排卵の場合は排卵誘発療法となるが、自然排卵のある例では卵子の機能を高める意味がある。第1段階がクエン酸クロミフェン (CC) であり、次がクロミフェンに性腺刺激ホルモンである卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone ; FSH) 作用のあるhMGを追加する方法、あるいはhMG単独法である。クロミフェンは抗エストロゲン作用を有しており、下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌を促すことにより卵胞を発育させる。hMGはそのFSH作用により直接卵胞を発育させるだけでなく、卵胞の顆粒膜細胞の変性を抑制することにより卵子の機能を高める。なお、これらの薬剤を投与すると複数の卵胞が発育するため、多胎妊娠の頻度が高くなる。双胎妊娠は自然排卵周期では約1.5%に起こるが、クロミフェン単独周期では5%程度に、hMG単独では20%にまで増加する。このためクロミフェン-hMGあるいはhMG単独法は、妊孕性の高い若年女性では十分な配慮が必要であり、発育する卵胞が少なく、卵子の機能も低下した高齢女性が主に適応となる。卵子の成熟・機能を最も高める方法は、性腺刺激ホルモン放出ホルモンアゴニスト (gonadotropin releasing-hormone agonist ; GnRHa) により下垂体からの黄体化ホルモン (luteinizing hormone ; LH) 分泌を抑制した後にhMGを投与するものである。この方法では多数の卵胞が発育するため、多胎妊娠や卵巣過剰刺激症候群のリスクが非常に高くなる。

第4表：治療法と妊娠

卵巣刺激法	授精・受精法別妊娠例数 (全妊娠に占める割合)				
	TI	IUI	cIVF	ICSI	計
無し (自然排卵)	188 (24.4%)	24 ( 3.1%)			212 (27.6%)
CC	132 (17.2%)	70 ( 9.1%)			202 (26.3%)
CC-hMG or hMG	14 ( 1.8%)	95 (12.4%)			109 (14.2%)
その他	9 ( 1.2%)	3 ( 0.4%)			12 ( 1.6%)
GnRHa-hMG			154 (20.0%)	80 (10.4%)	234 (30.4%)
計	343 (44.6%)	192 (25.0%)	154 (20.0%)	80 (10.4%)	769 (100%)

市川 ART クリニック 1999年～2004年

TI : timed intercourse (予測排卵日の性交)

IUI : intrauterine insemination (子宮内人工授精)

cIVF : conventional *in vitro* fertilization (顕微授精によらない体外受精)

ICSI : intracytoplasmic sperm injection (卵細胞質内精子注入法による顕微授精)

CC : clomiphene citrate

hMG : human menopausal gonadotropin

GnRHa : gonadotropin releasing-hormone agonist

授精 (insemination, 媒精ともいう) とは受精 (fertilization) の場あるいはその近くに精子を授ける (送り届ける) ことであるが、「授精・受精法」には、まず予測排卵日に性交をもつ方法 (timed intercourse; TI) と精液から運動良好精子を選別・濃縮して子宮内に注入する子宮内人工授精 (IUI) がある。比較的軽症例では排卵のタイミングをみる (TI) だけで妊娠し、次の段階の卵子の成熟・機能を改善するためのクロミフェン投与 (無排卵症も含む) と TI でも多くが妊娠に至っている。なお卵巣刺激の有無にかかわらず、ほとんどの例で排卵のタイミングをとるために、排卵のトリガーである LH サージの代用としてヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin; hCG) を投与している。男性不妊ではまずは IUI が行われるが、卵巣刺激を行わない周期での妊娠は射精障害・性交障害や不妊期間の短い症例に限られる。クロミフェン-IUI は、卵巣刺激なしの IUI の次の段階として選択されるだけでなく、クロミフェン-TI から移行する場合も多くある。クロミフェンの抗エストロゲン作用により腔に射精された精子が子宮腔に遡上するために不可欠な頸管粘液が減少し、その結果としてしばしば IUI が必要となる。クロミフェン単独では卵子の機能が不十分と推測される場合に hMG が追加されるが、TI よりも IUI 妊娠が圧倒的に多いのは、ほとんどがクロミフェン-IUI の次の段階の治療として選択されるという流れのためである。なお卵巣刺激法の「その他」には高プロラクチン血症に対するドーパミン作動薬療法などがある。

卵管障害には体外受精 (顕微授精によらないものを conventional IVF; cIVF と呼ぶことがある) が、高度男性不妊には顕微授精 (ICSI) が適応となるが、この治療には多数の成熟卵子を採取するための卵巣刺激が不可欠である。以前はクロミフェン単独法やクロミフェン-hMG 法が用いられたが<sup>6)</sup>、これらの方法では卵子の機能が不十分なためなどの理由から、現在では GnRHa-hMG 法が汎用されている<sup>7)</sup>。卵管や精液所見には異常がなく、卵子の機能に不妊原因があると推測される場合には、前述のようにクロミフェン、hMG が投与されるが、最も機能の高い成熟卵子が排卵される方法は GnRHa-hMG 法である。これにより TI あるいは IUI を行えば非常に高い妊娠率が期待できるが、多胎妊娠と卵巣過剰刺激症候群のリスクのため、よほどの高齢女性でない限り採用することはきかない。卵子の機能を高める究極の GnRHa-hMG 法では、卵胞・卵子の吸引と移植胚数の制限によりこのリスクを回避すること、すなわち体外受精が不可欠となる。

第4表のように、卵巣刺激法「無し」、すなわち卵子に対する治療を行わずに妊娠したものは28%に過ぎなかった。一方「授精・受精法」をみると、なんら処置を施さない性交 (TI) による妊娠が45%に達する。人工授精 (IUI) による妊娠は25%、体外受精 cIVF/顕微授精 ICSI などの ART による妊娠は30%であるが、もちろん治療患者数・治療周期数は ART によらないものが圧倒的に多い。前述のように IUI の授精周期当たりの妊娠率は5.6%であるのに対し、ART の採卵当たりの妊娠率は36.1%であり、1治療周期あたりの妊娠率は ART がはるかに高い。しかし、体外受精/顕微授精は1年間に最大でも3~4回しか受けることができないが、一般の治療ならば1年間に10周期以上の実施が可能である。したがって、体外受精/顕微授精は1年間の妊娠率が最も高い方法とはいえない可能性がある。

### 治療と患者の理解

第4表は当院の開院から2004年末までの妊娠例をまとめたものであるが、同期間に不妊を主訴に来院した患者は1,600組近くであり、妊娠例は来院患者の半数に過ぎない。約20%の患者が数回受診したのみで来院しなくなり、初診から1年を過ぎても治療に通院している者は3割程度にまで減少する。初診時に、①できるだけ自然に近い方法で妊娠したい、②人工授精までなら行ってもよい、③最終的には体外受精まで考えている、④今は何も考えていない、の中から治療の希望を選択してもらっているが、多くが①を希望しており、②の人工授精でさえ少数に留まる。

かなりの数の患者が十分な治療を受けずに通院しなくなっているが、それは仕事のために通院できない場合や経済的理由もあるが、患者自身の描いていた検査・治療のイメージが実際と乖離していることが原因となることが多い。「排卵誘発剤」イコール副作用という誤解、「人工」という言葉や精子・卵子を取り扱うことへの抵抗感を取り除くことは容易ではない。

治療は負担の少ない方法から始めてステップ・アップしていくが、前述したようにヒトの生殖効率の低さから、一つの治療が有効か否かを判定するには6周期くらい行わなければならない。根気が続かず早い段階で脱落する者、次の段階の治療に躊躇する者が少なくない。また、高度な治療と考えられている人工授精や体外受精/顕微授精などの ART に対する過度な期待が、妊娠しなかったときの失望を大きくする結果、治療の継続が困難となることもある。20歳代では80%近くが1回目の体外受

精/顕微授精により妊娠するが、45歳前後の女性では5回目くらいに妊娠すれば幸運といえる。「できるだけ自然に近い方法で妊娠したい」、あるいは「高度な治療によりできるだけ短期間に妊娠したい」という願望は当然であろうが、どのような治療法を選択するにせよ、ヒトの妊娠成立の不確実性を理解できなければ目的地までたどり着くことはできない。

## 現代社会と不妊

卵胞発育、排卵、黄体形成などの卵巣の一連の機能は、視床下部・下垂体により制御されているが、この視床下部・下垂体系は生命維持に不可欠な内分泌器官の中核であり、さらにストレスの主要な伝達・反応経路でもある。このため、もし高度のストレスにさらされると、性腺刺激ホルモン分泌が低下し、卵胞発育あるいは造精機能が障害される。環境の変化あるいは人間関係などの精神的ストレスにより、卵巣機能不全を来す女性にしばしば遭遇する。また若い女性が美容のために過度に減量すると、排卵が停止して無月経となる。このようなストレスが長期間持続すると、それが取り除かれても卵巣機能は回復しない。現代社会にはストレスが山積しており、それとうまくつき合う方法を会得しなければ、不妊症の仲間入りをすることになる。

近年の女性の晩婚化は周知のとおりである。加齢に伴い妊孕性が低下し、30歳代後半女性の不妊率は20歳代前半の5～6倍であると推計されている。この理由としての卵子の機能低下、異常卵の増加、ovarian reserveの減少は前述したとおりである。また35歳の女性の半数に子宮筋腫があり、さらに子宮内膜症による不妊が増加しているといわれている。子宮内膜症とは、子宮内膜組織が卵巣、卵管あるいは子宮周囲などに存在し、月経時にその異所性子宮内膜から出血を来し、進行すれば卵管の通過障害を引き起こす。これは30歳前後に発症し、月経のある間は徐々に進行するが、妊娠あるいは授乳中は月経がないため軽快する。昔の日本女性は20歳頃に結婚し、妊娠・分娩・授乳を何回か繰り返し、さらに授乳期間も長かったため、長期間生理的に排卵・月経が抑制されていた。したがって、このような女性は子宮内膜症とは無縁であったといえる。近年の晩婚化、少産化の傾向が、子宮内膜症を女性にとっての重大な疾患としてしまった。

現代では性に対する価値観の変化から、結婚前に複数の異性と性交渉を持つことに抵抗感がなくなっている。近年、梅毒や淋病などのいわゆる性病は激減したが、性

交により感染する疾患としてクラミジア感染症が注目されている。その既往歴のない女性の中にも、クラミジア抗体陽性のものが高率に認められ、不妊患者の陽性率は20%以上であるとの報告もある。クラミジアは卵管に炎症を起こし、不妊や子宮外妊娠の原因となる。このように現代社会には、多くの不妊の危険因子が存在していることを認識しなければならない。

## おわりに

本邦におけるARTにより妊娠・出生した児の数は、1988年までの累計は211人であったが<sup>3)</sup>、1990年に初めて年間1,000人を越し、1998年には11,119人となった。2003年の1年間の治療による出生児は17,400人(累計117,589人)に達したが<sup>4)</sup>、これは日本の年間出生数の1.6%に相当しており、生まれた子供の64人に1人がARTによる妊娠であった。これは驚異的な数字であり、ARTの輝かしい成果と喜ぶべきかもしれないが、約30万人が不妊治療を受けている現状を考えると、不妊専門医としては無力感の方が大きい。

1990年の合計特殊出生率(1人の女性が一生涯に産む子供の数)「1.57ショック」によりクローズアップされた少子化傾向には歯止めがかからず、2004年には1.29、出生率(人口1000対)8.8にまで低下した。戦後の第1次ベビーブームで270万人、第2次ベビーブームで209万人であった年間の出生数は、2004年には110万人となってしまった。これには様々な要因があろうが、子供を切望する人が多数いる反面、望まない女性が増えている現代の価値観を反映していると思われる。自分自身の人生設計に従って30歳代後半から、場合によっては40歳を過ぎてから初めて不妊治療に訪れる人が少なからずいる。加齢に起因する妊孕性の低下に対する治療法は未だ存在せず、最先端のARTであっても無力である。女性が一生の間に排卵する卵子は、その女性が胎児の時期に全て卵巣内に出現しており、思春期になって排卵が開始するまで未熟な状態で眠っている。卵子の数(ovarian reserve)は胎児期では600万個にも達するが、思春期には30万個にまで減少している。30歳以降ではその減少が加速するだけでなく、異常卵の増加と機能低下、すなわち卵子の老化が顕著になる。数年後には人口が減少に転ずる日本の未来を考える時、不妊専門医は医療技術の進歩を誇らしげに宣伝するのではなく、ヒトの妊娠成立の不確実性を広く一般社会に啓蒙し、人生設計の再考を促す責務を負っているのかもしれない。

文 献

- 1) Dodson WC, Haney AF : Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. *Fertil Steril* 55 : 457-467, 1991
- 2) 小田高久, 吉村慎一, 角 ゆかり : AIH, IVF よりみた男性不妊の妊娠限界に関する一考察. 受精・着床 '85. 学会誌刊行センター, p146-150, 1986
- 3) 森崇英 : 生殖医学に関する委員会報告. *日産婦誌*, 42 : 393-397, 1990
- 4) 久保春海, 小田高久, 斉藤英和, 鈴木薫, 平川俊夫, 澤倫太郎, 杉浦真弓, 高桑好一, 阪埜浩司 : 平成16年度倫理委員会・登録・調査小委員会報告. *日産婦誌*, 57 : 1601-1629, 2005
- 5) Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF et al : Early embryonic mortality in women. *Fert Steril* 38 : 447-453, 1982
- 6) 小田高久, 吉村慎一, 角 ゆかり, 飯塚理八 : Clomiphene-hMG 卵巣刺激法による体外受精・胚移植法の検討. *日産婦誌*, 3 : 2059-2066, 1985
- 7) Akaboshi K, Oda T, Yoshida Y, Kohriyama S, Miyazaki T, Yoshimura, Y : The effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on androstenedione production and follicular development during controlled ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genetics* 15 : 478-484, 1998

## 医師と業務上のストレス

筆者は約2年前から企業の産業医として働いている。一般企業では、職場ストレスの問題が重要課題として取り上げられ、取り組みが行われている。企業について言われている職場のストレスに関する一般論を医師の職場についてあてはめてみると、医師、特に病院勤務医の勤務には様々な職場ストレス要因があることが分かる。筆者はメンタルヘルスの専門家ではないが、これまで、医師の職場ストレスについては取り上げられる事が少なかったと思われるので、以下にそれを列挙してみたい。

(1)長時間労働：長時間労働は業務上のストレス要因である。時間外労働が月45時間を越えて、長くなればなるほど業務と脳・心臓疾患の発症との関連性が強まるというのが現在の一般的な考え方である。この場合の時間外労働とは、1週間あたり40時間を超えて行う労働のことである。朝早くから仕事を始めれば、その時間も労働時間である。土曜や日曜・休日に仕事をすれば、それも労働時間として加算する。労働時間が週40時間を超えれば、時間外労働として加算する。それが45時間を超えると、業務と脳・心臓疾患の発症との関連性が強まるということである。

医療現場について考えてみると、病院勤務医は、朝早くから夜遅くまで働き、土曜や日曜も働く。「当直」と称する夜間・休日勤務があり、それを行っても平日の勤務は同様に行われる。

現在、このような勤務を従業員に強いている一般企業はあまりない。夜間に業務を続ける必要がある職場は交替制勤務とすることが一般的である。日曜に勤務する事が常である職場では、日曜出勤の場合に別の日が休日になる仕組みができてきている事が多い。

(2)不規則な勤務：単に長時間というだけでなく、勤務が不規則であると、ストレス要因として強くなる。医師は、重症患者の診療や予期せぬ事態の出現などによって予定外に夜遅くまで勤務する事が多い。一度帰宅しても深夜や休日に呼び出される。遠くに出かけていても移動中でも呼び返される。まさに不規則な勤務の連続である。勤務の不規則性は以前から同様に見えるが実は悪化している。携帯電話もポケットベルもなかった時代には、電車や車で移動中や、買い物・レクリエーションなどで外出しているときなどには呼ぶ方法がなかったため、結果として呼ばれなかったはずである。現在は、便利になった反面、ストレスは増えているこ

とを理解する必要がある。

(3)拘束時間の長い勤務：一般に、実際に労働していなくても、勤務に付随して拘束性が強い場合はストレス要因となるとされている。これを医師の勤務について考えると、当直でなくても、病院近傍にいないければならない「オンコール」は強いストレスとなることが理解できる。重症患者の受け持ち医となって、病院の近くにいる必要があれば同様である。ある専門領域の医師が1人しかいない（いわゆる1人医長）ため、他の医師に任せて仕事から解放されることがない状況が続けば、実際に労働していなくても拘束時間は長いいため、ストレス要因となる。

(4)仕事の裁量度（仕事のコントロール）：仕事のストレスは、仕事の「きつさ」の要因のみならず、仕事の裁量度の広さ（仕事のコントロール）によっても、程度が異なる。仕事がついだけでなく、裁量度が低い場合に、最も精神的緊張が高く、疾病のリスクが高くなる。これは仕事要求度-コントロールモデルと呼ばれる。医師の仕事は、一見自分で裁量できる範囲が広いように見えるが実際は違う。外来診療は終わるまで続けなければならない。診療を断ることはできない。手術・処置なども必要に迫られれば好むと好まざるに関らず行うことになり、医師の都合で後日に回すことはできない。手術や処置を始めたなら途中でやめられない。すなわち、医師の業務は、仕事の始まりを自分で決める事は出来ず、何をやるかは状況によって決められてしまい、いつ仕事が終わるかは自分では決められない。一度仕事が終わっても次の仕事がついつ始まるかを自分では決められない。すなわち、裁量度が低いと考えられる。

(5)職場の上司・同僚からのサポート：一般に、職場の上司・同僚からのサポートが得られると職場ストレスによる影響が緩和される。サポートが得られないと心身への影響が強くなる。医師自身が自分たちの職場ストレスについての理解が必ずしも充分でなく、そのため、同僚や部下に対するサポートが適切ではない場合がかなりある。一般企業では、一般従業員のみならず管理職にもメンタルヘルス教育を行い、改善をめざしているが、病院の医師・管理職に対しては、職場のメンタルヘルスに関する教育はあまり行われていないと思われる。医師の職場のストレスが近年増加している事を理解せず、ストレスを感じている同僚の医師に向かって「他の医師はやっている。だから、君もがんばって

同じようにやれ」などと言う医師は、職場ストレスの原因そのものである。管理職の医師が、「昔から医師の勤務がきついのはあたりまえだ。楽をしようとせず、君が病院や社会に対してどう貢献するのかを考えてがんばれ。」などと言うと、現場で働く医師のストレスはさらに増大する。

(6)責任が重大な仕事：一般に、責任が重大な仕事はストレスが大きい。医師の責任が重大であることは言うまでもない。1人の医師に毎日、1日24時間、全てのせ責任がかかる制度は、ストレスが多いと考えられる。

(7)仕事上の出来事：仕事上での事故の経験や、仕事上のミスなどはストレスとなる。さらに仕事上の事故に関し責任を問われるとより大きなストレスとなる。医療の分野では近年、民事訴訟が多く、さらに、わが国では刑事責任を問われる事まで頻発している。12~13年位前までは、訴訟ということは話題にはなっても、自分の周囲に生じたり実際に自分自身に関ったりする事は少なかった。故意による「事件」でない限り、刑事責任を問われる事はほとんどなかった。最近では多くの医師が訴訟に関係した経験を持っていると思われる。自分自身では訴訟に関係していなくても、勤務している病院の同僚あるいは知り合いの医師などが訴訟に関係したという経験がない医師の方が少ないであろう。非典型的な病態や稀な疾患に遭遇した場合や、危険を伴う処置をしなければならぬ状況になって、結果が悪ければ、刑事責任を問われる可能性がある。

これらの医療事故や医事紛争の増加は医師にとってストレスとなっていることを認識する必要がある。医事紛争などが起こらないよう、誠実に医療を行う事は重要だが、誠実さを持って仕事をする事によってストレスがなくなるわけではない。一般の企業では、産業医が従業員に対して「ストレスに気づいたら心身の休養が必要だ。」と指導している。強いストレスを受けている従業員に、産業医が、誠意をもって努力して勤務するよう指導する事はない。

上記のように、医師の職場環境は単に長時間勤務であるというだけでなく、それ以外の様々なストレス要因に満ちており、それらの要因は近年増大している。筆者自身、病院勤務をしていたころには、ストレスを感じてはいたが、上記のような理解はしていなかった。同様に、職場のストレスについて理解が不足している医師が少なくないと思われる。

長時間労働などの、医師の職場ストレスの問題が一部の医師、例えば研修医とか特定の診療科の医師、あるいは特定の地域に限られているかのような取り上げ方がされる場合がある。しかし、上記(1)から(7)の項目は、ほと

んど全ての病院勤務医にあてはまる。したがって、限られた医師だけが強いストレスを受けているというわけではない事が理解できるはずである。

筆者が見聞きする範囲でも、医師がメンタルヘルス上の問題を生じたり、自殺したりする事は決して少ないわけではない。マスコミ等で報じられている以上に多いと思われる。また、心疾患・脳血管障害などを40歳台から50歳台で発症する医師は少なくない。突然死する医師もいる。

これらの過大なストレスのため、多くの働き盛りの病院勤務医が限界を感じて辞めていき、病院勤務医不足の大きな要因となっている。

一般の職場では、健康障害は、発生を少なくすることが重要であると考えられており、そのために心理的ストレスの少ない職場作りが推奨されている。

医師の職場においても、これらの業務上のストレスについて医師自身がよく理解して、改善できることから改善し、ストレス要因を少しでも軽減していく事が必要であると考えられる。

## 文 献

- 1)メンタルヘルスケア実践ガイド。産業医学進行財団、2002

篠原 保

(東芝ヒューマンアセットサービス株式会社産業医)

## 大学医師会・東京都医師会連絡協議会 について

平成16年度から、新しい「医師臨床研修制度」がスタートしました。診療に従事しようとする医師は、医師免許を取得した後、2年間の臨床研修を行うことが義務づけられたことは周知のとおりです。地域保健・医療についても2年次に1か月以上の研修を行うことが必修化され、その内容は、「へき地・離島診療所、中小病院・診療所、保健所、介護老人保健施設、社会福祉施設、日本赤十字社血液センター、各種検診・健診の実施施設等を適宜選択して研修を行うこと」と定められました。

慶應義塾大学での初期臨床研修プログラムでは、2年次が慶應義塾大学病院で研修を行う場合、リハビリテーション科の関連病院4か所に分かれ、1か月の「地域保健・医療」研修が実施されています。2年次の研修が協力型臨床研修病院で行われる場合は、出向先の研修プログラムに従うため多くのパターンが存在します。

さて、東京都医師会では平成16年から「指導医のための教育ワークショップ」を数回開催し、これまでに



100名以上の指導医を育成してきました。平成15・16年度に東京都医師会学術担当理事を務められた千野直一先生には、ワークショップの計画・運営にあたり多大な協力をいただきました。ここに感謝申し上げます。地域医師会において臨床研修に協力する診療所・病院医師は、ワークショップに参加することにより、日本医師会と厚生労働省から研修指導医として認められます。

「東京都大学医師会懇親会」という会合があります。これは、東京都にあるすべての大学医師会の代表が顔を合わせ、東京都医師会役員も加わった懇親会で、年に1度開催されてきました。しかし、交流が主な目的でした。そこで、医師臨床研修制度を協議するための「大学医師会・東京都医師会連絡協議会」を設立し、9月に第1回目の開催をするに至りました。東京都にあるすべての医学部（13大学）から、研修担当責任者である委員が招集されました。慶應義塾大学医学部からは、卒後臨床研修センター長である河瀬斌教授が参加されました。

大学医師会・東京都医師会連絡協議会では、①研修医受け入れの状況、②「地域保健・医療」研修のスケジュール、③地域医師会との連携、医師会への要望、④課題などについて各大学から提出された資料をもとに意見交換が行われました。2年間の研修も残り半年余りとなり、その評価をいかに行うのか、研修管理委員会をどう開催していくのか、主題とされた「地域保健・医療」研修に

ついても、その計画と実施方法の現状と課題が話し合われました。

医師臨床研修制度を通し、大学と地域医師会との連携が、より充実した形になっていくものと期待しています。患者さんの紹介・逆紹介だけが連携ではありません。大学と地域が一緒になり、医師を育成していくことを通し、お互いをより理解していくものと考えています。研修医としても、わずか1か月ではありますが、「地域保健・医療」研修を通して、診療所での医療、往診や訪問診療、保健所、介護保険制度などを体験し、医師会の存在と役割を知ることもなります。

今後も定期的に連絡協議会を開催していく予定です。各大学の担当者が顔を合わすことによって、お互いに情報交換を行い、よりよい臨床研修をスムーズに行うことができるよう、東京都医師会がその窓口になり、地域医師会や保健所、行政との連携に協力していきたいと思えます。そして、よい医師を育てるために、皆が協力しているということを、社会にアピールしていくことも大切なことだと認識しています。

医師臨床研修制度をよりよくしていくためには、多くの先生方の協力が必要です。何とぞよろしくお願い申し上げます。

近藤太郎（東京都医師会理事）

## 学会展望

### 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 副会長 相磯 貞和 (慶應義塾大学医学部解剖学)  
15:05 総会議事, 三四会奨励賞授与式  
司 会 監事 鹿島 晴雄 (慶應義塾大学精神・神経科学)

#### シンポジウム『医療提供体制の改革』

ご挨拶 会長 池田 康夫 (慶應義塾大学医学部長)

司 会 池上 直己 (慶應義塾大学医学部医療政策・管理学)

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

## I. 医療提供体制の改革について

前厚生労働省医政局長 岩尾 総一郎

○平成 15 年 8 月に策定した「医療提供体制の改革のビジョン」の具体化に向けて、患者の視点に立った患者本位の医療提供体制という基本的考え方の下、平成 15 年 3 月の閣議決定に基づく医療保険制度改革と併せ、平成 18 年の通常国会への法案提出を念頭に、以下のような改革を検討中（制度改革案）※社会保障審議会医療部会において検討中

### 1. 医療計画制度の見直し

○都道府県が策定する医療計画について、がん対策、糖尿病対策、小児救急対策、周産期医療対策などの事業ごとに数値目標を設定して、都道府県が自主性・裁量性と責任をもって、地域内の医療機関の機能分化と連携を推進する仕組みへ  
○住民にとって必要な医療情報をわかりやすく医療計画に明記

→適切な機能分化・連携により、急性期から回復期を経て在宅療養への切れ目のない医療の流れを作り、患者が早く自宅に戻れるようにすることで、患者のQOLを高め、また、トータルな治療期間（在院日数を含む。）が短くなる仕組みをつくる

→都道府県を支援するため、関係する補助金の交付金、統合補助金化を平成 18 年度に実施

※医療計画は、同じく都道府県が作成する健康増進計画（生活習慣病対策）や介護保険事業支援計画（高齢者の生活機能の重視）、現在検討中の医療費適正化計画（仮称）と十分連携をとって作成

→各都道府県が、その地域にふさわしい形で、整合性を持って、計画的に取り組む。

→結果として医療費の伸びの抑制に寄与

### 2. 医療法人制度改革

○民間非営利部門である医療法人が、従来国公立の病院が担ってきた公益的な分野も含め、透明性のある効率的な医療経営を行うことができるような医療法人制度改革を、公益法人制度改革の動きを踏まえつつ、実施。

- ・非営利性の徹底を通じた医療法人制度の再構築
- ・公益性の高い新たな医療法人類型の創設

※寄付税制など税制上の優遇措置の創設

### 3. 医療機関による積極的な情報提供など患者・国民の選択の支援

○患者・国民による適切な医療サービスの選択に資するよう、医療機関に関するより多くの情報が提供される仕組みを構築。

- ・医療機関が、その施設の医療機能に関する一定の情報を都道府県に届け出て、都道府県がそれらの個別の医療機関に関する情報を集積し、住民に対し分かりやすく情報

提供する仕組みの制度化

- ・客観的で検証可能な事項については、極力、「広告できる事項」として追加
- ・インターネットなどにより提供される医療情報の信頼性の確保のための措置

### 4. 医療安全対策の強化

- 無床診療所、歯科診療所、助産所及び薬局における安全管理体制の整備や病院等における院内感染制御体制の整備等
- 医療事故等の事例の分析と原因究明、再発防止対策の徹底（中立的機関、裁判外紛争処理制度の整備に向けた検討に着手）

### 5. 地域や診療科による医師不足問題への対応

- へき地等特定の地域や特定の診療科における医師不足問題への対応として、離島・へき地勤務へのインセンティブの付与、地域の拠点病院への集中を図ること等による病院の小児科医師等の確保の方策などについて検討、実施。
- 関係省庁において「医師確保総合対策」を取りまとめ、（平成 17 年 8 月 11 日）

### 6. 医療従事者の資質の向上

- 医療ミス等により行政処分を受けた医師等医療従事者への再教育制度の構築
- 看護職員の資質向上等に係る制度の見直し

## II. 新医師臨床研修制度施行 1 年半をすぎて

厚生労働省医政局医事課

医師臨床研修推進室長 宇都宮 啓

昭和 43 年以来、36 年ぶりの抜本的な改正として、新しく必修化となった医師臨床研修制度が 16 年 4 月からスタートした。平成 6 年 12 月の医療関係者審議会臨床研修部会の間まとめとして「基本的には必修とするとともに、その内容等の改善を図ることが望ましい」との意見がとりまとめられて以来約 10 年にも及ぶ議論を踏まえてのスタートとなった。

研修医の研修先を決めるマッチングも順調に行われ、これまで 2 回の結果も 95.6%、95.3%という高いマッチ率であった。スタート前には地域における医師の確保が困難になるといった地域医療への影響も懸念されたが、東京、大阪等で減少傾向、北海道、沖縄等で増加傾向になるなど、むしろ研修医が都市から地方へ流れる傾向が見られた。また、旧制度において「7対3」であった大学附属病院と臨床研修病院の研修医数割合が、新制度第 2 期生においては、「49.2対50.8」と、初めて若干ではあるが臨床研修病院が上回った。プライマリ・ケアを研修する場所として、大学から臨床研修病院を求める流れが表れていると思われる。

本年 3 月に実施した研修医に対するアンケート調査によれば、大学病院の研修医の多くが不満を抱えており、その理由としては、待遇・処遇が悪い、手技の経験が不十分、プライ

マリ・ケアの能力がよく身につかないということが多かった。新医師臨床研修制度施行後約1年半が過ぎた現時点における現状、第3回目となる研修医マッチングの結果分析及び今後の方向等について概説したい。

### Ⅲ. 独法化により国立病院はどう変わったか

独立行政法人国立病院機構理事長 矢崎 義雄

親方日の丸の経営による不効率な運営、国立のブランドに安住した医療サービスの低下などを厳しく指摘されていた154の国立病院・療養所が、その改善を目指してひとつの組織にまとめられ、平成16年4月に独立行政法人国立病院機構として再出発した。その基本方針として、病院長が先頭に立って指導力を発揮して発想の転換を進め、患者の目線に立ち、国民に満足される安全で質の高い医療を提供するとともに、各病院の特色を活かした政策医療の実施、臨床研究の推進、そして教育研修を通じた良き医療人を育成して、わが国の医療の向上に貢献することを目指している。経営の視点からは、7500億円余の債務を償還しつつ収支を相償化するのを5年間の中期計画に基づいて達成するよう求められており、前途多難な発足となった。

しかし、年度毎に国立病院の全てが一括してまとめられて予算や組織が決められていた従来の官庁会計方式から、各病院が現場の必要性を反映させつつ収入に応じた支出を組み立てる企業会計のシステムに移行したことによって、各施設の自己裁量権が大幅に拡大され、運営方針も迅速に決定して実施することが可能になった。さらに、地域医療のニーズに応えた病院機能強化に向けて、各病院が職員の意識を変革し、独自の方向性を組み立てて新たな活動をはじめた。経営的にも経費を節減するとともに、現場のニーズを反映した設備整備や投資、年功序列的な公務員給与体系より業績評価を取り入れた新たな給与体系に移行するなど、運営の効率化が実現できるように改革が着実にすすみ、昨年度の決算は機構全体で16億円の赤字にとどまり、評価委員会でも高い評価を得たところである。

さらに、各病院から構成されるネットワークを活かして臨床研究をすすめ、EBMのエビデンスとなるデータの収集や治験の推進などを行い、わが国の医療の向上の貢献に努めた。

### Ⅳ. 医療提供体制の改革—日本医師会の立場から

日本医師会副会長 櫻井 秀也

医療提供体制というのは、文字通り「医療」を「提供」する「体制」であります。

従って、提供すべき「医療」、国民の立場から言えば、提供されるべき「医療」について考えてみたいと思います。

#### 1. 国民サイドからみた提供されるべき医療の概念

医療を受ける立場に立ってみて、どういう医療を受けるか

という時に、いくつかの視点から大きく2つのグループに分けて考えてみたいと思います。

まず、「医療の日常性」という視点からは、日常的に対して非日常的、連続的に対して単発的・突発的、慢性的に対して急性的、恒常的に対して一時的、一般的に対して専門的、という対比が考えられます。

この対比は、言い方を変えれば、「比較的よくかかる病気や外傷（普通の状態）」に対する医療と「めったにかからない病気や外傷（普通でない状態）」に対する医療とに言い換えることができます。

提供される「医療の内容」から言えば、一般医療、一次から三次にわたる予防医療、応急・初期救急医療などに対して、二次・三次救急医療、専門医療、高次・高度先進医療などを対比させることができます。

それらの医療を提供する「医療機関」の視点から分ければ、無床診療所、有床診療所、中小病院に対して、専門病院、大病院、公的病院、国・公立病院、特定機能病院ということになります。

以上、大きく2つのグループに分けて考えてみましたが、両者は完全に2分できるものではなく、実際にはお互いに内容的にクロスしている部分が多いと考えられます。

最後に、これらの医療を「担当する医師」の視点からみると、日常的医療を担当するのが「かかりつけ医」であり、非日常的医療を担当するのが「専門医」ということになります。勿論、「かかりつけ医」というのは、患者サイドからの呼称でありますから、専門的医療の提供者の中にも「かかりつけ医」は存在するし、逆に、一般の医療提供者の中にも「専門医」が存在することになります。

#### 2. 地域医療体制のあるべき姿

このように医療を2つのグループに分けて考えると種々な問題が鮮明になってきます。

国民には、「かかりつけ医」を選んでもらい、日常的医療は「かかりつけ医」が担当して、非日常的医療は、その「かかりつけ医」の紹介によって、「専門医」が担当するという「医療機能連携体制」を構築することが、日本医師会が提唱する「かかりつけ医を中心に位置づけた医療提供体制の改革」になると考えられます。

「かかりつけ医」を中心とした包括的医療提供システムの主なポイントは、

- ①かかりつけ医を中心とした医療機関の役割分担と医療機能連携を明確化すること。
- ②これに基づいて医療提供体制のあるべき姿を提示すること。
- ③さらに、より良質な医療を提供するために、救急医療システム、医療安全体制、生涯教育制度等々の環境整備をすること、であります。

勿論、良質な医療を提供するために、国民皆保険制度という世界に冠たるわが国の公的医療保険制度のさらなる充実が必要なことは言うまでもありません。

慶 應 医 学

第 82 卷 総 目 次

平 成 17 年

Journal of The Keio Medical Society

Volume 82

2005

## 第 1 号

### 綜 説

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

### 講 座

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

### 学 位 論 文

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

### 号 外

- 博士(医学)学位論文—内容および審査要旨— (第175号).....(別頁)

## 第 2 号

### 綜 説

- 食道癌治療のパラダイムシフト .....安藤 暢敏.....( 47)

### 原 著 論 文

- 2型糖尿病患者における血管合併症に与える酸化ストレスの影響 .....大橋 徳巳.....( 55)  
日常生活活動が閉経後骨粗鬆症の薬物治療患者の骨密度に及ぼす影響について .....冬城 高久.....( 65)

### 話 題

- 小児のリハビリテーションにおける運動制御理論の応用 .....間川 博之.....( 73)  
東京歯科大学市川総合病院心臓病センター開設への道のり .....大木 貴博.....( 73)  
髪の毛の中の発がん性物質 .....花岡 知之.....( 74)  
<sup>13</sup>C-MRSによるサルの脳グルコース代謝 .....清水 克悦.....( 75)  
伊豆にてリハビリ工学の研究生活をおくって .....村岡 慶裕.....( 77)  
嚥下障害と遺伝子異常 .....相馬 啓子.....( 78)

### 学 会 展 望

- 第28回慶應外科フォーラム総会 .....( 80)  
第10回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会 .....( 93)  
慶應医学会平成16年度庶務・会計報告 .....( 99)

### 学 位 論 文

- 若年非糖尿病肥満患者における肥満・糖尿病関連遺伝子 resistin の  
血中濃度と遺伝子多型の検討 .....東 宏一郎.....(T39)  
卵管内胚移植のための子宮鏡用カテーテルの開発  
—組織学的評価とその臨床応用— .....北村 誠司.....(T55)  
子宮頸部腫瘍におけるp16<sup>INK4a</sup>蛋白質過剰発現の解析 .....石川 光也.....(T67)  
Von Willebrand 因子切断酵素(ADAMTS-13)の発現部位に関する検討 .....鈴木美佐子.....(T81)  
肥満2型糖尿病モデル動物 db/db マウスにおける  
PPAR $\gamma$ アゴニストおよびPPAR $\alpha$ アゴニストの影響 .....矢島 賢.....(T95)

脂肪細胞特異的分泌蛋白質アディポネクチンと糖・脂質代謝	山本 幸宏	(T107)
1型糖尿病発症における抗酸化薬の効果		
- 1型糖尿病モデル動物における N-acetyl-cysteine の影響 -	入江潤一郎	(T127)
インスリン抵抗性およびインスリン分泌能に関連する		
血中可溶性レプチン受容体および脂肪酸受容体遺伝子多型の検討	小川 健夫	(T139)
インスリン非依存糖尿病と自己免疫		
~ 膵島関連自己抗体陽性者における細胞性免疫異常 ~	鈴木 竜司	(T155)
HDL コレステロールに関する遺伝因子の研究 - 日本人女性における		
CETP 遺伝子 Taq IB 多型と Apo A-I 遺伝子 MspI 多型の意義 -	中村 佳子	(T169)
若年成人肥満者の metabolic syndrome におよぼす年齢, 肥満度,		
身体的フィットネスの影響, 生活習慣修正による減量の効用	勝川 史憲	(T181)
アンジオテンシン II 受容体遮断薬および Ca 拮抗薬の慢性経口投与による,		
高血圧ラットの循環調節の線形性の低下と, 非線形性の亢進	大波 敏子	(T197)
号 外		
博士 (医学) 学位論文 - 内容および審査要旨 - (第 176 号)		(別頁)

### 第 3 号

#### 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 慎一	(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 -	小宮山慎一	(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 F 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 4 号

#### 綜 説

難治性神経疾患に対する治療法の開発と実用化へ向けて	戸田 正博	(167)
---------------------------	-------	-------

講 座

不妊治療—生殖補助医療技術の可能性と限界— ……小田 高久……(181)

話 題

医師と業務上のストレス ……篠原 保……(189)

大学医師会・東京都医師会連絡協議会について ……近藤 太郎……(190)

学 会 展 望

第 85 回慶應医学会総会・シンポジウム ……(192)

第 82 巻総目次 ……(195)

Key Word 索引 ……(199)

著者名索引 ……(202)

学 位 論 文

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……(T297)

新規ピンカアルカロイド conophylline の子宮体癌細胞に対する

抗腫瘍効果に関する検討 ……入江 琢也……(T313)

号 外

博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第 178 号) ……(別頁)



# Key Word 索引

第 82 卷 2005

## A

<sup>99m</sup>Tc-HL91 .....(1) T1  
ADAMTS-13 .....(2) T81  
adhesion .....(3) T285  
adiponectin .....(2) T107  
aging .....(4) 181  
angiotensin II receptor blocker .....(2) T197  
angiotensin converting enzyme inhibitor (3) T257  
angiotensin II receptor blocker, .....(3) T257  
antigen .....(4) 167  
antioxidant .....(2) T127  
apolipoprotein A-I (Apo A-I) .....(2) T169  
arterial baroreflex .....(3) T257  
assisted reproductive technology .....(4) 181  
astroglia .....(3) 119  
autoradiography .....(1) T1

## B

bisphosphonate .....(4) T297  
body composition .....(2) T39  
bone metabolic marker .....(4) T297  
bone metastasis .....(4) T297  
bone mineral density hormone replacement therapy  
.....(2) 65  
Boyden chamber .....(4) T313  
breast cancer .....(4) T297

## C

Ca channel blocker .....(2) T197  
cancer vaccine .....(4) 167  
catheterization .....(2) T55  
cervical neoplasia .....(3) T231  
Chemoradiotherapy .....(2) 47  
cholesteryl ester transfer protein (CETP) (2) T169  
coherence .....(2) T197  
Conophylline .....(4) T313  
conservative treatment .....(3) 129  
creatine kinase isozyme .....(3) T207

CXC chemokine ligand-10 (CXCL-10)/interferon-  
inducible protein-10 (IP-10) .....(2) T155

## D

DC .....(4) 167  
diabetes mellitus .....(2) T155  
diabetic nephropathy .....(1) T29

## E

endometriosis .....(3) T217  
Esophageal cancer .....(2) 47

## F

fallopian tube .....(2) T55  
fatty acid .....(2) T139  
flow-metabolism coupling in the brain .....(3) 119  
fucosyltransferase .....(3) T285

## G

gallbladder carcinoma .....(1) 1  
gene .....(2) T169  
gene polymorphism .....(1) T29  
gene polymorphism .....(2) T107  
gene polymorphism .....(2) T139  
glucolipototoxicity .....(2) T95  
glucose .....(3) 119  
glucose-stimulated insulin secretion .....(2) T95  
glutamate .....(3) 119  
glutamic acid decarboxylase (GAD) .....(2) T155

## H

H type 1 carbohydrate antigen .....(3) T285  
high density lipoprotein cholesterol (HDL-C)  
.....(2) T169  
high sensitive C reactive protein .....(2) 55  
HSV .....(4) 167  
human papillomavirus .....(2) T67  
human papillomavirus .....(3) T231  
human sperm .....(3) T207

Hypertension .....(2) T197  
hypertension.....(3) T257  
hysteroscopic tubal embryo transfer .....(2) T55

I

IGF-1 .....(3) T245  
*in vitro* experiment .....(4) T313  
*in vitro* fertilization.....(4) 181  
infertility .....(4) 181  
insulin resistance .....(2) T39  
insulin resistance .....(2) T95  
insulin resistance .....(2) T107  
insulin resistance .....(2) T139  
insulin secretion .....(2) T139  
insulinitis .....(1) T11  
interleukin-18 .....(1) T11  
intervertebral disc degeneration .....(3) 129  
intracytoplasmic sperm injection .....(4) 181  
invasion .....(4) T313

J

juxtaglomerular cells.....(3) T269

L

lactate.....(3) 119  
latent autoimmune diabetes in adults (LADA)  
.....(2) T155  
leptin .....(2) T139  
Lewis<sup>b</sup> carbohydrate antigen .....(3) T285  
lipid profile .....(2) T107  
low back pain .....(3) 129

M

male infertility.....(3) T207  
membranous nephropathy .....(3) 143  
metabolic syndrome .....(2) T181  
modest weight loss.....(2) T181  
myocardial infarction .....(3) T257

N

nonlinearity .....(2) T197  
nonobese diabetic mouse .....(1) T11  
nonobese diabetic mouse .....(2) T127  
nonobese diabetic mouse .....(3) T245

O

obesity .....(2) T39  
obesity .....(2) T181  
ovarian clear cell adenocarcinoma .....(3) T217  
oxidative stress .....(1) T29  
oxidative stress .....(2) 55

P

p16INK4a .....(2) T67  
peroxisome proliferator-activated receptor.....(2) T95  
phospholipase .....(3) T269  
physical activity .....(2) 65  
physical activity .....(2) T181  
physical fitness .....(2) T181  
plasminogen activator inhibitor 1 .....(2) 55  
platelet-derived growth factor .....(2) 55  
polymorphism .....(2) T169  
postmenopausal osteoporosis.....(2) 65

R

radiation therapy .....(1) T1  
radical surgery.....(1) 1  
radiosensitivity .....(1) T1  
ratio of oxidized albumin .....(2) 55  
regeneration .....(4) 167  
renal biopsy .....(3) 143  
renin .....(3) T269  
resistin .....(2) T39  
review.....(1) 1

S

scanning electron microscopy.....(2) T55  
seminal plasma .....(3) T207  
short term effect .....(3) 143  
single nucleotide polymorphism .....(2) T39  
single-stranded conformational polymorphism  
.....(3) T231  
slowly progressive type 1 diabetes .....(2) T155  
steroid.....(3) 143  
streptozotocin .....(3) T269  
Surgery .....(2) 47  
surgical treatment .....(3) 129  
Sympathetic nerve activity .....(2) T197

T	
tartrate resistant acid phosphatase	(4) T297
thrombosis	(2) T81
transforming growth factor-beta 1	(3) T217
transforming growth factor-beta receptor	(3) T217
transmission electron microscopy	(2) T55
transmural pressure	(3) T269
TTP	(2) T81
tumor hypoxia	(1) T1
type 1 diabetes mellitus	(2) T127
type 1 diabetes mellitus	(3) T245
type 2 diabetes mellitus	(1) T29
type 2 diabetes with obesity	(2) T95
type1 diabetes mellitus	(1) T11

U

urinary protein	(3) 143
urokinase type-plasminogen activator	(3) T217
uterine cervical carcinoma	(2) T67
uterine endometrial cancer	(3) T285
uterine endometrial cancer	(4) T313

V

VWF	(2) T81
VWF-CP	(2) T81

あ

アイバンク	(1) 9
アストログリア	(3) 119
医師自身解剖・描画	(3) 109
医師の裁量権	(1) 29
医療水準	(1) 29
インターフェロン	(1) 21
インフォームド・コンセント	(1) 29

江戸時代後期	(3) 109
--------	---------

か

角膜移植	(1) 9
角膜上皮	(1) 9
グルコース	(3) 119
グルタミン酸	(3) 119

さ

三叉神経	(1) 15
C型肝炎ウイルス	(1) 21
自己決定権	(1) 29
人体解剖図譜	(3) 109
説明義務	(1) 29
セロトニン	(1) 15

た

トリプタン	(1) 15
-------	--------

な

乳酸	(3) 119
粘弾性手術補助剤	(1) 9
脳幹	(1) 15
脳血流代謝カップリング	(3) 119

は

分子生物学	(1) 21
片頭痛	(1) 15

ま

マイクロケラトーム	(1) 9
-----------	-------

ら

リバビリン	(1) 21
レプリコン	(1) 21

# 著者名索引

第82卷 2005

- |                      |  |                      |                      |                     |  |
|----------------------|--|----------------------|----------------------|---------------------|--|
| A                    |  | 北村 誠司 ……………(2) T55   | S                    |                     |  |
| 安藤 暢敏 ……………(2) 47    |  | 児玉 桂一 ……………(3) T245  | 佐久間 正祥 ……………(1) 1    |                     |  |
| 浅井 昌樹 ……………(3) 143   |  | 小宮山 慎一 ……………(3) T217 | 佐久間 雄一 ……………(3) T285 |                     |  |
| 東 宏一郎 ……………(2) T39   |  | 近藤 太郎 ……………(4) 184   | 榛村 重人 ……………(1) 9     |                     |  |
| C                    |  | 熊谷 直樹 ……………(1) 21    | 篠原 保 ……………(4) 183    |                     |  |
| 千葉 一裕 ……………(3) 129   |  | M                    |                      | 鈴木 美佐子 ……………(2) T81 |  |
| F                    |  | 宮地 系典 ……………(3) T207  | 鈴木 則宏 ……………(1) 15    |                     |  |
| 冬城 高久 ……………(2) 65    |  | 宗像 雄 ……………(1) 29     | 鈴木 竜司 ……………(2) T155  |                     |  |
| H                    |  | N                    |                      | 鈴木 天之 ……………(1) T1   |  |
| 廣田 展久 ……………(3) T269  |  | 中川 博之 ……………(3) T231  | T                    |                     |  |
| I                    |  | 中村 佳子 ……………(2) T169  | 高橋 慎一 ……………(3) 119   |                     |  |
| 入江 潤一郎 ……………(2) T127 |  | 西澤 雅彦 ……………(3) T257  | 戸田 正博 ……………(4) 167   |                     |  |
| 入江 聖子 ……………(1) T29   |  | O                    |                      | W                   |  |
| 入江 琢也 ……………(4) T313  |  | 小田 高久 ……………(4) 181   | 和田 徳昭 ……………(4) T297  |                     |  |
| 石川 光也 ……………(2) T67   |  | 小川 健夫 ……………(2) T139  | Y                    |                     |  |
| K                    |  | 大橋 徳巳 ……………(2) 55    | 矢島 賢 ……………(2) T95    |                     |  |
| 勝川 史憲 ……………(2) T181  |  | 及川 洋一 ……………(1) T11   | 山本 幸宏 ……………(2) T107  |                     |  |
|                      |  | 大波 敏子 ……………(2) T197  | 安田 健次郎 ……………(3) 109  |                     |  |

## 雜 報

### 慶應医学会例会第1429回

日 時 平成 17 年 8 月 3 日 (水) 午後 5 時 45 分  
 場 所 新棟 11 階 中会議室  
 演 題 HPV and esophageal cancer in China  
 演 者 Yang Ke, MD  
 Executive Vice President, Peking University  
 Executive Vice President, Health Science  
 Center, Peking University, Beijing, China  
 担 当 内科学教室

### 慶應医学会例会第1430回

日 時 平成 17 年 8 月 3 日 (水) 午後 6 時 30 分  
 場 所 新棟 11 階 中会議室  
 演 題 Recognition of bacterial glycolipids by NKT  
 cells  
 演 者 Mitchell Kronenberg, MD  
 Professor, Division of Developmental Immunology,  
 La Jolla Institute for Allergy and Immunology,  
 San Diego, CA, USA  
 担 当 内科学教室, 微生物学・免疫学教室

### 慶應医学会例会第1431回

日 時 平成 17 年 8 月 6 日 (土) 午後 3 時  
 場 所 東校舎講堂  
 演 題 Constrained induced movement therapy in sub-  
 acute stroke  
 演 者 Steven L. Wolf, PhD, PT, FAPTA  
 Professor, Emory Department of Rehabilitation  
 Medicine, School of Medicine, Atlanta, USA  
 担 当 リハビリテーション医学教室

### 慶應医学会例会第1432回

日 時 平成 17 年 8 月 11 日 (木) 午後 6 時 30 分  
 場 所 新教育研究棟講堂 3  
 演 題 Telenavigation in oral and maxillofacial sur-  
 gery  
 演 者 Michael Truppe, MD  
 Medical University of Vienna, University  
 Hospital for Cranio-Maxillofacial and Oral  
 Surgery, Vienna, Austria  
 担 当 歯科・口腔外科学教室

### 慶應医学会例会第1433回

日 時 平成 17 年 8 月 26 日 (金) 午後 6 時  
 場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
 演 題 Novel mechanisms of cell signaling and

inflammation

演 者 Averil Ma, MD, PhD  
 Rainin Distinguished Associate Professor of  
 Medicine  
 Director, Colitis and Crohn's Disease Center,  
 University of California School of Medicine,  
 CA, USA  
 担 当 内科学教室

### 慶應医学会例会第1434回

日 時 平成 17 年 8 月 29 日 (月) 午後 5 時  
 場 所 新教育研究棟 講堂 1  
 演 題 Anorexia nervosa and the brain- in search of a  
 neurobiological substrate  
 演 者 Bryan Lask, MD  
 Chair and Professor, Department of Child and  
 Adolescent Psychiatry, Eating Disorder  
 Research Team, St. George's Hospital Medical  
 School, London University, London, UK  
 担 当 小児科学教室

### 慶應医学会例会第1435回

日 時 平成 17 年 8 月 23 日 (火) 午後 5 時  
 場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
 演 題 Fat paradox in liver disease  
 演 者 Hidekazu Tsukamoto, DVM, PhD  
 Professor of Pathology, Director, USC-UCLA  
 Research Center for Alcoholic Liver and  
 Pancreatic Diseases, USC Cirrhosis Research  
 Center, Keck School of Medicine, University of  
 Southern California, Los Angeles, CA, USA  
 担 当 医化学教室

### 慶應医学会例会第1436回

日 時 平成 17 年 9 月 20 日 (火) 午後 6 時  
 場 所 新棟 11 階 中会議室  
 演 題 Novel treatment strategies in multiple  
 myeloma  
 演 者 Teru Hideshima, MD, PhD  
 Jarome Lipper Multiple Myeloma Cancer,  
 Department of Medical Oncology, Dana-Farber  
 Cancer Institute, Harvard Medical School,  
 Boston, USA  
 担 当 内科学教室

慶應医学学会例会第1437回

日時 平成17年10月8日(土)午後5時  
場所 総合医科学研究棟1階ラウンジ  
演題 Role of bicarbonate in gastroduodenal acid cycle  
演者 Jonathan D. Kaunitz, MD  
Professor, Department of Medicine, University of California, Los Angeles, Center for Ulcer Research and Education and West Los Angeles Veterans Affairs Medical Center, Los Angeles, CA, USA  
担当 内科学教室

慶應医学学会例会第1438回

日時 平成17年10月14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 Role of aldosterone in target organ damage in hypertension and heart failure a mechanistic overview  
演者 Ricardo Rocha, MD  
Associate Medical Director, Cardiovascular & Metabolism, US Clinical Development and Medical Affairs, East Hanover, NJ, USA  
担当 内科学教室

慶應医学学会例会第1439回

日時 平成17年10月25日(火)午後7時  
場所 総合医科学研究棟8階南会議室  
演題 1) Bone morphogenetic protein heterodimer for enhanced bone formation around the spine  
2) Expression of embryonic genes in post-natal articular cartilage - possible relation to osteoarthritis  
演者 Chisa Hidaka, MD  
Assistant Scientist, Hospital for Special Surgery, Institute for Sports Medicine Research, Laboratory for Soft Tissue Research, New York, NY, USA  
担当 整形外科教室

## 慶應医学会における個人情報の取扱いについて

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

### 1.個人情報の利用目的

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

### 2.個人情報の取得方法

慶應医学会では、以下の方法で会員の皆さまの個人情報を取得しております。

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

### 3.個人情報の第三者への提供

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

### 4.個人情報の適切な管理

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

以上

## 『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る。A4 判の白紙に横書き（35 字/行×23 行の約 800 字詰）で、上下を約 2.5 cm ずつ、左右を約 3 cm ずつあける。外国語の原語綴は行末で切れないよ

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

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT） 英語での表示とする。

1) 読者が一読して論文の主旨が明確にわかるもの。

2) 150 語ないし 200 語以内にまとめる。

3) ダブルスペースで A4 判の用紙にタイプする。

4) 題名にすでに表記されているものを最初の文章で繰り返さないこと。

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

6) 数字が文頭にある場合はスペルアウトし、文中ではアラビア数字を用いる。

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

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

略語は各分野を通じて周知のもの以外は使わない。

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

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

9. 見出しの振り方（参照例）

研究成績

1. 臨床的事項

1) 頻度



- a) ……………
- (1)……………
- (i)……………

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

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

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

14. 文献 本文中では引用された順とし、“Smith”によれば、……という報告がある<sup>23)</sup>。”のように肩に番号をふる。文献表は本文とは別とする。共著者のある場合すべての著者名を書き、スタイルはバンクーバー方式とする。論文のタイトルの文頭のみ大文字とし、あとは小文字で書く。雑誌名は公式の略号を用い、頁は最初と最後を必ず書く。（下記の例を参照する。）

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

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

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

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

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

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

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

# 「学位申請論文」投稿の手引き

## 「学位申請論文」について

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

### 1. 学位取得の十分条件ではない。

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

### 2. 二重投稿が回避できる。

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

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

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

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

### 3. プライオリティーを主張することはできない。

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

## 論文作成上の注意

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

ある。

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT）は不要である。

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

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

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

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

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

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

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

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

なお、ご不明の点については事務局にお問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

## 編集後記

今、韓国で行われたヒトES細胞研究に関して、卵子の採取にあたって倫理上不適切な経緯があったのではないかと、韓国はもちろん世界中で問題になっています。一体、この問題はどのような経過をたどりどのような結論にいたるのか、社会的にも医学的にも文化的にも非常に重要で興味深いと思っています。ただ、韓国国内の反応には Nationalism が絡みすぎ問題の本質から離れてしまわないかと危惧しています。一方、われわれとしては、先端医療を開発していくためには、時間がかかり面倒であっても、global standardでの倫理性、情報の開示、透明性、社会に対する説明責任、社会からの支持を得て行わないといけないということを改めて思い知らされた気がします。

## 編集委員 (◎副会長, ○理事)

◎相磯貞和 ○岡田保典 ○末松 誠 ○戸山芳昭  
櫻庭了 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12月18日 印刷

平成17年12月25日 発行

編 集 者 池 田 康 夫

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ください。

### 複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写したい方は、©日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の方でない限り、著作権者から複写権等の行使の委託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。

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

電話(03)-3475-5618 FAX(03)3475-5619 E-mail: jaacc@mtd.biglobe.ne.jp

著作物の転載・翻訳のような、複写以外の許諾は、直接本会へご連絡下さい。

アメリカ合衆国における複写については、次に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

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

### Notice about photocopying

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

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

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

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

In the USA Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

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

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



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<sup>®</sup>錠・細粒**

Cravit<sup>®</sup> (レボフロキサシン製剤)

薬価基準収載

※注意—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/>

慶應医学 第82巻第4号別頁  
平成 17 年 12 月 25 日

# 学位論文

慶應医学会

学位論文

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

慶應義塾大学医学部外科学教室

(指導：北島政樹教授)

和田 徳 昭

(平成 16 年 3 月 17 日受付)

Key Words : tartrate resistant acid phosphatase, breast cancer, bone metastasis, bone metabolic marker, bisphosphonate

乳癌は女性にとって最も罹患率の高い悪性腫瘍である。骨に転移する頻度が高く初再発の 30%にみられ、癌死までに 70%の患者に骨転移が発生するといわれる<sup>1), 2)</sup>。骨転移の成立、進展過程には破骨細胞がその主役を担うことが最近判明してきた。実験的には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、腫瘍細胞が分泌する parathyroid hormone related peptide (PTHrP)<sup>3)</sup>により破骨細胞が活性化され、溶骨が促進される。それにより骨基質に豊富に蓄えられた腫瘍成長因子が放出され、さらに腫瘍細胞の増殖が進行する<sup>4-6)</sup>。ところで、ピロリン酸の類似物質である bisphosphonate (BP) は強力に骨表面に結合し、骨吸収に伴い破骨細胞に取り込まれ、その働きを抑制するとされる。骨微小環境における活性化成長因子放出を抑えることで、腫瘍細胞と破骨細胞の悪循環を断ち切ることが可能であり<sup>7)</sup>、骨転移の治療に有効とされる。

臨床的に骨転移は、骨痛、病的骨折、脊髄圧迫など患者の生活の質に重大な問題を長期に引き起こすため、骨転移の早期診断と適切な治療効果の評価は重要である。通常骨転移発見には骨シンチグラフィがよく用いられ、高感度で 1 回の施行で全身が検査できるため骨転移の疑わしい部位の同定に威力を発揮する<sup>8)</sup>。しかしながら、

特異度がやや低いことやフレア現象などのため<sup>9), 10)</sup>、しばしば、病変の評価に苦慮する。さらに、検査は煩雑で、被曝の問題などで経過観察中に頻回に繰り返すことはできない。単純エックス線検査は簡便であるが確定診断には問題が多い。CT, MRI<sup>11)</sup>などの画像検査は転移評価に有効ではあるが、高価でスクリーニングには向かない。

一方、別のアプローチとして、最近、種々の骨代謝に関する生化学マーカー<sup>12)</sup>が開発され、骨転移に対する臨床応用が進んでいる。マーカーの多くは骨吸収時に分解された骨基質タンパク質である I 型コラーゲンの代謝産物を血中、尿中で測定するものである。それとは別に、破骨細胞に局在する酵素<sup>13-15)</sup>で、破骨細胞の活性化と共に血中に放出される血清酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase ; TRACP) がある。総酸性フォスファターゼが骨転移患者で上昇することは以前からよく知られていたが、TRACP は総酸性フォスファターゼの酒石酸抵抗性分画<sup>16), 17)</sup>であり、血清 TRACP の大部分は破骨細胞由来とされる。骨吸収は破骨細胞特有の機能であることから、直接破骨細胞の活性化や骨吸収の指標となり、理論上骨転移に対するマーカーとして期待される。

本論文は、Wada N, Ishii S, Ikeda T, Enomoto K, Kitajima M : Serum tartrate resistant acid phosphatase as a potential marker of bone metastasis from breast cancer. *Anticancer Res* 19 : 4515-4521, 1999 の一部、Wada N, Fujisaki M, Ishii S, Ikeda T, Kitajima M : Evaluation of bone metabolic markers in breast cancer with bone metastasis. *Breast Cancer* 8 : 131-137, 2001 の一部、Wada N, Ishii S, Ikeda T, Kitajima M : Inhibition of Bone Metastasis from Breast Cancer with Pamidronate Resulting in Reduction of Urinary Pyridinoline and Deoxypyridinoline in a Rat Model. *Breast Cancer* 11 : 282-287, 2004 の一部を含む。



以上のように破骨細胞と腫瘍細胞の親密な関連や高感度な生化学マーカーの発展は、骨代謝の変化を捉え、骨転移の診断、治療に関する新しい方向性を示した。さらに我々は骨転移の治療だけでなくその予防の可能性と骨転移の発見や評価を画像診断だけに頼ってきた従来の方法を変える新しい戦略を必要としている。

本研究の目的は、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、骨転移の状態と骨代謝マーカーとの関係を実験的、臨床的に明らかにすることである。まず、動物実験にて骨転移と破骨細胞の状態を観察し、pamidronate による骨転移の予防・治療効果と骨代謝マーカーである pyridinoline (Pyr), deoxypyridinoline (Dpyr) の関係を検討した。次に臨床研究として、乳癌患者における血清 TRACP を中心に、現在利用可能で代表的な骨代謝マーカーである尿中 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), 総アルカリフォスファターゼ (ALP) を測定比較し、乳癌骨転移に対する骨代謝マーカーの有用性を評価した。

## 対象と方法

### 1. 動物実験

#### 1) 動物

Charles River Japan Inc.より購入した42-45日齢のメス自然発症高血圧ラット (SHR ラット) を用いた。体重は100-120gの範囲であった。実験動物は慶應義塾大学医学部実験動物センター内で飼育し、実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守し行われた。

#### 2) 細胞株

北海道大学病理学教室武市紀年博士より贈与を受けた、SHR ラット自然発症乳癌細胞株である c-SST-2 を用いた。この細胞株は SHR ラット皮下に接種すると局所に腫瘍を形成しリンパ節、肺、心、腎などに高率に転移を生じる<sup>18)</sup>。この細胞株はエストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプターはともに陰性である。

#### 3) 細胞培養

c-SST-2 細胞は10%胎児ウシ血清を加えた Eagle's minimal essential medium を培養液とし、5%CO<sub>2</sub>を含む37°C大気中の環境下で培養した。Passage と培養液の交換は週1回施行した。

#### 4) 骨転移の作成

SHR ラットを pentobarbital sodium 50 mg/kg の腹腔内投与により麻酔後、左頸部に小切開を加え、左頸

動脈を露出、切開し、ポリエチレンカテーテル (PE-10, Becton Dickinson) を挿入、胸部大動脈内に留置した。小開腹後、一時的に両側腎動脈をクランプし、腫瘍細胞の腎への流入を防ぐ準備をした。0.2 ml の Hanks 液に浮遊させた  $1 \times 10^4$  個の c-SST-2 細胞をカテーテルから約1分間かけて緩徐に注射し、0.8 ml の生理食塩水でフラッシュした。腎動脈のクランプを解除し、カテーテルを抜去後、左頸動脈を結紮した。

#### 5) 治療プロトコール (BP 投与)

骨転移治療薬として、第二世代の BP 剤である pamidronate を用いた。動物は対照群 (Control), 前治療群 (Pre-treatment group), 後治療群 (Post-treatment group) の3群とした。前治療群は腫瘍接種24時間前に pamidronate 10 mg/Kg を 0.5 ml 生理食塩水に溶解し下腹部に皮下投与した。後治療群は腫瘍接種7日後に同量の薬剤を投与し、対照群には生理食塩水を皮下投与した。腫瘍接種3週後に、12時間の絶食後、血液と尿検体を採取した。屠殺後、肉眼的に臓器転移を確認し、胸椎、腰椎を摘出した。

#### 6) 骨転移の評価

##### (1)組織準備

摘出した脊椎は10%ホルマリンにて1週間固定し、5.0%エチレンジアミン四酢酸にて4週間かけ脱灰した。脊椎は長軸の中心にて切断し、バラフィンに包埋、通常の方法にて薄切しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と TRACP 染色を施行した。TRACP 染色は改良された片山らの方法<sup>19)</sup>を用いた。TRACP 染色は1 mM の Naphthol AS-BI phosphate 酢酸緩衝液と 20 mg/ml の Hexazonium pararosanilin に 0.05 M 酒石酸を加え、pH を 5.0 に調整した液を用い、37°Cにて1-2時間インキュベーションした。その後、ヘマトキシリンにて核を染色した。この TRACP 染色で胞体が赤染する多核細胞を破骨細胞とみなした。

##### (2)組織評価

HE 染色の標本にて脊椎転移を顕微鏡的に観察し、1匹毎の胸腰椎転移数をカウントした。さらに、骨転移と TRACP 染色で染められた破骨細胞の関係を観察した。

#### 7) 骨関連マーカーの測定

採取された血液は凝固後直ちに3000回転/分、10分間の遠心分離にて血清を採取し、検体測定まで-70°Cにて凍結した。尿も同様の条件で保存した。尿中 Pyr, Dpyr は HPLC にて測定し、すべて尿中 Cr 値との比を使用した。血清、尿中カルシウム値は通常の生化学検査にて行い、血清アルブミンが 4.0 g/dl 以下の時は以下の補正式を用いた：補正血清カルシウム値 = 測定カ

ルシウム値 (mg/dl)+4-血清アルブミン値 (g/dl).

## 8) 統計

すべての結果は平均値±標準偏差 (mean±SD) で示した。二群間の比較は Fisher's test と Mann-Whitney U test を用い、p 値は 0.05 以下を有意差ありとした。

## 2. 臨床研究

本研究の対象は乳房摘出術もしくは乳房温存手術を受け、組織学的に乳癌と診断した日本人女性 269 例 (研究 1: 113 例, 研究 2: 156 例) である。肝転移を除く重篤な肝機能障害や腎機能障害、また骨の代謝性疾患を有する患者は除外した。いずれの患者も BP 製剤の投与は受けていない。すべての患者はスクリーニングとして  $^{99m}\text{Tc}$ -polyphosphate による骨シンチグラフィを受け、骨転移が疑われる時は、単純 X 線写真や MRI, CT などを施行し、慎重に経過観察し、骨転移の診断を確実なものとした。骨病変の検索だけでなく、理学的身体所見、胸部単純エックス線写真、腹部超音波検査を施行し、他部位の再発・転移の有無を確認した。すでに骨転移があり、治療中の患者の場合は、画像診断による骨病変の評価をおこない、乳癌取り扱い規約<sup>20)</sup>に基づき complete response (CR), partial response (PR), no change (NC), progressive disease (PD) に分類した。血液、尿検体は空腹時採血、早朝 2 番尿採取を原則とした。

検体採取は、術後決められた期間ではなく、外来定期検診時に説明と同意の得られた患者のみから行なった。得られたデータから個人が特定されることはなく、この研究だけに使用した。測定終了した検体の 2 次利用はなく、すみやかに廃棄した。

### 1) 対象

#### (1) 研究 1 TRACP と尿中 Pyr, Dpyr との比較

1995 年 1 月から 1996 年 1 月までに慶應義塾大学病院にて検体採取した乳癌患者 113 例を対象に、TRACP と尿中 Pyr, Dpyr, ALP を測定し骨代謝マーカーとしての有用性を比較検討した。また、同時期に同意の得られた 21-76 歳の健常女性 56 例から検体を採取し TRACP の健常対照群として使用した。

#### (2) 研究 2 TRACP と血清 ICTP, 尿中 NTx との比較

さらに 1997 年 7 月から 1999 年 3 月までに足利赤十字病院にて検体採取した乳癌患者 156 例を対象に、TRACP と血清 ICTP, 尿中 NTx を測定し、臨床的有用性を検討した。

### 2) 検体測定

採取した血液は凝固後直ちに 3000 回転/分の遠心分離を 10 分間施行後、測定した。当日測定できない場合

は -70°C にて保存し、採取後 1 週間以内に測定した。採取された尿も同様に保存し測定した。

TRACP は Osawa ら<sup>21)</sup>の方法にて改良された比色定量法にて自動分析装置 (HITACHI 7150 もしくは OLYMPUS AU600) にて測定した。基質として Nitto Boseki から入手した基質 2,6-dichloro-4-acetylphenylphosphate (DCAPP) を用いた。要約すると、0.1mM, pH5.4 ウシアルブミン加クエン酸ナトリウムに 26mM 酒石酸を加え緩衝液とした。基質 DCAPP は 6.0 mM, pH 3.0 に調整した。20 $\mu$ l の血清サンプルと 400  $\mu$ l の緩衝液を混ぜ、100  $\mu$ l の基剤を加えて測定を開始する。この DCAPP が酸性フォスファターゼにより加水分解され、その吸光度増加速度を測定波長 340 nm で 40-240 秒測定し TRACP 活性を算出した。

過去の TRACP 測定方法<sup>22), 23)</sup>では基質がそれぞれ違い、ビリルビンや溶血の影響を受けるなど、再現性や比較が難しいなどの問題点があったが、今回用いた基質 DCAPP は、前立腺 ACP に親和性が高く、水解生成物が直接高感度に検出できる改良された物質で、吸光度増加速度を生体色素の影響が少ない測定波長 340 nm にて自動分析装置で測定可能であり、従来<sup>24), 25)</sup>より安定し測定も容易となった。

尿中 Pyr, Dpyr は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて測定し、いずれも尿中 Cr 値との比 (Pyr/Cr, Dpyr/Cr) を用いた。ICTP は Orion 社製の 2 抗体を用いた Radioimmunoassay 法にて測定し、尿中 NTx は持田製薬社製モノクローナル抗体を用いた ELISA 法にて測定した。ALP は各施設のルーチン検査キット (International 社もしくは Yatoron 社製) を用いて測定した。

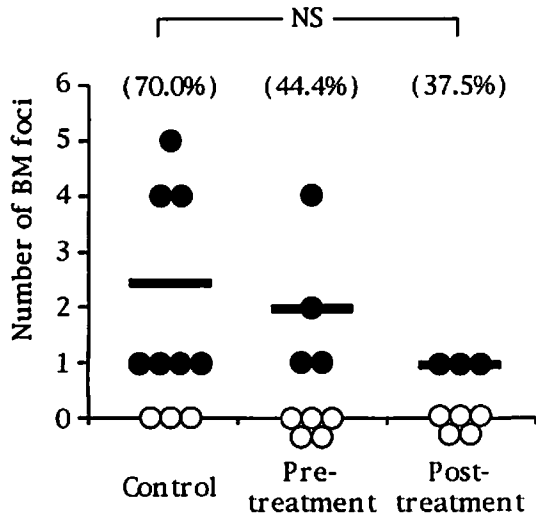
### 3) 統計

すべての結果は平均±標準偏差 (mean±SD) にて表示し、検定は 2 群間の比較は unpaired t test を、3 群間以上の比較は one-way analysis of variance (ANOVA) にて Scefes F テスト, Kruskal-Wallis テストを用いた。感度特異度の検定は  $\chi^2$  乗検定を用いた。p 値は 0.05 以下を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 動物実験

第 1 図に各群の骨転移の数を示す。対照群の骨転移の発生率は 70.0% (7/10) であったが、前治療群、後治療群ではそれぞれ 44.4% (4/9), 37.5% (3/8) であった。治療されたラットの転移の大部分は 1, 2 カ所の小

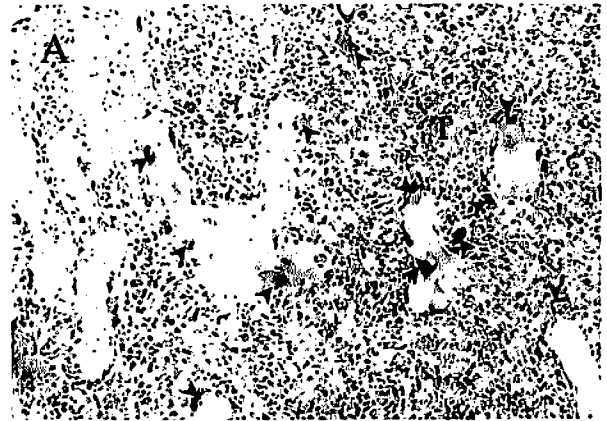


第1図 腫瘍接種3週後の脊椎転移個数。括弧内は各群の骨転移発生率を示す。●は骨転移のあるラット、○は骨転移なしのラットを示す。グラフ内の横棒は骨転移を有するラットの平均骨転移数を示す。各群の平均転移個数±標準偏差は以下のとおり。対照群 (Control: n=10): 2.4±1.7個, 前治療群 (Pre-treatment group: n=9): 2.0±1.2個, 後治療群 (Post-treatment group: n=8): 1.0±0.0個。NS: 有意差なし (Wada N et al: Breast Cancer 11: 282-287, 2004 の第1図を許可を得て転載)

転移巣であったが、対照群では4カ所以上の骨転移を認めるラットもいた。

第2図 A, Bに脊椎中の骨転移顕微鏡写真を示す。TRACP染色で胞体が赤染する多核細胞が破骨細胞である。これにより破骨細胞と骨転移の特別な関係が明らかとなった。対照群での骨転移は微小骨髄転移から骨破壊まで多彩な像がみられた。骨髄内皮細胞に沿って破骨細胞が観察されたが、骨髄転移巣周囲と取り囲まれた島状の骨梁周囲にも多数の破骨細胞が存在し、活発に骨吸収を思わせる吸収窩を形成していた (第2図 A)。骨髄中の転移巣は他の正常骨髄細胞を圧排するように発育しているが、破骨細胞は転移巣内にも観察された。骨破壊を伴い骨髄内から骨周囲軟部組織へ広がった浸潤転移巣内にも破骨細胞は認められた (第2図 B)。しかし、骨に密接する軟部組織転移巣内には破骨細胞は存在せず、外側からの骨破壊像は決して認めなかった。一方、治療群には骨破壊をもたらす転移はなく、対照群にくらべて小さな転移巣であり、破骨細胞数もより少なかった。

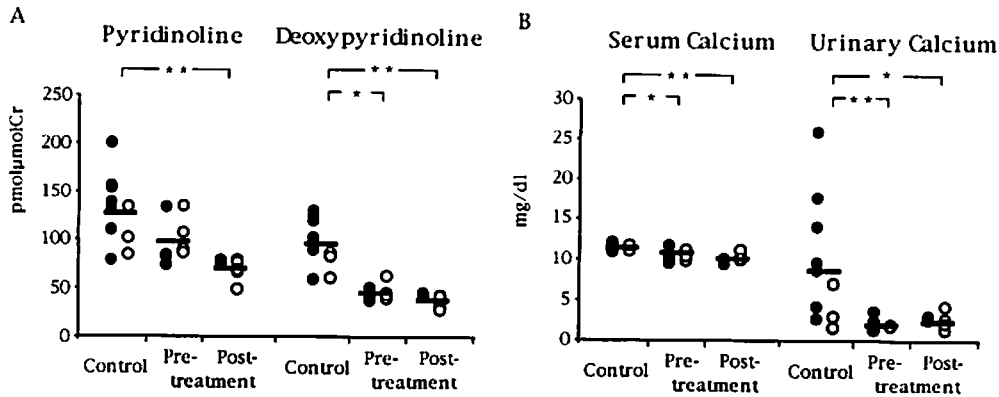
骨転移と各群のPyr, Dpyrと血清、尿中カルシウムとの関連を示すため骨転移有無別にプロットしたのが第3図である。まず骨転移の有無に関係なく各群全体の平



第2図 対照群の脊椎骨転移病理組織像

(A) 腫瘍細胞 (T) は破骨細胞 (矢印) の増殖を伴って溶骨をおこす。(TRACP染色, ×100) (B) 骨髄内から骨破壊を伴い椎体外の軟部組織 (S) に浸潤する腫瘍 (T)。赤染する破骨細胞は浸潤する腫瘍に混じって椎体外でも認められる。(TRACP染色, ×40) (Wada N et al: Breast Cancer 11: 282-287, 2004 の第2図を許可を得て転載)

均値を比較してみると、治療群の平均Pyr値はいずれも対照群より低く、特に後治療と対照群では有意な差を認めた。平均Dpyr値も治療群で有意に低値を示した。平均尿中、血清補正カルシウム値も同様であり、対照群との間に有意差を認めた。さらに骨転移の有無別に検討すると対照群において、骨転移を有するラットの平均Pyr, Dpyr値は、転移がないラットと比較してやや高い傾向にあるものの、有意差はなかった。これらの値は対照群から前治療、後治療になるにつれて順に低くなっていった。すべての治療群のPyr, Dpyr値は骨転移の状態に関係なく同じレベルであった。尿中、血清補正カ



第3図 (A) 骨転移有無別尿中Pyr, Dpyr値。骨転移の有無によらず pamidronate 投与によりPyr, Dpyrの平均値は低下した。(B) 骨転移有無別血中Ca, 尿中Ca値。転移を有する対照群の中には非常に高い尿中Caを示すものがあるが、治療群にはない。●は骨転移のあるラット、○は骨転移なしのラットを示す。グラフ内の横棒は各群全体の平均値を示す。対照群(Control: n=10), 前治療群(Pre-treatment group: n=9), 後治療群(Post-treatment group: n=8), \*p<0.05, \*\*p<0.01, (Wada N et al: Breast Cancer 11: 282-287, 2004の第3図を許可を得て転載)

ルシウム値は骨転移の有無で有意差を認めなかった。しかし尿中カルシウムでは骨転移を有する対照群の一部が非常に高値を示したが、治療群では認めなかった。

## 2. 臨床研究

### 1) 研究1

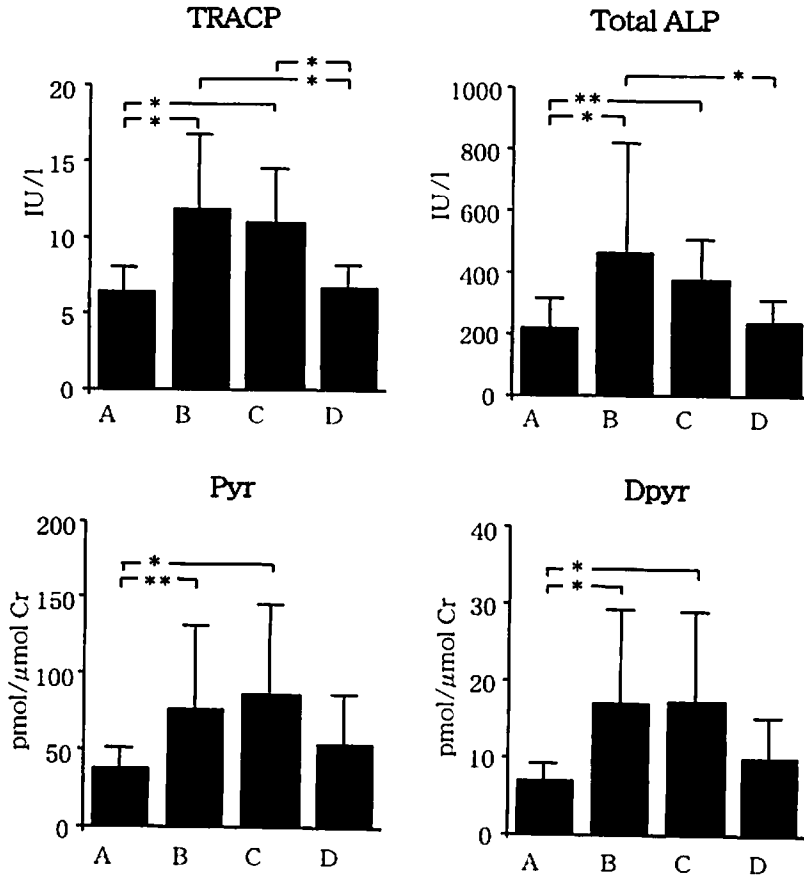
症例全体の平均年齢は54.5±11.8歳。閉経前40例、閉経後73例であった。この症例を骨転移の有無に従い以下の4グループに分類した。Group A (n=61)は健存群、Group B (n=20)は骨単独転移群、Group C (n=15)は骨+他臓器転移を有する群、Group D (n=17)は骨以外の転移群である。第4図は各骨代謝マーカーと骨転移の有無の関係を示している。いずれの群間にも平均年齢に差はない。すべてのマーカーにおいて、骨転移を含むGroup BとGroup Cの平均値は健存群Group Aに比べ有意に上昇していた。特にGroup DとGroup BもしくはGroup Cの間に有意差を認めたのはTRACPだけであり、Pyr, Dpyrには認められなかった。第5図では年齢別健常女性におけるTRACPの変化をみたもので、TRACPは加齢と共に上昇する傾向を示し、閉経前女性の平均値(5.7±1.3 IU/l)は閉経後女性(6.6±1.2 IU/l)に比べ有意(p<0.02)に低い値を示した。このことからTRACPの正常上限値をmean+2SDに設定すると、閉経前後でそれぞれ8.3 IU/lと9.0 IU/l以下を正常値と定義できた。これをカッ

トオフ値に設定し、実際の骨転移の有無を示したのが第1表である。これよりTRACPの骨転移マーカーとしての特異度、感度、正診率はそれぞれ91.0%、65.7%、83.2%であった。

骨転移を有する患者は全て検体採取時、様々な治療を既に受けていた。この時点で骨転移に対する治療効果を乳癌取扱い規約<sup>20)</sup>に基づいて評価しnon-responder群(PD)とstable-responder群(NC, PR, CR)に分類した。すべての骨代謝マーカーの平均値はnon-responder群でstable-responder群に比べ有意に上昇していた。

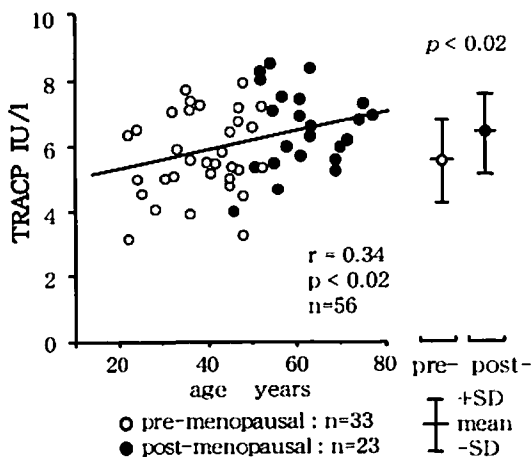
non-responder群を骨シンチグラムのホットスポットの数に応じて分類し、マーカーとの関係を調べた(第6図)。いずれのマーカーもstable-responder群は健存群と同じレベルであるが、ホットスポットの数が増加するに従い、値も上昇していった。TRACPだけが5-9カ所のホットスポットでも有意な上昇を認めたが、他のマーカーは10カ所以上ホットスポットがないと健存群と有意な差を認めなかった。

骨転移を有する症例で経時的(2-12ヶ月間)に観察し2回TRACPを測定できたのは16症例で、その差を第7図にプロットした。この間に病状が悪化した群(n=10)は安定していた群(n=6)に比べ有意(p<0.05)に大きな正の差を認めた。すなわち病勢の悪化にともない上昇する傾向にあった。



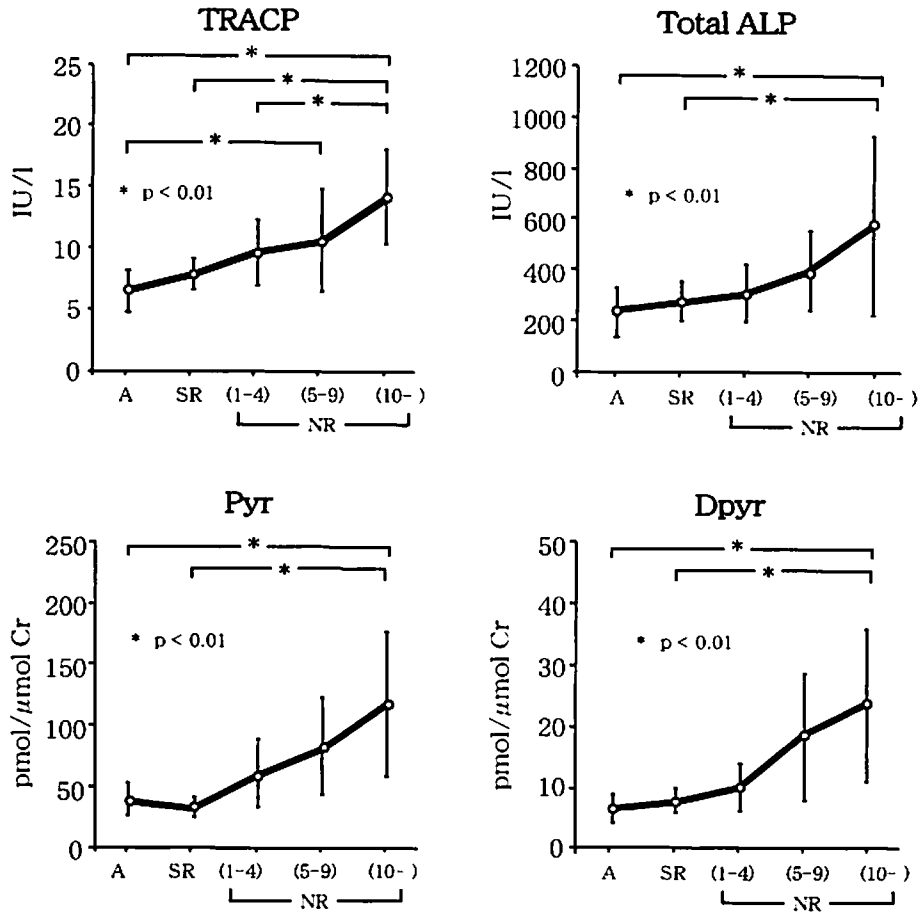
第4図 研究1 転移部位別骨代謝マーカーの比較

各群間の平均年齢に差はない。骨転移を有する群の平均値は健存群と比べいずれも有意な上昇を認めた。骨転移群と骨以外の転移群との間に有意差を認めたのはTRACPだけであった。Group A (n=61 51.8±11.2歳)：健存群，Group B (n=20 55.8±9.9歳)：骨単独転移群，Group C (n=15 58.8±13.6歳)：骨+他臓器転移群，Group D (n=17 58.6±12.6歳)：骨以外の転移群。  
\*p<0.01, \*\*p<0.05. (Wada N et al : Anticancer Res 19 : 4515-4521, 1999 の第1図を許可を得て転載)



第5図 研究1 健康人におけるTRACP値と年齢との関係、閉経状況別平均値の比較

健康人においては、年齢が上昇するにつれTRACP値も徐々に増加し有意な相関を認めた。閉経前女性のTRACP平均値(5.7±1.3 IU/l)は閉経後女性の平均値(6.6±1.2 IU/l)と比べ有意に低かった。(Wada N et al : Anticancer Res 19 : 4515-4521, 1999 の第2図を許可を得て転載)



第6図 研究1 骨転移治療効果別、転移程度とマーカーとの関係

骨転移治療後、骨転移病巣を non-responder 群 (NR) と stable-responder 群 (SR) に分類し、NR 群はさらに程度別に細分した。図中の NR 群の括弧内の数値は骨シンチグラムのホットスポット数を示す。A は第1図と同じく健存群を意味する。骨転移治療効果のあった SR 群のマーカーの平均値は健存群と同レベルであるが、NR 群ではホットスポット数の増加に応じて各マーカーの平均値も上昇した。TRACP のみが、ホットスポット (5-10) でも健存群に比べ有意な上昇を示した。(Wada N et al : Anticancer Res 19 : 4515-4521, 1999 の第3図を許可を得て転載、一部改変)

第1表 研究1 TRACP 値による骨転移の判定

		骨転移		計
		あり (Group B, C)	なし (Group A, D)	
TRACP	上限以上	23	7	30
	範囲内	12	71	83
計		35	78	113

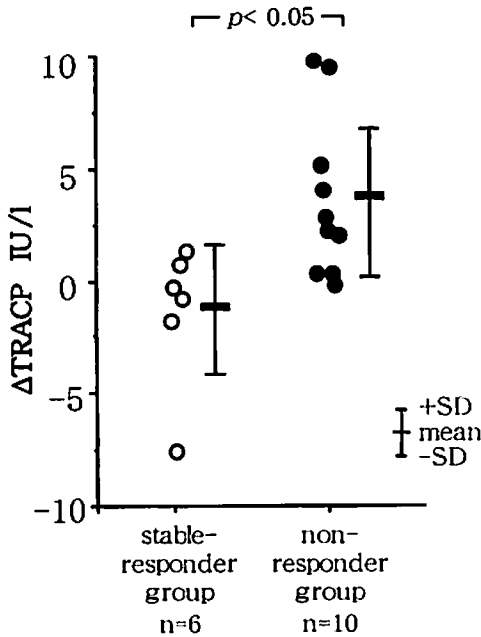
特異度：91.0%，感度：65.7%，正珍率 83.2%，Fisher's exact probability test；p<0.001 健常人の mean+2SD を正常上限値と定め、閉経前後で正常値を変えた。(Wada N et al : Anticancer Res 19 : 4515-4521, 1999 の第2表を許可を得て転載)

2) 研究2

症例全体の平均年齢は 55.3±12.5 歳, 閉経前 64 例, 閉経後 71 例, 不明 21 例であった. この症例を骨転移の有無に従い, 健存群 (n=114), 骨転移群 (n=23), 骨以外の転移群 (n=19) と分類した.

第2表は, 骨代謝マーカーと骨転移の有無の関係を示す. 骨転移群の ICTP と TRACP は健存群に比べ有意 (p<0.01) に上昇していた. 同様に骨以外の転移群との比較でも有意 (p<0.05) に上昇しておりこれらのマーカーは骨転移で特異的に上昇していた. ALP と NTx はいずれの群間にも有意な差を認めなかった.

第3表に骨転移患者の特徴を表し, 第8図に骨代謝マーカーと骨転移の程度との関係を示した. 骨転移群は骨シンチグラムのホットスポットの数に応じ2つのサブグループに分けた. 第3表中の骨転移程度+と++は第8図の BM (+) と BM (++) にそれぞれ一致する. BM (+) は1-3カ所のホットスポットを認める群で, BM (++) は4カ所以上認める群である. 骨シンチグラムの画像上, 胸椎面積の3倍までを BM (+) とみなした. BM (-) は健存群を示す. 第8図で ICTP と TRACP は BM (++) 群だけでなく BM (+) でさえ BM (-) と比べ有意 (p<0.05) に上昇していた. また BM (++) は BM (+) と比べても有意 (p<0.05) な上昇を認めた. これらのマーカーは明らかに骨転移の程度と関連していた. NTx においては BM (++) と BM (-) 間に有意差 (p<0.05) を認めたが, BM (+) と BM



第7図 研究1 TRACP 病勢別経時的変化

骨転移を有する症例で経時的 (2-12ヶ月間) に観察し2回 TRACP を測定できたのは16症例で, その差をプロットした. この間に病状が悪化した群 (n=10) は安定していた群 (n=6) に比べ有意 (p<0.05) に大きな正の差を認めた. (Wada N et al: Anticancer Res 19: 4515-4521, 1999 の第4図を許可を得て転載)

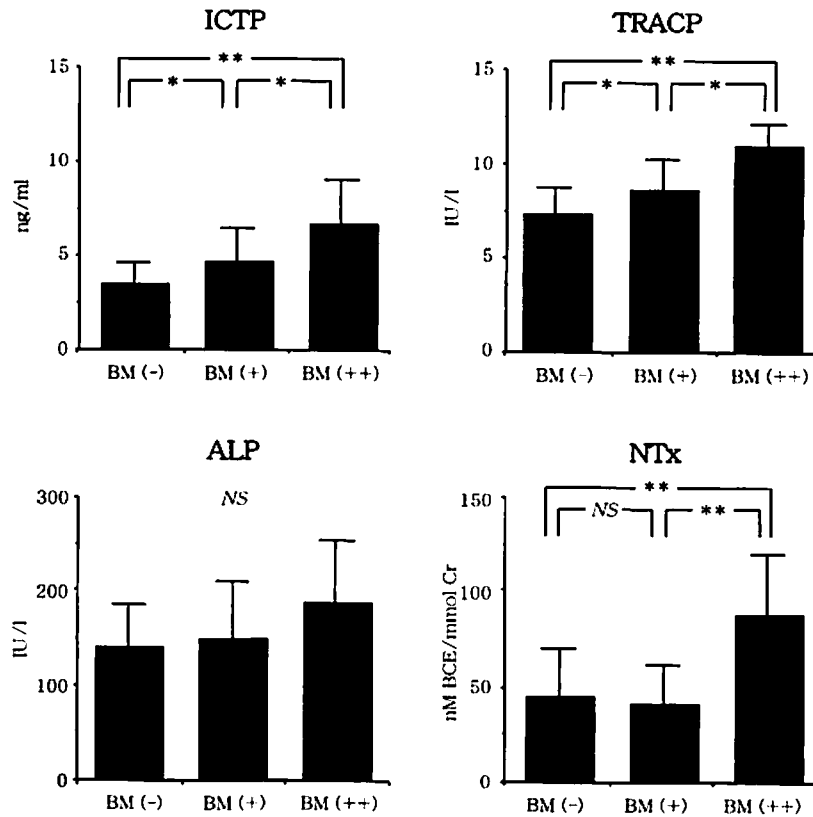
第2表 研究2 骨転移の有無と骨代謝マーカーの関係

	健存群 (n=114)	骨転移群 (n=23)	骨以外の転移群 (n=19)
検体採取時年齢 (歳)	56.7±11.8	63.2±13.1	55.9±13.9
ICTP (ng/ml)	3.5±1.2*	5.4±2.2**	4.1±1.9'
TRACP (IU/l)	7.3±1.4*	9.4±1.9**	8.0±1.6'
ALP (IU/l)	139.7±43.3	156.7±59.9	135.5±54.2
NTx/Cr (nM BCE/mmol Cr)	45.3±24.7	59.7±34.2	42.5±22.6

\*p<0.01, 'p<0.05, 他の群間は無意味

平均±標準偏差

(Wada N et al: Breast Cancer 8: 131-137, 2001 の第2表を許可を得て転載)



第8図 研究2 骨代謝マーカーと骨転移程度との関係

ICTPとTRACPはBM(++)群だけでなくBM(+)でもBM(-)と比べ有意( $p < 0.05$ )に上昇していた。またBM(++)はBM(+)と比べても有意( $p < 0.05$ )な上昇を認めた。これらのマーカーは明らかに骨転移の程度と関連していた。NTxにおいてはBM(++)とBM(-)間に有意差( $p < 0.05$ )を認めたが、BM(+)とBM(-)間には有意差を認めなかった。BM(-):健存群, BM(+):ホットスポット1-3カ所, BM(++):ホットスポット4カ所以上, BM(+)とBM(++)は第3表の骨転移程度の+と++にそれぞれ一致する。詳細は本文参照。(Wada N et al: Breast Cancer 8: 131-137, 2001の第1図を許可を得て転載)

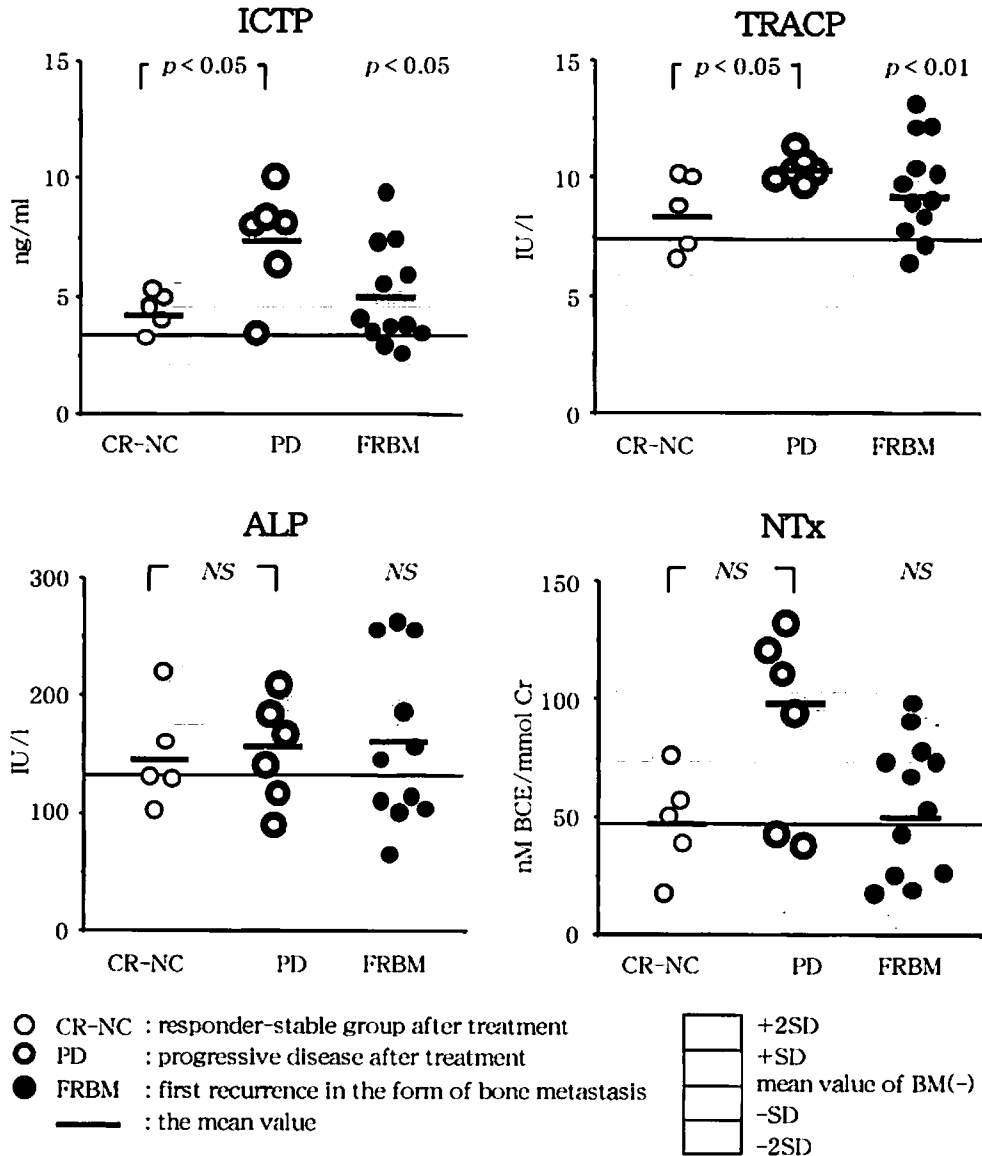
(-)間には有意差を認めなかった。

骨転移を有する群は検体を採取する時点で、骨転移が初めて発見され骨転移に対する治療がなされていない症例と既に治療を受けている症例などさまざまであった。そこで、骨転移に対して治療を受けていた患者11名を検体採取時点での治療効果別に2つのサブグループに分類した。一つは骨転移に対する効果がPD( $n=5$ )で、もう一つはCR-NC( $n=6$ )のサブグループである。また第3表、第9図のFirst recurrence in the form of BM(FRBM):骨初再発転移症例とは骨転移群の中で、未治療初再発骨単独転移か、もしくは他の転移部位の治療中に骨転移が初めて見つかったサブグループ( $n=12$ )とする。第9図に骨代謝マーカーと骨転移に

対する治療効果の関係を示す。ICTPとTRACPはPD群とCR-NC群間で有意な差( $p < 0.05$ )を認めた。健存群の範囲をグラフ中の斜線の領域(mean $\pm$ 2SD)で示してあるが、この平均値とCR-NC群にはいずれのマーカーも差を認めなかった。第9図には直接示していないがPD群においては、ALP以外の各マーカーの平均値は健存群に比べ有意( $p < 0.01$ )に上昇していた。

さらに同じ第9図中で骨初再発転移症例(FRBM)のICTPとTRACP値は、健存群と比べ有意(ICTP: $p < 0.05$ , TRACP: $p < 0.01$ )に上昇していたが、ALP, NTxは差を認めなかった。





第9図 研究2 骨転移治療効果とマーカーの関係、および骨初再発転移群と健存群との比較  
 検体測定時、骨転移治療の評価でPD群とCR-NC群のサブグループに分類した。ICTPとTRACPは両群間で有意な差 ( $p < 0.05$ ) を認めた。健存群の範囲をグラフ中の斜線の領域で示してあるが、この平均値とNC-CR群にはいずれのマーカーも差を認めなかった。PD群においては、ALP以外の各マーカーの平均値は健存群にくらべ有意 ( $p < 0.01$ ) に上昇していた。また、骨初再発転移群 (FRBM) のICTPとTRACP値は、健存群と比べ有意 (ICTP:  $p < 0.05$ , TRACP:  $p < 0.01$ ) に上昇していた。(Wada N et al: Breast Cancer 8: 131-137, 2001の第2図を許可を得て転載、一部改変)

第3表 研究2 骨転移群患者の特徴

番号	検体採取時年齢	骨転移程度	骨転移部位	骨以外 転移部位	検体採取時 治療内容
1	79	+	胸椎	-	内分泌
2*	87	+	胸椎	-	-
3	64	++	多発転移	-	内分泌
4	44	+	胸椎	-	化学内分泌
5	54	+	胸椎	-	化学内分泌
6*	54	+	胸椎	-	化学内分泌
7*	47	+	胸骨	-	-
8*	60	+	腰椎	-	化学内分泌
9*	76	++	多発転移	-	-
10*	67	++	頸椎, 胸骨	リンパ節	-
11	68	++	多発転移	肺, リンパ節	化学
12	67	+	胸骨	肺, 皮膚	化学内分泌
13*	48	++	多発転移	リンパ節	-
14	78	+	胸骨	リンパ節	化学内分泌
15	61	+	腰椎	リンパ節	化学
16	56	++	多発転移	肺, リンパ節	内分泌
17	71	++	腰椎, 胸骨	-	化学内分泌
18	69	++	多発転移	皮膚	-
19*	77	+	胸骨	-	-
20*	51	+	胸骨	-	化学
21*	57	+	骨盤, 頭蓋骨	-	-
22*	81	+	頭蓋骨	肺	-
23*	38	+	頭蓋骨	肺, 肝	化学内分泌

\*First recurrence in the form of BM (FRBM) : 骨初再発転移症例.

初めて骨転移再発が確認された症例で、骨単独初再発例と骨以外の再発部位治療中に新たに骨転移が出現した例を含む。骨転移の程度の定義は本文参照。(Wada N et al : Breast Cancer 8 : 131-137, 2001 の第3表を許可を得て転載)

## 考 察

骨転移と BP の関係について今まで多数の論文があり、基礎的検討にて BP によって骨転移が抑制されることが示されている<sup>26)</sup>。しかし、*in vivo* において BP 治療下における骨転移の状態と骨代謝マーカーの関連はまだ十分に検討されていない。

本研究では、まず動物実験として乳癌骨転移モデルを用いて、骨転移、骨代謝マーカー (Pyr, Dpyr)、破骨細胞の強力な抑制剤である pamidronate の治療効果の関係を調べた。背景として、極めて硬い骨の吸収、破壊は腫瘍細胞自身では不可能で、破骨細胞がその役割を担っていることがある。骨転移の成立には、腫瘍細胞が骨髄に到達しそこで増殖する必要がある。癌の増殖因子として作用する transforming growth factor- $\beta$  や insulin-like growth factor などは骨基質自体に豊富に蓄えられ、

生理的な骨のリモデリングの一環として放出される。また、骨転移をおこしやすい乳癌などの特定の癌は PTHrP, transforming growth factor- $\alpha$ , prostaglandin などの分泌により破骨細胞を増殖、活性化させ、骨基質の吸収が増加、それによりさらに腫瘍増殖因子が放出されるといふ悪循環がおり、癌増殖の場を広げ骨破壊に至ると考えられている<sup>27-29)</sup>。よって効果的な治療・予防として BP を用いた破骨細胞の抑制が考えられる。

本実験では pamidronate 投与時期を、腫瘍接種前の前治療；完全予防投与と骨髄に生着した直後の後治療；臨床的な補助療法を想定し設定した。BP は骨に長期にとどまり、徐々に骨代謝に伴い放出される<sup>30)</sup>ため、単回投与で実験期間中は治療効果を十分持続すると考えられた。Wingen ら<sup>31)</sup>の実験も BP の前治療は後治療より優れていることを示し、最近の研究では BP は腫瘍細胞と骨表面の特性を変化させ、癌細胞が骨表面に接着するの

を阻止することが示されており<sup>32), 33)</sup>, 当初, 前治療としての pamidronate 予防投与が骨転移制御に最も効果的であろうと予想していた. 結果は骨転移の発生率は対照群, 前治療群, 後治療群はそれぞれ 70.0%, 44.4%, 37.5%であり, 後治療の骨転移の程度が対照群と比べ有意差はないが, 最も低かった. 治療されたラットには癌細胞による骨破壊は全くみられなかった. pamidronate は前, 後治療でほぼ同等であり, 確実に骨破壊が進展するのを阻止することが示された.

病理組織像では対照群の転移巣内には骨髄腔だけに限らず, 骨破壊により浸潤した椎体外に広がる転移巣内にも破骨細胞が多数存在することが観察された. しかしこの骨転移モデルにおいては椎体に隣接する軟部組織転移がどんなに大きくても, 椎体外から骨髄腔内へ腫瘍の浸潤はみられなかった. そこには破骨細胞が存在しないためと思われ, 破骨細胞は骨破壊に重要な役割を担っていると考えられた.

骨代謝マーカーと骨転移, pamidronate の治療効果の関係であるが, 第3図から, pamidronate の使用は対照群に比べ骨転移の有無に関係なく Pyr, Dpyr 全体の平均値を有意に引き下げた. また第3図Aは骨転移の有無別に Pyr, Dpyr の個々の値もプロットしており, 対照群の中では骨転移のある群で若干 Pyr, Dpyr の平均値が高い傾向にあったものの, 有意差を認めなかった. この理由は, 骨破壊を伴う進行した骨転移の数が, 腫瘍接種後3週ではまだ少なかったためと思われる. Tamura ら<sup>34), 35)</sup>は同じモデルを用いて, 骨破壊を伴う骨転移群のみ Pyr, Dpyr の増加がみられ, 骨転移スコアと密接に関連することを示している. また, 治療群の中でも骨転移の有無にかかわらず平均値に全く差を認めなかったが, いずれも対照群より値が低いことに注目すべきであり, pamidronate 使用により破骨細胞機能が抑制され骨転移の発生, 骨破壊に至らなかったためと思われる.

本実験は pamidronate が骨転移の発生と骨転移による骨破壊を明らかに抑制し, Pyr, Dpyr の値は低下した<sup>36)</sup>. これらの測定は骨転移の治療の良い示標となり, Pamidronate によって Pyr, Dpyr の値を低く保つことは, 骨転移の発生と進展を抑制することにつながるかもしれない.

動物実験の結果から, 骨転移には破骨細胞が関与しており, 破骨細胞に局在する TRACP は活性化の示標となる可能性があることが示された. 生理的に破骨細胞の活動が活発となるのは, 子供では成長時の骨のリモデリング<sup>37)</sup>, 閉経後では骨密度の低下時であり<sup>38)</sup>, この時期

に血清 TRACP の増加が報告されている. 今回は研究1にて56人の健康女性ボランティアから TRACP の正常範囲を求めた. 第5図で TRACP は加齢と共に上昇する傾向にあり, 閉経前後において平均値に有意な差を認めた<sup>39)</sup>. よって, 閉経状況により cut off を設定することで, より正確に骨転移の状態が判定できるようになり, 特異度は 91.0%と, 他の報告<sup>40), 41)</sup>よりも優れていた. しかし, TRACP の感度は 65.7%であり, 一般的な骨シンチグラフィの感度と比べてまだ十分とはいえなかった.

次に, 症例全体を骨転移の有無で分類しマーカーの平均値を比較した. 平均年齢に有意差はない. 研究1, 2のそれぞれ第4図, 第2表から, TRACP は骨転移を含む群で特異的に上昇し, 骨以外の転移では健存群に比べ変化はなかった. 同様に Pyr, Dpyr, ICTP も骨転移を含む群で有意な上昇を認めたが, NTx は有意な差を認めず, 骨転移の検索マーカーとしては劣っていた.

研究1の骨転移を有する症例はすべて治療されており, 第6図から治療に反応した症例は健存例と同レベルで, いずれのマーカーの上昇も認めていない. 骨転移増悪症例はその転移個数が増加するにつれてマーカーも上昇しているが, TRACP は他マーカーより少ない骨転移数でも有意な上昇がみられ, より鋭敏であった. また同様に研究2でも第9図から骨転移を治療し安定している症例のマーカーは健存群と同程度に低いレベルであり, 増悪群は有意に上昇していた. また第8図での骨転移症例 (BM+, BM++) は研究1第6図と違い, 治療の有無が様々で, その反応も不均一な集団である. それでも BM (++) では全マーカーで有意に上昇し, TRACP, ICTP は BM (+) でも健存群と有意な差を認めた.

研究2において, 骨病変には未治療の骨初再発転移例 FRBM (第9図) では血清 ICTP と TRACP は健存群より有意に高かった. 初再発骨転移例の大半が, TRACP ではばらつきが少なく健存群の平均値以上を示したことは重要であり, スクリーニングとしての骨転移診断とさらに骨転移の程度も予想できる可能性が示唆された. さらに CR-NC 群と PD 群を選別する治療効果判定では, 他のマーカーは値のばらつきが目立つ中, 病変の増悪に対して TRACP は最も値のばらつきが少なく, 骨病変の病勢を反映し治療効果判定により有用であると思われた<sup>42)</sup>. 研究1の第7図では少数例であるが, TRACP を経時的に2回測定し, その差を治療効果別にプロットしたもので, 治療に反応しなかった群の差は正に大きく開いており, 経過観察にも有用である可能性が示唆された. 研究2では TRACP と同じく ICTP の有

用性<sup>43), 44)</sup>も高かったが、NTx はそれに比べ劣っていた。一方で、NTx が骨転移を有する患者にとって最も predictive な生化学マーカーであるとする報告もある<sup>45, 47)</sup>。最近では破骨細胞特異性を高めた血清 TRACP 5b が測定可能となり、優れた骨吸収マーカーであることが示されている<sup>48), 49)</sup>。

乳癌の好発年齢はちょうど閉経前後に及ぶため、骨のモニタリングを行う場合、エストロゲン欠乏による閉経後骨粗鬆症という生理的な骨量の減少をマーカーが反映し、また治療としてのホルモン療法による影響をうけるなど、骨代謝マーカーの値は骨全体の病変の総和を反映したものであることを常に考慮しなければならない。スクリーニングとして骨代謝マーカーの上昇を認めても、臨床症状がない限り場所の特定は困難であり、この点において骨シンチグラフィはまだ重要な役割を担うであろう。しかし、骨代謝マーカーは存在診断やすでに骨転移を有する乳癌患者のモニタリングにとって繰り返し測定ができ、低侵襲、低コストで利便性の高いものであることから、骨転移の臨床評価の戦略として考慮すべき手段であると思われた。さらに、BP は臨床では悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療だけではなく、既に骨転移に対する直接的な治療や骨転移予防として BP 製剤が使用されてきている<sup>50), 51)</sup>。破骨細胞の抑制により骨代謝マーカーの低下、中でも TRACP が破骨細胞の機能を反映するため有用であることが示された。これらのことから骨転移早期発見、治療効果判定だけでなく、治療としての BP 使用時のモニターなど、今後 TRACP 測定は様々な応用されていくことが考えられた。

## 総 括

動物実験にて骨転移と破骨細胞の状態を観察し、pamidronate による骨転移の予防・治療効果と Pyr, Dpyr の関係を検討した。さらに臨床研究では乳癌患者にて各種骨代謝マーカーを測定、TRACP を Pyr, Dpyr, ICTP, NTx と比較することで骨転移の診断、治療効果判定に対する有用性を検討した。

1. 動物実験において Pamidronate 投与は骨転移発生を抑制し、骨破壊への進展を阻止した。治療により Pyr, Dpyr 全体の平均値は低下し、骨吸収が抑制された。
2. 病理組織検査で、対照群の骨転移巣内には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た。
3. 臨床研究にて健常人において TRACP 値は閉経前

に比べ閉経後で有意に上昇し、閉経状況に応じて正常値の設定が必要であった。これにより骨転移診断の特異度、感度、正診率はそれぞれ 91.0%, 65.7%, 83.2%であった。

4. TRACP は骨転移を有する群で有意に高値をとり、骨転移の程度に応じて上昇していった。特に骨シンチグラム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。骨転移治療が無効であった群は有意に高く、骨病変の病勢を反映し変動することで治療効果判定や経過観察にも有用であると思われた。
5. 初再発骨転移例のほとんどの TRACP 値が健存群の平均値以上を示したことは重要であり、スクリーニングとしての骨転移診断が可能で、さらにその程度も予想できる可能性が示唆された。

以上により、動物実験にて pamidronate は骨転移を抑制し Pyr, Dpyr 値を下げた。臨床的に TRACP は他の骨代謝マーカーと同等かそれ以上に有用性があり、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。

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外科学教室北島政樹教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、直接御指導、御高閲いただきました外科学教室池田正助教授と川崎市立川崎病院外科石井誠一郎博士に深謝いたします。実験助手であった安藤靖子女史に深謝いたします。御指導いただいた榎本耕治助教授（現 国際医療福祉大学教授）に深謝いたします。

本論文の一部は、平成7年度文部省科学研究費補助金により行われた。

本論文の要旨は第6、10回日本乳癌学会総会、第36、37回日本癌治療学会総会、第96回日本外科学会総会、21st American Association for Cancer Research, 18th, 19th, 22nd San Antonio Breast Cancer Symposium, 3rd European Breast Cancer Conference において発表した。

## 文 献

- 1) Coleman RE, Rubens RD: The clinical course of bone metastases from breast cancer. Br J Cancer 55: 61-66, 1987
- 2) Nielsen OS, Munro AJ, Tannock IF: Bone metastases: pathophysiology and management policy. J Clin

- Oncol 9 : 509-524, 1991
- 3) Powell GJ, Southby J, Danks JA, Stillwell RG, Hayman JA, Henderson MA, Bennett RC, Martin TJ : Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases : increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Res* 51 : 3059-3061, 1991
  - 4) Boyde A, Macconnachie E, Reid SA, Delling G, Mundy GR : review of methods, potential and applications. *Scan Electron Microsc* 1 : 537-1554, 1986s
  - 5) Taube T, Elomaa I, Blomqvist C, Beneton MN, Kanis JA : Histomorphometric evidence for osteoclast-mediated bone resorption in metastatic breast cancer. *Bone* 15 : 161-166, 1994
  - 6) Hiraga T, Nakajima T, Ozawa H : Bone resorption induced by a metastatic human melanoma cell line. *Bone* 16 : 349-356, 1995
  - 7) Mundy GR, Yoneda T : Facilitation and suppression of bone metastasis. *Clin Orthop* : 34-44, 1995
  - 8) Krasnow AZ, Hellman RS, Timins ME, Collier BD, Anderson T, Isitman AT : Diagnostic bone scanning in oncology. *Semin Nucl Med* 27 : 107-141, 1997
  - 9) Vogel CL, Schoenfelder J, Shemano I, Hayes DF, Gams RA : Worsening bone scan in the evaluation of antitumor response during hormonal therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 13 : 1123-1128, 1995
  - 10) Pollen JJ, Witztum KF, Ashburn WL : The flare phenomenon on radionuclide bone scan in metastatic prostate cancer. *AJR Am J Roentgenol* 142 : 773-776, 1984
  - 11) Algra PR, Bloem JL, Tissing H, Falke TH, Arndt JW, Verboom LJ : Detection of vertebral metastases : comparison between MR imaging and bone scintigraphy. *Radiographics* 11 : 219-232, 1991
  - 12) Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM : Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 17 : 333-368, 1996
  - 13) Eggert FM : Stable acid phosphatase : II. Effects of pH and inhibitors. *Histochemistry* 66 : 319-329, 1980
  - 14) Minkin C : Bone acid phosphatase : tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34 : 285-290, 1982
  - 15) Stepan JJ, Zichova M, Lachmanova J, Pacovsky V : Plasma tartrate resistant acid phosphatase : a marker for osteoclastic bone resorption. *Acta Univ Carol* 32 : 345-353, 1986
  - 16) Yam LT : Clinical significance of the human acid phosphatases : a review. *Am J Med* 56 : 604-616, 1974
  - 17) Tavassoli M, Rizo M, Yam LT : Elevation of serum acid phosphatase in cancers with bone metastasis. *Cancer* 45 : 2400-2403, 1980
  - 18) Yuhki N, Hamada J, Kuzumaki N, Takeichi N, Kobayashi H : Metastatic ability and expression of c-fos oncogene in cell clones of a spontaneous rat mammary tumor. *Jpn J Cancer Res* 77 : 9-12, 1986
  - 19) Katayama I, Yang JP : Reassessment of a cytochemical test for differential diagnosis of leukemic reticuloendotheliosis. *Am J Clin Pathol* 68 : 268-272, 1977
  - 20) The Japanese breast cancer society : General rules for clinical and pathological recording of breast cancer, 13th edition, Tokyo, Kaneharashuppan, 1998
  - 21) Osawa S, Iida S, Yonemitsu H, Kuroiwa K, Katayama K, Nagasawa T : Prostatic acid phosphatase assay with self-indicating substrate 2,6-dichloro-4-acetylphenyl phosphate. *Clin Chem* 41 : 200-203, 1995
  - 22) Stepan JJ, Silinkova-Malkova E, Havranek T, Formankova J, Zichova M, Lachmanova J, Strakova M, Broulik P, Pacovsky V : Relationship of plasma tartrate resistant acid phosphatase to the bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase in hyperparathyroidism. *Clin Chim Acta* 133 : 189-200, 1983
  - 23) Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ : Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem* 14 : 177-181, 1981
  - 24) Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, Singer FR, Baylink DJ : Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum : potential use to assess bone resorption. *Clin Chem* 33 : 458-462, 1987
  - 25) Scarnecchia L, Minisola S, Pacitti MT, Carnevale V, Romagnoli E, Rosso R, Mazzuoli GF : Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover. *Scand J Clin Lab Invest* 51 : 517-524, 1991
  - 26) Hall DG, Stoica G : Effect of the bisphosphonate risedronate on bone metastases in a rat mammary adenocarcinoma model system. *J Bone Miner Res* 9 : 221-230, 1994
  - 27) Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA : TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103 : 197-206, 1999
  - 28) Yoneda T : Cellular and molecular mechanisms of breast and prostate cancer metastasis to bone. *Eur J Cancer* 34 : 240-245, 1998
  - 29) Mundy GR, Yoneda T : Facilitation and suppression of bone metastasis. *Clin Orthop* : 34-44, 1995
  - 30) Kasting GB, Francis MD : Retention of etidronate in human, dog, and rat. *J Bone Miner Res* 7 : 513-522, 1992
  - 31) Wingen F, Eichmann T, Manegold C, Krempien B : Effects of new bisphosphonic acids on tumor-induced bone destruction in the rat. *J Cancer Res Clin Oncol* 111 : 35-41, 1986
  - 32) van der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Wee-Pals L, Lowik C, Papapoulos S : Bisphosph

- onates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices *in vitro*. *J Clin Invest* 98 : 698-705, 1996
- 33) Boissier S, Magnetto S, Frappart L, Cuzin B, Ebetino FH, Delmas PD, Clezardin P : Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res* 57 : 3890-3894, 1997
- 34) Tamura H, Ishii S, Ikeda T, Enomoto T, Imai Y, Kitajima M : A novel animal model for bone metastasis of breast cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 34 : 97, 1993
- 35) Tamura H, Ishii S, Ikeda T, Enomoto K, Kitajima M : The relationship between urinary pyridinoline, deoxypyridinoline and bone metastasis in a rat breast cancer model. *Breast Cancer* 6 : 23-28, 1999
- 36) Wada N, Ishii S, Ikeda T, Kitajima M : Inhibition of bone metastasis from breast cancer with pamidronate resulting in reduction of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in a rat model. *Breast Cancer* 11 : 282-287, 2004
- 37) Chen J, Yam LT, Janckila AJ, Li CY, Lam WK : Significance of "high" acid phosphatase activity in the serum of normal children. *Clin Chem* 25 : 719-722, 1979
- 38) de la Piedra C, Torres R, Rapado A, Diaz Curiel M, Castro N : Serum tartrate-resistant acid phosphatase and bone mineral content in postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 45 : 58-60, 1989
- 39) Wada N, Ishii S, Ikeda T, Enomoto K, Kitajima M : Serum tartrate resistant acid phosphatase as a potential marker of bone metastasis from breast cancer. *Anticancer Res* 19 : 4515-4521, 1999
- 40) Desoize B, Veiler V, Pourny C, Comoe L, Jardillier J C : Isoenzymes of alkaline and acid phosphatases as bones metastasis marker in breast cancer patients. *Anticancer Res* 9 : 1105-1109, 1989
- 41) Nguyen M, Bonnetterre J, Hecquet B, Desoize B, Demaille A : Plasma acid and alkaline phosphatase in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 11 : 831-833, 1991
- 42) Wada N, Fujisaki M, Ishii S, Ikeda T, Kitajima M : Evaluation of bone metabolic markers in breast cancer with bone metastasis. *Breast Cancer* 8 : 131-137, 2001
- 43) Koizumi M, Takahashi S, Ogata E : Bone metabolic markers in bone metastasis of breast cancer. *Int J Clin Oncol* 4 : 331-337, 1999
- 44) Shimozuma K, Sonoo H, Fukunaga M, Ichihara K, Aoyama T, Tanaka K : Biochemical markers of bone turnover in breast cancer patients with bone metastases : a preliminary report. *Jpn J Clin Oncol* 29 : 16-22, 1999
- 45) Demers LM, Costa L, Chinchilli VM, Gaydos L, Curley E, Lipton A : Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. *Clin Chem* 41 : 1489-1494, 1995
- 46) Costa L, Demers LM, Gouveia-Oliveira A, Schaller J, Costa EB, de Moura MC, Lipton A : Prospective evaluation of the peptide-bound collagen type I cross-links N-telopeptide and C-telopeptide in predicting bone metastases status. *J Clin Oncol* 20 : 850-856, 2002
- 47) Brown JE, Thomson CS, Ellis SP, Gutcher SA, Purohit OP, Coleman RE : Bone resorption predicts for skeletal complications in metastatic bone disease. *Br J Cancer* 89 : 2031-2037, 2003
- 48) Capeller B, Caffier H, Sutterlin MW, Diel J : Evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 5b as serum marker of bone metastases in human breast cancer. *Anticancer Res* 23 : 1011-1015, 2003
- 49) Koizumi M, Takahashi S, Ogata E : Comparison of serum bone resorption markers in the diagnosis of skeletal metastasis. *Anticancer Res* 23 : 4095-4099, 2003
- 50) Lipton A, Theriault RL, Hortobagyi GN, Simeone J, Knight RD, Mellars K, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman JJ : Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases : long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer* 88 : 1082-1090, 2000
- 51) Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G : Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 339 : 357-363, 1998

学位論文

新規ピンカアルカロイド conophylline の  
子宮体癌細胞に対する抗腫瘍効果に関する検討

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

いり え たく や  
入 江 琢 也

(平成 16 年 2 月 17 日受付)

Key Words : Conophylline, uterine endometrial cancer, Boyden chamber, *in vitro* experiment, invasion

わが国において、子宮体癌は欧米諸国に比べ罹患率が低率であるとされていたが、女性の平均寿命の上昇に伴う好発年齢層の増加や生活習慣の変化などにより、その罹患率は上昇傾向にある。子宮体癌の治療では手術療法が第一選択とされているが、術後の残存腫瘍や再発・転移に対する有効性の高い治療法はいまだ確立されていない。近年、さらに殺細胞効果の高い抗癌剤の開発が望まれているが、これらは一般に臓器選択性を欠くためその細胞毒性は少なくない。一方、欧米を中心として臨床開発が進められている血管新生阻害剤<sup>1)</sup>、シグナル伝達阻害剤<sup>2)</sup>などは、癌細胞の増殖・分化・転移を制御する分子を標的として開発されていることから、殺細胞性の抗癌剤と比べ毒性は少ないことが予想され、癌の新たな治療法として期待されている。

1993 年、Umezawa はキョウチクトウ科植物である *Ervatamia microphylla* の葉のクロロホルム抽出物から K-ras-transformed normal rat kidney (K-ras-transformed NRK) 細胞<sup>3)</sup>の形態正常化を誘導する物質としてアルカロイドに属する一つの物質を単離した<sup>4)</sup>が、これは T. S. Kam らが 1992 年に報告した天然有機化合物 conophylline (コノフィリン) と同一物質であることが後に判明している<sup>5)</sup>。キョウチクトウ科植物からは今までに治療薬となる多くの生理活性物質が発見されており、その代表的なものにニチニチソウ (*Vinca rosea*) から発見された同じピンカアルカロイドである

vinblastine や vincristine がある。これらはチューブリンに結合して微小管形成を阻害 (G2/M 期阻害) することによりその抗腫瘍作用を発現することが知られている<sup>6), 7)</sup>。しかし、conophylline は微小管の形成を阻害せず、normal rat kidney (NRK) 細胞<sup>8)</sup>を用いた実験では cyclin D1 の発現を抑えることで G1 期 arrest を起こすことが判明していることから (投稿準備中)、conophylline は既存のピンカアルカロイドとは全く異なった作用を有することが予想されている。その後、*in vitro* の実験において Amino らにより、conophylline が K-ras-normal rat kidney (K-ras-NRK) 細胞<sup>9)</sup>の細胞増殖を抑制しない濃度でマトリゲルへの浸潤を抑制することが明らかにされた<sup>10)</sup>。このことから、conophylline は癌細胞の増殖抑制を標的とした従来の殺細胞性抗癌剤とは作用機序が異なり、宿主に対し細胞毒性のより少ない抗腫瘍剤としての可能性が示唆された。

癌細胞が原発病巣から離脱し、浸潤・転移を成立させるためにはいくつかの過程を経なければならない<sup>11)</sup>。血管内皮細胞における基底膜と癌細胞との相互作用に着目した Liotta の three step theory<sup>12)</sup>によると、原発病巣から離脱した癌細胞はつぎの 3 つのステップを踏んで新たに転移巣を形成するとされている。すなわち、最初に癌細胞は血管内皮細胞下に存在する基底膜へ接着し、次に、基底膜に接着した癌細胞は MMP (matrix metalloproteinase) によって基底膜を分解、破壊す

本論文は、Irie T, Kubushiro K, Suzuki K, Tsukazaki K, Umezawa K, Nozawa S : Inhibition of Attachment and Chemotactic Invasion of Uterine Endometrial Cancer Cells by a New Vinca Alkaloid, Conophylline. *Anticancer Res* 19 : 3061-3066, 1999 の一部を含む。

る<sup>13), 14)</sup>。最後に癌細胞が基底膜を足場として血管内に移動するというステップである。以上のように、癌転移成立のプロセスは複雑で、そのすべてを突破するために癌細胞はさまざまなステップを乗り越えることが必要となる。それゆえ、そのうちどれか一つのステップを阻止することができれば、癌細胞の浸潤・転移の抑制につながる可能性がある。

そこで本研究では、conophylline の子宮体癌に対する浸潤・転移抑制効果を評価するため、子宮体癌由来培養細胞株 SNG-II<sup>15)</sup> の細胞増殖に与える conophylline の影響を MTT assay により評価した後、ポイデンチャンパーによる *in vitro* invasion assay を施行した。その結果、conophylline は SNG-II 細胞の増殖を抑制しない濃度においてマトリゲルへの浸潤を抑制する結果を得た。Conophylline がこのマトリゲル浸潤のいずれのステップに影響を与えているかを解析することを目的とし、細胞接着能や接着分子に対する影響、細胞運動に対する影響をそれぞれ conophylline 添加群と conophylline 非添加群 (コントロール群) とに分け比較検討した。さらに、*in vivo* において、conophylline の子宮体癌由来培養細胞株 HOOUA<sup>16)</sup> に対する抗腫瘍効果についても検討し、conophylline が新たな抗転移薬、あるいは抗腫瘍剤になり得るか否かについて考察した。

## 材料と方法

### 1. 培養細胞株と細胞培養

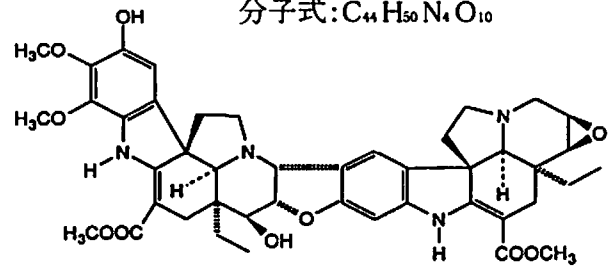
SNG-II 細胞<sup>15)</sup> (高分化型子宮体癌由来培養株: 慶應大学医学部産婦人科学教室)、HOOUA 細胞<sup>16)</sup> (低分化型子宮体癌由来培養株: 石渡産婦人科、石渡勇先生より供与) は、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium: 日水製薬) に 10% ウシ胎児血清とカナマイシン (明治製薬株式会社) 100 μg/ml を加えたものを培地として 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### 2. Conophylline

Conophylline (慶應大学理工学部梅澤教授より供与) は無色の物質で、分子量は FAB-MS (fast atom bombardment mass spectra) より 794 と決定され、分子式は HRFAB-MS (high-resolution fast atom bombardment mass spectra) および元素分析により C<sub>44</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> と確認されている (第 1 図)。Conophylline は、ベンゼンに溶解し冷凍または凍結乾燥した真空状態では安定である。そこで conophylline をベンゼン中に 1 mg/ml となるように溶解させ、-20°C で保存しておき、使用

分子量: 794

分子式: C<sub>44</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>



第 1 図 Conophylline の化学構造。

する場合は直前にベンゼンを完全に揮発させてメタノールで希釈した。細胞懸濁液に添加する際には懸濁液中の conophylline の最終濃度が体積比 1% となるように調整して添加した。コントロール群には conophylline の溶媒であるメタノールのみを、細胞懸濁液中の最終濃度が、同じく体積比 1% となるように添加した。

### 3. MTT Assay

0.56 × 10<sup>5</sup> 個/ml に調節した SNG-II 細胞の細胞懸濁液を 96 well (Falcon Lab ware) に 1 well につき 5000 (個) (90 μl) ずつまいた。24 時間培養後に conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3, 10 μg/ml) 添加し、さらに培養時間を 24 時間群と 48 時間群とに分け培養した。それぞれ培養終了後に dye solution を添加し、4 時間培養した。さらに、solubilization/stop solution を添加して 1 時間培養した後、これにより染色された細胞を分光光度計 590 nm の吸光度にて測定した。

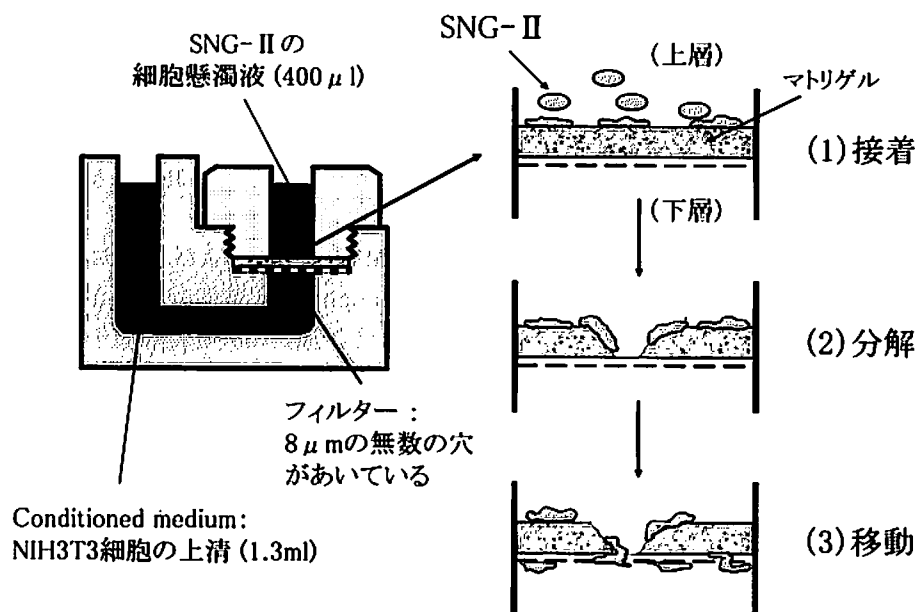
### 4. トリパンブルー細胞外排出試験

2.0 × 10<sup>6</sup> 個/ml に調整した SNG-II 細胞の細胞懸濁液を 24 時間培養した後、conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。さらに 48 時間培養後、新しい培地を加え、トリパンブルー液 (GibcoBRL Trypan Blue Stain 0.4%) を加えて細胞を染色した。血球計算盤にて全細胞数とトリパンブルー液で染色されない生細胞数をそれぞれカウントし、以下の計算式にて各濃度における細胞の生存率 (%) を求めた。

$$\text{生存率 (\%)} = (\text{生細胞数}) / (\text{全細胞数}) \times 100$$

### 5. ポイデンチャンパーによる *in vitro* invasion assay 二層式ケモタキ西斯チャンパー (ポイデンチャンパー:





第2図 ボイデンチャンパーを用いた *in vitro* invasion assay. ボイデンチャンパーの本体はポリカーボネイトフィルターによって、上下二層に仕切られている。癌細胞はポリカーボネイトフィルターにコートされたマトリゲルを分解し、フィルター下に存在する走化性因子 (conditioned medium: chemoattractant) に応答して8 μmの無数の小孔を通過し、フィルター下面に移動し付着する。図はポリカーボネイトフィルターにコートされたマトリゲルを浸潤しているSNG-II細胞の概念図である。

永大産業株式会社) を用いた (第2図)。

直径8 μmの無数の穴があいた直径13 mmのポリカーボネイトフィルター (以下フィルター: Costar) 上にマトリゲル (Becton Dickinson Lab ware) を10 μgコートし、乾燥させた。2.0×10<sup>5</sup>個/mlに調整したSNG-II細胞を24時間培養した後、conophyllineを各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。これらをさらに48時間培養後、PBSで洗浄し新しい培地を加え、5.0×10<sup>5</sup>個/mlに希釈し、実験用細胞懸濁液とした。

マトリゲルをコートし、乾燥させた先のフィルターをチャンパーにセットした。その後、チャンパーの下層にconditioned mediumを1.3 ml入れ、上層にはconophyllineを各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した細胞懸濁液を400 μl入れた。これを24時間培養した後、フィルター下面に浸潤した細胞を固定・染色し、200倍の顕微鏡視野でフィルターごとに10視野ずつ数えることにより浸潤細胞数を計測した。

## 6. 細胞接着能と接着分子に与える影響

1) 細胞接着能に与える影響: 2.0×10<sup>5</sup>個/mlに調整し

たSNG-II細胞を24時間培養した後、conophyllineを各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。さらに48時間培養し、マトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンを固相化したwell dish (Becton Dickinson; Biocoat Cell ware) に1.0×10<sup>5</sup>個/mlに調整したSNG-II細胞を1 mlずつまき、30分間培養した。その後3分間シェーカーにて振とうすることにより非接着細胞を除去し、残った細胞を接着細胞とした。Wellに接着した細胞はグルタルアルデヒドで室温に15分間固定し、0.05%のクリスタルバイオレットを加え、室温に15分間置くことで染色した。染色された接着細胞の色素を0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/EtOH (50%) で抽出し、色素を吸光度計540 nmの吸光度にて測定した。

2) 接着分子に与える影響: 2.0×10<sup>5</sup>個/mlに調整したSNG-II細胞を24時間培養した後、conophylline濃度0.3 μg/mlを添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。これらをさらに48時間培養した後培地を除去し、遠心チューブに回収した。1000 rpm 5分間遠心分離し、PBSで洗浄後細胞数を5.0×10<sup>5</sup>個/ml

に調節した。これに、FITC 標識抗 integrin  $\beta 1$  抗体 (住友電工, Yokohama, Japan), 抗 CD44 抗体 (IMMUNOTECH, Marseille, France) を 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加し, 水上で 30 分間反応させた。その後 1000 rpm 5 分間遠心分離し, PBS で 3 回洗浄後, PBS300  $\mu\text{l}$  で再懸濁させ, フローサイトメトリー (EPICS Profile II, Coulter, Hialeah, USA) にて測定した。測定結果は縦軸を細胞数, 横軸を FITC 蛍光強度とするヒストグラムに表示し, conophylline 添加群とコントロール群との蛍光強度の分布の差異を検討した。

## 7. 細胞運動に与える影響

$2.0 \times 10^5$  個/ml に調整した SNG-II 細胞を 24 時間培養した後, conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加した。さらに 48 時間培養し, ほぼ confluent となった時点で, マイクロピペット用のチップの先端で well の中央部に一直線に線を引いた後 24 時間培養した。細胞の移動距離は 400 倍顕微鏡下  $10 \times 10$  方眼のマス目を用い, 傷つけ直後のマス目の数から 24 時間後のマス目の数を引くことにより細胞の移動距離として算出した。

## 8. 細胞形態変化

$1.0 \times 10^5$  個/ml に調整した SNG-II 細胞を 24 時間培養した後, conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加した。コントロール群にはメタノールのみを添加し, さらに 48 時間培養した時点で顕微鏡 200 倍の視野で観察した。

## 9. *In vivo* における conophylline の抗腫瘍効果

ヌードマウスは 5 週齢の雌 BALB/cA Jcl-*nu* を日本クレア (東京) から購入した。実験は当大学の実験動物センターで滅菌飼料, 滅菌水を与え可能な限り無菌状態で飼育した。ヌードマウスに  $1.0 \times 10^7$  個/ml に調整した HOOA 細胞を背側左皮下に移植した。HOOA 細胞は SNG-II 細胞と比べ, *in vivo* での皮下移植に対して生着率と細胞増殖率が高く, conophylline 投与による抗腫瘍効果を検討する実験により適切であると考え用いた。推定腫瘍重量は Geran らの方法<sup>17)</sup>により, 推定腫瘍重量 (mg) =  $1/2 \times (\text{長径 mm}) \times (\text{短径 mm})^2$  として算出した。推定腫瘍重量が 300~400 mg となったところで (皮下移植後 10 日目), 一群のマウスを 4 匹とし, 隔日に conophylline を 0.01 mg/mouse 腹腔内注射した。*In vivo* では Umezawa らの方法<sup>18)</sup>により

conophylline をオリーブオイルで希釈し, コントロール群にはオリーブオイルのみを 100  $\mu\text{l}$  腹腔内注射した。腹腔内注射を 10 回行ったところで (皮下移植後 28 日目) 投与を終了した。

## 結 果

### 1. MTT Assay およびトリパンプルー細胞外排出試験

Conophylline 濃度 0.03~0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加群では, 24 時間培養後, 48 時間培養後のいずれにおいても conophylline 非添加群と比べ, SNG-II 細胞に対する細胞増殖にはほとんど影響を及ぼさなかった。しかし, conophylline 添加後 24 時間培養では 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  までの濃度まではほとんど細胞増殖に影響を認めなかったのに対し, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加では急激に細胞増殖の低下を認めた。同じく, conophylline 添加後 48 時間培養では 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  まではほとんど細胞増殖に影響を認めなかったが 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の濃度では徐々に細胞増殖の低下を認めた。48 時間培養の 50% 抑制濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は 6.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった (第 3 図)。

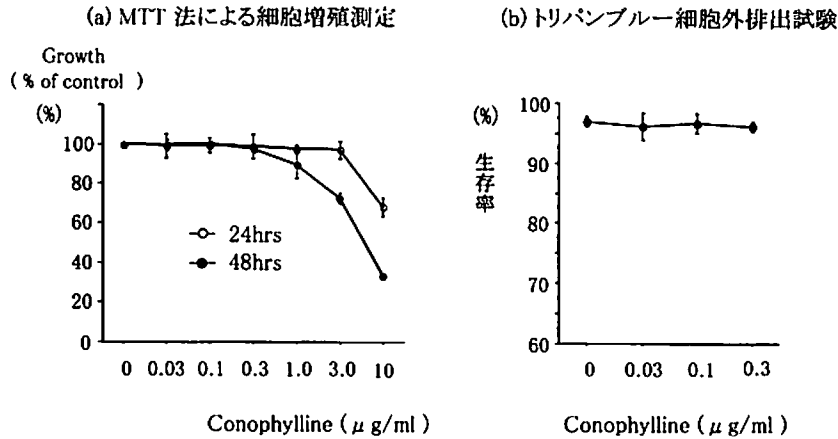
トリパンプルー細胞外排出試験においては, 48 時間培養したコントロール群の生存率は 96.9% であった。Conophylline 濃度 0.03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加群の生存率もそれぞれ 96.1%, 96.6%, 96.2% であり (第 3 図), コントロール群と比較し, 生存率にほとんど差を認めなかった。

### 2. ボイデンチャンバーを用いた *in vitro* invasion assay

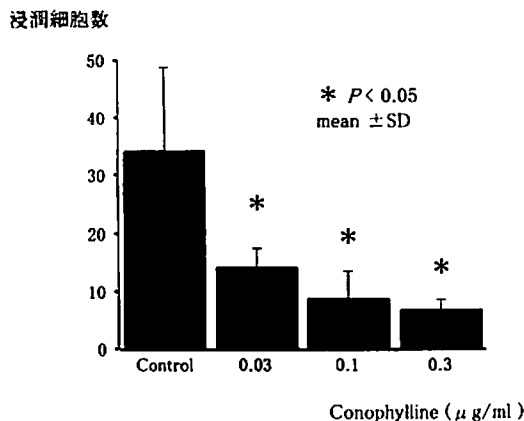
SNG-II 細胞を conophylline 添加後 48 時間培養し, ボイデンチャンバーでさらに 24 時間培養後, フィルター上にコートしたマトリゲルへの浸潤細胞数を 200 倍の顕微鏡視野でそれぞれ 10 カ所数えることにより計測した。SNG-II 細胞のマトリゲルへの浸潤細胞数はコントロール群では平均 34.5 であるのに対し, conophylline 濃度 0.03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ではそれぞれ平均, 14.2, 8.92, 6.69 となり, コントロール群と比べるとそれぞれ 41.2%, 25.2%, 19.4% と濃度依存的に減少した (第 4 図)。

### 3. 細胞接着能と細胞表面に発現する接着分子の発現に対する影響

細胞接着への影響を検討した結果, 固相化したマトリゲルへの接着率はコントロール群と比べ, conophylline 添加群 0.03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$



第3図 MTT assay およびトリパンプルー細胞外排出試験。(a) SNG-II 細胞を 24 時間培養後、conophylline を各濃度添加した。添加後さらに 24 時間、48 時間培養し、それぞれ培養終了後に Dye Solution を添加し、4 時間培養後 Solubilization/Stop Solution を添加して 1 時間培養した。これにより染色された細胞を分光光度計 590 nm の吸光度にて測定した。縦軸にはコントロール群を 100% としたときの、conophylline 各濃度における細胞数をパーセントで示した。(b) SNG-II 細胞の細胞懸濁液を 24 時間培養後、conophylline を各濃度添加した。さらに 48 時間培養後、トリパンプルー液を加えた。血球計算盤にて全細胞数、生細胞数をそれぞれカウントし、生存率 (%) = (生細胞数) / (全細胞数) × 100 にて各濃度における細胞の生存率 (%) を求めた。(Irie T et al : Anticancer Res 19 : 3061-3066, 1999 の Fig. 2 より許可を得て転載)



第4図 *In vitro* invasion assay における浸潤細胞数。SNG-II 細胞の細胞懸濁液を 24 時間培養した後、conophylline を各濃度 (0.03, 0.1, 0.3 μg/ml) 添加した。さらに 48 時間培養したものをサンプル用細胞懸濁液とした。マトリゲルをコートしたフィルターをチャンバーにセットし、conditioned medium を下層に入れ、上層にサンプル用細胞懸濁液を入れた。これを 24 時間培養後、フィルター下面に浸潤した細胞を 200 倍の顕微鏡視野で各濃度のフィルターごとに 10 カ所ずつ数えることにより、浸潤細胞数を計測した。(Irie T et al : Anticancer Res 19 : 3061-3066, 1999 の Fig. 5 より許可を得て転載)

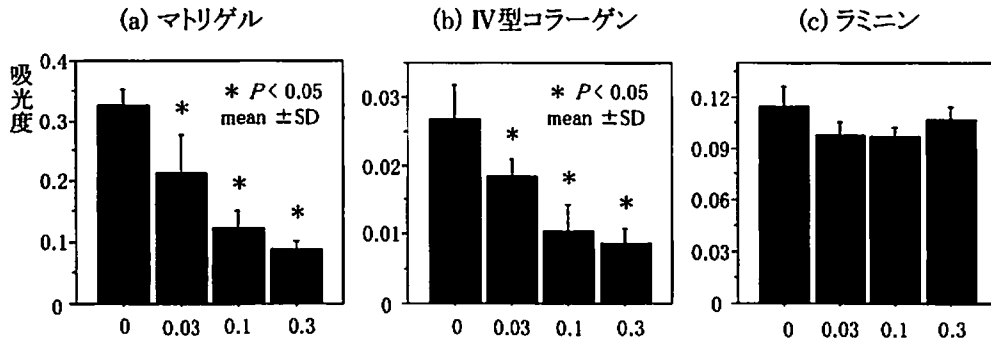
ではそれぞれ 65.6%、37.6%、26.9% と濃度依存的に減少した。

IV 型コラーゲンへの接着率においても、コントロール群と比べ、conophylline 添加群 0.03 μg/ml、0.1 μg/ml、0.3 μg/ml ではそれぞれ 68.5%、46.1%、32.5% と濃度依存的に減少した。しかし、ラミニンへの接着率はコントロール群と比べ、conophylline 添加群 0.03 μg/ml、0.1 μg/ml、0.3 μg/ml ではそれぞれ 86.4%、84.5%、95.5% と有意な差を認めなかった (第5図)。

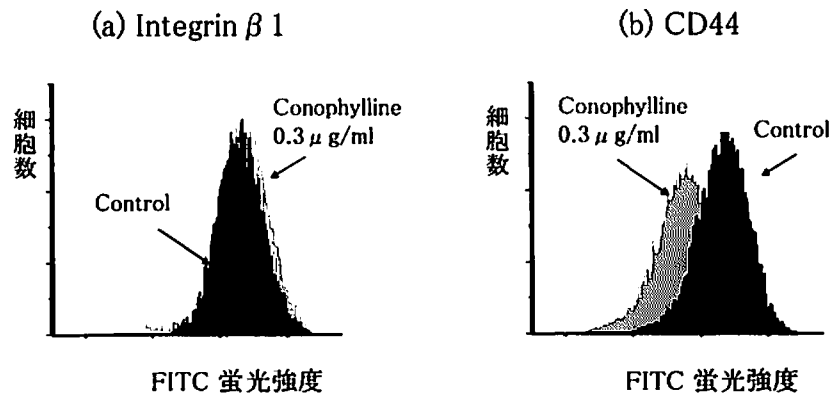
フローサイトメトリーによる接着分子の発現に対する影響を検討した結果、integrin β1 の蛍光強度は conophylline 添加 (灰色) のヒストグラムとコントロール (黒) とで蛍光強度の分布に変化は認められなかった。しかし、CD44 においては conophylline 添加 (灰色) のヒストグラムは、コントロール (黒) のヒストグラムと比べ蛍光強度の peak channel が左方へシフトし、その蛍光強度は減弱しているのが認められた (第6図)。

#### 4. 細胞運動に対する影響

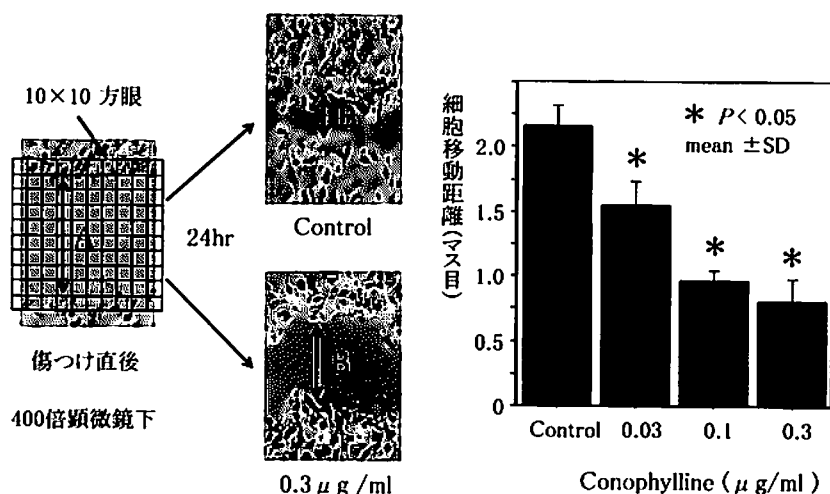
細胞の移動距離を 400 倍顕微鏡下 10×10 方眼のマス目を数えることにより計測した結果、細胞の移動距離



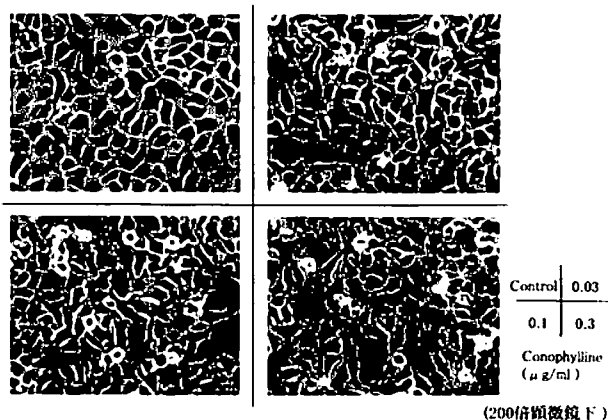
第5図 Conophyllineによる細胞接着への影響。SNG-II細胞を24時間培養した後、conophyllineを各濃度(0.03, 0.1, 0.3 μg/ml)添加し、conophylline非添加群にはメタノールのみを添加した。これらをさらに48時間培養した後、マトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンを固相化した24well dish (Becton Dickinson; Biocoat Cell ware)に $1.0 \times 10^5$  cells/mlに調整したSNG-II細胞を1mlずつまき、さらに30分間培養した。これらを3分間シェーカーにて振とうすることにより非接着細胞を除去し、残った細胞を接着細胞とした。Wellに接着した細胞を固定、染色し、染色された接着細胞の色素を吸光度計で波長540nmにて測定した。(Irie T et al: Anticancer Res 19: 3061-3066, 1999のFig. 4の一部より許可を得て転載)



第6図 細胞接着分子に与える影響。SNG-II細胞の細胞懸濁液を24時間培養した後conophylline濃度0.3 μg/mlを添加した。さらに48時間培養した後培地を除去し、遠心分離し、PBSで洗浄後細胞数を100 μl ( $5 \times 10^5$  cells)を分注し、FITC標識抗integrin β1抗体、抗CD44抗体をそれぞれ添加した。その後遠心分離し、PBSで洗浄後再びPBS 300 μlで懸濁させ、フローサイトメトリーにてこれらのFITC蛍光強度を計測した。黒色がコントロール、灰色がconophylline添加である。(Irie T et al: Anticancer Res 19: 3061-3066, 1999のFig. 7の一部より許可を得て転載)



第7図 細胞運動に与える影響. SNG-II細胞の細胞懸濁液を24時間培養した後, conophyllineを各濃度(0.03, 0.1, 0.3 μg/ml)添加した. さらに48時間培養した後, マイクロピペット用のチップの先端でwellの中央部に一直線に線を引いた後24時間培養した. 400倍顕微鏡下10×10方眼で, 傷つけ直後と24時間後の細胞間のます目の差を細胞が移動した距離として計測した. A: 傷つけ直後のます目の数, B: 24時間後のます目の数. 移動距離=A-B (Irie T et al: Anticancer Res 19: 3061-3066, 1999のFig. 6より許可を得て転載)



第8図 Conophylline添加によるSNG-II細胞の細胞形態変化. SNG-II細胞の細胞懸濁液を24時間培養した後, conophyllineを各濃度(0.03, 0.1, 0.3 μg/ml)添加した. さらに48時間培養した時点で顕微鏡200倍の視野で観察を行った. (Irie T et al: Anticancer Res 19: 3061-3066, 1999のFig. 3より許可を得て転載)

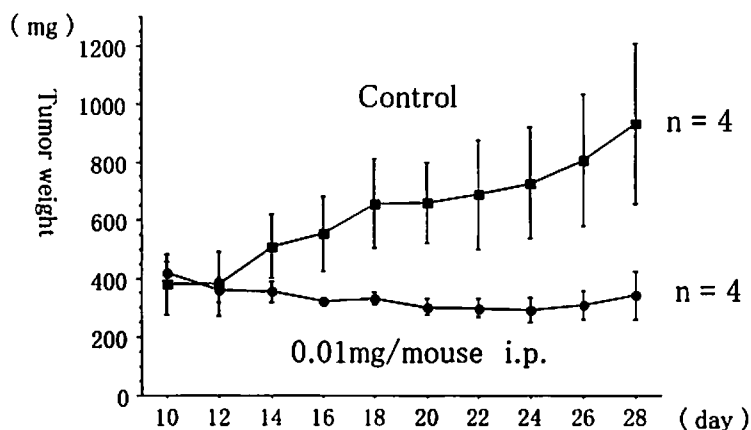
は, コントロール群ではます目の平均が2.20であるのに対し, conophylline濃度0.03 μg/ml, 0.1 μg/ml, 0.3 μg/ml添加群ではそれぞれ1.52, 0.96, 0.78となりコントロール群と比べるとそれぞれ69.0%, 45.6%, 35.4%と濃度依存的にその移動距離は減少した(第7図).

#### 5. 細胞の形態変化に与える影響

Conophylline濃度0.03~0.3 μg/ml添加後48時間培養においてSNG-II細胞は濃度依存的に細胞相互の結合が徐々に粗となり, 糸状仮足様の細胞突起が現れるのが観察された(第8図). この変化はconophyllineを添加している間持続したが, conophyllineを除去することにより可逆性を示した.

#### 6. In vivoにおけるconophyllineの抗腫瘍効果

Conophylline投与終了時(皮下移植後28日目), HOUA細胞を皮下移植したヌードマウスのいずれにおいても腫瘍死あるいは衰弱死は見られなかった. Conophylline投与群ではHOUA細胞の腫瘍重量が300±20 mgであるのに対し, 非投与群では910±180 mgとなり, conophylline投与により腫瘍重量が約67%抑制された(第9図). 腫瘍重量計測後屠殺したマウ



第9図 *In vivo*における conophylline の抗腫瘍効果。ヌードマウスに  $1 \times 10^7$  cell/ml に調整した HOOA 細胞を背側皮下に移植した。推定腫瘍重量が、300~400 mg となったところで (皮下移植後 10 日目) 一群のマウスを 4 匹とし、隔日に conophylline を 0.01 mg (100  $\mu$ l)/mouse 腹腔内注射し、control 群 (100  $\mu$ l のオリーブオイルを腹腔内注射) と腫瘍重量を比較した。縦軸は腫瘍重量を、横軸は皮下移植してからの日数を示す。

スには conophylline 投与群、コントロール群共に腹腔内に明らかな転移巣は認められなかった。

### 考 察

子宮体癌の予後因子として癌細胞の筋層への浸潤の深さ、リンパ節転移の有無、組織分化度などがあげられる<sup>19)</sup>。Mariani らは、筋層浸潤の深さが筋層の 50% 以上のものは血行性転移の独立した危険因子であると報告し<sup>20)</sup>、さらに、これを当てはめると、子宮全摘術と標準的追加治療を施行した 915 人の子宮体癌患者のうち 24% に術後に血行性転移を生じる可能性があり、そのうちの 28% に肺や肝臓などに血行性転移を生じたと報告している<sup>21)</sup>。また、この割合はリンパ行性転移や腹腔内転移より多かったとしている。よって、子宮体癌に対し、血行性を含め転移を抑制する薬剤は有用な治療薬になると考えられる。

癌細胞の浸潤・転移において、基底膜は主要な役割を演じており、主として IV 型コラーゲン、ラミニン、ファイブロンectin、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックス成分により構成されている。基底膜そのものを分離することは技術的にも量的にも困難であるが、マウス EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) 腫瘍が基底膜と類似したマトリックス成分を産生していることが明らかとなり<sup>22)</sup>、マトリゲルとして市販されるようになった。この

マトリゲルを一定サイズのポアを有するフィルター上にコートし、ボイデンチャンバーに装着したアッセイ系は *in vivo* における転移能と良く相関することから、以降、基底膜浸潤に関わる癌細胞の浸潤・転移を抑制する物質の検討などに有用性の高い方法<sup>23), 24)</sup>として広く用いられるようになった。本研究において、ボイデンチャンバーによる *in vitro* invasion assay を施行した結果、conophylline は SNG-II 細胞の増殖を抑制しない濃度においてマトリゲルへの浸潤細胞数を抑制した。この結果を解析する上で、接着分子や細胞接着能に対する影響、細胞運動に対する影響に着目し、接着分子については integrin  $\beta 1$  と CD44 を、接着能についてはマトリゲル、IV 型コラーゲン、ラミニンについて検討した。

Integrin は  $\alpha$ ,  $\beta$  の組み合わせより 20 種類以上の integrin が存在するが<sup>25)</sup>、そのうち  $\beta 1$  は他の  $\beta$  サブユニットと比べ主なりガンドがコラーゲン、ラミニン、ファイブロンectinなどの細胞外マトリックス成分であることから本研究に用いた。子宮体癌と integrin との関連については、 $\alpha$  サブユニットと  $\beta 1$  の組み合わせで、これらのモノクローナル抗体を用い、*in vitro* invasion assay でのマトリゲル浸潤抑制効果が得られた報告<sup>26)</sup>や、免疫組織染色を用いて筋層浸潤やリンパ節転移した子宮体癌の integrin の発現を検討した報告がある<sup>27)</sup>。

CD44 はヒアルロン酸を始め、ファイブロンectin、IV 型コラーゲン、ラミニンなどの細胞外マトリックス

をリガンドとする膜貫通型タンパク質で、生体内に広く分布している<sup>28), 29)</sup>。CD44の遺伝子は20個のexonから構成され、うち細胞外領域の10個のvariant exon (v1~v10)のalternative splicingによって多数の変異体CD44 variant (CD44v)が存在する<sup>30)</sup>。CD44が癌の転移に関与する接着分子であることが報告されたのは1991年にGunthertら<sup>31)</sup>によって発表されたラット肺癌由来細胞株を用いた研究がその背景にある。以来、CD44と癌の浸潤・転移との関連性を論じた報告が数多く発表されており、子宮体癌との関連についての報告も多い<sup>16), 32-34)</sup>。本研究では最も生体内に広範囲に発現し<sup>29)</sup>、なおかつ子宮体癌との関与も報告されている標準型CD44 (CD44s)を用いておこなった<sup>32), 33)</sup>。

固相化したマトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンに対する細胞接着実験においてマトリゲル、IV型コラーゲンでは共に接着細胞数は濃度依存的に減少したが、ラミニンの接着細胞数には変化が認められなかった。また、フローサイトメトリーを用いた実験の結果、conophylline添加によりコントロールと比べ、integrin  $\beta 1$ ではその蛍光強度にほとんど変化を認めなかったが、CD44では蛍光強度の減弱を認めた。すなわち、conophylline添加によりSNG-II細胞の細胞表面に発現しているintegrin  $\beta 1$ の発現は変化せず、CD44の発現は低下したと考えられた。マトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンはいずれもintegrin  $\beta 1$ のリガンドであると共にCD44のリガンドでもある。よって、この結果に対する考察として、integrin  $\beta 1$ とCD44のいずれが主にこれらリガンドとの接着に影響を与えていたかが一つの重要な因子と考えられ、ラミニンとの接着に対してはintegrin  $\beta 1$ の方が結合特異性や親和性が高いため、接着細胞数に変化を認めず、マトリゲル、IV型コラーゲンの接着に対してはCD44の方が結合特異性や親和性が高いため、接着細胞数が減少したと推測された。Integrin  $\beta 1$ とラミニンとの結合特異性を検討した報告はある<sup>35), 36)</sup>が、integrin  $\beta 1$ とCD44に対し、リガンドへの結合特異性を直接比較検討した報告は認められない。よって、integrin  $\beta 1$ 、CD44に対するモノクローナル抗体を用いた接着阻止実験などにより、マトリゲル、IV型コラーゲン、ラミニンに対する接着細胞数がconophyllineの添加によりどのような影響を受けるかなど、今後の検討が必要と思われる。

癌転移の成立過程、とりわけ癌細胞が基底膜や周囲の正常組織などへ浸潤していく際には癌細胞の運動性は必要不可欠な細胞生物学的性状である。細胞運動は細胞形態の動的変化を伴い、細胞が前進するためには、細胞先

進部の細胞外マトリックスへの接着と細胞後端部の解離が必要である。すなわち、癌細胞の運動性を制御している重要な部分は癌細胞側の接着分子とそのリガンドであるといえる。本研究において、Wound assayを用いたconophyllineによる細胞の固有運動に対する影響を検討した結果、conophyllineを添加した群はコントロール群と比べ、濃度依存的に移動距離が減少した。ここで用いたconophylline濃度はSNG-II細胞の細胞増殖や生存率に影響を与えない濃度であることから、計測された細胞の移動距離は細胞増殖の影響によるものではなく、それぞれの濃度における運動能を表していると考えられた。先に検討したconophylline添加によるSNG-II細胞のリガンドへの接着能の低下が、細胞の移動距離の減少に関与していると推測された。また、conophylline添加による細胞形態に対する影響では、濃度依存的にSNG-II細胞相互の結合が徐々に粗となり、糸状足様の細胞突起が現れるのが観察された。これらの変化は細胞が運動(移動)するために必要な形態変化を反映していると推測され、conophyllineが細胞接着斑、アクチン線維束を中心とするストレスファイバーの形成に影響を与えている可能性が考えられた。

*In vivo*での実験を行うに際して、低分化型子宮体癌由来培養株HOOA細胞はSNG-II細胞と比べ、ヌードマウスでの皮下移植において生着率と細胞増殖率が高いため、conophylline投与による抗腫瘍効果を検討する実験に用いた。しかし、HOOA細胞は*in vitro*の実験では取り扱いが難しく、データの変動が大きいため、*in vitro*ではSNG-II細胞を、*in vivo*ではHOOA細胞を用いて実験を行った。また、conophyllineのHOOA細胞に対する細胞増殖に与える影響や細胞毒性について未知であったため、Umezawaらが*in vivo*で用いたconophylline濃度を参考とし、0.01 mg (100  $\mu$ l)/mouseで隔日に腹腔内投与とした<sup>18)</sup>。Conophylline投与終了時(皮下移植後28日目)、皮下移植したHOOA細胞の腫瘍重量はconophylline投与により約67%抑制され、*in vivo*においてはconophyllineの抗腫瘍効果が認められた。投与実験終了後屠殺したマウスでは、conophylline投与群コントロール群共に腹腔内に明らかな転移巣は認められず、このため、抗転移薬としての効果を評価することはできなかったが、conophylline投与群のいずれのマウスにおいても投与終了時まで生存しており、宿主に対する細胞毒性は少ないことが推測された。

以上、*in vitro*において、細胞接着能と細胞運動(移動)能に着目し検討した結果、conophyllineが細胞増

殖を抑制しない濃度において *in vitro* invasion assay でのマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた機序には、接着や細胞運動を制御する分子に影響を与えている可能性が示唆された。すなわち、conophylline 添加により、細胞が浸潤・転移するための最初のステップである基質への接着が抑制されてその足場を失い、細胞運動(移動)ができなかったことが原因であると考えられた。また、*in vivo* における実験では、皮下移植腫瘍の細胞増殖を抑制する結果を得た。

以上のことから、conophylline は子宮体癌細胞の接着分子や細胞運動を制御する分子を標的とした新たな抗転移薬、あるいは殺細胞性の少ない抗腫瘍剤としての可能性が考えられた。今後 conophylline の分子標的のさらなる解明により、臨床応用の可能性が示唆された。

現在のところ、conophylline はヒト T 細胞白血病細胞を用いた実験により、tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) レセプターを down regulation させることで、リガンドに誘導される nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) の活性を抑制する<sup>37)</sup>ことが判明している。また、ラット胎児膵臓培養細胞やラット膵臓腺房腫瘍細胞を用いた実験にて、conophylline 投与により neurogenin3 の誘導活性が見いだされ<sup>38)</sup>、膵幹細胞から  $\beta$  細胞への分化誘導作用が認められた<sup>39)</sup>と報告されている。NF- $\kappa$ B はアポトーシスにも関与している転写因子であり<sup>40)</sup>、また、neurogenin3 は膵幹細胞から  $\beta$  細胞への分化に関与する転写因子である。種々の表現型を変化させることから conophylline の標的分子は一般的に転写制御因子に関わっていることが推測されている。

## 総括

新規ピンカアルカロイド conophylline は、キョウチクトウ科植物である *Ervatamia microphylla* の葉の抽出物から精製された。本研究ではヒト子宮体癌由来培養細胞株 SNG-II 細胞に対する *in vitro* における浸潤能抑制効果と、HOCUA 細胞に対する *in vivo* における抗腫瘍作用について検討し、conophylline が新たな抗転移薬、あるいは抗腫瘍剤になり得るか否かについて検討した。

Conophylline は子宮体癌細胞において、細胞増殖を抑制しない濃度でマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた。この機序を解析する目的で、細胞が浸潤・転移するために必要なステップである細胞接着能と細胞運動能に着目した実験を行い、以下の結果を得た。

Conophylline は (1) 固相化したマトリゲルや IV 型コラーゲンへの接着数を減少させた。(2) wound

assay にて細胞運動能を抑制した。(3) フローサイトメトリーを用いた実験において CD44 の発現を減弱させた。さらに、*in vivo* における実験では、子宮体癌細胞を皮下移植したヌードマウスのいずれにおいても投与終了時まで衰弱死を認めず、コントロール群と比べ約 67% 腫瘍重量を抑制した。

Conophylline がマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた機序には、接着や細胞運動を制御する分子に影響を与えている可能性が考えられた。すなわち、conophylline 投与により、細胞が浸潤・転移するための最初のステップである基質への接着が抑制されてその足場を失い、細胞運動(移動)ができなかったことが原因と考えられた。さらに、*in vivo* における実験では、コントロール群と比べ腫瘍重量を抑制したことから、conophylline が抗腫瘍効果を有することが認められた。また、conophylline 投与により、いずれのマウスにおいても衰弱死を認めなかったことから、宿主に対する細胞毒性は少ないことが予想された。以上のことから、conophylline は新たな抗転移薬、あるいは殺細胞性の少ない抗腫瘍剤としての可能性を有していると考えられた。今後 conophylline の分子標的のさらなる解明により、臨床応用の可能性が示唆された。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科教室野澤志朗教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に有益な御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学理工学部応用化学科生物化学教室梅澤一夫教授に深謝いたします。さらに、久布白兼行講師に深く感謝いたします。また、実験を様々な面から援助して下さった産婦人科学教室塚崎克己助教授、鈴木完哉氏、婦人科病理研究室諸兄に感謝をいたします。

本研究の一部は、第 57 回日本癌学会総会、第 51 回日本産科婦人科学会総会、第 38 回日本癌治療学会総会、第 7 回がん転移研究会総会、第 6 回 International Gynecologic Cancer Society において報告した。

また、本研究の一部は平成 9 年度文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) 課題番号 9771299 によった。

## 文 献

- 1) Kerbel R, Folkman J: Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2: 727-739, 2002
- 2) Lee AV, Schiff R, Cui X, Sachdev D, Yee D, Gilmore AP, Streuli CH, Oesterreich S, Hadsell DL: New mechanisms of signal transduction inhibitor action:



- receptor tyrosine kinase down-regulation and blockade of signal transactivation. *Clin Cancer Res* 9 : 516S-523S, 2003
- 3) Preiss J, Loomis CR, Bishop WR, Stein R, Nidel JE, Bell RM : Quantitative measurement of sn-1, 2-diacylglycerols present in platelets, hepatocytes, and ras- and sis-transformed normal rat kidney cells. *J Biol Chem* 5 : 8597-8600, 1986
  - 4) Umezawa K, Ohse T, Yamamoto T, Koyano T, Takahashi Y : Isolation of a new vinca alkaloid from the leaves of *Ervatamia microphylla* as an inhibitor of ras functions. *Anticancer Res* 14 : 2413-2418, 1994
  - 5) Kam TS, Loh KY, and Wei C : Conophylline and conophyllidine : new dimeric alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *J Nat Prod* 56 : 1865-1871, 1993
  - 6) Wilson L, Creswell KM, Chin D : The mechanism of action of vinblastine. Binding of [acetyl-3H] vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules. *Biochemistry* 30 : 5586-5592, 1975
  - 7) Owellen RJ, Hartke CA, Dickerson RM, Hains FO : Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the Vinca alkaloid class. *Cancer Res* 36 : 1499-1502, 1976
  - 8) Bradshaw GL, Dubes GR : Supplementary factors required for serum-free culture of rat kidney cells of line NRK-49F. *In Vitro* 19 : 735-742, 1983
  - 9) De Vouge MW, Mukherjee BB : Transformation of normal rat kidney cells by v-K-ras enhances expression of transin 2 and an S-100-related calcium-binding protein. *Oncogene* 7 : 109-119, 1992
  - 10) Amino N, Ohse T, Koyano T and Umezawa K : Inhibition of cellular chemo tactic invasion by a vinca alkaloid, conophylline. *Anticancer Res* 16 : 55-60, 1996
  - 11) Poste G, Fidler IJ : The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283 : 139-146, 1980
  - 12) Liotta LA, Rao N and Wewer UM : Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann Rev Biochem* 55 : 1037-1057, 1986
  - 13) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA : Tumor cell interactions with the extra cellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9 : 541-573, 1993
  - 14) Liotta LA, Steeg PS and Stetler-Stevenson WG : Cancer metastasis and angiogenesis. An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64 : 121-125, 1991
  - 15) Nozawa S, Sakayori M, Ohta K, Iizuka R, Mochizuki H, Soma M, Fujimoto J, Hata J, Iwamori M and 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
  - 16) Fujita N, Yaegashi N, Ide Y, Sato S, Nakamura M, Ishiwata I, Yajima A : Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues : possible implication of reduced expression of CD44 in lymphovascular space involvement of cancer cells. *Cancer Res* 54 : 3922-3928, 1994
  - 17) Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM : Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (third edition). *Cancer Chemotherapy Rep* 3 : 51-52, 1972
  - 18) Umezawa K, Taniguchi T, Toi M, Ohse T, Tsutsumi N, Yamamoto T, Koyano T, Ishizuka M : Growth inhibition of K-ras-expressing tumors by a new vinca alkaloid, conophylline, in nude mice. *Drugs Exp Clin Res* 22 : 35-40, 1996
  - 19) Kadar N, Malfetano JH, Homesley HD : Determinants of survival of surgically staged patients with endometrial carcinoma histologically confined to the uterus : implications for therapy. *Obstet Gynecol* 80 : 655-659, 1992
  - 20) Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Calori G, Podratz KC : Hematogenous dissemination in corpus cancer. *Gynecol Oncol* 80 : 233-238, 2001
  - 21) Mariani A, Dowdy SC, Keeney GL, Long HJ, Lesnick TG, Podratz KC : High-risk endometrial cancer subgroups : candidates for target-based adjuvant therapy. *Gynecol Oncol* 95 : 120-126, 2004
  - 22) Orkin RW, Gehron P, Mcgoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R : A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 145 : 204-220, 1977
  - 23) Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM and McEwan RM : A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47 : 3239-3245, 1987
  - 24) Repesh LA : A new *in vitro* assay for quantitating tumor cell invasion. *Invasion Metastasis* 9 : 192-208, 1989
  - 25) Hynes RO : Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell* 48 : 549-554, 1987
  - 26) Prifti S, Zourab Y, Koumouridis A, Bohlmann M, Strowitzki T, Rabe T : Role of integrins in invasion of endometrial cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 84 : 12-20, 2002
  - 27) Lessey BA, Albelda S, Buck CA, Castelbaum AJ, Yeh I, Kohler M, Berchuck A : Distribution of integrin cell adhesion molecules in endometrial cancer. *Am J Pathol* 146 : 717-726, 1995
  - 28) Jalkanen S, Jalkanen M : Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116 : 817-825, 1992
  - 29) Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Gunthert U : Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 124 : 71-82,

1994

- 30) Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI : Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 : 12160-12164, 1992
- 31) Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H : A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65 : 13-24, 1991
- 32) Hoshimoto K, Yamauchi N, Takazawa Y, Onda T, Taketani Y, Fukayama M : CD44 variant 6 in endometrioid carcinoma of the uterus : its expression in the adenocarcinoma component is an independent prognostic marker. *Pathol Res Pract* 199 : 71-77, 2003
- 33) Tokumo K, Kodama J, Seki N, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Kudo T : CD44 exon v6 is not implicated in the progression and metastasis of endometrial cancer. *Cancer Lett* 125 : 221-225, 1998
- 34) Tempfer C, Haeusler G, Kaider A, Hefler L, Hanzal E, Reinthaller A, Breitenecker G, Kainz CH : The prognostic value of CD44 isoform expression in endometrial cancer. *Br J Cancer* 77 : 1137-1139, 1998
- 35) Hall DE, Reichardt LF, Crowley E, Holley B, Moezzi H, Sonnenberg A, Damsky CH : The alpha 1/beta 1 and alpha 6/beta 1 integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol* 110 : 2175-2184, 1990
- 36) Kikkawa Y, Sanzen N, Fujiwara H, Sonnenberg A, Sekiguchi K : Integrin binding specificity of laminin-10/11 : laminin-10/11 are recognized by alpha 3 beta 1, alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins. *J Cell Sci* 113 : 869-876, 2000
- 37) Gohda J, Inoue J, Umezawa K : Down-regulation of TNF-alpha receptors by conophylline in human T-cell leukemia cells. *Int J Oncol* 23 : 1373-1379, 2003
- 38) Umezawa K, Hiroki A, Kawakami M, Naka H, Takei I, Ogata T, Kojima I, Koyano T, Kowithayakorn T, Pang HS, Kam TS : Induction of insulin production in rat pancreatic acinar carcinoma cells by conophylline. *Biomed Pharmacother* 57 : 341-350, 2003
- 39) Ogata T, Li L, Yamada S, Yamamoto Y, Tanaka Y, Takei I, Umezawa K, Kojima I : Promotion of beta-cell differentiation by conophylline in fetal and neonatal rat pancreas. *Diabetes* 53 : 2596-2602, 2004
- 40) Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X : A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 11 : 561-570, 2003

慶應医学 第82卷第4号号外  
平成17年12月25日

# 博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第178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 9月12日 慶大博士甲第2483号	松岡克善	昭和47年 2月20日
同 同 第2484号	湯浅慎介	昭和49年 1月12日
平成17年10月17日 慶大博士甲第2492号	森泰昌	昭和46年 2月21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 9月12日 慶大博士乙第3957号	天川和久	昭和42年 1月17日
同 同 第3958号	池田俊之	昭和36年 8月 3日
同 同 第3959号	石井智弘	昭和42年 1月 6日
同 同 第3960号	板橋裕史	昭和47年 6月21日
同 同 第3961号	一色郁子	昭和43年 5月 9日
同 同 第3962号	入江琢也	昭和35年12月29日
同 同 第3963号	香取信之	昭和43年 9月26日
同 同 第3964号	杵渕修	昭和44年 5月17日
同 同 第3965号	佐藤慎二	昭和34年12月10日
同 同 第3966号	佐藤博子	昭和42年 3月20日

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成17年9月12日 慶大博士乙第3967号	佐野元昭	昭和43年1月23日
同 同 第3968号	鈴木敏雄	昭和31年2月4日
同 同 第3969号	高野洋之	昭和43年1月26日
同 同 第3970号	高山伸	昭和44年11月18日
同 同 第3971号	田村睦弘	昭和44年9月12日
同 同 第3972号	寺下謙三	昭和28年7月10日
同 同 第3973号	成毛聖夫	昭和40年12月25日
同 同 第3974号	前野晋一	昭和47年7月2日
同 同 第3975号	三浦勇太	昭和39年6月5日
同 同 第3976号	宮木幸一	昭和49年11月12日
同 同 第3977号	森文子	昭和45年11月27日
同 同 第3978号	山下博	昭和42年10月18日
平成17年11月14日 慶大博士乙第3980号	清水篤	昭和48年10月30日
同 同 第3981号	清水壮一	昭和36年11月8日
同 同 第3982号	徳山丞	昭和45年6月24日
同 同 第3983号	平野早秀子	昭和38年4月27日
同 同 第3984号	北條隆	昭和42年10月3日
同 同 第3985号	吉津晃	昭和42年1月5日

## 目 次

松岡 克善	<p>T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease.          (T-betの発現上昇とその後のinterleukin-12刺激が、クローン病におけるTh1細胞による免疫学的な病態の誘導に必須である) …………… 6</p>	6
湯浅 慎介	<p>Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells          (ノギンによるBMPシグナルの一過性の抑制はマウス胚性幹細胞を心筋細胞に分化させる) …………… 7</p>	7
森 泰昌	<p>Combination of hTERT and <i>bmi-1</i>, E6, or E7 Induces Prolongation of the Life Span of Bone Marrow Stromal Cells from an Elderly Donor without Affecting Their Neurogenic Potential          (高齢者ドナー由来の骨髄間葉系細胞へのhTERT及び<i>bmi-1</i>, E6, E7遺伝子導入組み合わせによる寿命延長と神経様細胞への分化誘導) …………… 8</p>	8
天川 和久	<p>SUPPRESSIVE EFFECTS OF DIESEL EXHAUST PARTICLES ON CYTOKINE RELEASE FROM HUMAN AND MURINE ALVEOLAR MACROPHAGES.          (ディーゼル排気微粒子はヒトとマウスの肺泡マクロファージのサイトカイン産生を抑制する) …………… 9</p>	9
池田 俊之	<p>本邦中高年女性における不定愁訴の実態についての検討 …………… 10</p>	10
石井 智弘	<p>The Roles of Circulating High-Density Lipoproteins and Trophic Hormones in the Phenotype of Knockout Mice Lacking the Steroidogenic Acute Regulatory Protein.          (Steroidogenic acute regulatory protein欠損マウスの表現型における高密度リポ蛋白と性腺刺激ホルモンの関与) …………… 11</p>	11
板橋 裕史	<p>A New Method for Manufacturing Cardiac Cell Sheets Using Fibrin-Coated Dishes and Its Electrophysiological Studies by Optical Mapping.          (フィブリン塗布培養皿を用いた心筋細胞シートの作成法および電気生理学的検討) …………… 12</p>	12
一色 郁子	<p>Genetic analysis of hereditary factor X deficiency in a French patient of Sri Lankan ancestry : <i>in vitro</i> expression study identified Gly366Ser substitution as the molecular basis of the dysfunctional factor X.          (スリランカ系フランス人に発症した凝固第X因子欠損症の遺伝学的解析 : 発現実験による機能不全の原因変異Gly366Serの同定) …………… 13</p>	13
入江 琢也	<p>新規ピンカアルカロイドconophyllineの子宮体癌細胞に対する抗腫瘍効果に関する検討…………… 14</p>	14
香取 信之	<p>A Novel Method to Assess Platelet Inhibition by Eptifibatid with Thrombelastograph®          (トロンボエラストグラフを用いた、糖蛋白Ⅱb/Ⅲa阻害薬エプティフィバタイトによる血小板機能抑制効果の新たな評価法) …………… 15</p>	15
杵渕 修	<p>Temporal patterns of progression and regression of electrical and mechanical remodeling of the atrium.          (持続的心房高頻度刺激による心房筋の電氣的、機械的リモデリングの形成および回復過程の検討) …………… 16</p>	16

佐藤 慎二	Autoantibodies to a 140-Kilodalton Polypeptide, CADM-140, in Japanese Patients With Clinically Amyopathic Dermatomyositis (Clinically Amyopathic Dermatomyositis患者血清中に見出された140kDa蛋白を認識する自己抗体(抗CADM-140抗体)に関する研究) ……………	17
佐藤 博子	Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. (間葉系幹細胞移植は皮膚創傷の皮膚の初期再生に効果を認める) ……………	18
佐野 元昭	Interleukin-6 Family of Cytokines Mediate Angiotensin II -induced Cardiac Hypertrophy in Rodent Cardiomyocytes. (アンジオテンシンIIによるIL-6族サイトカインの誘導と心肥大における意義) ……	19
鈴木 敏雄	Signals mediated by FcγR II A suppress the growth of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. (FcγR II Aからのシグナルは、B細胞系の急性リンパ性白血病細胞の増殖を抑制する。) ……………	20
高野 洋之	IL-4 regulates chemokine production induced by TNF-α in keratocytes and corneal epithelial cells. (IL-4による培養角膜実質および上皮細胞におけるケモカイン産生の制御) ………	21
高山 伸	The Relationship Between Bone Metastasis from Human Breast Cancer and Integrin α <sub>v</sub> β <sub>3</sub> Expression. (乳癌骨転移とインテグリンα <sub>v</sub> β <sub>3</sub> の発現の関係) ……………	22
田村 睦弘	Targeted Expression of Anti-Apoptotic Protein p35 in Oligodendrocytes Reduces Delayed Demyelination and Functional Impairment After Spinal Cord Injury (オリゴデンドロサイトにおける抗アポトーシス蛋白p35の標的発現は脊髄損傷後の遅発性脱髄を減少させ運動機能回復を促進させる) ……………	23
寺下 謙三	Two serine residues distinctly regulate the rescue function of Humanin, an inhibiting facotor of Alzheimer's disease-related neurotoxicity : functional potentiation by isomerization and dimerization (2個のセリン残基によるアルツハイマー病関連神経細胞死抑制因子ヒューマニンの活性制御機構:異性体化と2量体化による増強) ……………	24
成毛 聖夫	Interleukin-10 expression is correlated with growth fraction in human non-small cell lung cancer xenografts. (非小細胞肺癌xenograftにおけるInterleukin-10発現と細胞増殖分画との関連) ………	25
前野 晋一	The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. (単層及び3次元培養において、カルシウムイオン濃度が、骨芽細胞の生存・増殖・分化に与える影響) ……………	26
三浦 勇太	Expressed Emotion and Social Functioning in Chronic Schizophrenia (慢性統合失調症における感情表出と社会機能) ……………	27
宮木 幸一	Assessment of tailor-made prevention of atherosclerosis with folic acid supplementation : randomized, double-blind, placebo-controlled trials in each MTHFR C677T genotype (葉酸補充によるテイラーメイドな動脈硬化予防の評価: MTHFR遺伝子C677T多型で層別化したプラセボ対照二重盲検ランダム化比較試験) ……………	28
森 文子	Analysis of 109 Japanese children's lip and nose shapes using 3-dimensional digitizer. (三次元デジタイザーを用いた日本人正常幼児109人の口唇外鼻形態分析) ………	29

山下 博	女性性器癌細胞における $\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素の発現とその細胞生物学的特性におよぼす影響	30
清水 篤	IgG Binds to Desmoglein 3 in Desmosomes and Causes a Desmosomal Split Without Keratin Retraction in a Pemphigus Mouse Model. (天疱瘡モデルマウスにおいて、IgG自己抗体はデスモソーム内のデスモグレイン3に直接結合し、ケラチン線維の退縮をとまわずにデスモソームを半割する。)	31
清水 壮一	Detection of IL-2 Receptor Gene Expression in Peripheral Blood from Renal Transplant Patients (腎移植患者末梢血におけるIL-2 receptor遺伝子発現の検出)	32
徳山 丞	Tyrosine Kinase Inhibitor SU6668 Inhibits Peritoneal Dissemination of Gastric Cancer <i>Via</i> Suppression of Tumor Angiogenesis. (チロシンキナーゼ阻害剤SU6668は腫瘍血管新生阻害によって胃癌細胞の腹膜転移を抑制する)	33
平野早秀子	HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction. (熱ショック蛋白27は線維芽細胞の接着、運動、基質収縮を制御する)	34
北條 隆	Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues. 乳癌組織におけるmaspin蛋白の発現と組織学的悪性度と血管新生との関係についての解析。	35
吉津 晃	Hemorrhagic Shock Resuscitation With an Artificial Oxygen Carrier, Hemoglobin Vesicle, Maintains Intestinal Perfusion and Suppresses the Increase in Plasma Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . (出血性ショック蘇生における人工酸素運搬体、ヘモグロビン小胞体投与による腸管血流維持と血漿中Tumor Necrosis Factor $\alpha$ の抑制)	36



# T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease

(T-betの発現上昇とその後のinterleukin-12刺激が、クローン病におけるTh1細胞による免疫学的な病態の誘導に必須である)

松岡 克善

## 内容の要旨

### 【背景】

クローン病 (CD) の腸管局所では、interferon (IFN)- $\gamma$ 産生に特徴づけられるT helper cell type 1 (Th1) 型反応が惹起されている。naïve T細胞からTh1細胞への分化のmaster switchとして転写因子T-box expressed in T cells (T-bet) が同定・報告された。

### 【目的】

CDの病態形成におけるT-betの役割を明らかとすることを目的とした。

### 【材料・方法】

- (1) 外科切除された腸粘膜よりEDTA-collagenase-Percoll法により腸粘膜内リンパ球 (lamina propria mononuclear cell; LPMC) を分離した。
- (2) 比重遠心法で末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) を分離した。
- (3) LPMCおよびPBMCよりCD4+細胞を磁気ビーズ法で分離した。
- (4) CD・潰瘍性大腸炎 (UC) ・正常コントロール (NL) より分離したCD4+LPMCにおけるT-bet mRNA転写量を定量的RT-PCR法にて測定した。また、T-bet蛋白の発現をWestern blotting法にて検討した。
- (5) LPMCの培養上清中のIFN- $\gamma$ およびinterleukin (IL)-12濃度を測定した。
- (6) LPMCをIL-12, 18で刺激し、T-bet発現および培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度を検討した。
- (7) CD4+PBMCを抗CD3/CD28抗体で刺激し、1) 培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度、2) T-bet発現、3) IL-12受容体 $\beta$ 2鎖の発現について検討した。

### 【結果】

- (1) CDから分離したCD4+LPMCにおいて、UC・NLと比較してT-bet mRNA転写量・蛋白発現量ともに有意に増加していた。
- (2) CDのLPMCにおいて、UC・NLと比較してIFN- $\gamma$ およびIL-12の産生量が有意に増加していた。
- (3) CDより分離したLPMCはIL-12およびIL-18刺激によりIFN- $\gamma$ 産生が亢進したが、T-betの発現量に変化はなかった。
- (4) CD4+PBMCでは抗CD3抗体刺激によりT-betが発現した。T-betの発現とともにPBMCはIFN- $\gamma$ を産生するようになり、またIL-12受容体 $\beta$ 2鎖を発現し、IL-12によるさらなるIFN- $\gamma$ 産生亢進に感受性となった。

### 【結論】

CDの腸管局所では、T細胞は抗原刺激によってT-betを発現しTh1細胞への分化を開始、その後樹状細胞・マクロファージからのIL-12/IL-18刺激により、さらに強固なTh1反応が誘導され、腸管炎症が惹起されていると考えられた。

## 論文審査の要旨

腸管の慢性肉芽腫性炎症性疾患であるクローン病の腸管局所ではinterferon (IFN)- $\gamma$ 産生に特徴づけられるT helper cell type 1 (Th1) 優位の免疫反応が惹起されている。クローン病におけるTh1細胞の誘導にはinterleukin (IL)-12, IL-18といった樹状細胞・マクロファージから分泌されるサイトカインの重要性が報告されているが、転写因子レベルでの制御機構については明らかにされていない。本研究では、Th1特異的な転写因子であるT-box expressed in T cells (T-bet) がクローン病の腸管局所のCD4陽性細胞で発現が亢進していること、またT-betが抗原刺激によって誘導されること、T-betが誘導された後にIL-12受容体が発現しIL-12によるIFN- $\gamma$ 産生亢進に対して感受性になることを示した。以上の結果よりT-betがクローン病の腸管局所のTh1細胞誘導に関与している可能性が示唆された。

審査では、まずT-betの機能はマウスでは詳細に分析されていることを踏まえて、本研究の新規性について質問があり、ヒトの検体を用いて詳細にクローン病におけるT-betの関与を検討した点が本研究の新規性であると回答された。また、本研究中でIL-12+IL-18によるTh1細胞誘導の亢進が示されているが、IL-18単独ではTh2細胞を誘導するとの報告があり、その点に関する検討も行うべきであるとの指摘がなされた。次に、クローン病の中でもT-bet発現量に幅があることから薬剤や疾患活動度による影響はないのか、という点に関して議論となった。手術標本を用いるため臨床背景を揃えることは困難であったが、薬剤・採取部位・炎症の程度についてはT-bet発現量とは有意な相関は認めなかったと回答され、それに対して組織学的な炎症像とT-bet発現についても検討すべきであるとの指摘がなされた。さらに、T-betのクローン病の治療標的としての可能性についての言及がなされ、T-betは転写因子であるのでsiRNAによる抑制が新たな治療法として考えられるとの回答があった。最後に、今回の結果より考えられるクローン病の病因について議論がなされた。T-betの発現を誘導しているのは、樹状細胞・マクロファージなどの抗原提示細胞であること、近年報告されたクローン病の疾患感受性遺伝子は全てマクロファージに関連した遺伝子であることより、食餌抗原や細胞内寄生菌を適切に処理できず樹状細胞・マクロファージが異常に活性化されることが病態の根幹である可能性が高いとの回答がなされた。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、クローン病のTh1細胞誘導機構における転写因子レベルでの制御機構の一端を明らかにした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 日比 紀文

医化学 末松 誠 微生物学・免疫学 小安 重夫

外科学 北島 政樹

学力確認担当者：

審査委員長：末松 誠

試問日：平成17年 7月26日

# Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells

(ノギンによるBMPシグナルの一過性の抑制はマウス胚性幹細胞を心筋細胞に分化させる)

湯 浅 慎 介

## 内容の要旨

胚性幹細胞は心筋細胞に分化しうる魅力的な幹細胞である。胚性幹細胞より心筋細胞を分化誘導する方法は現在まで様々なものが報告されているが、そのどれも満足のいくものではない。胚性幹細胞の分化は正常の発生を模倣していると言われているが、心臓発生に必要とされている因子を加えただけでは高率には分化しえないと言われている。心筋細胞の発生は全身の臓器の中でも最も早期、すなわち原腸陥入が始まり三胚葉が形成され始めるマウスの胎生7.0日目に始まる。心筋細胞の初期発生における重要な因子は過去に様々なものが報告されており、BMP (Bone morphogenic protein), Wnt, FGF (Fibroblast growth factor), IGF-1 (Insulin like growth factor-1) などがあるが、これらを胚性幹細胞に添加しても、心筋細胞への分化誘導効率の上昇を確認しえなかった。さらに心筋細胞発生に最も重要な因子と考えられているBMPを添加した際には心筋細胞への分化誘導効率が若干低下することが確認された。我々はまず心筋細胞の発生過程を見直す必要があると考え、過去に報告されている因子とは別の様々な因子の発現状態を調べることにした。この結果、心筋細胞の発生領域においてBMP antagonistのNogginが一過性であるが非常に強く発現していることが分かった。これは心筋細胞の発生自体にBMPを阻害するNogginが必要であるが、発生後の心筋細胞の成熟と維持にはNogginの存在は不都合であると考えられる。心筋予定領域の発生過程におけるNogginの発現状況を参考に、胚性幹細胞から心筋(前駆)細胞への分化誘導条件について種々検討を重ねた結果、培養時の初期にNogginを添加することにより、自律拍動能を有する心筋細胞が、選択的かつ高率に産生されることを見いだした。過去のBMP signalの心筋細胞発生における重要性の検討から、当初NogginはBMP signalをブロックする以外の機能があるのではないかと考えた。しかしながら、胚性幹細胞の分化過程ではNoggin存在下においてBMPを添加すると心筋細胞の発生は著明に抑制され、またNoggin以外のBMPをブロックする物質(Chordin, soluble BMP receptor)を胚性幹細胞に添加した際にもNogginと同様に心筋細胞を高率に分化誘導し得ることが分かった。これより、Nogginによる心筋発生促進作用はBMPを阻害することによると考えられた。また、免疫染色、RT-PCR、Western blot等の手法を用い、本方法により胚性幹細胞から作製された拍動性細胞は、典型的な心筋細胞の特徴を有する細胞であることが確認された。これらの結果より、胚性幹細胞を用いた心筋再生療法が躍進的に進歩することが期待される。

## 論文審査の要旨

胚性幹細胞(ES細胞)は高い増殖能と分化能から再生医学領域で高く注目されている。ヒトES細胞を用いた心筋再生療法を実現するには有効な分化誘導法の確立が急務である。ES細胞分化は発生を模倣しているが、発生に必要な因子を加えただけでは高率には分化しない。心筋発生に重要な因子として、BMP (Bone morphogenic protein) などがあるが、それらを添加しても心筋細胞への分化誘導効率の上昇を確認されず、BMPを添加した際にはむしろ低下することが確認された。そこで心筋細胞の発生過程を見直したところ、心筋細胞の発生領域においてBMP antagonistのNogginが発現していることが判明した。Nogginの発現状況を参考に分化誘導条件の検討結果から、培養時の初期にNogginを添加することにより、心筋細胞が選択的かつ高率に産生されることを見いだした。さらにNoggin以外のBMPをブロックする物質をES細胞に添加した際にも心筋細胞を高率に分化誘導しうることを明らかにした。

審査では、まずBMPおよびNogginの発生学的な意味づけについて質問がなされた。BMPは心筋細胞の発生において必須であるとされているが、BMPは心筋細胞発生初期においては発生を抑制している可能性が示されており、主に発生した心筋細胞の維持に作用していると考えられている。未分化な細胞から心筋細胞へ分化する初期にのみNogginが作用し、以降は心筋細胞を維持するという点でBMPが作用していると予測されると回答された。

Noggin処理によりBrachyury陽性細胞が得られ心筋細胞分化に貢献するとのことだが、他の系譜への分化について質問がなされた。BrachyuryはES細胞から血球へ分化する際のマーカーとして重要であるとの報告がされているが、血球や血管などのマーカーの上昇は確認し得ず心筋細胞へ分化する傾向があることを確認したと回答された。細胞あたりのBrachyury RNA量がコントロールに比べNoggin処理により数倍以上多く、性質が違うことが予測されるという回答がなされた。BrachyuryやFlklなどのマーカーをもとにFACSを用いてprospectiveな検討をするべきであるとの助言がなされた。

最後に、ヒトES細胞における心筋再生療法の開発に関し、本法の位置づけはどの質問がなされた。ヒトES細胞は倫理的問題もあり、どこでも研究できるというわけではないが、過去の報告から推測するとマウスES細胞と類似点と相違点がある。すなわち、本法をそのままヒトES細胞に適用するのではなく、さらに工夫していく必要があると思われると回答された。

以上のように本研究は、今後検討されるべき課題を残しているものの、ES細胞より心筋細胞への分化誘導方法を確立したという点において有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡

外科学 四津 良平 発生・分化生物学 須田 年生

解剖学 仲嶋 一範

学力確認担当者:

審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年 8月 1日

# Combination of hTERT and *bmi-1*, E6, or E7 Induces Prolongation of the Life Span of Bone Marrow Stromal Cells from an Elderly Donor without Affecting Their Neurogenic Potential

(高齢者ドナー由来の骨髄間葉系細胞へのhTERT及び*bmi-1*, E6, E7遺伝子導入組み合わせによる寿命延長と神経様細胞への分化誘導)

森 泰 昌

## 内容の要旨

ヒト骨髄間葉系細胞はこれまで骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、心筋細胞等の中胚葉由来である細胞のみならず神経外胚葉への分化も報告されている。しかしながらヒト骨髄間質細胞は分離培養が容易であるがその増殖には限界がある。ヒト骨髄由来間葉系細胞はES細胞、ある種の癌細胞とは異なりテロメラーゼ活性が存在せず理論的にテロメア短縮により絶対寿命が存在する。またテロメラーゼサブユニットであるhTERTのみの導入では延命できないことが報告されている。本研究では、91歳の高齢者から得られたいくつかの骨髄間質細胞種からH4-1と名付けたクローンをその対象とした。これらの骨髄間質細胞もこれまでの報告と同様にhTERTのみの導入によるテロメラーゼ活性を誘導しても延命できなかった。またこの際にp16の発現増加が見られRb経路の活性が*in vitro*における寿命を規定していることが示された。Rb/p16経路に拮抗するために内因性遺伝子である*Bmi-1*、HPVのE7の高発現により細胞は寿命を延長し、さらにp53経路に拮抗するHPVのE6の導入により細胞は長期増殖が可能となった。またE6E7のみの導入により長期延命した細胞にはテロメラーゼ活性は起きずにテロメア短縮によるクライシスを迎えることが確認された。これらの細胞のうちE7, hTERT導入群では長期培養にもかかわらず染色体の異常を認めなかった。次にこれらの寿命延長細胞が遺伝子導入前の骨髄間質細胞の性格を保持出来ているかの検討を行った。*in vitro*の系を用いて神経系への分化誘導プロトコールを作成し、神経系への分化誘導を行ったところ突起の延長等の形態学的に神経細胞様への変化をきたした。これらの細胞の分化誘導前後をgene chipによる遺伝子の発現の網羅的解析による比較検討を行った結果いくつかの重要な神経関連遺伝子の発現がみられ、それらの分子について遺伝子および蛋白レベルでの発現を確認した。さらにこれらの神経様細胞が細胞興奮性を有しているかをカルシウムイメージング法により検討した結果、細胞の興奮性が確認された。

本研究において本来の骨髄間質細胞の性質を維持した状態での寿命延長が可能であることが示された。また骨髄間質細胞の寿命延長機構を解明した。今後本研究において得られた遺伝子導入による寿命延長細胞は、細胞の増殖と癌化のメカニズム、そして可塑性を有す未分化機構の解明の有用なツールとなると考えられる。また将来的に中枢神経系の自己細胞移植による治療法開発に貢献する可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

ヒト骨髄間葉系細胞は、これまで多分化能を有することが報告されている。しかしながらヒト骨髄間葉系細胞は腫瘍細胞株以外での長期にわたる研究は困難であった。本研究では、高齢者から得られたH4-1と名付けたクローンを対象とした。この細胞のRb/p16経路に拮抗するために*Bmi-1*, E7遺伝子の導入、さらにp53経路に拮抗するE6により長期増殖が可能となった。これらの細胞に予めhTERTを導入した細胞群は事実上の不死化が示され、E7, hTERT導入群では、長期の培養によっても染色体の異常を認めなかった。次に寿命延長細胞を*in vitro*の系を用いて神経系への分化誘導を行ったところ神経細胞様分化を示し、分化誘導前後を遺伝子、蛋白レベルでの発現解析を行った。さらにカルシウムイメージング法による細胞の興奮性が確認された。以上より本来の性質を維持した状態での寿命延長が可能であることが示された。

審査では、まず導入した遺伝子の上記の組み合わせの理由について、また単一の遺伝子導入での結果について質問がなされた。これについて、単一遺伝子のみの導入では寿命延長を得られなかったこと、またこれまでのE6, E7, hTERTの研究成果を基盤にp16蛋白を抑制する内在性遺伝子である*bmi-1*を組み合わせることで細胞寿命延長と間葉系細胞の有す多分化能の維持を目的としたと回答された。次に作成された細胞のクローナリティー及びそれぞれのクローン間の違いについての質問がなされた。クローナリティーについてはおそらくクローナルな集団と考えているがその詳細な検討は行ってないこと、及び各遺伝子の組み合わせに各3クローン作成して検討した結果、基本的に同様の性質を示すも一部では異なる性質を示すクローンも認めたと回答された。次にこれらの細胞でのがん化と不死化の違いについての質問がなされた。これについて、増殖能の極めて高い細胞クローンに対して分化誘導を行うと細胞形態の変化と共に細胞死を起こすことなくその増殖を停止する。また移植し長期間の観察を行っても、これまでの結果では、腫瘍の形成を認めていないと回答された。この原因については興味深い遺伝子の関与が予測されているがその機構は解析されて今後課題となるとの現状が説明された。また神経分化誘導に際し*Num1*の過剰発現についての意義、その機能についての質問がなされた。これに対して、現状では検討はなされておらず詳細について更なる検討が必要であると回答された。また神経細胞機能の検討としてカルシウムイメージングだけでは不十分であり、また領域特異的な遺伝子の発現等を含め詳細な検討が必要であるとの指摘を受けた。

以上の様に本研究は今後更に検討すべき点はあるものの、未分化能を維持した寿命延長細胞の確立と、本研究において得られた寿命延長細胞は、細胞の増殖と癌化のメカニズム、そして可塑性を有す未分化機構の解明の有用なツールとなり今後の研究の発展が期待される点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 病理学 坂元 亨宇

発生・分化生物学 須田 年生 生理学 岡野 栄之  
病理学 岡田 保典

学力確認担当者：

審査委員長：須田 年生

試問日：平成17年 9月21日

# SUPPRESSIVE EFFECTS OF DIESEL EXHAUST PARTICLES ON CYTOKINE RELEASE FROM HUMAN AND MURINE ALVEOLAR MACROPHAGES.

(ディーゼル排気微粒子はヒトとマウスの肺胞マクロファージのサイトカイン産生を抑制する)

天 川 和 久

## 内容の要旨

【背景】大気汚染物質のうち粒径が $10\mu\text{m}$ 以下のものは浮遊微粒子 (suspended particulate matterあるいは $\text{PM}_{10}$ ) と呼ばれ、その大気中濃度の上昇と呼吸器疾患の関連があることが疫学的に報告された。我が国における $\text{PM}_{10}$ の発生源はディーゼル自動車からの排気ガスに含まれるディーゼル排気微粒子 (diesel exhaust particles ; DEP) で、肺胞マクロファージ (AM) を介する免疫反応に影響を与えることが示されているが、その機序は十分に明らかになっていない。そこで本研究はDEPへの曝露がAM機能、特にサイトカイン産生に及ぼす影響についてヒトおよびマウスのAMを用いて検討することを目的とした。

【材料および方法】ディーゼルエンジンよりDEPを集め、 $50\text{mM}$ リン酸緩衝液中に浮遊させ超音波破砕機で攪拌しDEP浮遊液 ( $0\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を作成した。気管支肺胞洗浄 (BAL) で採取し培養液に混和したマウスAMをDEPに24時間曝露、上清のTNF- $\alpha$ 、IL-6をELISAで測定した。マウスAMをエンドトキシンおよびIFN- $\gamma$ で刺激後同様にDEPに曝露、上清のTNF- $\alpha$ 、IL-6を測定した。BALで採取した健常ヒトAMをエンドトキシンで刺激後DEPに曝露、上清のTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8を測定した。Superoxide dismutase (SOD) で前処置したマウスAMをDEPに曝露、上清の活性酸素濃度を化学発光法で測定し、IL-6を測定した。マウスAMをカーボン粒子 ( $0\sim 100\mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびDEPのメタノール抽出成分 ( $0\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) にそれぞれ曝露、TNF- $\alpha$ 、IL-6を測定した。マウス・ヒトAM曝露時のDEPの細胞障害性について上清のLDH濃度、トリパンブルー色素排除法、WST-8法で検討した。

【結果】DEP曝露によりマウスAMのTNF- $\alpha$ 、IL-6産生は抑制された。エンドトキシン、IFN- $\gamma$ で刺激したマウスAMのTNF- $\alpha$ 、IL-6産生はDEP曝露により濃度依存性に抑制された。エンドトキシン刺激後のヒトAMのTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8産生はDEP曝露 ( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) により抑制された。SODの前処置によりDEPによる活性酸素の産生は低下し、同時にIL-6の産生減少作用も部分的に抑制された。カーボン粒子曝露ではマウスAMからのTNF- $\alpha$ およびIL-6産生は抑制されなかった。メタノール抽出分画 ( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 曝露で、マウスAMのTNF- $\alpha$ 、IL-6産生は抑制された。細胞障害性については本研究で用いた濃度 ( $0\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) のDEPでは示さなかった。

【結果】DEP曝露が肺の炎症に対し抑制的に作用する可能性と、その抑制効果がDEPの核となる炭素粒子ではなく、メタノール抽出成分に起因し活性酸素が関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

ディーゼル自動車の排気ガスに含まれるディーゼル排気微粒子 (diesel exhaust particles ; DEP) は重要な大気汚染物質で、肺胞マクロファージ (AM) の免疫反応を低下させるがその機序は明らかではない。本研究ではDEPへの曝露がAMのサイトカイン産生に及ぼす影響について、ヒトおよびマウスのAMを用いて検討した。マウスAMにそのまま、あるいはエンドトキシンないしIFN- $\gamma$ で刺激後、DEPを曝露、上清のTNF- $\alpha$ ・IL-6をELISAで測定した。ヒトAMではエンドトキシン刺激後DEPを曝露、TNF- $\alpha$ ・IL-6・IL-8を測定した。結果、DEP曝露によりマウス・ヒト共にサイトカイン産生は抑制された。またSuperoxide dismutase (SOD) で前処置後のマウスAMにDEPを曝露、上清の活性酸素濃度とIL-6を測定したところ、SODでDEPによる活性酸素濃度は低下、IL-6の産生減少作用は抑制された。またマウスAMにカーボン粒子およびDEPのメタノール抽出分画を曝露した結果、カーボン粒子でサイトカイン産生は抑制されず、メタノール抽出分画では抑制された。上清のLDH濃度、トリパンブルー色素排除法、WST-8法による検討では、本研究で用いたDEP濃度 ( $0\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) では細胞傷害性は示さなかった。以上から、DEPは細胞傷害性を示さずに肺の炎症に抑制的に作用すること、その作用がメタノール抽出成分に起因し活性酸素が関与していることが示唆された。

審査では、より高濃度のDEPでの反応について質問があり、細胞傷害性が認められたと回答されたが、細胞傷害性を示す濃度も併せて記載されるべきだとの助言がなされた。また本実験はin vitroでの検討だったが、in vivoでのDEPの作用について質問があり、動物のDEP吸入実験においても、サイトカインのmRNA発現が抑制される報告や易感染性が誘発される報告があると回答された。またAM間の相互作用が実験に影響を与える可能性についても検討される必要があるとの指摘もされた。メタノール抽出分画作成時に生じた沈殿物に生体へ作用する物質が含まれていないかとの質問には、メタノール抽出分画分離後の炭素粒子は活性酸素を産生しないとの報告があり生体へ作用する物質が含まれる可能性は低いのではないかと回答された。メタノール抽出分画のどの成分がサイトカイン抑制作用を有するのか、成分分析を含め検討されるべきであるとの助言もされた。また一部に統計処理での不備があることと、DEPとそのメタノール抽出分画の提供元についての記載が不十分であるとの指摘もあった。

以上、本研究ではなお検討すべき課題を残しているものの、重要な大気汚染物質であるDEPが肺に与える影響について、AMのサイトカイン産生という点から明らかにした意義のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡

外科学 小林 紘一 衛生学公衆衛生学 大前 和幸

微生物学・免疫学 小安 重夫

学力確認担当者：北島 政樹、小林 紘一

審査委員長：小林 紘一

試験日：平成17年 7月29日

# 本邦中高年女性における不定愁訴の実態についての検討

池田 俊之

## 内容の要旨

(目的) 近年、欧米だけでなく本邦でも多くの医療機関において更年期障害の治療が行われているが、更年期における中高年女性の身体的および精神的変化は、卵巣機能低下に起因する女性ホルモンの分泌低下だけでなく加齢や社会心理学的要因などにも修飾されることにより様々な不定愁訴として出現する。そのため、更年期障害の概念は年代や地域によっても異なり、更年期障害の診断に明確な診断基準は存在しないのが現状である。これまでに我々は、本邦と欧米では更年期障害として出現する諸症状が異なることにより更年期障害の概念に差異が生じている仮説を検証する目的で当科更年期外来の初診患者を対象とした調査研究を施行した結果、「全身倦怠」や「肩こり」が、欧米では最高頻度で認められる「hot flush」や「発汗」よりも症状の出現頻度および重症度が高いことを報告した。ただし、これらの結果のみから本邦中高年女性の更年期における諸症状の一般的特徴と結論づけることは困難である。そこで、本研究では本邦一般健常中高年女性にみられる不定愁訴の実態について検討する目的で慶應式調査票を用いたアンケート調査を施行し、得られた結果を解析検討した。

(方法) 平成13年4月から平成16年3月までに埼玉県内各地域の保健センターに訪れた40歳以上60歳未満の一般健常中高年女性398名を調査対象とした。調査40項目の症状毎に有症率と重症率を算出し、同時期に慶應義塾大学病院産婦人科更年期外来を受診した初診患者309例を対象とした同内容の調査結果と比較検討した。また、対象を閉経前期、閉経周期、閉経早期、閉経後期の4群に分類し、4群間における各症状の有症率と重症率を比較検討した。

(結果) 以下の事実を見出した。①一般健常中高年女性に高頻度で出現する症状の大半は加齢的变化に関連する症状であった。②更年期外来受診者と同様、一般健常中高年女性においても「腰が痛い」「肩こりがある」等の症状における重症度が高い傾向を示した。③更年期外来受診者と同様、一般健常中高年女性においても更年期障害の代表的症状とされる「hot flush」や「不眠」は最高頻度の症状ではなく、閉経周期や閉経後早期に多く認められる傾向を示した。

(結論) 一般健常中高年女性における更年期の不定愁訴の頻度および重症度は、更年期外来受診者と同様の傾向を示した。今回の調査により、欧米とは異なる日本人中高年女性全般における更年期不定愁訴の特徴が存在することを明らかにした。

## 論文審査の要旨

更年期障害は症状や発症頻度に人種差や地域差があるといわれ、日本と欧米ではその発症要因における概念が異なり未だに統一した診断基準が存在しない。また、世界的にも更年期女性に出現する諸症状の実態についての検討がなされていないのが現状である。本研究では、慶應義塾大学産婦人科更年期外来受診者を対象に行った先行研究にて得られた「欧米とは異なる更年期不定愁訴の特徴が存在する」という結論が健常中高年女性という更に一般化された対象集団においても同様であるという仮説を検証する目的で、埼玉県内各地域の保健センター来訪者を対象として、慶應式更年期調査票を用いて不定愁訴の実態(有症率と重症率)とその症状群の月経状況との関連を更年期外来受診者との結果と比較して検討した。

審査では、まず更年期症状はその有症率ではなく発生率を検討する必要があるとの指摘がなされた。これに対し、今回の研究では最近出現した症状を有する患者の割合という意味において有症率という用語を使用したとの回答がなされたが、用語の使い方に誤解を招く可能性があることが指摘された。次に「hot flush」や「発汗」が単なる加齢現象ではなく女性ホルモン低下による症状とされる根拠について質問がなされた。これに対して、更年期外来受診者における縦断的調査で、それらの症状は女性ホルモン低下により出現するが時間的経過により消失することが明らかにされていると回答された。また、更年期障害をホルモンの障害、精神障害、器質的障害等に分けて議論すべきではないかとの検討課題がなされた。さらに、不定愁訴を訴える更年期外来受診者の中にはうつ病患者が混在している可能性があるとの指摘がなされた。これに対して、当科更年期外来ではSDS (Self-Rating Depression Scale) にて抑うつの評価を行い、必要を認めた症例については精神科受診としていると回答された。一方、更年期障害に対する治療内容についての質問がなされ、長期間のHRT (Hormone Replacement Therapy) の危険性を指摘した米国におけるWomen's Health Initiativeの報告もあり、HRTの他に漢方療法、自律神経調節薬、抗うつ薬、カウンセリング等を症例ごとに選択していると回答がなされた。最後に、一般健常中高年女性と更年期外来受診者の比較検討には、更年期外来受診者が身体症状を訴える傾向が多いことから、精神症状と身体症状とに分けた分析を行うとさらにその差異が明確となるのではないかと提案がなされた。また、一般健常中高年女性と更年期外来受診者には異なった性格傾向があるのではないかと指摘がなされた。これらについては今後検討すべき課題とされた。

以上のように、本研究ではなお検討すべき課題はあるものの、本邦における一般中高年婦人の不定愁訴の実態を同一の調査指標を用いて明らかにした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
精神神経科学 鹿島 晴雄 衛生学公衆衛生学 大前 和幸  
内科学 鈴木 則宏  
学力確認担当者: 北島 政樹、鹿島 晴雄  
審査委員長: 鹿島 晴雄  
研究指導者: 野澤 志朗 (産婦人科学)

試問日: 平成17年 7月 5日

# The Roles of Circulating High-Density Lipoproteins and Trophic Hormones in the Phenotype of Knockout Mice Lacking the Steroidogenic Acute Regulatory Protein.

(Steroidogenic acute regulatory protein欠損マウスの表現型における  
高密度リポ蛋白と性腺刺激ホルモンの関与)

石井 智弘

## 内容の要旨

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) は副腎皮質・性腺で発現し、ステロイドホルモン合成の律速段階であるミトコンドリア外膜から内膜へのコレステロール転送を促進する。実際にStAR遺伝子変異を持つヒト先天性リポイド副腎過形成患者およびStAR欠損マウスでは、副腎皮質・性腺でのステロイドホルモン産生能が低下し、ステロイドホルモン産生細胞の細胞質に多量の脂肪滴が蓄積する。細胞質内に蓄積した脂肪滴はコレステロールエステルを主成分とし残存するステロイドホルモン産生能を二次的に障害すると提唱されている。しかし、StAR欠損下における脂肪滴蓄積の機序は解明されていない。

本研究ではStAR欠損下で副腎皮質・性腺に蓄積する脂肪滴の由来、蓄積の制御因子を*in vivo*で解析する目的で、高密度リポ蛋白 (HDL) の主要構成蛋白の一種であるアポリポ蛋白A-I (Apo A-I) 欠損マウスおよび性腺刺激ホルモン分泌ホルモン遺伝子に欠失をホモ接合体で持つhypogonadal (hpg) マウスそれぞれでStARを欠損させた二種類の複合ホモ接合体マウス (StAR欠損/Apo A-I欠損マウス、StAR欠損/hpgマウス) を作成し表現型を解析した。週齢8のStAR欠損/Apo A-I欠損マウスの血清プロゲステロン (P4)、コルチコステロン (CS)、雄のテストステロン (T) 濃度はStAR欠損マウスと有意差はなかったが、雌のエストラジオール (E2) 濃度は有意に低かった [平均±標準誤差、StAR欠損/Apo A-I欠損 (n=4) 3 ± 1、StAR欠損 (n=4) 13 ± 5 pg/ml、P=0.02]。日齢0のStAR欠損/Apo A-I欠損マウスの副腎皮質細胞と胎児型Leydig細胞、週齢8の副腎皮質細胞、成人型Leydig細胞、卵巣間質・莖膜細胞に蓄積する脂肪滴はStAR欠損マウスに比し軽度であった。週齢8のStAR欠損/hpgマウスの血清P4、CS、雌のE2濃度はStAR欠損マウスと有意差はなかったが、雄のT濃度は有意に低かった [StAR欠損/hpg (n=4) 0.037 ± 0.013、StAR欠損 (n=5) 0.465 ± 0.068 ng/ml、P=0.01]。日齢0のStAR欠損/hpgマウスの胎児型Leydig細胞ではStAR欠損マウスと同様の脂肪滴の蓄積が生じたが、週齢8の成人型Leydig細胞、卵巣間質・莖膜細胞では明らかな脂肪滴の蓄積は認められなかった。週齢8からの妊娠牝馬血清性腺刺激ホルモン5単位/日、5ないし10日間の投与により、StAR欠損/hpgマウスの成人型Leydig細胞、卵巣間質・莖膜細胞ではStAR欠損マウス同様の多量の脂肪滴の蓄積が生じたが、hpgマウスでは野生型と同程度であった。以上の結果は、StAR欠損下で副腎皮質・性腺に蓄積する脂肪滴の供給源が主にHDLであること、StAR欠損下における性腺への脂肪滴の蓄積が思春期以降では性腺刺激ホルモンにより直接誘導されることを示唆する。

## 論文審査の要旨

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) はステロイドホルモン合成の律速段階であるミトコンドリア外膜から内膜へのコレステロール転送を調節する。StAR遺伝子変異を持つ先天性リポイド副腎過形成患者とStAR欠損マウスでは、副腎皮質・性腺でのステロイドホルモン産生能が低下し、細胞質に多量の脂肪滴が蓄積する。本研究ではStAR欠損下で副腎皮質・性腺に蓄積する脂肪滴の由来、蓄積の制御因子を*in vivo*で解析することを目的とし、StARおよびアポリポ蛋白A-I (Apo A-I) 両者を欠損したStAR/Apo A-Iダブルノックアウトマウス、StARを欠損しかつ性腺刺激ホルモン分泌ホルモン遺伝子にホモ接合性欠失を有するStAR欠損/hypogonadal (hpg) マウスの二種類の遺伝子改変マウスを作成し表現型を解析した。その結果、StAR欠損下において、副腎皮質・性腺に蓄積する脂肪滴の供給源が主に高密度リポ蛋白 (HDL) であること、性腺への脂肪滴の蓄積が性腺刺激ホルモンにより直接誘導されることを初めて明らかにした。

審査では、第一に、StAR欠損/hpg雄マウスの血清テストステロン濃度がStAR欠損雄マウスより低値であることについて質問がなされた。StAR非依存性のテストステロン産生能の存在を示唆する所見で、コレステロールの自由拡散ないしStARを代償する未知の蛋白の関与が推測される、との回答がなされた。第二に、Apo A-Iに着目した理由について質問がなされた。齧歯類では生理的ステロイドホルモン合成に利用されるコレステロールが主にHDLに由来することが判明していたため、との回答がなされた。第三に、脂質蓄積の結果生じる細胞機能障害の機序について質問がなされた。ミトコンドリア外膜へのコレステロール蓄積によるミトコンドリアの変性あるいは外膜へ局在する蛋白の機能低下が考えられる、との回答がなされた。第四に、ヒト先天性リポイド副腎過形成症の治療における本研究の意義について質問がなされた。本研究から性腺刺激ホルモン分泌の抑制により脂質蓄積を回避できることが示唆され、女性患者における卵巣機能不全の発症予防に性腺刺激ホルモンの分泌抑制が有効である可能性を示した点で臨床的意義がある、との回答がなされた。第五に、雌マウスの血清エストラジオール濃度の測定においては性周期を考慮すべきであった、StAR欠損/hpg雄マウスに投与する外来性性腺刺激ホルモンとしてはヒト絨毛性性腺刺激ホルモンが適当であった、とのコメントがなされた。

以上、本研究はさらに検討すべき課題はあるものの、StAR欠損下で副腎皮質・性腺に生ずる脂肪滴蓄積の機序の一部を解明した点で極めて有意義な基礎研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 孝雄  
産婦人科学 吉村 泰典 医化学 末松 誠  
産婦人科学 青木 大輔  
学力確認担当者: 北島 政樹、吉村 泰典  
審査委員長: 吉村 泰典

試問日: 平成17年 7月 8日

# A New Method for Manufacturing Cardiac Cell Sheets Using Fibrin-Coated Dishes and Its Electrophysiological Studies by Optical Mapping.

(フィブリン塗布培養皿を用いた心筋細胞シートの作成法および電気生理学的検討)

板 橋 裕 史

## 内容の要旨

工学と生命科学の協力によって著しい発展を遂げている組織工学の研究分野において、近年斬新な手法として細胞シート工学が注目されている。

今回われわれはフィブリン塗布培養皿を用いて簡便に細胞シートを作製する手法を新たに開発した。フィブリノーゲンとトロンビンの溶解液を混合後、直ちに細胞培養皿に塗布し培養皿の表面で重合させることによりフィブリン塗布培養皿を作製した。新生仔ラットの心室筋を用い、上述の培養皿上で心筋細胞の初代培養を行った。培養皿の表面にコーティングされた薄いフィブリン層は心筋細胞が分泌するタンパク分解酵素により徐々に分解され、次第に心筋細胞と培養皿表面の結合が疎となってゆく。4日後には膜状に連結した心筋細胞を容易に剥離することが可能となり、心筋細胞シートを回収することができた。次に2枚の心筋細胞シートを用い、その一部を重ね合わせた状態で培養を継続すると、2枚の心筋細胞シートは同期した自律収縮を行うようになった。電位感受性色素di-4ANEPPSを用いたオプティカルマッピング法を用いて、活動電位が心筋細胞シート間を伝播する様子を詳細に検討した。3日間の共培養期間を設けることによって2枚の心筋細胞シート間には安定した電気的結合が形成されることが観察された。免疫組織学的解析により、シート内の個々の心筋細胞間にはコネクシン43の発現が確認されたことから心筋細胞シート内および心筋細胞シート間でギャップ結合が形成されていることが推測された。3層に重ねた心筋細胞シートをヌードラットの皮下に移植し2週間後に観察した。移植された心筋細胞シートが収縮する様子が肉眼で確認できた。また組織学的検討により、移植された心筋細胞は生体内で良好に伸展し横紋構造の再構築がおこなわれ、心筋細胞が集団として配向されていることが観察された。われわれの開発した方法により作製された心筋細胞シートは、心筋組織としての電気的性質および収縮能を維持しており、移植片として有効利用することが可能であると考えられた。また本手法は心筋細胞以外の様々な細胞で応用が可能であり、多くの臓器分野において新たな組織工学的手法として利用することが可能であると考えられた。

## 論文審査の要旨

組織工学の領域において、東京女子医科大学岡野光夫教授らにより温度感応性培養皿を用いて作製する細胞シート法が提唱されているが、本研究ではフィブリン塗布培養皿を用いた独自の細胞シート作製法が示された。フィブリン塗布培養皿上で新生仔ラット心室筋細胞の初代培養を行ったところ、フィブリン層は心筋細胞が分泌するタンパク分解酵素により分解され、心筋細胞と培養皿表面の結合が疎となり、4日後には膜状に連結した心筋細胞シートを剥離し回収することが可能となった。2枚の心筋細胞シートの一部を重ねし培養を継続すると、同期した自律収縮を行うようになった。電位感受性色素di-4ANEPPSを用いた光マッピング法を用いて心筋細胞シート間の電気活動を解析したところ、3日後には心筋細胞シート間に良好な電気的結合が形成されることが示された。免疫蛍光染色により、心筋細胞間にコネクシン43が発現し、心筋細胞シート間にギャップ結合が再構築されていることが示された。3層の心筋細胞シートをヌードラットの皮下に移植したところ、2週間経過後も心筋シートは生着し自律収縮を行っていた。さらに移植された心筋細胞は横紋構造を再構築し、互いに配向していた。以上の結果から本手法が新たな心筋移植片作製法となる可能性が示唆された。

審査ではまず上皮様構造などの細胞の構造、配列に極性を持った組織を再構築するためには、細胞シートを作成する際にそれぞれの細胞に極性を持たせて配列させる必要がある、との指摘があった。また今回は新生仔心筋細胞を用いて細胞シートを作製したが、成獣心筋細胞でも細胞シートの作製が可能か、また新生仔心筋細胞を成獣心臓に移植した場合、円滑な電気的結合が形成されるか、を検討すべきとの助言があった。ついで本実験では、2枚の心筋細胞シート間で電気的結合が形成される理由としてギャップ結合の再構築がなされていることが示されたが、他にも細胞シート間の絶縁構造が消失した可能性、などの機序を除外するための詳細な解析を行うことが望ましかったとの助言があった。さらに心筋細胞シートを用いて心筋グラフトを作る際には、左心系の圧に耐えうる性質が必要になると考えられるが、重層細胞シートに強度を持たせることは可能であるか、との質問がなされた。これに対し、現在温度感応性培養皿を用いて作製された細胞シートでは、肝細胞、内皮細胞などの異なる種類の細胞シートを重層化する試みがすでに行われているが、同様に線維芽細胞シートを加えて結合組織の形成を促す、あるいはコラーゲンフィルムなどの細胞外基質成分を加える、などの方法により強度を確保できる可能性があると回答された。

以上より、本研究にはなお検討すべき課題が残るものの、細胞シート工学という新たな手法が様々な臓器分野において容易に応用される可能性を示したという点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 生理学 柚崎 通介  
生理学 岡野 栄之  
学力確認担当者：北島 政樹、四津 良平  
審査委員長：四津 良平

試問日：平成17年 6月22日

# Genetic analysis of hereditary factor X deficiency in a French patient of Sri Lankan ancestry : *in vitro* expression study identified Gly366Ser substitution as the molecular basis of the dysfunctional factor X.

(スリランカ系フランス人に発症した凝固第X因子欠損症の遺伝学的解析：  
発現実験による機能不全の原因変異Gly366Serの同定)

一 色 郁 子

## 内容の要旨

### 1. 緒言

血液凝固第X因子 (FX) は、ビタミンK依存性の血漿蛋白であり、肝細胞により生成される。FXは内因系では凝固第IX因子により活性化され、また外因系では第VII因子により活性化され、プロトロンビンをトロンビンにする働きを担っており、凝固系の中心的役割を果たしている。先天性FX異常症は希な常染色体劣性遺伝疾患であり、現在までに50以上の遺伝子異常が報告されている。我々は、cross-reactive material (CRM) 陽性FX異常症の一家系について遺伝子解析を行い、同定された異常を発現解析することによりFX分子の機能を理解する上で重要な知見を得たので報告する。

### 2. 症例

11才女性、スリランカ系フランス人。扁桃摘出手術時の血液凝固学的検査にてFX異常症と診断された。FX抗原量は67%、活性は1 u/dlであった。

### 3. 材料・方法

同意を得られた症例の血液よりDNAを採取し、FX遺伝子の全エクソンの塩基配列をPCRを用いて解析し、さらにRFLP解析を行った。FX蛋白発現解析は発現ベクターpCMV4/FX野生株にPCR法にて一塩基置換を導入し、カチオン脂質を用いてHEK293に遺伝子導入した。無血清培養後上清を回収し、蛋白発現量をELISA法とウェスタンブロット法で確認した。機能解析は凝固時間法 (プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、ラッセル蛇毒時間) と発色基質を用いて行った。凝固時間法では野生株で標準曲線を作成し、FX異常蛋白の活性を算出した。

### 4. 結果

FX遺伝子の全エクソンの塩基配列を解析し、第8エクソンG→Aの一塩基置換 (Gly366Ser) を認めた。RFLP解析ではホモ接合体であった。父、母、妹はヘテロ接合体であった。HEK293を用いたFX蛋白発現解析では、野生株とGly366SerとでELISA法とウェスタンブロット法における発現量の差は認めなかった。FX蛋白機能解析は、凝固時間法では野生株を100%活性とした場合Gly366Serは、プロトロンビン時間0.04%、活性化部分トロンボプラスチン時間1.05%、ラッセル蛇毒時間0.75%と著明に低下していた。発色基質を用いた機能解析では、Gly366SerはFXa活性、トロンビン生成ともに認められなかった。

### 5. 考察・結論

Gly366SerはFX Nagoya 2としてすでにヘテロ接合体症例が報告されているが、今回我々はホモ接合体症例と発現機能解析を初めて報告した。FX Gly366Serは蛋白発現は認められるものの、FX機能解析では、凝固時間法では活性をほとんど認めず、また、FXa活性、トロンビン生成も認められなかった。アミノ酸366はcatalytic domainにあり、FXの機能発現に重要であることが示唆された。

## 論文審査の要旨

稀な遺伝性出血性疾患である凝固第X因子 (FX) 欠損症の一家系について遺伝子解析を行い、第8エクソンの363番目のG→A一塩基置換 (Gly366Ser) を同定した。既に、ヘテロの症例がFX Nagoya2として報告されているが、本症例はホモ接合体であった。変異蛋白の発現解析では発現量は野生型と有意差を認めなかったが、凝固時間法および発色基質法により測定したFX活性はともに著明に低下していた。

審査ではまず、発端者の臨床症状の有無について質問があり、本症例では、外傷による皮下血腫形成があり、プロトロンビン製剤、新鮮凍結血漿輸血を行ったこと、また、月経出血による著明な貧血を認めたことから閉経療法が必要とされたと説明された。また、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の双方が延長していた場合の鑑別疾患について質問があり、凝固カスケードの共通系の異常として、FX異常症以外に凝固第II因子異常症、凝固第V因子異常症が考えられると回答された。FX異常症の変異部位の分布についての質問があり、特に偏った傾向はないと回答された。FXとカルシウムの関係について質問がなされ、内因系カスケードが活性化される際にカルシウムが必須であること、また、FXは他のビタミンK依存性凝固因子と同様にγ-Glutamyl carboxylase domain (Gla domain) を有しているが、このGla domainがリン脂質、血管内皮細胞などに接合するときにカルシウムが必要とされること、また、FX 前駆体が肝細胞内でゴルジ装置に輸送される時にも密接に関与していると説明された。

FX構造解析について、GlyがSerに置換されることで、起こりうる構造変化についての質問がされた。Cys364-Ala365-Gly366は、ほ乳類のセリンプロテアーゼにおいて良く保存されている配列でありこの配列が崩れることでプロテアーゼ活性が消失する可能性がある。また、より大きいアミノ酸のSer366に置換されることで隣接するAla365との距離が近くなりすぎ、原子間の衝突が起こり、蛋白の構造が崩壊する可能性があるとして説明された。今回の変異アミノ酸の近傍にカルシウム結合部位があり、本変異によりカルシウムとの結合に影響が及ぶ可能性について指摘があった。

以上、本研究は今後検討されるべき課題は残しているものの、稀な症例の遺伝子、蛋白発現解析を通して、FXの機能におけるcatalytic domainの役割を一部解明した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫  
分子生物学 清水 信義 発生・分化生物学 須田 年生  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者: 北島 政樹、清水 信義  
審査委員長: 清水 信義

試問日: 平成17年 6月29日



# 新規ビンカアルカロイドconophyllineの子宮体癌細胞に対する 抗腫瘍効果に関する検討

入江 琢也

## 内容の要旨

新規ビンカアルカロイドconophyllineは、キョウチクトウ科植物の葉からRas活性阻害剤として抽出、精製された。Conophyllineは*in vitro*において、K-ras-NRK細胞の細胞増殖を抑制しない濃度でマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させることが明らかにされている。このことから、conophyllineは癌細胞の細胞増殖抑制を標的とした従来の殺細胞性抗癌剤とは作用機序が異なり、細胞毒性のより少ない抗腫瘍剤としての可能性が示唆された。そこで本研究では子宮体癌由来培養細胞株を用い、*in vitro*における浸潤能抑制効果と*in vivo*における抗腫瘍作用について検討し、conophyllineが新規の抗転移薬、あるいは抗腫瘍剤になり得るか否かについて考察した。

Conophyllineは子宮体癌細胞において、細胞増殖を抑制しない濃度でマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた。この機序を解析する目的で、細胞が浸潤・転移するために必要なステップである細胞接着能と細胞運動能に着目した実験を行い、以下の結果を得た。Conophyllineは

(1) 固相化したマトリゲルやtype-IVコラーゲンへの細胞接着数を減少させた。(2) wound assayにて細胞運動能を抑制した。(3) フローサイトメトリーを用いた実験においてE-cadherin、CD44の発現を減弱させた。さらに、*in vivo*における実験では、子宮体癌細胞を皮下移植したヌードマウスにおいて投与終了時までいずれのマウスにも衰弱死を認めず、コントロール群と比べ約50%の腫瘍増殖を抑制した。

Conophyllineがマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた機序として、接着や細胞運動に関与する分子に影響を与えている可能性が考えられた。すなわち、conophylline投与により、細胞が浸潤・転移するための最初のステップである基質への接着が抑制されてその足場を失い、細胞移動(運動)ができなかったことが要因と考えられた。*In vivo*における実験では、コントロール群と比べ約50%の腫瘍増殖を抑制したことから、conophyllineが抗腫瘍効果を有することが認められた。また、conophylline投与により、いずれのマウスにおいても衰弱死を認めなかったことから、宿主に対する細胞毒性は少ないことが推測された。

現在、conophyllineはTNF- $\alpha$ レセプターをdown regulationさせることで誘導されるNF- $\kappa$ Bの活性を抑制することや脾 $\beta$ 細胞の分化に重要と考えられる転写因子neurogenin3の誘導活性が見いだされており、標的分子は一般的な転写制御因子に関与している可能性が強いと考えられている。以上のことから、conophyllineは核酸や微小管に結合しない新規の抗転移薬、あるいは抗腫瘍薬に発展する可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

Conophylline (コノフィリン) は、アルカロイドに属する新規の天然有機化合物である。本研究では、conophyllineを用い、婦人科癌の中でも増加傾向にある子宮体癌について実験を行った。その結果、conophyllineは子宮体癌細胞の細胞増殖を抑制しない濃度において*in vitro* invasion assayでのマトリゲルへの浸潤細胞数を減少させた。その機序には、conophyllineが、細胞接着や細胞運動を制御する分子に影響を与えている可能性が示唆された。また、*in vivo*における実験では、conophylline投与により、背側皮下に移植した低分化型子宮体癌由来細胞の腫瘍の増殖を抑制する結果を得た。以上の結果より、conophyllineは、新規の抗転移薬あるいは抗腫瘍剤になり得る可能性が示された。

審査ではまず、*in vitro*における実験で、SNG-II細胞を用いた理由が問われた。これに対し、予備実験にて、5種の子宮体癌細胞株を用いた*in vitro* invasion assay (conophylline添加なし)を施行した結果、SNG-II細胞が最も浸潤細胞数が多く、薬剤による浸潤能抑制効果を検討する実験に、より適していると考えて用いたとの回答があった。次に*in vitro*で用いた細胞株が1つでは不十分ではないかとの指摘があった。これに対し、Ishikawa細胞(高分化型子宮体癌由来細胞株)を用いた実験で、細胞増殖に対する影響と*in vitro* invasion assayを行い、SNG-II細胞と同様の結果を得ているが今後、複数の細胞株を用いての実験も必要であると回答された。また、接着分子での検討でintegrin $\beta$ 1とCD44になぜ着目したのかとの質問に対し、子宮体癌においてintegrin $\beta$ 1とCD44は、文献的に転移・浸潤への関与の報告が多いため着目したと回答がなされた。さらに、*in vitro*と*in vivo*の実験で異なった細胞株を用いた理由が質問された。これに対し、HOOA細胞はSNG-II細胞と比べ、皮下移植腫瘍の生着率と細胞増殖率が高いため*in vivo*で用いたが、*in vitro*の実験では取り扱いが難しく、データの変動が大きいため、*in vitro*ではSNG-II細胞を、*in vivo*ではHOOA細胞を用いたとの回答がなされた。また、*in vivo*における実験では、皮下移植した腫瘍重量の変化だけではなく、conophylline投与群と、非投与群の腫瘍組織をさまざまな実験系で比較検討することにより、conophyllineの分子メカニズムがさらに明確になる可能性があるとの助言がなされた。

以上のように、本研究には今後検討されるべき課題を残しているものの、conophyllineがヒト子宮体癌細胞に対し、*in vitro*や*in vivo*における実験において、浸潤能抑制効果や、皮下移植腫瘍の細胞増殖を抑制することをはじめて明らかとし、子宮体癌の新たな治療法の可能性を示した点において、有意義な研究であると評価された。

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

試問日: 平成17年 6月10日

# A Novel Method to Assess Platelet Inhibition by Eptifibatid with Thrombelastograph®

(トロンボエラストグラフを用いた、糖蛋白Ⅱb/Ⅲa阻害薬エプティフィバタイトによる血小板機能抑制効果の新たな評価法)

香 取 信 之

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

### 1. 背景

Thrombelastograph (TEG) は血液凝固過程における血液弾性粘調度の変化を測定する機器であり、TEGのパラメータの一つMaximum Amplitude (MA) は血液の凝固因子活性および血小板数・機能の影響を受ける。したがってMAを測定することにより血小板膜表面糖蛋白 glycoprotein Ⅱb/Ⅲa (GP Ⅱb/Ⅲa) 阻害薬の効果を検出できると考えられるが、従来のceliteを用いたTEGでは、GP Ⅱb/Ⅲa阻害薬Eptifibatideの検出は困難であった。そこでトロンビン産生を抑制した状態で血小板を活性化し、フィブリンとの結合能を測定することによってEptifibatideの血小板機能抑制効果をより明確に測定できると仮定し実験を行った。

### 2. 材料・方法

健康成人の全血を用いて、①血小板凝集能検査および②TEGの測定を行った。

①血小板凝集能検査：クエン酸加全血 (Cit検体) およびヘパリン加全血 (UH検体) にEptifibatideを添加し、コントロールとして血小板数を測定した。またADP添加後の血小板数を測定し、その差から血小板凝集率を計算した。

②TEG：Cit検体およびUH検体にEptifibatideを添加した後 (最終濃度0.4, 0.8, 1.6, 4, 8, 24 $\mu$ g/ml)、Cit検体には0.2M CaCl<sub>2</sub> 20 $\mu$ lおよびkaolinを (Kaolin TEG)、UH検体にはbatroxobin-based activator 10 $\mu$ lおよび0.072mM ADP 10 $\mu$ l (Batroxobin TEG) 添加してTEG測定を行った。

全てのデータは平均値±標準偏差で示した。Cit検体およびUH検体間での血球数の比較にはpaired t-testを使用した。凝集率およびTEGデータはCit検体およびUH検体間で比較し、Friedman test、post-hocはWilcoxon's t-test、Bonferroni補正を採用した ( $p < 0.01$ )。

### 3. 結果

血小板凝集能検査では、Eptifibatideの添加によってCit検体、UH検体ともにコントロールと比較して有意な凝集率の低下を認めた。Kaolin TEGではEptifibatide濃度24 $\mu$ g/mlでのみ有意なMAの低下を認めたが (56.3 $\pm$ 7.8mm vs. 36.9 $\pm$ 7.0mm ;  $p < 0.01$ )、Batroxobin TEGではEptifibatide濃度0.8 $\mu$ g/ml以上で有意なMAの低下を認めた (44.6 $\pm$ 7.1mm vs. 15.7 $\pm$ 2.3mm ;  $p < 0.01$ )。

### 4. 結論

Batroxobin TEGによって、臨床濃度であっても検出不可能であったclass II GP Ⅱb/Ⅲa阻害薬Eptifibatideの抗血小板作用を検出することが可能である。

従来、抗血小板薬であるGlycoprotein Ⅱb/Ⅲa (GP Ⅱb/Ⅲa) 阻害薬Eptifibatideのin vitroでのモニタリング法としては透過光法による凝集能検査が一般的であり、血液弾性粘調度の変化から血液凝固能をモニターするThrombelastograph (TEG) を用いて抗血小板作用を検出することは困難であった。血液凝固にはフィブリン・フィブリノゲンと血小板のGP Ⅱb/Ⅲaを介した結合が重要であるが、凝固過程で産生するトロンビンによって血小板のGP Ⅱb/Ⅲaが直接活性化されることがEptifibatideの抗血小板作用のTEGでの検出を困難にしてきたと考えた。そこでヘパリンによってトロンビン産生を抑制した後にバトロキソピンでフィブリンを産生させ、血小板とフィブリンのGP Ⅱb/Ⅲaを介した結合強度を血液の弾性粘調度の変化として捉えることにより、血小板機能を検査することが可能であると仮定し研究を行った。従来のceliteを用いたTEGではEptifibatideの抗血小板作用を血中濃度24 $\mu$ g/ml以上で検出できたのに対し、バトロキソピンを使用したTEGでは0.8 $\mu$ g/mlで検出可能であった。

審査では凝集能検査との相違および血液凝固能検査機器によって血小板機能を測定する意義について質問があったが、凝集能検査がフィブリノゲンおよびvon Willebrand因子を介したGP Ⅱb/Ⅲaの機能の評価するものであるのに対して、今回考案した測定法はGP Ⅱb/Ⅲaを介した血小板とフィブリン網の結合性を測定するため、凝血塊形成における血小板機能の関与を評価可能であると回答された。他の抗血小板薬の検出も可能かとの質問に対しては、COX阻害薬、ADP受容体阻害薬などの検出も可能であると回答された。赤血球とフィブリンの直接的な相互作用が影響する可能性があるかとの質問に対しては、赤血球が受容体を介して直接フィブリンと結合することはないが、血漿成分や血小板数が非常に少ない状態ではその体積比が弾性粘調度に影響する可能性があるため、今後の研究課題とすると回答された。抗凝固薬としてヘパリンは適切であったのかという質問に対しては、クエン酸ではGP Ⅱb/Ⅲaの構造変化をもたらすため血小板機能が正確に評価できないこと、アルガトロバンやヒルジンなどの抗トロンビン薬であれば使用可能であるが、もっとも汎用性が高いヘパリンを選択したと回答された。

本研究は今後の臨床応用について更に検討する必要性は残すものの、GP Ⅱb/Ⅲa阻害薬のみならずTEGでは検出が困難であったシグナル伝達阻害薬の抗血小板作用も検出可能であり、臨床上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 臨床麻酔学 武田 純三

内科学 池田 康夫 臨床検査医学 村田 満

医化学 末松 誠

学力確認担当者：北島 政樹、池田 康夫

審査委員長：池田 康夫

試問日：平成17年 6月27日

# Temporal patterns of progression and regression of electrical and mechanical remodeling of the atrium.

(持続的心房高頻度刺激による心房筋の電気的、機械的リモデリングの形成および回復過程の検討)

杵 淵 修

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

### 〈緒言〉

近年、人口の高齢化に伴い心房細動（以下AF）の罹患率も増加の一途を示している。発作性AFは、AF自身が心房筋の性質を変化させながら持続性AFへと進行し、またAFの持続時間が長いほど、除細動後の正常洞調律の維持が困難になることが知られている。しかしながら、このAFの発生、維持の機序についてはいまだ不明な点も多い。心房の高頻度興奮の持続は、心房筋の不応期の短縮や伝導遅延による電気生理的性質の変化をもたらす（電気的リモデリング）、さらには左房収縮機能の低下、心房拡大等の機械的・構造的リモデリングを引き起こし、それらがAFの維持や血栓形成に寄与している。しかしこれらのリモデリングが経時的に平行して進行するのか、それとも時間にずれがあるのかについては知られていない。そこで本研究ではイヌ心房高頻度刺激モデルを用いて持続刺激を2週間行い、それに伴う心房における電気的、機械的リモデリングの形成および回復過程を調べ比較検討した。

### 〈方法〉

すべての実験は、本塾における動物実験ガイドラインに基づいて行った。雑種成犬14頭を対象に、右心耳心外膜側に刺激用および記録用のフック型双極電極を縫着した。8頭に対して毎分400回の心房高頻度刺激を開始し、14日間継続した。残り6頭は高頻度刺激を施行せず、対照犬とした。刺激開始直前をP0、刺激開始2、7、14日目をP2、P7、P14とし、各時点において一時ペースングをやめ洞調律した状態で、薬理学的自律神経遮断下に、電気生理学的検査ならびに経食道心臓超音波検査を施行した。さらに高頻度刺激中止後1、7日目をPP1、PP7とし、同様の諸検査を施行した。高頻度刺激あり（n=8）となし（n=6）との2群に分け、電気的および機械的諸因子を比較検討した。

### 〈結果および考察〉

持続的高頻度心房刺激に伴って心房有効不応期（ERP）の短縮、左心耳流出血流速度（LAAV）および経僧帽弁の左室流入血流速度（MAV）の低下は、急速でP2で有意に変化した。一方、心房内伝導速度（CV）の低下と左心耳断面積（LAAA）の拡大はP7で有意に変化し、以後P14まで進行性に変化を認めた。回復過程ではERP、LAAVおよびMAVはPP1でほぼ完全に回復したのに対し、CVとLAAAは遅れてPP7で回復した。ERPはLAAV（ $r=0.78$ ,  $p<0.001$ ）およびMAV（ $r=0.73$ ,  $p<0.001$ ）に正の相関関係を認め、CVではLAAA（ $r=-0.58$ ,  $p<0.001$ ）に負の相関関係を認めた。ERPとLAAV、MAVの変化が同期的に平行して観察された所見は、L型カルシウム電流の減少を反映している可能性が推測された。

### 〈結論〉

本研究では高頻度刺激による心房のリモデリングの形成と回復過程において、ERPや心房収縮機能の変化はCVや心房径の変化より急速に認め、それぞれ異なる機序が寄与していると考えられた。

心房細動（AF）は発作が出現停止を繰り返すうちに、持続性AFへと進行し慢性化していくことが知られている。AF発作が一旦発生すると、心房筋の不応期短縮や伝導速度低下をもたらす（電気的リモデリング）、さらには左房収縮機能の低下、心房拡大等の機械的・構造的リモデリングを引き起こし、それらがAFの維持や血栓形成に寄与している。しかしながら、このAFの発生、維持の機序についてはいまだ不明な点も多く、これらのリモデリングが経時的にどのように変化するのかについては知られていない。本研究ではイヌ心房高頻度刺激モデルを用い、これらのリモデリングの形成および回復過程での電気的および機械的諸因子の経時変化を比較検討した。高頻度刺激による心房のリモデリングの形成と回復過程において、心房有効不応期（ERP）や心房収縮機能の変化（左心耳流出血流速度および経僧帽弁の左室流入血流速度）は心房内伝導速度や心房径の変化より急速に認め、それぞれ異なる機序が寄与していると考えられた。ERPと心房収縮機能の変化には正の関係を認め、いずれもL型Ca電流の減少を反映している可能性が推測された。本研究の結果から、急速に進行するリモデリングを一刻も早く断ち切ることの重要性が確認され、早期の除細動が洞調律維持や再発、血栓形成の予防に有効であることが示唆された。

審査において本研究の新知見の総括が求められ、心房高頻度刺激による電気的・機械的リモデリングの形成と回復は平行して認められ、早期よりこれらのリモデリングの進行が急速に進むことを明らかにしたことでありと説明された。本研究においてERPと心房収縮機能には正の相関関係を認め、L型Ca電流の減少を反映している可能性を考慮したが裏づけがあるのかとの質問に対し、他施設の研究で本研究と同様のモデルを用いてL型Ca電流の減少やチャンネル蛋白のmRNAレベルの変化が報告されており、本研究の副論文においてL型Caチャンネル遮断薬であるverapamil hydrochlorideがこれらのリモデリングを抑制したことからも共通の機序が示唆されたと回答された。本研究では右房からの1点刺激であり、左房には同様のリモデリングが起きているのかと質問され、さらには左房における電気的因子も検討すべきではと助言された。高頻度右房刺激中にも左房は1:1で捕捉されており、同様のリモデリングが起きていることが予想された。左房を含め多点における観察が重要であるが、左房側に電極を縫着するには胸骨正中切開が必要となるが侵襲が大きく、本研究の目的である14日間の高頻度刺激を継続することが困難であり、長期生存が可能な右肋間開胸による右心耳電極縫着の方法が選択されたと回答された。本研究において使用された麻酔薬や薬理学的自律神経遮断により各因子に影響はなかったかという質問に対し、麻酔の鎮静により若干脈拍や血圧の低下が認められたが個々のデータには有意差はなかった。全頭ではないが薬理学的自律神経遮断の前後でそれぞれ電気的・機械的因子も検討をしているが、有意差は認めなかったと説明された。高頻度心房刺激の持続により心室側に変化が認められたかという質問に対し、心室へはほぼ2:1の房室伝導を示すため心室拍数は生理学的範囲内であり、肉眼では肥大等の構造変化は認めなかったと説明された。

以上のように、本研究には今後の課題がいくつか残されたが、AFの機序の解明およびAF治療の研究に貢献する価値がある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科 四津 良平 生理学 柚崎 通介  
臨床麻酔学 武田 純三  
学力確認担当者: 北島 政樹、四津 良平  
審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年 7月 4日

# Autoantibodies to a 140-Kilodalton Polypeptide, CADM-140, in Japanese Patients With Clinically Amyopathic Dermatomyositis

(Clinically Amyopathic Dermatomyositis患者血清中に見出された140kDa蛋白を  
認識する自己抗体 (抗CADM-140抗体) に関する研究)

佐藤 慎二

## 内容の要旨

【目的】多発性筋炎/皮膚筋炎 (Polymyositis/dermatomyositis : PM/DM) において間質性肺炎 (Interstitial lung disease : ILD) は、重要な予後因子であるが、特に、PM/DMのsubtypeである臨床的に筋炎症状に乏しいDM (Clinically amyopathic DM : C-ADM) 症例に治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎 (Rapidly progressive ILD) を合併することが知られている。かかる症例では、自己抗体陰性がひとつの特徴とされてきたが、その詳細は不明である。本研究は、白血病細胞由来K562細胞を用いてC-ADM患者血清中の自己抗体の追跡を目的とした。

【方法】(1) 教室の膠原病255例 (PM61例、DM42例 (C-ADM15例を含む)、関節リウマチ50例、全身性エリテマトーデス46例、混合性結合組織病/重複症候群27例、全身性強皮症22例、シェーグレン症候群7例)、特異性間質性肺炎43例と健康人16例を対象とした。(2) 自己抗体は、白血病細胞由来K562培養細胞を基質とした免疫沈降法、HEp-2細胞を用いた蛍光抗体法で分析した。(3) 免疫沈降法で、K562培養細胞成分中の140kDa蛋白を認識したDM症例の臨床特徴を検討した。

【結果】(1) C-ADM患者15例中8例 (53%) が蛋白成分の免疫沈降法で140kDa蛋白を認識した。核酸成分の検討では、1例で抗SS-A抗体が反応する核酸成分を認めるのみであった。(2) C-ADM患者血清が認識する140kDa蛋白は、既知の自己抗体の免疫沈降する蛋白と明らかに違うものであり、この140kDa蛋白を認識する新たな自己抗体を抗CADM-140抗体と命名した。(3) 間接蛍光抗体法では、細胞質が網目状・顆粒状に染色された。(4) 抗CADM-140抗体は、C-ADM患者に特異的に検出された。(5) 抗CADM-140抗体陽性8例中7例で、ILDを併発しており、うち4例はRapidly progressive ILDであった。(6) 抗CADM-140抗体陽性例は同抗体陰性DM例よりもRapidly progressive ILDと密接に関連していた (50% vs. 6%,  $P=0.008$ )。

【考察】C-ADM患者血清中に、140kDa蛋白を認識する新たな自己抗体 (抗CADM-140抗体) の存在が示唆された。同抗体陽性C-ADM患者では、予後不良のRapidly progressive ILDの併発に注意して経過観察することが必要と考えられた。

## 論文審査の要旨

本研究は、多発性筋炎/皮膚筋炎 (Polymyositis/Dermatomyositis : PM/DM) のサブタイプであるClinically amyopathic DM (C-ADM) 患者血清中の自己抗体の追跡を試みたものである。従来、C-ADMに治療抵抗性のRapidly progressive interstitial lung disease (Rapidly progressive ILD) を合併することが知られているが、かかる症例では、これまで自己抗体陰性がひとつの特徴とされており、臨床面からC-ADMに関連する自己抗体の検討は重要な課題である。本研究では、C-ADM患者血清中に約140kDa蛋白成分を認識する新たな自己抗体が見出された。このCADM-140抗体は、C-ADMの特異自己抗体である可能性が示唆された。さらに、興味深いことに同抗体陽性DMは、陰性症例と比較して、Rapidly progressive ILDを高頻度に併発しており、その臨床的意義の重要性が示唆された。

審査では、まず、CADM-140抗体の対応抗原が何かが問われた。現時点では、対応抗原の細胞局在が細胞質であることが示唆されているが、抗原の分析は今後の課題であること、その検討方法については、アフィニティカラムを利用して抗原蛋白を精製し、プロテインシーケンサーによるN末端アミノ酸配列解析による抗原蛋白の同定を検討していると回答された。次に、自己抗体の検討に免疫沈降法を用いた理由、白血病細胞由来のK562細胞を用いた理由について問われた。免疫沈降法は、自己抗体検索法として感度・特異度とも高い方法であり、これまで同方法で種々の核酸および細胞成分に対する自己抗体が発見されていること、K562細胞は、これまで免疫沈降法で一般的に使われていることが回答された。しかしながら、同抗体陽性症例にRapidly progressive ILD併発が高頻度であることから、肺や筋組織由来の細胞を用いた検討も必要でないかとの指摘があり、対応抗原の分析とともに今後の課題であるとの回答があり、了承された。

さらに、Targoffらが、発表している155kDa蛋白との異同について分子量の大きさや疾患・臨床症状の違いについて議論された。臨床面からは、同抗体陽性DM群と陰性DM群の比較だけではなく、同抗体陽性C-ADM群と陰性C-ADM群との比較について問われた。C-ADMは、症例が非常に少数のため、統計学的な比較は困難であるが、Rapidly progressive ILD併発は、陽性群で4例であったのに対し、陰性群では1例のみであり、DM群での検討と同じ傾向であったと回答された。

以上のように、本研究は、今後、抗CADM-140抗体陽性症例の集積とその対応抗原の追跡・検討が課題であるが、この新たな自己抗体の測定は臨床的、極めて予後不良とされるRapidly progressive ILD併発C-ADMの早期診断・治療法の選択に有用と考えられ、その予後の改善につながるものと期待される点で意義あるものと評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫  
微生物学・免疫学 小安 重夫 皮膚科学 天谷 雅行  
先端医科学 河上 裕  
学力確認担当者：北島 政樹、小安 重夫  
審査委員長：小安 重夫

試問日：平成17年 6月22日

# Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds.

(間葉系幹細胞移植は皮膚創傷の皮膚の初期再生に効果を認める)

佐藤 博子

## 内容の要旨

### 目的

骨髄より採取される細胞のうち、間葉系への多分化能を有する間葉系幹細胞を生体に移植するとその環境に合わせて分化することが報告されており、この現象は、間葉系幹細胞が皮膚創傷の再生にも影響を及ぼす可能性を示唆している。本研究では、ラットの皮膚創傷に間葉系幹細胞を移植し、皮膚創傷治癒に与える影響を検討した。

### 材料・方法

成獣F344オスラットの大腿骨より骨髄を採取してプラスチックディッシュに播種し、10-15継代培養して得られた細胞を使用した。脂肪細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞への分化能を検討し、得られた細胞が多分化能を有するか否か確認を行った。間葉系幹細胞はDIIで標識したうえ、低濃度群は $4 \times 10^5$ 個、高濃度群は $4 \times 10^6$ 個に細胞数を調整し、F344ラットの背部4ヶ所の真皮に局注し、直後に1cmの皮膚全層切開を加えた。7、14日目に肉眼的観察を行い、14日目に創を採取した。14日目の創はホルマリン固定し、パラフィン包埋後、Masson-Trichrome染色を行った。組織はSingerらの方法で点数化した。

### 結果

骨髄培養細胞の分化をin vitroで誘導した結果、脂肪細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞への分化が認められ、私たちが培養したプラスチック接着細胞は多分化能を有しており、間葉系幹細胞であると考えられた。皮膚全層切開創への間葉系幹細胞移植後7日目の肉眼的観察結果では、コントロール、低濃度群においてわずかに癒痕を認識できるが、より高濃度で移植した群では認識しにくくなっており、14日目の高濃度群の創はさらに認識できなくなっていることが確認された。

14日目の組織像ではコントロールでは創の範囲に一致して膠原線維の乱れと皮膚付属器の欠損を認めた。低濃度群でも膠原線維の乱れが明らかだったが、高濃度群では創の範囲の判別が困難であり、正常組織にほぼ近い状態で治癒していることが確認された。また、創作成14日目の蛍光写真像では低濃度群、高濃度群ともに創の範囲に一致して移植細胞が遊走し分布していることがわかった。

Singerらによる組織像の評価では、最高点が10点で、良好に治癒した創であると判断される。この方法で14日目の創を評価すると、コントロールは平均1.5点、低濃度群は3.25点、高濃度群は4.5点となり、コントロールと細胞移植群との間に有意差を認めた。

### 考察

以上より間葉系幹細胞は皮膚の癒痕を目立たなく治癒させる能力を有していること、組織学的に膠原線維の配列が正常化すること、移植細胞数は多いほうが有効であることが確認された。骨髄からの細胞採取は容易で、自己の細胞を使用するため免疫上の問題は生じない。また形成外科領域では傷跡が目立たなくなることを希望する患者は多く、臨床応用の利点は大きいと考える。この結果をふまえ、現在臨床応用を検討中である。

## 論文審査の要旨

皮膚の創痕をScarlessに近い状態にすることは形成外科の重要な研究テーマの一つである。これまで癒痕をできる限り目立たなくする手技や各種サイトカインの応用等が報告されているが、いまだに完全なscarless woundには至っていない。本論文は、ラットの皮膚切開創に多分化能を有するmesenchymal stem cells (MSCs)を移植すると組織学的に膠原線維の配列が正常化し、肉眼的にも癒痕化抑制効果が認められたことを明らかにしている。

審査ではどの段階の細胞を移植に使用したかと質問があり、多分化能のポテンシャルを有していることが確認された細胞で、分化の方向付けがされていない段階の細胞を使用した、と回答がなされた。継代した細胞を使用するほうが良いのかという質問に、継代するとマクロファージなどの炎症性細胞が除去されることが確認されており、線維化抑制に寄与する可能性があることから継代した細胞を使用する方が良いとの回答がなされた。癒痕が目立たないのはMSCsが組織を構成しているためか、もしくはMSCsが放出している因子の影響かとの質問には、MSCsが組織を構成している所見は得られていないこと、MSCsがHGFを強く発現していることが確認されており、TGFβ1を抑制し、癒痕化抑制効果につながっている可能性があること、MSCs移植組織内へのマクロファージ出現の抑制が確認されており、炎症反応が抑えられることで線維化が少ない可能性がある、と回答がなされた。また、DIIによる細胞の染色だけでは詳細が不明であり、GFP Ratの細胞移植を行い、皮膚の構造組織との2重染色を行うべきであるというご教示があった。MSCsを移植する方法につき質問があり、100μlのPBSに細胞を浮遊させて真皮内に局注し、直後に1cm長さの皮膚全層切開創を加え、縫合とドレッシングは行わず開放創のままとしたと回答がなされた。MSCsをin vitroで分化させた場合、分化が誘導される細胞の割合はどれくらいかと質問があり、90%以上の細胞が脂肪・軟骨細胞へ分化し、骨格筋細胞への誘導は数%の細胞に留まると回答がなされた。組織の蛍光写真像は移植細胞が生着している事を示すのかという質問に、生着は不明だがその場に細胞が滞っていると考えられると回答がなされた。また、今後臨床応用を進めていくにあたり、細胞移植を行うタイミングや方法、ケロイドなどへの効果、年齢による効果の違い、骨髄以外からMSCsを得る方法などを検討するようアドバイスがあった。

以上のように、本研究はMSCsが皮膚創傷治癒の癒痕化を抑制する機序について今後解明しなくてはならない点を残しているものの、手術後の癒痕を目立たなくする方法のひとつであり、この成果を臨床応用することが可能な点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 形成外科学 中島 龍夫

皮膚科学 天谷 雅行 生理学 岡野 栄之

発生・分化生物学 須田 年生

学力確認担当者: 北島 政樹、天谷 雅行

審査委員長: 天谷 雅行

試問日: 平成17年 7月 7日

# Interleukin-6 Family of Cytokines Mediate Angiotensin II -induced Cardiac Hypertrophy in Rodent Cardiomyocytes.

(アンジオテンシンIIによるIL-6族サイトカインの誘導と心肥大における意義)

佐野 元昭

## 内容の要旨

アンジオテンシンII (Ang II)はAT1受容体を介して心筋細胞肥大と心線維芽細胞増殖を引き起こすことが知られている。しかし、心筋細胞ではAT1受容体が心線維芽細胞に比して1/10以下しか発現していないにも拘らず、ACE阻害薬やAT1受容体拮抗薬が心臓の線維化や心肥大も抑制することに対する説明はなされていない。この現象はAng IIが直接心筋細胞に作用するのではなく、心筋細胞-心線維芽細胞間の神経体液性因子を介したクロストークにより心肥大を形成するという仮説により説明する。HaradaらはAng IIが心筋細胞単独の培養では心筋細胞肥大を惹起せず、心線維芽細胞との共培養系においてのみ心筋細胞肥大を促進すること、この作用はET-A受容体拮抗薬により55%抑制されること、Ang IIが心線維芽細胞からエンドセリン (ET)-1の分泌を促進することから、Ang IIによる心肥大作用は部分的には心線維芽細胞から分泌されるET-1を介していると報告した。しかし、ET-A受容体拮抗薬による抑制効果が55%しかないことからET-1以外の他のパラクリン心肥大促進因子も重要な役割を果たしている可能性が残された。

IL-6族サイトカインはgp130受容体を共有し程度の差はあるものすべてが心肥大促進作用を有することが報告されている。なかでも白血病抑制因子leukemia inhibitory factor (LIF) とcardiotrophin-1 (CT-1)は強力な心肥大促進作用を持つことが知られている。我々はこれまでLIFが培養心筋細胞でJAK/STAT系を活性化し心肥大を惹起することを報告してきた。

本研究では、ラット新生児心筋細胞と心線維芽細胞を分離培養し、心線維芽細胞をAng II刺激した際的心線維芽細胞の変化と培養上清中のIL-6族サイトカインのパラクリン作用を観察した。その結果、(1) Ang II刺激はAT1受容体を介して心線維芽細胞においてIL-6、LIF、CT-1のmRNAを誘導し、IL-6の培養上清中への分泌を増加させること、

(2) Ang II刺激により心線維芽細胞培養上清中に心筋細胞のgp130受容体やSTAT3のリン酸化を惹起し、心筋細胞を肥大させるパラクリン因子が分泌されること、(3) gp130受容体のブロック抗体RX435によりIL-6族サイトカインの作用を特異的に阻害すると心筋細胞に対するこれらのパラクリン作用が部分的に抑制されること、(4) 心線維芽細胞のCT-1とLIFの発現をアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてKnock downするとAng IIにより刺激した心線維芽細胞の培養上清の持つ心筋細胞肥大促進作用が抑制されることを示した。以上の結果から、Ang II刺激による心肥大現象において心線維芽細胞から分泌されたIL-6族サイトカイン、主としてCT-1とLIFがパラクリン因子として重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

この論文はレニン・アンジオテンシン系とIL-6族サイトカインの間に心線維芽細胞を介した密接なクロストークがあり、心肥大、リモデリングの形成に重要な役割を持つことを示した最初の報告である。ACE阻害薬やAT1受容体拮抗薬はこの神経体液性因子のパラクリン作用を断ち切るにより心肥大、心リモデリング抑制効果を発揮していると考えられた。

## 論文審査の要旨

本論文は、(1) アンジオテンシンIIが心線維芽細胞においてIL-6、LIF、CT-1のmRNAを誘導し、少なくともIL-6の分泌を増加させること、(2) アンジオテンシンII刺激により心線維芽細胞培養上清中に心筋細胞のgp130やSTAT3のリン酸化を惹起し、<sup>3</sup>H]-Phenylalanineの取り込みや細胞面積を増加させるパラクリン因子が分泌されること、(3) RX435によりIL-6族サイトカインの作用を阻害することにより心筋細胞に対するこれらのパラクリン作用が部分的に抑制されること、(4) 心線維芽細胞にCT-1とLIFのアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することによりアンジオテンシンIIにより刺激した心線維芽細胞の培養上清の持つ心肥大促進作用が抑制されることを示した。以上の結果は、アンジオテンシンII刺激による心肥大現象において心線維芽細胞から分泌されたIL-6族サイトカイン、主としてCT-1とLIFが重要な役割を果たしていることを意味し、神経体液性因子を介したクロストークの心肥大形成における重要性を明らかにした。

審査に際して、アンジオテンシンやエンドセリンなどのG蛋白結合型受容体を介する血管作動性物質とIL-6族サイトカインによる心筋細胞肥大の相違に関して質問があった。これに対して、G蛋白結合型受容体を介する血管作動性物質では臨床的には圧負荷モデルに認められるタイプの心筋細胞の短軸方向への伸長が生じ、対照的にIL-6族サイトカインでは、容量負荷モデルに認められるタイプの心筋の長軸方向への伸長が認められるという回答がなされた。

さらに、個々の研究方法に関して詳しい説明を要求された。すなわち、心筋細胞のみを心筋から分離、培養する方法とその特異性の問題、心筋細胞の研究に特異的な細胞肥大を測定する方法に関する生理学的な根拠について質問がなされた。これに対し、心筋細胞をそれ以外の細胞と分離する際には、おのおのの細胞比重の違いを利用したパーコール密度勾配法と、心筋細胞が他の細胞と比して培養ディッシュの底へ付着しにくい性質を組み合わせた方法で、95%以上の純度の心筋細胞培養系が得られること(心筋特異的抗体を利用した免疫科学染色法により確認済)、一方、心筋細胞の肥大は必須アミノ酸のフェニルアラニンの心筋細胞への取り込みからタンパク合成能を推定することによって検討できること、その際に心筋細胞は細胞周期から逸脱した細胞であるためDNA合成能の変化(細胞増殖)を考慮した補正の必要が必ずしも必要でない、と回答された。

最後に、アンジオテンシンIIのAT1受容体とAT2受容体の作用の違いに関して質問がなされた。すなわち、臨床的な心肥大、心不全が単にAT1受容体の活性化だけで説明できるものではなく、AT1受容体とAT2受容体を介するシグナルの不均衡によって生じている可能性はないかという問題提起であった。これに対して申請者は、心線維芽細胞からのIL-6族サイトカインの誘導は、AT1受容体とAT2受容体にそれぞれ特異的な拮抗薬を用いた検討から、AT1受容体を介するものであると考えた。しかし、AT2受容体を介する生理作用はAT1受容体を介するものと比べまだ十分に解析がなされておらず、またAT2受容体がNOの産生を介して逆に心筋の線維化を抑制するとの報告もあることから非常に興味深い今後の課題であるとの意見が述べられた。

以上、研究背景、目的も明確であり、一部今後検討されるべき内容も指摘されたが、博士課程修了者と同程度以上の内容と学識があることが確認された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 医化学 末松 誠  
微生物学・免疫学 小安 重夫  
学力確認担当者: 北島 政樹、四津 良平  
審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年 7月25日

# Signals mediated by FcγR II A suppress the growth of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells.

(FcγR II Aからのシグナルは、B細胞系の急性リンパ性白血病細胞の増殖を抑制する。)

鈴木 敏雄

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

Fcγ受容体は免疫グロブリンGのFc部分に対する受容体で、B細胞はこの受容体のII型 (FcγR II, CD32) を特異的に発現している。成熟B細胞において主に表出されるFcγR II Bは、膜免疫グロブリン (slg) からの刺激伝達に対し共受容体として抑制的に作用する。slgを発現していない未分化B細胞においてもFcγR IIの発現を認めるが、その機能は不明である。そこでヒト未分化B細胞及び未分化B細胞の免疫表現型を示す急性リンパ性白血病細胞 (ALL細胞) におけるFcγR IIの発現と機能を検討した。正常骨髄B細胞の解析では、FcγR IIの発現はCD19<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>群で8.1 ± 1.2%、CD19<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>群で19.2 ± 5.7%、CD19<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>群で82.4 ± 5.0%と、B細胞の分化が進むにつれて増大した。FcγR IIは、正常未分化B細胞で発現が乏しいのに対して、患者ALL細胞57例中45例、同様の免疫表現型を示す白血病細胞株7種類中6種類で陽性とALL細胞に多く発現していた。RT-PCR及び免疫染色による解析では、これらのALL細胞で表出されているFcγR IIは主にFcγR II Aであった。未分化B細胞性白血病細胞株であるRS4 ; 11及び380においてFcγR IIを抗CD32抗体2E1により架橋させると、細胞内蛋白のチロシンリン酸化が誘導された。また、骨髄間質細胞上での培養でFcγR II陽性のALL細胞に2E1を加えると、患者ALL細胞7例中5例、細胞株6種類中5種類で増殖が抑制された。この増殖抑制効果は骨髄間質細胞なしには認められなかった。増殖抑制がCD32陰性細胞では全く認められないことから、この効果には抗CD32抗体とALL細胞との直接作用が必要と考えられる。増殖抑制を生じないFcγR II陽性の細胞株NALM6においては、2E1による細胞内蛋白のチロシンリン酸化は認められなかった。また2E1で増殖抑制を生じる細胞株380において、異なる抗CD32抗体KB61によりFcγR IIを架橋させると、増殖抑制も細胞内蛋白チロシンリン酸化も誘導されなかったが、KB61を2次抗体でさらに架橋させると、2E1と同様に増殖抑制および細胞内蛋白チロシンリン酸化の両者が誘導された。以上から、2E1がALL細胞にもたらすチロシンリン酸化シグナルと増殖抑制効果との関連が示唆された。増殖抑制効果が明らかでリン酸化シグナルの解析を行った細胞株RS4 ; 11が、RT-PCR上FcγR II Aのみを表出していることから、増殖抑制に関連するリン酸化シグナルはFcγR II Aを介して入ると考えられる。2E1によるFcγR II Aの架橋によりチロシンリン酸化が誘導される細胞膜、細胞内蛋白として、CD32, CD19, CBL, SYK, PI3-K p85が同定された。また、成熟B細胞におけるFcγR II Bからの抑制性シグナルにおいて重要とされるSHIPおよびp62<sup>shc</sup>のチロシンリン酸化とp62<sup>shc</sup>とRas GAPとの会合も認められた。以上の実験結果からFcγR II Aは、未分化B細胞性白血病細胞において増殖抑制に関わるシグナルを伝達すると考えられる。

成熟B細胞に特異的に発現するFcγ受容体II型 (FcγR II, CD32) は、膜型免疫グロブリン (slg) からの刺激伝達に対し共受容体として抑制的に作用する。一方、slgを発現しない未分化B細胞におけるFcγR IIの機能は不明である。本研究ではヒト正常未分化B細胞および未分化B細胞性白血病細胞 (ALL細胞) を用いてFcγR IIの発現と機能を検討した。正常未分化B細胞ではFcγR IIの発現が乏しいのに対して、ALL細胞では主にFcγR II Aが高率に発現していた。骨髄間質細胞上で培養した場合、ALL細胞7例中5例、ALL細胞株6種類中5種類で抗CD32抗体2E1による増殖抑制を認めた。この増殖抑制効果には、抗CD32抗体によるリン酸化シグナルの誘導、成熟B細胞におけるFcγR II B関連抑制性シグナルに重要とされるSHIPおよびp62<sup>shc</sup>, Ras GAPの関与が示唆された。

審査では、抗CD32抗体による増殖抑制効果における骨髄間質細胞の関与について質問され、抑制効果の発現にはALL細胞と骨髄間質細胞との接触が重要であると説明された。骨髄間質細胞の存在下では抗体を介してFcγR II A同士の架橋が増強されることが増殖抑制に関与している可能性が指摘され、今後の検討課題とされた。次に、免疫受容体チロシン依存性活性化モチーフ (ITAM) をもつFcγR II Aを介するシグナルが増殖抑制効果を有する機序について質問され、ITAMを介したシグナルがもたらす生物学的効果は細胞種に依存し、この場合は未分化B細胞性ALL細胞に固有の現象と考えるがその詳細な機序については今後の検討課題である、と回答された。抗CD32抗体による増殖抑制効果を臨床応用する際の問題点について質問され、骨髄間質細胞がALL細胞のアポトーシスを抑制するため、増殖は抑制されてもALL細胞が骨髄間質細胞上に残存する可能性がある、ALL細胞株に比べて患者ALL細胞ではCD32の発現がやや少ない場合があることから臨床応用に際しては症例を選択する必要がある、と回答された。個々の患者の白血病細胞を用いたシグナル解析の有用性について助言がなされた。抗CD32抗体がアポトーシスを直接誘導する可能性について質問され、アポトーシス誘導については否定的な実験結果を得ているが、同じシグナル伝達系を介する抗CD38抗体がALL細胞にアポトーシスを誘導することから、検討の余地があると説明された。モノクローナル抗体による白血病治療について質問され、FcγR II Aを発現するALLおよびAMLにおいて、ヒトFc部分が、本研究で示された機序を介して白血病細胞の増殖を抑制する可能性がある、と述べられた。

本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、FcγR IIを介するシグナルが造血微小環境中で白血病細胞の増殖を抑制する可能性を示したことにより、白血病治療の新しい展開を示唆した有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 孝雄  
内科学 池田 康夫 先端医科学 河上 裕  
発生・分化生物学 須田 年生  
学術監認担当者: 北島 政樹、池田 康夫  
審査委員長: 池田 康夫

試問日: 平成17年 6月28日

# IL-4 regulates chemokine production induced by TNF- $\alpha$ in keratocytes and corneal epithelial cells.

(IL-4による培養角膜実質および上皮細胞におけるケモカイン産生の制御)

高野 洋之

## 内容の要旨

### (目的)

重症アレルギー性結膜疾患である春季カタルやアトピー性角結膜炎などの合併症として角膜びらんや角膜浸瘍などが知られている。このような角膜合併症の病態形成には好酸球などの炎症細胞の集積が関与している。炎症細胞の局所集積には種々のケモカインが関与しているが眼表面におけるケモカイン産生の調節の詳細については不明な点が多い。アレルギー性疾患の涙液中にはTh2タイプサイトカインであるインターロイキン4 (IL-4) が高値であることが報告されている。我々は涙液中のIL-4が角膜上皮や実質細胞からのIL-8やRANTESの産生を調節し、眼表面への好酸球有意な細胞浸潤を誘導している仮説のもと今回の実験を行った。

### (方法)

EBAA (アメリカアイバンク協会) から得られた角膜より角膜実質および上皮細胞を分離、培養した。同細胞を24時間無血清培養後、TNF- $\alpha$ もしくは、IL-4もしくはその両者により刺激し、その24時間後に上清を回収し、ELISA法にてケモカインであるRANTESとIL-8の濃度について検討した。

### (結果)

角膜実質および上皮細胞の両者においてTNF- $\alpha$ 単独刺激によりIL-8の産生は誘導された。このTNF- $\alpha$ によるIL-8の産生はTNF- $\alpha$ とIL-4の同時刺激では有意に低下した。RANTESについては角膜実質細胞において、TNF- $\alpha$ とIL-4の同時刺激によりTNF- $\alpha$ 単独刺激や無刺激に対して有意に増加した。

### (結論)

IL-4は角膜実質細胞におけるRANTESの産生を増強し、IL-8の産生を抑制した。IL-4は角膜の構成細胞におけるケモカイン産生の調節を行うことにより、アレルギー性結膜疾患における眼表面への好酸球の選択的集積を誘導している可能性が示唆された。今回の実験により重症眼アレルギーにおける好酸球による角膜障害の発症のメカニズムの解明に関する重要な知見が得られたと考えられる。

## 論文審査の要旨

近年、アレルギー性結膜疾患は増加していることが知られている。重症型である春季カタルやアトピー性角結膜炎においては遅延性の角膜上皮障害がしばしば生じ、時には不可逆的な視力低下を生じる。角膜病変発症には好酸球による組織傷害を主体としたアレルギー反応の遅発層が重要である。本研究では好酸球のターゲットである角膜の構成細胞からのin vitroでのケモカイン産生、IL-4によるその制御およびin vivoにおける結膜上皮中のケモカイン濃度、好酸球・好中球数、角膜上皮障害の関係を検討した。

角膜上皮・実質細胞共にTNF- $\alpha$ 刺激によりIL-8の産生は誘導され、これはTNF- $\alpha$ とIL-4の同時刺激では有意に低下した。RANTESについては角膜実質細胞において、TNF- $\alpha$ とIL-4の同時刺激によりTNF- $\alpha$ 単独刺激や無刺激に対して有意に増加した。以上よりIL-4が角膜構成細胞からのケモカイン産生を制御することにより好酸球の選択的遊走を誘導している可能性が示唆された。又in vivoのデータではIL-8の濃度は好酸球・好中球浸潤に共に相関、RANTES濃度は好酸球・好中球浸潤に共に相関が認められなかった。従って、IL-8は好酸球・好中球の遊走に関与している可能性が示唆されたがRANTESについてはin vivoでは好酸球の選択的遊走には他の因子の関与の方が強いことが示唆された。

審査ではアレルギー反応の主役の一つであるマスト細胞の関与、IL-5の涙液中濃度、IL-4の産生細胞、Toll like receptor (TLR) を介したマスト細胞の活性化について質問があった。マスト細胞はTNF- $\alpha$ 、IL-4と共に産生し重症アレルギー性結膜疾患のアレルギー性炎症のinitiationにおいて関与していること、今回の研究についてはIL-5の涙液中濃度の測定を行っていないこと、眼表面におけるIL-4の産生源として結膜マスト細胞、浸潤Th2細胞が考えられること、アトピー患者の結膜嚢にはS.aureusを含めた細菌のmicrocolonizationが報告されておりTLRを介したマスト細胞活性化の可能性もあると回答された。刺激サイトカインの濃度設定についての質問があり、TNF- $\alpha$ については予備実験における至適濃度、IL-4については以前行った実験および文献を参考に決定したと説明された。サイトカインの濃度の組み合わせを変更した上での実験の必要性が指摘された。又、mRNAレベルでの検討、上清による遊走実験などの必要性も指摘された。他論文とstarvation期間の差異によりケモカイン産生の結果が異なることについても指摘があり本来は追加実験が必要であったとの指摘もあった。強力な好酸球遊走因子であるeotaxinについてのデータの有無についての質問があり同データを含めたその後の研究データを加えた総説の作成が指示された。

以上のように本研究は今後なお検討すべき課題が残るものの重症アレルギー性結膜疾患におけるケモカインの産生、制御につき重要な知見が得られ同疾患における角膜上皮障害の発症メカニズム解明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 眼科学 坪田 一男  
微生物学・免疫学 小安 重夫 病理学 岡田 保典  
微生物学・免疫学 石川 博通  
学力確認担当者：北島 政樹、小安 重夫  
審査委員長：小安 重夫

試問日：平成17年 2月 7日



# The Relationship Between Bone Metastasis from Human Breast Cancer and Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression.

(乳癌骨転移とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現の関係)

高山 伸

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

【背景】 接着因子は、細胞間の接着や癌細胞と細胞外基質との相互作用に必要であり、転移の成立に関わっている。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ が過剰発現している乳癌細胞が、骨基質に接着することにより、破骨細胞との相互作用によって骨吸収を促進し、生着する空間を生み出しているという仮説のもとに、乳癌骨転移とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現の関係を検討した。

【方法】 ①ヒト乳癌細胞培養株におけるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現を検討する。

②インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現の有無による骨転移形成率の差をラット骨転移モデルを用いて検討する。

【結果】 免疫組織染色、flow cytometry、RT-PCRの検討から、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を発現していたのは、MDA-MB-231とMDA-MB-435の二つの細胞株であった。ラット骨転移モデルにおいて、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を発現しているMDA-MB-231とMDA-MB-435は、それぞれ81.8% (9/11例)と80.0% (8/10例)と高率に骨転移を形成したが、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ を発現していないMKN-4では11.0% (1/9例)と低率であった。

【考察】 四種類のヒト乳癌細胞株を用いて様々な方法でインテグリンの発現を検討したが、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ とインテグリン $\alpha_2\beta_1$ の発現に違いがあることが示された。インテグリン $\alpha_2\beta_1$ は、全ての乳癌細胞株に発現しており、その欠失は乳癌の浸潤性と関係していると言われているが、今回の検討では骨転移との関係は見出せなかった。一方、ラット骨転移モデルを用いた検討では、MDA-MB-231とMDA-MB-435の二つの細胞株において、高頻度で骨転移を形成した。この事は、癌転移におけるseed and soil theoryの理論を裏付ける結果となった。すなわち、二つの乳癌細胞株は、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ のリガンドである骨基質（オステオポンチンを有する）が存在するために同部位に接着し、破骨細胞や間質細胞との相互作用を介して転移巣を形成することが想定された。従って、骨転移の形成にインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現は極めて重要であることが示された。また、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の抑制が骨転移に与える影響を検討するために、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ のリガンド結合部位であるRGD (arg-gly-asn) ペプチドを有するechistatinを投与したところ、ラット骨転移モデルにおいては骨転移の形成を抑制した。これは、骨転移の形成とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ が密接に関係している事を裏付ける結果となった。

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現しているヒト乳癌細胞株が、骨基質に接着する能力を獲得する可能性が示されたが、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ と骨転移の関係の詳細はまだ明らかではなく、さらなる研究が必要である。

乳癌が骨に強い転移能を有する病態像は明らかでない。一般的に転移の成立には標的臓器の微細環境が密接に関与しており、骨転移においても、破骨細胞の活性化が不可欠である。本研究は、癌の転移に深く関わっている接着因子インテグリンに着目し、「インテグリン $\alpha_v\beta_3$  (以下 $\alpha_v\beta_3$ ) が過剰発現している乳癌細胞が、骨基質に接着することにより、破骨細胞との相互作用によって骨吸収を促進し、生着する空間を生み出している。」という骨転移成立の仮説のもとに行われた。主論文の内容に加え、骨転移を有する臨床検体においても $\alpha_v\beta_3$ が高率に発現する傾向が示され、乳癌骨転移と $\alpha_v\beta_3$ の発現の関連性が示唆された。

審査ではまず、実験方法に関しての質問がなされ、細胞培養株の免疫染色の手順や判定基準、ラット骨転移モデルにおける転移の判定基準などの確認がなされた。

次に、癌細胞は最初に骨髄に入り込み、微小転移を形成するので、骨基質に接着するという「仮説」は成り立たないのではないかと指摘を受けた。骨髄の微小転移は骨転移の初期像であるが、骨髄転移がそのまま骨転移とはならない。最初に骨髄転移を生ずる過程に関しては、さらなる研究を要すると思われるが、微小転移を形成した後に、どのようにして骨基質、骨環境に留まり、周囲との相互作用によって増殖し、骨転移が成立するかが臨床重要であり、この過程において $\alpha_v\beta_3$ の発現は重要であると説明された。

続いて、溶骨性転移と造骨性転移のメカニズムについて質問がなされた。仮説では癌細胞と破骨細胞の直接的な相互作用に着目しているが、もう一つの間接的な相互作用によると説明された。つまり、癌細胞と破骨細胞の相互作用を仲介する骨芽細胞が存在し、骨芽細胞からの破骨細胞刺激因子の発現の違いにより溶骨性転移と造骨性転移が生じると回答された。また、副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) の関与も考察に加えることが望ましいという示唆があった。

最後に、なぜ $\alpha_v\beta_3$ に着目したかとの質問がなされた。乳癌骨転移巣において $\alpha_v\beta_3$ が癌細胞に高発現していたという報告があり、また、破骨細胞が $\alpha_v\beta_3$ を介してオステオポンチンを認識し、骨基質を溶解していることから、乳癌骨転移の形成と $\alpha_v\beta_3$ の関係に着目したと回答された。さらに、インテグリン抗体の認識部位やディスインテグリンの特異性などが確認され、ラット骨転移モデルにおけるディスインテグリンの阻害作用に関しては、 $\alpha_v\beta_3$ に対する拮抗的な作用だけではなく、*in vivo*における血管新生阻害などの他の影響が作用している可能性もあることが指摘された。

以上、本研究は、実験結果の判定基準や骨転移巣の定量化など修正すべき点があるが、今後、さらなる研究を加えることにより、乳癌骨転移とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の発現の相互関係を示唆する貴重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  
病理学 坂元 亨宇 整形外科学 戸山 芳昭  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者：北島 政樹、坂元 亨宇  
審査委員長：坂元 亨宇

試問日：平成17年 7月26日

# Targeted Expression of Anti-Apoptotic Protein *p35* in Oligodendrocytes Reduces Delayed Demyelination and Functional Impairment After Spinal Cord Injury

(オリゴデンドロサイトにおける抗アポトーシス蛋白*p35*の標的発現は脊髄損傷後の遅発性脱髄を減少させ運動機能回復を促進させる)

田 村 睦 弘

## 内容の要旨

脊髄損傷後の機能障害はニューロンの細胞死や軸索断裂に加え、髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイト (OLG) のアポトーシスにより重症化すると考えられているが、これを直接証明した報告はこれまでにない。本研究では、OLGのアポトーシスを選択的に抑制した*p35* transgenic mouseを用いて脊髄損傷モデルを作製し、損傷後の脱髄や運動機能障害について解析し、脊髄損傷にOLGのアポトーシスの意義を明らかにすることを目的とした。

方法は、1) 実験動物：MBPのpromotor下にアポトーシス抑制遺伝子*p35*を発現する生後7週齢のMBP-cre*p35* transgenic mouseを用いた (Tg群N=10)。 *p35*の発現はRT-PCR法にて確認した。2) 脊髄損傷モデル作製：全麻下に第7胸椎椎弓切除後、MASCISの方法に準じて硬膜上に重錘を落下させ損傷モデルを作製した。対照としてcontrol cre mouseとwild-typeのC57BL/6 mouseを用いた (C群各N=10)。経心臓的灌流固定後、以下の検討を行った。3) 組織学的検索：①一般組織染色：LFB/HE重染色を行った。②髄鞘染色：Toluidine Blue染色を行い画像解析ソフトを用いて脊髄後索部の髄鞘面積を定量化した。③免疫染色：OLGのマーカーである $\alpha$ GSTを用いて染色後、後索部の陽性細胞数を定量化した。さらにHoechst33342との2重染色にてOLGのアポトーシス像を観察した。④電顕：脊髄後索皮質脊髄路を中心に髄鞘の微細構造を観察した。4) 運動機能評価：BBB scaleと行動解析装置 (SCANET) を用いて行った。

その結果、1) 髄鞘染色ではTg群で後索の髄鞘はC群と比較して有意に温存されていた。2) 免疫組織染色では、Tg群の後索部に残存するOLGはC群と比較し有意に多かった。また、C群ではTg群と比較して多くのOLGのアポトーシス像を認めた。3) 電顕像ではTg群の髄鞘は比較的温存されていた。一方C群では著明な脱髄を認めた。4) 運動機能評価ではTg群ではC群と比較して損傷後の下肢運動機能は良好であった。

OLGは数多くの髄鞘を形成するが、損傷によりニューロンの細胞死や軸索の断裂が起こると、それをとりまくOLGのアポトーシスが引き起こされ、その結果損傷を免れた組織にも脱髄が起こり重篤な機能障害をきたす。今回の結果から、*p35* transgenic mouseでは1次損傷を免れたOLGのアポトーシスが抑制され、脱髄が減少したために良好な機能回復が得られたものと考え、*p35*によって脊髄損傷後のOLGのアポトーシスを抑制し、機能障害を軽減することができたことは、OLGのアポトーシスの抑制が脊髄損傷治療の一手段となりうる可能性を示唆しており、意義深いものと考え。

## 論文審査の要旨

脊髄損傷後の機能障害はニューロンの細胞死や軸索断裂に加え、髄鞘形成細胞であるオリゴデンドロサイト (OLG) のアポトーシスにより重症化すると考えられているが、これを直接証明した報告はこれまでにない。そこで本研究では、OLGのアポトーシスを選択的に抑制した*p35* transgenic mouseを用いて脊髄損傷モデルを作製し、損傷後の脱髄や運動機能障害について解析し、脊髄損傷におけるOLGのアポトーシスの意義を明らかにした。実験はMyelin Basic Protein (MBP) のpromotor下にアポトーシス抑制遺伝子*p35*を発現するMBP-cre*p35* transgenic mouseを用いた (Tg群)。全麻下MASCISの方法に準じて硬膜上に重錘を落下させ損傷モデルを作製した。対照群としてcre mouseとwild-typeのC57BL/6 mouse (C群)、椎弓切除のみを行なった群 (Sham群) を用いた。以上について組織学的検索、運動機能評価を行なった。髄鞘染色ならびに電顕像ではTg群で後索の髄鞘はC群と比較して有意に温存されており、損傷の頭尾側でも両群とも軽度脱髄を認めた。免疫組織染色では、Tg群の後索部に残存するOLGはC群と比較し有意に多く、C群ではTg群と比較して多くのOLGのアポトーシス像を認めた。運動機能評価ではTg群ではC群と比較して損傷後の下肢運動機能は良好であった。

審査では、脊髄切断モデルの方が挫滅が少ないため実験結果がより明瞭に出るのではないかと質問された。これに対して、実際の脊髄損傷に近い病態で解析をするという理由でMASCISの重錘落下法を選択したと回答された。また、脊髄損傷の病態の中での血流障害の重要性について質問がなされ、本研究では虚血や血管新生を直接評価する実験はなされていないが、損傷後の虚血や出血、脊髄損傷後の血管新生が、本研究の病態に深く関わっていることが考えられるとの推察が述べられた。また、再髄鞘化が起こった可能性についての質問に対しては、軸索-髄鞘比 (g-ratio) による両群間の比較では有意差がなく、軸索と髄鞘は形態学的には差異を認めなかったが脊髄損傷後に再髄鞘化が起こった可能性は十分考えられると回答された。さらに、*p35*の持続的発現が脊髄障害を引き起こす可能性についての質問に対して、*p35* transgenic mouseで椎弓切除のみ行なったSham群では、組織や運動障害を認めなかったことよりその可能性は低いと回答された。

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、*p35*によって脊髄損傷後のOLGのアポトーシスを抑制し、機能障害を軽減できたことから、将来の臨床応用においてOLGのアポトーシスの抑制が脊髄損傷治療の一手段となりうる可能性を示唆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  
解剖学 仲嶋 一範 内科学 鈴木 則宏  
外科学 河瀬 斌  
学力確認担当者：北島 政樹、仲嶋 一範  
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成17年 7月12日

# Two serine residues distinctly regulate the rescue function of Humanin, an inhibiting factor of Alzheimer's disease-related neurotoxicity : functional potentiation by isomerization and dimerization

(2個のセリン残基によるアルツハイマー病関連神経細胞死抑制因子ヒューマニンの  
活性制御機構：異性体化と2量体化による増強)

寺 下 謙 三

## 内容の要旨

我々はアルツハイマー病（A病）関連遺伝子やAβによる神経細胞死を特異的に抑制する、24残基からなるペプチド性因子ヒューマニン（HN）「MAPRGFSCLLL LTSEIDLVPKRRRA」を発見し、その強力かつA病特異的な神経保護作用をin vitroで明らかにしてきた。一次構造上、HNは7番目と14番目にセリン残基を有する。既に報告した様に、我々は14番目のセリン（S14）がグリシン置換される（S14G-HN）ことによりHNの神経細胞保護作用が100-1000倍上昇することを発見した。今回、我々はこのグリシン置換によるHN活性上昇が、実は生体内で実際起きている何らかのS14の翻訳後活性化修飾をミミックしているのではないかという仮説をたて、種々のS14翻訳後修飾によるHN活性化の有無を検討した。その結果、S14残基のD体化により、S14G-HNと同程度までHNの神経保護作用効果が増強されることを発見した。近年の研究により脳神経組織のグリア細胞にセリンのD体化変換酵素であるセリンラセメースが存在することが報告されており、HNのS14のD体化が脳神経組織において実際起きている可能性は十分あると考えられる。また、7番目のセリン（S7）についても同様な検討を行ったが、S7はD体化してもHNの神経保護作用は変化せず、アルギニンへの置換によりHNの神経保護作用は消失した。更に一連の実験により最終的に、HNの2量体化がHNの神経保護作用発現には不可欠な過程であり、S7はHNが自らを2量体化することに必須なアミノ酸であることを発見した。今回の研究の結果を基に創り上げたHNの最も強力な誘導体（EF-AGA-HNG）は1-10pMのレベルで、Aβの神経毒性から完全に保護する力を有する。生体内で実際HN中のセリン残基の活性修飾が起こっていることの証明は今後の課題ではあるが、これらの知見はHNの神経保護作用機序の解明の重要な手がかりや手段になるのみならず、今後アルツハイマー病の治療薬の開発あるいはHNの毒性を抑制する拮抗薬開発に寄与することが期待される。

## 論文審査の要旨

アルツハイマー病に関連する神経細胞死を特異的に抑制するペプチド性因子ヒューマニン（HN）は、一次構造上7番目と14番目にセリン残基を有する。14番目のセリン（S14）がグリシン置換される（S14G-HN）ことによりHNの神経細胞保護作用が100-1000倍上昇するが、このグリシン置換によるHN活性上昇が、実は生体内で実際起きている何らかのS14の翻訳後活性化修飾をミミックしているのではないかという仮説のもと、種々のS14翻訳後修飾によるHN活性化の有無が検討された。その結果、S14残基のD体化により、S14G-HNと同程度までHNの神経保護作用効果が増強されることが示された。近年の研究により脳神経組織のグリア細胞にセリンのD体化変換酵素

であるセリンラセメースが存在することが報告されており、HNのS14のD体化が脳神経組織において実際起きている可能性が議論された。また、7番目のセリン（S7）についても同様な検討が行なわれた。S7がD体化してもHNの神経保護作用は変化しなかったが、アラニンに置換するとHNの神経保護作用は消失した。一連の実験により、HNの2量体化がHNの神経保護作用発現には不可欠な過程であり、S7はHNが自らを2量体化することに必須なアミノ酸であることが示された。

審査に当たり、まず神経細胞死のアッセイ方法について、特に初代培養における培養条件を中心に質問がなされた。それに対し、初代神経細胞の採取培養条件とその純度およびviabilityが結論の妥当性に支障とならない範囲内である事が説明された。また、2量体化がHNの活性化機構であるとの仮説をたてた経緯、そしてそれと関連して、HNと同じくPro, Glyの置換で活性が変化する前例が知られているかの質問に対して、今まで他分子ではそのような報告はないがアミノ酸配列とHN活性との関連とを検討する過程でこの仮説に至ったと回答された。さらに、HNの生体内での役割に関連して、ラットにおいて見出された関連物質であるRattinおよびHNの作用機構についてはRattinとHNの作用の類似性および情報伝達経路の説明がなされ、生体内でのHNの作用とアルツハイマー病発症の因果関係についてはHNはアルツハイマー病の防御因子である可能性があり、その活性の低下が脳萎縮を伴う真の意味でのアルツハイマー病動物モデル作成に重要ではある可能性があるとの説明がなされた。なお、HNによる神経細胞死抑制のアッセイ系としてヒト由来の培養細胞を用いる系を確立すべきであるとの助言が審査員よりあった。

本論文で提唱されたHN中のセリン残基の活性修飾が生体内で実際に起こっていることの最終証明は今後の課題ではあるが、今回明らかにされた知見はHNの神経保護作用機序の解明の重要な手がかりや手段になるのみならず、今後アルツハイマー病治療薬の開発あるいはHNの毒性を抑制する拮抗薬開発に寄与することが期待されるものであった。

以上より本論文は今後のアルツハイマー病の病態解明、治療法開発において意義ある研究であり、博士論文として妥当なものであるものと認められた。

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

試問日：平成17年 4月13日

# Interleukin-10 expression is correlated with growth fraction in human non-small cell lung cancer xenografts.

(非小細胞肺癌xenograftにおけるInterleukin-10発現と細胞増殖分画との関連)

成 毛 聖 夫

## 内容の要旨

悪性腫瘍に対する局所(微小環境)の免疫反応において、サイトカインネットワークのヘルパーT(Th)細胞はTh1とTh2の2つに分類される。インターロイキン10(IL-10)は、Th2のサイトカインに属し抗腫瘍免疫を抑制すると考えられている。最近、IL-10を発現する非小細胞肺癌症例は、IL-10を発現しない症例と比較して有意に予後不良であったと報告された。ヒト癌xenograftは、免疫不全マウスにヒト癌細胞とマウス間質とから成立し、サイトカインがヒト腫瘍細胞自身から産生されるのか否かを検討するのに有用である。本研究では、ヒト非小細胞肺癌xenograftを用いてIL-10遺伝子の発現を検討し、各種の腫瘍増殖因子との関係の評価した。

ヒト非小細胞肺癌xenograft44例(腺癌11例、扁平上皮癌19例、大細胞癌14例)を対象とした。これに対し、RT-PCR法によりIL-10と血管新生関連因子の遺伝子発現を検討した。xenograftの癌細胞の増殖性をMIB-1抗体による免疫染色にて評価し、腫瘍増殖に関与する間質の血管密度を血管壁の抗von Willebrand因子抗体による免疫染色にて評価した。

その結果、IL-10遺伝子発現を10例に認めた。血管新生関連因子の遺伝子発現を、Angiopoietin(Ang)-1、Ang-2、Vascular endothelial growth factor(VEGF)、Thrombospondin(TSP)1、TSP2、Brain-specific angiogenesis inhibitor(BAI1)、Tyrosine kinase with immunoglobulin and epithelium growth factor homology domain-2(TIE2)、Kinase insert domain containing receptor(KDR)、Fms-like tyrosine kinase(FLT-1)について検討したが、IL-10遺伝子発現と関係認めなかった。IL-10遺伝子発現を認めたxenograftのうち7例が組織学的に低分化であった。IL-10遺伝子発現陽性のxenograftは陰性のものと比べ、MIB-1発現細胞が増加しており、癌間質の血管密度は高かった。

以上の結果より、IL-10は腫瘍に浸潤する免疫担当細胞に発現するとの報告もあるが、ヒト非小細胞肺癌xenograftにて初めてIL-10遺伝子を検出したことで、非小細胞肺癌細胞自身が産生するIL-10が癌細胞の増殖性を強めている可能性が示唆された。また、非小細胞肺癌細胞に発現するIL-10を介して腫瘍間質の血管密度が高められている可能性が考えられた。

## 論文審査の要旨

本研究は、非小細胞肺癌の局所微小環境におけるインターロイキン10(IL-10)の癌増殖への関与について、ヒト癌xenograft44例を用いて検討したものである。ヒト非小細胞肺癌をヌードマウスに移植樹立し10代から20代まで継代したxenograftに対して、ヒト特異的プライマーを用いたRT-PCR法によりIL-10遺伝子の発現を検討した。そして各種血管新生関連因子の遺伝子発現との関係や免疫組織化学的解析により癌細胞のもつ増殖性や癌間質の血管密度を評価した。その結果、IL-10遺伝子発現を10例(22.7%)に認め、そのうち7例のxenograftが低分化の組織学的所見を示していた。IL-10遺伝子発現陽性のxenograftはMIB-1抗体陽性細胞が有意に増加していた。IL-10と血管新生因子との間の遺伝子発現に相関を認めなかった。IL-10遺伝子発現陽性のxenograftは血管密度が有意に増加していた。以上より、非小細胞肺癌細胞自身から産生されるIL-10が癌細胞の増殖性を強め、癌間質の血管新生の誘導を促進している可能性が示された。

審査では、まずヒト癌xenograftを対象として検討した意義が問われた。ヒト特異的なプライマーを用いて遺伝子発現を検討することにより、検出したいサイトカインが癌細胞自身から産生されるのか、あるいは癌間質に浸潤する免疫担当細胞から産生されるのかを評価できる有用性があると回答された。また、xenograftの増殖においてマウス間質がどのような作用を示していたのか質問された。IL-10とIL-10受容体の両遺伝子発現を認めたxenograftが44例中3例のみの低頻度であった事より、ヒト癌細胞の産生するIL-10が種を越えてマウス間質の免疫担当細胞のIL-10受容体に作用し、間質において癌増殖に関与すると思われる血管密度が高まる一因となった可能性が示唆されたが、今回の研究では血管新生因子との関係は明らかでなく、IL-10の新生血管の誘導における機序は今後の検討事項である旨返答された。今回の研究にて多くのxenograftを対象とすることが出来たことより、各継代時期でどのようにヒト間質が取り除かれ、マウス間質の血管密度が増加してゆくのかを検討する余地があると助言された。また、同じ組織分化度のxenograftでも、IL-10発現の有無により間質の線維化・炎症細胞のパターンにどのような違いがあるか組織像を観察し、IL-10の癌増殖への関与の程度を評価する事は今後の興味深い検討項目になり得ることが助言された。

以上のように、本研究には今後さらに検討すべき課題を残しているものの、xenograftを用いることにより非小細胞肺癌細胞自身からのIL-10産生とその癌増殖への関与の一部を明らかとしたものとして意義のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 小林 絃一

先端医科学 河上 裕 病理学 坂元 亨宇

微生物学・免疫学 小安 重夫

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 7月 1日

# The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture.

(単層及び3次元培養において、カルシウムイオン濃度が、骨芽細胞の生存・増殖・分化に与える影響)

前野 晋一

## 内容の要旨

【緒言】軟骨損傷に対して現在行われている自家培養軟骨細胞移植術の様々な問題点を解決すべく、われわれは軟骨複合体の作製を試みている。まず軟骨の構成成分であるⅡ型コラーゲンを用いて細胞を包埋する。骨との接触部に交互浸漬法を用いてアパタイトを沈着させて骨に適した環境を作り、母床との強固な骨性の癒合を得る。しかしアパタイトの沈着の際に用いるカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 溶液の、濃度による骨芽細胞に対する影響は明らかにされていない。そこで本研究では、各 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度における骨芽細胞の反応性を明らかにするため、生存率、増殖率、分化能、石灰化能の4つの観点から単層培養およびゲルによる3次元培養下で検討を行った。

【方法】骨芽細胞はマウス頭蓋骨から抽出し、継代した。単層培養ではtissue culture plateに $1 \times 10^4$ 個/well、3次元培養では鋳型として既述のⅡ型コラーゲンゲルに $1 \times 10^5$ 個/mlの濃度で細胞を含有させ、 $\text{Ca}^{2+}$ 溶液は培養液、生理食塩水、塩化カルシウムなどを用いて各濃度に調整した。生存率は $\text{Ca}^{2+}$ 溶液に細胞を4時間浸漬した後の生存細胞数を、増殖率は $\text{Ca}^{2+}$ 溶液で細胞を培養した後の増殖細胞数を、WST-1法もしくはMTT法を用いて測定した。分化能として1週間培養後の細胞からmRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRを用いて骨芽細胞の最終分化マーカーであるオステオカルシン (OC) を定量し、またALP染色も行った。石灰化能として、やはり1週間培養後のplateもしくはゲルに沈着したCa量を定量し、von Kossa染色も行った。

【結果】生存率は単層・3次元培養とも低濃度の $\text{Ca}^{2+}$ 、すなわち $\text{Ca}^{2+} 2-6\text{mM}$ で細胞の生存率は良好であり、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が高くなるにつれて低下した。増殖率も $\text{Ca}^{2+} 5\text{mM}$ での培養で、いずれも良好な細胞増殖を示した。この際ゲルは $\text{Ca}^{2+}$ 含有培養では基質沈着により2ヵ月間形態を維持したが、 $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下では形態維持が困難であった。分化能は、単層培養では $\text{Ca}^{2+} 6-15\text{mM}$ 、3次元培養では $\text{Ca}^{2+} 2\text{mM}$ 以上でOC mRNAの発現が亢進していた。石灰化能は、単層培養では $\text{Ca}^{2+} 10, 15, 5\text{mM}$ の順で、3次元培養では $\text{Ca}^{2+} 6\text{mM}$ でCa沈着量および沈着速度が亢進していたが、ゲル培養では細胞非包埋ゲルでも相当量のCa沈着が認められた。

【考察】骨芽細胞の骨形成において、基質産生および石灰化は重要な最終過程であるが、その詳細なメカニズムは分かっていない。本研究により単層培養およびコラーゲンゲルによる3次元培養系において、低濃度の $\text{Ca}^{2+}$ 刺激は骨芽細胞の増殖・分化を亢進しうることが示された。低濃度の $\text{Ca}^{2+}$ 負荷は、細胞活性および基質の石灰化を亢進させる有用な手技であり、今後のtissue engineeringの手技へ応用しうると考えられた。

## 論文審査の要旨

関節軟骨欠損に対する治療として、われわれはⅡ型コラーゲンゲルの深層を交互浸漬法によりアパタイト化し軟骨複合体を作製する試みを行っている。しかし、その際用いるCa溶液の濃度による細胞に対する影響は明らかでなく、本研究では2次元と3次元培養系において骨芽細胞培養に対するCa濃度の影響について検討した。マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞を用い、単層培養およびⅡ型コラーゲンゲルによる3次元培養でCa濃度による増殖能、分化能、および石灰化能の3点を検討した。また、ゲルをヌードマウスの皮下に移植する実験も行った。その結果、骨芽細胞の単層培養系において、Ca濃度は $2-4\text{mM}$ という低濃度で細胞の増殖・生存能が、 $6-8\text{mM}$ で分化能、 $10\text{mM}$ 付近で石灰化能が良好であった。コラーゲンゲルによる3次元培養系においてもほぼ同様の傾向が見られたが、濃度による差は明らかでなかった。経時的なCaの沈着は、細胞存在下の方がそのスピードは速かった。マウスの皮下移植実験では、交互浸漬のCa濃度が $10\text{mM}$ 以下では濃度依存性にゲルの石灰化が見られた。骨の微小環境下では破骨細胞周囲で局所的にCa濃度が上がっている可能性もある。今回の実験で、生理的よりもやや高いCa濃度においても骨芽細胞の活性は低下せず、むしろ石灰化を促すことが明らかとなった。従って骨芽細胞の3次元培養系においてもCaを低濃度負荷することが有効と思われる。

審査では、まず軟骨基質であるⅡ型コラーゲンに骨芽細胞を包埋した理由を質問された。未分化間葉系幹細胞を包埋し、片側を軟骨細胞、対側を骨芽細胞に傾斜をかけて分化させる試み、もしくはコラーゲンに傾斜をかける試みも行ったが難しく、再生が難しい軟骨の基質を使用し、そこに骨を作ることが軟骨複合体を作る上で容易と判断したためと回答された。また、細胞の由来・定義についての質問がなされた。頭蓋骨由来の抽出細胞は文献的に70%は骨芽細胞であり、その形質はマーカーにより確認し、継代により均一化することは確認した。しかしcell lineとして確立されている骨芽細胞や長幹骨由来の軟骨内骨化を起こす細胞との相違や、ホルモンへの感受性などは検討しておらず、今後の課題であると回答された。また、石灰化したゲルの強度、病理組織所見について質問された。細胞を包埋しCa存在下で培養することで、Ca沈着量は増えゲルとして安定化して長期にわたり形態が維持される。しかし強度は硬くならず、また病理組織所見でも細胞の基質小胞周囲での石灰化や、細胞の再配列等も確認できなかつたと回答された。

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、骨芽細胞のCa濃度による反応の違いを検討し、tissue engineeringに応用しう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 整形外科学 戸山 芳昭  
発生・分化生物学 須田 年生 生理学 岡野 栄之  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 北島 政樹、須田 年生  
審査委員長: 須田 年生

試問日: 平成17年 6月27日

# Expressed Emotion and Social Functioning in Chronic Schizophrenia (慢性統合失調症における感情表出と社会機能)

三 浦 勇 太

## 内容の要旨

家族の感情表出 (Expressed Emotion ; 以下EE) は患者に対する家族の全般的な態度を反映する臨床的尺度とされ、高EEは患者の統合失調症の再発予測因子になるとされている。EEの高低の成因を解明するためには、患者本人の要因や家族員の要因、さらに文化・社会背景のような外部要因を含め、多岐にわたる観点からの検討を要する。本研究では、統合失調症患者の社会復帰に関連し注目を集めている社会機能に着目し、EEの形成にいかなる影響を与えているかについて検討した。

対象はICD-10における統合失調症の基準を満たし、過去3ヶ月以上同居家族がある44名と、その全家族員82名である。家族は個別に、日本語版Social Functioning Scale (SFS) を記入した後、EE評価用面接であるFive-Minutes Speech Sample (FMSS) を実施された。また患者の精神症状と全般的機能を評価するために、日本語版Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) とGlobal Assessment of Functioning Scale (GAF) による評価を実施し、EEの高低と、精神症状、社会機能、その他の要因との関連を検討した。

その結果、52.3%にあたる23名の患者が高EE家族員と同居し、21名が低EE家族員とのみ同居していた。高EE群と低EE群では、患者の性別、年齢、罹病期間、抗精神病薬処方量、診断の下位類型、PANSSの下位項目、GAFスコアにおいて有意差はなかった。高EE群と低EE群間では、点数が高いほど社会機能がより高いことを示すSFSの2つの下位項目 (社会的引きこもり、自立レベル (能力)) と合計点のそれぞれにおいて、低EE群の方が有意に高い点数を示した。高EE群における低EE家族員と低EE群の家族員との比較では、社会的引きこもり、対人機能、自立レベル (能力) 項目において、低EE群の方が有意に高かった。得られた結果の因子分析では4つの因子が導かれ、第2因子がEEとSFS合計点によって説明され、高EEがSFSスコア低値と関連していた。さらにこの研究では高EE家族における低EE家族員の行動が高EE家族員のそれに類似していることが見出された。従ってより効果的なりハビリテーションのためには高EE家族における低EE家族員も統合失調症の慢性期における家族心理教育や対処行動トレーニングに組み入れられる必要があることを示唆するものである。

以上本研究により、統合失調症患者の家族のEEと患者の社会機能水準には双方向性に因果関係を持つことが明らかになった。また慢性統合失調症患者の家族員はおそらく患者の日常の社会機能を注視しており、患者の社会機能のレベルは家族のEEプロフィールに影響していることが示唆された。

## 論文審査の要旨

本研究は統合失調症患者の社会機能に着目しEEとの関連を検討したものである。対象は同居家族がある44名と、全家族82名であった。SFSが家族により評価され、FMSSおよびPANSSとGAFも実施された。23名 (52.3%) の患者が高EE 家族と、21名が低EE家族とのみ同居していた。高EE群と低EE群間では、SFSの下位項目 (社会的引きこもり、自立レベル (能力)) と合計点において、低EE群の方が有意に高い点数を示した。高EE群における低EE家族と低EE群の家族との比較では、社会的引きこもり、対人機能、自立レベル (能力) 項目において、低EE群の方が有意に高かった。因子分析では4つの因子が導かれ、高EEがSFSスコア低値と関連していた。また高EE家族における低EE家族員の行動は、高EE家族のそれに類似していた。

審査ではまず、境界線級の低EEを高EEとした理由について質問がなされた。先行研究では境界線級の低EEを高EEとした場合、より予後の予測性が高まることが指摘されており、本研究もそれに従ったとの回答がなされた。また、今回の対象は比較的に慢性軽症例であった可能性もあるが、この場合にもEEが再発可能性に影響を与えるのかとの質問があり、これに対し慢性例においてもEEの再発影響性が認められていると回答された。続いて高EEと低EEを形成する要因についての質問がなされた。病前からの家族側の要因についての検討は十分にはなされていないと回答があり、これに対し、家族の相互関係性や役割の違いも含めた検討を今後行うべきとの指摘があった。また論文中の対象採用基準によれば、慢性例のみならず急性例も含まれるため、その場合、高EEになることも考えられ、対象の設定に考慮するべきとの指摘があった。この点については、検討に含まれた初発2例とも罹病期間が1年以上の慢性状態にあったと回答された。今回の結果ではEEと社会機能の関連が確認されたが、同じ集団であっても違う時期においては結果に相違がみられることもあるかとの質問がなされた。例えば急性期においては幻覚妄想などの目立つ精神症状に対して家族の批判が強まることは予想され、また病期によって家族の注意の対象が変わることも考えられることから、同一集団であっても結果に相違がみられる可能性が高いとの説明がなされた。今後の課題として、高EE家族内における低EE家族員に焦点をあてる研究においては、同居家族が1名の場合にはこれを検討対象から除外すべきこと、評価方法としてのSFSの内部構造について一層の検討が必要であることが指摘された。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残してはいるが、統合失調症の慢性期におけるEEと社会機能の関連を確認し、さらには高EE家族員と同居する低EE家族員への臨床的介入の必要性を明らかにした点で、臨床的に価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 精神神経科学 鹿島 晴雄

内科学 鈴木 則宏 衛生学公衆衛生学 大前 和幸

医療政策・管理学 池上 直己

学力確認担当者：北島 政樹、鈴木 則宏

審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成17年 7月 5日

# Assessment of tailor-made prevention of atherosclerosis with folic acid supplementation : randomized, double-blind, placebo-controlled trials in each MTHFR C677T genotype

(葉酸補充によるテイラーメイドな動脈硬化予防の評価：MTHFR遺伝子C677T多型で層別化したプラセボ対照二重盲検ランダム化比較試験)

宮 木 幸 一

## 内容の要旨

近年発表された2つのメタアナリシスにより、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 遺伝子C677T多型のホモ変異はマイルドな高ホモシステイン血症を介し動脈硬化性疾患の独立した危険因子であることが明らかにされた。本研究では上記SNPのgenotype毎に葉酸補充によるホモシステイン低下効果を定量的に明らかにしてテイラーメイドな動脈硬化予防検討の基礎とすべく、ホモシステイン濃度の変化を主たる指標とした介入研究を行った。

研究デザインとしてはMTHFR遺伝子C677T多型で層別化した二重盲検プラセボ使用ランダム化比較試験で、RCTの報告の質を高めるべくConsolidated Standards of Reporting Trials statement (CONSORT声明)に準拠して計画・実行した。対象は某企業に勤務する健康者からボランティアを募り、葉酸または葉酸代謝に影響する薬剤の常用者を除外した203名の健康男性である。介入としては葉酸1mgを含むカプセルおよび同形のプラセボ1日1錠を経口投与90日間とした。主要エンドポイントとしては血漿総ホモシステイン濃度 (tHcy) を用い、ベースライン時、介入1ヶ月後・3ヶ月後に測定を行った。解析は全てIntention-to-treatの原則で行った。

介入群で1ヶ月後から有意な血清葉酸値の増加を認めた。全ての多型群において介入1ヶ月後から実薬群で有意なtHcy低下が観察され、その減少幅はCCおよびCT群と比較して (CC : 平均2.59 [1.81-3.36]  $\mu\text{mol/L}$ , CT : 2.64 [2.16-3.13]、但し [ ] 内は95%信頼区間)、TT群において最大で統計的にも有意差があった。(TT : 6.61 [3.47-9.76]、対CC, CT共に $p < 0.01$ ) さらに変異アリル数と減少幅の間に有意なトレンド ( $p < 0.01$ ) が確認された。上記現象は3ヶ月後でも同様に観察された。実薬群・プラセボ群における追跡率はそれぞれ96.1%、93.1%、平均服薬遵守率はそれぞれ91.8%、92.8%でありいずれも群間に有意差はなかった。

葉酸補充による有意なtHcy低下はどの遺伝子多型でも観察され、中でもTT型 (日本人一般集団での割合は10数%) における低下量はCCおよびCT群に比べ約2.4倍であることが1ヶ月後および3ヶ月後の2度にわたり定量的に示され、葉酸補充による恩恵を最も享受できる集団であることがわかった。遺伝子変異に基づく動脈硬化性疾患リスク上昇を、緑黄色野菜または葉酸サプリメントの摂取推奨により効率的に低減できるテイラーメイド予防が実現できる可能性があり、今回の知見をもとに、これらの予防施策の効率を議論していく必要があると考えられる。

## 論文審査の要旨

動脈硬化性疾患の独立した危険因子として注目されているホモシステインであるが、その代謝に重要な役割を果たすメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子C677T多型のホモ変異 (TT型) が軽度の高ホモシステイン血症を介し動脈硬化性疾患の独立した危険因子であることが明らかになってきた。本研究はCONSORT声明に準じ、遺伝子多型ごとの葉酸補充への反応性の違いを定量化することを目的とした葉酸介入のランダム化比較試験であり、3ヶ月間1mg/日の葉酸介入で血漿中のホモシステイン減少量がTT型の集団において野生型の2.4倍であることを定量的に示した。

審査では、本遺伝子多型の選定理由および他の遺伝子多型測定について質問がなされ、ホモシステイン代謝関連主要3酵素の遺伝子多型を文献調査し、機能的な変化を伴いかつJSNPデータベースにて日本人でアリル頻度が高い多型を選択したこと、および同遺伝子上のA1298C多型もタイピングしたが意味ある結果は得られなかった旨説明があった。Intention-to-treat (ITT) 解析を行ったことの妥当性について質問がなされ、CONSORT声明に準じて解析したこと、脱落を含めて解析することで本研究結果を応用した際の介入効果をより正しく推定できる可能性が高いと考えた旨説明があった。研究対象の性別は男性に限定されているが、他にホモシステインに影響を与えるとされている年齢や喫煙などについてはどう扱ったかについて質問がなされ、年齢・BMI・喫煙・アルコール消費量を交絡因子として多変量解析にて調整を行ったが結果に影響はなかった旨説明があった。ホモシステインの低下量は絶対量・比率ともにTT型の集団で大きいのが、十分な葉酸補充によりどの多型でも低下し同程度まで下がることから、ホモシステインの低下には遺伝子多型は関連しない可能性が指摘された。ベースライン時のデータで高感度CRPやbaPWV、ABIに遺伝子型による差がないことから、健康者でのホモシステインの上昇が動脈硬化を進展させるというより進展した動脈硬化巣への影響や心血管イベントの発症のトリガーになっている可能性が推定され、健康者への介入を検討することの他にハイリスク者への介入を検討すべきこと、心血管イベントの発症や死亡などの強固なエンドポイントを用いたさらなる検討が望ましいことなどの助言がなされた。

以上より、本研究はMTHFR遺伝子C677T多型ごとの葉酸補充によるホモシステイン低減を適切な疫学デザインにより定量的に評価した点で、価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 衛生学公衆衛生学 大前 和幸  
内科学 小川 聡 衛生学公衆衛生学 武林 亨  
薬剤学 谷川原祐介  
学力確認担当者：北島 政樹、小川 聡  
審査委員長：小川 聡

試問日：平成17年 7月11日

# Analysis of 109 Japanese children's lip and nose shapes using 3-dimensional digitizer.

(三次元デジタイザーを用いた日本人正常幼児109人の口唇外鼻形態分析)

森 文子

## 内容の要旨

顔面の形状の計測法としては、直接計測法、写真計測法、モアレ法、顔面石膏モデルの接触型三次元計測法、三次元レーザースキャナーによる計測法、三次元コンピュータトモグラフィによる計測法などが報告されている。

なかでも三次元的な解析が可能な顔面計測方法として、顔面石膏モデルを用いた接触型三次元計測法と、レーザースリット光ダブルスキャン方式三次元局面形状計測装置を用いた非接触型三次元計測法、三次元コンピュータトモグラフィによる計測法の報告がある。そのなかでも、臨床に有用だと思われる非接触型レーザースキャン法は、測定基準面に対して垂直に近い部分、つまり鼻翼、鼻柱などの傾斜が急な部分では精度の高いデータが得られにくいという欠点があった。

今回我々は、主に口唇裂術後の評価に重要な口唇外鼻形態を分析することに重点をおき、5～6才の日本人正常幼児109人(男児51人、女児58人)を対象に、非接触型半導体レーザ三次元計測装置を用いて、顔面形態計測を行うのに十分な精度の外鼻と口唇の三次元画像を得ることができた。

その得られた画像をコンピューター上で回転し、正面顔貌よりキュービッド弓のピーク間距離と左右の口角距離(width of the labial fissure)を測定し、basal viewより鼻翼幅と鼻尖と突出度(nasal tip protrusion)を各々計測し、その結果を男女別に分け口唇外鼻形態を詳しく分析した。さらに三次元データ変換編集ソフトを用いて、側面顔貌から鼻柱口唇角度(NLA)を計測した。その結果、nasal tip protrusion、キュービッド弓のピーク間距離、NLAでは男女間に有意差は認められなかったが、鼻翼幅、width of the labial fissureでは男児の方が有意に大きかった。

また人中稜走行を4型に(1)三角型、(2)平行型、(3)陥凹型、(4)平坦型)、鼻孔形態も4型に(1)涙滴型、(2)ハート型、(3)丸型、(4)三角型)分類した。人中稜走行分析では、男女とも平行型が最も多く(男児22人/51人、女児24人/58人)、次いで三角型が多かった(男児18人/51人、女児18人/58人)。鼻孔形態分析では、従来、口唇裂手術による変形として典型的だと言われていたハート型の鼻孔形態をもつ正常幼児が、男児で51人中14人、女児で58人中13人と相当数存在していた。

また、それぞれの特徴点で三次元座標の平均値を算出し、正常幼児男女の口唇外鼻形態平均モデルを作成した。

さらに前述の三次元データ変換編集ソフトを用いて左右鼻孔面積と上下赤唇面積を算出し、口唇裂術後の新たな形態評価法を考案した。今回の計測結果は、日本人正常幼児口唇外鼻形態の基本データとなるものである。また、今回の計測法は口唇外鼻形態の評価の指標として応用可能と考えられた。

## 論文審査の要旨

口唇裂の手術に際しては、術者の主観や美的感覚を排除し、平均的な日本人の顔面形態を念頭に入れて治療にあたる必要がある。

本論文では、口唇裂術後の評価を行う為、日本人正常5～6歳児109人を対象に、非接触型半導体レーザ三次元計測装置を用いて、外鼻と口唇の三次元画像をスキャンした。得られた画像をコンピューター上で回転、補正し、正面顔貌にてキュービッド弓のピーク間距離と口唇横裂幅を、basal viewの顔貌にて鼻翼間距離と鼻深長を計測し、口唇外鼻形態を男女別に分析した。さらに三次元データ変換編集ソフトを用いて、側面顔貌にて鼻柱口唇角度を計測した。鼻深長、キュービッド弓のピーク間距離、鼻柱口唇角度では男女間に有意差は認められなかったが、鼻翼間距離、口唇横裂幅では男児の方が有意に大きかった。また人中稜走行を4型に(1)三角型、(2)平行型、(3)陥凹型、(4)平坦型)、鼻孔形態も4型に(1)涙滴型、(2)ハート型、(3)丸型、(4)三角型)分類した。

また、それぞれの特徴点で三次元座標の平均値を算出し、正常幼児男女の口唇外鼻形態平均モデルを作成した。

さらに三次元データ変換編集ソフトを用いて左右鼻孔面積と上下赤唇面積を算出し、その計測値と顔面各部位の測定値との割合を比較することによる口唇裂術後の新たな形態評価法を考案した。

審査では、まず、幼児の身長・体重が計測値と相関しているか、計測値は正規分布をしていたのかが質問された。今回、身長・体重は記録してあるものの、計測値と関連付けた解析はしておらず、正規分布をしていたかどうかも含めて今後の検討課題としたいと回答された。また、口唇外鼻形態の成長による変化及び成人例でのデータについての質問には、現在測定を継続中であるとの回答があった。

また、表情により顔面形態が変化するのではないかと質問には、出来るだけ安静時に短時間で計測を行うようにしているとの回答があった。

さらに、口唇裂手術前に本検査を行うことにより、性差、両親の顔貌、体格なども考慮された口唇裂手術時に目指すべき形態のイメージが、術者と患者双方にとって明確になり、手術による具現性が高められると回答された。

また、本測定法の他の臨床応用の可能性についての質問には、小耳症、上顎骨発育不全、人中低形成などの顔面形態異常疾患だけでなく、胸郭変形、乳房低形成などにおいても診断治療に応用し得るとの回答があった。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているものの、顔面計測法として新しい方法であり、その測定値は日本人正常幼児の口唇外鼻形態の基本データとなるものである。また、顔面形態異常を示す様々な疾患の診断に応用できる発展性があり、意義ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 形成外科学 中島 龍夫  
耳鼻咽喉科学 小川 郁 解剖学 相磯 貞和  
小児科学 高橋 孝雄  
学力確認担当者: 北島 政樹、小川 郁  
審査委員長: 小川 郁

試問日: 平成17年 6月 9日



# 女性性器癌細胞における $\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素の発現とその細胞生物学的特性におよぼす影響

山下 博

## 内容の要旨

$\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素（以下 $\beta$ 1,4-GT）は、N-アセチルグルコサミンにガラクトースを $\beta$ 1-4結合させる糖転移酵素であり、ラクト系列II型糖鎖群の合成に関与している。婦人科悪性腫瘍の中でも比較的前後良好な子宮体癌にはこの酵素の発現が少なく、予後不良な卵巣癌においては高発現であることから、 $\beta$ 1,4-GTは癌の細胞生物学的特性に深く関与している可能性がある。本研究においては、 $\beta$ 1,4-GTがどのような癌の生物学的特性に関与しているのかを明らかにするために、子宮体癌細胞株に $\beta$ 1,4-GTのセンス遺伝子を、卵巣癌細胞株にアンチセンス遺伝子をそれぞれリポフェクチン法にて導入し、細胞増殖、形態、および浸潤・転移といった細胞特性の変化について検討した。

子宮体癌細胞株SNG-Mにセンス遺伝子を導入したトランスフェクタント細胞株においては、コントロール細胞に比べて細胞倍加時間が有意に短く細胞増殖能は亢進していた。また、細胞外基質である4型コラーゲンに対する接着やマトリゲルへの浸潤はトランスフェクタント細胞株で有意に亢進しており、 $\beta$ 1,4-GTの過剰発現が浸潤・転移能を高めている結果となった。

一方、卵巣癌細胞株RMG-IIにアンチセンス遺伝子を導入したトランスフェクタント細胞株においては、細胞倍加時間はコントロール細胞に比べて有意な変化を認めなかった。1型コラーゲン、4型コラーゲン、およびフィブロネクチンといった細胞外基質に対する接着はトランスフェクタント細胞株において有意に低く、 $\beta$ 1,4-GTの発現低下が浸潤・転移能を低下させている可能性が示唆された。また、*in vivo*実験としてヌードマウスにおける腹腔内注射モデルを用いたところ、トランスフェクタント細胞株が形成する腹腔内腫瘍の湿重量はコントロール細胞が形成する腹腔内腫瘍の湿重量と有意差を認めなかったが、形成された転移巣の数はトランスフェクタント細胞株において有意に減少しており、*in vitro*の結果を裏付けるものとなった。

子宮体癌細胞株、卵巣癌細胞株いずれにおいても $\beta$ 1,4-GTの発現量の変化は細胞株の形態に変化をもたらさなかった。

本研究では、婦人科悪性腫瘍細胞における $\beta$ 1,4-GTの作用について検討した。その結果、 $\beta$ 1,4-GTは腫瘍細胞の浸潤・転移といった細胞生物学的特性に促進的に作用することが明らかになった。しかしながら、作用がインテグリンなどの接着分子を介した間接的なものであるのか、あるいは $\beta$ 1,4-GTそのものが接着分子として作用するのかわかりず、検討する必要がある。また、細胞増殖に対しては抑制的には作用しないことが明らかになった。

## 論文審査の要旨

$\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素（ $\beta$ 1,4-GT）は癌の細胞特性に関与している可能性がある。本研究では $\beta$ 1,4-GTが低発現な子宮体癌細胞株に $\beta$ 1,4-GTのセンス遺伝子を、高発現な卵巣癌細胞株にアンチセンス遺伝子をそれぞれ導入し細胞特性の変化を検討した。子宮体癌細胞株SNG-Mにセンス遺伝子を導入し、 $\beta$ 1,4-GTを過剰発現させることにより細胞倍加時間が短縮し細胞外基質に対する接着やマトリゲルへの浸潤は亢進した。卵巣癌細胞株RMG-IIにアンチセンス遺伝子を導入し発現を抑制することにより、細胞倍加時間は不変であったが、細胞外基質への接着は低下した。また、ヌードマウスにおける腹腔内注射モデルでは、形成された腫瘍重量には変化が認められなかったが、転移巣の数はトランスフェクタント細胞株では減少し、*in vitro*の結果を裏付けるものとなった。以上の結果より $\beta$ 1,4-GTは腫瘍細胞の浸潤・転移という特性に促進的に作用することが明らかになった。細胞増殖に対しては抑制的には作用しないことが明らかになった。

審査では、まず背景説明の知見が古いことが指摘された。特に $\beta$ 1,4-GTが接着分子としての機能を有するという点について、現在では認識が変わっていることが指摘された。また、方法の記載に重複する項目が認められること、統計学的解析法の表記が一般的ではないことが指摘された。結果説明では、*in vivo*の実験結果の表記が一部誤っている点が指摘された。以上の指摘を踏まえ加筆訂正をおこなうものとした。次にSNG-Mを用いた実験が単一クローンの実験である点が指摘され、他のクローンでも実験が行われたかが質問された。これに対し、予備実験では他のクローンも同様の傾向を示したと回答された。また、女性性器癌と $\beta$ 1,4-GTの関連性を調べた報告はあるかとの質問に対しこの実験系を用いた報告はないとの回答があった。RMG-IIを用いた実験については、アンチセンス導入細胞に形態学的な変化はなかったのかとの質問があり、形態学的な変化は認められなかったとの回答があった。*in vivo*での実験においてシアリルルイスX抗体を投与し、転移の抑制を検討した実験は行わなかったのかとの質問があり、行っていないが今後の検討課題としたとの回答があった。最後に細胞外基質との接着分子として知られているインテグリンとの関係が質問され、本研究の結果はインテグリンの糖鎖修飾による機能変化を捉えている可能性があるが、インテグリンの機能が他の糖転移酵素の過剰発現では低下するという報告もあり、インテグリンの機能調節には適切な糖鎖修飾が必要なのではないかと考察が述べられた。

以上、本研究はさらに検討すべきいくつかの課題を残しているが、女性性器癌の細胞特性に $\beta$ 1,4-GTが促進的に関与していることが示唆された点において、有意な論文であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
病理学 坂元 亨宇 先端医科学 河上 裕  
医化学 末松 誠  
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

# IgG Binds to Desmoglein 3 in Desmosomes and Causes a Desmosomal Split Without Keratin Retraction in a Pemphigus Mouse Model.

(天疱瘡モデルマウスにおいて、IgG自己抗体はデスモソーム内のデスモグレイニン3に直接結合し、ケラチン線維の退縮をとまわずにデスモソームを半割する。)

清水 篤

## 内容の要旨

### PV水疱発生機序の免疫電顕的解析

PVの標的抗原はデスモソーム (DM) に存在するカドヘリン型接着蛋白の一つDsg3である。これまでの研究から、PV自己抗体がDM上に特異的に結合することが免疫電顕的に明らかにされてきたが、実際に生体内 (*in vivo*) に沈着するIgG自己抗体の微細局在は不明であり、またPV水疱発生機序についても十分に解明されていなかった。

PVモデルマウスは (J Clin Invest 105:625-631, 2000)、PV標的抗原であるDsg3を発現していないDsg3ノックアウト (-/-) マウスが、自己に対する免疫寛容が成立していない事実を利用し、Dsg3<sup>-/-</sup>マウスをマウス組み替えDsg3 (rDsg3) にて免疫し、その脾細胞を、正常にDsg3を発現する免疫不全マウス (Rag2<sup>-/-</sup>マウス) に移植することで、*in vivo* で持続的に抗Dsg3抗体を産生し、病理組織学的、電顕的にヒトPVに特徴的な表現型を呈する疾患モデルである。本研究では、本疾患モデルを用いて免疫電顕的な解析を行った。方法として、現在、抗原性および形態の保持に最も優れた手法である、急速凍結固定および凍結置換法を用いた後免疫電顕法を用いた。

その結果、*in vivo* に沈着するIgG自己抗体はDM細胞外領域に特異的に局在し、生体内に存在するDsg3の局在と一致することを突き止めた。さらに、PVの特徴的な所見である基底細胞直上での棘融解部の上面において、半割したDMの細胞外領域にIgG自己抗体が沈着していること、非棘融解部および棘融解部の基底細胞側面においては、接着板やケラチン線維が退縮しているにもかかわらず、その細胞外領域にIgG特異的な沈着を認めること、を発見した。これまでに、PVの水疱発生機序には3つの機序、すなわち、(1) Dsg3へPV自己抗体が直接結合することでDsg3分子の細胞接着能が障害されるとする説(直接阻害説)、(2) 細胞膜上にプールされているDsg3がIgG自己抗体と結合し細胞質内に取り込まれ、DMからDsg3が枯渇しDMの接着が障害されるとする説 (Dsg3枯渇説)、(3) IgGがDsg3と結合することで、何らかのシグナル伝達が生じ細胞接着が障害される説 (ケラチン退縮説)、が考えられてきた。しかし、実験の結果*in vivo*においてIgG自己抗体はDMに存在するDsg3に直接到達し結合し得ること、棘融解部上面での半割DMの細胞外領域にIgGは結合し残存していること、ケラチン線維の退縮を認めるにもかかわらず、基底細胞側面では細胞接着が維持されていること、などから(2)の機序であるDsg3のDMからの枯渇は水疱発生機序において否定的であること。ケラチン線維の退縮は棘融解部および非棘融解部においても認められることから、(3)の説であるケラチン退縮は*in vivo*において認められるものの、水疱発生機序として重要なイベントとは考えにくいこと。そして、IgG自己抗体が標的抗原に直接結合し、細胞接着能を阻害することが、PV水疱発生機序において最も重要であることを明らかにした。

## 論文審査の要旨

自己免疫性水疱性疾患である尋常性天疱瘡 (PV) の標的エピトープであるデスモグレイニン3 (Dsg3) の超微細局在が、デスモソーム (DM) 細胞外領域にあることはこれまで免疫電顕的に示されてきたが、*in vivo*でのPV自己抗体 (IgG) 結合部位の局在の解析はなされていない。本研究では、PVモデルマウスを用いて、*in vivo*でのIgG沈着部位の超微細局在およびDsg3にIgGが結合した後のDMの変化を免疫電顕的に解析し、PV水疱発生機序の検討を行った。結果、IgGはDM外縁だけでなく、DM内側の標的エピトープに到達可能であることが示された。また、棘融解部の基底細胞上面では、ケラチンに裏打ちされたままDMの接着面で分割された、半割DMの細胞外領域にIgGの沈着が認められた。一方、棘融解部および非棘融解部の基底細胞側面では、DMの接着板からケラチンが細胞内へ退縮し、接着板を消失したDM様構造が観察された。以上から、PVの水疱形成はIgGのDsg3細胞接着能の直接阻害により引き起こされていることが推測され、PV水疱形成部位において基底細胞上面と側面で形態的に異なるDMが認められることを初めて記載した。

審査では、Dsg3にIgG結合後、Dsg3細胞外領域が何らかのプロテアーゼにより切断される可能性について質問された。既知の報告により、水疱形成誘導能を有し、Dsg3細胞外領域N末端を認識するモノクローナルIgG (AK23) のハイブリドーマ細胞を腹腔内投与したマウスの水疱形成部の免疫電顕から、半割DM外面にAK23の沈着を認めたことから、少なくとも一部のDsg3は切断されることなくDMに存在していることが示唆されると回答された。また、Dsg3はAK23と結合した後、切断されることなくAK23と共に細胞内に取り込まれる点について補足され、今後、Dsg3のプロテアーゼによる消化については検討が必要であるとの助言がなされた。次に、DMからのケラチン退縮および半割DMの形成機序について説明が求められた。基底細胞は基底膜により真皮と強力に固定されているため、基底細胞側面のDMは上面に比べ外力による影響が少なく、Dsg3にIgG結合後、何らかのシグナル伝達によりケラチン退縮が生じるのに十分な時間、細胞接着を保ったまま存在していると考えられる。一方、上面ではDsg3へのIgG結合により細胞接着能の弱くなったDMが、ケラチン退縮を生じる前に外力の影響を受け半割してしるものと推察されると回答された。また、DM様構造が、抗体結合後のシグナルによるケラチン退縮により形成されるのであれば、PV標的抗原を欠損したDsg3<sup>-/-</sup>マウスではDM様構造が形成されないのかとの質問に対し、DM様構造が形態的に正常の細胞膜と区別がつかず、Dsg3の免疫染色ができないDsg3<sup>-/-</sup>マウスにおいて特定するのは困難であることを説明し、審査を終えた。

以上、本研究ではさらに検討されるべき課題は少なからずあるものの、*in vivo*でのIgG結合部位の超微細局在を免疫電顕的に初めて詳細に解析した論文であり、PV水疱発生機序の解明のため価値ある研究として評価された。

論文審査担当者 主査 皮膚科学 天谷 雅行  
微生物学・免疫学 小安 重夫 病理学 岡田 保典  
微生物学・免疫学 石川 博通  
学力確認担当者: 北島 政樹、小安 重夫  
審査委員長: 小安 重夫

試問日: 平成17年 8月24日

# Detection of IL-2 Receptor Gene Expression in Peripheral Blood from Renal Transplant Patients

(腎移植患者末梢血におけるIL-2 receptor遺伝子発現の検出)

清水 壮一

## 内容の要旨

移植患者の治療には、拒絶反応の早期かつ安全な発見が重要であるが、理学所見、臨床化学検査所見の異常は特異的でなく、実際の免疫反応より遅れておこってくるし、グラフト生検には出血などの合併症がある。移植後の病態では、グラフト内に浸潤している免疫細胞がIL-1、IL-2などのサイトカインを産生し免疫反応を調節している。そこで、これらのサイトカイン遺伝子発現を検出できれば拒絶反応の早期発見に有用であると考えられる。サイトカインを検出する方法として、末梢血中のタンパクレベルを測定するのが一般的であるが、サイトカインはautocrine、paracrine的に局所で働いているため、末梢血中のタンパクのレベルはその局所の変化を必ずしも反映していない。移植グラフトの生検組織などから直接局所のサイトカイン遺伝子発現を検出する試みもあるが、侵襲性である。末梢血には局所で活性化された免疫細胞が一部流入しており、これらの細胞における遺伝子発現を検出すれば、末梢レベルで局所の変化を知ることができると考えられる。しかしこれには従来単核球の単離が必要とされおり、人工的な遺伝子活性化が惹起されることが問題である。これに対し、もし末梢血全血より直接の検出が出来れば、遺伝子活性化を防ぐことができ臨床的にも有用と考えられる。本研究では、開腹手術、腎移植症例におけるIL-1、TNF、IL-2、IL-2R遺伝子発現のprofileを明らかにし、サイトカインモニタリングの可能性を検討した。対象は健康人3例、開腹手術例8例、腎移植4例であった。移植の1例は術後53日目に拒絶反応がみられた。末梢全血よりacid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法に準じTotal RNAを抽出し、RT-PCRをおこなった。末梢血中のIL-1、TNF、IL-2、IL-2R遺伝子発現profileの検討では、健康人、開腹手術前、腎移植前にはこれらのmRNAは検出されなかった。開腹手術後には、IL-1、TNFが検出されたが、IL-2、IL-2Rは検出されなかった。腎移植後および拒絶反応時には、IL-1、TNF、IL-2Rが検出されたが、IL-2は検出されなかった。この結果より、本方法で移植患者と開腹手術患者とのサイトカインprofileの違いを識別でき、移植後のモニタリングの可能性が示唆された。IL-2が検出されなかった理由としては、免疫抑制剤によって抑制されている可能性、術後遅れて発現している可能性があり、経時的な検討が必要と考えられた。IL-2Rの上昇をきたすとされるサイトメガロウィルス (CMV) 感染などでは、CMV自体をPCRで検出することやIL-2R mRNAレベルを定量することが必要で、今後の検討課題と考えている。

## 論文審査の要旨

サイトカインが移植後の免疫反応に重要な役割を果たしていることはよく知られている。本研究は、末梢血全血からのRT-PCR法を用いたサイトカインmRNA微量検出法の確立と、その免疫学的モニタリングの可能性につき腎移植例で検討したものである。本方法で開腹手術例ではIL-1、TNFが検出されたが、腎移植例、拒絶反応例ではこれらに加えIL-2Rが検出された。本方法は非侵襲的で頻回の検査が可能、また遺伝子発現を人工的な活性化なしに検出する点でモニタリングに適している。また移植と開腹手術とのサイトカインprofileの違いを識別できたことは、移植患者のモニタリングに有用である可能性を示唆する。

審査ではまず、開腹手術例でIL-1、TNFが検出され、移植例でIL-2Rが検出されたことの意味について質問がなされた。これに対して開腹例では侵襲に対する生体反応として炎症性サイトカインが誘導され関与していること、また移植例ではこれに加え細胞性免疫の活性化が起こっているものと推測されると回答された。また心、肝移植ではどうかとの質問があり、いずれも拒絶反応でIL-2Rの上昇の報告が有り、本研究は肝移植への準備として泌尿器科の協力を得て行われたものであることが述べられた。次いで、末梢血中のmRNAがタンパクレベルより局所の変化を反映するとの考え方への説明が求められ、これに対し末梢タンパクレベルは必ずしもグラフト組織の遺伝子発現と相関しないとの報告があること、末梢では局所に相関した遺伝子発現が検出された例があることより末梢の遺伝子発現がより局所を反映する可能性があることと説明された。IL-2Rの上昇を本法のように定性的に見ることの意味について質問がなされたが、これに対しては、今回のPCR条件下では開腹と移植が定性的に識別可能であったが、将来的には定量的な検討が必要であり、本研究でもAW108をinternal standardに用いた定量化を試みたが不成功であったと回答がなされた。また今回の結果からは拒絶反応を早期に発見するとの結論は得られないのではないかと指摘には、拒絶反応例に特異的な所見は得られなかったがサイトカインprofileで病態を識別できたことは研究の第一歩として今後の可能性を示唆するものと考えられ、今後経時的な検討に加えIL-4、IL-10、IL-12、IFN $\gamma$ などの他のサイトカインについても調べる必要があると説明された。また方法の具体的な手順については、日常の採血検体の一部、全血1mlから行うことができ、簡便で小児例にも適した方法であると述べられた。さらに肝移植例での検討も行えば興味深いとの助言をうけた。

以上、本研究は今後検討すべき課題が少なからずあるものの、臨床応用上有用なサイトカインの免疫学的モニタリングの方法を示した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
微生物学・免疫学 小安 重夫 先端医科学 河上 裕  
内科学 池田 康夫  
学力確認担当者：北島 政樹、小安 重夫  
審査委員長：小安 重夫

試問日：平成17年 7月21日

# Tyrosine Kinase Inhibitor SU6668 Inhibits Peritoneal Dissemination of Gastric Cancer *Via* Suppression of Tumor Angiogenesis.

(チロシンキナーゼ阻害剤SU6668は腫瘍血管新生阻害によって胃癌細胞の腹膜転移を抑制する)

徳 山 丞

## 内容の要旨

胃癌の再発形式においては腹膜播種がもっとも頻度が高く、その予防・治療は臨床的に極めて重要である。胃癌の腹膜播種には癌細胞の離脱・接着・浸潤・増殖など様々な段階が必要であるが、特に浸潤・増殖における血管新生が中心的な役割を果たしているものと考えられている。血管新生にはvascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, platelet-derived growth factorなどのtyrosine kinase receptor (TKR) が関わっており、これらのTKRを抑制することにより血管新生阻害を介して腹膜播種を抑制することが期待される。本報ではヒト胃癌株を用いて小分子TKR阻害剤であるSU6668の腹膜播種抑制効果の検討を行った。

ヒト胃癌細胞株 (TMK-1, MKN-45, MKN-74) と培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対するSU6668の細胞毒性を、*in vitro* MTTアッセイおよびBrdU取り込み阻害試験により検討した。MTTアッセイによりおけるSU6668のヒト胃癌株に対する細胞毒性は高濃度においてのみ認められ、TMK-1, MKN-45, MKN-74のIC<sub>50</sub>はそれぞれ22.6, 31.8, 26.7μg/mlであったが、HUVECにおけるIC<sub>50</sub>は8.9μg/mlと血管内皮細胞に対する選択的細胞障害性が認められた。VEGF (100μg/ml) 刺激によりHUVECのBrdU取り込みは対照群に比し約2.6倍に増加したが、ヒト胃癌株 (TMK-1, MKN-45) のBrdU取り込みはVEGF刺激による影響されなかった。ヒト胃癌株 (TMK-1, MKN-45) のBrdU取り込みはSU6668 (24μg/ml) により対照群に比し半減し、その効果はVEGF刺激の有無に関わらず観察された。一方、HUVECのBrdU取り込みはSU6668 (8 μg/ml) の存在下でVEGF刺激の有無に関わらず5.8–10.1%程度に減少した。

Severe combined immuno-deficient (SCID) マウス・ヒト胃癌腹膜播種モデルを用いてSU6668の腹膜播種抑制効果について検討した。すなわちSCIDマウス腹腔内へTMK-1 (1.0×10<sup>5</sup> cells) を投与し、SU6668 200mg/kg/dayを一日2回二週間連続経口投与をおこなった。対照群では7匹中7匹に腹膜播種が認められたが、SU6668投与群では、8匹中2匹のみが腹膜播種が発現した (p<0.05)。また腹膜播種の平均重量は対照群150±190mg, 治療群15mgであり、推計学的に有意なSU6668による腹膜播種の減少が認められた。

胃癌腹膜播種の予防・治療には長期の治療が必要であり、経口で有効かつ毒性の低いSU6668は今後臨床応用に有用な薬剤と考えられた。

## 論文審査の要旨

胃癌腹膜播種は難治性の病態であり、新規抗癌剤の開発が期待されている。胃癌腹膜播種の形成過程にはさまざまな段階があり、癌細胞の増殖の際に血管新生が不可欠であることが知られている。血管新生の際に必要な血管内皮細胞の増殖にはチロシンキナーゼレセプター (TKR) を標的とするVEGFが深く関与している。本研究ではヒト胃癌株を用いて、VEGF, PDGF, FGFのTKR阻害剤であるSU6668の腹膜播種抑制効果の検討を行った。

審査では、まずSU6668が有するTKR阻害の特異性についての質疑がなされた。本薬剤はVEGFのみならずPDGFやFGFに対する阻害効果も有しているため、本実験において他の増殖因子が影響をおよぼす可能性についての質問がなされた。今回使用したヒト胃癌株はVEGF産生性であり、VEGFが血管内皮細胞の増殖因子であることから、癌細胞から産生されるVEGFによって腫瘍血管新生が誘導されるとの仮説のもとに実験を行ったとの説明がなされた。本研究では施行されていないSU6668が有するPDGFやFGFの阻害効果についての検討も必要であるとの指摘がなされた。

本薬剤の培養癌細胞に対する抑制効果が非特異的なものなのかVEGFを介するものなのかとの質問があり、他の増殖因子が関与している可能性はあるが、培養液中の他の増殖因子を排除して培養を行ったとの回答がなされた。またMTTアッセイが培養細胞のcytotoxicityの評価となり得るのかと質問があった。MTTアッセイは生細胞がミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素による反応を観察しており、生細胞数と相関することから、生細胞の指標として細胞毒性の評価に使用しているとの回答がなされた。

腹膜播種結節の評価の際、結節数や重量からだけでは血管新生を介した抑制効果であるとの根拠に乏しいとの指摘があり、新生血管密度の測定が不可欠であった説明がなされた。さらに本薬剤によりアポトーシスが誘導されるかどうかの検討も必要である指摘がなされた。この他に腹膜転移の抑制効果が血管新生阻害によるものではなく、腹膜への接着や浸潤に対する阻害効果によって抑制された可能性があるとの指摘があり、この点を明らかにするためには腹膜転移が成立後に本薬剤の投与を開始する動物実験の必要性についての回答がなされた。SCIDマウスを使用した理由については、腹膜播種好発モデルであるためであることが説明され、本薬剤の経口投与量決定方法や血中濃度についての質疑応答がなされた。

本薬剤の副作用についての質問がなされ、実験動物では認められなかったが、現在日本でのPhase Iの臨床試験における副作用報告について説明がなされた。

以上のように本論文には図表の改訂や今後検討すべき課題が残されているが、TKR阻害剤SU6668がヒト胃癌株を用いたSCIDマウス腹膜播種モデルにおいて血管新生を介した腹膜播種抑制効果を有すること、今後の臨床応用に有用な薬剤となる可能性があることを明らかにした点で、意義ある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 病理学 坂元 亨字  
先端医科学 河上 裕  
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 8月10日

# HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction.

(熱ショック蛋白27は線維芽細胞の接着、運動、基質収縮を制御する)

平野 早 秀 子

## 内容の要旨

皮膚の全層欠損創の治癒では、欠損部に形成される肉芽組織の収縮により欠損面積は20%に縮小し、収縮した肉芽組織上に上皮化がおり治癒は完成する。肉芽組織は主に、創部に遊走し増殖した線維芽細胞と、線維芽細胞が分泌した細胞外マトリックスからなる。収縮は線維芽細胞および筋線維芽細胞の細胞張力により、コラーゲンの再構築によると考えられており、細胞骨格であるアクチンファイバーが主要な役割を果たしていると考えられている。

低分子熱ショック蛋白27 (HSP27) は、骨格筋および平滑筋をはじめ、多様の細胞内に発現されている蛋白質である。MAPキナーゼ経路の下流に位置し、リン酸化されることがわかっており、アクチンとの結合能を有し、アクチンファイバーの保護作用や、平滑筋の収縮への関与が報告されている。線維芽細胞をコラーゲンゲル内に3次元的に培養すると、ゲル体積の収縮を引き起こす現象を、細胞培養の肉芽組織モデルとして用い、HSP27が創収縮に関与している可能性について検討した。

HSP27をごく微量のみ発現するマウス線維芽細胞株STOを用い、ラットのセンス及びアンチセンスHSP27を遺伝子導入し、HSP27過剰発現株 (SS12)、過小発現株 (AS10)、ベクターのみ導入株 (VOS) を樹立した。3つの細胞株を用い、コラーゲンゲルの収縮を調べると、SS12で促進され、AS10で抑制され、HSP27発現量とコラーゲンゲル収縮に相関性がみられた。コラーゲンゲル収縮は、細胞の器質への接着、細胞の張力および再構築の能力など、複数の過程の結果おこる現象であるため、それらのうちのどの過程がHSP27の発現によって影響をうけるかを検討した。

コラーゲン器質の中に3次元的に蒔かれた細胞が双極性に伸展する速さを調べると、SS12で促進され、AS10で抑制されていた。SS12は長径の長さ、長径と短径の比ともにVOSよりも大きく、AS10では双方とも小さく、伸展能の、HSP27発現量との関連が見られた。細胞の接着能を調べると、1時間後に付着した細胞の面積および数は、SS12で有意に多く、AS10で有意に少なかった。これより、HSP27発現量が細胞の器質との接着を制御することがわかった。

以上の結果より、HSP27の発現量が、線維芽細胞の細胞接着能、細胞伸展を制御し、創収縮の細胞培養モデルであるコラーゲンゲル収縮を制御した。HSP27が細胞接着能を制御することにより、細胞伸展能およびコラーゲンゲル収縮を制御している可能性が示唆されたが、収縮作用への直接の関与の可能性もあり、分子レベルでの機序の解明が今後の課題である。

## 論文審査の要旨

皮膚の全層欠損創の治癒は、欠損部に形成される肉芽組織の収縮と、収縮した肉芽組織上の上皮化による。肉芽組織の収縮は線維芽細胞および筋線維芽細胞の細胞張力による、コラーゲンの再構築によると考えられており、細胞骨格であるアクチンファイバーが主要な役割を果たしていると考えられているが、収縮を制御する分子レベルの機序については明らかでない。本論文では、3次元培養線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮を用い、HSP27がマトリックスとの接着、細胞伸長を制御することにより、創収縮を制御することを示した。

審査ではまず、細胞同士の接着の有無および、細胞の方向性について質問され、ペトリ皿に平行な面内でランダムな向きに進展していると回答された。浮遊ゲルの辺縁では、細胞は辺縁に平行に並び、細胞同士が進展した先端同士で接着しているようにみられる場合もあるが、数は少なく、ゲル収縮は細胞と基質の相互作用によるもので、細胞同士の相互作用とは考えにくい、と回答された。コラーゲンゲル内の細胞の形態を経時的に追った写真について、HSP27過剰発現株では細胞の位置が変わっていることが指摘され、細胞が移動したことによると考えられると答えられた。

遺伝子導入の方法については、発現量の違いのちがう細胞株をいくつか使用するか、またはオン・オフの可能なベクターを使用すれば、よりよかつたとの指摘があった。

細胞接着が全ての結果を導いているのかという質問に対しては、分子機構がわからないため、そのほかの可能性は否定できないが、細胞接着の相違ですべての結果が説明できることは事実であると回答され、HSP27が細胞の基質への接着を制御する機序が今後の課題であると指摘された。

げっ歯類では、ヒト皮膚よりも創収縮が大きく、同様の結果がヒトでも想定されるか、また、肉線筋膜が収縮に大きな役割を担っているのではないかと、という質問に対して、文献によるラットの創は創縁を肉芽組織または下面組織から刺がすと収縮しないことが報告されており、肉線筋膜が収縮をになう可能性は低いと解答された。また、臨床応用への可能性については、実際に創収縮にはHSP27は誘導され、機能していることがほとんどなので、創傷治癒遅延でHSP27に障害がみとめられた場合には、治療の可能性も考えられるが、現在の状態では創治癒に関連する治療は適応がないと回答された。ただ、様々な筋肉疾患でHSP27の異常が発見されており、HSP27の臨床応用は近い将来可能になると考えられる。

本研究は、HSP27が線維芽細胞のマトリックス接着能、細胞伸展を制御し、創収縮の細胞培養モデルであるコラーゲンゲル収縮を制御することを明らかにした。今後の研究による、分子機序の解明が不可欠であるが、創傷治癒の機序解明において有用な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 形成外科学 中島 龍夫  
皮膚科学 天谷 雅行 病理学 岡田 保典  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者：北島 政樹、天谷 雅行  
審査委員長：天谷 雅行

試問日：平成17年10月 3日

# Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues.

乳癌組織におけるmaspin蛋白の発現と組織学的悪性度と血管新生との関係についての解析。

北 條 隆

## 内容の要旨

Serpin (serin protease inhibitor) familyの一員であるMaspinは癌細胞の浸潤と転移の抑制や血管新生の抑制に関与し、更にp53による発現の制御を受けるといった報告がなされている。Maspinは正常乳腺上皮と乳癌細胞由来の遺伝子を用いたdifferential display法により同定された癌抑制遺伝子の一つである。我々は乳癌組織において、癌細胞周囲に存在する筋上皮細胞でのMaspinの発現の有無と病理学的悪性度、間質での腫瘍血管数、癌細胞でのp53およびc-erbB2の発現パターン、更にMaspinとc-erbB2の発現の有無と5年無病率との相関を検討した。乳癌組織49例を用いて抗Maspin抗体、筋上皮細胞の確認に対し抗平滑筋抗体(SMA)、腫瘍新生血管に対して抗第Ⅳ因子抗体、さらに抗p53および抗c-erbB2抗体を用い免疫染色を行い、顕微鏡下にて反応の有無を確認し検討した。Maspinの筋上皮細胞での発現の内訳は陰性29例、陽性20例であった。癌細胞の周囲間質への浸潤様式と強い相関を認めた。また間質での腫瘍新生血管数はMaspin陰性症例に有意に多く、癌細胞におけるc-erbB2の発現はMaspin陰性症例に多く認められた。しかしMaspinとp53の発現には有意な相関は見られなかった。更に術後5年間の無病生存率と比較したところ、Maspin陽性症例は陰性症例と比較し再発が少ない傾向がみられ、またc-erbB2陰性症例は陽性症例と比較し有意に再発率が少なかった。以上の結果より、腫瘍周囲に存在する筋上皮細胞より産生されるMaspinが腫瘍の増悪に対し抑制的に作用し、腫瘍の周囲間質への進展を制御している可能性が示される。いくつかの研究では、筋上皮培養細胞を用いて、筋上皮細胞が細胞死を誘導する事により乳癌細胞の増殖抑制効果を引き起こすことが証明され、さらに筋上皮細胞の存在が癌細胞の浸潤や転移を抑制している事も示唆している。筋上皮細胞でのMaspinの発現が腫瘍間で差を認める理由としては、Maspin発現抑制に関してMaspin promoter活性を抑制する因子の存在や、promoter領域部分のmethylationなどが考えられる。今回の研究においては、有意差は認めなかったがMaspin陽性症例は陰性症例と比較して、術後5年間の再発症例が少ない傾向が見られた。これらの結果より、筋上皮細胞でのMaspinの発現の有無が乳癌局所での癌の進展や腫瘍血管新生などの病理学的悪性度、さらには術後乳癌の再発に少なからず関与している事が示唆され、今後新たな予後因子としてのマーカーとなる可能性が示された。

## 論文審査の要旨

本研究では乳癌臨床検体を使用し、癌巣における筋上皮細胞でのserine protease inhibitorであるMaspinの発現様式とその臨床病理学的意義と癌浸潤先進部における血管新生に及ぼす影響について免疫組織染色にて検討した。結果Maspin陽性症例では、腫瘍増殖形式のexpanding patternが有意に多く、周囲間質への浸潤様式との相関が示唆され、さらに新生血管数は有意に少なかった。また、乳癌悪性度指標のひとつであるc-erbB2の発現の低い症例と相関している可能性が示唆された。

審査では、まずMaspin蛋白の正常部と癌部での発現について質問がなされた。免疫組織染色においては、正常乳腺では筋上皮細胞に発現している。また、今までの研究では筋上皮細胞と癌細胞自体にも発現を見ることがあるといわれており、悪性度に従い漸減し高悪性度群や転移巣では完全に消失すると報告されているが、今回の研究では悪性度に関係なく乳癌細胞では発現を見ない症例が大多数であったと回答がなされた。筋上皮細胞に発現しているMaspinと上皮細胞である癌細胞の増殖、また間質での血管新生との関係について問われ、正常組織でのMaspinの主な働きは、乳腺の発生・発育・発達および授乳期においては、乳管局所での乳管上皮の過剰な増殖を抑制することにより恒常性を保つといわれている。従って、癌巣内の筋上皮細胞に発現するMaspinは、乳管局所においてパラクライン的に癌細胞の増殖を抑制している可能性が考えられ、血管新生の抑制については細胞外に分泌されたMaspinがその血管新生抑制作用により血管新生を抑制しているという回答がなされた。Maspinの染色性とmutationとの関係についての質問に対しては、乳癌では、癌の進展に伴いMaspin発現の減少が報告されているが、遺伝子のmutationや欠損は報告されておらず、プロモーター領域のメチル化がその発現や消失に関与していると説明された。乳癌以外の癌種でのMaspinの発現様式について質疑され、Maspinは正常乳腺の筋上皮細胞や前立腺の基底細胞に恒常的に発現され、乳癌や前立腺癌では癌の進展や悪性度に伴い発現が抑制される。一方膀胱癌や胃癌や卵巣癌では正常組織に発現はなく、癌化に伴って発現が見られるという対照的な現象が報告されているが、それら癌細胞でのMaspinの役割は明らかにされていないと回答された。今回の研究では筋上皮細胞のマーカーとしてanti-human smooth muscle actinを使用しているが、他の筋上皮細胞の抗体であるS100やCD10を使用し検討すべきであったと指摘された。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残してはいるが、乳癌におけるMaspinの役割を解明する手がかりとなる有意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  
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 亨宇  
先端医科学 河上 裕  
学力確認担当者: 北島 政樹、岡田 保典  
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成17年 8月 4日

# Hemorrhagic Shock Resuscitation With an Artificial Oxygen Carrier, Hemoglobin Vesicle, Maintains Intestinal Perfusion and Suppresses the Increase in Plasma Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ .

(出血性ショック蘇生における人工酸素運搬体、ヘモグロビン小胞体投与による腸管血流維持と血漿中Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ の抑制)

吉 津 晃

## 内容の要旨

輸血は外傷や外科手術により大量出血した際の一般的な治療方法である。しかし、輸血には感染症や自己免疫病の誘発、移植片対宿主病などの問題がある。こういった問題を背景として人工血液代替物の開発が展開されてきた。hemoglobin vesicle (HbV) は脂質薄膜でヘモグロビンを被覆した人工酸素運搬体である。このHbVの酸素運搬能が、出血性ショックで腸管の血流動態を安定させうるか否かを調べた。

HbV溶液の調整は期限切れヒト赤血球より精製し高濃度ヘモグロビン溶液 (40g/dl) を作成した。これにアロステリックエフェクターとしてピリドキサル5'リン酸を、還元剤としてホモシステインを添加した。HbVの脂質二重膜は1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC)、cholesterol、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG)、 $\alpha$ -tocopherolを含む混合脂質Presome PPG-Iより構成されている。さらに表面をpolyethylene glycolで修飾し細網内皮系への取り込みを抑制した。これを5%アルブミンに分散させ、0.45 $\mu$ mのフィルターを通して作成した。また、対象としてヘパリン加ウサギ(ラット)脱血液を遠心し上澄を除去したのち5%アルブミンで2回洗浄したウサギ(ラット)洗浄赤血球を用いた。Hb濃度はHbVと同様に10g/dLとした。雄日本白色ウサギに循環血液量の40%相当の脱血を行い、10分後5%アルブミン、HbV、洗浄赤血球それぞれを脱血量に相当するまで投与した。同様の操作をもう1度行い30分経過を観察した。平均体血圧、血流量や脈拍数を測定した。上腸間膜静脈血、動脈血、末梢静脈血に対し血液ガス分析を行い、小腸粘膜pH、小腸粘膜下組織酸素分圧をそれぞれ測定した。さらに血漿中TNF- $\alpha$ を測定するため雄ウィスターラットを用い、実験のプロトコルや試料はウサギの時に準じて行った。TNF- $\alpha$ はELISA法にて測定した。

平均体血圧、上腸間膜動脈血流量、脈拍、動脈血酸素分圧、動脈血二酸化炭素分圧は差が認められなかった。Systemic base excess、消化管粘膜内pH、小腸粘膜下組織酸素分圧は洗浄赤血球、HbVはほぼ初期値まで回復したが、5%アルブミンでは回復せず有意差を認めた。5%アルブミンでは血漿中TNF- $\alpha$ が有意に増加していた。これに対しHbVでは洗浄赤血球ほどではないが約1/40に抑制されていた。以上よりHbVは酸素運搬能に優れておりショック時の治療に有効であると考えられた。また容易に酸素親和性などを操作出来る特性がありショックに対する治療でさらに有効となるよう改善されていくものと考え

## 論文審査の要旨

輸血療法には血型の判定、交差試験の必要性、輸血感染症などの問題があり、これらを克服すべく人工血液代替物の開発が展開されてきた。赤血球の酸素運搬能を代替すべく開発されている人工酸素運搬体もその一つであるが、未だ臨床応用に至ったものはない。Hemoglobin vesicle (HbV) は脂質薄膜でヘモグロビンを被覆した人工酸素運搬体であり、現在臨床応用に向け開発が進められている。本研究ではHbVの酸素運搬能を検証した。ウサギの出血性ショックモデルに対して投与を行い、虚血に敏感な小腸の血流動態を観察した。対照として5%アルブミンと洗浄赤血球を投与した。全身的血行動態では差が無かったが、Base excess、小腸粘膜内pH、小腸粘膜下組織酸素分圧は5%アルブミンでは有意に低下したのに対しHbVでは洗浄赤血球と同等の回復を示した。次にラットで同様の出血性ショックモデルを作成し、血漿中TNF- $\alpha$ を測定した。5%アルブミンと比較しHbVと洗浄赤血球では有意にその上昇が抑制されていた。以上より、HbVの酸素運搬能は赤血球に近いと推定され、出血性ショックの治療に有効であると考えられた。

審査では、実験終了後に5%アルブミンでは大半の動物が死亡した原因について質問がなされた。現象としては呼吸停止が先ず見られたが病理学的検索でも死因については同定されなかったと回答された。TNF- $\alpha$ を測定した理由について質問がなされた。本実験は消化管の虚血障害によりbacterial translocationが起こりその後敗血症に至るといふモデルを想定しており、敗血症においてTNF- $\alpha$ は重要な役割を担っていると考えられているためと回答がなされた。TNF- $\alpha$ の測定について種の違う動物を用いた理由が質問された。ELISA法におけるウサギの抗体で適切なものがなかったためとの説明があったが、種のが動物のデータで同一実験系について議論することはできれば避け方がよかったのではとの指摘を受けた。また、アロステリックエフェクターの量を調節することで酸素親和性をコントロールし、いかなる病態や治療が可能になるかとの質問がなされた。例えば酸素親和性を上げることにより低酸素状態にある障害部位でのみ酸素を放出させるといった利用が考えられるが投与方法や実験系については今後検討を継続する予定である旨の説明がなされた。さらに他の人工酸素運搬体である修飾ヘモグロビンで行った場合での結果について質問がなされた。酸素運搬能のみから推測すると消化管への効果ではHbVに匹敵する結果が得られる可能性が高いと思われるが、腎機能障害などの副作用が強いため全身状態では差が出てくる可能性があるとの回答がなされた。

以上のように、本研究ではさらに検討するべき課題を残しているものの、出血性ショックにおける消化管の障害をHbVが抑制する可能性が示され、臨床応用につながる有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 小林 絢一  
医化学 末松 誠 内科学 池田 康夫  
救急医学 相川 直樹  
学術随認担当者: 北島 政樹、末松 誠  
審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成17年 9月14日

## 新発売

カルバペネム系抗生物質製剤 ———— 指定医薬品、処方せん医薬品<sup>(注1)</sup> 薬価基準収載

# フィニバックス<sup>®</sup> 点滴用 0.25g

## FINIBAX<sup>®</sup> (注射用ドリベネム水和物 略号: DRPM)

注1) 注意—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」、「原則禁忌」、「使用上の注意」等については添付文書等をご参照下さい。

製造販売元 [資料請求先]



### シオノギ製薬

大阪市中央区道徳町3-1-8 〒541-0045  
電話0120-956-734 (医薬情報センター)  
<http://www.shionogi.co.jp/med/>



◎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、サラッとした服用感を実現しました。

◎ハルナールカプセルと生物学的に同等で、有効性・安全性は同じです。



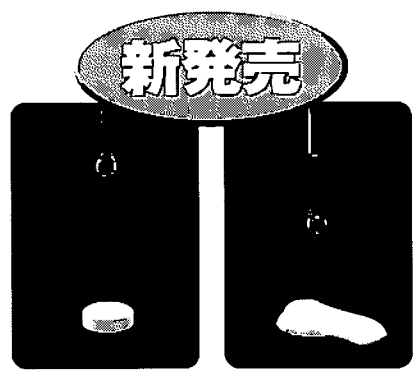
# ハルナールD錠、 口腔内崩壊錠で 新登場。

**【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、クエン酸シルデナフィル  
 4.副作用 ハルナールカプセル承認時及び市販後の使用成績調査における調査症例4,724例中、ハルナールカプセルとの関連が疑われる副作用(臨床検査値異常を含む)は104例(2.2%)に発現し、主なものはめまい、胃不快感等であった。(ハルナールカプセル再審査終了時) (1)重大な副作用 1)失神・意識喪失(頻度不明)：血圧低下に伴う一過性の意識喪失等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止し適切な処置を行うこと。2)肝機能障害、黄疸(頻度不明)：AST(GOT)上昇、ALT(GPT)上昇、黄疸等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。

■その他の使用上の注意等につきましては、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

Harnal<sup>®</sup>D

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)

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