

第83卷第1号
平成18年
3月

慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

綜 説

- アレルギー性結膜疾患におけるケモカインの役割高野 洋之(1)
- 電動歯ブラシの清掃効果について中川 種昭(7)
- 大腸癌化学療法—標準的医療と遺伝子多型による個別化の試み—久保田 哲朗(13)
- 卒前医学教育におけるパラダイムシフト—知の偏重から心と技の教育へ—大野 良三(21)

原 著

- 神経病原性レトロウイルス A8-V の *env* 遺伝子発現に見られた奇妙なスプライシング
Eccentric splicing found in *env* gene expression of neuropathogenic A8-V
.....渡辺 里仁(29)
- 司法解剖例における心中の検討保科 光紀(37)

学 会 展 望

- 第10回慶應医学賞授賞式・受賞記念講演会・受賞記念シンポジウム(47)
- 第11回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会(52)

学 位 論 文

- カスパーゼ活性化が腎形態形成に及ぼす影響の検討荒木 崇志(T1)

号 外

- 博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第179号)(別頁)

Vol. 83 No. 1
March 25, 2006

慶應醫學會

綜 説

アレルギー性結膜疾患におけるケモカインの役割

¹⁾川崎市立川崎病院眼科, ²⁾慶應義塾大学医学部眼科学教室

高野 洋之^{1), 2)}

ABSTRACT

The role of chemokines in allergic conjunctival diseases

Yoji Takano^{1), 2)}

¹⁾Ophthalmology, Kawasaki Municipal Hospital

²⁾Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Due to changes in environmental factors and lifestyles, the incidence of allergic conjunctival diseases has increased in recent years. Severe allergic conjunctival diseases such as vernal keratoconjunctivitis and atopic keratoconjunctivitis are often complicated by corneal lesions, that often cause severe pain and sometimes decreases in visual acuity. The infiltration of inflammatory cells such as eosinophils and neutrophils observed in the late phase reaction of allergies is important in the pathogenesis of such lesions. Chemokines are key factors in the regulation of the infiltration of such cells to the ocular surface. In this article, we review the role of chemokines in allergic conjunctival diseases, the role of IL-4 in the regulation of the production of chemokines and possible therapeutic strategies that target chemokines.

Key Words : chemokine, atopic keratoconjunctivitis, vernal keratoconjunctivitis, CCL11 (eotaxin), corneal damage

はじめに

近年、環境因子およびライフスタイルの変化に伴いアレルギー性結膜疾患は増加傾向を示している。アレルギー性結膜疾患には、比較的軽症で組織障害を伴わない季節性・通年性アレルギー性結膜炎と、慢性炎症と組織障害を特徴とする春季カタル (vernal keratoconjunctivitis : VKC) やアトピー性角結膜炎 (atopic keratoconjunctivitis : AKC) などに代表される重症型アレルギー性結膜疾患がある。

重症型アレルギー性結膜疾患の増悪期には、角膜潰瘍や角膜びらんなどの角膜病変が認められることがある。このような病態は、難治性であり、強い疼痛の原因にもなり、時には不可逆的な視力低下につながる場合もある。これら重症型アレルギー性結膜疾患の上眼瞼結膜は石垣

状の増殖性病変をしばしば呈し、その組織中にはリンパ球、形質細胞、好中球、マスト細胞、好塩基球、好酸球などの浸潤細胞が認められる¹⁾。このような炎症細胞の局所浸潤には選択的遊走活性を持つ様々なケモカインが重要な役割を担っていると考えられている。

ケモカインは白血球に対する走化活性を持つ低分子蛋白で、その構造により、CC, CXC, C, CX3Cの4つのサブファミリーに分類される。ケモカインレセプターは7回膜貫通型G蛋白共役型レセプターで、特異的に結合するケモカインのサブファミリーによりCCR, CXCR, XCR, CX3CRに分類される。

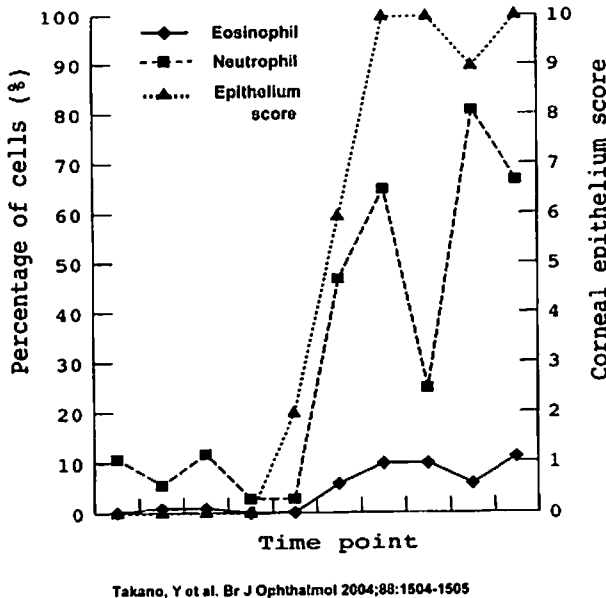
本稿では春季カタルやアトピー性角結膜炎などに代表される重症型アレルギー性結膜疾患におけるケモカインの役割について概説する。

ケモカインと遅発相反応 (late phase reaction)

アレルギー性結膜疾患はI型アレルギー反応で惹起される。I型アレルギー反応は、即時相 (early phase reaction) と遅発相 (late phase reaction) に分けられる。即時相は、マスト細胞の脱顆粒時に放出されるヒスタミン、セロトニンなどの化学伝達物質により惹起される局所の組織浮腫・充血を主体とする急性の反応であり、遅発相は、4～6数時間後にみられる炎症細胞の組織内への浸潤と、それによる組織傷害を主体とする反応である。

ブラッシュサイトロジー法を用いて即時相が主体である軽症の季節性・通年性アレルギー性結膜炎の結膜擦過検体評価では、炎症細胞の浸潤をほとんど認めない。しかし、重症型の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の場合では好中球や好酸球など組織傷害性のある炎症細胞の浸潤が多数認められ、病態の形成にはアレルギー性炎症の遅発相が重要だと考えられる。

我々は、経時的に上眼瞼結膜上皮に対し、結膜ブラッシュサイトロジー法で、浸潤してきた炎症細胞の出現率を検討した。また、同時に角膜上皮障害の程度をスコア化し、あわせて比較検討した²⁾。



第1図 角膜上皮障害と炎症細胞数との関係
本症例では角膜上皮障害 (▲) と好酸球の出現率 (◆) はほぼ平行して推移している。(本図は Takano et al : Br J Ophthalmol 88 : 1504-1505, 2004. の第1図を許可を得て転載)

第1図に炎症細胞の出現率と角膜上皮障害スコアとの関係の一例を示す。好酸球は、角膜上皮障害を認めない時点では、サンプル中にほとんど認めなかったが、角膜上皮障害が重症化するに従い、出現率は増加した。これに対し好中球は角膜障害がない時点からも少数認められ、増悪期には出現率が上昇していた。以上のことから、角膜上皮障害には、上眼瞼結膜に浸潤した好中球、好酸球が関与していると考えられる。

炎症細胞の局所浸潤の機序は、以下のように考えられている。炎症細胞は、種々のサイトカインにより血管内皮細胞に発現した接着分子と接着して血管内皮細胞間隙を通過する。その後、組織内のケモカインなどの化学走性物質の濃度勾配にそって遊走集積すると考えられている。

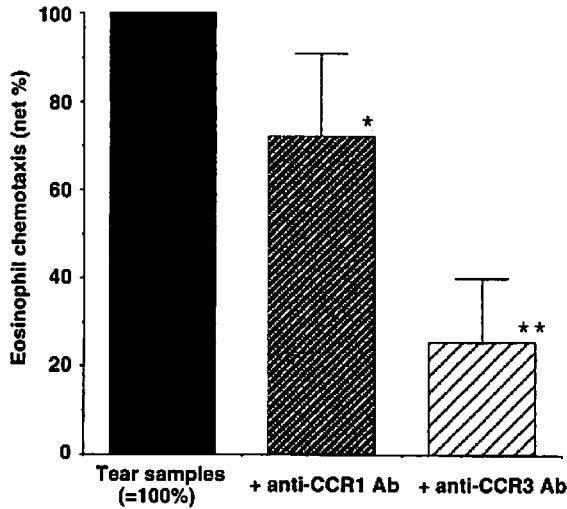
重症アレルギー性結膜疾患においては結膜組織中や涙液中のケモカイン等が特に重要であり、マスト細胞、局所へ浸潤してきた炎症細胞のみならず、炎症の場を構成する角結膜の上皮・実質細胞からも産生されると考えられる。

眼表面におけるケモカイン

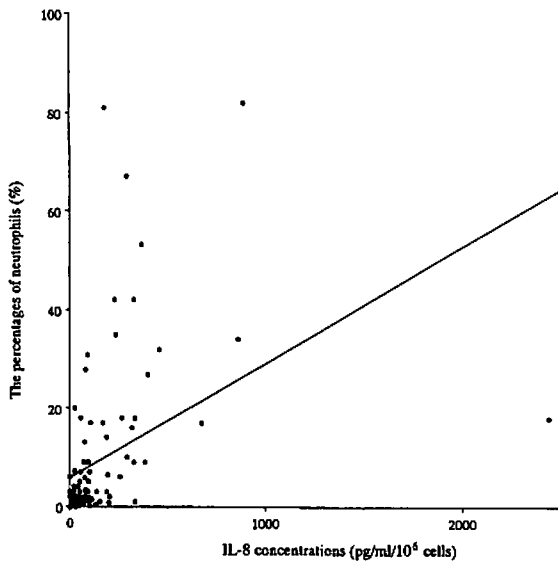
眼表面構成細胞からの CC ケモカインの産生について、角膜実質細胞³⁾、結膜実質細胞⁶⁾が CCL11 (eotaxin) を産生することが報告されている。また、単球・マクロファージ、Tリンパ球、好酸球、好塩基球を走化させる能力を持つ CCL5 (RANTES : regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) は結膜上皮細胞⁶⁾および角膜実質細胞⁷⁾からの産生が報告されている。

我々のグループは、好酸球に対して強い選択的遊走活性を持ち、CC ケモカインである CCL11 の涙液中濃度が角膜上皮障害の重症度と相関することを報告した⁹⁾。また、重症結膜アレルギー患者から採取した涙液を用いた好酸球の遊走実験を行い患者涙液に好酸球遊走活性があることも確認した。この遊走活性は CCR1, CCR3 に対する抗体で各々のレセプターを介した作用を阻害した場合、各々27.8%, 74.5%抑制された (第2図)¹⁰⁾。このことから、重症結膜アレルギー患者の涙液中に存在する、CCL11, CCL5 が CCR3 に結合することが好酸球の組織浸潤に重要な役割を果たしていることが示唆された。

好中球の遊走因子である CXC ケモカインである CXCL8 は、角膜上皮・実質細胞¹¹⁾、結膜上皮¹²⁾・実質細胞¹³⁾から産生される。我々は、重症アレルギー性結膜



第2図 患者涙液による好酸球遊走およびその抑制
重症結膜アレルギー患者涙液による好酸球の遊走は抗 CCR1 抗体により 27.8%, 抗 CCR3 抗体により 74.5% 抑制された (本図は Fukagawa et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 43: 58-62, 2002 の第4図を許可を得て転載)



第3図 好中球出現率と結膜上皮中 CXCL8 (IL-8) 濃度
CXCL8 (IL-8) 濃度は好中球出現率と正の相関を示した。
(本図は Miyoshi et al: Cornea 20: 743-747, 2001 の第3図を許可を得て転載)

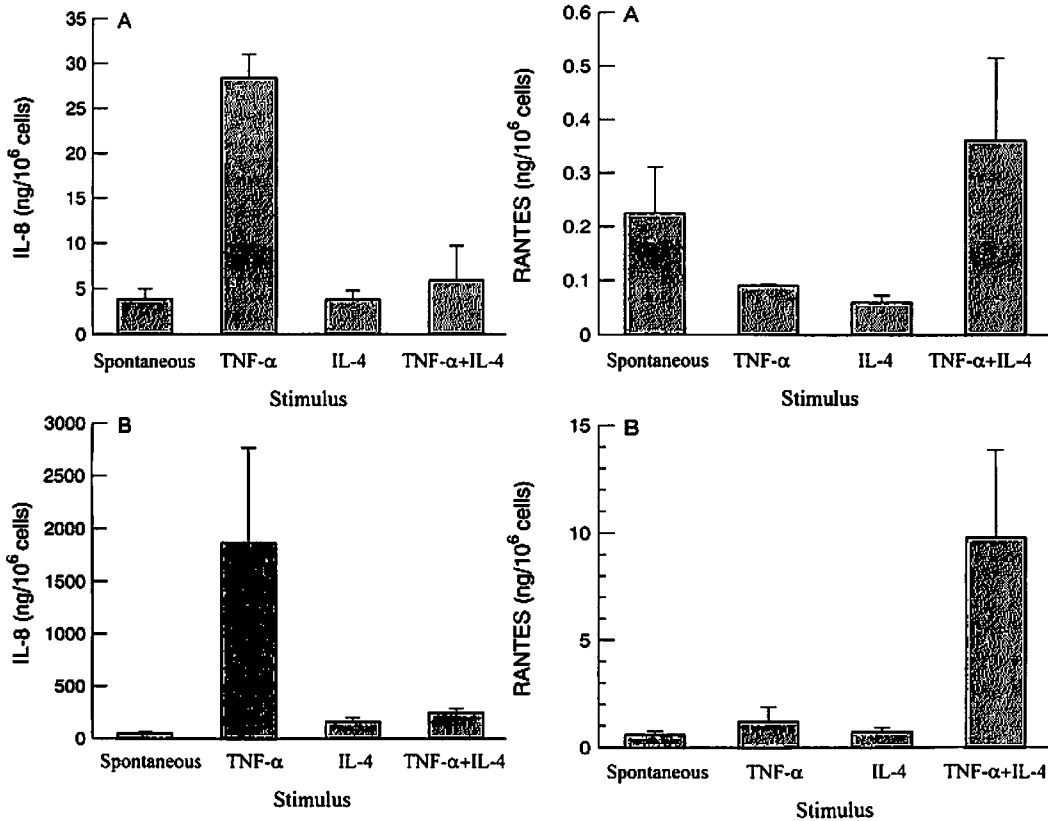
疾患における好中球出現率と角膜障害が相関すること²⁾, 重症角膜上皮障害例では結膜上皮中 CXCL8 濃度が高値であることを報告している¹⁴⁾. 結膜上皮中の CXCL8 (IL-8) 濃度と炎症細胞の出現率との関係についても検討した¹⁴⁾. CXCL8 濃度は好中球出現率と正の相関を示した (第3図). アレルギー性炎症において, 好中球由来の組織傷害性蛋白である neutrophil myeloperoxidase が涙液中で高値を示すことが報告されており¹⁵⁾, さらに好中球由来の活性酸素なども組織傷害に関与している可能性も示唆されている. しかし好中球のアレルギー性結膜疾患における役割の詳細についてはまだ不明な点が多く, 今後の検討が期待される.

T 細胞の組織浸潤も重症アレルギー性結膜疾患の特徴の一つである. VKC 患者の輪部結膜において, T 細胞に対して強い走化活性を持つ CC ケモカインである CCL18 (PARC), CCL22 (MDC), CCL1 (I-309) の発現が CD68 陽性単球/マクロファージ上に認められた¹⁶⁾. CCL18 (PARC) は naive T 細胞に対して遊走活性を持ち, CCL22 (MDC) は CCR4 を介して CD4 陽性 T (Th) 細胞のうち Th2 細胞を遊走させる. したがって, T 細胞の遊走に対しても, ケモカインが重要な役割を果たしていると考えられる.

アレルギー性結膜疾患と IL-4

重症結膜アレルギー患者の涙液中には IL-4 が高値であることが報告されている¹⁷⁾. IgE 受容体を介した刺激によりマスト細胞が TNF- α および IL-4 を産生し¹⁸⁾, 組織中に浸潤してきた Th2 細胞も IL-4 を産生することから, IL-4 がアレルギー性結膜疾患の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる.

IL-4 刺激下により角膜実質細胞は CCL11 を産生する^{3, 4)}. 我々は CXCL8 と CCL5 産生が IL-4 により制御されていることも明らかにした (第4図)⁹⁾. TNF- α 刺激による角膜上皮, 実質細胞からの CXCL8 産生は, IL-4 により抑制された. 一方, 角膜実質細胞からの CCL5 産生は, IL-4 と TNF- α の同時刺激により認められた. CXCL8 は好中球に対し, CCL5 は好酸球に強い遊走および活性化作用をもつ因子である. また, IL-4 は血管内皮細胞に VCAM-1 の発現を誘導する¹⁹⁾. VCAM-1 の対応受容体である VLA-4 はリンパ球や好酸球に発現が認められるが, 好中球には発現しない. IL-4 はこのように様々なメカニズムによりアレルギー性結膜疾患に認められる好酸球主体の炎症の病態形成に中心的な役割を果たしていると考えられる.



第4図 角膜上皮細胞(A)および実質細胞(B)からのケモカイン産生

TNF-αは角膜実質細胞および上皮細胞からのCXCL8(IL-8)産生を誘導したが、IL-4同時添加により、このCXCL8産生能は有意に抑制された。角膜実質細胞ではTNF-αとIL-4の同時刺激によりCCL5産生に対する相乗的効果が認められた。両細胞共にIL-4単独刺激ではCXCL8、CCL5産生は誘導されなかった。(本図はTakano et al: Br J Ophthalmol 83: 1074-1076, 1999.の第1および2図を許可を得て転載)

CCR3拮抗薬などを使用した治療の可能性

重症アレルギー性疾患の病態形成にはCCL11やCCL5が重要であり、最近はそのレセプターであるCCR3をターゲットとした治療が検討されている。

現在、研究が進められているCCR3拮抗薬として、(i) modified natural chemokines, (ii) peptide/protein based antagonists, (iii) small molecular antagonistsがある²⁰⁾。

ケモカイン遺伝子の塩基配列の一部を操作することにより、構造を変化させることで、シグナルを発生させないケモカイン拮抗薬の作製が研究されている。Met-RANTESはCCR1とCCR3に結合し、これらの受容体と結合するリガンドの結合を阻害し、結果的に好酸球機能を抑制する²¹⁾。この他にもCCL18(MIP-4)を修

飾したmet-chemokineβ⁷²²⁾や、CCL11のN末端のアミノ酸をCXCL11(I-TAC: CXCR3作用薬)で置換したCCR3拮抗薬²³⁾などについても研究がすすめられている。

Peptide/protein based antagonistsとしてCPWYFWPCがCCR3拮抗薬として²⁴⁾、small molecular antagonistsとしてはbenzylpiperidine誘導体²⁵⁾が報告されている。これらの薬剤については、動物を用いたアレルギー疾患モデル(*in vivo*)における効果についての研究が期待される。

また、抗CCL11モノクローナル抗体²⁶⁾の臨床応用が検討されており、こちらの分野での今後の発展が期待される。

結 語

本稿では重症結膜アレルギー患者における炎症細胞の選択的集積におけるケモカインの重要性について概説した。アレルギー性炎症にはケモカイン（特にCCL11）の過剰発現が病態の重症化、遷延化に関与していると考えられる。現在開発中のケモカイン拮抗薬の多くは比較的选择性が高く、ステロイドなど広範囲に作用する薬剤に比べてアレルギー性炎症に適していると考えられる。今後の研究によりケモカイン拮抗薬が次世代の抗アレルギー薬として活躍することが期待される。

文 献

- 1) Collin HB, Allansmith MR : Basophils in vernal conjunctivitis in humans : an electron microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16 : 858-864, 1977.
- 2) Takano Y, Fukagawa K, Dogru M, Asano-Kato N, Tsubota K, Fujishima H : Inflammatory cells in brush cytology samples correlate with the severity of corneal lesions in atopic keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 88 : 1504-1505, 2004.
- 3) Kumagai N, Fukuda K, Ishimura Y, Nishida T : Synergistic induction of eotaxin expression in human keratocytes by TNF-alpha and IL-4 or IL-13. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1448-1453, 2000.
- 4) Fukagawa K, Nakajima T, Saito H, Tsubota K, Shimmura S, Natori M, Hirai K : IL-4 induces eotaxin production in corneal keratocytes but not in epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 121 : 144-150, 2000.
- 5) Leonardi A, Jose PJ, Zhan H, Calder VL : Tear and mucus eotaxin-1 and eotaxin-2 in allergic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 110 : 487-489, 2003.
- 6) Fukagawa K, Saito H, Tachimoto H, Tsubota K, Akasawa A, Oguchi Y : RANTES production in a conjunctival epithelial cell line. *Cornea* 16 : 564-570, 1997.
- 7) Tran MT, Tellaetxe-Isusi M, Elnor V, Strieter RM, Lausch RN, Oakes JE : Proinflammatory cytokines induce RANTES and MCP-1 synthesis in human corneal keratocytes but not in corneal epithelial cells. Beta-chemokine synthesis in corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 987-996, 1996.
- 8) Takano Y, Fukagawa K, Shimmura S, Tsubota K, Oguchi Y, Saito H : IL-4 regulates chemokine production induced by TNF- α in keratocytes and corneal epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 83 : 1074-1076, 1999.
- 9) Fukagawa K, Nakajima T, Tsubota K, Shimmura S, Saito H, Hirai K : Presence of eotaxin in tears of patients with atopic keratoconjunctivitis with severe corneal damage. *J Allergy Clin Immunol* 103 : 1220-1221, 1999.
- 10) Fukagawa K, Okada N, Fujishima H, Nakajima T, Tsubota K, Takano Y, Kawasaki H, Saito H, Hirai K : CC-chemokine receptor 3 : a possible target in treatment of allergy-related corneal ulcer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 58-62, 2002.
- 11) Cubitt CL, Tang Q, Monteiro CA, Lausch RN, Oakes JE : IL-8 gene expression in cultures of human corneal epithelial cells and keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 3199-206, 1993.
- 12) Irkec M, Bozkurt B : Epithelial cells in ocular allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 3 : 352-357, 2003.
- 13) Leonardi A, DeFranchis G, Fregona IA, Violato D, Plebani M, Secchi AG : Effects of cyclosporine A on human conjunctival fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 119 : 1512-1517, 2001.
- 14) Miyoshi T, Fukagawa K, Shimmura S, Fujishima H, Takano Y, Takamura E, Tsubota K, Saito H, Oguchi Y : Interleukin-8 concentrations in conjunctival epithelium brush cytology samples correlate with neutrophil, eosinophil infiltration, and corneal damage. *Cornea* 20 : 743-747, 2001.
- 15) Leonardi A, Borghesan F, Faggian D, Depaoli M, Secchi AG, Plebani M : Tear and serum soluble leukocyte markers in conjunctival allergic diseases. *Am J Ophthalmol* 129 : 151-158, 2000.
- 16) El-Asrar AM, Struyf S, Al-Kharashi SA, Missotten L, Van Damme J, Geboes K : Expression of T lymphocyte chemoattractants and activation markers in vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 86 : 1175-1180, 2002.
- 17) Fujishima H, Takeuchi T, Shinozaki N, Saito I, Tsubota K : Measurement of IL-4 in tears of patients with seasonal allergic conjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. *Clin Exp Immunol* 102 : 395-398, 1995.
- 18) Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST : Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways : evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10 : 471-480, 1994.
- 19) Gundel R, Lindell D, Harris P, Fournel M, Jesmok G, Gerritsen ME : IL-4 induced leukocyte trafficking in cynomolgus monkeys : correlation with expression of adhesion molecules and chemokine generation. *Clin Exp Allergy* 26 : 719-729, 1996.
- 20) Gangur V, Birmingham NP, Thanavorakul S, Joseph S : CCR3 and CXCR3 as drug targets for allergy : principles and potential. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2 : 53-62, 2003.
- 21) Elsner J, Petering H, Hochstetter R, Kimmig D, Wells TN, Kapp A, Proudfoot AE : The CC chemokine an-

- tagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3. *Eur J Immunol* 27 : 2892-2898, 1997.
- 22) Nibbs RJ, Salcedo TW, Campbell JD, Yao XT, Li Y, Nardelli B, Olsen HS, Morris TS, Proudfoot AE, Patel VP, Graham GJ : C-C chemokine receptor 3 antagonism by the beta-chemokine macrophage inflammatory protein 4, a property strongly enhanced by an amino-terminal alanine-methionine swap. *J Immunol* 164 : 1488-1497, 2000.
- 23) Loetscher P, Pellegrino A, Gong JH, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G, Baggiolini M, Clark-Lewis I : The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem* 276 : 2986-2991, 2001.
- 24) Houimel M, Loetscher P, Baggiolini M, Mazzucchelli L : Functional inhibition of CCR3-dependent responses by peptides derived from phage libraries. *Eur J Immunol* 31 : 3535-3545, 2001.
- 25) De Lucca GV, Kim UT, Johnson C, Vargo BJ, Welch PK, Covington M, Davies P, Solomon KA, Newton RC, Trainor GL, Decicco CP, Ko SS : Discovery and structure-activity relationship of N-(ureidoalkyl)-benzyl-piperidines as potent small molecule CC chemokine receptor-3 (CCR3) antagonists. *J Med Chem* 45 : 3794-3804, 2002.
- 26) Dent G, Hadjicharalambous C, Yoshikawa T, Handy RL, Powell J, Anderson IK, Louis R, Davies DE, Djukanovic R : Contribution of eotaxin-1 to eosinophil chemotactic activity of moderate and severe asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 169 : 1110-1117, 2004.
-

綜 説

電動歯ブラシの清掃効果について

慶應義塾大学医学部歯科口腔外科学教室

中 川 種 昭

Key Words : 電動歯ブラシ, 音波振動式歯ブラシ, 清掃効果

はじめに

う蝕(虫歯), 歯周病は歯科の二大疾患と言われており, 国民のほとんどが罹患する。どちらの疾患も細菌感染症であることが明らかになり, う蝕では *Streptococcus mutans*, 歯周病では *Porphyromonas gingivalis* などの細菌が病原菌として考えられている¹⁾。う蝕が進行し, 骨膜炎, 骨髄炎を生じることがあること, 歯周病は, 糖尿病²⁾, 心疾患³⁾, 低体重児出産⁴⁾などと関連があること, また口腔細菌と肺疾患の関連性についての報告⁵⁾があることを考え合わせると, 口腔清掃は医学的見地からも大変重要である。

最近, 口腔清掃に対する認識が高まる中で, 電動歯ブラシによるブラッシングが簡便さ, 清掃時間の効率化などの理由から広く行われるようになった。また, 臨床の場においても電動歯ブラシにはどのような種類があるのか, 手用歯ブラシと比較して清掃効果は高いのかなどの質問を数多く受ける。病院においても, GICU 内の患者あるいは病室での口腔ケアに利用できる可能性もある。

本稿では, 筆者が行ってきた臨床研究などのデータから, 電動歯ブラシの有効性について考察する。

電動歯ブラシと手用歯ブラシの清掃効果について

電動歯ブラシの清掃効果を手用歯ブラシと比較した研究は, 1960年代から欧米で行われており, 当時の論文の多くは手用歯ブラシと電動歯ブラシのプラーク除去効果はほぼ同程度であると報告している⁶⁾。もともとは肢体不自由な方や小児においての有効性が報告されるなどや特殊な装置として認識されていた。電動歯ブラシの動きは, 当時手用歯ブラシで主流であったローリング法の動きに似た運動(偏心運動: たて磨き方向の運動)をするものが用いられていた。我が国では, 1972年に偏

心運動式と微震動式の電動歯ブラシのプラーク除去効果が手用歯ブラシとほぼ同様であったという報告がなされた⁷⁾。推奨される手用歯ブラシの磨き方がローリング法(縦磨き方向)からスクラビング法(横磨き方向)に変化してくるにつれ, 電動歯ブラシも1990年頃からスクラビング振動(横磨き方向の振動)をする方式のものが開発された。

そこで我々は, スクラビング振動式の電動歯ブラシと, 手用歯ブラシのプラーク除去効果を比較した⁸⁾。電動歯ブラシが短時間で磨くことができるかを検証するために, 電動歯ブラシ間では, ブラッシング時間を1分30秒と3分の2条件を設定した。

得られた結果は, 1) スクラビング振動式の電動歯ブラシのプラーク除去効果は手用歯ブラシと同程度であった。2) 清掃時間を1分30秒とした場合は(1歯面あたり約3秒)3分間の場合と比較して, 電動歯ブラシ, 手用歯ブラシともにプラーク除去効果は低く, 特に隣接面(歯と歯の間)でその差は顕著であった。

以上の結果より, 手用歯ブラシと同様の動きをする電動歯ブラシの清掃効果は手用歯ブラシと同程度であることが示された。

ヘッドや毛先が特有の動きをする電動歯ブラシ

近年, ヘッドや毛先が特有の動きをする電動歯ブラシが開発され, その有効性が示されるようになり, とくに毛束(歯ブラシの毛先の束)が反復回転する方式(INTERPLAK, Conair社)(図1a, b), ヘッド部が反復回転する方式(PLAK-CONTROL, Braun Oral-B社)(図2), 少し遅れてヘッドが音波振動(いわゆる微震動)(図3)する方式が目された。数年前の我々の研究では, 毛束が反復回転する方式のものが調べた中で最も優れたプラーク除去効果を示した⁹⁾。しかし, この方式の

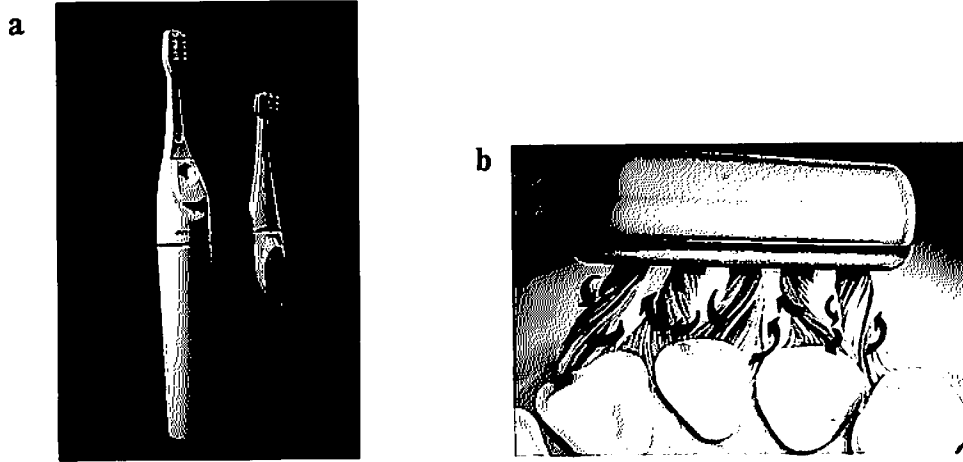


図1 a, b 毛束反復回転式の電動歯ブラシ

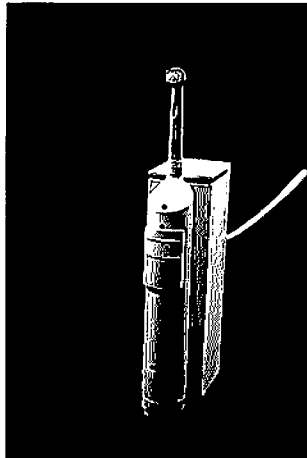


図2 ヘッド部が反復回転する方式

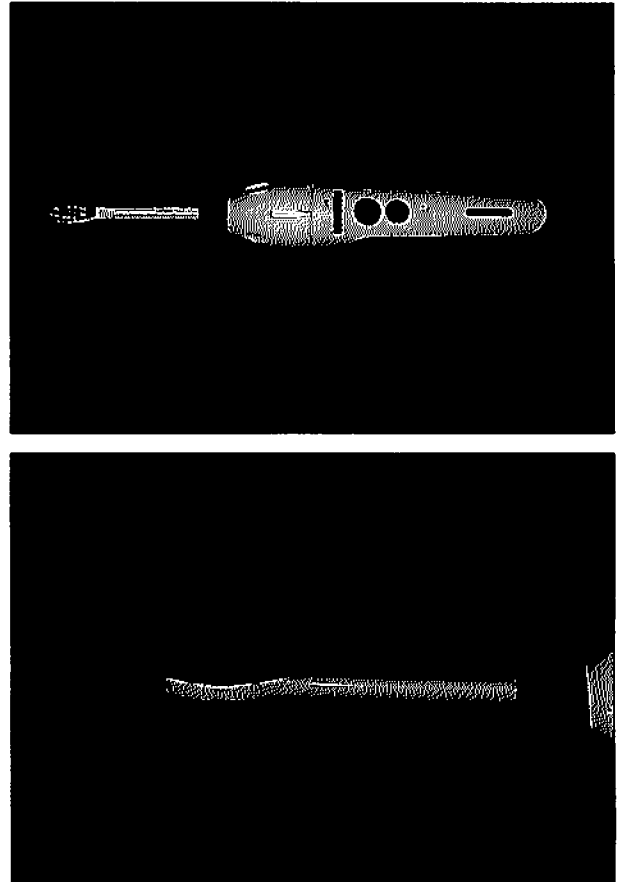


図3 音波振動式の電動歯ブラシ

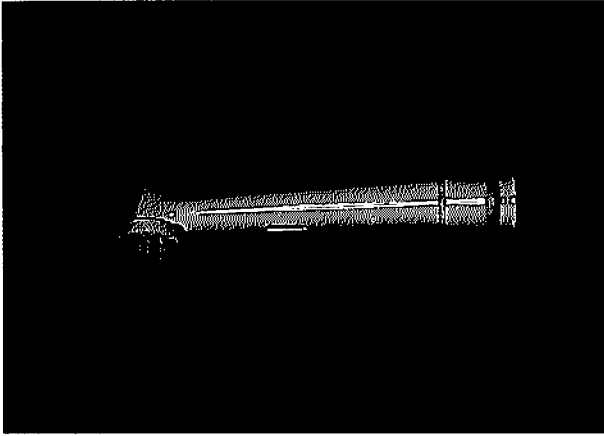
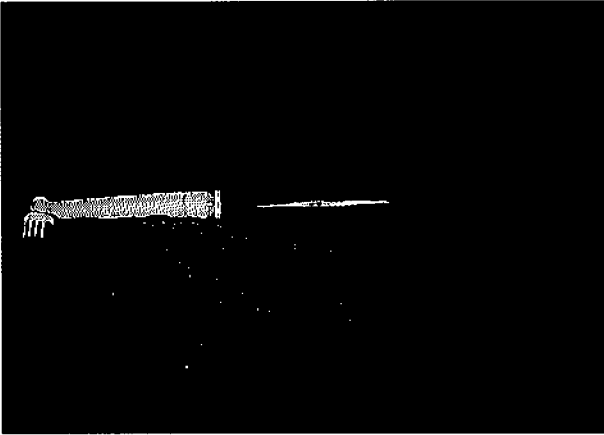


図4 ヘッド部反復回転に加え、上下振動する方式

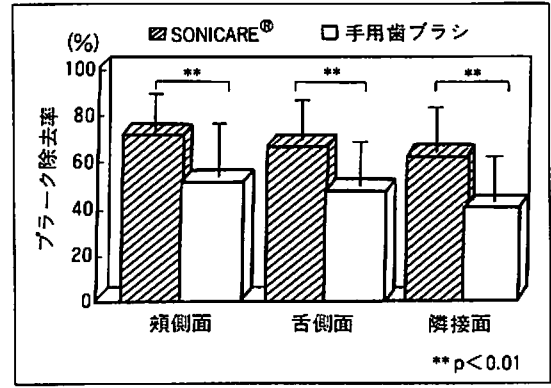


図5 各歯面におけるプラーク除去率の比較

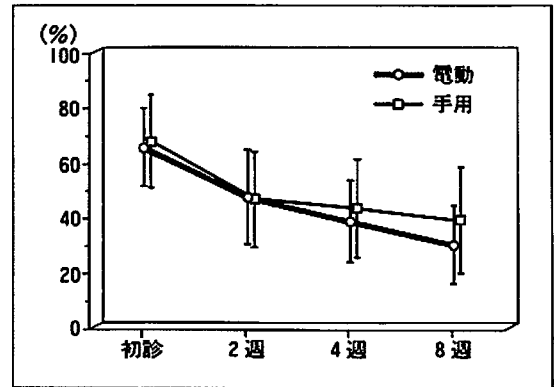


図6 プラークスコアの経時的変化



図7 歯周炎患者の初診時、プラークの蓄積により歯肉の発赤腫脹が認められる。

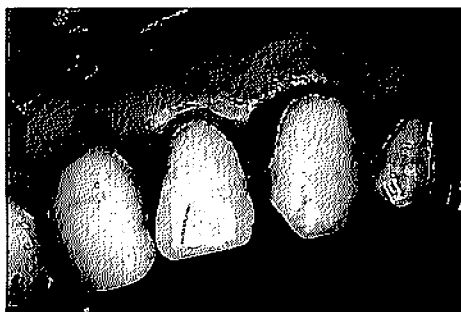


図8 インタープラーク® 8週間使用后、炎症症状の緩解が認められる。

電動歯ブラシは音がうるさい、電池の寿命が短いなどの欠点もあり、日本では購入することができなくなった。ヘッド部が反復回転する方式の電動歯ブラシは丸いヘッド部が毎分7600回の速さで60°左右に反復回転する方式で、この方式も手用歯ブラシと比較して優れたプラーク除去効果を示した。さらに、被験者の使用感が良好で実際の清掃効果とのバランスが良好であった。最近では、ヘッド部の反復回転(8800回/分)に加え、40,000サイクル/分の上下振動をする製品(Professional Care 8000, Braun Oral-B社)が開発され(図4)、優れた清掃効果の報告がされている¹⁰⁾

ヘッドが音波振動をする方式

ヘッドが音波振動をする方式は、現時点ではもっとも広く用いられている電動歯ブラシといえよう。ヘッドの歯ブラシの形態が、長さ7mmのフラットカットが交互に配列され、ヘッド部が毎分31,000サイクルの微振動を行うものである。図5に示すように、この方式の歯ブラシは手用歯ブラシよりも高いプラーク除去効果を示した¹¹⁾。改良型について検索した結果も同様であった¹²⁾。象牙質の摩耗に関する研究でこの方式の電動歯ブラシは他の方式に比べ、摩耗性の低いことが報告されている¹³⁾。その優れた点に対する背景として、高周波数の運動が音響エネルギーを生じ、口腔内に存在する液体を介して伝達されるため、毛先の到達しにくい部位に対してもプラーク除去効果が期待されることが挙げられる。その効果は、液体を介したエネルギーにより細菌の付着に関与している構造物である線毛を破壊するという報告からも裏付けられている¹⁴⁾。しかしながら、他の電動歯ブラシと比較して、ヘッドが大きいため、大臼歯部において適切に使用するのが難しいこと、また微振動による搔痒感、不快感が使用開始時に強く、多くの被験者は慣れるまでに2週間ほどかかることなどが問題点としてあげられた。この点はこの方式の電動歯ブラシをブラッシング指導時に導入する際には使用開始時というモチベーションに大事な時期に問題が生じやすいので注意が必要である。

電動歯ブラシにも指導が必要か？

電動歯ブラシは、手用歯ブラシと異なり、部位に到達すれば歯ブラシの運動によりプラークが除去されるため、ブラッシング指導は必要ないのではないかとも思われる。しかし、我々の研究結果では2週に1回のブラッシング指導によって8週間の実験期間中、プラークの付着率は

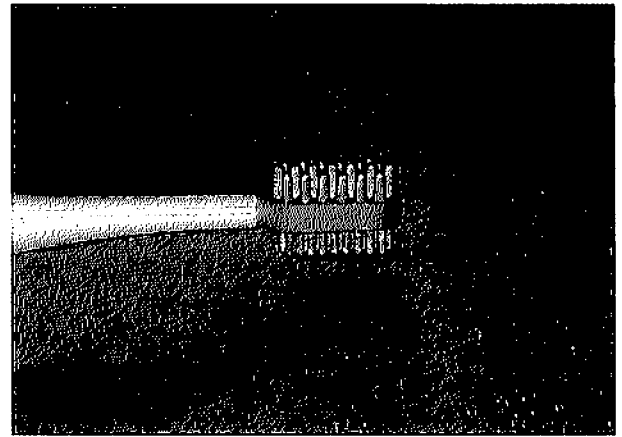
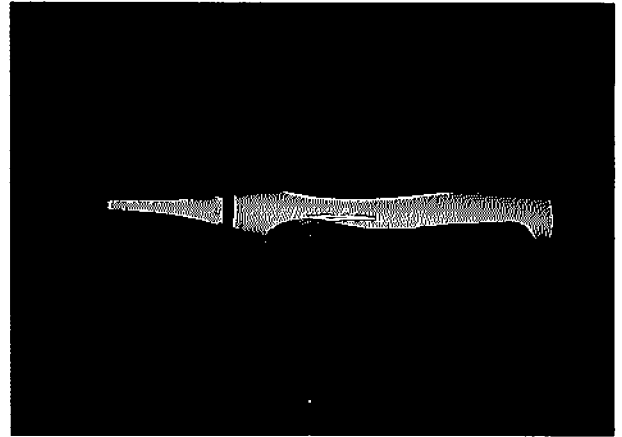


図9 歯ブラシの形状になったラバーチップを装着できる音波振動式歯ブラシ

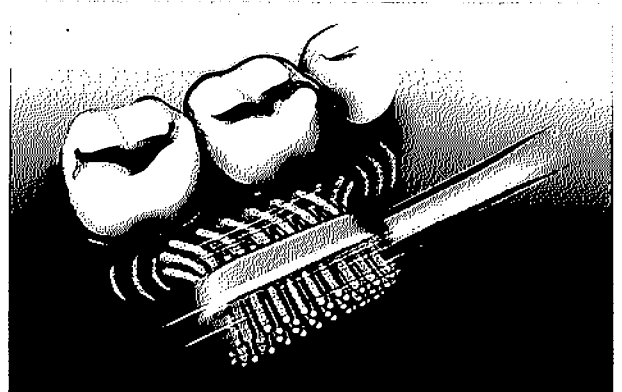


図10 マッサージ刺激で唾液の分泌も期待できる。

改善されていった(図6, 7, 8)¹⁵⁾。これは手用歯ブラシと同じように、ドクターサイドの指導が磨き残し部位の理解や、よりよい清掃法の確立に重要であることを示している。

おわりに

電動歯ブラシは、多少の流行の波にさらされながらも確実に定着してきている。しかし、単なる電気製品と異なり、専門家の指導により、より有効な口腔清掃の武器になりうる。我々は患者に紹介あるいは指導を行う際に、そのタイプや特徴を理解しておく必要がある。医療の分野でも介護の必要な患者の口腔清掃において、現場のニーズに合わせたチップが開発されている(図9, 図10)が、嚥下をうまく行うことができない患者に対しては、誤嚥性肺炎を引き起こすことになりかねないので、注意して使用していただきたい。本稿が歯科以外の領域の方に少しでも役に立てば幸いである。

語句説明

プラーク：一般的に歯垢とよばれるもので、細菌の集積物である。これらの細菌の中にう蝕や歯周病の原因となる細菌が含まれている。

文 献

- 1) 奥田克爾：最新口腔微生物学。一世出版, p. 396-400, 418-423, 2002.
- 2) Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y : Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol* 3(1) : 20-29, 1998.
- 3) Mattila KJ, Valle MS, Nieminen MS, Valtonen VV, Hietaniemi KL : Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 103 : 205-211, 1993.
- 4) Offenbacher S, Kats V, Fertik G, et al. : Periodontal infection as a possible risk factor for pattern low birth weight. *J Periodontol* 67 : 1103-1113, 1996.
- 5) Scannapieco FA, Potential associations between

chronic respiratory disease and periodontal disease : analysis of National Health and Nutrition Examination Survey III. *J Periodontol* 72(1) : 50-56, 2001.

- 6) Toto PD, Farchione A : Clinical Evaluation of an Electrically Powered Toothbrush in Home Periodontal Therapy. *J Clin Periodontol* 32 : 249-257, 1961.
- 7) 新井 高, 石川 烈, 木下 四郎 : 電動歯ブラシの毛束の長さ, 硬さと, 口腔清掃効果との関係について. *日歯周誌*, 14 : 33-40, 1972.
- 8) 中川種昭, 池上暁子, 鷺 二郎, 伊藤幸高, 林 智子, 大島みどり, 島 信博, 山田 了 : 電動歯ブラシのプラーク除去効果に関する研究(第1報) - スクラビング方式について -. *日歯周誌*, 34 : 901-906, 1992.
- 9) 中川種昭, 島田 篤, 宮下博行, 坂下顕照, 北村秀和, 大島みどり, 島 信博, 角田正健, 山田 了 : 電動歯ブラシのプラーク除去効果に関する研究(第2報) - 各種電動歯ブラシのプラーク除去効果 -. *日歯周誌*, 35 : 674-680, 1992.
- 10) van der Weijden GA, Timmerman MF, Piscoer M, Ijzerman Y, van der Velden U. : Oscillating/rotating electric toothbrushes compared : plaque removal and gingival abrasion. *J Clin Periodontol* 28 : 536-543, 2001.
- 11) 松村彰子, 鴨井久博, 佐藤 聡, 鴨井久一, 中川種昭, 斎藤伸司, 杉戸博記, 山田 了 : 超微振動型電動歯ブラシ(ソニケアー)の清掃効果について. *日歯保誌*, 39 : 142-148, 1996.
- 12) 深谷千絵, 穂坂康朗, 中川種昭 : 音波歯ブラシと超音波歯ブラシのプラーク除去効果. *日歯保誌*, 48 : 481-487, 2005.
- 13) Sorensen JA, Nguyen HK. : Evaluation of toothbrush-induced dentin substrate wear using an *in vitro* ridged-configuration model. *Am J Dent* 15. Spec No : 26B-32B, 2002
- 14) McInnes C, Engel D, Martin RW. Fimbria damage and removal of adherent bacteria after exposure to acoustic energy. *Oral Microbiol Immunol* 8 : 277-282, 1993 .
- 15) 中川種昭, 田嶋志織, 轟 啓造, 林 真理, 住井浩剛, 渋谷義宏, 磯部秀一, 高橋潤一, 島 信博, 山田 了 : 歯周炎患者のプラークコントロールにおける毛束反復回転式電動歯ブラシの有効性について. *日歯周誌*, 37 : 532-538, 1995. 中川 : 電動歯ブラシの清掃効果

綜 説

大腸癌化学療法

—標準的医療と遺伝子多型による個別化の試み—

慶應義塾大学病院包括先進医療センター

くぼた てつ ろう
久保田 哲 朗

Key Words : colon cancer, chemotherapy, efficacy, polymorphism, pharmacogenomics

近年、大腸癌化学療法の進歩には目覚ましいものがあり、特に米国癌治療学会 (American Society of Clinical Oncology ; ASCO) においては毎年のように治療法の進展が紹介され、時には CNN ニュースやニューヨークタイムスで報道されるようなセンセーショナルな報告もみられるようになってきた。これは長期間 5-fluorouracil (5-FU) およびその類縁化合物のみに頼っていた大腸癌化学療法にロイコボリン (LV), イリノテカン (CPT-11), オキサリプラチン (L-OHP) などの新規抗癌剤が導入され、最近に至って bevacizumab (Avastin) や cetuximab (Erbix) などの分子標的モノクローナル抗体が登場し、抗腫瘍効果と延命効果が著しく向上したことによるものである。この世界的な大腸癌化学療法の進歩に対応し、本邦でも 2005 年に入って従来承認されていなかった 5-FU の持続静注投与方法が追加承認され L-OHP も承認されたことにより、新たな時代に入ったと言えよう。しかし、これらの著しい進歩は薬剤価格の急騰を伴い、効果もあるが高価でリスクを伴う薬剤の個別化医療が提起されるようになってきた。本報では大腸癌に対する標準的化学療法の現況と、遺伝子多型に基づく治療の個別化について概説する。

大腸癌化学療法の標準的治療

1. 抗がん剤適正使用のガイドライン

大腸癌化学療法については依然として 5-FU が key drug の役割を果たしてきており、多くのレジメンに 5-FU ないしフッ化ピリミジン製剤が含まれている。大腸癌化学療法については「抗がん剤適正使用のガイドライン」¹⁾ と「大腸癌治療ガイドライン医師用 2005 年版」²⁾ が発表されている。適正ガイドライン第 I 項において切

除不能進行・再発大腸がんに化学療法を施行することは、エビデンスレベル I であり勧告グレードは A とされている。これは 90 年代初めに施行された 2 つの best supportive care (BSC) との比較試験^{3, 4)} および、2001 年に報告された化学療法と BSC の meta-analysis⁵⁾ を根拠としている。これを受けてガイドラインでは切除不能進行・再発大腸がんの初回化学療法としては①5-FU/LV, ②UFT/LV, ③5-FU/LV+CPT-11 がエビデンスレベル I で勧告のグレード A と推奨されている。ガイドラインでは「5-FU 単独と 5-FU/LV のランダム化比較試験のメタ・アナリシスでは、奏効率は 5-FU/LV が有意に優れるが、生存期間の延長は証明されていない」⁶⁾ としている。しかし 10 年を経て再度のメタ・アナリシスが行われ⁷⁾、このメタ・アナリシスでは奏効率は 5-FU 単独 11%, 5-FU/LV 群 21% で併用群の奏効率は約倍であった (P<0.0001)。さらに生存期間の中央値 (mean survival time : MST) においても 5-FU 単

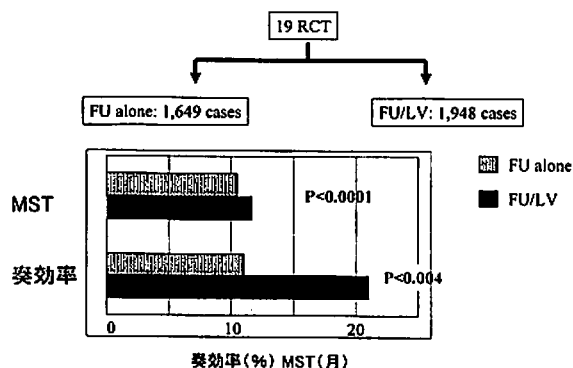


図1 進行・再発大腸癌に対する 5-FU 単独対 5-FU+ロイコボリンのメタ解析結果

独群 10.5 ヶ月に対して 5-FU/LV 群は 11.7 ヶ月と推計学的に有意な延長 ($P<0.004$) が示された。(図1).

2. ロイコボリン

本邦では大腸がんに対して LV の光学異性体の活性体である *l* 体のみを成分としたアイソボリン (*l*-LV) と 5-FU との併用療法の治験がなされた。この時検討された Roswell Park (RPMI) レジメンは、5-FU 600 mg/m² + LV 500 mg/m² (*l*-LV 250 mg/m²) 毎週投与、6 回投与後 2 週休薬であり、LV を 2 時間持続点滴で投与し、その 1 時間目に 5-FU 600 mg/m² を急速静注 (bolus) する方法である⁹⁾。*l* 体を使用する場合 *dl* 体の LV の半量投与となる。本邦での第二相試験におけるこの投与方法の大腸がんに対する奏効率は 30-32.8% であり^{9, 10)}、この結果本邦では RPMI レジメンの 5-FU/*l*-LV が大腸癌に対して認可された。本レジメンは Phase III 試験において 5-FU 単独よりも奏効率が高いことが証明されている¹¹⁾。一方、欧州では infusional 5-FU が中心に開発されてきた。infusional 5-FU の一つである de Gramont レジメンは 1 日量として *l*-LV 100 mg/m² を 2 時間点滴静注し、直後に 5-FU を 400 mg/m² を急速静注、さらに 600 mg/m² 5-FU を 22 時間かけて持続静注する方法で、これを 2 日間連続投与し、この 2 日間投与を 2 週間毎に繰り返す¹²⁾。本法の奏効率は 32.57% である。米国で開発された Mayo レジメンは RPMI レジメンとは異なる bolus 投与方法であり、5-FU 425 mg/m² + LV 20 mg/m² を 5 日間連日投与し 4 週間毎に繰り返す方法である。de Gramont 療法と Mayo 療法との無作為比較試験 randomized control trial : RCT (GERCOR)¹³⁾ では、MST はそれぞれ 15.5 ヶ月、14.2 ヶ月 ($p=0.067$) と差がなかったが、奏効率 ($p=0.0004$)、無増悪生存期間 ($p=0.0012$)、Grade3-4 の毒性の頻度 ($p=0.0004$) において、Mayo 療法よりも de Gramont 療法が優れているとの成績であった。またドイツで開発された AIO レジメンは *l*-LV 250 mg/m² を 2 時間点滴静注後、5-FU を 2,600 mg/m² を 24 時間持続静注し、このクールを毎週 6 回投与して 2 週休薬する。AIO レジメンと Mayo レジメンとの RCT (EORTC 40952)¹⁴⁾ では、奏効率、生存期間については両群間に有意差は認められなかったが、無増悪生存期間 (5.6 ヶ月 vs 4.0 ヶ月, $p=0.03$) については AIO 療法が優れているとの結果であった。さらに持続静注をシンプルにした sLV5FU2 レジメンも用いられている。*l*-LV 200 mg/m² を 2 時間点滴静注直後に 5-FU を 400 mg/m² を急速静注し、続いて 5-FU を 2,400-3,000 mg/m² を

46 時間持続静注する方法であり、これを 2 週間ごとに繰り返す。奏効率は 37% である。

3. イリノテカンとオキサリプラチン

ガイドラインにおいては 5-FU/LV+CPT-11 の大腸癌に対する効果はエビデンスレベル 1 とされている¹⁾。実際、欧州では infusional 5-FU レジメンに *l*-OHP を組み合わせた FOLFOX レジメン (folate=LV+infusional 5-FU+*l*-OHP) (図2) や FOLFIRI レジメン (folate=LV+infusional 5-FU+CPT-11) が切除不能・再発大腸がんに対する標準的レジメンとされている^{15, 16)}。これらのレジメンは副作用も高い一方、奏効率が 50~60%、平均生存期間が 20 ヶ月に届いており、すぐれた成績が報告されている。Goldberg らは、当時米国で主流であった Saltz レジメン (IFL)¹⁷⁾ と FOLFOX および CPT-11 + *l*-OHP の三群比較試験とおこなった¹⁸⁾。結果、FOLFOX レジメンの奏効率が明らかに高く (図3)

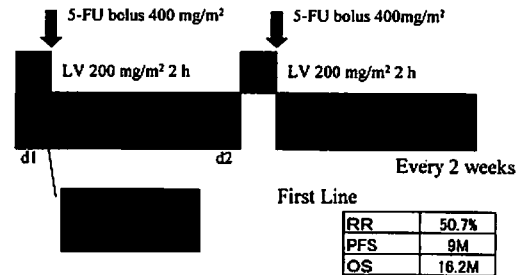


図2 FOLFOX 4 レジメン

Andre T, et al. J Clin Oncol, 17 : 3560-3568 (1999)
Phase II de Gramont. J Clin Oncol 18 (16), 2938-2947 (2000) Phase III

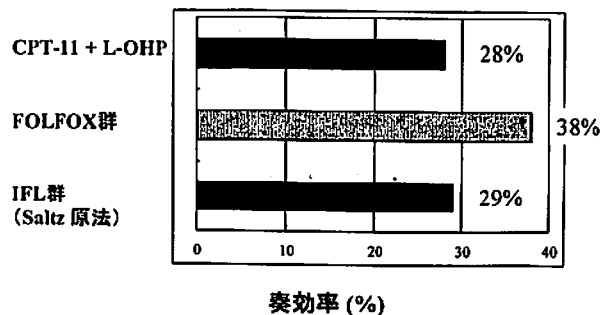


図3 N9741 トライアル (Mayo Clinic, NCCTG, CALGB, ECOG, SWOG, NCIC の共同研究) における奏効率

副作用も少なかった。さらに FOLFOX と FOLFIRI の sequential 投与の RCT が行われ、どちらの順序でも生存期間が 20 ヶ月を越える成績が得られている¹⁹⁾。これらの成績に基づき、米国における進行・再発大腸がんに対する標準的一次治療は FOLFOX, FOLFIRI レジメンが category 2A とされている²⁰⁾。厚生労働省では「抗がん剤併用療法検討会」の結論に基づいて 2005 年に infusional 5-FU レジメンである de Gramond, AIO, sLVFU2 を承認し²¹⁾、2005 年 3 月には L-OHP を FOLFOX4 レジメンとして承認した。これによって本邦でも大腸癌化学療法の標準的レジメンである FOLFOX, FOLFIRI レジメンが使用可能となった。これを受けて、大腸癌治療ガイドライン医師用 2005 年版²⁾における切除不能転移再発大腸癌に対する化学療法には次の 5 つのレジメンが本邦において使用可能と表記されている。(1) FOLFOX, (2) FOLFIRI, (3) IFL (Saltz regimen), (4) 5-FU/LV (RPMI, de Gramond, sLV5FU, AIO), (5) UFT/LV。これら FOLFOX, FOLFIRI の導入、sequential な両レジメンの投与により、進行・再発大腸癌の golden standard は奏効率 50 %、MST 20 ヶ月の時代になってきた。

4. 経口フッ化ピリミジン

本邦においては 82 施設において医療保険の包括評価が導入され、入院癌化学療法が包括されたため入院化学療法が医療経済上大きな問題となってきている。実際、FOLFOX, FOLFIRI は 48 時間持続点滴静注のレジメンであるため、2泊3日の入院が必要とされる場合もあるが、薬価の高額なこれらのレジメンが包括化されることは病院運営上問題となってくる。そこで多数の症例に手馴れた施設では埋め込み式のポートを挿入してインフューザーポンプによる外来治療を行っている。入院経費が高額である欧米においても患者の QOL の維持、医療経済の改善の面から経口フッ化ピリミジン製剤の導入が注目されてきており、capecitabine (Cape) や経口 UFT/LV が注目を集めている。Cape+CPT-11 (CapIri) と Cape+L-OHP (CapOx) についての randomized phase II では、RR CapIri 42.6%、CapOx 51.3%と奏効率も高く、最終死亡率は統計学的には差がなかったという成績が報告された。これらの成績は従来の FOLFOX に匹敵する奏効率である。また LV/UFT+L-OHP (TEGAFOX) については RR 34%との報告があり、LV/UFT は本邦でも既に 2004 年 9 月に薬価収載予定された。このように今まで日陰者だった経口フッ化ピリミジン製剤についても、欧米の標準的治療である静注

LV/5-FU とほぼ対等の立場が確立されてきている。今後は本邦においても、大腸癌に対して従来の標準的治療である静注 LV/5-FU に加えて、経口の LV/UFT や S-1 が使用可能となり、将来的には現在乳癌のみに認可されている Cape も応用可能になるかもしれない。

5. 分子標的モノクローナル抗体

Bevacizumab (Avastin) はヒト 95%、マウス 5%のキメラ・モノクローナルの抗 VEGF 抗体である。ECOG の E2200 という phase II study では、IFL (LV/5-FU+CPT-11) との併用によって、CR が 5 例、PR が 35 例で、合わせて奏効率が 43%という成績が得られた。この試験では Saltz regimen を減量した modified regimen に比べて有害事象には統計学的に差がなかったものの、bevacizumab を加えることによって凝固線溶系の有害事象が増えたことが報告されている。この phase II study は phase III study に引き継がれ、placebo control で IFL+placebo が 412 例、IFL+bevacizumab が 403 例で、MST が 15.6 ヶ月に対し、20.3 ヶ月と著しい延長が認められ、奏効率も 35%から 45%に向上した。特に奏効率が 10%しか向上しなかったにも拘らず、MST が 4.7 ヶ月も延長されたことは注目される。これらの成績から NCCN ガイドライン 2006 年版では、FOLFOX, FOLFIRI, IFL, 5-FU/LV に bevacizumab を加えるレジメンが進行大腸癌に対する category 2A の標準治療とされている²⁰⁾。今後は bevacizumab, cetuximab 抗体の効率的な臨床導入が本邦大腸癌化学療法の課題となるものと考えられる。

抗癌剤耐性機構における遺伝子多型

このように多彩な薬剤が使用可能となった大腸癌化学療法についても、癌種の個性に基づいた個別的化学療法耐性の予測が臨床的に要求されるようになってきた。抗癌剤は、他の薬剤と同様に生体内で吸収・代謝（活性化・不活性化）・排泄される。一方、生体側の活性・不活性化酵素、基質（抗癌剤）を細胞より排出する膜輸送蛋白、DNA 修復酵素、活性体が標的とする癌細胞の蛋白はいずれもそれぞれの遺伝子により制御されており、その遺伝子の多型性（polymorphism）が蛋白発現に影響を与えることにより抗癌剤の感受性に影響を与えることがあきらかになってきた²²⁾。遺伝子多型とは DNA の塩基配列の変異であり、多くの変異は遺伝子配列における単一の塩基配列の変異（single-nucleotide polymorphism：SNPs）を原因としている。以下、大腸癌化学療法にお

ける主要な抗癌剤の耐性機構と遺伝子多型について概説する。

1. Thymidylate Synthetase (TS)-5-FU の標的酵素-
チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthetase; TS) は分子量 67,000 の蛋白質であり、細胞質内では二量体として存在する。TS はピリミジンヌクレオチド合成酵素の一つであり、カルバモイル酸とアスパラギン酸の縮合から始まるピリミジン *de novo* 合成の終盤過程において、 N_5, N_{10} -CH₂ tetrahydrofolate (5, 10-CH₂FH₄) が deoxyuridine monophosphate (dUMP) を deoxythymidine monophosphate (dTMP) すなわち thymidylate にメチル化する反応を触媒する。dTMP は *de novo* における核酸前駆体であり、主要な DNA 合成物質の一つであるため、TS は DNA 合成の盛んな癌細胞に対する抗癌剤の分子標的として重要な位置をしめる。TS が高い腫瘍に対しては、より多量の FdUMP が必要であるため、5-FU 感受性が低いとの多くの報告があるが、必ずしも 5-FU 感受性に相関しないとの報告もみられる。

TS 遺伝子のプロモーター領域の繰り返し配列には 28 ベースペアの 2 つ (2R) と 3 つ (3R) のタンデムリピートの多型性が存在する²⁰⁾。多型には 3R/3R, 3R/2R, 2R/2R の 3 種類があり、3R は 2R に比べて TS 遺伝子の翻訳効率が高いことが知られている。すなわち 3R を含む遺伝子多型を有する群では TS mRNA の発現と TS 酵素活性が高く、5-FU による治療効果が低いことが推定される。この多型性には人種差があり、3R/3R の頻度は白人と南西アジア人では 38%、日本人と中国人では 67% と報告されている。ある報告では 5-FU 耐性群の 2R/2R の率は 22% であったのに対して、感受性群では 40% であった。また他の報告では 2R/2R における 5-FU の奏効率は 50% であり、3R/3R における奏効率 9%、2R/3R における奏効率 15% よりも、2R/2R 群における奏効率は高かった。5-FU を基盤とした補助化学療法においても 2R/2R 群では生存転帰の延長が認められたが、3R/3R 群ではその効果は認められなかった。

2. Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD)-5-FU の分解律速酵素-

DPD は (フッ化) ピリミジン分解経路の第一段階かつ律速段階を触媒する酵素である。DPD は肝および単核球において高い活性を示し、小腸粘膜などの幅広い臓器においても活性分布を示すことが知られているが、分

解を律速する臓器は相対的な容量の大きさから肝であると考えられている。また投与された 5-FU の約 85% は DPD によって分解されることから、5-FU の血中濃度消失半減期 ($T_{1/2}$) は僅か 20 分程度に過ぎない。5-FU を分解する主たる臓器は肝であるが、DPD 活性測定に供する試料の採取は容易ではない。そこで、肝臓の DPD 活性と弱い正の相関関係を示す、末梢血単核球が surrogate marker として用いられ、その DPD 活性 (PMNC-DPD) は 5-FU のクリアランスと逆相関することが報告されている。さらに PMNC-DPD 活性は日内変動を示し、持続静注時の血中 5-FU 濃度の変動に関与することも知られている。

DPYD 遺伝子は 1p22 染色体に位置し 23 塩基対よりなる。現在まで DPD の遺伝子多型には 39 種類の報告があり、このうち IVS14+1 における G→A の点突然変異 (DPYD*2A) がもっとも高率であり、エクソン 14 を欠損するため 55 アミノ酸よりなる活性を持たない DPD を産生するため重度の DPD 欠乏障害、5-FU の重篤な副作用の原因となる²¹⁾。この DPYD*2A は白人の 0.9% に存在し、5-FU に Gr. 3-4 の毒性を示した症例の 24-28% にこの変異が認められている。このほかにも c.1601G>A の変異による低 DPD、5-FU 中毒症の報告がされている。しかし、ある報告では 5-FU 毒性を発現した 57% の症例に DPYD 遺伝子多型が認められたとする一方、他の報告では DPD 欠乏症例で DPYD の遺伝子多型が認められた症例は 17% とするなど、DPD 欠損・低 DPD 活性は、遺伝子多型からは十分に説明できていない²²⁾。また欧米においては、人口の約 3% が低 DPD 活性症例とする報告もあるが、本邦において報告された DPD 欠損症は僅か 2 症例に過ぎず、人種差についても興味を持たれる。

3. トポイソメラーゼ-CPT-11 の標的酵素-

トポイソメラーゼ (トポ) は topology (位相) を語源とする酵素であり、DNA 鎖の切断と再結合という触媒反応を介して DNA の高次構造の変換を行っている。ヒト細胞には I 型 (トポ I) と II 型 (トポ II) が存在し、両酵素ともに細胞内 DNA の複製、転写、染色体の凝縮と分離など DNA 機能の発現に伴う DNA の超らせんや環状分子の連環化反応に関与している。トポは細胞増殖に必須の酵素であるため、癌細胞のように増殖が盛んな細胞においては発現レベルや活性が高く、これが正常細胞との選択毒性の標的として癌化学療法の対象となる。トポが癌化学療法の標的として広く着目されるようになったのは、CPT-11 が、最初のトポ I 阻害剤として大腸癌

を初め胃癌・肺癌などへの臨床に導入されてきたこと²⁵⁾がきっかけである。CPT-11はカンプトテシン(CPT)の半合成誘導体であり、生体内では活性型であるSN-38に変換されることにより抗腫瘍性を発現する。CPT-11耐性株におけるトポイソメラーゼIの遺伝子変異はコドン361と363, 533, 722と729の点突然変異が報告されているが、その変異の有無はトポイソメラーゼIの蛋白発現とかならずしも一致していなかった²⁶⁾。また臨床的にCPT-11耐性を示した非小細胞肺癌の臨床検体を用いた検討では、遺伝子多型は認められず、トポイソメラーゼImRNAの高発現が観察されている²⁷⁾。これらのことから、トポイソメラーゼIについては遺伝子多型が耐性に結びつく根拠は今のところ見出されていない。

4. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) – CPT-11の副作用関連酵素 –

グルクロン酸抱合は脂溶性の内因性・外因性物質を代謝・不活化する主要な経路であり、その酵素であるUDP-glucuronosyltransferase (UGT)には60種類のisoformが報告されており、UGT1とUGT2の二つのfamilyに大別される²²⁾。CPT-11はcarboxyesteraseによりSN-38に活性化され、SN-38は肝臓でUGT1A1によりSN-38Gへとグルクロン酸抱合されて胆汁中へ排泄される。遺伝性で間接ビリルビン高値を示すジルベール症候群ではUGT1A1遺伝子のプロモーター領域に変異を有しUGT1A1酵素の発現が低下している。UGT1A1のプロモーター領域における最も多い多型性はTATA boxへのTAの挿入(TA)7であり、このUGT1A1*28遺伝子発現はUGT酵素活性を30%減弱する。UGT1A1*28のホモザイゴット(*28/*28)は人口の0.5-19%に認められジルベール症候群になることがあるが、必ずしも全例が高ビリルビン血症をきたすわけではない。UGT1A1の転写活性はTATA boxにおけるTAの数に反比例するために、(TA)7のホモザイゴット(7/7)は(6/7)(6/6)に比べてSN-38が不活性化されにくく血中濃度が上昇するため好中球減少をきたしやすいことが報告されている²⁸⁾。UGT1A1*28を有する(7/7)の症例ではUGT1A1*28を持たない症例(6/6)に比してSN-38のAUCが増加するためにCPT-11の投与量を減量する必要がある。米国食品医薬局(FDA)ではUGT1A1*28を有する症例に対してはCPT-11の投与量を減量するように勧告している。一方グルクロン酸化されたSN-38Gは胆汁排泄されて腸管に入ると腸内細菌のβ-glucuronidaseにより脱グルクロン化されSN-38となり、CPT-11の重大な副作用で

ある下痢を発現する。UGT1A1の遺伝子多型がなく酵素活性が高いと血中のSN-38は速やかにSN-38Gとして胆汁から腸管内へと移行するために、SN-38による好中球減少は低下するが、腸管内細菌により再び活性化されたSN-38が消化管毒性をもたらす可能性がある。このようにCPT-11の毒性はSN-38の不活性化酵素であるUGT1A1ばかりではなく、SN-38へ活性化するcarboxyesterase、膜排泄蛋白、腸管内細菌のβ-glucuronidaseなどが複合して関連しているため、単一の酵素をコードする遺伝子多型によって抗腫瘍性と副作用を予知することは困難である。

おわりに

FOLFOX, FOLFIRの導入、sequentialな両レジメンの投与により、進行・再発大腸癌のgolden standardは奏効率50%、MST 20ヶ月の時代になってきた。さらにbevacizumab, cetuximabといった分子標的モノクローナル抗体の導入により、その奏効率はさらに向上

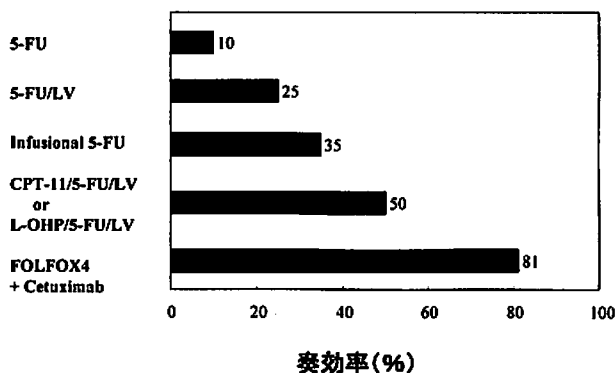


図4 大腸癌化学療法奏効率の進歩

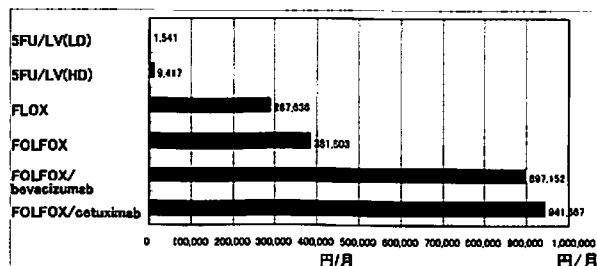


図5 大腸癌補助化学療法に要する医療費
数値は1症例1月あたりの必要医療費(単位:円, \$1=¥113で換算)

され、FOLFOX+ cetuximab の第二相試験²⁹⁾では奏効率 81% (うち CR10%)、progression-free survival 12ヶ月、disease control rate (CR+PR+SD) 98% という驚異的な奏効率が報告されている (図4)。しかしながら、これらの薬剤価格は著しく高価であり、本邦で承認済みの FOLFOX4 で月に 40 万円、抗体を加えたレジメンでは月 90 万円となることが予測されている (図5)。Benson は 2005 年 ASCO 年次総会についてのサマリーにおいて、米国における大腸癌補助化学療法の対象となる Stage II, III 症例は年間 55,000 人と推定されること、これらの症例全例に FOLFOX/cetuximab を投与すると、総医療費は \$ 5.5 billion (6,215 億円) に到達することを指摘している³⁰⁾。Stage II, III 症例全例にこの治療を補助化学療法として投与することは直ちに医療経済の破綻をきたすことは言うまでもなく、何千例を対象とした RCT で数パーセントの差があったからと言って、このような高額薬剤を標準治療とすることは RCT 原理主義の行きすぎである。年間 2,500 円のエイズ治療薬を購入できずに 1 分に一人の子供が死んで行くときに、先進国では手術で治癒したかもしれない大腸癌症例に年間一人 1,000 万円の補助化学療法を施行することは、どちらの世界からも一歩離れた日本では「いかなものか」というのが偽らざる心境である。

これらの RCT 原理主義に基づいて行き着いた「標準的治療」の経済的限界に対して、薬剤耐性予測による個別化医療の必要性が重要視されるようになってきた。薬剤の耐性に関与するのは、実際に薬剤の標的となったり、薬剤を代謝したり、薬剤を細胞外へ排出するなどの各種の蛋白ないし酵素であるが、これらの酵素活性を臨床的に測定するのは困難な場合が多い。そこで、これらの蛋白発現を制御する mRNA の発現、さらには mRNA をコードする cDNA の遺伝子多型により抗癌剤感受性を予測する試みがなされてきた。DNA の遺伝子多型の多くは SNPs であり、germ line の polymorphism であるため、末梢血の単核球を用いた測定が可能であり、腫瘍細胞の採取といった侵襲的な方法を取らずに判定可能なメリットがある。このように、従来型の細胞障害性抗癌剤についても律速遺伝子を診断することによりテーラーメイド癌化学療法が可能になってきたが、DPD や UGT の項で論じたように単一の酵素、単一の遺伝子多型で耐性や副作用の発現を予測することは困難である。癌細胞の感受性測定には DNA, mRNA, 蛋白量, 蛋白 (酵素) 活性, 細胞活性, 腫瘍, 臨床反応の各段階があり、DNA の遺伝子多型測定は最終的な endpoint である臨床効果, 副作用を究極の原因で予見しようとする試みで

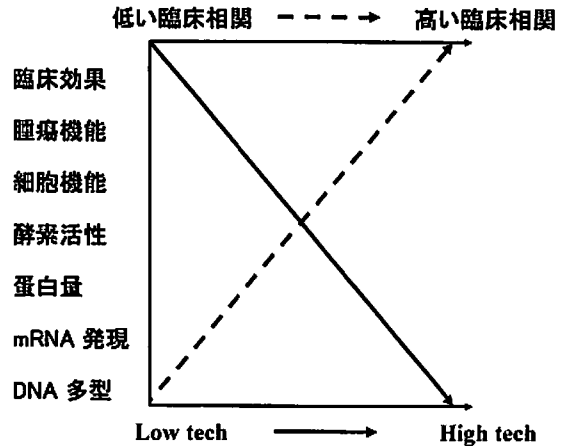


図6 癌細胞の感受性測定

癌細胞の感受性測定には DNA, mRNA, 蛋白量, 蛋白 (酵素) 活性, 細胞活性, 腫瘍, 臨床反応の各段階があるが、low tech な細胞活性は臨床相関にもっとも近似する。(久保田哲朗: 抗癌剤感受性と遺伝子多型. *Biotherapy*, 19 (6): 471-476, 2005)

ある。その分種々の測定のうちでは最も high tech ではあるが、実際に遺伝子多型が臨床効果・副作用に影響を与えるためには、その下流で転写・翻訳・蛋白発現・酵素活性など種々の段階が必要とされる (図6)³¹⁾。現時点では、現在厚生労働省から 11 施設で認可されている細胞生物学的な *in vitro* 抗癌剤感受性試験を臨床に応用しつつ、上流の遺伝子・蛋白研究によるあらたな個別化がん治療を探索すべきであろう。

文 献

- 1) 日本癌治療学会がん診療ガイドライン委員会: 抗がん剤適正使用のガイドライン大腸がん *Int J Clin Oncol* 9 (Suppl II): 9-13, 2004
- 2) 大腸癌研究会編: 大腸癌治療ガイドライン医師用 2005 年版, 金原出版, 2005.
- 3) Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group: Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 10: 904-911, 1992
- 4) Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D.: Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Br Med J* 306: 752-755, 1993
- 5) Simmonds PC: Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis *Colorectal Cancer Collaborative Group. Br Med J* 321: 531-535, 2001

- 6) Advanced Colorectal Cancer Meta-analysis Project : Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer : evidence in terms of response rate. *J Clin Oncol* 10 : 896-903, 1993
- 7) The Meta-Analysis Group in Cancer : Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer : An updated meta-analysis. *J Clin Oncol* 22 : 3766-3775, 2004
- 8) Petrelli N, Herrera L, Rustum Y, Burke P, Creaven P, Stulc J, Emrich LJ, Mittelman A, et al : A prospective randomized trial of 5-fluorouracil versus 5-fluorouracil and high-dose leucovorin versus 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 5 : 1559-1565, 1987
- 9) 吉野正暲, 太田和雄, 栗原稔, 赤沢修吾, 富永健, 佐々木常雄他 : 多施設共同研究による大量 *l*-leucovorin・5-FU 併用療法の進行結腸・直腸癌に対する後期第 II 相試験 (東日本グループ). *癌と化学療法* 22 : 785-792, 1995
- 10) 小西孝志, 藪下和久, 田口鐵男, 太田潤, 高島茂樹, 阿部達生 他 : 多施設共同研究による *l*-Leucovorin・5-FU 併用療法の進行結腸・直腸癌に対する後期第 II 相試験 (西日本グループ). *癌と化学療法* 22 : 925-932, 1995
- 11) Petrelli N, Douglass HO Jr, Herrera L, Russell D, Stablein DM, Bruckner HW, et al : The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma : a prospective randomized phase III trial. *Gastrointestinal Tumor Study Group. J Clin Oncol* 7 : 1419-1426, 1989
- 12) De Gramont A, Krulik M, Cady J, Lagadec B, Maisani JE, Loiseau JP, et al : High-dose folinic acid and 5-fluorouracil bolus and continuous infusion in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24 : 1499-1503, 1988
- 13) de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouche O, Etienne PL, et al : Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer : a French intergroup study. *J Clin Oncol* 15 : 808-815, 1997
- 14) Kohne CH, Wils J, Lorenz M, Schoffski P, Voigtmann R, Bokemeyer C, et al : Randomized phase III study of high-dose fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion with or without leucovorin versus bolus fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer : European organization of Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40952. *J Clin Oncol* 21 : 3721-3728, 2003
- 15) Andre T, Bensmaine MA, Louvet C : Multicenter phase II study of bimonthly high-dose leucovorin, fluorouracil infusion, and oxaliplatin for metastatic colorectal cancer resistant to the same leucovorin and fluorouracil regimen. *J Clin Oncol* 17 : 3560-3568, 1999
- 16) de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al : Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18 : 2938-2947, 2000
- 17) Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al : Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *Irinotecan Study Group. N Engl J Med* 343 : 905-914, 2000
- 18) Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, et al : A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22 : 23-30, 2004
- 19) Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D : FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer : a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22 : 229-237, 2004
- 20) National Comprehensive Cancer Network : Clinical Practice Guidelines in Oncology - v. 1. 2006 (http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/colon.pdf)
- 21) 抗がん剤報告書：フルオロウラシル及びアイソボリン (大腸がん) (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2004/05/s0521-5o.html>)
- 22) Nagasubramanian R, Innocenti F, Ratain MJ : Pharmacogenetics in cancer treatment. *Annu Rev Med* 54 : 437-52, 2003.
- 23) Kawakami K and Watanabe G : Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 63 : 6004-6007, 2003.
- 24) Raida M, Schwabe W, Hausler P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, Behnke D, et al : Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene with the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared to control *Clin Cancer Res* 7 : 2832-2839, 2001.
- 25) Schneider, E., Hsiang, YH. and Liu, LF. : DNA topoisomerases as anticancer drug targets. *Adv Pharmacol* 21 : 149-183, 1990
- 26) Takatani H, Oka M, Fukuda M, Narasaki F, Nakano R, Ikeda K, et al : Gene mutation analysis and quantitation of DNA topoisomerase I in previously untreated non-small cell lung carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 88(2) : 160-165, 1997.
- 27) Ohashi N, Fujiwara Y, Yamaoka N, Katoh O, Satow Y, Yamakido M, et al : No alteration in DNA topoisomerase I gene related to CPT-11 resistance in human lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 87(12) : 1280-1287, 1996.
- 28) Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka

- H, et al : Polymorphisms of UDP-glucuronosyl-transferase gene and irinotecan toxicity : a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 60 (24) : 6921-6926, 2000.
- 29) Diaz Rubio E et al. : Cetuximab in combination with oxaliplatin/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (FOLFOX-4) in the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing metastatic colorectal cancer : An international phase II study. *Proc ASCO 2005*, Abstract #3535
- 30) Benson, AB : Gastrointestinal (colorectal) cancer, 2005 Annual Meeting Summaries of ASCO (Ed) Roth BJ, American Society of Clinical Oncology, Alexandria, VA, p. 64-70, 2005.
- 31) 久保田哲朗 : 抗癌剤感受性と遺伝子多型. *Biotherapy* 19 (6) : 471-476, 2005.
-

綜 説

卒前医学教育におけるパラダイムシフト

— 一知の偏重から心と技の教育へ —

埼玉医科大学保健医療学部

おおのりょうぞう
大野良三

Key Words：医学教育，統合カリキュラム，アーリーエクスポージャー，共用試験，診療参加型臨床実習

はじめに

わが国の卒前医学教育は、この15年間でかつてない程に大きな変貌をとげてきた。とくに21世紀を迎えたこの5年間では、新臨床研修制度の導入ともあいまり、新たな医学教育改革の波が全国の各大学を洗っている。

このような改革の皮切りとなったのは、1991年の大学設置基準の一部改正（いわゆる大綱化）であり、これを受けてほとんどの大学医学部が様々な形でカリキュラム改正を行い、卒前医学教育の改革を目指した。また、臨床実習に関しては、同じく1991年の厚生省臨床実習検討委員会最終報告¹⁾において、医学生が病棟において医行為を行うことの条件が示され、欧米型のクリニカル・クラークシップ方式（診療参加型臨床実習）を導入する道が示された。さらに、early exposureの普及や広い意味での倫理教育の拡充が図られ、また、問題基盤型学習（Problem-Based Learning：PBL）を導入する試みもなされた。これらは、医師が主導する医師中心の医療から、患者さんを主体とした医療、患者さんを全人的にとらえる医療への転換が求められる時代を背景として、増え続ける膨大な医学知識を詰め込むだけでなく、医師として必要とされる基本的な診療技能と態度を身につけ、自らが考えて課題を解決していく能力を備えることが医学生に求められ、大学に要求された結果ともいえる。

しかし、一部の大学では改革がゆっくりながら確実に進んできたとはいえ、全国80の医学部・医科大学を俯瞰すると、その拡がりは必ずしも満足すべきものではなかった。ここで大きな変革点となったのが、1999年の21世紀医学・医療懇談会第四次報告²⁾である。この報告では教育内容の精選と適切な進級判定システムの構築が謳われ、2001年のモデル・コア・カリキュラムの提

示³⁾、2002年の共用試験トライアル開始の原動力となった。また、これに伴い、共用試験システムの一部を構成する客観的臨床能力試験（Objective Structured Clinical Examination：OSCE）が、またたくまに全国に普及したことも記憶に新しい。共用試験ではモデル・コア・カリキュラムに示された知識および技能と態度が評価され、医学生が診療参加型臨床実習において医行為を行う1つの要件となっている。さらに同報告では、少人数教育の推進と臨床実習の充実も掲げられ、PBLチュートリアル⁴⁾の普及、診療参加型臨床実習への移行促進につながった。また、このような実習に参加するための準備教育として“臨床入門”（Introduction to Clinical Medicine：ICM）の重要性も認識されてきた。

残念ながら、塾の医学部はこのような改革の波に乗り遅れた感があったが、この数年来、北島政樹前医学部長をはじめとする関係各位のご努力で医学教育統括センターが新設され、天野隆弘教授の指揮のもとに大幅な教育改革が進んでいることに、関係者として改めて敬意を表する次第である。

本稿では、この15年来、埼玉医科大学での教育改革にかかわったものの1人として、著者が直接的に見聞きし体験した、わが国の卒前医学教育改革の流れを概説する。

6年一貫教育と統合カリキュラム

1991年7月の大学設置基準の一部改正（大綱化）により、一般教育科目、外国語科目などの授業科目区分や区分ごとの必要単位数の規定が廃止され、大学毎に独自の教育理念や目標のもとに自由なカリキュラム編成が可能となった。例えば、進学課程が2年、専門課程が4年

と定められていたために、豊かな人間性を培うはずの一般教育の形骸化やそれに伴う学生の学習意欲の低下などが問題となっていたが、大綱化により多くの大学で6年間の一貫した医学教育の枠組みを作り、これに一般教育をくさび状に取り入れることや、一般教育の内容を厳選して不要な部分を廃止することなどが試みられるようになった。この結果、一般教育部門を独立して設けている大学は、1991年度の80校中46校(57.5%)⁴⁾から2003年度の19校(23.7%)⁵⁾となった。また、同じく2003年度の統計⁶⁾では、6年一貫教育を行っているのは80校中61校(76.2%)であり、専門教育を1年生から開始しているのが53校(66.2%)、2年生からが25校(31.2%)、旧来の3年生からが2校(2.5%)となっている。

もとより、2年間の一般教育課程の中で、科学者としての基礎固めともいえる自然科学を修め、専門教育とは分野の異なる様々な人文科学、社会科学、さらには外国語を学ぶこと、また、大学によっては他学部の多様な学生たちとも触れ合う機会があることは、将来、医師として活動するための貴重な財産となるはずである。ただし、その内容がただ決められた単位を修得させるための、おざなりでその場しのぎのものとした場合には、医学部入学を志して受験戦争を勝ち抜いてきた学生たちには、陳腐で退屈きわまりない2年間となり、医学生としての自覚や医学学習という大きな目的を見失わせることともなりうる。このような観点からみると、期間限定で一般教育のみを行う旧来の体制に比べて、専門教育に早くから触れる機会を与え、学年進行に合わせた形で、時に応じて一般教育を付加していく新たなカリキュラム構成は、学生の学習意欲を向上させ、効率的な医学学習への道を拓くものといえよう。

カリキュラムの多様化のもう一つの表れは統合カリキュラムの導入である。従来の講座単位の学問体系を重視したカリキュラムでは、たとえば解剖学と生理学が別個の授業として開講される結果、前期に神経解剖学の講義と実習が行われ、後期に神経生理学の講義と実習が行われるなど、本来不可分な関係である構造と機能が時期を違えて教えられ、学生がそれぞれの内容を統合整理して記憶するという非効率的な構造となっていた。時には同じ解剖学が2講座により別個に、詳細な打ち合わせもなく教えられ、内容の重複や欠落がチェックされにくい場合もある。

水平型の統合カリキュラムでは、これを「人体の構造と機能」としてまとめ、心・血管系に関するユニット、呼吸器系に関するユニットなど、各臓器系において担当

者が講義・実習内容を打ち合わせて実施する。このような構成は臨床医学においても同様で、心・血管系に関するユニットでは、循環器内科、循環器外科、放射線科、リハビリテーション科など、複数の教員がひとつのユニットを構成して授業にあたる。これらの水平型統合カリキュラムは、基礎から臨床に、さらに臨床実習の中で、スパイラルな形で反復されていく。また、基礎と臨床をまとめた形で統合する垂直型の統合カリキュラムも考えられる。この場合には、基礎医学の知識がただちに臨床の場面に適用されるので、学生にとってはより効率的な学習体制となりうるが、一方、各ユニットに要する時間が増加して、コース終了までに2～3年間に要する場合もあり、コースの始めに行ったユニットの内容をどのように記憶の中に保持していくかが問題となろう。

いずれにせよ、統合カリキュラムでは講座間の壁が取り払われ、授業内容の調整が容易となること、授業内容の重複や欠落を防ぎやすいこと、学生にとっては授業内容を統合的に理解しやすいことが利点として挙げられるが、反面、学問体系としての体系的な理解が妨げられることを欠点とする立場もある。このような統合カリキュラムの導入は、大学設置標準の大綱化を受けて、多くの大学で部分的な導入も含めて検討されたが、その本格的な導入には後述のモデル・コア・カリキュラムの提示³⁾まで、さらに10年以上の年月を要することになった。

Early exposure と医の倫理教育など

医学部入学の早期から基礎・臨床医学の現場にふれ、医学学習への動機づけや医の倫理教育への導入を図る early exposure は、1991年度においても80校中49校(61.2%)で行われていた⁷⁾。また、独立した科目としての「医の倫理」教育は10校(12.5%)で行われていたのみであったが、いわゆる「医学概論」も含めると

第1表：期待される医療人像

- 生涯を通じた学習
- 広い視野と高い見識
- 患者の立場に立った診療
- 深い教養と周辺科学の知識
- 地域医療への関心
- 医師としての社会的責任
- 自らの能力の限界の自覚
- チーム医療の指導者

「医学教育の改善に関する調査研究協力者会議」最終まとめ(1987)⁸⁾より、著者改変

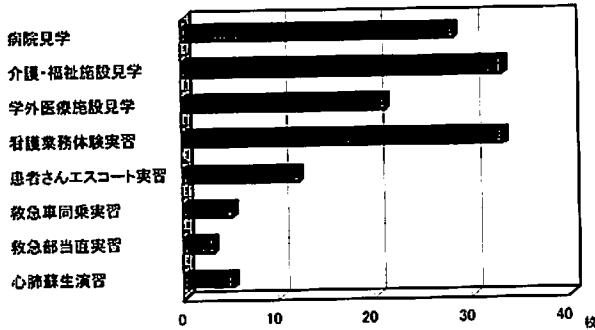


図1 Early exposure プログラムの内訳 (2003 年度)⁹⁾

73 校 (91.2%) で医の倫理に関連する授業が採用されていた⁹⁾。これらはおそらく、医学教育の改善に関する調査研究協力者会議の最終まとめ (1987)⁹⁾ に示された「期待される医師像」(表 1) の精神に則った改善の結果と思われる。

これらの重要な学習科目については、さらに大学設置基準の大綱化により自由な科目設定が容易となったことを受け、early exposure は 1993 年度で 65 校 (81.2%)⁷⁾、1997 年度で 79 校 (98.7%)⁹⁾、2003 年度で全 80 校が実施することとなった⁹⁾。また、医の倫理教育についても、1993 年度には独立した科目としての「医の倫理」が 16 校 (20%) で行われ⁷⁾、1995 年度では 58 校 (72.5%)⁹⁾、さらに後述するモデル・コア・カリキュラムの提示⁹⁾を受けて、2003 年度には 79 校 (98.7%) が何らかの形で医の倫理に関する授業を行うことになった⁹⁾。

なお、2003 年度に行われた early exposure プログラム⁹⁾について、その内訳の主なものをみると、病院見学が 28 校 (35%)、介護・福祉施設の見学が 33 校 (41.2%)、学外医療施設の見学が 21 校 (26.2%)、看護業務の体験が 33 校 (41.2%)、外来や病棟での患者さんエスコートが 12 校 (12%) となっており、さらに数は少ないが、救急車同乗が 5 校 (6.2%)、救急部当直などが 3 校 (3.7%)、基本的な心肺蘇生演習が 5 校 (6.2%) となっている (図 1)。

PBL テュートリアル

PBL テュートリアルは 1960 年代後半にカナダの McMaster 大学で始まり、欧米を中心に広く普及している。

欧米で通常行われている学習方法を略述すると、一般

に学生は 6～8 名程度の小グループに分けられ、第 1 ステップとして、テュータから提示された臨床的な課題について、異常と思われる事項を抽出、分析、整理して、どのようなメカニズムで問題が生じているのか仮説を立てる。ここでは各々が持っている知識を最大限に活用し、提供しあうことが求められる。臨床的な課題は患者プロフィールから病歴、身体所見、検査所見など、順次提示される。第 2 ステップは自己学習であり、学生はこの一連の過程を通じて明らかになった必要事項について、適切なリソースを選択して自己学習を行う。第 3 ステップでは、学習してきた事項を適用して、前回の仮説をはじめから検証し直し、必要に応じてさらに仮説を深めていく作業を行う。

このように、PBL テュートリアルでは、臨床的な課題を用いるが、それに診断をつけ、治療方針を決定することが目的ではなく、その根底にある病的なメカニズムを推定して、新たに自ら学習した知識をもとに検証していく、そのような学習過程を通じて、長く記憶され、必要に応じて取り出して新しい問題の解決に適用することができる“生きた知識”を修得し、また、自らが必要と判断した事項について、適切なリソースを用いて学習する能力を身につけることが目的となる。

わが国では 1988 年に東海大学、1990 年に東京女子医大に PBL テュートリアルが導入されたが、その後大きな変化はみられず、5 年後の 1995 年度でも全体で 7 校 (8.7%)⁹⁾ が導入したに留まった。しかし、その後少しずつ PBL テュートリアルを導入する大学が増加しはじめ、1997 年度には 27 校 (33.7%)⁹⁾、1999 年度には 39 校 (48.7%)¹⁰⁾、2001 年度には 46 校 (57.5%)¹¹⁾ となり、とくにモデル・コア・カリキュラム提示後の 2003 年度には 65 校 (81.2%)⁹⁾ まで増加している。

なお、わが国と欧米を比べた場合、学生が討論型のグループ学習や自己学習に不慣れであること、高校からの入学であるので学生の年齢層が低いこと、教員数が絶対的に少ないためテュータへの負担が過大となることなど、わが国では PBL テュートリアルが有効に機能するための障害も多く、費用対効果のバランスが悪いとの意見も少なからず聞かれるが、このような学習法の効果判定には長期的な観察も必要であることを考慮し、工夫を加えながら継続していくことが重要と思われる。

クリニカル・クラークシップ (診療参加型臨床実習)

クリニカル・クラークシップは欧米の医学教育の中核をなすもので、病棟に配属された学生は、診療チームの

一員として、真っ先に新入院患者さんの病歴を聴取し、身体診察を行い、診断・治療方針を自ら検討した上で、チームの回診や指導医の回診においてプレゼンテーションを行い、責任をもって積極的に患者さんの診療に参加する。

わが国で行われている臨床実習を3つの形態に分類すると、見学型、模擬診療型、診療参加型に分けられる。見学型では病棟に配属された学生は、医師や看護師が行う医療を行う現場を見学するだけで、患者さんとじかに触れ合うことは極端に少ない。模擬診療型では、学生は受け持ち患者さんを与えられ、指導医の指示のもとで病歴を聴取したり、時に診察をしたりするが、すでに診断と治療方針が決定した患者さんについて、医師の業務の一部を模擬的に体験するだけである。一方、診療参加型の臨床実習では欧米のクリニカル・クラークシップと同様に、診療チームの一員として(医学生としての)責任をもって、患者さんの診療に参加することになる。

従来、わが国では見学型の臨床実習が主体となっており、患者さんと触れ合うにしても模擬診療型の臨床実習がせいぜいであった。これには、明治以来の講義を中心として実習を軽視する風潮、研究が重視され臨床教育がないがしろにされる体質が原因としてあげられよう。さらに、臨床教育の重要性を認識したとしても、診療参加型の臨床実習では、医療面接や身体診察だけでなく、一定の医行為をも行うことになり、医師法第17条の「医師でなければ医業をしてはならない」との条文に違反することになることも阻害要因となっていた。

この問題の突破口となったのは、1991年の厚生省臨床実習検討委員会最終報告¹⁾であり、医学生が医行為を行うことに関して、1) 許容される基本的な医行為を設定し、2) 指導医による指導・監督のもとで、3) 一定の資格要件を満たす医学生が、4) 医学生である旨の明確な紹介のもとに、患者さんや家族の同意を得た場合には、違法性が棄却されるとの見解が示された。

この報告をうけて、全国的に診療参加型の臨床実習を導入することが検討され始めたが、実態としては診療参加型臨床実習を実施していたとした大学が、1993年度で14校(17.5%)²⁾、1995年度で30校(37.5%)であり³⁾、その後も大きな変化なく推移した。このような事態の背景には、欧米と比べて医学生が医療に参加して活動することへの社会的な認識が不足していること、医学生と教員の双方に、欧米では当然のことである「医学生として臨床実習に参加するためには基本的な臨床能力が必須である」、「臨床実習を開始する学生は基本的な臨床能力を備えているはずである」という共通の認識が欠如

していること、さらに重要なのは、例えば米国式のチーフレジデント、レジデント、インターン、医学生が、診療チームの一員として働き、その間、屋根瓦方式で上級者が下級者に対して、それぞれ可能な限りの教育を行うという、卒前と卒後を一体化した臨床教育のインフラともいべき診療システムが欠如していることが挙げられる。

なお、後述する2001年のモデル・コア・カリキュラムの提示³⁾、2002年の共用試験トライアル開始をうけて、2003年度⁴⁾では診療参加型臨床実習を全科で導入している大学が51校(63.7%)、一部の科で導入しているのが24校(30.0%)と急増したが、その内容をみると、なお欧米でのそれとは大きな隔りがあるように思われる。

21世紀医学・医療懇談会第4次報告

近年のわが国の医学教育改革の原動力となったのは、1999年の21世紀医学・医療懇談会第4次報告「21世紀に向けた医師・歯科医師の育成体制の在り方について」であった²⁾。同報告では、大学における教育研究体制の改善の方向として、学部教育の改善に関しては、1) 入学者選抜方法の改善、2) 豊かな人間性の涵養とコミュニケーション能力等の育成、3) 少人数教育の推進と臨床実習の充実、4) 教育内容の精選と多様化、5) 適切な進級認定システムの構築と進路指導の充実、6) 今日の医療の課題に応じた諸分野の教育の充実を掲げている(表2)。

この報告で示された改善の方向の中で、3)の少人数教育の推進と臨床実習の充実は、まさにPBLチュートリアルの実施を促し、また、診療参加型臨床実習の導入をさらに促進する結果となった。4)の教育内容の精選と多様化は、モデル・コア・カリキュラムの提示に帰結し、さらに5)の適切な進級認定システムの構築から、モデル・コア・カリキュラムの内容を評価する形で、全

第2表：学部教育の改善

- | | |
|---|---------------------------|
| A | 入学者選抜方法の改善 |
| B | 豊かな人間性の涵養とコミュニケーション能力等の育成 |
| C | 少人数教育の推進と臨床実習の充実 |
| D | 教育内容の精選と多様化 |
| E | 適切な進級認定システムの構築と進路指導の充実 |
| F | 今日の医療の課題に応じた諸分野の教育の充実 |

「21世紀医学・医療懇談会第4次報告」(1999)²⁾

国一律の共用試験システムが構築される結果となった。この試験システムは、1991年の厚生省臨床実習検討委員会最終報告¹⁾で示された医学生が医行為を行うことの違法性を棄却するための「一定の資格要件」を満たすことになる。

モデル・コア・カリキュラム

医学・歯学教育の在り方に関する調査研究協力者会議が2001年に提示した「医学教育モデル・コア・カリキュラム—教育内容ガイドライン—」³⁾は、事前に各大学の意見を聴取し、その結果を踏まえたものとはいえ、全国の医科大学に大きな衝撃をあたえた。

その内容は、A. 基本事項、B. 医学一般、C. 人体各器官の正常構造と機能、病態、診断、治療、D. 全身におよぶ生理的变化、病態、診断、治療、E. 診療の基本、F. 医学・医療と社会、G. 臨床実習に分けられ(表3)、これらの事項の修得に教育課程の約2/3を費やし、残りの約1/3を各大学独自の多様なプログラムにあてるといえるものである。

このカリキュラムの特徴は、1) 基礎医学と臨床医学の区分、あるいは内科系と外科系などの区分をはずして、ヒトの体の正常と異常を統合的にとらえる構成であるこ

と、2) 症候や病態からのアプローチを重視し、より科目横断的な思考を求めること、3) 医の倫理や医療安全、課題探求・問題解決能力など、従来型のカリキュラムにおいて不足していた部分を重視し取り上げたこと、4) 知識量を最低限に抑えるとともに、技能や態度の側面にも言及していることである。

前述の医学・歯学教育の在り方に関する調査研究協力者会議の報告書¹²⁾には、診療参加型臨床実習の導入が推奨され、さらに、これを実現するために、全国の大学が臨床実習前の学生に対する共同の試験システムを開発する必要性が提言されている。

このような状況の下で、旧来のカリキュラム構成を保ってきた大学では、急速、カリキュラムを徹底的に見直して、統合カリキュラムを採用する方向が進められた。この結果、全面的な統合カリキュラムの採用校は、1999年度¹⁰⁾の23校(28.7%)、2001年度¹¹⁾の30(37.5%)校から、2003年度⁹⁾には51校(63.7%)となり、部分的な採用も含めると80校中75校(93.7%)が統合カリキュラムを採用することになった。また、カリキュラムの見直しにより、医の倫理や医療安全に関するプログラムの拡充や、課題探求・問題解決能力の育成を目指すPBLテュートリアル¹³⁾の導入などが促進されてきた。

モデル・コア・カリキュラムの内容自体については、医師国家試験ガイドラインとの整合性も含めて見直すべき箇所が多いことは周知であり、必ずしも理想的なものとはいえないが、その目指すところはわが国の医学教育改革の目的に沿っており、多くの大学でのカリキュラム改革を促した功績は特筆すべきことといえよう。

第3表：医学教育モデル・コア・カリキュラムの内容

A	基本事項
1	医の原則
2	医療における安全性への配慮と危機管理
3	コミュニケーションとチーム医療
4	課題探求・解決と論理的思考
B	医学一般
1	個体の構成と機能
2	固体の反応
3	原因と病態
C	人体各器官の正常構造と機能、病態、診断、治療
D	全身におよぶ生理的变化、病態、診断、治療
E	診療の基本
1	症候・病態からのアプローチ
2	基本的診療知識
3	基本的診療技能
F	医学・医療と社会
G	臨床実習
1	全期間を通じて身につけるべき事
2	内科系臨床実習
3	外科系臨床実習
4	救急医療臨床実習

医学教育モデル・コア・カリキュラム—教育内容ガイドライン—(2001)³⁾

共用試験システム

医学・歯学教育の在り方に関する調査研究協力者会議の提言¹²⁾をうけて、2002年度から共用試験(臨床実習開始前の学生評価のための共用試験システム)のトライアルが開始された。運営は共用試験実施機構(現社団法人医療系大学間共用試験実施評価機構)が担当し、各大学は試験問題の提供と経費の納入を行うシステムとなっている。

対象は臨床実習開始前の学生であり、診療参加型の臨床実習に必要とされる「知識」をコンピュータを用いた多肢選択問題で評価し(Computer-Based Testing: CBT)、さらに「技能と態度」をOSCEで評価する。「知識」の評価内容はモデル・コア・カリキュラムに示され、「技能と態度」の評価内容は「診療参加型臨床実習に参加する学生に必要とされる技能と態度に関する学

習・評価項目」¹³⁾ に示されている。

このような形で診療参加型臨床実習に参加する学生を、全国一律の試験システムにより評価することは、実習に参加する医学生が一定の要件を満たしていることを社会に担保することにほかならず、各大学での診療参加型臨床実習の導入を促進する結果となったのは前述のとおりである。

共用試験は3年間のトライアルを行った後、2005年度から本格実施されることになり、最終的には全80大学が参加する予定である。

なお、CBTは米国のシステム (United States Medical Licensing Examination, step 1) を参考にしたもので、プールされた多数の問題の中から、コンピュータ上で学生ごとにランダムに選択された問題群を提示する形で試験を行う。問題管理から採点結果の提供までを実施評価機構が行うが、その成績をどのように利用するかは各大学の判断にゆだねられる。また、各大学から提供された問題については、各大学の協力のもとで実施評価機構がブラッシュアップを行うとともに、試験後の事後評価も慎重に行ってプール問題を決定している。

正式実施にあたっての問題点は、トライアルでの成績を見るかぎり、全国平均が50点台にとどまり評価基準の設定に困難を感じる点である。CBTの結果については、そのみで総括的評価の対象とするのではなく、総括的評価の一部として取り扱う方向が妥当かと思われる。また、プール問題の数がさらに増加すれば、正答率を参考にした問題選択の幅が広がり、ある程度の範囲の期待正答率をもとに、全国一律の絶対的評価基準を設定することも可能かと思われるが、いずれにせよ今後の検討課題となろう。

共用試験の一部を構成するOSCEは、学生が一定の時間内に、定められた共通の課題をもとに臨床実技を行い、一定の評価基準のもとに評価される客観的な臨床能力の評価法である。1975年にHardenら¹⁴⁾により開発され、欧米では臨床教育の評価法として広く普及した。わが国では厚生省班研究の一環として、1995年12月に日本大学医学部、東京女子医科大学および埼玉医科大学による3大学トライアルが行われ、大学単位でOSCEを実施することが可能であることが示されたが、臨床能力の評価法として大学単位で導入されたのは、1999年度¹⁰⁾においても38校と半数に満たなかった。100名程度の学生を1日で評価するためには、10数室の試験会場の確保と多数の評価者を必要とすること、さらに、このような評価を受けるだけの臨床技能教育が十分に行われていなかったことが、わが国での普及を阻んだ要因と



図2 スキルラボ (埼玉医科大学)

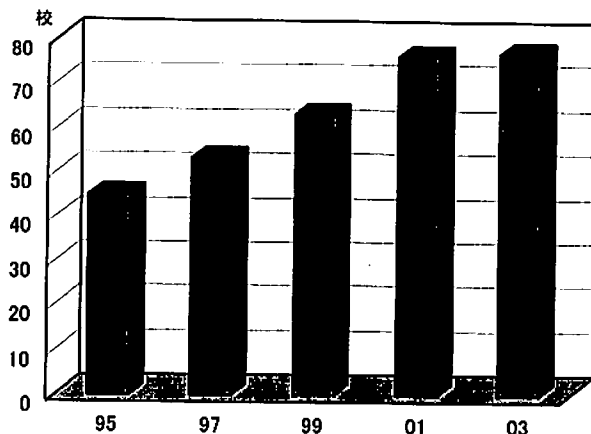


図3 診断学実習の実施校数^{5) 9) 10) 11)}

考えられる。

しかし、1999年11月の医師国家試験改善検討委員会報告書¹⁵⁾で、国家試験に実技試験 (OSCE等) を導入する方向性が明記されたこと、さらに、2002年度から共用試験OSCEのトライアルが開始されたことを受けて、OSCEは全国で急速に導入されることとなり、2001年度¹¹⁾には64校 (80.0%)、2003年度⁵⁾には77校 (96.2%) で、2004年度には全80校でOSCEが実施されることになった。また、OSCEの課題構成において重要な要素となる医療面接では、標準模擬患者 (Simulated Patient: SP) の育成を目指す各種のボランティア団体の惜しみないご協力が大きな力となった。

このようなOSCEの普及は、必然的に各大学での臨床技能教育の充実を促すこととなり、基本的な身体診察法の実技演習のみならず、医療面接や身体診察時にお

る患者さんへの配慮を重視した態度教育にも力が入られる結果となった。とくに、従来、軽視されがちだった医療面接の教育が多くで大学で行われるようになり、SPを独自に養成する大学も増加しつつある。

また、共用試験 OSCE の課題として、頭頸部診察、胸部診察、腹部診察、神経診察に加えて、手洗い・ガウンテクニック、縫合・抜糸、体外式自動除細動器の使用を含む救命処置が挙げられていることから、これらの手技の詳細を記載した「診療参加型臨床実習に参加する学生に必要とされる技能と態度に関する学習・評価項目」³⁾ に準じて、各大学で心肺蘇生や縫合用のシミュレータを用いた臨床技能教育が行われるようになった。さらに、診療参加型臨床実習に円滑に参加できるよう、これらの基本的手技のみならず、採血、導尿、乳房診察や直腸診、気管内挿管など、様々なシミュレータを備えた専用の訓練施設（スキルスラボ）を配する大学も増加している（図2）。

なお、このような臨床技能教育は診療参加型臨床実習の準備教育（ICM）として、欧米では入学直後から多くの時間をさいて実施されているが、わが国においては図3に示すように、OSCEの普及とともにようやく大多数の大学で実施されるようになってきたところである。ただし、その内容や用いる時間については、各大学の報告様式が必ずしも統一されていないため詳細な分析は困難であった。いずれにせよ、共用試験 OSCE が本格的に実施され、教員と学生が共通の目的意識のもとに努力を重ねることにより、欧米のそれに勝るとも劣らない実習形態が確立されるものと期待している。

おわりに

この15年間に行われてきた卒前医学教育の大きな変革について、その改革へのエネルギーを教育の現場で実感し、それに抵抗する力との対応に苦慮してきた立場から、全国的な教育改革の流れを概説した。この変革は、まさに「知の偏重」から「心と技の教育」を重視する立場への、卒前医学教育のパラダイムシフトと称するべきであり、多くの教員にとっては、かってないほどの時間を教育に捧げることが必然となる事態でもあった。おり

しも、頻発する医療過誤事件が世間の注目を集め、患者さん中心の、安全で開かれた医療を求める風潮が当たり前なこととなる時代背景の中で、心と技の教育を重視する新しい医学教育の流れが確立されようとしていることは、まさに時宜をえた取り組みといえる。さらに、2004年度から開始された新医師臨床制度とともに、卒前から卒後の医学教育が一貫して互いに補完し、高めあえるような教育システムが構築されることを期待している。

文 献

- 1) 厚生省臨床実習検討委員会最終報告, 1991
- 2) 21世紀医学・医療懇談会第4次報告: 21世紀に向けた医師・歯科医師の育成体制の在り方について, 1999
- 3) 医学・歯学教育の在り方に関する調査研究協力者会議: 21世紀における医学・歯学教育の改善方策について—学部教育の再構築のために—別冊「医学教育モデル・コア・カリキュラム—教育内容ガイドライン—」, 2001
- 4) 全国医学部長病院長会議: 医学教育カリキュラムの現状, 平成3年度(1991年), 1992
- 5) 全国医学部長病院長会議: 医学教育カリキュラムの現状, 平成15年度(2003年), 2004
- 6) 医学教育の改善に関する調査研究協力者会議最終まとめ, 1987
- 7) 全国医学部長病院長会議: 医学教育カリキュラムの現状, 平成5年度(1993年), 1994
- 8) 全国医学部長病院長会議: 医学教育カリキュラムの現状, 平成9年度(1997年), 1998
- 9) 全国医学部長病院長会議: 医学教育カリキュラムの現状, 平成7年度(1995年), 1996
- 10) 全国医学部長病院長会議: 医学教育カリキュラムの現状, 平成11年度(1999年), 2000
- 11) 全国医学部長病院長会議: 医学教育カリキュラムの現状, 平成13年度(2001年), 2002
- 12) 医学・歯学教育の在り方に関する調査研究協力者会議: 21世紀における医学・歯学教育の改善方策について—学部教育の再構築のために—, 2001年3月
- 13) 社団法人医療系大学間共用試験実施評価機構: 診療参加型臨床実習に参加する学生に必要とされる技能と態度に関する学習・評価項目(正式実施第1版), 2005
- 14) Harden RM, Stevenson M, Downie WW & Wilson GM.: Assessment of clinical competence using objective structured examination. Br Med J 1: 447-451. 1975
- 15) 医師国家試験改善検討委員会報告書, 1999

原 著

神経病原性レトロウイルス A8-V の env 遺伝子発現に見られた 奇妙なスプライシング

¹⁾創価大学工学部生命情報工学科, ²⁾デンカ生研株式会社

わた なべ り ひと たか せ よ でん さ や か やま かわ けい いけ だ とみ お²⁾
渡 辺 里 仁, 高 瀬 (余 田) 明, 山 川 圭, 池 田 富 夫²⁾

ABSTRACT

Eccentric splicing found in env gene expression of neuropathogenic A8-V

Rihito Watanabe¹⁾, Sayaka Takase-Yoden²⁾, Kei Yamakawa¹⁾, Tomio Ikeda²⁾

¹⁾Department of Bioinformatics, Faculty of Engineering, Soka University, Tangi-cho 1-236, Hachioji, Tokyo

²⁾Denka Seiken Co., LTD. 1-2-2 Minami Honcho, Gosen-shi, Niigata

Packaging cell lines PacNIH/A8 β and PacNIH/A8 δ , which were introduced by the DNA of expression vectors pA8(Ψ -) β and pA8(Ψ -) δ , respectively, to produce pseudo-retroviral particles in the retroviral vector system, were established. Both the expression vectors were constructed using the genes of A8-V, which is an isolate from Friend murine leukemia virus (F-MLV) and shows higher proliferation rates in the central nervous system (CNS) of rats and mice compared with original F-MLV. These two expression vectors utilize a different polyadenylation signal (polyA signal) for the expression of retroviral genes. The former employs a 0.85 kb fragment in the SV40 early region as a polyA signal, and the latter, a 0.13 kb of the same region. PacNIH/A8 β showed an unstable expression of the env gene in the A8-V genome, whereas all of the retroviral gene expressions in the PacNIH/A8 δ were perfect. An occurrence of abnormal splicing in the mRNA for the env gene in the PacNIH/A8 β cells was suggested.

Key Words : ecotropic, packaging cell, histochemistry, retrovirus, CNS

緒 言

我々は、フレンド白血病マウスレトロウイルス (Friend murine leukemia virus, F-MLV) を、ラット脳内への継代接種およびラット由来グリア細胞株 C6 への継代感染を繰り返すことにより神経病原性ウイルス株 FrC6-V を樹立した¹⁾。更にこのウイルスを分子クローニングして A8-V を得た²⁾。A8-V も FrC6-V と同様に、新生仔ラットに感染させることにより、感染後 6-8 週で感染したラットの中枢神経系内に海綿状脳症を惹き起こす。病変部位は橋を中心に大脳皮質、視床、基底核、小脳、脊髄におよぶ、脊髄病変が強い場合には下肢麻痺が出現する³⁾。海綿状病変を形成する空胞は、我々の電

子顕微鏡による検索から後シナプスの部位にある神経網 (neuropil) に局在していると考えられる²⁾。病変が神経細胞に生じているにもかかわらず、ウイルスは神経細胞には感染せず、ウイルス抗原は感染したラットの中枢神経内の血管壁やグリア細胞に認められる^{3), 4), 5)}。

一般にマウスレトロウイルス (MLV) の遺伝子は、5' 末端の Long Terminal Repeat (5' LTR), gag 遺伝子, 次に pol 遺伝子領域を挟んで、ウイルスの被膜タンパク質 (envelope protein, Env タンパク質) をコードとする env 遺伝子が配列され最後に 3' 末端 LTR が付加される構造をとっている⁶⁾。この中の gag 遺伝子はウイルス粒子のコア蛋白を形成する Gag タンパク質をコードする。Gag タンパク質の発現には LTR 領域にあ

る U3 領域から始まり env 遺伝子を含む全長 8.4 kb の mRNA (full length-mRNA) が用いられる。一方、env 遺伝子の発現では、前述の全長の mRNA からスプライシングにより gag-pol の領域が除去された 3.1 kb の mRNA (env-mRNA) が用いられる^{6), 7)}。A8-V の神経病原性に関与している遺伝子がどの領域にあるかについては、神経系であまり増殖せず、かつ神経病原性もない F-MLV の分子クローンである 57-V の遺伝子と A8-V の遺伝子間で組換えをして作成した種々のキメラウイルスを用いた感染実験の結果から明らかになっている^{2), 7)}。神経病原性を惹起し、また、ラット中枢神経系で効率よく増殖するためには、A8-V 由来の env 遺伝子 (A8/env) が必須である。この遺伝子にコードされる Env タンパク質 (A8/Env) は、我々がラットグリア細胞株 F10 細胞から分離した MLV レセプター F10-EcoR を、57-V 由来の Env タンパク質 (57/Env) に比べてより効率よく認識し、A8/Env を発現しているウイルス粒子の標的細胞への進入を促進させる^{8), 9)}。A8-V の病原性発現および中枢神経内での高い増殖能獲得のためには上記 env 遺伝子だけではなく、LTR の U3 領域にあるエンハンサー配列や 5' LTR 下流のリーダー配列も重要であることが確かめられている^{7), 10), 11)}。

我々はこれまでに、これら A8-V 遺伝子特有の配列を利用して中枢神経系内に遺伝子を導入するためのレトロウイルスベクター系を構築してきた^{12), 13), 14)}。福光らは、本研究でも使用されている、A8-V 遺伝子を用いた発現ベクターである pA8 (Ψ-) δ をラット由来グリア細胞株 C6/G に遺伝子導入してパッケージング細胞 PacC6/A8 を得た¹³⁾。C6/G 細胞株は我々が C6 細胞から星状膠細胞特異抗原であるグリア線維酸性タンパク質 (GFAP) 陽性の細胞をクローニングして得た細胞株である¹⁾。PacC6/A8 に更に脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) の遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを遺伝子導入して、持続的に BDNF 遺伝子を運ぶ偽ウイルスを産生する PacC6/A8/bmh 細胞をクローニングした。PacC6/A8/bmh 細胞をラット脳内に移植したところ、偽ウイルスにより運ばれた BDNF 遺伝子を発現するグリア細胞がラット脳内で確認された。このとき、A8-V で誘導される神経病変は生じなかった¹³⁾。海綿状脳症を誘発するためには、A8-V が感染して A8-V の遺伝子が脳内のグリア細胞または血管内皮細胞で発現しなければならないものと考えられる。

今回の我々の論文は、これまでの一連のベクター構築の実験、とりわけ pA8 (Ψ-) δ 構築の過程で A8/env

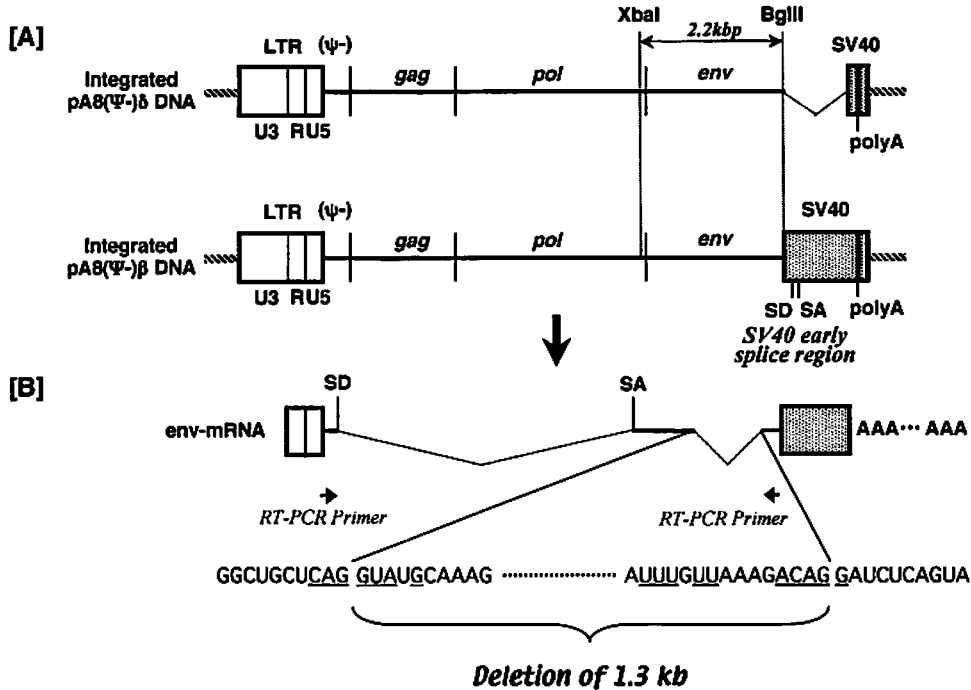
の発現が不安定になる現象が見られ、この現象の原因を解明することで、より安定なレトロウイルスベクターの開発のための知見とする目的で行った研究の結果である。

材料と方法

発現ベクターおよびパッケージング細胞の構築：すでに発表してある方法²⁾により A8-V の遺伝子 (Accession No. D88386) から Ball-Pst I 断片を欠失させてパッケージングシグナルを除去した。更に 3' LTR の部位 (env 領域下流) に SV40 遺伝子 (Accession No. V01380) の 0.61 kbp Sau3AI (4710) -Sau3AI (4100) 断片と 0.24 kbp BclI (2770) -BamHI (2533) をつないだ 0.85 kbp の断片を結合させて発現ベクター pA8 (Ψ-) β を構築した¹³⁾。同様に SV40 遺伝子 0.14 kbp の HpaI (2666) -BamHI (2533) 断片を env 領域 3' 末端に結合させて pA8 (Ψ-) δ を得た (第 1 図 [A])。それぞれの発現ベクターには薬剤選択のためにプラスミジンデアミナーゼ遺伝子を導入した。これらのベクターを NIH3T3 細胞にトランスフェクトした後、1.25 μg/ml のプラスミジン (Invitrogene) 存在下で細胞クローニングを行い、パッケージング細胞 PacNIH/A8β 細胞と PacNIH/A8δ 細胞を得た。同様に pA8 (Ψ-) δ または pA8 (Ψ-) β を C6/G 細胞に遺伝子導入して PacC6/A8δ および PacC6/A8β を得た¹³⁾。

遺伝子解析：サザンブロットにあたっては、PacNIH/A8δ、PacNIH/A8β および正常 NIH3T3 細胞から DNA を抽出した。10 μg の DNA を XbaI および BglII で消化し、アガロースゲル電気泳動を行った。DNA をメンブレンにトランスファーした後、env 遺伝子を含む BamHI-BamHI 断片 (0.8 kbp) をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。RT-PCR では PacNIH/A8δ、PacNIH/A8β、A8-V 感染 NIH3T3 細胞から抽出した RNA を用いた⁷⁾。オリゴ (dT) をプライマーとして、逆転写反応を行い、合成された cDNA をフォワードプライマー (5'-TTCTCGAGAGGGACC ACCGACCCACCAC-3') およびリバースプライマー (5'-TAAGATCTTTATTGTGGGTCGTATTCTA-3') を用いて、PCR に供した。得られた遺伝子断片をクローニングした後、遺伝子配列を決定した (第 1 図 [B] 参照)。

染色および病理検索：すでに発表した方法を用いて^{12), 13)}クローニングされた細胞はスライドガラス上で 1 晩培養した後、100%エタノールで 2 分固定し、酵素抗体法にて Env タンパク質と Gag タンパク質の発現を



第1図 pA8(Ψ-)δ, pA8(Ψ-)βの構造および mRNA の欠損部位の遺伝子配列。

発現ベクターの基本構造を [A] に, env-mRNA の基本構造と PacNIH/A8β 細胞で作られた env-mRNA の欠損部位を [B] に示した。[A] の XbaI-BglIII はサザンブロットの解析に用いた部分。[B] にある Deletion of 1.3-kb が PacNIH/A8β 細胞で作られた env-mRNA の欠損部位。この欠損部位の前後に見られたスプライシング供与部位および受容部位のコンセンサス配列に下線を付した。RT-PCR Primer の上に示した矢印は RT-PCR に用いたプライマーの設定部位, プライマーの塩基配列は材料と方法参照。Ψ: パッケージングシグナル, Ψ- はパッケージングシグナルを欠失させたことを示す。欠失部位は材料と方法参照。polyA: ポリ A 付加シグナル, SD: スプライシング供与部位, SA: スプライシング受容部位, SV40 early splice region: SV40 初期遺伝子のスプライシング部位。

確かめた。抗体は、それぞれのタンパク質に対して gost anti-Rauscher MLV gp70 と anti-AKR p30^{Gag} (Quality Biotech Incorporated Resource Laboratory) を使用した^{3), 5)}。PacC6/A8δ および PacC6/A8β は、本大学の安全規定と動物倫理規定に基づいて飼育されているルイスラットの新生仔 7 匹および 5 匹の脳内にそれぞれ 10² 細胞/匹をマイクロシリッジを用いて注入して移植した¹⁰⁾、同時に A8-V を従来の方法で^{1), 3)} 5 匹に感染させた。移植または感染後 6 週で深麻酔下で屠殺し中枢神経を取り出し 4% パラホルムアルデヒドで浸漬固定しパラフィン切片を作成した。顕微鏡による観察はヘマトキシリン-エオジン染色した後におこなった。

研究結果

パッケージング細胞における遺伝子発現: PacNIH/

A8β 細胞からはプラストサイジン存在下での細胞培養により 30 クローンの細胞を分取した。このうち Gag タンパク質または Env タンパク質を発現していたのは 24 クローンであった。この 24 クローンすべてで Gag タンパク質が発現 (Gag+) していた。しかし Gag+ で Env タンパク質を発現していた (Env+) クローンはわずか 3 クローンであった。残りの 21 クローンには Gag+ であるにもかかわらず、Env タンパク質が発現していなかった (Env-)。また、Gag タンパク質が発現しておらず (Gag-) に Env+ であったクローンはなかった (第 1 表)。一方 PacNIH/A8δ 細胞からは 24 クローンを分取し、13 の Gag+ クローンを得た。これらの Gag+ クローンすべてが Env+ であった。PacNIH/A8δ 細胞から得たクローンでも Gag-かつ Env+ のクローンは見られなかった。

DNA 解析: PacNIH/A8β 細胞で見られた Gag+,

第1表 パッケージング細胞クローンの遺伝子発現

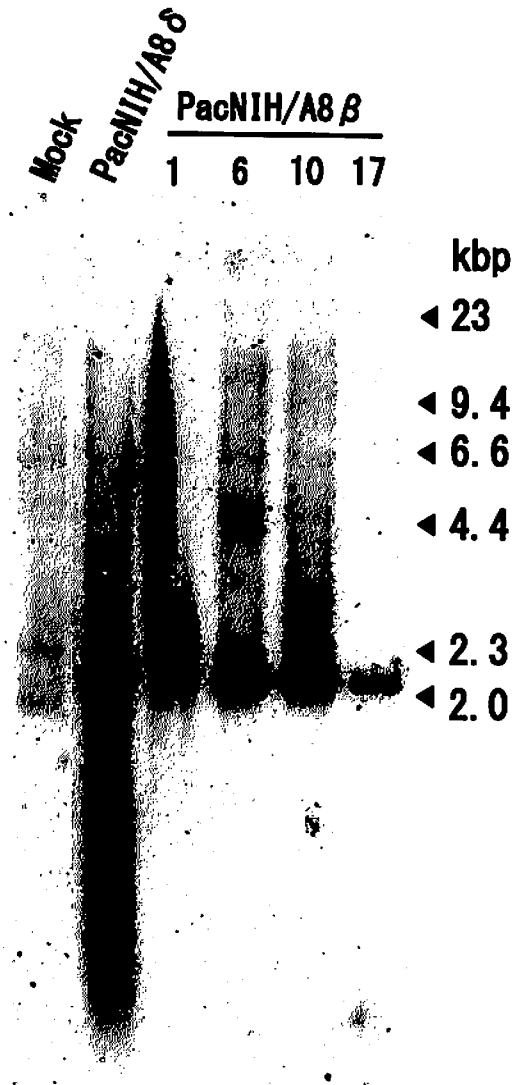
Clone No.	PacNIH/A8β		PacNIH/A8δ	
	Gag	Env	Gag	Env
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	+	++
7	+	-	+	+
8	+	-	+	+
9	+	-	+	+
10	+	-	+	+
11	+	-	-	-
12	++	+	+	++
13	+	-	+	+
14	++	-	+	+
15	+	-	-	-
16	+	-	-	-
17	+	-	-	-
18	+	-	+	+
19	++	-	-	-
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-
22	+	-	-	-
23	+	-	-	-
24	+	-	+	+
25-30	他6クローンでGag-, Env-			

発現ベクター pA8 (Ψ-) β または pA8 (Ψ-) δ を NIH3T3 細胞に遺伝子導入して、パッケージング細胞 PacNIH/A8β および PacNIH/A8δ 細胞を得た。それぞれの細胞はプラストサイジン 1.25 mg 存在下でクローニングした。酵素抗体法で Gag タンパク質と Env タンパク質 (表中 Gag, Env と記載) を検出し個々のクローンについてウイルス抗原陽性 (+) と陰性 (-) を記した。(++) の表記は強い発現がさいぼうのほぼ 100% に発現していたことを示す。(+) のクローンではスライドガラス上の細胞のわずか 70% 以上の細胞がウイルス抗原陽性として判定できた (方法の詳細については福光, 渡辺の論文参照)。

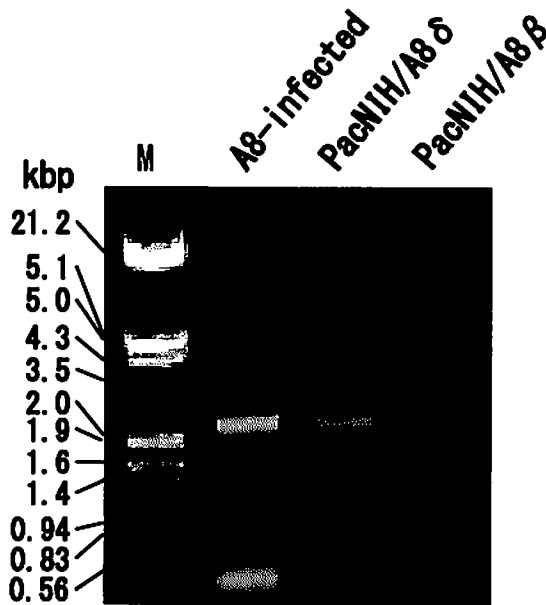
Env- の現象が導入された DNA の欠損によるものか否かをサザンプロット法により確かめた。DNA の欠損の可能性をより精密に測定するために、導入された DNA の env 領域にできるだけ近い部位を切断する制限酵素を用いた (第1図【A】で示した XbaI-BglII 領域)。PacNIH/A8β 細胞クローンから 4 つの Gag+, Env- のクローンを選んで解析したが、導入されていた env 遺伝子の大きさは期待通りのサイズで、PacNIH/A8δ 細胞から得られた結果と同じであった (第2図)。

mRNA 解析: それぞれのクローンについて mRNA

の env 遺伝子領域を RT-PCR にて増幅して解析した。env 遺伝子発現にはスプライシングを受けた後に生じる短い env-mRNA が用いられる。この env-mRNA 内の env 遺伝子領域を解析できるプライマーを設定し (第1図【B】で示したプライマー設定部位)、発現を確かめたところ、Gag+, Env- PacNIH/A8β 細胞クローンに

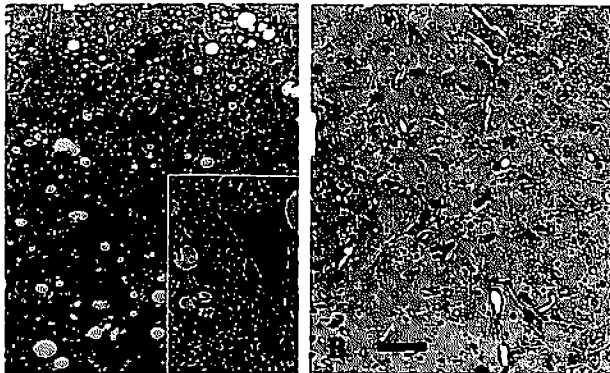


第2図 PacNIH/A8δ および PacNIH/A8β 細胞ゲノムに組込まれた env 遺伝子 PacNIH/A8δ, PacNIH/A8β および正常 NIH3T3 細胞から抽出された DNA のサザンプロットによる解析。細胞ゲノムに組込まれた発現ベクターの env 領域 (XbaI-BglII 領域, 第1図【A】参照) には大きな欠損はなく、期待された約 2 kbp のバンドが検出された。



第3図 PacNIH/A8 δ および PacNIH/A8 β 細胞で発現している env-mRNA

PacNIH/A8 δ , PacNIH/A8 β , A8-V 感染 NIH3T3 細胞から抽出した RNA を用いた RT-PCR の結果得られた電気泳動像。PacNIH/A8 β から得られた材料からは約 1 kbp 短いバンドが検出された。プライマーの設定部位は材料と方法および、第1図【B】参照。



第4図 移植後の病原性

1×10⁶個の PacC6/A8 β 細胞をルイスラット新生仔の脳内に移植し、移植後6週目の橋の組織(写真B)と、A8-V 感染後の橋に見られた強い海綿状病変(写真A)。細胞移植群では、既に発表した PacC6/A8 δ 細胞の移植の結果¹⁾と同様、海綿状の病変もまた、それ以下の小さな病変である空胞変性も全く見られなかった。写真内の太いバーと2重線はそれぞれ50 μ mと60 μ mを示す。写真A内の白枠部分は同部位の拡大であり、海面状変性の中にある神経細胞が健全に保たれていることを示す。

において、env-mRNA の env 遺伝子領域が約 1 kb 短くなっていた(第3図)。PacNIH/A8 δ から得た細胞クローンで作られる env-mRNA の env 遺伝子領域は期待通りの大きさであった。

塩基配列の検索：Env-PacNIH/A8 β 細胞クローンで作られる env-mRNA の塩基配列を調べたところ env-mRNA の 3' 側に 1.3 kb の欠損が確かめられた(第1図【B】)。この欠損部分は、Env タンパク質の表面タンパク質(SU protein)である gp70 の中の下流域をコードする部分と、やはり Env タンパク質の一部で、その膜貫通部分である p15E の大部分をコードしている領域であった。この欠損した部分の下流域の配列は保たれていた(第1図【B】)。

病原性の検討：PacC6/A8 δ および PacC6/A8 β を新生仔ラット脳内に移植して病原性を確かめた。それぞれ7匹、3匹の脳内に移植し6週後に病理検索を行ったが海面状病変は認められなかった(第4図)。

考 察

異なる env-mRNA の発現を示した PacNIH/A8 δ および PacNIH/A8 β 細胞の違いは、それぞれのパッケージング細胞に遺伝子導入された発現ベクター pA8 (Ψ) δ または pA8 (Ψ) β のポリ A シグナルとして用いた SV40 の初期遺伝子(SV40 early region) 構造の違いのみである。pA8 (Ψ) β では初期遺伝子の中にあるスプライシング供与部位と受容部位の構造を含んだ 0.85 kbp 遺伝子断片をポリ A シグナルとして付加されている。この pA8 (Ψ) β を NIH3T3 細胞または C6/G 細胞に遺伝子導入して得られたパッケージング細胞 PacNIH/A8 β 細胞および PacC6/A8 β 細胞の双方で env-mRNA の発現が不安定となったために、我々は SV40 初期遺伝子内のスプライシング供与部位と受容部位の構造が影響していると考え、この部分を含んだ大きな領域を欠失させた 0.14 kbp の遺伝子断片を A8/env の下流に付加して pA8 (Ψ) δ を作成したのである(第1図)。期待通りに、この発現ベクターを導入した PacNIH/A8 δ 細胞では env-mRNA の発現が安定していた(第1表)。PacNIH/A8 β 細胞で観察された不安定な env-mRNA の発現が、導入された DNA の不安定性、または欠失が原因ではないことがサザンプロットの結果から推測されたため、次に我々は mRNA の解析を行った。Gag タンパク質の発現は比較的安定していたため、このタンパク質発現に使われる full length mRNA の解析よりも、Env タンパク質の発現に使われる env-

mRNA に注目した。また、本論文ではデーターを記述しなかったが、RT-PCR を行う前に行ったノザンブロットの結果から PacNIH/A8 β 細胞でも、また PacNIH/A8 δ 細胞でも産生される full length mRNA の大きさは、期待通りのサイズであることが確認されている。

予測通り env-mRNA を標的とした RT-PCR の結果から PacNIH/A8 β 細胞が産生する env-mRNA に欠損が認められた。しかし、欠損部位付近の塩基配列を調べると欠損していた領域は env-mRNA の env 領域内であって、この領域内にある p15E の 3' 末端領域は保たれ、しかもその後のポリ A 付加は正常に行われていた。env-mRNA は full length mRNA から、LTR 下流のスプライシング供与部位と env 遺伝子上流のスプライシング受容部位を使ってスプライシングを受けて形成される⁹⁾。我々は A8-V 遺伝子にあるスプライシング供与部位と受容部位が SV40 初期遺伝子にあるスプライシング供与部位と供与部位が何らかの相互作用を起こして mRNA のポリ A 付加が正常に行われない可能性を予測していた。Gag タンパク質の発現が安定していること、また full length mRNA に大きな欠失が見られなかったことから、スプライシングを受けた後の env-mRNA に異常が生じたことは明らかである。普段はスプライシングで除去されない配列が、後ろにスプライシング供与部位と受容部位の構造を含んだ 0.85 kb の SV40 初期遺伝子の遺伝子断片が付加されることにより、あたかもスプライシングを受けたかのように、env-mRNA の一部が除去されてしまったのである。欠損した部位の前後の領域に異常が見られなかったことから、まずは PacNIH/A8 β 細胞で産生される env-mRNA が更にスプライシングを受けたと考えるのが妥当であろう。そこで、詳細に欠損した部位の前後の塩基配列を検討したところ、実にスプライシング供与部位と受容部位として使われるうる配列が認められたのである (第 1 図 [B] の欠損領域の前後に示した塩基配列に下線を引いた部位)。A8-V や pA8 (Ψ -) δ の遺伝子から読まれる env-mRNA ではスプライシングを受けない部位が、なぜ pA8 (Ψ -) β の遺伝子から読まれる env-mRNA ではスプライシングを受けるのかを説明できる材料をまだ我々は手にしていないが、ひとつには env-mRNA の立体構造の変化がスプライシングを受けやすくする条件の一つであることが考えられる。しかし、コンピューターによるシミュレーションで検索してみたが、今のところ我々の検索では、それを裏付ける手がかりは得られていない。SV40 初期遺伝子にあるスプライシング供与部位と供与部位が何らかの相互作用を起こしている可能性について

も否定的な結果が得られている。というのは、SV40 初期遺伝子にあるスプライシング供与部位と供与部位を含んだ領域を用いた新たな構築で発現ベクターを作成して同様の実験をしたが env-mRNA の発現は安定していた。異常なスプライシングの機構の解明のためには、今後更に種々の長さの SV40 初期遺伝子断片を付加した構築で検討を重ねる必要がある。

Env タンパク質の発現異常は通常の感染でも報告されている。MLV に属し神経病原性を有するレトロウイルスでミクログリアに感染して発現する Env タンパク質に異常が見られ、これが病原性に関与していることが示唆されている¹⁵⁾。そこで我々は PacC6/A8 β 細胞の移植実験を試みたが、神経病原性は認められなかった。

謝 辞

本研究ならびに文献に挙げた我々の論文の多くは、塚田裕三慶應義塾大学医学部名誉教授が設立に尽力した創価大学生命科学研究所で行われた実験を基にしたものです。研究環境を整え、またご助言を下された同名誉教授に感謝します。病理組織標本は創価大学生命科学研究所に勤務していた後藤かつ美技術員の卓越した技術によるものです。また、本研究の一部は文部科学省私学助成・ハイテク・リサーチ・センター整備事業・2004-2008 年の助成を受けました。

総 括

A8-V は我々がフレンド白血病マウスレトロウイルス (F-MLV) から樹立した神経病原性ウイルス株である。このウイルスは、ウイルス粒子の表層の被膜タンパク質 (Env タンパク質) とラット中枢神経系で発現している特異的なレセプターとの相互作用を利用してラット中枢神経系の標的細胞に効率よく侵入する。また、A8-V がラット中枢神経系で強い増殖能を発揮することに対しては、A8-V 遺伝子の LTR およびその下流のリーダー配列が重要な役割を担っている。A8-V が病原性や高い増殖能を中枢神経で発現するためには、ウイルス粒子のコアタンパク質である Gag タンパク質は A8-V 由来のものである必要はない。Gag タンパク質をコードする gag 遺伝子を、神経系に対して病原性がなく、しかも中枢神経系であまり増殖しない 57-V 由来の遺伝子と組換えても、A8-V の性質は変わらない。この A8-V の遺伝子を用いたパッケージング細胞を構築するための発現ベクターを作成した。A8-V の gag-pol-env 遺伝子領域の

発現のためのポリ A シグナルとして SV40 初期遺伝子の領域を利用した。ポリ A シグナルとして 3' LTR を用いなかったのは組換えによって増殖能を持ったウイルス粒子がパッケージング細胞から出現する可能性をより低く抑えるためである。gag-pol-env 遺伝子領域の下流に SV40 初期遺伝子の領域 0.85 kbp および 0.13 kbp を付加して、発現ベクター pA8 (Ψ-) β と pA8 (Ψ-) δ を得た。それぞれを NIH3T3 細胞に遺伝子導入してパッケージング細胞 PacNIH/A8β 細胞と PacNIH/A8δ 細胞を構築した。PacNIH/A8δ 細胞では gag 遺伝子と env 遺伝子の発現は安定していたが、PacNIH/A8β 細胞での env 遺伝子の発現が不安定であった。塩基配列を確かめたところ、PacNIH/A8β 細胞の env 遺伝子を発現させる mRNA の env 遺伝子領域の一部がスプライアウトされていた。

文 献

- 1) Watanabe R, Takase-Yoden S : Gene expression of neurotropic retrovirus in the CNS. *Prog. Brain Res* 105 : 255-262, 1995
- 2) Takase-Yoden S, Watanabe R : Unique sequence and lesional tropism of a new variant of neuropathogenic Friend murine leukemia virus. *Virology* 233 : 411-422, 1997
- 3) Fukumitsu H, Takase-Yoden S, Watanabe R : Neuro-pathology of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis modified by Retroviral Infection. *Neuro-pathology* 22 : 280-289, 2002
- 4) Ikeda T, Takase-Yoden S, Watanabe R : Characterization of monoclonal antibodies recognizing neurotropic Friend murine leukemia virus. *Virus Research* 38 : 297-304, 1995
- 5) Nakai R, Takase-Yoden S, Watanabe R : Analysis of the distribution of neuropathogenic retroviral antigens following PVC211 or A8-V infection. *Microbiol Immunol*, 49 : 1075-1081, 2005
- 6) Coffin J : Structure of the retroviral genome. RNA tumor viruses. (Ed) Weiss R, Teich N, Varmus H, and Coffin J, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. p. 261-368, 1984
- 7) Takase-Yoden S, Watanabe R : A 0.3 kb Fragment Containing the R-U5-5' Leader Sequence is Essential for the Induction of Spongiform Neurodegeneration by A8 Murine Leukemia Virus. *Virology* 336 : 1-10, 2005
- 8) Takase-Yoden S, Watanabe R : Contribution of virus-receptor interaction to distinct viral proliferation of neuropathogenic and nonneuropathogenic murine leukemia virus in rat glial cells. *J Virol* 73 : 4461-4464, 1999
- 9) Takase-Yoden S, Watanabe R : Distribution of Ecotropic Retrovirus Receptor Protein in Rat Brains Detected by Immunohistochemistry. *J General Virol* 82 : 1815-1820, 2001
- 10) Takase-Yoden S, Watanabe R : Identification of genetic determinants that regulate tumorigenicity of Friend murine leukemia virus in rats. *Microbiol Immunol* 46 : 885-890, 2002
- 11) Takase-Yoden S, Watanabe R : Unique three-repeat sequences containing FVa, LVb/C4, and CORE motifs in LTR-U3 of Friend murine leukemia virus clone A8 accelerate the induction of thymoma in rat. *Virology* 326, 29-40 : 2004
- 12) Ikeda T, Takase-Yoden S, Watanabe R : Retroviral pseudo-virus carrying the envelope proteins of neurotropic Friend murine leukemia virus effectively transferred retroviral vector into glial cells. *Virus Research*, 42 : 97-106, 1996
- 13) Fukumitsu H, Takase-Yoden S, Furukawa S, Nemoto K, Ikeda T, Watanabe R : Implantation of BDNF producing packaging cells into brain. *Cell Transplantation* 11 : 459-464, 2002
- 14) Watanabe R, Takase-Yoden S, Fukumitsu H, Nakajima K : Cell Transplantation to the Brain with Microglia labeled by Neuropathogenic Retroviral Vector System. *Cell Transplantation*, 11 : 471-473, 2002
- 15) Wong PK, Soong MM, MacLeod R, Gallick G. E, Yuen PH : A group of temperature-sensitive mutants of Moloney leukemia virus which is defective in cleavage of Env precursor polypeptide in infected cells also induces hind-limb paralysis in newborn CFW/D mice. *Virology* 125 : 513-518, 1983

原 著

司法解剖例における心中の検討

慶應義塾大学医学部法医学教室

保 科 光 紀

ABSTRACT

A judicial autopsy study of double-suicides

Mitsunori Hoshina, M.D.

Department of Forensic Medicine, School of Medicine, Keio University

Objective This study was designed to investigate murder-suicide cases and double-suicides agreed on by both parties, by means of judicial autopsies performed at the Department of Forensic Medicine, School of Medicine, Keio University, to elucidate the characteristics of both double-suicide types, and to compare domestic cases with foreign cases.

Methods Autopsy records of 7,276 corpses, on which judicial autopsies had been performed at the Department of Forensic Medicine, School of Medicine, Keio University during the period from September 1945 to December 2003, were investigated and cases of murder-suicide and double-suicide, i.e. agreed upon by both parties, were extracted. Offender-victim relationships, motives for double-suicides, and methods of homicide were analyzed in individual cases. All cases were compared with foreign cases in terms of these points in the literature.

Results There were 259 murder-suicides and 39 double-suicides, as defined above. The largest number, 110 of the 259 cases, were parent-child suicides. In contrast, the largest numbers of foreign murder-suicides were those due to a failure in the relationship of a couple. Although the number of double-suicides agreed on by both parties between male and female lovers has been believed to be large in Japan, the number was actually small, only 22. This tendency was recognized in the foreign cases as well. In the majority of parent-child murder-suicides, the motive was maternal depression, which correlated with child rearing. In double-suicide cases involving elderly couples, health problems and questions regarding their livelihood were important motives. In the largest number of suicides, in which one person kills the other and then him/herself based on a pact, the method of killing the partner was strangulation, in contrast to cases abroad in which firearms were used in the majority of cases. In many of the double-suicides the methods were nonviolent, i.e., carbon monoxide poisoning, hypnotic poisoning, etc.

Conclusion It was considered important for prevention of murder-suicides to prevent isolation and despair of mothers and the elderly. The present study revealed the limitations, which are attributable cultural differences, of a comparison of domestic with foreign cases. It was considered necessary for future studies of double-suicides to devise flexible definitions of double-suicides.

Key Words : murder followed by suicide, offender-victim relationship, methods of homicide, mercy killing, suicide pact

緒 言

従来、わが国において「心中」という言葉は、基本的には相思相愛の男女が互いの合意のもとに「自殺」する行為を意味し、「情死」などとも呼ばれてきた。心中は江戸時代、特に元禄に流行し、近松、西鶴の作品に好んで描かれ、小峰はそれらの影響により「物に感じ易く情に熱し易い青年男女の心酔するところとなり、悲恋に悩む者の中にはこれらの作物から暗示を受けて心中悲劇を辿る者が輩出した」と考察している¹⁾。一方、海外文献で「心中」は日本に特徴的であると報告されており²⁾、その文化的背景として結婚における制約や、義理と人情の相克、死後に来世で結ばれるという民間信仰的な解釈などが挙げられている³⁾。主に精神医学の論文では suicide pact、すなわち約束のある自殺と紹介されることが多く (double suicide とも言われる)、法医学的には多くは男性が女性を殺害した後に自殺するという点から、murder followed by suicide、または murder-suicide、すなわち加害者の自殺を伴う殺人と記載される。つまり、合意のある心中といえども現象的には殺人とその短時間後に続く加害者の自殺の複合であると考えられている。このように研究者によって、また合意の有無と加害、被害の関係のどちらに重きを置くかによって suicide pact と murder-suicide はしばしば混同して用いられてきた。加害者と被害者の意志が同等の場合を suicide pact、加害者の意志が優越する場合を murder followed by suicide とする考え方もある⁴⁾。わが国では1960年代以降、母子心中が最も多く、家庭崩壊や取り残された家族、特に子供の心的外傷後ストレス障害、いわゆる post traumatic stress disorder (PTSD) の問題など法医学と精神医学の両方の範疇にまたがり、両者の協力のもとにその防止に努めなければならない重要な領域を占めているが、無理心中に関する研究の多くは症例報告にとどまっている。このため、研究者によって異なっている無理心中や心中の定義を統一するために筆者の考える定義を示し、わが国でのこれらの特徴を明らかにし、海外との比較を行い、防止策を検討するために本研究を企図した。

対象ならびに方法

1945年9月から2003年12月までの期間に慶應義塾大学医学部法医学教室で施行された司法解剖 (総数7276体) の解剖記録を調査し、無理心中および合意のある心中の事例を抽出した。解剖記録は司法解剖の総括であり、死因、創傷の部位と形態、凶器、死斑や死後硬

直の程度、アルコールや薬物の定性、定量などの医学的な所見の他、加害者 (記録中では被疑者と呼ばれる) の氏名や遺体を持ち込んだ警察署名、加害者と被害者の関係、事件の状況など社会的な情報についても記載されている。この事件の状況に関する記載を参照して心中事例を抽出し、合意の有無や動機についても判定した。しかし記載者によって事件の状況の記載の詳しさは大きく異なり、新聞記事なみに詳細なものから全く記載されていないものまで見られ、よって記載が不十分なために全例を把握出来ていない可能性は否定できない。本研究では加害者の自殺が未遂の事例も含め、総計298例、うち259例の無理心中を認め (総数306体)、39例が合意のある心中であった。加害者が殺人の自責感から後に自殺した例や加害者と無関係な被害者が犯罪に巻き込まれて殺された例は本研究の対象から除外した。無理心中については解剖記録をもとに加害者と被害者の統計的特徴、年齢分布、関係、動機、殺人の手段などについて分析した。司法解剖は原則的に事件の一両日中に行われるため、その時点で心中であることが判明している事例が解剖記録に心中として記載され、そのような事例を本研究では抽出しているが、1984年以降の事例は朝日新聞のデータベースを検索し、該当事件の新聞記事があればそれを参照した。それによって新たに心中であることが判明した事例は認めなかった。また、1989年から2003年までの間の殺人の305例 (総数321体) について同様の分析を行い、無理心中と比較した。無理心中と合意のある心中についても比較を行った。精神医学的診断については解剖記録に記載されたものを使用し、遺族や関係者への面接、かかりつけ医のカルテの閲覧は行わなかった。

結 果

1. 加害者と被害者の統計的特徴

無理心中の加害者は男性が104人、女性が149人であり、記録の不備から6人が性別不詳であった。無理心中の被害者は男性が124人、女性が182人であった。無理心中の加害者の平均年齢は42.2歳、被害者の平均年齢は22.5歳であった。殺人の加害者の平均年齢は38.0歳であった。一方、殺人の加害者は男性が203人、女性が28人 (他は記録の不備により不詳) であり、殺人の被害者は男性が226人、女性が95人であった。無理心中では加害者、被害者とも女性が多いが、殺人では加害者、被害者とも男性が多い。事件発生時の飲酒状況は、無理心中の被害者の21人から血液中よりアルコールが検出され、そのうち9人 (3%) が血中アルコール

第1表 無理心中の加害者、被害者の年齢分布

年齢	男性/女性 (加害者)	男性/女性 (被害者)
1歳未満		26/22
1～9		53/40
10～19	0/1	10/16
20～29	14/31	10/38
30～39	17/36	7/17
40～49	10/12	2/10
50～59	12/15	5/10
60～69	8/3	2/10
70～79	9/1	2/12
80～89	3/2	3/5
90～	0/0	0/1
年齢不詳	37/48	4/1
総計(人)	110/149	124/182

濃度 1 mg/ml 以上であり、殺人の被害者の 101 人から血液中よりアルコールが検出され、そのうち 48 人 (15%) が血中アルコール濃度 1 mg/ml 以上であった。年代別では、無理心中の加害者は 30 歳代が 53 人 (うち女性が 36 人)、20 代が 45 人 (うち女性が 31 人) の順で多く、女性の占める割合が高かった (表 1)。無理心中の被害者は 1 歳以上 10 歳未満が 93 人 (うち女性が 40 人)、1 歳未満と 20 歳代が各 48 人 (それぞれ女性が 22 人、38 人) という順に多く、子供の被害者に女性が特に多いということはなく、男女ともほぼ同数であることが分かった (表 1)。遺書は無理心中事例のうち 39 例で残されていた。

2. 加害者と被害者の関係

加害者と被害者の関係は母子心中が最も多く、恋人どうしの無理心中は 16 例と少なかった (表 2)。また、母子心中の加害者は 30 歳代の母親が多く (表 3)、被害者は 1 歳未満が多かった (表 4)。被害者の人数は 1 人が 96 例、2 人が 12 例、3 人が 2 例であった。一家心中では 13 例のうち 10 例は夫が加害者であり、うち 5 例の夫が 30 歳代であった。合意のある心中 (39 例) の中では恋人どうしのものが 22 例であった。また殺人の加害者と被害者の関係を比較すると、殺人では知人 (友人、同僚、上司、隣人など) (86 例)、無関係 (60 例) の順に多く、無理心中のように肉親の間での事例は少なかった。

第2表 加害者と被害者の関係 (無理心中)

母子	110
夫婦	53
内縁	21
恋愛	16
一家心中	13
父子	12
親殺し	12
孫殺し	4
姉妹	2
姑の嫁殺し	1
入院患者同士	1
不詳	14
総計(例)	259

第3表 母子心中の母親の年齢 (歳)

10～19 (歳)	1
20～24	7
25～29	17
30～34	20
35～39	9
40～49	10
50～	4
不詳	43 (人)

第4表 母子心中の被害者の年齢 (歳)

生後 1 ヶ月以内	8
2 ヶ月から半年	25
7 ヶ月～11 ヶ月	10
1～4	38
5～9	29
10～14	9
15～19	2
20～	5 (人)

第5表 母子心中の動機 (解剖記録に記載のあったもの)

育児ノイローゼ	22
家庭内不和	9
子供の病氣	8
母親の病氣	4
父親の病氣、死	2
経済問題	2
子供の家庭内暴力	1
子供の進学問題	1 (例)

第6表 夫が加害者の場合の夫婦間の無理心中の動機(解剖記録に記載のあったもの)

年代(夫の年齢)	総件数	動機(件)
20	5	加害者の病気(1)
30	8	家庭内不和(5)
40	3	家庭内不和(2)
50	9	家庭内不和(2), 経済問題(3)
60	5	妻の病気(2), 夫婦とも病気(1) 家庭内不和(1), 経済問題(1)
70	8	妻の病気(3), 夫婦とも病気(3) 家庭内不和(1), 経済問題(1)
80	1	妻の病気(1)
総計	39(例)	

3. 無理心中の動機および殺人との比較

動機は解剖記録の記載に従って分類し、複数認められる場合はそれぞれをひとつと数えた。また、記載が不十分であるため、心中であることは分かっても動機が不明な事例も見られた。加害者と被害者の関係別に動機を表に示す(表5, 6)。母子心中では育児ノイローゼが最も重要な動機であり(表5)、以下家庭内不和、子供の病気が続き、「子供がかわいそうだから道連れにして死ぬ」といった愛他的な動機が続く。また、夫婦間の無理心中の動機は年代が低い夫婦では家庭内不和が多く、年代が高くなるに従い病気や経済問題が目立つようになる(表6)。内縁間の動機は「別れ話」が11例(52%)と最も多く、海外での無理心中の動機と類似していた。恋人どうしの場合、結婚に反対されたという動機は1例しか見られなかった。一家心中では動機が判明した5例中経済問題が動機のもの2例あり、経済問題が重要であることが分かった。父子心中は動機が判明した6例のうち4例が父子家庭であり、育児疲れや子供の病気など母子心中に似たような理由が多い。親殺し心中は12例のうち6例が病気や寝たきりの親を殺したものであり、介護疲れが動機と考えられる。係殺し、姉妹の心中は全例の動機が不詳であった。姑の嫁殺しは看病疲れ、入院患者どうしは加害者、被害者とも結核病院で長期療養中であった。一方、殺人の動機と比較すると、知人、無関係の間では口論、特に飲酒の上でのものが多く、親子間でも口論が8例と最も多いが、統合失調症の子供に殺されたのが5例と次に多かった。夫婦間でも口論が多く、子殺しでは子供や親の病気といった愛他的な動機が4例であり、それと並んで虐待が4例見られた。子殺しでは親子心中と似た動機が多く、この中には死にきれなかった親も含まれていると考えられる。子殺し以外は口論が殺人の主な動機と言える。合意のある心中39例では32例の動

第7表 無理心中全体の加害の手段

絞頸	114
扼頸	10
鼻口部閉塞	18
その他の窒息的手段	12
刃器	48
一酸化炭素中毒	37
焼死	21
溺死	14
鈍器による殴打	8
薬物中毒*	7
高所からの飛び降り	1
電車への飛び込み	1
その他	8
不詳	7
総計	306** (人)

*睡眠薬5, 青酸化合物1, 黄燐1

**総解剖体数に一致

第8表 母子心中の加害の手段

絞頸	42
扼頸	4
鼻口部閉塞	13
その他の窒息的手段	4
一酸化炭素中毒	33
溺死	13
薬物中毒*	6
焼死	4
刃器	3
高所からの飛び降り	1
電車への飛び込み	1
その他	1
不詳	2
総計	127** (人)

*睡眠薬5, 黄燐1

**被害者の解剖体数に一致

第9表 無理心中の手段の年代による変化

	1945年～	1955年～	1965年～	1975年～	1985年～	1995年～
絞頸	5	17	32	30	10	20
刃器	4	2	18	11	4	9
一酸化炭素中毒	1	8	26	2	0	0
薬物中毒	2	5	0	0	0	0(例)

機が不詳であり、不倫や三角関係の清算などの動機が1例ずつ見られるが、特に目立つ動機は見られなかった。

4. 無理心中の加害の手段

手段はほとんどの事例が単一であったが、複数ある場合は死亡の直接的原因となった手段を加害の手段とした。その結果、絞頸が最も多く(表7)、母子心中(表8)においても同様であった。しかし母子心中では刃器による刺殺は少なく、一酸化炭素中毒が多いなどより暴力的でない手段が選ばれていることが分かった。溺死も母子心中で特に選ばれることが多く、状況としては母親が子供を負ぶって、または紐で縛って一緒に入水するものである。銃は無理心中では使用されなかった。合意のある心中の手段は睡眠薬中毒(20例)が最も多く、以下一酸化炭素中毒(13例)、その他薬物(黄燐など)(3例)の順であり、暴力的な手段ではなく同時に企図することが可能なものが選ばれていた。一方、殺人では刃器を手段とするもの(128例)が最も多い。銃を用いた殺人はほぼ全例が暴力団関係である。また、無理心中の手段の年代による変遷を見ると、絞頸、刃器はどの年代にも見られるが、一酸化炭素中毒は1985年(昭和60年)以降、薬物中毒は1965年以降見られなかった(表9)。

考 察

1. 調査対象例の問題点

本研究では慶應義塾大学医学部法医学教室で司法解剖された事例のみを対象とした。慶應義塾大学医学部法医学教室の司法解剖の管轄地域はかつては都区内から多摩地域までの広い範囲に及んだが、医大、医学部の新設に伴い徐々に縮小し、現在では都区内の西半分のみとなるなど大きく変遷している。また、近年は司法解剖が当番制となり、管轄内の事例であっても曜日によっては近隣の他大学に委嘱されることもあり、全例を把握することは困難になっている。海外でも州、郡、市単位の研究は

あっても国レベルでの研究は見られないが、本研究も事例数は豊富ではあるがあくまでも慶應義塾大学医学部法医学教室の事例を分析したものであり、我が国、あるいは東京都といった国や地域を代表する研究とまでは言えない限界を認める。

2. 方法論的問題

無理心中の国際的に統一された定義はない。Marzukらは殺人の後に加害者が1週間以内に自殺した場合を無理心中と定義しているが⁵⁾、文献により殺人と加害者の自殺の間隔を1日から3ヶ月まで定義したものが見られる⁶⁾⁷⁾。またMarzukは加害者が自殺未遂に終わった例を除外しているが、妄想的、あるいは自己愛的な加害者が軽蔑されたり、昇進を妨げられたという被害妄想を抱き、それに基づいて同僚や上司などを殺害した後に自分も自殺した事例も含めており、わが国での理解に馴染まない面もある。このように国や地域によって定義が異なることが正確な比較を困難にしている。さらに、無理心中と合意のある心中の区別があいまいである文献もしばしば見られ、例えば親子心中は基本的には親の愛他主義の強要であり、殺人的な要素が強いため厳密には無理心中であるが、大原はdouble suicideの中にlove suicide pactと親子心中を併記しており¹⁸⁾、FishbainとAldrichはこの分類は誤っているのではないかと指摘している²⁾。また、FishbainとAldrichは、ほんとうに日本に特徴的といえる「心中」は恋人どうしの異性心中、love suicide pactなのではないのかと主張しているが²⁾、本研究では合意のある心中39例の中でlove suicide pactは22例見られるのみであり、決して心中全体の中でわが国に特徴的と言えるほどの数を占めているとは言えなかった。むしろわが国に特徴的なのは母子(無理)心中であると言える。また事例の個別性からもあえて操作的に殺人と加害者の自殺の間隔を区切って議論することはあまり意味が無いと考えられる。よって無理心中、心中を筆者は次のように緩やかに定義する。

無理心中 (murder-suicide)

「加害者が自殺する意志をもって殺人を犯した事例」
 心中 (suicide pact)

「合意のあることが遺書やその他の状況から確認でき、一酸化炭素中毒や薬物中毒など暴力的でない、同時に企図出来る手段が用いられた事例で、一方が知的、年齢的、体力的に他方の意志に逆らえない関係を除外したもの」

また、従来の研究では動機に関しても精神医学的な動機と社会的な動機を区別したものは見られない。例えば経済困難とうつが動機として併記されている場合であり、それぞれ精神医学的な動機としてはうつ、社会的な動機としては経済困難というように区別して記載されるべきである。一方、加害者、被害者の精神医学的診断を確定するのは法医学的には困難であり、Allenが指摘しているように、警察の聴取の際にある関係者がうつと言及すればそれが記録されてしまうなど法医学的な記録での精神症状の記載は十分に信頼できるものではない²⁾。このため関係者からの聴取により精神科受診歴が確認されるか、あるいは遺体の血液の薬物定性検査により向精神薬が証明された事例を精神疾患があったと推定するのが法医学的手法での限界と考えられる。正確な診断を明らかにするためにはRosenbaum¹⁰⁾のように遺族や関係者へのインタビューを行う必要があるだろう。本研究では加害者、被害者の背景にあるうつ状態についての明らかなデータは入手できなかった。しかし加害者のうつについては海外文献では18~75%までの広い範囲での報告があり⁵⁾、作田²⁰⁾の研究では56%を示している。また、本研究では記録の不備のために表中に不詳という項目が散見される結果となった。特に加害者に関する情報は不詳な点が多く、今後の研究のために系統的な記録体系の整備が必要と考えられた。

3. 海外での無理心中の特徴

アメリカにおける無理心中率は0.2~0.3件/人口10万/年であり、殺人率の10件/人口10万/年と比べ非常に稀である⁵⁾。加害者はほとんどの報告で男性が圧倒的に多く、約75~90%であり、被害者は60~90%が女性である。加害者と被害者の関係は夫婦あるいは恋人同士が最も多い。親子心中は子供の犠牲者の割合で見ると、バリとその近郊で45%⁸⁾、香港で35.7%⁹⁾、カナダのケベックで35%¹⁰⁾であるのが目立つ。アメリカでは父親が加害者であることが多く、40~60%の子供が父親に殺されているが⁶⁾ ¹¹⁾、逆にオーストラリア¹²⁾では約半数、香港では69.2%の加害者が母親である⁹⁾。動機に関してMarzukらは無理心中を二つのサブグループに分けて説

明している⁵⁾。一つは恋愛上の嫉妬のタイプで、加害者は通常若い男性であり、カップルの関係の破綻や男性の女性に対する時に妄想的とも言える不貞の疑いが動機であり、無理心中に先立ち言葉や身体的な暴力が見られ、女性の拒絶や別れるという脅しが引き金となるもの。もう一つは健康状態悪化のタイプで、加害者は病身の妻の面倒をみている高齢男性であり、一方、あるいはどちらも健康を損なっている、というものである。海外の文献では前者が多く、アメリカでは無理心中の50~75%を占める⁵⁾。後者は被害者を「憐れんで」殺害するという側面から、mercy killingと呼ばれることもある。前者の加害者の平均年齢は40歳前後であり、殺人の加害者よりも平均年齢が高いとする研究が多い⁶⁾。動機は親子心中の場合、父親が加害者のときにはカップルの関係の破綻に子供を巻き込む場合が多く、拡大自殺とも表現される⁵⁾。経済問題は動機としてあまり多くはなく、香港⁹⁾で25%と多いほかはバリ⁸⁾の5.4%、英国のヨークシャー、ハンバーサイド¹³⁾では11%を示す程度であるが、高齢者では不健康と並んで重要な動機であるとする文献も見られる¹⁴⁾。精神疾患の関与は、ニューメキシコ州アルバカーキで1978年から1987年の間に起こった12件の無理心中の死亡者の家族、友人、親類にインタビューを行ったRosenbaumの研究では、無理心中の加害者の75%がDiagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Revised Third Edition (DSM-III-R) 診断基準¹⁵⁾のうつ病性障害に一致した¹⁶⁾。同じ研究では、無理心中の犠牲者では精神疾患は見られなかった。また、24件の殺人事件のカップルと比較すると、殺人事件の加害者、被害者とも無理心中のカップルに比べて人格障害(特に反社会性)、アルコール依存、薬物乱用と診断される者が多かった。このため殺人事件の加害者、被害者は犯罪歴があるものが多く、社会経済的地位も低いのが特徴であった。アメリカで無理心中の加害の手段として最も多いのは銃である。Marzukらは1966年以降の文献を調査し、無理心中に銃が使われたのは80~90%であると述べており⁵⁾、アメリカにおける銃の入手の容易さが加害の手段に反映されていると考えられる。他の国々でも銃の入手が容易であるところでは射殺が多く、逆に銃の規制が厳しい香港では56例のうちわずか1例しかなかった⁹⁾。加害者の自殺の手段は銃の入手が容易な国々では殺人と同様に銃であるが、香港では高所からの飛び降りが最も多く、48%であった⁹⁾。

4. 日本での無理心中の特徴

警察白書や警視庁統計書などには心中という分類がな

いことから、わが国における近年の無理心中に関する情報を入手するのは困難である。それは、心中が殺人と自殺に分けられるためと考えられる。このため、心中という分類が存在した頃の古い文献を見ると、心中の全ての自殺に占める割合は、1993年の警察庁資料では全自殺の1.6%である。また、心中発生率は1970年頃の警視庁統計書では人口10万あたり0.3前後である¹⁷⁾。恋人どうしの異性心中は戦後の混乱期には少なかったものの、1950年代にはすべての心中の半数前後を占め、大原によれば1954年のわが国での「複数自殺」のうち58%が異性心中であり、母子心中はわずか18%にすぎない¹⁸⁾。ところが異性心中は1960年代に入ると激減し、以後は母子心中がすべての心中の半数以上を占めるようになる¹⁷⁾。1970年から1984年までの15年間に地方紙に掲載された心中事例を調査した研究によれば、すべての心中に対する母子心中の割合は、青森県で67%、全国で50.4%であった¹⁹⁾。また警察との協力で行われた作田の報告では、加害者の48%が母親であった²⁰⁾。

5. 海外文献との比較

1970年頃の警視庁統計書では心中率は0.3前後であり、アメリカの0.2~0.3と似ており、無理心中率は先進国の間ではどこもほぼ同一であるという海外文献の記載⁹⁾とも一致している。また、本研究では無理心中の加害者の平均年齢(42.2歳)の方が殺人の加害者の平均年齢(38.0歳)よりも高く、この点も無理心中の加害者の平均年齢の方が殺人の加害者の平均年齢よりも高いという海外文献の記載と一致している⁶⁾。一方、海外との大きな違いは、まず海外では配偶者や恋人の間の無理心中が最も多いのに対し、わが国では母子心中が最も多いことである。ヨークシャーやハンバーサイド¹³⁾ ²¹⁾では74%の被害者が配偶者あるいは恋人であるのに対し、本研究では配偶者、恋人である被害者は内縁を合わせても41%である。また、本研究では件数で見ると母子心中が42%と最も多く、子供の被害者の割合では父子、一家心中まで含めると162人、53%の被害者が子供であるが、海外ではパリとその近郊⁹⁾は45%、シカゴ²²⁾は7.5%でしかない。母子心中が多いことは被害者の平均年齢にも影響しており、例えば香港⁹⁾では32.3歳であるのに対し、本研究では22.5歳と非常に若い。このようにわが国で母子心中が多い理由は、わが国では母子心中に対する市民の反応は概して批判的ではなくむしろ同情的であるためと考えられる。一方、海外で関係の破綻により配偶者、恋人が被害者になることが多い理由は、男性の女性に対する性的独占、支配欲が強いことによると

されている⁹⁾。また、無理心中の加害者の性別は海外では男性が80~90%であるのに対し、本研究では女性が59%と過半数であることも相違点であるが、これもわが国において母子心中が多いことの反映であろう。一方、無理心中の被害者は海外では女性が70~85%であるのに対し本研究では女性が59%で、海外に比べ女性の割合が少ない。これは、被害者の46%を占める10歳未満の子供では男性、女性ともほぼ同数であるためと考えられる。10歳未満の子供の被害者で男性と女性の違いが少ないのは、小さい子供であれば男児であっても母親による殺害が容易であるためと考えられる。一家心中に関しては、Marzuk⁵⁾は「典型的には、うつ状態で、妄想的な高齢の男性が、妻、子供、時にはペットまで殺し、加害者は自分が家族を救う愛他主義者であると考えている」「他に、身体的、精神的に無能力である成人の扶養している子供を配偶者とともに殺すものがある」と述べている。しかし本研究では13件の一家心中のうち5件の加害者が30歳代の男性であり、高齢ではなくむしろ働き盛りの父親であった。また、判明している動機としては経済問題が最も多かった。この違いの理由としては、第一に一家心中の概念が海外と我が国とで異なっていると考えられること、核家族化が進み、高齢者が一家心中の加害者になりえないこと、子供の病気が動機の場合、母子心中が選ばれることが多いためと考えられる。配偶者間の無理心中の動機は我が国では病気、経済問題が多く、恋愛上の嫉妬のタイプが50~75%を占めるアメリカ⁹⁾とは大きく異なっている。

6. 母子心中のハイリスク

母子心中では表3、表4のように加害者は30歳代前半の母親が多く、被害者は1歳未満の子供が多い。被害者の人数は110例のうち96例が1人であった。

7. 加害の手段および年代による変遷

加害の手段は絞頸が最も多いが(表7、8)、同じ窒息的手段の中でも扼頸は少なく、直接徒手的に窒息させることには心理的に抵抗があるためと考えられる。銃の規制が厳しい香港でも絞頸を始めとする窒息的手段が26%と最も多く⁹⁾、銃を用いることが出来ない国では絞頸が最も多く用いられる手段であると考えられる。また、母子心中では一酸化炭素中毒など暴力的でない手段が選ばれることが多い。合意のある心中では睡眠薬中毒、一酸化炭素中毒の順に多く、母子心中と同様に暴力的な手段は少なかった。絞頸は索状物の入手が容易なためどの年代にも見られるが、一酸化炭素中毒は都市ガスに一酸

化炭素が含まれなくなったことにより、また薬物中毒は手段として最も多い睡眠薬で比較的安全なベンゾジアゼピン系が開発され、バルビツール系の処方激減したことにより、近年では全く見られなくなっている(表9)。また、殺人では刃器による刺殺が最も多く、次いで絞頸、扼頸などの窒息的な手段、撲殺の順であり、暴力的な手段が多かった。

8. アルコールとの関係

殺人の方が無理心中に比べ酩酊状態(血中アルコール濃度が1 mg/ml以上)にある被害者が約5倍(15%対3%)も多かった。このことから殺人ではアルコールによる暴力的な衝動に対する抑制の欠如が犯行の主要な動機となっているが、無理心中ではアルコールの影響はあまり関係ないと言える。

9. 心中 (suicide pact) について

本研究では、わが国で特徴的とされてきた異性心中、love suicide pactは22例しか見られず、他の文献の事例も合意の有無や手段を厳密に評価すると従来 love suicide pactとされてきた事例の多くが実際は無理心中であったと考えられる。異性どうしの無理心中は16例、6%しか見られず、作田²⁰⁾の研究の7%とはほぼ一致している。1960年代以降異性心中が減少しているのは¹⁷⁾、その大きな動機であった恋愛や結婚に関する制限が緩くなり、自由になったためと考えられる。一方、海外では心中を「二人が同時に、通常は同じ場所で自殺する相互の試み」とごく簡単に定義しており²¹⁾、その頻度は400件の既遂の自殺に1件の割合であると言われており、非常に稀である²⁴⁾。また心中者は一般に50歳以上の夫婦であり、心中を提案するのは自己破壊的な行為の既往のあるうつ状態の男性で、青年のケースは更に稀であるとされている²⁴⁾。このため、若いカップルが恋の悩みから「心中」することが文学や演劇にも描かれたというわが国の歴史的背景が海外の研究者に異性心中が日本に特徴的であると考えさせたのであろう。また、Westは心中を二種類のグループに分類している²⁵⁾。即ち、二人が自殺を決意し、その後各々が自殺するものと、一方が相手にまず自分を殺すことを頼む、あるいは命令し、その後相手が自殺するものである。前者がより一般的であり、後者は一方が身体的な障害から自殺することが困難な場合に見られるとされている。しかし、後者は法医学的には無理心中と考えられる。一方、心中とされるケースにおいても心中の発案者から相手に対し一緒に自殺するよう圧力がかかっていることも多いとされており²⁶⁾、相互

の意志が同等とは言えないことも多いと考えられる。

10. 今後の防止策

無理心中の防止については、わが国ではその4割以上を占める母子心中の防止が重要である。母子心中の背景としてまず母親の孤立が考えられ、このため看護の側からは看護師、助産師、保健師による3ヶ月までの育児の訪問指導が提案されている²⁷⁾²⁸⁾。これにより母親の孤立が防がれるだけでなく、産褥期精神障害のような精神病が早期に発見される効果が期待される。今日のように核家族化のため容易に肉親の支援を期待できない状況では、このような血縁以外の支援が必要となるであろう。また、心中に限らず自殺一般に言えることは、過去の自殺やうつの既往、喪失体験などは重要な警告指標である。家族やかかりつけ医がこれらに注意して早期にうつを発見し、専門的な治療につなげることも重要な防止策である。さらに家族の死を目の当たりにした子供がPTSDとなることも十分考えられる。今後はサバイバーの人生の再建についての研究もなされねばならないであろう¹⁰⁾。

総括

慶應義塾大学医学部法医学教室で1945年9月から2003年12月までに行われた司法解剖事例の中から無理心中および合意のある心中の事例を調査し、その特徴について検討し、海外文献との比較を行った。その結果、

1. 無理心中の中では母子心中が多いのに対し、海外では配偶者、恋人の間での無理心中が多い。
2. 母子心中の動機は育児ノイローゼが最も多く、海外での配偶者、恋人の間での無理心中の動機は関係の破綻が多い。
3. 無理心中の手段は絞頸が最も多く、海外では銃が最も多い。合意のある心中では一酸化炭素中毒や薬物中毒など暴力的でない手段が用いられることが多い。
4. わが国に特徴的とされてきた恋人どうしの合意のある心中は実際は少なく、特に1960年代以降はほとんど見られない。
5. 無理心中を定義する上で殺人と自殺の間隔を議論することに意味はなく、解剖記録等を参照し加害者が被害者を殺害した後に自殺する意志を持っていたかどうかで判断するべきである。

稿を終えるにあたり御指導を賜りました慶應義塾大学医学部精神神経科学教室、鹿島晴雄教授に深甚なる謝意を表します。また、多大なる御支援と御助言を頂きました。

た北里大学医学部法医学教室、栗原克由教授に深謝致します。ならびに症例検討に御協力頂きました慶應義塾大学医学部法医学教室、北里大学医学部法医学教室の教職員および大学院生の方々に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 小峰茂之：情死に対する医学的考察。財団法人小峰研究所紀要第6巻，1938
- 2) David A. Fishbain, M. D., and Tim E. Aldrich, Ph. D. : Suicide Pacts, International Comparisons. J Clin Psychiatry 46 : 11-15, 1985
- 3) Fuse T : Some characteristics of suicide in Japan. Psychiatr J Univ Ottawa 5 : 89-94, 1980
- 4) Martin Brown, Elizabeth King and Brian Barraclough : Nine Suicide Pacts. A Clinical Study of a Consecutive Series 1974-93. British Journal of Psychiatry 167 : 448-454, 1995
- 5) Peter M. Marzuk, M. D., Kenneth Tardiff, M. D., MPH., and Charles S. Hirsch, M. D. : The Epidemiology of Murder-Suicide. JAMA 267 : 3179-3183, 1992
- 6) Palmer S, and Humphrey JA : Offender-victim relationships in criminal homicide followed by offender's suicide, North Calolina, 1972-1977. Suicide Life Threat Behav 10 : 106-118, 1980
- 7) Allen NH : Homicide followed by suicide, Los Angeles, 1970-1979. Suicide Life Threat Behav 13 : 155-165, 1983
- 8) D. Lecomte, M. D. and P. Fornis, M. D., Ph. D. : Homicide followed by suicide. Paris and its suburbs, 1991-1996. J Forensic Med 43 : 760-764, 1998
- 9) Y. Chan, S. L. Beh, and R. G. Broadhurst : Homicide-suicide in Hong Kong, 1989-1998. Forensic Science International 140 : 261-267, 2004
- 10) J. Buteau, A. Lesage, and M. Kiely : Homicide followed by suicide. a Quebec case series, 1988-1990. Can. J. Psychiatry 38 : 552-556, 1993
- 11) C. M. Milroy : The epidemiology of homicide-suicide (dyadic death). Forensic Science International 71 : 117-122, 1995
- 12) R. W. Byard, D. Knight, R. A. James, and J. Gilbert : Murder-suicide involving children, a 29-year study. Am. J. Forensic Med. Pathol 20 : 323-327, 1999
- 13) C. M. Milroy : Reasons for homicide and suicide in episodes of dyadic death in Yorkshire and Humberside. Med. Sci. Law 35 : 213-217, 1995
- 14) C. M. Milroy, M. D., Magdalene Dratsas, and D. L. Ranson : Homicide-Suicide in Victoria, Australia. Am. J. Forensic Med. Pathol 18 : 369-373, 1997
- 15) Committee on Nomenclature and Statistics, American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Revised Third Edition. Washington, DC : American Psychiatric Association ; 1987.
- 16) Milton Rosenbaum, M. D. : The Role of Depression in Couples Involved in Murder-Suicide and Homicide. Am J Psychiatry 147 : 1036-1039, 1990
- 17) 稲村博：わが国における心中の最近の傾向および危険の予測と対策。精神科診断学 4 : 173-184, 1993
- 18) K. Ohara, M. D. : Characteristics of suicides in Japan, especially of parents-child double suicide. Am J Psychiatry 120 : 382-385, 1963
- 19) 品川信良, 野村雪光, 平岡友良, 北林静子, 奈良月光, 大坂弥生：産科および母子医療担当者の立場から「母子心中」を考える。日本医事新報 3250 : 31-34, 1986
- 20) T. Sakuta : A Study of Murder Followed by Suicide. Med Law 14 : 141-153, 1995
- 21) C. M. Milroy : Homicide Followed by Suicide (Dyadic Death) in Yorkshire and Humberside. Med. Sci. Law 33 : 167-171, 1993
- 22) S. Stack : Homicide followed by suicide, an analysis of Chicago data. Criminology 35 : 435-454, 1997
- 23) Robert Milin, M. D., and Atilla Turgay, M.D. : Adolescent Couple Suicide, Literature Review. Can. J. Psychiatry 35 : 183-186, 1990
- 24) Noyes R, Freye S, and Hartford CE : Conjugal suicide pact. J Nerv Ment Dis 165 : 72-75, 1977
- 25) West DJ : Murder Followed by Suicide. Cambridge, Mass : Harvard University Press ; 1967
- 26) Rosenbaum M : Crime and punishment-the suicide pact. Arch Gen Psychiatry 40 : 979-982, 1983
- 27) 芹沢茂登子：電話相談から見た親子関係。周産期医学 13 : 2258-2261, 1983
- 28) 佐藤 裕：わが国の自殺に関する研究 (III) 親子心中の実態。聖路加看護大学紀要 6 : 1-11, 1979

第10回慶應医学賞授賞式・受賞記念講演会・受賞記念シンポジウム

◇授賞式・受賞記念講演会

日時 平成17年12月6日(木)16時30分～18時

場所 慶應義塾大学信濃町キャンパス(医学部)
北里記念医学図書館2階北里講堂

◇受賞記念シンポジウム

「かたちのちからー構造生物学は医学に何をもたらすか？」

日時 平成17年12月7日(金)13時～

場所 慶應義塾大学信濃町キャンパス(医学部)
病院新棟11階大会議室

座長 末松 誠, 岡野 栄之, 柚崎 通介(慶應義塾大学医学部)

13:05～「NMRを用いた, 膜タンパク質・リガンド相互作用解析」
嶋田 一夫(東京大学大学院薬学系研究科)

13:45～「蛋白質立体構造データベースの国際化・高度化とその応用」
中村 春木(大阪大学蛋白質研究所)

14:25～「変異体を用いたウシチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の研究」
下方 国稔(慶應義塾大学医学部医化学)

15:00～「ドライアイとアクアポリン」
後藤 英樹(慶應義塾大学医学部眼科学)

15:20～「神経伝達物質輸送の構造基盤: Na⁺/Cl⁻依存性神経伝達物質トランスポーターの細菌由来
ホモログの結晶構造」
山下 敦子(理化学研究所播磨研究所)

16:00～「膜タンパク質 X 線結晶構造解析の将来」
岩田 想(インペリアルカレッジロンドン)

16:40～「アクアポリン水チャンネルと病気」
佐々木 成(東京医科歯科大学大学病院医歯学総合研究所)

17:35～「構造生理学の登場とその展望」
藤吉 好則(京都大学大学院理学研究科)
第10回慶應医学賞受賞者

構造生理学の現状と展望

京都大学大学院理学研究科 藤吉 好則

はじめに

生理学はここで改めて確認する必要はないであろうが、Physiology のラテン語の意味として、*physis* = Nature, *logos* = word と言う意味を内包している。それゆえ、構造生理学という言葉は、「分子構造レベルから生命を論理的に理解する学問」という気持ちで、勝手に使い始めた造語である。この構造生理学が実質的な意味を持つようになってきたのは、R. マッキノンによるところが大きい。彼は、2003年に水チャネルの発見とその構造と機能の解明でノーベル化学賞を受賞したP. アグレ博士と共にノーベル賞を受賞したのみならず、生理学の分野を大きく変えつつあると思う。

私どもは、試料を低温に冷却することによって電子線損傷を最少に押さえることができる極低温電子顕微鏡等の構造研究システムを開発してきた^{1) 2)}。これは、神経細胞の情報伝達や制御に関する分子の基礎原理を理解すること、そして将来的には記憶や意識、個性等を分子レベルで理解することを目指した技術や手法の開発を目指している。電子線結晶学は、これらの研究で鍵となる膜蛋白質の構造を膜に存在する状態で解析する事ができる。さらに、結晶性の試料でなくても立体構造の情報を得ることができるので、生理学を構造学的な視点から研究し、理解するには有力な手法であると思っている。

近年、極低温電子顕微鏡を用いた膜蛋白質の構造研究はそれなりに進んできた。典型的な例として、図1に水チャネルの構造を示すが、この解析で、このチャネルが1秒間に20

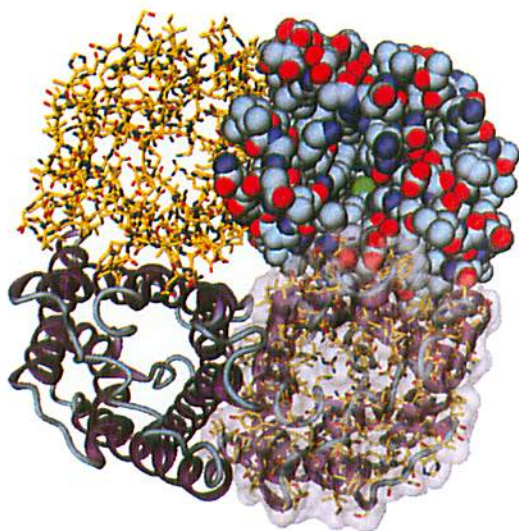


図1 電子線結晶学で解析された水チャネルの4量体の構造

億分子もの水を高速で透過しながら、いかなるイオンもプロトンさえも透過しない高い選択性を示す機構が解明された³⁾。また、アセチルコリン受容体の構造解析によって、神経筋接合部で行われる情報伝達の機構の1部分、アセチルコリンによって、このイオンチャネルが開閉される分子機構が解明された⁴⁾。

水チャネルの構造と機能

水の選択的膜透過はイオンチャネルの機能発現のための基礎となっている。1992年にヒト赤血球から水チャネルが発見されて⁵⁾以来、ヒトでも13種類の水チャネルが知られる様になった。これらの内、AQP4はAQP1と同様、水のみを透過する水チャネルである。この水チャネルは、脳に発現しており、脳浮腫などに関与する重要な分子である。さらに重要な事に、未知の脳機能と関わっている可能性がある。実際、脳内毛細血管を取り巻いている星状膠細胞の終末足には、アレイ構造 (orthogonal array) という特殊な結晶状格子が見られるが、この結晶性アレイは水チャネルAQP4が周期的に配列したものであることが分かっている。また、浸透圧や、グルコースおよび温度センサーの機能を担うと考えられている視床下部のグリア細胞層にも、多くのAQP4が発現している。我々は、AQP4の2次元結晶と極低温電子顕微鏡を用いて、AQP4の立体構造を3.2Å分解能で解明した⁶⁾。この2次元結晶は、二層の膜からなる特殊な結晶で、しかも、二層の相互作用が弱いために、2枚の結晶のずれが生じたものが30%程度も存在する。このずれた結晶を解析から除くために、同じ結晶から、電子線回折像と電子顕微鏡像を撮影する必要があった。独自に開発した極低温電子顕微鏡と新たに開発した試料作製法を用いることによって、この様な困難なデータ収集にも成功した。この構造から2次元結晶の分子のパッキングは、終末足で見られる格子状構造のものと同じであることを示唆する結果が得られ、そのアレイ構造の大きさを制御する機構のモデルも得られた。さらに、結晶の二層間の特異的な相互作用から、グリア細胞層で発現するAQP4が接着分子として機能していることが新たに示唆された。

おわりに

上記の様な構造研究が進んでも、脳組織や神経細胞の研究と構造生物学研究の間をうめる上で必須な、高次細胞機能構造体を分子レベルで議論できる立体的な構造観察技術は欠落していると思われる。また、これら神経細胞の機能は、細胞の動的な形態変化と密接に結びついているので、細胞の動的な形態変化を観察する新しい技術の開発が望まれている。それゆえ、細胞や組織の構造を分子レベルで議論できる極低温電子顕微鏡を用いた高分解能の立体構造観察法が、電子線トモグラフィーの発展と共に重要になってきている。そのために、傾斜機構を持った極低温電子顕微鏡を新たに開発している。今後も構造生理学とも言えるであろう研究分野に少しでも貢献したいと願っている。

文 献

- 1) Y. Fujiyoshi et al. ; *Ultramicroscopy* **38**, 241-251 (1991)
- 2) Y. Fujiyoshi ; *Adv. Biophys.* **35**, 25-80 (1998)
- 3) K. Murata et al. ; *Nature* **407**, 599-605 (2000)
- 4) A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, N. Unwin ; *Nature* **423**, 949-955 (2003)
- 5) G. M. Preston, T. P. Carrol, W. B. Guggino, P. Agre ; *Science* **256**, 385-387 (1992)
- 6) Y. Hiroaki et al. ; *J. Mol. Biol.* in the press

NMR を用いた、膜タンパク質・リガンド相互作用解析

東京大学大学院薬学系研究科 嶋田 一夫

ゲノム情報は直接の産物である蛋白質として具現することにより初めて生体内で目的とする機能を発現することができる。ゲノム情報を役立てるためには、タンパク質がどのような機構で機能を発揮しているかを明らかにすること、すなわちタンパク質及びそれらと相互作用する生体高分子の相互作用を詳細に解明することが重要である。

特に、シグナル伝達、細胞内へのイオン、物質透過、エネルギー変換、および細胞接着など生体内で重要な働きを担っている膜タンパク質とリガンドとの相互作用を解明することは、その機能を考える上で、またタンパク質の立体構造もとに薬物のデザインをする上でも、重要である。

構造生物学的手法の一つである核磁気共鳴法 (NMR) は、タンパク質や核酸など生体高分子の立体構造や相互作用様式に関する情報を静的、動的な観点から提供する、ユニークな分光法である。しかしながら、NMR で立体構造を求めることができるタンパク質は、対象タンパク質の分子量がおおよそ 40 K 以下のものに制限されている。これは、高分子量タンパク質になると NMR シグナルの線幅が著しく増大し、詳細な解析、が著しく困難になることに起因する。

一方、界面活性剤によって可溶化された膜タンパク質およびそのリガンドとの複合体は、NMR 測定限界分子量をはるかに超える場合が多く存在する。したがって、NMR を用いて膜タンパク質・リガンド相互作用に応用するためには、測定法の開発が必須である。さらに、構造生物学的研究が可能な程度に大量かつよく精製された膜タンパク質を得ることは極めて困難な問題である。さらに、もし仮に膜蛋白試料が大量に得られたとしても、経時変化を経て不可逆的に集合体をとることも多い。したがって、NMR 測定に適した試料調製法の開発も行わなくてはならない。

本発表では、ここ数年間、我々がやってきた、膜タンパク質・リガンド相互作用解析のための NMR 測定法および NMR 試料調製法に関して説明すると同時に、その応用例を紹介する。

蛋白質立体構造データベースの国際化・高度化とその応用

大阪大学蛋白質研究所 中村 春木

国際的な構造生物学の進展と成熟によって、多くの蛋白質の立体構造が従来に比べて迅速に決定される時代を迎えつつある。PDB (Protein Data Bank) では、1970 年代からこれらに蛋白質の立体構造データを収集してデータベースとして維持・管理し、2005 年 11 月の時点では 33,000 件を超える構造データを無料で全世界に公開している。大阪大学蛋白質研究所では、科学技術振興機構バイオインフォマティクス推進センターの支援を受け、日本蛋白質構造データバンク (PDBj : Protein Data Bank japan) という組織を作り、米国構造バイオインフォマティクス共同機構 (RCSB) と欧州バイオインフォマティクス研究所 (MSD-EBI) と共同して、三極で wwPDB なる組織を創設し、国際協力により蛋白質立体構造データベースの登録・維持・管理を進めている [1]。アジア・オセアニア地区からの登録については、本 PDBj が担当しており、PDBj における登録処理件数は、平成 13 年 356 件、平成 14 年 648 件、平成 15 年 935 件、平成 16 年 1,586 件と急増しており、平成 16 年には世界の約 27% 以上を処理している。また、生体分子に対する NMR 実験データを集めた BMRB (BioMagResBank) のミラーサイトを開き、日本でのデータ登録作業も行っている。

PDBj では、様々なタグをつけた PDB データ記述の XML 化をラトガース大学と共同して行い、canonical な XML 記述として PDBML を確立した [2]。これによって、33,000 件を超える全ての PDBML データから validation エラーをなくすことができた。また、オリジナルの PDB データに多く欠損している分子機能や実験条件等の情報を文献から抽出して追加し、その数は現在 15,000 件を超えている。

このように集積してきた蛋白質構造情報から蛋白質機能を解読するため、我々は、蛋白質分子表面の形状とそこでの物理化学的特性に注目し、蛋白質分子認識機構の解析を行ってきた。講演では、情報科学・計算科学を用いた、蛋白質立体構造からその機能を解読する試みについて紹介する [3, 4]。

参考文献

- 1) H. Berman, K. Henrick, and H. Nakamura, *Nat. Struct. Biol.* **10**, 980 (2003).
- 2) J. Westbrook, N. Ito, H. Nakamura, K. Henrick, and H. Berman, *Bioinformatics* **21**, 988 (2005).
- 3) K. Kinoshita, H. Nakamura, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 396-400 (2003).
- 4) K. Kinoshita, H. Nakamura, *Protein Science* **12**, 1589-1595 (2003) ; *ibid.* **14**, 711-718 (2005).

変異体を用いたウシチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の研究

慶應義塾大学医学部医化学 下方 国穂

チトクロム酸化酵素は、呼吸鎖の末端酸化酵素として酸素分子を水に還元するとともにプロトン (H⁺) を膜の内側から外側にポンプする。さらに、酸素分子は、酸素還元部位で、

膜外側と内側からそれぞれ電子とH⁺とが供給されて、水に変換されることによって、内側が負の膜電位とH⁺濃度勾配が生じ、これらがATP合成を駆動する。このように、チトクロム酸化酵素によるH⁺ポンプは、細胞エネルギー変換の最も重要な過程の一つであり、その分子機構の解明が待たれている。

ウシ心筋酵素のX線構造解析(1, 2)によって、膜外側に面した分子表面に近いアスパラギン酸残基(Asp51)と膜内側分子表面とは、効率のよいH⁺輸送経路になり得ることが知られている水素結合のネットワークとこれに膜内側の水を接触させ得る空隙(水経路)とによって(H pathwayと呼ぶ)、繋がっていることが明らかにされている。Asp51は、近傍に存在するヘムの一つ(ヘムa)が還元されると疎水性の分子内部から分子表面に移動するため、そのH⁺親和性が大きく低下する。これらの構造知見はAsp51が、ヘムaが酸化型のとき膜内側のH⁺を取り込み、還元されるとH⁺を膜外側に放出することを示唆している。しかし、これらはX線構造にもとづく予測に過ぎないし、このH⁺ポンプの中心として機能するAsp51が全ての生物種に保存されていないため、H pathwayがH⁺ポンプ機能をもつことに疑問を持つ研究者が少なくない。

そこで本研究では細菌に保存されていないアミノ酸残基も含まれるウシ心筋酵素のH pathwayの機能を検証するために、ウシ酵素の機能発現系を開発した(2)。H pathwayを担うウシサブユニットI遺伝子(ミトコンドリアDNAにコードされている)を強力なプロモーターの支配下に置きHeLa細胞の核に組み込ませ、発現する蛋白質を細胞質からミトコンドリアに移行させる。この移行のために、ウシ酵素の核由来サブユニットの延長ペプチド(輸送シグナル配列)をウシサブユニットIのN末端に延長ペプチドとして連結した。ウシサブユニットIは他のヒトサブユニットと会合し、ウシヒト雑種酵素をドミナントに形成する。得られた野生型の雑種酵素は、ヒト酵素に等しい酵素機能と吸収スペクトルを示していた。したがって、ウシサブユニットIはその固有の立体構造を雑種酵素中で形成していると考えられる。そこで、H pathwayのH⁺ポンプ部位(Asp51)、水素結合ネットワーク、そして水経路のそれぞれの部位に、それぞれの機能を妨害すると推定出来るアミノ酸を導入した。それら変異体は、正常に酸素を還元したが、H⁺ポンプ機能を失っていた。変異体解析は、H pathwayがH⁺ポンプ経路であることを強く示唆している。

- 1) Yoshikawa S., et al., *Science* 280, 1723-1729 (1998)
- 2) Tsukihara T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15304-15309 (2003)

ドライアイとアクアポリン

慶應義塾大学医学部眼科学 後藤 英樹

ドライアイ症候群は“涙液分泌の減少または涙液の過剰な蒸発による涙液疾患であり、眼表面上皮障害、視機能障害、

および眼不快感の症状を引き起こす。”と定義されており、涙液異常(シルマーテストによる分泌機能、または涙液層破壊時間測定による安定性評価)および角結膜障害の生体染色による評価により診断されている。ドライアイ症候群は様々な疾患に合併するが、その代表がシェーグレン症候群である。シェーグレン症候群は原因不明の自己免疫疾患であり、ドライアイ、ドライマウスなどを引き起こす。

近年ドライアイの診断及び治療に関しては大きな進展がみられている。いままでは点眼による水分の補充が治療の中心であったが、近年、涙液の鼻腔への排出口である涙点の閉鎖手術の成功率が高まり、また涙液の蒸発を制御している涙液最表層の油層の再建も可能となってきた。

しかし依然として、涙液分泌そのものを増加させる治療手段は乏しく、涙液分泌コントロールが将来有望な治療手段になる可能性がある。このような背景のもと、我々は、水チャネルであるアクアポリンがドライアイに関連しているのではないかと注目した。今回の発表では、シェーグレン症候群患者涙腺におけるアクアポリン5(AQP5)の発現および局在の検討、シェーグレン症候群モデルマウスを用いたAQP5の局在異常の検討、アフリカツメガエル卵母細胞を用いたAQP5ゲーティング機構の検討について述べる。

神経伝達物質輸送の構造基盤：Na⁺/Cl⁻依存性神経伝達物質トランスポーターの細菌由来ホモログの結晶構造

理化学研究所播磨研究所 山下 敦子

脳神経系は、生命活動をする上で情報の受理、処理、統合そして伝達の役割を果たしているきわめて重要な器官であり、そのシステム全体の理解とともに個々の素過程に対する理解、それらを担うタンパク質の機能への理解も求められている。Na⁺/Cl⁻依存性神経伝達物質トランスポーター(NSS)は、中枢神経系に存在し神経伝達の制御に関わるトランスポーターである。これらは細胞の内外に存在するNa⁺イオンとCl⁻イオンの電気化学勾配を利用して、ドーパミン、セロトニン、ノルエピネフリン、γアミノ酪酸、グリシンなどの主要な神経伝達物質を細胞内にとりこむことにより、神経細胞間のシグナル伝達を終焉させ次の信号の到達に備える役割を担っている。NSSファミリーは、その機能不全がうつ病、パーキンソン病、注意欠陥・多動性障害など様々な精神疾患の原因となり、それらの治療薬(抗うつ剤など)や麻薬・覚醒剤(コカインなど)の標的分子でもあることから、医学的・薬理学的にも重要な研究対象である。しかしながらこれらのトランスポーターは構造解析が困難な膜タンパク質であるため、これまで立体構造情報が全く得られておらず、その機能を担うメカニズムへの理解が進んでいなかった。我々はNSSの相同タンパク質が原核生物にも存在することに着目し、これらをクローニングしてX線結晶構造解析を行った結果、高度好熱菌 *Aquifex aeolius* 由来のNSS相同トランスポーターLeuT₁の結晶構造を1.65 Å分解能で明らかにすることができた。LeuT₁の構造は12の膜貫通部位から成り立って

おり、これまでに報告されたとの膜タンパク質の構造とも似ていないものであった。さらに解析したトランスポーター分子の中央付近に、輸送基質であるトロイシと共輸送イオンである Na^+ イオンが結合しているのが観察され、その部分がこれらの結合部位であることが判明した。LeuT_{As} 分子には α ヘリックスが中央付近で中断されほどけた構造を持つ膜貫通部位が 2 か所存在しており、基質や Na^+ イオンはちょうどこのほどけた構造の近傍に結合していて、主鎖を構成する原子や α ヘリックスのダイポール・モーメントなど LeuT_{As} の骨格そのものをこれらの分子の結合に利用する巧妙な設計になっていた。また、それら結合部位の構造を含めた分子全体の立体構造は、トランスポーター分子がどのようにして基質やイオンの特異性を決定しているか、そしてどのようにして構造変化をおこして基質やイオンを輸送しているかについて説明を与えてくれるものであった。これらの基本的な骨格構造や輸送のメカニズムは実際に中枢神経系で働く NSS のものと共通と考えられることから、LeuT_{As} の構造は NSS の機能の理解への大きな手がかりとなり、さらには精神疾患の原因解明や治療薬の開発・改良のための重要な情報となることが期待できる。

膜タンパク質 X 線結晶構造解析の将来

インペリアルカレッジロンドン 岩田 想

膜蛋白質が初めて構造解析されてから 20 年が経とうとしている。この間に各種の技術開発がおこなわれ 90 種類程度の膜蛋白質の構造が解かれてきた。しかしながら高等生物の蛋白質の 1/3 程度は膜蛋白質であり、3 万個以上の構造がプロテインデータバンクにおさめられている可溶性の蛋白質に比べるとその数はあまりに少ない。創薬等の鍵となる膜蛋白質構造解析の現状の問題点を指摘すると共に、どのような技術開発が今後の発展の為に必要とされているかについて実際の構造解析の例を示しながら議論する。

アクアポリン水チャネルと病気

東京医科歯科大学大学院腎臓内科学 佐々木 成

アクアポリンは水を選択的に通過させる膜蛋白であり、浸透圧勾配に従っての細胞内外への水の受動的輸送に働いているチャネルである。細菌から哺乳類まで普遍的に存在しており多くの種類が知られている。哺乳類では 13 種見つかっており (AQP0 から AQP12)、全身に分布しており種類ごとに細胞・臓器発現部位に特徴が認められる。そのいくつかは水のみならず、グリセリンのような小物質、さらに CO_2 ガスや Cl^- イオンなども通過させ、また細胞接着にも働いていることが報告されているが、その生理的意義には不明な点も多い。

アクアポリンの体内での役割は遺伝子改変マウスの表現型と遺伝子変異を有するヒトの症状・病態から検討されてきている。ノックアウトマウスの結果は、存在部位での水透過性の減少が認められ、アクアポリンが水チャネルとして働いていることを証明するものであった。また腎臓と脂肪細胞ではグリセリンチャネルとして働くことも明らかになった。さらには皮膚や脳で大切な役割を担っていることも示されてきている。一方、ヒトにおいては、AQP0, 1, 2, 3, 7 における遺伝子変異の存在が知られているが、はっきりとした症状を示したのは AQP0 と AQP2 であった。AQP0 では白内障になり、AQP2 では腎性尿崩症という尿の濃縮力障害を示す病気になる。特に AQP2 の変異による腎性尿崩症はアクアポリンの水チャネルとしての働きを、そして腎集合管での AQP2 を介する水輸送が尿濃縮に必須であることを証明したものである。また AQP5 の後天的な異常によりシーエグレン症候群という眼と口の乾燥症が起こることも報告されている。

AQP2 の遺伝子変異と臨床病型の対応から AQP2 の細胞内動態に関する多くの示唆が得られており、調節系、調節蛋白などが次第に明らかになってきている。本講演ではアクアポリンの生体内での役割とその破綻からおこる疾患 (アクアポリン病) の現状について自験データを中心にまとめてみたい。

学会展望

第 11 回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会

日 時 平成 17 年 7 月 23 日 (土) 14 時～17 時 30 分

場 所 慶應義塾大学 別館 第二会議室

主 催 慶應義塾大学医学部形成外科学教室同窓会

事務局 慶應義塾大学医学部形成外科学教室内

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

14 : 00～14 : 40 症例報告 座 長 佐藤 博子

14 : 40～15 : 20 特別講演 I 「医療情報をめぐる最近の話題」 座 長 緒方 寿夫

15 : 20～15 : 30 -休憩-

15 : 30～16 : 10 特別講演 I 「戦前の日本における医学・歯学の発達」 座 長 金子 剛

16 : 10～16 : 50 治療法 座 長 高野 淳治

16 : 50～17 : 30 治療体系 座 長 曾根 清昭

14:00~14:40 症例報告

座長：独立行政法人国立病院機構東京医療センター
形成外科 佐藤博子

1. 自己注射により両側上腕皮膚に石灰化を認めた 1 例

埼玉社会保険病院形成外科

高野淳治

慶應義塾大学形成外科

服部典子

症例は、78 歳男性、不眠のため約 30 年前から数年間、塩酸ジフェンヒドラミン・臭化カルシウム（レスタミンカルシウム）を両側上腕部に自己注射していた。平成 16 年 1 月頃、左上腕の硬結に搔痒感が出現、膿瘍を形成し潰瘍となった。近医にて、数回のデブリードマンを受けるも症状が改善しないため、当院を紹介され受診した。初診時、左上腕部に石灰化をとともなう潰瘍を認めた。X 線写真上、びまん性に不整な石灰化像を認めた。血液検査では、血清カルシウム、リンとも正常であった。当院転院後、局所麻酔下に潰瘍部のデブリードマンを施行するも、潰瘍の再発を繰り返した。治療に難渋した上腕の皮膚石灰沈着症の 1 例を経験したので若干の文献的考察を加えて報告する。

（質疑応答）

Q 中島：抗癌剤の点滴もれにおける原則ではすぐに創を縫合せず、1~2 週間おいてから縫合を行う。今回の治療でもその原則を守るべきではなかったか。

A 高野：回顧的に考えるとそのように思う。

Q 金子：dystrophic とはどういう意味か。

A 高野：循環障害を呈して局所の栄養が不良になることである。

Q 井上：カルシウムを含まない注射液でも起こりうるか。

A 高野：起こりうる事が報告されている。

2. Lipoinjection による豊胸術後に生じた重篤な乳房膿瘍の 2 例

杏林大学形成外科・美容外科

三鍋俊春、波利井清紀

同乳腺外科

福島久喜、松田実、木川田弥生

大腿部または下腹部から採取した脂肪の胸部への注入は、一見痩身と豊胸の一挙両得的である。しかし、極めて重篤な膿瘍を発症して乳腺外来に紹介されてきた 2 症例を経験したため、警告の意味を込めて症例報告する。症例 1、32 歳、既婚女性。婚前の 8 年 6 か月前に都内の某美容外科医にて大腿部から吸引採取した脂肪を豊胸目的に両側乳房に注入した。2 か月前より右乳房に炎症・腫脹が生じ、ついに外側上方皮膚が穿破して排膿を認め当院紹介となった。初診時、右乳房の腫大と疼痛が著明で右上肢が挙上不能であった。MRI 上

両側乳房下に膿瘍像、マンモグラフィーでは石灰化を伴う円形腫瘤像を呈し、培養では MSSA を検出した。内部隔壁と疼痛のため局所処置が困難で 3 か月間の保存的治療を要した。症例 2、36 歳、未婚女性。3 年前に同医にて両側乳房に脂肪注入を受け 2 年前に硬結が生じていた。ステロイド局注とマッサージを同医で受けていたが、2 か月前より腫脹疼痛が激化したため当院紹介となった。抗生剤、消炎剤で一次軽減したが、初診 2 か月後に再び右乳房の急速腫大が生じたため、緊急ドレナージ術を施行し 750 ml の排膿した。左側も膿瘍が著明となったため、入院の上切開排膿術を施行した。幸いにして 2 症例とも症状の軽快を見たが、患者の精神的ダメージは大きい。脂肪注入術後の膿瘍形成は海外誌においても報告が多く、危険な術式として認識すべきである。

（質疑応答）

Q 貴志：瀰漫性に注入したのか、1 箇所注入したのか。

A 三鍋：1 箇所注入したということである。本症例のような合併症を防止するためには全体に満遍なく注射する必要があると考えられる。

Q 佐藤：一定期間経過後に膿瘍化したのはなぜだと考えられるか。

A 三鍋：不明である。

（コメント）

中島：脂肪組織には幹細胞が多数含まれていることが知られている。この概念を導入することで、脂肪注入法を安全で有用な方法に改良することができる。

金子：本治療方法における石灰化は巨大石灰化であり、乳がんに見られるような微細石灰化とは異なると思う。したがってその点に留意して乳がんとの鑑別を行えば、比較的容易に鑑別を行うことができると考えられる。

3. 強い自覚症状を呈した眼窩床骨折 3 手術例の検討

独立行政法人国立病院機構東京医療センター
形成外科

玉田一敬、佐藤博子

慶應義塾大学形成外科

緒方寿夫

眼窩床骨折は顔面骨骨折の中でも一定の割合を占める、比較的一般的に遭遇する顔面外傷であるが、その臨床像は様々である。

今回われわれは平成 16 年 1 月から平成 17 年 6 月までの間に強い自覚症状を呈した眼窩床骨折の 3 手術例を経験した。これら 3 例はいずれも初診時に強い自覚症状を認めた pure type の眼窩床骨折であり、いずれも手術後症状の明らかな軽快が認められた。

症例 1 は 29 才男性で、空手競技中に受傷した打ち抜き型の眼窩床骨折であり、強い複視を訴えていた。第 8 病日にバルーン挿入術を行い、その後症状の軽快が得られた。

症例2は7才男性で、友人の頭部と接触して受傷したスリット状の眼窩床骨折であり、頭痛と嘔気を訴えていた。第1病日に、絞扼された下直筋を含む眼窩内容の観血的整復術を施行し、症状の著明な改善が得られた。

症例3は8才男性で、転倒により受傷したスリット状の眼窩床骨折であり、強い嘔気と嘔吐のため脳外科に緊急入院となった。第2病日に眼窩内容の観血的整復術を施行し、症状の著明な改善が得られた。

各症例の臨床経過の詳細を供覧するとともに、これらの手術例を通じて得られた若干の知見につき報告する。

(質疑応答)

Q 高野：バルーンによる整復の適応は？

A 玉田：欠損が小さく、眼窩内容の herniation が大きい症例に適應している。

Q 曾根：小児においては複視が改善しにくいように思われるが、手術時期に関連するのであろうか。

A 緒方：文献上は48時間以内に手術を施行すると複視がよく改善すると言われている。現実の経験ではすこしそれより遅れても大きな問題は無いような印象がある。

4. Beckwith-Wiedemann 症候群 10 症例の歯科矯正学的検討

東京歯科大学歯科矯正科

坂本輝雄、一色泰成

慶應義塾大学形成外科

緒方寿夫、中島龍夫

【目的】 Beckwith-Wiedemann 症候群は、臍帯ヘルニア (Exomphalos)、巨舌 (Macroglossia)、巨人症 (Gigantism) の3徴を示す症候群で、EMG 症候群とも呼ばれている。歯科矯正学的には、巨舌の影響で開咬および下顎前突を呈する場合が多い。今回、Beckwith-Wiedemann 症候群について、初診時における所見を歯科矯正学的に検討したので報告する。

【方法】 対象は Beckwith-Wiedemann 症候群を伴う 10 症例 (女子7例、男子3例) で、平均年齢は7歳2ヶ月 (4歳1ヶ月～16歳7ヶ月) であった。資料として、問診票、初診時における顔面および口腔内写真、側面頭部エックス線規格写真を用いた。

【結果】 出生児体重の平均は 3513 g (2949 g～3950 g) であった。3症例に口蓋裂が認められ、1症例を除いて平均3歳3ヶ月時に舌縮小術が施行された。初診時の口腔内所見は、全症例に開咬がみられ、その内5症例が反対咬合も呈していた。

【結論】 今回報告した Beckwith-Wiedemann 症候群患者について、顎顔面形態の共通する所見は前歯部開咬と下顎角の開大であった。永久歯交換前に舌縮小術が施行されたことにより、歯牙を含めた顎顔面形態に影響を及ぼしていると思

われるが、全症例に開咬が認められたことから、その成因に舌の大きさと位置、発音や嚥下などの舌機能が影響していると考えられた。

(質疑応答)

Q 一色：出生後の成長は？舌筋の量は多いのか？

A 坂本：成人すると正常に近くなるといわれている。筋体の量は不明である。

(コメント)

中島：厚みと長さを正常化するためには全層で舌組織を切除するのが良い。

(質疑応答)

Q 金子：開口が残存したと言うことは、早めに舌切除を行ったほうが良いということではないか。

A 坂本：そう考えられる。

14：40～15：20

特別講演 I 「医療情報をめぐる最近の話題」－個人情報保護法と形成外科医－

座長：慶應義塾大学形成外科 緒方寿夫
国立成育医療センター 山野辺裕二

2005年4月に個人情報保護法が完全施行され、形成外科医の日常活動の中でも注意すべき点があるが、法律の基本を理解しておけば対応は難しくない。講演では個人情報保護法の理念と仕組みを簡単に説明するとともに、患者情報を入れたパソコンを盗まれて新聞沙汰にならないよう、また学会発表・症例検討会や患者紹介にあたって写真等の利用を安心して行えるよう、押さえておくべきポイントについて解説する。

特別講演 (質疑応答)

Q 一色：情報漏えいが出版社などで起きた場合、記者本人が責任をとるのか、出版社が責任をとるのか。

A 山野辺：出版社が責任をとるケースが多いようである。

Q 佐藤：メールで患者情報をおくることに関して注意点はありますか？

A 山野辺：送り間違いに注意する。写真と病歴を別におくるなどすることが推奨される。また、パスワード付圧縮ファイルにするなどの工夫が必要である。

Q 金子：包括同意ではなく、個別の利用に関して承諾が求められることもあるようであるが。

A 山野辺：特定個人ができないような形態であれば個別の同意は不要であろう。

Q 井上：電子カルテ普及に伴う安全化の工夫は？

A 山野辺：特定個人しか開けないようにする工夫。使用者各人に念書を取るなどの工夫が必要であろう。

15:20~15:30 休憩

15:30~16:10

特別講演 II 「戦前の日本における医学・歯学の発達」

座長：国立病院成育医療センター形成外科

金子 剛

東京歯科大学名誉教授 一色泰成

戦後 60 年が経った。戦前をふり返ってもいい頃である。明治新政府は、医学教育の方針として当時隆盛だったドイツ医学採用を決定し、外人教師陸軍医少佐ミュラーが最初に招聘され、明治 4 年に大学東校(東京大学の前身)に着任。西洋医学を学ぶための基礎教育が不足していることを政府に進言したことを採りあげ、医学校は予科 3 年(後に 5 年)、本科 5 年とした。慶應義塾は、明治 6 年に、鉄砲州時代の福澤塾の門下生で医師であった松山棟庵を校長とする慶應塾医学所を設立し、イギリス医学を範とし、その講義は英語によって行われ、予科 2 期、本科 5 期に分けた 2 年制で、松山棟庵の私塾のような感があったと言う。明治 8 年には学生数が百名を超過していたが、この医学所は明治 13 年に廃校のやむなきに至った。創立以来 300 余名の卒業生を出した。大学東校は、明治 10 年には東京医学校と名前を変え、開成学校と合併して東京大学となり、現在の本郷に医学校を併設した官立の総合大学が創立する。わが国の医療行政は、明治 5 年に文部省に医務課が設立されたのに始まる。近代医療制度が明治 7 年に東京、大阪、京都に発布。医術科目は、内科、外科、と専門内科として、産科、眼科、整骨科、口中科である。口中科も医師と扱われ医師免許を得た。明治 11 年医術開業試験について通達で、医師免許を必要とし、それは明治 17 年より施行される医術開業試験合格者に与えることにした。医術開業試験制度の確立で、開業医をめざす者には、西洋医学を修得する学校が必要となり、全国に医学塾や医学校が一挙に開校した。また、当然、受験生が漸次増大し、東京では専用試験場を新設する必要を生じ、また、試験用患者を収容する必要性から、東京医術開業試験附属病院を試験場に附設し、永楽病院と通称した。歯科については、当時は熟達した歯科医師の下で修業し、やがて一本立ちとなったわけであったが、開業試験制度の確立で全国各地に各種講習会が開講した。当時の明治政府は、歯科医師の養成などということは全く考えていなかった。富国強兵に役立つ分野ではなかったからである。また、当時のドイツでは、医師が耳鼻科医や眼科医になるように歯科医になるシステムであり、アメリカ流の医師と歯科医を別個のものとして取り扱う歯科医師養成機関の設立には抵抗感があった。明治 23 年に高山歯科医学院(現東京歯科大学の前身)が創立するが、明治 26 年には学校経営困難に直面し、経営手腕をかわれた血脇守之助に学校経営を委ねた。明治 28 年日清戦争後、政府は留学生を多数海外に派遣することを定めた。これにともなって東京大学医科大学は、専門学科に耳鼻咽喉科、整形外科、口腔外科の設置を決め、人選留学させている。歯科については、アメリカ流の歯科などは

医学とは認めていなかったが、実際の臨床には歯科不在になり不都合なことも起きる。陸軍軍医学校の派遣学生の養成施設であったことから、顔面外傷兵士の顎骨や咬合の整復手技の修得には歯科的処置の必要性があったと思われる。佐藤外科の石原 久が 3 年間独国及び米国に留学し、明治 36 年歯科教室主任に就任し、10 月より、歯科外来が開設されている。明治 30 年には、官立歯科医学校設立の請願書を両院に提出(血脇守之助ほか 35 名)。しかし、当然同意は得られなかった。明治 36 年専門学校令が公布された。医術開業試験は、大学及び専門学校の指定を受けた学校の卒業生は免除された。医学校では専門学校の指定校になれないものは廃校の止むを得なかった。明治 39 年 5 月 2 日、医師法、歯科医師法が公布された(法律 48 号)。高山歯科医学院は、明治 33 年 2 月、東京歯科医学院と改称し、明治 36 年専門学校令が公布されたことで明治 40 年 9 月に長年の念願が叶って東京歯科医学専門学校に昇格し、明治 44 年文部省の指定を受けて、医術開業試験免除の特典を得て、卒業したのであった。明治 41 年に中原市五郎が共立歯科医学校を設立し、翌明治 42 年に日本歯科医学校に改称し、同年 8 月には日本歯科医学専門学校として許可された。そして明治 43 年に文部省の指定校となり、大正元年に開業試験免除の卒業生を出した。大正 5 年には、佐藤運雄が東洋歯科医学校をつくり校長となり、大正 9 年に東洋歯科医学専門学校となり、これを日本大学は吸収合併して日本大学専門部歯科といった。当時の文部省は私立の医学校には大学の名称を許可しない方針であったが、慶應大学は大正 9 年(1920)慈恵は大正 10 年(1921)、日本医大は大正 14 年(1925)それぞれ大学ないし、大学医学部となった。慶應義塾では創立 60 周年を記念して、北里柴三郎を医学部長に医学部設立を決定し、大正 6 年予科学生が入学、大正 8 年に本科が始まり、大正 12 年春、第一回生の卒業を迎えた。大正 9 年文部省令により、予科 2 年が 3 年になり、正規の予科 3 年は第 5 回生から始まる。慶應義塾大学医学部は、大正 9 年 1 月 6 日午後 1 時より構内において各大臣ならびに朝野の名士約 3,500 人を招き、開校ならびに附属病院開院式を挙行政を、同医学部は現代医界の少壮一流の大家を招きて教授となし、しかも設備の点においては官立大学といえども遠く及ばざるものありとある(東京歯科大学百年史より)。

特別講演(質疑応答)

Q 金子：江戸時代には歯科は存在したのか

A 一色：存在した。開業もされていたし、いわゆる「出島」に修行に行くような状況も存在した。

(コメント)

中島：ドイツでは歯科医と医師でダブルライセンスが多い。アメリカでは医師と歯科医の区別が明確である。

16:10~16:50 治療法

座長: 埼玉社会保険病院形成外科 高野淳治

5. 前額部脂肪腫の内視鏡下超音波吸引摘除術-顔面露出部に傷をつけない Endoscopic Forehead Surgery の有用性

杏林大学形成外科・美容外科

三鍋俊春, 波利井清紀

多くの科で標準化した内視鏡手術は慶應医学のお家芸の一つといえ、形成外科においても導入後10年以上を経過し、術式や適応疾患の取捨選択や洗練が進んできた。中でも、前額部は頭髪内切開が可能であるがゆえに内視鏡手術が極めて有効であり、演者らは Endoscopic Forehead Surgery と呼称して積極的に内視鏡を適応している。今回は、内視鏡手術の利点が十分に活かされ、かつ、患者の満足も大きい前額部脂肪腫の手術を報告する。使用内視鏡は、口径4mm、長さ約20cmの硬性鏡で視角0°、30°、70°が適する。術式は、hair line 後方1cmの前頭部頭髪内に1.5cmの切開を2箇所おき、前額部骨膜下を脂肪腫底面まで非鏡視下に剥離する。通常、前額部脂肪腫は骨膜と前頭筋の間の層(LAFS, Nakajima et al)に存在しており、鏡視すると骨膜を通して黄色の腫瘍が透見でき、骨膜切開により腫瘍底面が露出する。左側切開より内視鏡、右側切開より超音波吸引メス(出力80%、洗浄15ml/min、吸引100%に設定)を挿入して、術者が両方を操作しながら、鏡視下に腫瘍の摘除を行う。摘除後には、眼高上神経血管束や、皺眉筋がきれいに温存されているのが確認できる。術後は、前額、眼瞼の腫脹は最小限で、三叉神経痛、顔面神経麻痺も生じない。翌日にはガーゼ除去、洗髪可とし、早期の職場復帰が可能である。

(質疑応答)

Q 金子: 脂肪腫は必ず骨膜直上の層に存在するのか。また、保険的には特殊機械を使用する分の点数を加算できるのか。

A 三鍋: 前額部においては必ず深い脂肪層に存在する。保険的加算は無い。

Q 高松: 出血を少なくする工夫は行っているか。またバイオペクスを使う上での工夫は?

A 三鍋: 超音波メスを使用すれば出血は少ない。また、出血が少ないというこの利点はバイオペクスを乗せる上でも有利である。

6. Labial ring flap

埼玉医科大学総合医療センター形成外科

高松亜子, 原科孝雄, 吉川嘉一朗

我々は、1998年から2004年までの6年間に26例の女性から男性への性同一性障害の性別適合手術を経験した。フェーストステージの手術は、子宮卵巣摘出とメタイドイオプラスチックである。メタイドイオプラスチックは「FTMTSにおい

て肥大した陰核からペニスを作成するテクニック」であるが、Hageらの方法(1993)を日本人に適応する場合、いくつかの問題が認められた。尿道皮膚瘻、尿道狭窄、不十分な陰核前進などであり、その結果、術後立位排尿が可能になったものは約半数であった。原因は主に日本人FTMにおける未発達小陰唇、狭小陰であると考えられたため、我々は独自に Labial ring flap を開発した。Labial ring flap は、小陰唇の内側粘膜部にデザインされる random pattern の皮弁で、小陰唇後連部で両側が連結して最遠位端の血行が補われる。幅3センチ長さ3センチの皮弁が安全容易に挙上できる。これを筒状に膀胱カテーテル周囲に巻き付け、腭前壁粘膜弁による尿道と連結することで、長く広い尿道を作成できる。10名に Labial ring flap を適応し、尿道皮膚瘻、狭窄の発生率が減少した。代表的症例を供覧する。

(質疑応答)

Q 三鍋: 立位排尿を行う場合にはどの程度の長さのペニスが必要なのか。また、感覚は維持されているのか。

A 高松: 長さよりも、尿路ベクトルをうまく変えることができるか否かが重要な要素である。陰角背神経は温存しているので感覚は保たれている。

7. 刺青の外科的治療

名古屋形成クリニック

長谷川時生, 上 敏明

最近では、刺青除去を目的に我々形成外科医を訪れる患者が増加している。その際、患者は短時間に完全に刺青の色素の除去を希望する場合が多い。刺青の治療にはレーザー治療が有効とされている。しかしながら、顔面、手指などの部分を除き、治療に時間がかかる、治療回数が多くなる、などの理由で患者の要求に十分応えているとは言いがたい。我々は約2年前より、四肢、軀幹における広範囲の刺青に対し、剥皮により刺青の除去手術を行っている。我々は第48回日本形成外科学会(2005東京)において四肢、軀幹における広範囲の刺青に対し、剥皮法による刺青の除去手術の有用性を報告し、さらに、剥皮した皮膚をディスパーゼによる酵素分離を行い、得られた表皮を深く切除した部分や関節部分など創傷治癒が遅れる部分に移植することで、創痛の軽減、浸出液の減少、創治癒の短縮化に効果のあることを報告した。今回我々の酵素分離の方法、表皮移植の工夫点を報告する。

(コメント)

中島: ディスパーゼを使用する方法は時間がかかり、かつ真皮を残存させる上でテクニックが必要である。

貴志: 母斑の症例に同様な方法を使用しているが、肥厚性癬瘡が残存しやすい傾向にあると感じている。

(質疑応答)

Q 金子: ディスパーゼ処理を行っている層はどこか? また、

刺青の形どおりに癬痕が残存した場合、患者は喜ばないのではないか？

A 長谷川：基底細胞層の上である。皮膚剥離を行う範囲に関しては今後検討してゆきたい。

8. ケロイド、肥厚性癬痕に対する複合レーザー治療

大城クリニック

大城貴史，藤井俊史，佐々木克己

日本医用レーザー研究所

大城俊夫

ケロイド、肥厚性癬痕の治療は、手術療法、圧迫療法、内服療法、ステロイド外用、電子線療法などがあるが、どの治療法においても決め手がなく、コントロールが難しいのが現状である。当院では、従来から低反応レベルレーザー治療やステロイド外用療法などの複合治療について発表してきたが、2002年より導入したロングパルス色素レーザー（V-Beam）を複合的に利用することで、ケロイドや肥厚性癬痕の大まかな治療指針を確立しつつある。今回は前胸部に生じたケロイド、肥厚性癬痕に対する治療経験より得た知見を中心に当院の治療方針を報告する。また2004年11月より開設した「傷あと外来」についても報告したい。

(質疑応答)

Q 三鍋：V ビームレーザーとステロイド注射の効果の比較は？

A 大城：併用することが多いので比較は現在のところできていない。

16：50～17：30 治療体系

座長：済生会宇都宮病院形成外科 曾根清昭

9. 清瀬小児病院における口唇口蓋裂治療の現況

東京都立清瀬小児病院形成外科

大西文夫，彦坂信

慶應義塾大学形成外科

中島龍夫，緒方寿夫

東京都立清瀬小児病院矯正歯科

早川龍

慶應義塾大学耳鼻咽喉科

佐藤美奈子

口唇口蓋裂の治療は、形成外科のみならず、歯科、耳鼻科、小児科など関連各科の連携の下、総合的な治療を行っていく必要がある。我々の施設でも近年、新生児科とのタイアップ、矯正歯科による早期顎矯正、耳鼻科による中耳炎管理など総合治療のできる体制が出来つつあり、口唇口蓋裂の症例も増えてきた。2004年6月以降の口唇口蓋裂治療の現況をまとめたので、その問題点、課題なども含めて報告する。

10. 当院における鼻咽喉閉鎖不全の治療 I 一周術期管理を中心に

国立成育医療センター形成外科

三浦麻由佳，金子 剛，清水雄介

当院における鼻咽腔閉鎖不全症の診断および治療は、形成外科外来及び口蓋裂チーム外来を中心に行っている。手術治療としては咽頭弁形成術を選択しているが、開院以来の3年間で28例を経験した。今回は周術期管理を中心に述べる。

(質疑応答)

Q 曾根：咽頭弁手術を施行した患者の年齢は？

A 三浦：4歳から10歳である。

11. 当クリニックにおける上眼瞼手術の実態

慶友形成クリニック

蘇 雅宏

2001年1月から2005年6月末までに当院にて行った上眼瞼手術989件（内訳：埋没法443件、上眼瞼切開法100件、挙筋前転法386件、その他50件）に対し、手術方法及び適応傾向について考察した結果を報告する。2003年までの2年間では253件で埋没法121件、上眼瞼切開法22件、挙筋前転法110件であり、2003年は244件で埋没法84件、上眼瞼切開法18件、挙筋前転法142件となった。患者数の増加に対し、上眼瞼切開法は減少したが、挙筋前転法は大幅に増加した。2004年では280件で埋没法144件、上眼瞼切開法22件、挙筋前転法114件であり、埋没法の増加と挙筋前転法の減少が見られる。2005年上半期では162件で埋没法94件、上眼瞼切開法48件、挙筋前転法21件であり、一部の挙筋前転法症例が新しい方法で上眼瞼切開法に帰属させたため、挙筋前転法が更に減少傾向に見られる。

12. 挙筋前転法（松尾法）の工夫

慶友形成クリニック

蘇 雅宏

2001年1月から2005年6月末までに当院にて行った上眼瞼手術989件（内訳：埋没法443件、上眼瞼切開法100件、挙筋前転法386件、その他50件）に対し、手術方法及び適応傾向について考察した結果を報告する。2003年までの2年間では253件で埋没法121件、上眼瞼切開法22件、挙筋前転法110件であり、2003年は244件で埋没法84件、上眼瞼切開法18件、挙筋前転法142件となった。患者数の増加に対し、上眼瞼切開法は減少したが、挙筋前転法は大幅に増加した。2004年では280件で埋没法144件、上眼瞼切開法22件、挙筋前転法114件であり、埋没法の増加と挙筋前転法の減少が見られる。2005年上半期では162件で埋

没法94件、上眼瞼切開法48件、挙筋前転法21件であり、一部の挙筋前転法症例が新しい方法で上眼瞼切開法に帰属させたため、挙筋前転法が更に減少傾向に見られる。

(質疑応答)

Q 原科：下横走靭帯の概念はだれが提唱したのか？

A 金子：15年前にニューヨークの病院を見学した際には、同靭帯を意識して手術していた。よって文献にはないが、かなり前より概念が存在するのではないか。

雑 報

慶應医学会例会第 1440 回

日 時 平成 17 年 10 月 20 日 (木) 午後 7 時
 場 所 中央棟 5 階 カンファレンスルーム
 演 題 重症心不全再生の第一例：左室補助人工装着患者
 への骨髄由来単核球細胞移植
 演 者 五條 理志 先生
 埼玉医科大学総合医療センター 心臓血管外科
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1441 回

日 時 平成 17 年 11 月 8 日 (火) 午後 5 時
 場 所 新棟 11 階 大会議室
 演 題 Communicative musicality in parent - infant interaction
 演 者 Stephen Malloch, MD
 MARCS Auditory Laboratories, University of
 Western Sydney, Penrith South DC, NSW,
 Australia
 担 当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1442 回

日 時 平成 17 年 11 月 8 日 (火) 午後 6 時
 場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ
 演 題 What's New in the United States in 2005 :
 What you should learn/What you shouldn't
 learn.
 演 者 Hiroshi Tazaki, MD
 Professor, Department of Urology, New York
 Medical College, Valhalla, NY, USA
 担 当 泌尿器科学教室

慶應医学会例会第 1443 回

日 時 平成 17 年 11 月 9 日 (水) 午後 5 時 30 分
 場 所 新教育研究棟 講堂 2
 演 題 Chemokines in Cancer Metastasis
 演 者 Sam Hwang, MD, PhD
 Senior Investigator, Dermatology Branch,
 Center for Cancer Research, National Cancer
 Institute, National Institutes of Health, USA
 担 当 皮膚科学教室

慶應医学会例会第 1444 回

日 時 平成 17 年 11 月 14 日 (月) 午後 5 時
 場 所 新棟臨床講堂兼大会議室
 演 題 The American College of Surgeons Oncology
 Group (ACOSOG) Studies

演 者 Peter W.T. Pisters, MD
 Professor of Surgical Oncology, The University
 of Texas M.D. Anderson Cancer Center,
 Houston, TX, USA
 担 当 外科学教室

慶應医学会例会第 1445 回

日 時 平成 17 年 11 月 18 日 (金) 午後 5 時
 場 所 講堂 1
 演 題 Novel Roles for B Cell Immunity after
 Allogeneic Stem Cell Transplantation
 演 者 Jerome Ritz, MD
 Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical
 School, Boston, MA, USA
 担 当 先端医科学研究所

慶應医学会例会第 1446 回

日 時 平成 17 年 11 月 21 日 (月) 午後 7 時
 場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ
 演 題 Learning from SARS -prospective role of
 angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in
 acute lung failure-
 演 者 Yumiko Imai, MD, PhD
 Institute of Molecular Biotechnology of the
 Austrian Academy of Sciences (IMBA), Vienna,
 Austria
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1447 回

日 時 平成 17 年 11 月 22 日 (火) 午後 6 時
 場 所 予防医学校舎
 演 題 Objective evaluation of dysphagia
 演 者 Tai Ryoan Han, MD, PhD
 Professor and Chairman, Department of
 Rehabilitation Medicine, Seoul National
 University, Seoul, Korea
 担 当 リハビリテーション医学教室

慶應医学会例会第 1448 回

日 時 平成 17 年 11 月 22 日 (火) 午後 5 時 30 分
 場 所 東校舎講堂
 演 題 Diagnosis and Management of Metabolic
 Disorders
 演 者 Eva Maria C. Cutiongco, MD
 Associate Professor, Institute of Human
 Genetics, National Institute of Health,

University of the Philippines, Manila,
Philippines

担 当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1449 回

日 時 平成 17 年 12 月 2 日 (金) 午後 6 時 00 分

場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ

演 題 ①Mechanisms of escape in chronic HCV
infection : implications for vaccine design

②Identification and function of a new cell that
links innate and adaptive immunity

演 者 ①Andrea Cox, MD

Assistant Professor, Johns Hopkins University,
Baltimore, MD, USA

②Drew Pardoll, MD, PhD

Professor, Johns Hopkins University,
Baltimore, MD, USA

担 当 先端医科学研究所

訂 正

「慶應医学」第 82 卷 3 号

1) 116 ページ左欄 最下行

誤：大黒屋幸太郎

正：大黒屋幸太夫

2) 116 ページ右欄 上から 2 行目

誤：幸太郎

正：幸太夫

3) 118 ページ右欄 文献 19

誤：外川行夫

正：戸沢行夫

4) 同上

誤：オランダ流御殿医

正：オランダ流御典医

慶應医学会における個人情報の取扱いについて

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

1.個人情報の利用目的

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

2.個人情報の取得方法

慶應医学会では、以下の方法で会員の皆さまの個人情報を取得しております。

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

3.個人情報の第三者への提供

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

4.個人情報の適切な管理

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

以上

『慶應医学』投稿規定

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

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

論文の受付

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

原稿はオリジナルとコピーを一部ずつ下記あてに届けて下さい。

〒160-0016

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

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9：00～午後 5：00

(土曜日は受付をしません)

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

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

論文原稿の作成上の注意

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

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

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT） 英語での表示とする。

1) 読者が一読して論文の主旨が明確にわかるもの。

2) 150 語ないし 200 語以内にまとめる。

3) ダブルスペースで A4 判の用紙にタイプする。

4) 題名にすでに表記されているものを最初の文章で繰り返さないこと。

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

6) 数字が文頭にある場合はスペルアウトし、文中ではアラビア数字を用いる。

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

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

略語は各分野を通じて周知のもの以外は使わない。

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

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

9. 見出しの振り方（参照例）

研究成績

1. 臨床的事項

1) 頻度

a)

(1).....

(i).....

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

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

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

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

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

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. プライオリティを主張することはできない。

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

論文作成上の注意

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

ある。

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT）は不要である。

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

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

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

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

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

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

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

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

なお、ご不明の点については事務局にお問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

編集後記

世の中、科学の進歩により、入ってくる情報量が非常に多くなり、それへの対応の速度も速くなり、情報の移り変わりが早い。「ライブドア」の野球参入、買収、転落の速度も速かったが、誘拐殺人、マンション・ホテルの設計偽装事件、牛肉輸入再開、禁止、オリンピックなどと、テレビなどの電子媒体を通してわれわれに入ってくる情報も次々に変化し、消化しきれぬまま過ぎていく。韓国で起こった stem cell の論文偽証事件、日本でもノックアウトマウスが作られた形跡なしで論文取り消しとなったが、結果を急いだための不愉快な事件が科学の世界でも起こっている。どちらもインパクトファクターの高い雑誌である。「慶應医学」にそのような不愉快なことは起こらないと信じているが、世の中の移り変わりの早さに乗せられて、大事なことが省略されることのないように気をつけたい。

(齋藤英胤)

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 齋藤英胤
林 松彦 村田 満 村松太郎

平成 18 年 3 月 18 日 印刷

平成 18 年 3 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64023

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写したい方は、©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

慶應医学 第83巻第1号別頁
平成18年3月25日

学位論文

慶應医学会

学位論文

カスパーゼ活性化が腎形態形成に及ぼす影響の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田教授)

荒木 崇志

(平成 15 年 1 月 24 日受付)

Key Words : caspase, apoptosis, ureteric bud branching, organ culture

近年、難治性疾患の治療として臓器や細胞の再生治療が注目されており、神経細胞や皮膚細胞、骨細胞などは *in vitro* での分化誘導が報告され^{1) 4)}、今後の治療応用が期待されている。腎臓病においては、末期腎不全に陥った患者に対し、人工血液透析という機械的に腎臓の代用を行う治療を行っているが、患者に対し時間的制約も多く、また金銭的にも医療財政の圧迫の一要因となっている。しかしながら腎臓の細胞の再生、分化誘導ははまだ報告されておらず、末期腎不全患者が透析から離脱するためには、腎移植を行うこととなるが、その広がりには不十分であり、約 20 万人の患者が人工血液透析を受けているのが現状である。腎臓の細胞の再生、分化誘導が実行できないことは、発達段階における腎臓の分化メカニズムの解明が不十分であることが一要因として考えられる。細胞死とは、低浸透圧や種々のサイトカインなどのストレスによって障害を受けた細胞を除去するためのメカニズムである⁵⁾。その一方、発生段階の器官形成においても、必要以上の細胞が一過性に生まれ、不要になった細胞が細胞死によって除去されて、正しい形態を形作ることも知られており^{6) 7)}、腎臓の発生においても約 50% の細胞が細胞死で除去されていると考えられている⁸⁾。線虫に関しては、成体となるまでの間のすべての細胞系譜が解明されており、細胞死によって除去されるべき運命を持つ細胞も同定されている⁹⁾。細胞死の実行においてシステインプロテアーゼであるカスパーゼという酵素が活性化されることが知られており、そのメカニズムは

線虫のような下等動物から、哺乳類まで保存されている¹⁰⁾。そして、哺乳類においても器官形態形成において細胞死の実行が重要であることが、神経堤の閉鎖や眼のレンズ形成において報告されている^{11) 12)}。

本研究では、腎臓の細胞の再生、分化誘導の前段階として、腎臓の形態形成のメカニズムを明らかにすることを目的とし、細胞死という現象が、腎臓の形態形成に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

1 動物

妊娠 12 日目、15 日目、16 日目、妊娠後期、成体マウスをチャールズリバーより購入し使用した。

2 RNA の抽出および RT-PCR

妊娠 12 日目、15 日目マウス胎児および新生マウスの腎臓からトータル RNA を acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法 (AGPC 法) を用いて抽出した。1 mg の RNA を 1 unit の RNase-free DNase I (Gibco BRL) と室温で 15 分反応させた後、1 ml の 25m M EDTA を加えて反応を停止し、65 °C で 15 分加熱したのち氷冷し、1X reverse transcriptional buffer, 6.7 mM DTT, 0.625m M dNTP, 0.8 unit RNase inhibitor, 4 unit MoMLV reverse transcriptase (以上 Gibco BRL) を使用して 37

本論分は、Araki T, Saruta T, Okano H, Miura M : Caspase activity is required for nephrogenesis in the developing mouse metanephros. *Exp Cell Res* 1999 May 1 ; 248 (2) : 423-9 の一部を含む。

℃で90分反応させてcDNAを作成した。PCRに用いたプライマーはそれぞれ

- caspase-1 forward 5'-TCCAGGAGGGAATATGTG
G-3'
reverse 5'-CTTGTCTTCTCTCCACGGCA-
3'
- caspase-2 forward 5'-ACCCTCTTCAAGCTTTTGG
GC-3'
reverse 5'-GAAAAACCTCTTGGAGCTG-
3'
- caspase-3 forward 5'-GATCACAGCAAAGGAGC
AGT-3'
reverse 5'-CTCCACTGTCTGTCTCAAT-
3'
- caspase-11 forward 5'-TGGGAACCTCTGGAGAAAT
G-3'
reverse 5'-AATGAAGTCCTTCTCCACG-
3'

である^{13) 14)}。PCRは1X ExTaq PCR buffer (Takara), 0.2 mM dNTPs, 0.5 mM primer, と1 unit Ex Taq DNA polymerase (Takara)を最終的に20 mlの量で行った。条件は94℃5分、95℃1分、55℃1分、72℃1分を35サイクル(actinのみ20サイクル)で行った。PCR産物は2%アガロースゲルに泳動して検出した。

3 たんぱく質の抽出およびウエスタンブロッティング法

妊娠12日目、16日目マウス胎児および新生マウスの腎臓を1X SDS サンプルバッファー(0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.25 ml, グリセロール 1.0 ml, 10% SDS 2.0 ml, 2-メルカプトエタノール 0.5 ml, 0.1% BPB 0.25 mlを蒸留水で10 mlにしたもの)でホモジネートして5分間煮たものをサンプルとして使用した。12.5% SDS ポリアクリルアミドゲルに泳動した後、メンブレン(Hi Bond; アマシャム)に転写した。メンブレンを4%スキムミルクでブロッキングした後、一次抗体(1:200 anti-caspase-9 抗体, 1:200 anti-Apaf-1 抗体; MBL, 1:200 anti-caspase-8 抗体; サンタクルーズ, 1:500 anti-tubulin 抗体; カルビオケム)と4℃で一晩反応させ、PBST(1X PBS, 0.2% Triton X-100)で3回洗浄した後、HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)-conjugated 二次抗体(1:1000; アマシャム)と室温で60分反応させ、再びPBSTで3回洗浄し、ECL キット(アマシャム)を用いて検出した。

4 TUNEL 法

72時間培養後の後腎をOCTコンパウンドを用いて包埋し、クライオスタットを用いて8mMの切片を作成した。Apop Tag in situ apoptosis detection kit (Oncor)を用い、プロテイナーースK処理を省略した以外の反応は添付プロトコールに従った。切片はequilibration bufferと45分室温で反応させた後、TdT reaction bufferと37℃で60分反応させた。Stop/wash bufferと反応させTdt reactionを停止させ、PBSで3回洗浄した後、fluorescein-conjugated anti-digoxigenin Fab fragmentと30分反応させ、Phosphate buffer saline (PBS)で再び3回洗浄したのち、Hoechst 33342で核染色を行い、鏡検した。

5 後腎器官培養

胎生12日マウスの後腎を摘出し、ポリカーボネイトフィルター(pore size: 1.0 μm; Nuclepore)上で培養した。使用した培地は過去の報告に基づき、Ham's F12: DMEM 1:1 にトランスフェリン, PGE1, ソディウムセレネート, ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した^{15) 16)}。培地にカスパーゼの阻害剤として、100 mg/ml Z-D-CH2DCB, 100 mM および 200 mM の Ac-DEVE-CHO, Ac-IETD-CHO, Ac-LETD-CHO, Ac-YVAD-CHO (以上 Peptide Institute) を添加した。培地は24時間ごとに交換し、72時間培養後に解析に用いた。

6 尿管芽の分岐、進展、およびネフロン様構造物の生成の評価

尿管芽の分岐、進展を評価するために、培養した後腎を氷メタノールにて固定した後、PBSTで3回洗浄し、一次抗体(1:50 anti-pancytokeratin 抗体; シグマ)と4℃で一晩反応させた。PBSTで3回洗浄した後二次抗体(1:50 Cy-3-labeled anti-mouse IgG; Jackson Immuno Research)と反応させ、PBSTで3回洗浄した後、蛍光顕微鏡にて鏡検した。

ネフロン様構造物の形成を評価するために、同様にメタノールで固定した培養後腎をFITC-conjugated LT (Lotus tetragonolobus) レクチン(1:50 フナコシ)と室温で2時間ないし3時間反応させた後、PBSTで3回洗浄し、蛍光顕微鏡にて鏡検した。

7 カスパーゼ活性の測定

培養後腎をトリプシン EDTA を用いて消化した後1500 rpm で5分間遠心し、ジギトニンバッファー(50

mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 10mM EGTA) に浮遊し、凍結、融解を3回繰り返した。終濃度 15 mM となるようにジギトニンを加え、37度で30分反応させた。15000 rpm で3分間遠心し、上清をサンプルとした。1 mg のサンプルを切断バッファー (20mM HEPES-NaOH, 100mM NaCl, 0.05% NP-40, 5mM MgCl₂) と 37 °C で 45 分前処理し、終濃度が 10 mM となるように Ac-DEVD-AMC を基質として添加して、37 °C で 30 分反応した。7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の放出を spectrofluorometer を用いて検出した。1 unit のカスパーゼ活性は、0.22 nmol の AMC の放出を1分間の反応で行う活性とした。

8 免疫染色および活性型カスパーゼ9の同一切片上での検出

胎生 16 日マウスの後腎を OCT コンパウンドを用いて包埋し、クライオスタットを用いて 8mM の切片を作成した。切片は一次抗体 (1 : 100 anti-Apaf-1 抗体; サンタクルーズ) と 4 °C で一晩反応させた後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体 (1 : 200 Rhodamine-conjugated donkey anti-goat antibody; サンタクルーズ) と室温で 2 時間反応し、さらに活性型カスパーゼ 9 を検出するために V1 抗体 (1 : 500; 理化学研究所森島先生より寄贈) と 4 °C で一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体 (1 : 200 FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody; サンタクルーズ) と室温で 2 時間反応させ、PBS で 3 回洗浄した後、蛍光顕微鏡を用いて鏡検した。

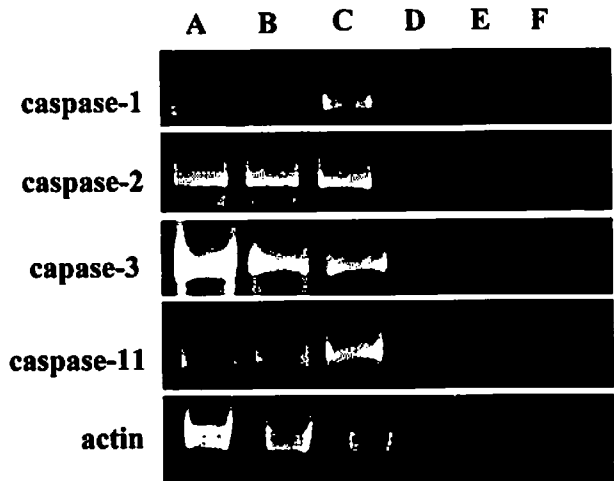
9 統計学的処理

データは平均値±標準偏差で表記し、群間の差を評価するにあたり unpaired t test を用いた。危険率が 0.05 未満のものを統計学的に有意とした。

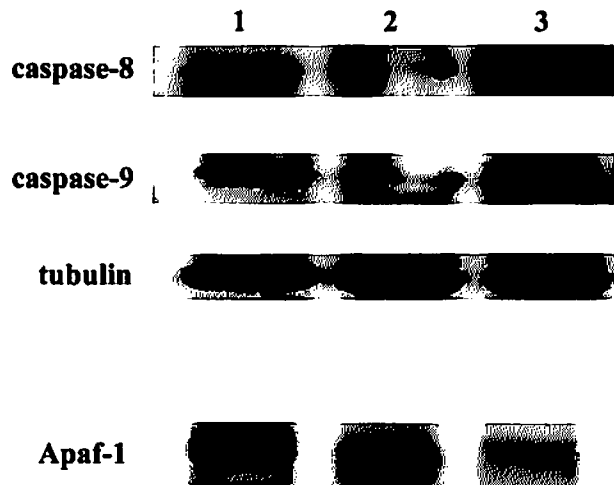
結 果

1 発生期腎臓におけるカスパーゼの発現

RT-PCR 法による検討により、カスパーゼ 1, 2, 3, 11 のいずれもが胎児期の腎臓において発現していることが確認された (第 1 図 A)。また、ウエスタンブロッティング法による検討により、カスパーゼ 8, 9 のいずれもが胎児期の腎臓において発現していることが確認された (第 1 図 B)。カスパーゼ 9 と複合体を作成し、細胞死の実行にかかわる Apaf-1 タンパクも胎児期の腎臓において発現しており、さらにその発現は成体の腎臓



第 1 図 A 胎児の腎臓におけるカスパーゼの発現を RT-PCR で確認した。カスパーゼ 1, カスパーゼ 2, カスパーゼ 3, カスパーゼ 11 のいずれもが、胎児期の腎臓における発現が認められた。A 胎生 12 日目, B 胎生 15 日目, C 新生児の腎臓からそれぞれ RNA を抽出したもの, D, E, F はそれぞれについて RT を行わず PCR を行ったもので、genomic DNA の混入の可能性を除外するために行った。



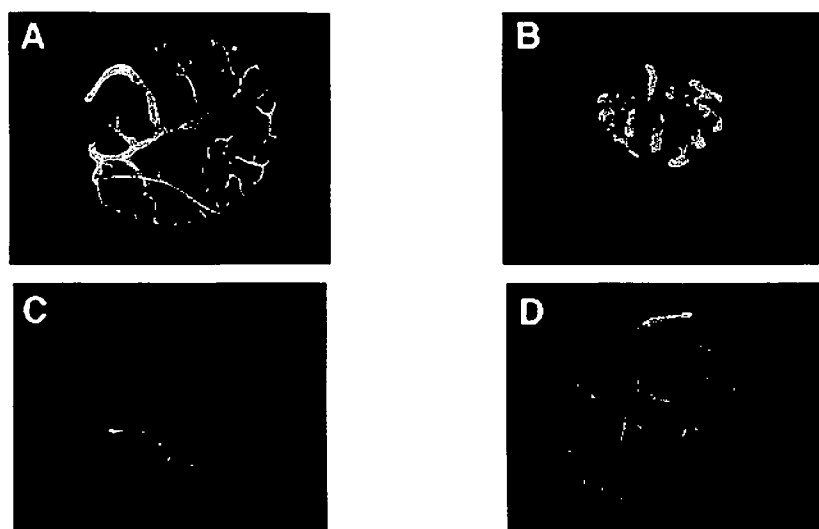
第 1 図 B 胎児の腎臓におけるカスパーゼ、およびカスパーゼの活性化に関与する Apaf-1 の発現をウエスタンブロッティングで確認した。カスパーゼ 8, カスパーゼ 9 のいずれもが胎児期の腎臓における発現が認められた。Apaf-1 も発現が確認されたが、胎児期の腎臓における発現量の法が多いことが認められた。1, 胎生 12 日目, 2, 胎生 16 日目, 3, 新生児の腎臓からそれぞれタンパクを抽出したもの。(Araki T et al : Nephron Experimental Nephrology 93 : e117-124, 2003 の第 1 図を許可を得て転載)

よりも胎児期の腎臓において多いことが確認された (第1図B)。複数回の実験で同様な結果が得られ、代表例を図1A, Bに示した。

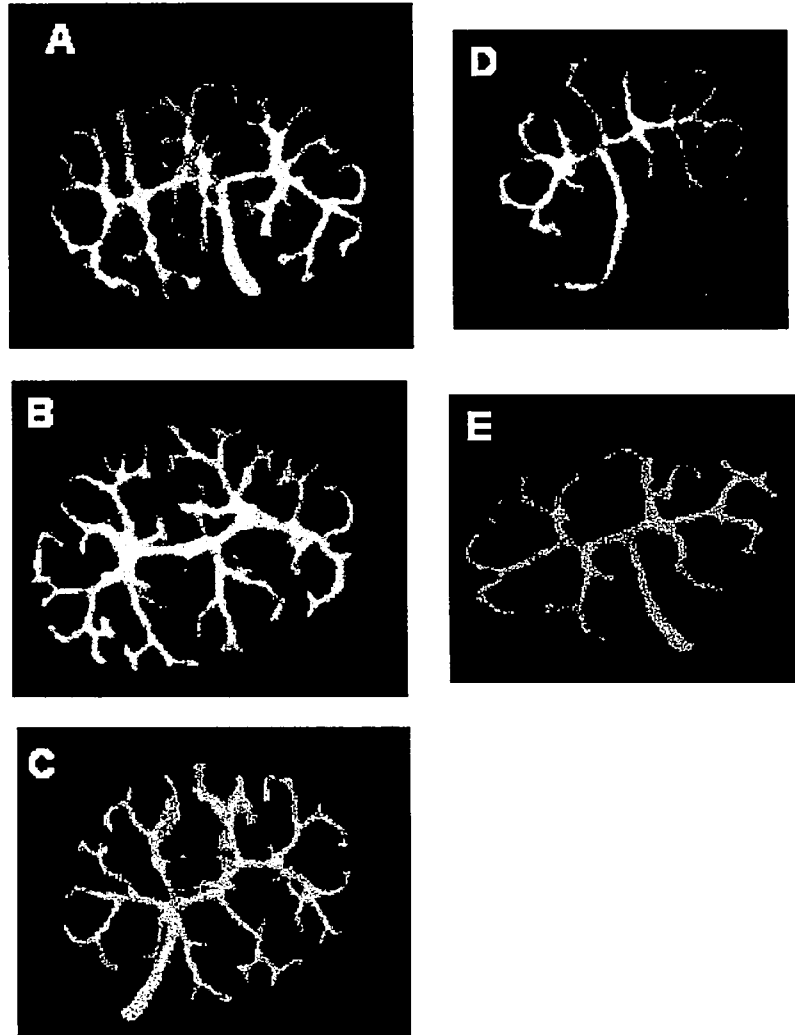
2 尿管芽の分岐, 進展に対するカスパーゼ阻害剤の影響

種々のカスパーゼの阻害剤である Z-D-CH2DCB およびカスパーゼ3の阻害剤である Ac-DEVD-CHO を添加し, 培養した後腎は尿管芽の分岐, 進展が抑制されていることが確認された。この効果は72時間の培養中の初

期の24時間においてのみ添加した培養後腎においても同様に認められた (第2図A)。カスパーゼ8の阻害剤である Ac-LETD-CHO の添加およびカスパーゼ1の阻害剤である Ac-YVAD-CHO の添加は尿管芽の分岐, 進展におよぼす影響は認められなかったが, カスパーゼ9の阻害剤である Ac-IETD-CHO の添加は, カスパーゼ3の阻害剤と同様に尿管芽の分岐, 進展を抑制した (第2図B)。複数回の実験で同様な結果が得られ, 代表例を図2A, Bに示した。



第2図A カスパーゼの阻害による尿管芽の分岐, 進展への影響をケラチンの抗体を用いた免疫染色で確認した。カスパーゼの阻害剤である, Z-D-CH2DCBおよびカスパーゼ3の特異的阻害剤である Ac-DEVD-CHO はともに尿管芽の分岐, 進展を抑制した。培養開始24時間のみに Z-D-CH2DCB を添加した後腎についても, 同様の分岐, 進展抑制効果が認められた。A, コントロール, B, Z-D-CH2DCB, C, Ac-DEVD-CHO, D, 培養開始24時間のみに Z-D-CH2DCB を添加したもの。(Araki T et al : Experimental Cell Research 248 : 423-429, 1999 の第4図を許可を得て転載)



第2図 B カスパーゼの阻害による尿管芽の分岐，進展への影響をケラチンの抗体を用いた免疫染色で確認した。カスパーゼ1の特異的阻害剤である，Ac-YVAD-CHOおよびカスパーゼ8の特異的阻害剤であるAc-IETD-CHOは尿管芽の分岐，進展を抑制しなかった。カスパーゼ3の特異的阻害剤であるAc-DEVD-CHO同様カスパーゼ9の特異的阻害剤であるAc-LETD-CHOも尿管芽の分岐，進展抑制効果が認められた。A，コントロール，B，Ac-YVAD-CHO，C，Ac-IETD-CHO，D，Ac-DEVD-CHO，E，Ac-LETD-CHO (Araki T et al : Nephron Experimental Nephrology 93 : e117-124, 2003 の第4図を許可を得て転載)

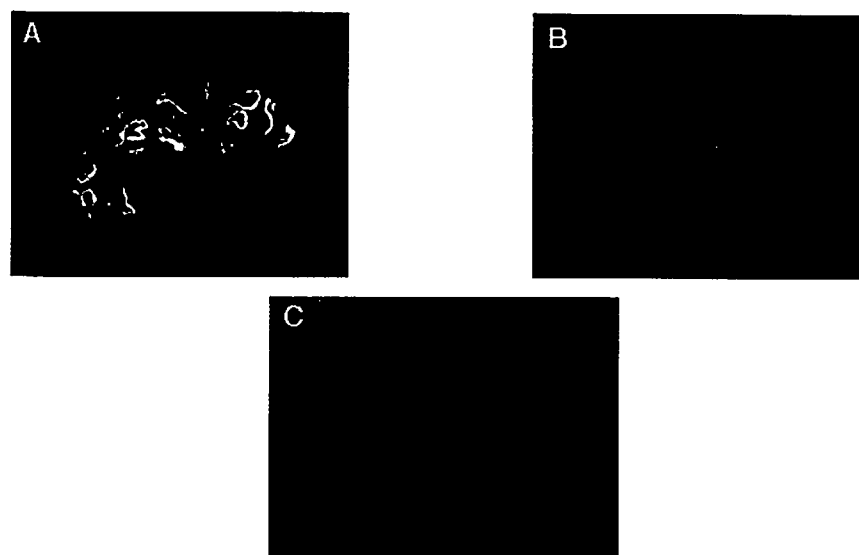
3 ネフロン様構造物の生成に対するカスパーゼ阻害剤の影響

種々のカスパーゼの阻害剤である Z-D-CH2DCB を添加し，培養した後腎は LTレクチンで検出されるネフロン様の構造物の生成が抑制されていることが確認された。この効果は 72 時間の培養中の初期の 24 時間においてのみ添加した培養後腎においても同様に認められた (第3図 A)。カスパーゼ8の阻害剤である Ac-LETD-CHO の添加およびカスパーゼ1の阻害剤である Ac-YVAD-CHO の添加はネフロン様の構造物の生成におよぼす影

響は認められなかったが，カスパーゼ9の阻害剤である Ac-IETD-CHO の添加は，カスパーゼ3の阻害剤と同様にネフロン様の構造物の生成を抑制した (第3図 B)。

4 培養後後腎の表面積に対するカスパーゼ阻害剤の影響

72 時間培養後，後腎の表面積の成長は，カスパーゼ3の阻害剤の添加により約 60 % に有意に抑制されることが認められた。カスパーゼ9の阻害剤によっても抑制効果は認められた。この抑制効果はカスパーゼ1および



第3図 A カスパーゼの阻害によるネフロン様構造物の生成をレクチン染色で確認した。カスパーゼの阻害剤である、Z-D-CH2DCB はネフロン様構造物の生成を抑制した。培養開始 24 時間のみに Z-D-CH2DCB を添加した後腎についても、同様のネフロン様構造物の生成の抑制効果が認められた。A、コントロール、B、Z-D-CH2DCB、C、培養開始 24 時間のみに Z-D-CH2DCB を添加したもの。(Araki T et al: Experimental Cell Research 248: 423-429, 1999 の第 4 図を許可を得て転載)

カスパーゼ 8 の阻害剤の添加および、カスパーゼを阻害しないシステインプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチン (200mM) によっては認められなかった (第 4 図)。

5 カスパーゼ阻害剤を添加した培養後腎の細胞死及びカスパーゼ活性の抑制効果

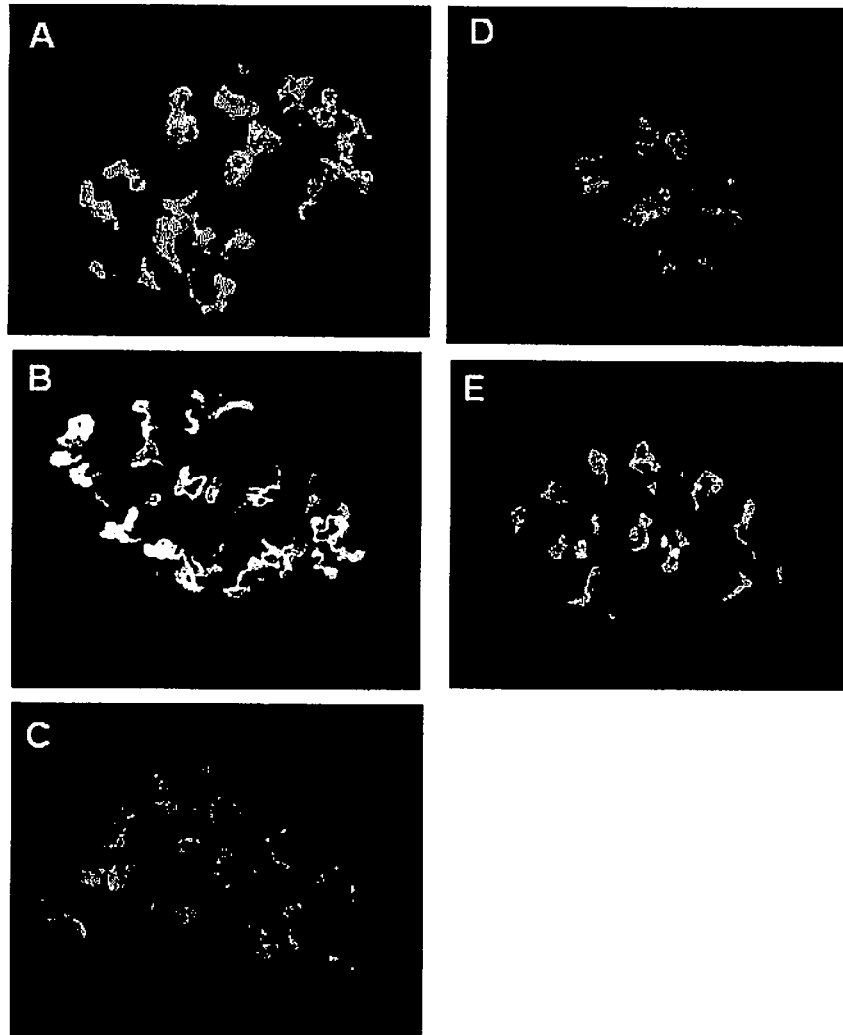
培養後腎における細胞死を TUNEL 法を用いて検討したところ、コントロールでは約 13% の細胞が TUNEL 陽性であったのに対し、Z-D-CH2DCB を添加した培養後腎では TUNEL 陽性細胞が約 3.3% と、細胞死が抑制されていることが確認された (第 5 図 A)。細胞死抑制効果はカスパーゼ 9 の阻害剤である Ac-IETD-CHO の添加によっても同様に認められた (第 5 図 B)。培養後腎のカスパーゼ活性を測定したところ、Z-D-CH2DCB を添加した培養後腎ではカスパーゼ活性が抑制されていることが確認された (第 5 図 C)。

6 カスパーゼ 9 の活性化細胞と Apaf-1 の発現

胎児腎の切片において、カスパーゼ 9 の活性化がおこっている細胞と、Apaf-1 の発現している細胞が同一細胞であることを、免疫染色法を用いて確認した (第 6 図)。

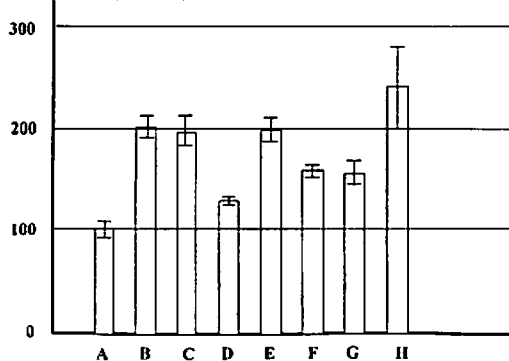
考 察

細胞死は、形態形成において、不要に作られすぎた細胞の除去に働いていることが推測されており、胎生期の種々の器官において、細胞死に陥っている細胞が検出されている⁶⁾。腎臓においても、胎児期の後腎において細胞死に陥っている細胞は認められており¹⁷⁾、細胞死がなんらかの作用を腎形態形成に対して行っていることは推測されていたが、その詳細は不明であった。本研究では、細胞死の実行に重要である細胞死実行遺伝子カスパーゼに注目し、その発現の確認、及び阻害剤の利用により、腎形態形成における細胞死の役割を考察した。カスパーゼはシステインプロテアーゼであり、現在までにカスパーゼ 1 からカスパーゼ 14 までが同定され、ファミリーを形成している (表 1)。また、線虫、ハエなどの下等生物においても、そのホモログが同定されている^{18) 21)}。カスパーゼはファミリー間でカスケードを作ることにより、上流のシグナルを下流に伝え、最終的にカスパーゼ 3 が活性化されることが種々の基質を切断することにより、細胞死の実行につながると考えられている (第 7 図)。カスパーゼ 3 の活性化を誘導する上流のカスパーゼとして、カスパーゼ 8 とカスパーゼ 9 が広く知られており、カスパーゼ 8 は TNF や Fas などの death receptor を



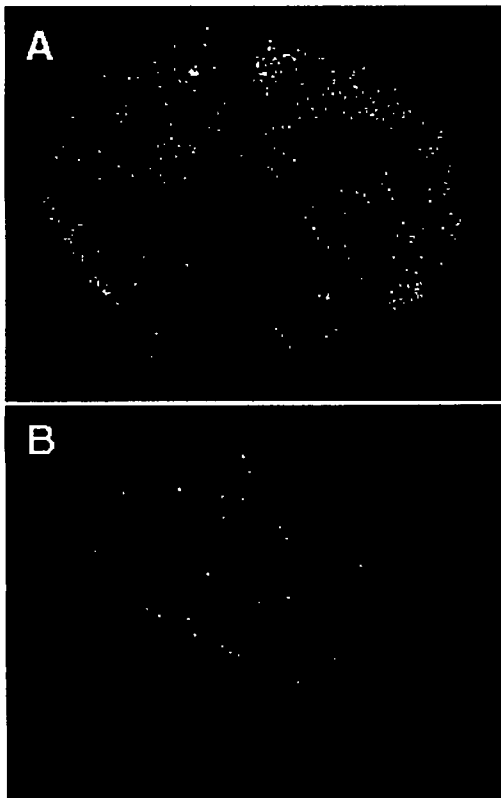
第3図 B カスパーゼの阻害によるネフロン様構造物の生成をレクチン染色で確認した。カスパーゼ1の特異的阻害剤である、Ac-YVAD-CHO およびカスパーゼ8の特異的阻害剤であるAc-IETD-CHO はネフロン様構造物の生成を抑制しなかった。カスパーゼ3の特異的阻害剤であるAc-DEVD-CHO 同様カスパーゼ9の特異的阻害剤であるAc-LETD-CHO もネフロン様構造物の生成抑制効果が認められた。A, コントロール, B, Ac-YVAD-CHO, C, Ac-IETD-CHO, D, Ac-DEVD-CHO, E, Ac-LETD-CHO (Araki T et al : Nephron Experimental Nephrology 93 : e117-124, 2003 の第2図を許可を得て転載)

metanephros surface area (E12=100)

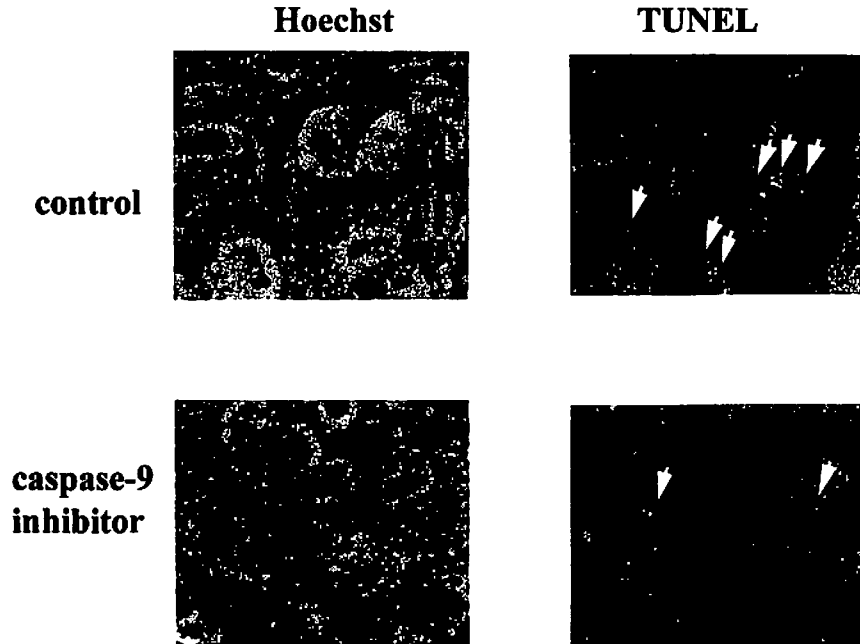


第4図

第4図 72時間培養後の後腎の表面積を比較した。培養開始時点である胎生12日目の後腎の面積を100として、比較した。カスパーゼ1の特異的阻害剤である、Ac-YVAD-CHO およびカスパーゼ8の特異的阻害剤であるAc-IETD-CHO はコントロールと同等の表面積を示した。カスパーゼ3の特異的阻害剤であるAc-DEVD-CHO およびカスパーゼ9の特異的阻害剤であるAc-LETD-CHO については、培養後腎の表面積はコントロールと比べ、その増大は抑えられていた。この効果はカスパーゼ阻害剤Z-D-CH2DCBによっても認められた。カスパーゼを阻害しないプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチンでは、増大抑制は認められなかった。A, 胎生12日目, B, コントロール, C, Ac-YVAD-CHO, D, Ac-DEVD-CHO, E, Ac-IETD-CHO, F, Ac-LETD-CHO, G, Z-D-CH2DCB, H, ロイペプチン

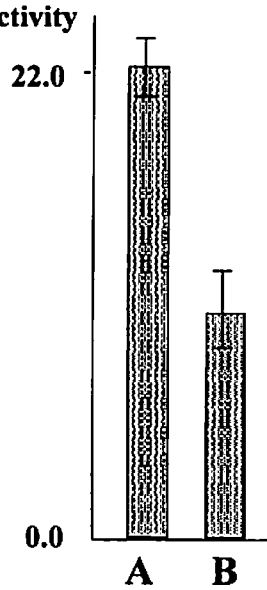


第5図A TUNEL法を用いて、カスパーゼ阻害剤を添加したときの培養後腎において細胞死が抑制されていることを確認した。カスパーゼ阻害剤Z-D-CH2DCBを添加した培養後腎ではTUNEL陽性細胞はコントロールに比べて少なく、細胞死が抑制されていると考えることができる。A、コントロール、B、Z-D-CH2DCB



第5図B TUNEL法を用いて、カスパーゼ9特異的阻害剤を添加したときの培養後腎において細胞死が抑制されていることを確認した。カスパーゼ9特異的阻害剤Ac-LETD-CHOを添加した培養後腎ではTUNEL陽性細胞(矢印で示す)はコントロールに比べて少なく、細胞死が抑制されていると考えることができる。(Araki T et al: Nephron Experimental Nephrology 93: e117-124, 2003の第6図を許可を得て転載)

caspase-3 like protease activity
(unit/mg protein)



第5図C カスパーゼ活性を測定し、培養後腎において、カスパーゼ阻害剤がカスパーゼ活性を抑制していることを確認した。カスパーゼ阻害剤Z-D-CH2DCBを添加して培養を行った後腎では、カスパーゼ活性がコントロールに比べて優位に抑制されていた。A、コントロール、B、Z-D-CH2DCB (Araki T et al : Experimental Cell Research 248 : 423-429, 1999 の第2図を許可を得て転載)

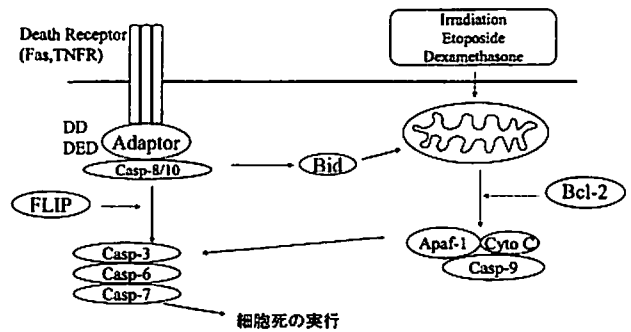


第6図 カスパーゼ9の活性化がおこっている細胞を組織学的に検討した。活性化型カスパーゼ9をカスパーゼ9によって認識、切断されるペプチドを利用して作成した抗体を用いて検出し、同一切片において、Apaf-1の発現も確認した。活性化カスパーゼ9およびApaf-1は同一細胞に染色性を示し(矢頭で示す)、さらにこの細胞は未分化な間質の細胞であることが確認された。(Araki T et al : Nephron Experimental Nephrology 93 : e117-124, 2003 の第7図を許可を得て転載)

第1表

カスパーゼ名称	認識配列	主な役割
グループ1		
カスパーゼ-1	WEHD	サイトカインの成熟化
カスパーゼ-4	(W/L) EHD	強制発現による細胞死の誘導
カスパーゼ-5	(W/L) EHD	
カスパーゼ-11		
グループ2		
カスパーゼ-2	DEHD	細胞死の実行
カスパーゼ-3	DEVD	
カスパーゼ-7	DEVD	
カスパーゼ-14	DEVD	
グループ3		
カスパーゼ-6	VEHD	グループ 2 のカスパーゼの活性化
カスパーゼ-8	LETD	
カスパーゼ-9	LEHD	

現在までに報告されているカスパーゼの認識配列をまとめたものである。カスパーゼはその働きによって大きく3つのグループに分類される。一つ目は細胞死よりもサイトカインの成熟に関与するグループであり、二つ目は細胞死の実行を行う下流に位置すると考えられるグループであり、もう一つは細胞外の刺激を2番目のグループを活性化する中間に介在するグループである。それぞれ特異的な認識配列をもっており、この認識アミノ酸配列中のシステインの前で切断する酵素活性をカスパーゼは有している。



第7図 細胞死実行のメジャーカスケードを示す。カスパーゼ3が細胞死を引き起こす最下流のカスパーゼと考えられており、細胞死刺激により、主にカスパーゼ8が活性化される系と、主にカスパーゼ9が活性化される系が存在する。カスパーゼ9の活性化には、ミトコンドリアから放出されるチトクロームcと、細胞質中のタンパク質 Apaf-1 がカスパーゼ9と複合体を形成することが重要であると考えられている。

介する細胞死において、それらの細胞膜レセプターと結合するタンパクにより活性化されることが知られており^{22) 24)}、カスパーゼ9は細胞外からの刺激によりミトコンドリアから放出されるシトクロームcとApaf-1というタンパクとの結合がその活性化に重要であることが知られている^{25) 27)}。Apaf-1とは、細胞死が不完全である線虫の変異体から発見されたCED-4の哺乳類ホモログであり、CED-4同様細胞死誘導能を有しており、哺乳類においても発生期の細胞死に関与している可能性が示唆されている^{28) 29)}。我々はカスパーゼ3、カスパーゼ8、カスパーゼ9をはじめとした、種々のカスパーゼが胎児期の後腎において発現していることを確認した。また、カスパーゼ3の免疫染色とTUNEL法による細胞死の検出を同一胎児腎切片に行うと、カスパーゼ3陽性細胞が細胞死に陥っていることが確認され、胎児腎の細胞死においても、カスパーゼがその実行を担っていることが推測された。

カスパーゼの阻害による形態形成の影響を、*in vitro*での腎形態形成の研究において有用性の高い器官培養という系を用いて検討したところ、種々のカスパーゼの阻害剤であるZ-D-CH2DCBは、カスパーゼの活性化を抑制し、細胞死を抑制した上で、尿管芽の分岐および進展を抑制し、その結果LTレクチンで認識される将来ネフロンへと分化していくと考えられる構造物の生成を抑制した。この現象は、種々の刺激、状況でおこる細胞死実行の最下流で働くと考えられているカスパーゼ3の特異的阻害剤であるAc-DEVD-CHOの器官培養への添加でも認められた。カスパーゼ3のアンチセンスオリゴヌクレオチドを器官培養に添加した実験においても、同様の尿管芽分岐、進展抑制効果は認められており、この効果はカスパーゼの阻害によるものであり、薬剤による副作用ではないと考えられた。さらに我々は、胎児期の後腎においてカスパーゼ3の上流で働いているカスパーゼを検討するためにカスパーゼ1、カスパーゼ8、カスパーゼ9の特異的阻害剤を同様に器官培養に添加して検討したところ、カスパーゼ1、カスパーゼ8の阻害剤では尿管芽分岐、進展抑制効果は見られず、カスパーゼ9の阻害剤によってのみ認められた。

培養後腎の表面積は、*in vitro*において分化が進むにつれ大きくなるが、尿管芽の分岐、進展抑制効果が見られるカスパーゼ3、カスパーゼ9の阻害剤の添加は、それぞれ培養後腎の表面積が、無添加群、ロイペプチン添加群などにくらべてその増大も抑制されることが確認された。

カスパーゼ9の活性化にはApaf-1と複合体を形成す

第2表

カスパーゼ	発生異常	細胞死との関連
カスパーゼ-1	正常	
カスパーゼ-2	正常	卵母細胞が薬剤誘導細胞死耐性
カスパーゼ-3	生後死亡 (神経発生異常)	神経前駆細胞の細胞死不全
カスパーゼ-6	正常	クロマチン凝集異常
カスパーゼ-8	胎児期死亡 (心筋、血球系異常)	TNFR, Fasによる細胞死耐性
カスパーゼ-9	生後死亡 (神経発生異常)	神経前駆細胞の細胞死不全
カスパーゼ-11	正常	チュニカマイシン誘導細胞死耐性
カスパーゼ-12	正常	アミロイドβタンパクに耐性

現在までに報告されているカスパーゼ変異体マウスの発生異常をまとめたものである。すべてのカスパーゼの変異マウスが胎生致死になるわけではないが、このことは、カスパーゼがファミリーを形成し、他のカスパーゼが補う形で働くために表現形が得られないと考えられている。また、腎臓の発生異常を示す変異マウスが報告されていないのは、神経系や血管、血球系に異常が生じるために、腎臓に影響が出る前に、非常に大きなダメージが胎児に与えられるためと考えられる。

ることが重要であることが知られていると前述したが、ウェスタンブロッティング法による検討で、Apaf-1の発現が成体の腎臓よりも胎児期の腎臓において多く認められることも、カスパーゼ9の系が、胎児期後腎において重要であることを推測させた。

そこで我々はカスパーゼ9の活性化を、その活性対象となるペプチドを利用して作成された抗体を利用して³⁰⁾、胎児の腎臓における活性部位を検討した。過去の報告により、胎児腎において細胞死は未分化の間質細胞において認められることが知られていたが、カスパーゼ9活性化細胞はやはり間質に認められ、さらにApaf-1との二重染色によって、カスパーゼ9活性化は、Apaf-1発現細胞において認められることが確認された。

現在までにカスパーゼファミリーの一部に関してはノックアウトマウスが作成され、表2に記した通り、発生期における臓器形成不全により胎生致死となるものも報告されている^{31) 39)}。腎臓の形成不全は報告されていないが、神経系の異常による死亡は胎生期の早い時期に見られることが多いために、腎臓の異常が認められる前に死亡している可能性が考えられる。

以上より、後腎の形態形成において、カスパーゼの活性化を通じた細胞死の実行は、おそらく間質の未分化な細胞を除去することにより、正常な尿管芽の分岐、進展

を制御しており、複数存在するカスパーゼの活性化機構の中、カスパーゼ9を上流カスパーゼとする系が重要であることが推測された。

本研究により、腎形態形成のメカニズムにおける、正常細胞数維持の機構が一部解明されたが、今後さらなる検討が進むことにより最終的に *in vitro* での腎再生が可能となれば、末期腎不全治療の選択肢が大きく広がることが期待される。

総 括

腎形態形成における細胞死の役割を、細胞死実行遺伝子産物カスパーゼを介して、後腎の器官培養を用いて検討し、以下の結果を得た。

- 1 細胞死実行遺伝子産物カスパーゼは胎児期後腎において発現している
- 2 カスパーゼの阻害剤の添加により、尿管芽の分岐、進展およびネフロン様構造物の生成が抑制された
- 3 形態形成に及ぼす影響はカスパーゼ3、カスパーゼ9の特異的阻害剤では認められたが、カスパーゼ1、カスパーゼ8の特異的阻害剤では認められなかった
- 4 カスパーゼ9の活性化は Apaf-1 陽性細胞において認められた

以上、腎形態形成において細胞死は、Apaf-1 の発現により、カスパーゼ9、カスパーゼ3の活性化を通じて、不要に生成されすぎた細胞を除去することにより働いていることと推測した。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、直接研究の御指導をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室林松彦助教授に深謝いたします。さらに、研究の御助言をいただきました慶應義塾大学生理学教室岡野栄之教授、東京大学大学院遺伝学教室三浦正幸教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakatsuji N, Sasai Y : Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (3) : 1580-5, 2002
- 2) Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD : Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18 (6) : 675-9, 2000
- 3) Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM : Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 7 (1) : 89-99, 2001
- 4) Bagutti C, Wobus AM, Fassler R, Watt FM : Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes : comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev Biol* 179 (1) : 184-96, 1996
- 5) Shi Y : Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9 (3) : 459-70, 2002
- 6) Jacobson MD, Weil M, Raff MC : Programmed cell death in animal development. *Cell* 88 (3) : 347-354, 1997
- 7) Meier P, Finch A, Evan G : Apoptosis in development. *Nature* 407 (6805) : 796-801, 2000
- 8) Coles HS, Burne JF, Raff MC : Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 118 (3) : 777-784, 1993
- 9) J. E. Sulston and H. R. Horvitz : Post-embryonic cell lineages of the nematode. *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56 : 110-156, 1977
- 10) Miura M, Yuan J : Mechanisms of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *Curr Top Dev Biol* 32 : 139-74, 1996
- 11) Weil M, Jacobson MD, Raff MC : Is programmed cell death required for neural tube closure? *Curr Biol* 7 (4) : 281-284, 1997
- 12) Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC : A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol* 140 (1) : 153-8, 1998
- 13) J. A. Flaws, K. Kugu, A. M. Trbovich, A. DeSanti, K. I. Tilly, A. N. Hirshfield and J. L. Tilly : Interleukin-1b-converting enzyme-related proteases (IRPs) and mammalian cell death : Dissociation of IRP-induced oligonucleosomal endonuclease activity from morphological apoptosis in granulosa cells of the ovarian follicle. *Endocrinology* 136 : 5042-5053, 1995
- 14) S. Wang, M. Miura, Y. K. Jung, H. Zhu, V. Gagliardini, L. Shi, A. H. Greenberg and J. Yuan : Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1b converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *J. Biol. Chem.* 271 : 20580-0587, 1996
- 15) Saxen L, Lehtonen E : Embryonic kidney in organ culture. *Differentiation* 36 (1) : 2-1, 1987
- 16) Perantoni AO, Dove LF, Williams CL : Induction of tubules in rat metanephrogenic mesenchyme in the absence of an inductive tissue. *Differentiation* 48 (1) : 25-31, 1991
- 17) Koseki C, Herzlinger D, al-Awqati Q : Apoptosis in metanephric development. *J Cell Biol* 119 (5) : 1327-33, 1992

- 18) Hengartner MO, Horvitz HR : Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4 (4) : 581-586, 1994
- 19) Fraser AG, McCarthy NJ, Evan GI : drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells. *EMBO J* 16 (20) : 6192-6199, 1997
- 20) Hawkins CJ, Yoo SJ, Peterson EP, Wang SL, Vernooy SY, Hay BA : The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *J Biol Chem* 275 (35) : 27084-27093, 2000
- 21) Enari M, Talianian RV, Wong WW, Nagata S : Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380 : 723-726, 1996
- 22) Ashkenazi A, Dixit VM : Death receptors : signaling and modulation. *Science* 281 : 1305-1308, 1998
- 23) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME : Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14(22) : 5579-5588, 1995
- 24) Weber CH, Vincenz C : A docking model of key components of the DISC complex : death domain superfamily interactions redefined. *FEBS Lett* 492 (3) : 171-176, 2001
- 25) Costantini P, Bruey JM, Castedo M, Metivier D, Loeffler M, Susin SA, Ravagnan L, Zamzami N, Garrido C, Kroemer G : Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death Differ* 9 (1) : 82-88, 2002
- 26) Tetz T, Wei T, Liu D, Valentine V, Valentine M, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ : Caspase-9 and Apaf-1 are expressed and functionally active in human neuroblastoma tumor cell lines with 1p36 LOH and amplified MYCN. *Oncogene* 21 (12) : 1848-1858, 2002
- 27) Zou H, Li Y, Liu X, Wang X : An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274 (17) : 11549-56, 1999
- 28) Cecconi F, Alvarez BG, Meyer BI, Roth KA, Gruss P : Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94 : 727-737, 1998
- 29) Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X : Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90 (3) : 405-13, 1997
- 30) Nakanishi K, Maruyama M, Shibata T, Morishima N : Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J Biol Chem* 276 (44) : 41237-41244, 2001
- 31) Sadowski-Debbing K, Coy JF, Mier W, Hug H, Los M : Caspases-their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50 (1) : 19-34, 2002
- 32) Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA : Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94 (3) : 325-37, 1998
- 33) Wang J, Lenardo MJ : Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* 113 : 753-757, 2000
- 34) Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer B, Roth KA, Gruss P : Apaf-1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94 : 727-737, 1998
- 35) Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun L, Jurisicova A, Varmuz S, Latham KE, Flaws JA, Salter JCM, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tily JL, Yuan J : Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes & Dev* 12 : 1304-1314, 1998
- 36) Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA : Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384 : 368-372, 1996
- 37) Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtman H, Lonai P, Wallach D : Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9 : 267-276, 1998
- 38) Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW : Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo*. *Cell* 94 : 339-352, 1998
- 39) Ruchaud S, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH, Earnshaw WC : Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *EMBO J* 21 (8) : 1967-77, 2002

慶應医学 第83巻第1号号外
平成18年3月25日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第179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12月12日 慶大博士甲第2498号	安部 貴人	昭和46年12月28日
平成18年1月16日 慶大博士甲第2509号	潮見 隆之	昭和47年9月5日
同 第2511号	杜 雯林	昭和47年9月30日
同 第2512号	林田 健太郎	昭和50年10月24日
同 第2513号	一松 収	昭和46年6月4日
同 第2514号	松村 紳一郎	昭和45年11月18日
平成18年2月13日 慶大博士甲第2542号	高橋 努	昭和48年5月1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12月12日 慶大博士乙第3987号	稲見 州治	昭和37年1月23日
同 第3988号	内田 敬子	昭和44年8月8日
同 第3989号	小杉 志都子	昭和47年7月11日
同 第3990号	小武海 成之	昭和37年7月12日
平成18年1月16日 慶大博士乙第3997号	今井 栄子	昭和23年2月21日
同 第3998号	高本 俊介	昭和44年12月5日

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成18年 1月16日 慶大博士乙第3999号	小 宮 浩 一 郎	昭和45年 5月26日
同 同 第4000号	佐 藤 通 洋	昭和29年 1月21日
同 同 第4001号	菅 野 康 夫	昭和47年 6月30日
同 同 第4002号	戸 坂 果 林	昭和49年10月14日
同 同 第4003号	中 村 威	昭和46年 3月13日
同 同 第4004号	野 尻 賢 哉	昭和45年10月 2日
同 同 第4005号	原 智	昭和46年 9月 9日
同 同 第4006号	吉 井 毅	昭和46年 3月26日
平成18年 2月13日 慶大博士乙第4012号	齋 藤 治 和	昭和40年 4月 7日
同 同 第4013号	浅 沼 宏	昭和39年 9月 8日
同 同 第4014号	大 塚 崇	昭和46年11月14日
同 同 第4015号	小 熊 剛	昭和41年 9月 5日
同 同 第4016号	鈴 木 武 志	昭和47年 7月13日
同 同 第4017号	堀 永 実	昭和44年 4月26日
同 同 第4018号	三 山 佐 保 子	昭和34年 9月25日

目 次

安部 貴人	Oxidative metabolism in cultured rat astroglia : effects of reducing the glucose concentration in the culture medium and of D-aspartate or potassium stimulation (ラット培養アストロサイトの酸化的代謝に対する低グルコース培養とD-アスパラギン酸ないしカリウム刺激の影響)	5
潮見 隆之	Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151 (潜在型 MMP-7 (潜在型マトリライシン-1) のCD151との相互作用を介した細胞周囲での活性化)	6
杜 雯林	Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment (多発性骨髄腫患者の骨髄における腫瘍血管新生とサリドマイド治療による影響) ..	7
林田健太郎	Down-regulation of p27 ^{Kip1} Promotes Cell Proliferation of Rat Neonatal Cardiomyocytes Induced by Nuclear Expression of Cyclin D1 and CDK4 (p27 ^{Kip1} の発現低下によりサイクリンD1、CDK4による新生仔ラットの心筋細胞増殖は促進される)	8
一松 収	Identification and characterization of novel gut-associated lymphoid tissues in rat small intestine (ラット小腸における新たな腸管リンパ組織の同定と解析)	9
松村紳一郎	Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice (MMP-2の遺伝子欠損と薬理学阻害はマウスにおける心筋梗塞後心破裂を抑制する)	10
高橋 努	Semilobar Holoprosencephaly with Midline 'Seam' : A Topologic and Morphogenetic Model Based Upon MRI Analysis (Midline 'Seam' を伴ったSemilobar Holoprosencephaly : MRIに基づいたトポロジカルモデル)	11
稲見 州治	Determination of reference intervals for vibratory perception thresholds of the lower extremities in normal subjects (健常人下肢の振動覚閾値に関する研究)	12
内田 敬子	Critical Regions for Activation Gating of the Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor (イノシトール三リン酸受容体におけるチャンネル開口に必要な領域の同定)	13
小杉志都子	Epidural Analgesia Prevents Endotoxin-Induced Gut Mucosal Injury in Rabbits (家兎内毒素惹起性腸管粘膜傷害における硬膜外麻酔の保護効果)	14
小武海成之	縦断的前向き研究からみた閉経前女性における腰椎骨密度の経時的変化に関する検討	15
今井 栄子	Surgical site infection surveillance after open gastrectomy and risk factors for surgical site infection (開腹胃切除後の術後感染サーベイランスと術後感染リスク因子)	16
高本 俊介	Effect of specific antigen stimulation on intraepithelial lymphocyte migration to small intestinal mucosa (特異的抗原刺激による腸上皮間リンパ球の小腸粘膜マイグレーションへ与える影響)	17

小宮浩一郎	Expression of ADAM 15 in rheumatoid synovium: up-regulation by vascular endothelial growth factor and possible implications for angiogenesis (関節リウマチ滑膜におけるADAM15の発現：血管内皮細胞成長因子による発現亢進と血管新生への関与について)	18
佐藤 通洋	Reevaluation of Ultrasonography for Solid-Organ Injury in Blunt Abdominal Trauma (鈍的腹部外傷における実質臓器損傷に対する超音波断層法の再評価)	19
菅野 康夫	Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction (心筋梗塞後早期リモデリングにおけるG-CSFの効果)	20
戸坂 果林	Association between glaucoma and gene polymorphism of endothelin type A receptor (緑内障とエンドセリンA受容体の遺伝子多型との関連)	21
中村 威	Expression of basic fibroblast growth factor is associated with a good outcome in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus (食道扁平上皮癌における塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) の発現は良好な術後成績に関与する)	22
野尻 賢哉	日本人脊椎骨の解剖学的、放射線学的研究	23
原 智	Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor (腎細胞癌におけるAktの活性化：PTEN発現の低下の寄与とAkt阻害剤によるアポトーシス誘導)	24
吉井 毅	Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis (ヒト精子核タンパク質の2次元電気泳動法による解析)	25
齋藤 治和	Specific expression of an HNK-1 carbohydrate epitope and NCAM on femoral nerve Schwann cells in mice (マウス大腿神経シュワン細胞におけるHNK-1糖鎖抗原とNCAMの特異的発現)	26
浅沼 宏	PHOTODYNAMIC THERAPY WITH PAD-S31, A NEW HYDROPHILIC CHLORIN PHOTOSENSITIZER, IN AN ORTHOTOPIC RAT BLADDER TUMOR MODEL (正所性ラット膀胱腫瘍モデルにおける新たな親水性クロリン光感受性物質であるPAD-S31を用いた光線力学的療法)	27
大塚 崇	ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis (ADAM28は非小細胞肺癌で過剰発現し、細胞増殖とリンパ節転移と相関する)	28
小熊 剛	Cyclooxygenase-2 Expression during Allergic Inflammation in Guinea-Pig Lungs (モルモットのアレルギー性気道炎症モデルにおけるシクロオキシゲナーゼ-2の発現)	29
鈴木 武志	Infusion of the β -adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats (β 遮断薬エスマロールは敗血症ラットにおける心機能障害の進行を抑制する)	30
堀永 実	INTRAVESICAL INTERLEUKIN-12 GENE THERAPY IN AN ORTHOTOPIC BLADDER CANCER MODEL (正所性膀胱癌モデルにおける膀胱内インターロイキン-12遺伝子治療)	31
三山佐保子	Continuity with Ganglionic Eminence Modulates Interkinetic Nuclear Migration in the Neocortical Pseudostratified Ventricular Epithelium (胎生期大脳新皮質pseudostratified ventricular epitheliumにおいて、神経前駆細胞核のエレベーター運動は線条体原基により調節をうける)	32

Oxidative metabolism in cultured rat astroglia : effects of reducing the glucose concentration in the culture medium and of D-aspartate or potassium stimulation

(ラット培養アストロサイトの酸化代謝に対する低グルコース培養と
D-アスパラギン酸ないしカリウム刺激の影響)

安部 貴人

内容の要旨

基礎活動時および神経活動亢進時に、アストロサイトが主に何をエネルギー基質にしているのかは明らかになっていない。細胞外乳酸の酸化率は酸化代謝すなわちTCAサイクルの活動度の指標となるが、培養細胞を用いた実験結果では、 $[^{14}\text{C}]$ lactateを基質とした際の $^{14}\text{CO}_2$ への酸化率はニューロンの方が高いとする報告と、ニューロンとアストロサイトで同程度とする報告があり一定していない。

ラットの脳の細胞外液中のグルコース濃度は $0.5\sim 3.3\text{mM}$ と報告されているが、通常の細胞培養に使用される培地中のグルコース濃度はこれに比べ非常に高い。しかし、生理的範囲内のグルコース濃度で培養されたアストログリアのエネルギー代謝についてはほとんど検討されていない。今回我々は、ラット大脳皮質由来のアストログリアを用い、低グルコース濃度下での培養がアストログリアのエネルギー代謝にどのような影響を与えるかを検討した。グルコース利用率評価のため、 $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseリン酸化率を測定した。TCAサイクルの活動度の指標として、 $[^{14}\text{C}]$ lactateおよび $[^{14}\text{C}]$ glucoseの、 $^{14}\text{CO}_2$ への酸化率を測定した。

また、細胞内 Na^+ 濃度ないし細胞外 K^+ 濃度の上昇は Na^+ 、 K^+ -ATPase活性を上昇させエネルギー需要を増やすことが知られており、定常状態でのエネルギー基質利用率に加えこれらの状態下でのエネルギー基質利用率の変化を検討した。

ニューロン、低グルコース下 (2mM) で培養したアストログリア (アストログリア₁)、高グルコース下 (22mM) で培養したアストログリア (アストログリア₂) の $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseリン酸化率は同程度であったが、アストログリア₁のグルコース酸化率、乳酸酸化率はアストログリア₂の各々2倍程度であった。D-アスパラギン酸による細胞内 Na^+ 濃度上昇は、アストログリア₁およびアストログリア₂の $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseリン酸化率、グルコースおよび乳酸酸化率を上昇させた。しかし細胞外 K^+ 濃度の上昇はアストログリア₁およびアストログリア₂の $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseリン酸化率を増加させたものの、酸化代謝には影響を与えなかった。このように、両アストログリアとも活性化された際には高いグルコースおよび乳酸酸化能を示すが、高グルコース濃度下での培養は、定常時のアストログリアの酸化代謝活性を著明に抑制することが明らかとなった。

神経興奮時に局所に増加する乳酸がどのような運命をたどるのかという事については、はっきりとした結論が出ていない。これまでニューロンがエネルギー基質として取り込む可能性が考えられてきたが、本研究の結果からはアストロサイトもまた乳酸を取り込みエネルギー基質とする能力を有していると考えられた。

論文審査の要旨

基礎活動時および神経活動亢進時に、アストログリアが主に何をエネルギー基質にしているのかは明らかになっていない。本研究では、ラット大脳皮質由来のアストログリアを用い、低グルコース濃度下での培養がアストログリアのエネルギー代謝にどのような影響を与えるかを検討した。グルコース利用率評価のため、 $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseリン酸化率を、またTCAサイクルの活動度の指標として、 $[^{14}\text{C}]$ lactateおよび $[^{14}\text{C}]$ glucoseの、 $^{14}\text{CO}_2$ への酸化率を測定した。ニューロン、低グルコース下 (2mM) で培養したアストログリア (アストログリア₁)、高グルコース下 (22mM) で培養したアストログリア (アストログリア₂) の $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseリン酸化率は同程度であったが、アストログリア₁のグルコース酸化率、乳酸酸化率はアストログリア₂の各々2倍程度であった。D-アスパラギン酸による細胞内 Na^+ 濃度上昇は、アストログリア₁およびアストログリア₂の $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseリン酸化率、グルコースおよび乳酸酸化率を上昇させた。しかし細胞外 K^+ 濃度の上昇はアストログリア₁およびアストログリア₂の $[^{14}\text{C}]$ deoxyglucoseリン酸化率を増加させたものの、酸化代謝には影響を与えなかった。このように、両アストログリアとも活性化された際には高いグルコースおよび乳酸酸化能を示すが、高グルコース濃度下での培養は、定常時のアストログリアの酸化代謝活性を著明に抑制することが明らかとなった。

審査ではまず、本来のニューロン・アストログリア相互作用を考えると、両者の混合培養系での代謝の変化を解析する必要があるのではないかととの質問があり、両者の混合培養は現段階では技術的に困難であるが、今後培養系の調整により克服していく予定であると回答された。さらに、今回の解析に用いられた培養ニューロンの成熟度やviabilityは検討されているか、との質問には今後電気生理学的特性などを含め検討していく予定であると回答された。次に、これまでのアストログリアの培養に一般に高濃度グルコース培地が用いられてきた理由についての質問には、かつてはニューロンの培養が主眼であったため培地交換の必要性の低い高濃度培地が用いられていた可能性が高いと回答された。さらに、培地に fetal bovine serum (FBS) が加えられているがグルコース濃度を変化させてしまうので必要ないのではないかととの質問に対して、従来の慣習にしたがってFBSを加えたが、非添加状態では検討していないと回答された。培養された細胞の評価については、免疫染色によりアストログリアとニューロンを同定して純粋性を評価した上で実験が進められたと回答された。さらに、大脳皮質から採取したアストログリアと基底核から採取したニューロンの機能の比較は妥当であるかととの質問には、すでにアストログリアの部位別の機能について差がほとんど見られないことを確認しているとの回答があった。さらに、アストログリアに比べニューロンの方が酸化代謝に依存しているという結論に対しては、両者でLDH isozymeが異なる可能性、乳酸の細胞内トランスポーターが異なる可能性、およびビルビン酸をTCAサイクルに取り込むpyruvate dehydrogenaseが異なる可能性などが考えられるが、本研究からは結論はできな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はいるが、アストログリアもまた乳酸を取り込みエネルギー基質とすることを明らかにした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 鈴木 則宏
解剖学 仲嶋 一範 外科学 河瀬 斌
生理学 岡野 栄之
学力確認担当者：
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成17年10月26日

Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151

(潜在型 MMP-7 (潜在型マトリライシン-1) のCD151との相互作用を介した細胞周囲での活性化)

潮 見 隆 之

内容の要旨

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 遺伝子ファミリーは、 Zn^{2+} イオンを必要とするメタロプロテアーゼで、ヒトでは23種類の分子種が同定されている。これらの酵素群は、生体内のほとんどすべての細胞外マトリックス (ECM) 成分に加えて非ECM分子分解能を有し、生理的状态での組織構築変化や病的状態での組織破壊に重要な役割を果たしている。ヒト肺癌や子宮内膜癌においては、MMP 遺伝子ファミリーの1分子である潜在型MMP-7 (マトリライシン-1) の活性化が浸潤・転移や予後と相関することが報告されているが、その活性化機構は全く不明である。

本研究では、潜在型MMP-7と結合する候補分子をスクリーニングし、候補分子との相互作用と潜在型MMP-7活性化との関係を検討するとともに、これらの肺癌組織での作用について調べた。

酵母two-hybrid systemで潜在型MMP-7をbaitとして、ヒト肺癌組織のcDNAライブラリーをスクリーニングし、候補分子としてインテグリンと結合する4回膜貫通型の膜タンパク質であるCD151分子を見いだした。MMP-7とCD151の両分子を発見するヒト直腸癌由来細胞株CaR-1細胞からMMP-7あるいはCD151を免疫沈降すると、両分子は共沈した。また、CD151を強制発現したCOS7細胞に精製した潜在型MMP-7を加えて免疫沈降しても、同様のデータが得られた。一方、精製した潜在型MMP-3を加えた実験では、共沈しなかった。アイソトープ標識潜在型MMP-7を用いたbinding assayでは、CD151発現細胞に有意に潜在型MMP-7が結合し、非標識潜在型MMP-7による競合阻害実験および抗CD151抗体を用いた阻害実験により結合の特異性が証明された。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による観察で、両分子はこれらの細胞膜上に共存した。潜在型MMP-7とCD151のdeletion mutantを用いた酵母two-hybrid assayにより、潜在型MMP-7のpropeptideとCD151のCOOH末端側の細胞外ループが結合に関与していることを明らかにした。*In situ* zymographyにより、両細胞はプロテアーゼ活性を出現し、その活性はMMP阻害剤やMMP-7抗体およびCD151抗体で阻害され、両分子の相互作用により潜在型MMP-7が活性化されることを証明した。さらに、ヒト肺癌組織においても、両分子の相互作用による潜在型MMP-7活性化を認めた。

以上の結果は、CD151が潜在型MMP-7との結合により細胞膜表面での潜在型MMP-7の活性化に関わることを示しており、本活性化機構がヒト肺癌の浸潤・転移をはじめとした種々の病的組織破壊に関わる可能性を示唆している。

論文審査の要旨

ヒト肺癌や子宮内膜癌において、潜在型MMP-7 (マトリライシン-1) の活性化が浸潤・転移や予後と相関することが報告されているが、その活性化機構は不明である。本研究では、酵母two-hybrid systemで潜在型MMP-7結合候補分子としてCD151分子を見出し、両分子の結合を免疫沈降法とbinding assayで証明するとともに、共焦点レーザー顕微鏡により細胞膜上での両分子の共存を確認した。また、酵母two-hybrid assayにより、潜在型MMP-7のpropeptideとCD151のCOOH末端側の細胞外ループが結合に関与していることを示した。さらに、*in situ* zymographyで両分子の相互作用により潜在型MMP-7が細胞膜上で活性化されることを明らかにし、本活性化機構がヒト肺癌組織においても作用していることを示した。

審査では、CD151とインテグリン分子の結合部位について質問があり、COOH末端側の細胞外ループが関与していると回答された。また、実験で用いた細胞におけるインテグリン分子の発現について質問され、CaR-1細胞ではインテグリン $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$ が発現していると説明された。トリプシンによる潜在型MMP-7の活性化について説明を求められたが、これまでのデータは*in vitro*での活性化であり、生体内での関与については報告がないと回答された。*In situ* zymographyの像の解釈と用いた2種類の細胞による基質分解パターンの違いについて質問があり、写真が白黒で分かりにくくなっている点とMMP-7の産生量や活性化因子の発現レベルの差を反映している可能性が高いと説明された。また、活性化における基質の必要性について質問があった。これに対しては、基質の存在下ではCD151およびインテグリンの膜表面上での安定性に変化が生じ、潜在型MMP-7の活性化が促進されるためと説明された。免疫二重染色について使用している2つの抗CD151抗体のうち、CD151との結合をブロックする抗体で染色しても両分子が共存することを示す所見が得られた理由について質問された。これについては、CD151は局所に濃縮しており、潜在型MMP-7が結合したCD151とfreeのCD151が近接して存在しているためではないかと回答された。また、免疫二重染色においてCD151の染色が細胞質内に認められる原因について質問され、CD151の一部は細胞質内にも局在するとの報告があると回答された。CD151のpeptidase活性の有無については、アミノ酸シークエンスおよびこれまでの文献上、活性は無いと説明された。

以上、本研究は活性化因子が決定されていないという課題を残しているものの、潜在型MMP-7が細胞膜上でCD151との相互作用で活性化されるという新規活性化機構を細胞およびヒト肺癌組織で証明しており、MMPと癌細胞浸潤・転移研究分野において有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 病理学 岡田 保典
医化学 末松 誠 微生物学・免疫学 小安 重夫
病理学 坂元 亨宇

学力確認担当者:

審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成17年11月28日

Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment

(多発性骨髄腫患者の骨髄における腫瘍血管新生とサリドマイド治療による影響)

杜 雯 林

内容の要旨

血管新生は固形腫瘍の成長、浸潤、転移に重要である。血管新生は血管内皮増殖因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) などによりコントロールされると報告されている。最近、血管新生は白血病や多発性骨髄腫を含む造血器腫瘍にも認められると報告された。われわれは51例の未治療の多発性骨髄腫あるいは単クローン性高ガンマグロブリン血症患者の骨髄生検検体について、血管数を計測し、血管密度を計算した。移植ドナーあるいは非造血器腫瘍の剖検例よりの骨髄検体を対照群として用いた。対照群と比較して、未治療の多発性骨髄腫患者の骨髄において、血管密度の上昇が認められた。また、骨髄腫細胞の骨髄への浸潤が中等度から高度の場合、有意な血管密度の増加が認められ、血管密度と骨髄腫細胞の骨髄浸潤程度との相関が認められた。最近、サリドマイドが多発性骨髄腫に有効であると報告された。われわれは、従来の治療法に抵抗性でサリドマイド治療になった11症例について、サリドマイド投与前後の骨髄血管密度を計測し、血漿中あるいは尿中のMタンパク濃度、血漿中FGF-2、VEGF濃度をELISA法で測定し、サリドマイドの治療効果と血管新生との関連について検討した。サリドマイド投与症例11例では、サリドマイド投与後に血漿中或いは尿中のMタンパク濃度が低下したのは7症例であり、3症例はMタンパク濃度に有意な変化はなく、1例はMタンパク濃度が増加した。血漿中のFGF-2とVEGF濃度は、11症例のすべてにおいてサリドマイド投与後に低下が認められた。骨髄血管密度を計測したところ、Mタンパク濃度が低下し、サリドマイド治療に反応性の7症例中3症例に骨髄血管密度の低下が認められた。サリドマイド投与症例における血漿中のFGF-2、VEGF濃度変化と骨髄血管密度の変化との関連性の有無について検討したところ、有意な関連性は得られなかった。これは血漿中の血管新生関連因子の他にも何らかの因子が存在し、複数の因子の影響で骨髄局所的な血管密度の変化をもたらす、血漿中のFGF-2、VEGF濃度の低下のみで十分な骨髄血管密度の低下を来すことはできないと考えた。血管新生阻害剤の効果を単純に可視的な骨髄血管密度の変化で代替することはできない可能性も考えられた。

本研究は血管新生は造血器腫瘍である多発性骨髄腫にもみられることを示した。また、骨髄血管密度が骨髄腫細胞の骨髄浸潤程度に相関するという結果より、血管新生は骨髄腫の成長に関連すると推測できる。血管新生抑制は多発性骨髄腫の治療に有用と期待される。

論文審査の要旨

多発性骨髄腫は高齢者に発生する予後の悪い悪性造血器腫瘍である。最近、抗血管新生、免疫機構とサイトカインの調節作用を有するサリドマイドが骨髄腫の治療薬として使用され始めた。本研究では、骨髄腫患者の骨髄生検検体を用いて骨髄血管密度を計測した結果、骨髄腫患者の骨髄血管密度の上昇および腫瘍浸潤程度との相関が認められ、また血漿中の血管新生促進因子FGF-2、VEGF濃度も高値であった。サリドマイド投与症例では、投与後に血漿FGF-2、VEGF濃度が低下したが、骨髄血管密度に明らかな減少傾向はみられなかった。以上より、血管新生は多発性骨髄腫にもみられ、骨髄腫の成長に関連すると示唆された。サリドマイドは骨髄腫に対して一定の血管新生抑制作用を有すると推測された。

審査では、骨髄生検の採取部位、血管密度の計測方法について質問がなされた。骨髄検体は患者の腸骨より採取され、各検体の切片はCD34に対する免疫染色の後、ブラインドで骨髄腔内の有核造血細胞が集積し、脂肪細胞が少なく、骨梁骨を含まない部位のCD34陽性血管数を計測したと回答された。コントロール群と骨髄腫群の血管密度における有意差の有無とその統計方法について質問がなされた。コントロール群とover allの骨髄腫群では有意差はないが、骨髄腫の骨髄浸潤中等度・高度群に血管密度の有意な増加が認められ、統計方法はt検定を用いたと回答された。骨髄腫における骨髄線維化の有無について質問がなされ、骨髄浸潤高度の骨髄腫の多くに線維化がみられたと回答された。また、サリドマイド投与量と骨髄検体採取時期についての質問に対して、重大な副作用がない場合に増量されたケースがあり、投与後4週間の時点で骨髄検体が採取されたと回答された。さらに、サリドマイド治療効果と血管密度の変化との相関の有無およびサリドマイドの抗血管新生作用について質問がなされた。高値であったFGF-2、VEGF濃度がサリドマイド治療後に顕著に低下したことより、サリドマイドに抗血管新生作用があると考えるが、骨髄生検検体では血管密度の減少傾向はみられなかった。これは、全身性に循環する血管新生促進因子が減少しても、骨髄に血管密度の変化をもたらすには時間がかかり、また2次元的に計測した血管密度は抗血管新生効果を反映する指標として不十分であるとも考えられ、抗血管新生作用を反映しうる指標についての研究は今後の課題である。骨髄生検は微小検体であり、全身骨髄の血管新生の変化を検索するには検体量が小さすぎるが、検体採取は患者の負担になり、検査手段の限界であると回答された。

以上、本研究は、さらに検討すべき課題を残しているものの、骨髄生検検体を用いて多発性骨髄腫における血管新生の関与を示し、また新薬の治療効果を病理学的に検討した点で今後骨髄腫の診断・治療の向上に役立つ有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 病理学 坂元 亨宇
病理学 岡田 保典 微生物学・免疫学 小安 重夫
薬剤学 谷川原 祐介
学力確認担当者：
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成17年12月28日

Down-regulation of p27^{Kip1} Promotes Cell Proliferation of Rat Neonatal Cardiomyocytes Induced by Nuclear Expression of Cyclin D1 and CDK4

(p27^{Kip1}の発現低下によりサイクリンD1、CDK4による新生仔ラットの心筋細胞増殖は促進される)

林 田 健 太 郎

内容の要旨

心筋細胞は他の細胞とは異なり、出生後急速に細胞周期を停止し、増殖能を失う。その結果、心筋梗塞等により一度傷害された心筋組織は再生せず、不可逆的で重篤な心機能低下をきたすことが知られている。これまで心筋細胞における細胞周期のメカニズムについて多くの研究が報告されてきた。細胞増殖の開始段階では、多くの細胞では増殖刺激に対し、細胞周期調節因子であるサイクリンD1が増加し核内に移行することが知られている。近年Adachiらにより、新生仔ラットの培養心筋細胞では、増殖刺激によるサイクリンD1は発現が増加するものの、核内に移行しないことが明らかとなった。さらに核内移行シグナル(NLS: nuclear localizing signal)を連結したサイクリンD1(以後サイクリンD1NLS)を、共役して働くサイクリン依存性キナーゼ4(CDK4)とともにアデノウイルスベクターを用いて核内に強制発現させることにより、心筋細胞が再び細胞周期に入り、細胞分裂を開始することを明らかにした。

しかしサイクリンD1NLS/CDK4の強制発現による方法では、今回心筋細胞は一週間ほどで増殖を停止してしまうことが同時に示されたが、その機序は不明であった。今回我々は心筋細胞において、他の細胞周期調節因子について解析した結果、細胞周期に抑制的に働くサイクリン依存性キナーゼ抑制因子p27の発現が著明に亢進すること、これに伴いサイクリン依存性キナーゼ2(CDK2)の活性が抑制され、細胞周期の停止につながることを見いだした。p27はユビキチンリガーゼSkp2を介するユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることが知られている。われわれはサイクリンD1NLS/CDK4の強制発現により増殖を開始した心筋細胞では、Skp2の発現が低下することにより、p27のSkp2依存性のユビキチン化が抑制され、p27の発現が亢進することを明らかにした。さらにSkp2のアデノウイルスベクターによる強制発現、またはp27のsmall interfering RNAによりp27の発現を特異的に低下させることにより、CDK2活性が増加し、サイクリンD1NLS/CDK4による心筋細胞増殖がさらに促進されることを見いだした。

以上により、心筋細胞ではユビキチンリガーゼSkp2の発現低下により、ユビキチン・プロテアソーム系による細胞周期抑制因子であるp27の分解が抑制され、発現量が増加するために細胞周期の停止に至り、増殖能を失うことが明らかになった。これらの所見は哺乳類の心筋細胞が終末分化に到る過程で増殖を停止する分子機序を解明する上で重要な現象であり、今後の研究に新たな影響を与えるものと考えられる。

論文審査の要旨

心筋細胞は出生後急速に細胞周期を停止し、増殖能を失うため、従来から心筋細胞増殖を目指してさまざまな試みがなされてきた。近年新生仔ラットの培養心筋細胞で、核内移行シグナル(NLS)を連結したサイクリンD1(以後サイクリンD1NLS)を、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)4とともにアデノウイルスベクターを用いて核内に強制発現させることにより、心筋細胞が再び細胞分裂を開始することが報告されたが、この方法では一週間ほどで増殖を停止してしまい、その機序は不明であった。今回我々はサイクリンD1NLS/CDK4の強制発現により増殖を開始した心筋細胞において、ユビキチンリガーゼを構成するSkp2の発現低下により、サイクリン依存性キナーゼ抑制因子であるp27のSkp2依存性のユビキチン化が抑制され、p27の発現が著明に亢進することによりCDK2の活性が抑制され細胞周期の停止につながることを、またSkp2のアデノウイルスベクターによる強制発現、またはp27のsiRNAによりp27の発現を特異的に低下させると、CDK2活性が増加しサイクリンD1NLS/CDK4による心筋細胞増殖がさらに促進されることを見いだした。

審査では、まず細胞周期解析においてG0期とG1期の区別についての質問があったが、現在分子生物学的な定義は確立されていないものの、Rb蛋白のリン酸化が一つの指標となり本研究でも確認されていることが示された。またSKp2のトランスジェニック、またノックアウトマウスの発現型と今回の結果との関係については、SKp2のノックアウトマウスでは躰は矮小であるものの心臓の発生については野生型とほとんど差がなく、心筋細胞においてSKp2の発現低下によるp27の増加をきたしているという今回の結果と合致することが示された。またSKp2の強制発現による他の細胞周期制御因子への影響、アポトーシスを起こしている可能性に関しては、既知の細胞周期制御因子に関しては余り変化がないこと、またTunel染色で陽性細胞の増加は見られず、否定的である旨回答された。さらに心筋細胞増殖時の増殖効率のコントロールと機能の維持についての質問に対しては、現在のところアデノウイルスベクターを用いているが完全に増殖の開始、停止をコントロールできる段階にはいたっておらず、癌化の危険性もあり再生医療への実用的な応用に向けては今後の更なる検討が必要であると回答された。また本論文はequal contributionとなっているが、実験の中でユビキチンアッセイとsiRNA作成は担当していない点を確認された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているが、心筋細胞の発生、分化機序の解明と心筋再生医療への応用の可能性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 内科学 小川 聡
外科学 四津 良平 生理学 岡野 栄之
発生・分化生物学 須田 年生
学術確認担当者:

審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年11月28日

Identification and characterization of novel gut-associated lymphoid tissues in rat small intestine

(ラット小腸における新たな腸管リンパ組織の同定と解析)

一 松 収

内容の要旨

腸管には様々な免疫的防御機構が備わっており、腸管免疫装置 (GALT) が腸管の免疫応答を制御していると考えられている。最近、マウス腸管全域の陰窩に相当する粘膜固有層内に新規のリンパ球小集簇、クリプトパッチ (CP) が見出された。CPは未分化なリンパ球集団であり、さらに胸腺外で発達分化する腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) が成熟する局所であることも確認された。

一方で、ヒト成人腸管では未分化リンパ球集簇は、現在まで確認されていない。ラットはマウスやヒトに次いで各種抗体を含めた研究材料の入手が比較的容易であること、また一部のラットIELは胸腺外分化することが示唆されている。そこで、ラットにもマウスCPに相当する組織が存在するか否かを精査した。

ラット小腸粘膜をヘマトキシリンエオジン染色し精査した結果、ラット小腸粘膜にもリンパ球小集簇を見出すことができ、これらのリンパ球小集簇は粘膜固有層の陰窩部分から絨毛の中にまでリンパ球が充填されており、形態学的にLFV (Lymphocyte-filled villi) であった。LFVが未分化リンパ球集簇である可能性を示唆する報告は認められるが、現在までにそれを証明した報告はない。そこでLFVをCPの未分化リンパ球マーカーであるc-kit、IL-7Rに対する抗体で染色したところ、ラットLFVを構成する大部分の細胞はc-kit、IL-7Rを発現し、さらにIgM陽性細胞集簇を含むもの (IgM⁺ LFV) と含まないもの (IgM⁻ LFV) の二種類に分けられた。IgM⁺ LFVはその基底部にIgM陽性Bリンパ球が分布し、これらは腸間膜対側に沿ってほぼ一直線に並んでいた。一方、IgM⁻ LFVは腸管全体にランダムに分布していた。

胎仔～新生仔ラットの腸管粘膜にはパイエル板以外にリンパ球集簇は認められず、生後13日目になってはじめてLFVを見出すことができ、この週齢のLFVはすべてIgM⁻ LFVであった。また、22週齢ラット腸管では、ほとんどのLFVがIgM⁺ LFVであり、これらのIgM⁺ LFVは腸間膜対側のみならず腸管全体に分布していた。さらに22週齢ラットの一部のIgM⁺ LFVはやや大型の細胞が分布している領域があり、この領域はPNA陽性、IgA陽性細胞が分布していた。

今回の研究で、ラットLFVのほとんどの細胞はc-kit、IL-7Rに対する抗体で染まり、ラットLFVはマウスCPと同様、未分化なリンパ球で構成されていることが判明した。さらにB細胞集簇を伴うLFVが存在すること、22週齢のラットにおいて認められる大型の細胞を含むIgM⁺ LFVは、PNA、IgA陽性の胚中心を保持することから、ラットLFVには孤立リンパ小節の特徴を持つものも含まれることが分かった。

論文審査の要旨

マウスにおいてクリプトパッチ (CP) は腸管粘膜内陰窩部に分布する、c-kit陽性IL-7R陽性の未熟なリンパ球の小集積であり、腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) が分化・発達するリンパ装置であることが確認されている。今回の研究において、ラット小腸には、陰窩部のみに限局して分布するリンパ球の存在を認めなかったものの、LFV (Lymphocyte-filled villi) 中のリンパ球のほとんどが、c-kit陽性、IL-7R陽性の未分化リンパ球であることが明らかとなった。またLFVは、IgM陽性のBリンパ球を含むもの (IgM⁺ LFV) と含まないもの (IgM⁻ LFV) とに分類できることが分かった。さらに週齢の進んだラットにおいては、一部のIgM⁻ LFVはPNAおよび抗IgA抗体で染色される胚中心を保持することも分かった。以上より、ラット小腸腸管粘膜には、未分化なリンパ球の小集積が分布していること、また、孤立リンパ小節様組織も認められることが分かり、これらはラットにおいて新たに見いだされた腸管リンパ装置であると考えられた。

審査では、先ずマウスにおけるCPが詳細に分析されていることをふまえて、本研究の新規性について質問があった。腸管粘膜内の未分化なリンパ球の小集積がマウスだけに特異的なものかどうか検討することは重要であり、他の動物種にも存在することが今回の研究で確認できたことは、腸管粘膜内における未分化なリンパ装置の普遍性につながり得る点で新規性があると回答された。方法論として、いかにしてラットのLFVの総個数を数えたか質問がなされた。腸管全長にわたり、新鮮凍結ブロックを作成し、さらに連続薄切切片にて個数をカウントしたと回答がなされた。また、今回ラットで認められたリンパ球の小集積をヌードラットにおいても検索したかどうか質問がなされた。ヌードラットにもこの未熟なリンパ球の小集積が認められることから、これは胸腺非依存性に発達したリンパ組織であると考えられると回答された。さらに、腸間膜対側にIgM⁻ LFVが並んで分布している理由について質問がなされた。マウスの孤立リンパ小節やパイエル板は、腸間膜対側に並んで分布しているので、おそらく関連性があるのであろうが、今後の検討課題であると回答された。最後に、本研究の今後の方向性について質問がなされた。今回の研究は免疫組織化学的に検討を行ったものであり、今後、GFPラットの骨髄移植モデルで、LFVからIELが分布していくかどうかを解析したいと回答された。これについて、生理的な役割はもちろん重要であるが、それにとどまらず、小腸移植時や、Bacterial translocation時に、これらのリンパ組織がどう病態に関連するかなど、臨床的意義を追究する必要があるとの指摘を受けた。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき点はあるものの、ラットにおける新たなリンパ装置を免疫組織学的に明らかにした点で意義のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 日比 紀文
外科学 北島 政樹 微生物学・免疫学 小安 重夫
病理学 岡田 保典

学力確認担当者：

審査委員長：北島 政樹

試問日：平成17年12月27日

Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice

(MMP-2の遺伝子欠損と薬理学阻害はマウスにおける心筋梗塞後心破裂を抑制する)

松村 紳一郎

内容の要旨

Matrix metalloproteinases (MMPs) は種々の病的状態における細胞外マトリックス (ECM) の分解に中心的な役割を担っており、心筋梗塞後の心筋組織でMMP-1,2,9の発現があり、梗塞後の左室拡張、すなわち左室リモデリングに関わるとされている。本研究では、心筋梗塞におけるMMP-2の作用を調べる目的で、野生型 (WT) マウスとMMP-2ノックアウト (KO) マウスで、冠動脈結紮により心筋梗塞を作製し、WTマウスに梗塞作製1日後より1週間MMP-2選択的阻害剤あるいはプラセボを投与した。

WTマウスにおいては、術後28日目の生存率は45.8%であり、主死因は術後1週間以内に多発する心破裂であった。MMP-2 KOマウスとMMP-2阻害剤投与群では、生存率は90.0%と81.8%に改善され、心破裂は全く認められなかった。心筋梗塞後3日目の梗塞心筋の組織学的検討により、WTマウスでは壊死心筋周囲のECMが分解・消失するのに対し、MMP-2 KOマウスとMMP-2阻害剤投与マウスではECM分解の著しい抑制が認められた。また、梗塞後3日目の心筋梗塞部には強いMMP-2活性が出現し、MMP-2 KOマウスと阻害剤投与マウス群では活性の消失ないし抑制が証明された。さらに、WTマウス梗塞心筋破裂閾値は、MMP-2 KOマウスと阻害剤投与マウス群より有意に低いことが示された。これらのデータは、MMP-2の活性による壊死心筋周囲のECM分解により心破裂が生じ、MMP-2活性阻害により心破裂が抑制されることを示唆している。

WTマウスでは心筋梗塞3日目より強いマクロファージの浸潤を認め、壊死心筋が食食により速やかに吸収された。一方、MMP-2 KOマウスと阻害剤投与マウス群では、マクロファージ浸潤と心筋リモデリングが著明に抑制された。また、MMP-2 KOマウスと阻害剤投与マウス群ではWTマウスで認められたフィブロネクチン (Fn) とラミニン (Ln) の分解が顕著に抑制されていた。マトリゲルを用いた *in vitro* 浸潤アッセイでは、WTマウス梗塞心筋組織はマクロファージ遊走・浸潤能を有することが示され、MMP-2 KOと阻害剤投与マウス群の梗塞心筋組織の遊走・浸潤能は有意に低かった。さらに、この遊走・浸潤にLnペプチドとFnペプチドが関与することを証明した。以上のデータより、梗塞心筋におけるMMP-2活性はLnやFnを分解し、その分解産物がマクロファージの遊走・浸潤を誘導することで左室リモデリングが生じると考えられた。

論文審査の要旨

心破裂は急性心筋梗塞による死亡の5~30%を占める致命的合併症である。Matrix metalloproteinases (MMPs) は細胞外マトリックス (ECM) の分解に中心的な役割を担っており、創傷治癒や血管新生に関与している。特にMMP-2は梗塞心筋で活性化されるため、心筋梗塞後の左室リモデリングや心破裂に関与することが示唆される。本研究で、心筋梗塞ではMMP-2活性化によるECM分解が組織の脆弱性をもたらし、心破裂に導くことを明らかにした。また、MMP-2の活性化によって生じたフィブロネクチンやラミニンの分解産物であるペプチドが、梗塞心筋へのマクロファージの遊走を促進し、壊死心筋の除去を促進させることを示した。さらに、MMP-2の活性化を阻害することによりECMの分解が抑制され、急性心筋梗塞における心破裂を阻止して、生存率を改善させることを示し、MMP-2選択的阻害剤が、急性心筋梗塞の心破裂を予防する治療薬として使用できる可能性を示唆した。

審査では、まず野生型 (WT) マウスとMMP-2ノックアウト (KO) マウスの表現形および梗塞領域の血管新生の差について質問がされた。表現形は両者で差がなく、血管新生はvon Willebrand factor抗体で免疫染色して調べたが、差を認めなかったと回答がなされた。続いて、MMP-2の発現・活性化部位について質問がされた。MMP-2は心臓全体に存在するが、心筋梗塞後に梗塞部位の心筋細胞で活性化されると回答された。さらに、MMP-9等、他のMMPsの心筋梗塞への影響について質問がされた。本実験ではゼラチンゼイモグラフィでMMP-9の活性化をほとんど認めず、MMP-9の活性抑制の重要性は示唆されなかった。しかしながら、MMP-2 KOマウスとMMP-2阻害剤投与マウスのいずれもECM分解に遅延を認めるものの、完全に分解されることよりMMP-2以外のMMPsが補完的に作用しECMを分解している可能性があり、これらの解明も重要と考えられると回答された。最後に、MMP-2選択的阻害剤の臨床応用について質問された。急性心筋梗塞後の心破裂予防として期待されるが、全身投与に対する副作用や投与期間等が問題となると回答され、また、MMP-2活性阻害がマクロファージの浸潤を抑制することより、経皮的冠動脈形成術のステント内再狭窄予防のため薬剤溶出性ステントへの応用ができればと考えていると回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているものの、心筋梗塞後の組織修復過程にMMP-2の遺伝子欠損あるいは活性阻害が及ぼす影響を調べ、心破裂の発症に対するMMP-2活性化とマクロファージの関与を明らかにした点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
外科学 四津 良平 構造生物学 福田 恵一
病理学 坂元 亨宇

学力確認担当者:

審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年12月19日

Semilobar Holoprosencephaly with Midline ‘Seam’ : A Topologic and Morphogenetic Model Based Upon MRI Analysis

(Midline ‘Seam’ を伴ったSemilobar Holoprosencephaly : MRIに基づいたトポロジカルモデル)

高橋 努

内容の要旨

全前脳胞症 (Holoprosencephaly, HPE) は、前脳が様々な程度で結合した中枢神経奇形である。本研究では、semilobar HPE 7例 (0.13~4.23歳) 及び正常小児6例 (0.3~6歳) を対象とし、3次元 (3D) MRI画像を用いた大脳容積の定量解析を行い、3次元再構成と合わせて解剖学的、発生学的解析を行った。

【方法】半自動化定量解析により終脳各構造の容積を算出した。各構造の輪郭をコンピューターで自動作成し、用手的に修正を加え詳細な解析を行った。構造異常を定量化するため、終脳を以下3区画に分類した。

間脳区画：視床下部～視交叉上

終脳区画：間脳区画吻側～脳室を通り海馬交連

間脳終脳区画：終脳区画尾側～脈絡叢を通り扁桃体

各区画を単純化した線上に展開し、各々の長さを算出した。

【結果】HPEにおける終脳構造異常は前脳に限局し、脳梁より後方の構造は正常であった。構造異常の特徴は以下2点であった。(1) 新皮質、前障、尾状核頭部、側坐核、前視床下部の左右結合 (Seam) (2) 中隔構造、脳弓、脈絡叢中隔肢の欠損、前方における大脳縦裂 (IHF) の欠損。重症度を、左右結合とIHF欠損の程度により以下の3段階 (Grade 1-3) に分類した。

Grade 1 ; 灰白質の左右結合とIHFの欠損

Grade 2 ; 灰白質の左右結合とIHFの部分欠損

Grade 3 ; Seamと正常IHF

Seamは視交叉上の前視床下部から前頭葉眼窩面皮質と尾状核頭部/側坐核に至り、IHF直下・脳室上を後走し脳梁前に終わることがわかった。HPEの終脳容積は、正常児のその31~77% (平均55%) であり、各区画の長さの総和との間に有意な相関を認めた。

【考察】正常の大脳発生過程では、まず神経細胞の領域特異化により正中構造の特異化が起こり、大脳半球が左右に分割する。続いて傍正中において分化・成長のための誘導が起こり、IHFはこの過程を通じて形成される。HPEにおける構造異常は終脳区画に限局し、重症度において吻側から尾側に向かう勾配を認める。以上の知見と本研究で得られたデータから、HPEのトポロジカルモデルを作成した。Grade 1では領域特異化と分化・成長の完全欠失が、Grade 2では領域特異化の完全欠失と分化・成長の部分欠失が病態の本質であると考えられた。Grade 3ではseamが大脳皮質や基底核の性質を備えないことから、領域特異化は部分欠失だが、分化・成長は正常と考えられた。また、各区画の長さの総和と終脳容積の間に相関が認められたことから、領域特異化過程と分化・成長過程は、互いに関連して進行する可能性が示唆された。

本研究では、3D-MRIにより可能となった詳細な定量解析に基づいてHPE発生モデルを作成し、複雑な中枢神経発生異常に対する発生学的アプローチにおける定量解析法を確立した。

論文審査の要旨

全前脳胞症 (HPE) は前脳の左右分割障害で説明される中枢神経奇形であり、重症度は様々である。本研究は3次元MRI画像を用いた大脳容積の定量および3次元再構成により、semilobar型HPEの発生メカニズムを説明することを目的とした。Semilobar HPEにおいて、正中部異常灰白質 (seam) が存在する一群が存在することを見出した。形態異常の本態は、灰白質の左右結合および大脳縦裂の欠損であり、正中構造の特異化、および傍正中における分化・成長の障害の程度により重症度が決定される、という発生モデルを提唱した。

審査では、まず、全体を通じて方法の説明や図が難解で分かりにくい点が指摘された。次いで、正常対象とHPE症例で年齢が一致しない点について質問された。まず、正常対象における年齢と計測値の関係式を求め、その関係式にHPE症例の年齢を代入して、期待される値と実測値を比較検討したと回答された。構造異常が間脳吻側から海馬交連の領域内に限局する理由について質問され、詳細は不明であると回答された。Shh, Zic2, Six3, TGIFについての遺伝子解析で異常が認められなかった点について、今後は対象遺伝子を増やす必要があると指摘された。顔面奇形、その他の合併奇形、特に輪状腭などShhがその発生に関与すると考えられている疾患の合併について質問され、小頭、顔面奇形は必発であったが、内臓奇形としては1例で水腎症が認められたのみ、と回答された。対象症例における運動機能や海馬機能の異常、特に認知機能について質問された。全例で重度の精神運動発達遅滞を認め、認知機能については正確な評価は困難であった、と回答された。灰白質の左右結合と大脳縦裂欠損の程度に吻側から尾側に向かう勾配が存在する理由について質問され、解剖学的形態解析のみではメカニズムの解明は困難であり、成長因子等、勾配をもって存在する他の因子の関与を想定する必要があると説明された。大脳縦裂が中等度に欠損している領域で正中構造の特異化が完全に障害されている、と仮定した点について、部分的な障害であっても良いのではないかと、との指摘がされ、その可能性はあると回答された。正常対象において終脳の全長と容積に相関が認められなかったことについて質問され、終脳の正常発生のある段階までは相関する可能性があるが、その後の急速な成長発育により両者の相関関係が希薄となるのではないかと回答された。終脳容積を年齢の関数とした場合に対数を選択した理由について質問され、正常小児の頭囲成長曲線が対数関数的に増加するためと回答された。

以上、今後の検討課題が多く残されているものの、semilobar HPEに代表される複雑かつ重篤な中枢神経奇形に関する3次元MRIを用いた定量解析法を確立し、発生モデルを提案した点で価値があると評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 孝雄
外科学 河瀬 斌 生理学 岡野 栄之
解剖学 仲嶋 一範

学力確認担当者 :

審査委員長 : 河瀬 斌

試問日 : 平成18年 1月13日

Determination of reference intervals for vibratory perception thresholds of the lower extremities in normal subjects

(健康人下肢の振動覚閾値に関する研究)

稲見 州治

内容の要旨

脊椎・脊髄疾患において神経症状を正確に把握することは、その診断、治療、予後判定上重要である。しかし、従来、臨床における知覚評価は、機器の操作性、時間的制約等から定性的手法により行われてきた。振動覚閾値は振幅の単位で計測されてきたが、振動覚の受容器は刺激の加速度に应答するため、加速度の単位での計測が妥当である。鈴木-松岡式振動覚計 (Suzuki Matsuoka Vibrometer-5: SMV-5) は、計測が簡便であり、正確な加速度単位での計測が可能である。基準範囲の設定は疫学的・臨床的に重要であるが、健康人における振動覚閾値のまとまった報告は少なく、下肢について本計測器を用い、適切な統計学的処理がなされた基準範囲に関する報告はない。1992年、アメリカ臨床検査標準化委員会が提示したガイドラインにより、基準範囲設定の手順の標準化が行われてきた。そこで本研究では、このガイドラインに準じて健康日本人の下肢振動覚閾値の基準範囲を設定することを目的に以下の検討を行った。合せて振動覚閾値に対する年齢、性別、身長、体重、および飲酒、喫煙等の影響についても検討した。

ガイドラインに準じて設定した除外基準により、健康者377例 (男性241例、女性136例、11-74歳) を対象とした。SMV-5振動覚計を用い、両側の尺骨頭、足の内果、外果、母趾、小趾、膝蓋骨の計12箇所について、一定の条件下に各部位5回振動覚閾値を計測し、統計処理を行った。

振動覚閾値は加齢に伴い上昇し、年齢との間に有意な相関を認めた ($r=0.472$)。内果、母趾、尺骨頭において0.03G以下の左右差を見た。振動覚閾値は、女性は男性に対し有意に低値を示した。振動覚閾値は上肢 (尺骨頭) が足部に比して有意に低く、足部は膝蓋骨に比して有意に低かったが、足部 (内外果、母趾、小趾) の4箇所の間では、有意差を認めなかった。振動覚閾値へのbody mass index、喫煙、および飲酒の影響は、明らかではなかった。以上の検討から下肢の振動覚閾値について、男女別年代別の基準範囲を設定し、全体として0.13G以下という結果を得た。

種々の要因により、健康人の計測データに異常値が混入することは避けられない。基準範囲の選定は、文献上振動覚閾値に影響し得る項目を除外基準として予め設定し、十分な母集団から問診により除外し、更に得られたデータに対する統計的除外を行った。本研究で得られた基準範囲は、腰椎椎間板ヘルニアを初めとする各種脊椎疾患の研究および臨床における診断、治療効果の判定において直ちに应用可能である。本計測器を用いた振動覚閾値計測は鋭敏であり、従来の神経学的検査や神経生理学的検査の補助診断として推奨される。本研究は、計測に影響し得る諸因子を考慮した十分な母集団による本邦初めての振動覚閾値の基準範囲設定であり、臨床上も有用なデータと考える。

論文審査の要旨

アメリカ臨床検査標準化委員会が提示したガイドラインに準じて、健康人下肢の振動覚閾値の基準範囲の設定を行い、合せて飲酒、喫煙等の影響についても検討した。十分な母集団から選定した健康者377例 (男性241例、女性136例、11-74歳) を対象とし、鈴木-松岡式振動覚計 (SMV-5) を用い、両側の尺骨頭、内果、外果、母趾、小趾、膝蓋骨の計12箇所について、一定の条件下に各部位5回振動覚閾値を計測し、統計処理を行った。振動覚閾値は加齢に伴い上昇し、年齢との間に有意な相関を認めた ($r=0.463$)。振動覚閾値は、女性は男性に対し低値を示した。振動覚閾値は上肢 (尺骨頭) が足部に比して低く、足部は膝蓋骨に比して低かったが、足部 (内外果、母趾、小趾) の4箇所の間には差を認めなかった。振動覚閾値へのBMI、喫煙、および飲酒の影響は認めなかった。以上の検討から下肢の振動覚閾値について、男女別年代別の基準範囲を設定し、全体として0.13G以下という結果を得た。本研究で得られた基準範囲は、各種神経疾患の研究および臨床における診断、治療効果の判定において直ちに应用可能である。本計測器を用いた振動覚閾値計測は鋭敏であり、従来の神経学的検査や神経生理学的検査の補助診断として推奨される。本研究は、影響し得る諸因子を考慮した十分な母集団による本邦初めての振動覚閾値の基準範囲設定であり、臨床上也も有用なデータと考える。

審査では、刺激法や強度による感覚のモダリティーについて質問がなされた。これに対して、被検者が痛みや異常知覚を生じた例はないと回答された。また、振動障害などの産業障害判定への応用について質問されたが、本計測器を使用した報告はまだないと回答された。測定時の条件設定についても質問があり、本研究では、測定時に周囲の音には十分に留意したことが述べられた。更に、視力障害者やピアニストでは閾値が低いという報告もあり、訓練によっては閾値が低下する可能性が考えられるとの推察が述べられた。また膝蓋骨での振動覚閾値の標準偏差が大きい理由について質問され、この点については不明であると回答された。更に対象者の選出法について質問され、それらを記載すべきであるとの指摘に対し、医師、看護婦、医薬医療機器関係者、人間ドック受診者が中心であることが回答された。本計測器による再現性についての質問では、平均6ヵ月の間隔での再検査で再現性が良好であったことが回答された。他の電気生理学的検査との使い分けについて質問があり、振動覚閾値と筋電図検査との比較の報告はあり、非侵襲的である点は振動覚閾値測定が有用であるが、本計測器で比較した報告はみられず、これからの課題であるとの考えが述べられた。

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、十分な母集団を対象としており、振動覚閾値の基準範囲の設定は臨床上也も有意義であると評価された。

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

試問日: 平成17年10月24日

Critical Regions for Activation Gating of the Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor (イノシトール三リン酸受容体におけるチャネル開口に必須な領域の同定)

内 田 敬 子

内容の要旨

イノシトール1, 4, 5三リン酸 (IP₃) 受容体 (IP₃R) は小胞体上に存在するCa²⁺放出チャネルである。細胞外刺激により形質膜から細胞内に遊離したIP₃がIP₃Rに結合することにより、小胞体内に貯蔵されたCa²⁺が細胞質に放出される。IP₃Rを介するCa²⁺放出は、多くの生命現象にかかわる細胞内シグナル伝達の一つである。

IP₃Rは、3種のサブタイプ (IP₃R1、IP₃R2、IP₃R3) が組み合わされたホモまたはヘテロ四量体であり、6膜貫通領域の第5、第6領域の間に存在する配列によってCa²⁺イオンが通過するポアを形成すると考えられている。各サブタイプは、IP₃結合ドメイン、修飾カップリングドメイン、膜貫通チャネル形成ドメインの3つのドメインからなると考えられてきたが、IP₃結合がチャネル開口を引き起こす分子メカニズムは未だ不明である。本研究ではマウスIP₃R1の欠失および点変異体のチャネル活性を測定することで、IP₃Rのチャネル開口に必須な領域を同定した。

方法 マウスIP₃R1のcDNAをもとに、IP₃結合領域と膜貫通チャネル形成領域を除くほぼ全ての領域を網羅的に欠損させた変異型を9種類作成した。また、膜貫通領域近傍で、IP₃Rサブタイプ間において相同性が高く、さらに細胞内Ca²⁺放出チャネルであるリアノジン受容体とも相同性の高い領域について、cysteine残基をserineに置換した点変異型4種類を作成した。すべての内在性IP₃Rを欠く細胞株であるR23-11細胞を用いて、これら全13種類の変異受容体を安定に発現する細胞株を樹立した。それぞれの安定発現株からマイクロソーム画分を調整し、IP₃結合能、Ca²⁺放出能、蛋白質フォールディングを、変異型IP₃Rと野生型と比較した。

結果 1から223番目のアミノ酸領域を欠失、651から1130番目のアミノ酸領域を欠失、または、2613番目のcysteine残基を置換した変異型IP₃R3種においてのみ、IP₃結合活性およびフォールディングは野生型と同等であったにもかかわらず、Ca²⁺放出能が完全に消失していた。よって、これらの領域がIP₃結合によるチャネル開口に必須であると考えた。

考察 既に報告されている他のイオンチャネルの解析結果と併せて、IP₃結合シグナルが、N末端及び中間カップリングドメインを介してC末端ドメインへ伝達され、C末端ドメインが直接ポアに作用し開口を引き起こす、と結論した。以上の結果をもとに、IP₃Rの構造に関して、N末端カップリングドメイン・IP₃結合ドメイン・中間カップリングドメイン・膜貫通ドメイン・C末端ドメインの5ドメインからなるという5ドメイン構造モデルを提唱した。

論文審査の要旨

イノシトール三リン酸受容体 (IP₃R) において、IP₃結合領域の立体構造やチャネル形成領域の機能に関する解析が進められているが、IP₃結合によるチャネル開口のメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、IP₃Rのチャネル開口機構を解明する目的で、チャネル開口に必須の領域を特定した。まず、3種類全ての内在性IP₃Rを欠失させたDT40細胞由来の細胞株を用い、マウス1型IP₃Rのチャネル機能解析系を確立した。次いで、同分子について、IP₃結合領域と膜貫通領域を除く領域を網羅的に欠損させた変異型、およびチャネル形成領域近傍のCysteine残基の点変異型を作成し、各々について機能解析を行った。IP₃結合能と立体構造が正常であるにもかかわらずCa²⁺放出能を持たない変異型を特定することにより、1から223番目、651から1130番目の2領域、および2613番目のCysteine残基がチャネル開口のために必須であると結論した。IP₃結合シグナルが、N末端ドメイン、およびIP₃結合領域と膜貫通領域の間にある中間カップリングドメインを介してC末端ドメインへ伝達され、C末端ドメインが直接ポアに作用し開口を引き起こすと考えられた。

審査では、IP₃結合が非協同性である一方、IP₃結合による開口は正の協同性があることについて質問され、1サブユニットで起こるIP₃結合と四量体におけるチャネル開口の協同性に関しては、別の解釈が必要であると回答された。審査員より親和性や協同性について慎重な議論が必要と指摘された。N末端と2613番目のCysteineのカップリングのメカニズムについて質問され、電位依存性K⁺チャネルと同様に、第4、5膜貫通領域間の細胞質側ループを介している可能性があるかと回答された。欠損変異型D651-1130のIP₃結合能が低い理由について質問され、欠損領域はIP₃結合領域から続くαヘリックス領域であると考えられ、IP₃結合能に影響することが予測されること、また、欠損領域内のCa²⁺結合領域の意義については現在検討中であると回答された。変異型IP₃Rは四量体を形成しているかと質問され、クロスリンク法などにより、第5、6膜貫通領域とそれに続くC末端が四量体形成に重要であることが既に報告されている、と回答された。チャネル機能を消失した変異型のIP₃Rは、ドミナントネガティブ型としての機能を有するかと質問され、同変異体のドミナントネガティブ効果については検討中であると回答された。最後に、少なくとも本研究の実験系においては、quantal releaseの実体が示されたとは言い難く、議論の余地があることが確認された。

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、多彩な生理現象・病態に関わるIP₃Rのチャネル開口機構に新たな概念を投入する有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 幸雄
生理学 岡野 栄之 生理学 柚崎 通介
医化学 末松 誠
学力確認担当者：北島 政樹、岡野 栄之
審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成17年10月17日

Epidural Analgesia Prevents Endotoxin-Induced Gut Mucosal Injury in Rabbits

(家兎内毒素惹起性腸管粘膜傷害における硬膜外麻酔の保護効果)

小 杉 志 都 子

内容の要旨

論文審査の要旨

(背景) 敗血症下では、腸管は容易に虚血と機能障害に陥る。腸管壁防御機構の破綻による腸内細菌や毒素の血管内流入 (Bacterial translocation) は、さらなる炎症性メディエーターの放出を誘導し、多臓器不全への進行を招く。腸管壁防御機構の保護は敗血症患者の予後を改善すると考えられている。周術期や外傷時に鎮痛手段として使用される硬膜外麻酔は、腸管アシドーシスの進行を防ぐことや微小循環を増加することが示されており、腸管壁防御機構の保護にも効果的に働く可能性がある。本研究は、敗血症下の腸管壁防御機構破綻に対する硬膜外麻酔の保護効果を明らかにすることを目的として、家兎内毒素血症における腸管粘膜の機能的および構造的傷害に対する硬膜外麻酔の保護効果を検討した。

(方法) ウサギ (2.0-2.5kg) に胸部硬膜外カテーテルを留置した後、無作為に硬膜外麻酔群 (n=14) と対照群 (n=14) に分け、それぞれ0.5%リドカインまたは生理食塩水の持続硬膜外投与 (0.1ml/kg/hr) を行った。内毒素静脈投与下 (LPS 15ug/kg/hr) の平均動脈血圧、腸管粘膜内pH (pHi)、血清TNF- α 濃度および血管内皮傷害の指標として血清トロンボモジュリン濃度を測定した。実験終了後、腸管組織を採取し、組織学的傷害度評価および腸管浮腫の指標となる腸管乾湿重量比測定を行った。別のウサギを無作為に硬膜外麻酔群 (n=10) と対照群 (n=10) に分け、内毒素投与下の fluorescein isothiocyanate-conjugated dextran (FD4, 分子量4000Da) の腸管壁透過性を調べた。

(結果) 内毒素投与後の平均動脈血圧および動脈血酸素含量の低下は、対照群と比較し硬膜外麻酔群で有意であったが、pHiは硬膜外麻酔群で正常範囲に保たれた。血清トロンボモジュリン濃度は両群で同程度に上昇した。血清TNF- α 濃度は、内毒素投与2時間では硬膜外麻酔群で有意に低かった。腸管乾湿重量比、腸管粘膜組織傷害度、FD4の腸管透過性は硬膜外麻酔群で低かった。

(考察) 内毒素血症下において、硬膜外麻酔が腸管粘膜の組織構造を保護するとともに、腸管粘膜アシドーシスの進行、腸管粘膜浮腫および腸管壁透過性の亢進を軽減することを示した。これらの有益な効果は、硬膜外麻酔による組織灌流低下や動脈血酸素飽和度の低下といった組織酸素化に不利となりうる状況下においても認められたことから、硬膜外麻酔の微小循環レベルでの修飾が推測され、さらにTNF- α の早期抑制が腸管粘膜保護に関与する可能性がある。

(結論) 敗血症下で、硬膜外麻酔が腸管防御機構破綻の予防的手段となることが示唆された。

敗血症下では、腸管は容易に虚血と機能障害に陥る。腸管壁防御機構の破綻による腸内細菌や毒素の血管内流入 (Bacterial translocation) は、さらなる炎症性サイトカインの放出を誘導し、多臓器不全への進行を招く。腸管壁防御機構の保護は、敗血症患者の予後を改善すると考えられている。周術期や外傷時に鎮痛手段として使用される硬膜外麻酔は、微小循環改善効果が示唆されており、敗血症における腸管壁防御機構の保護にも効果的に働く可能性がある。そこで家兎内毒素血症における腸管粘膜の機能的および構造的傷害に対する硬膜外麻酔の保護効果を検討した。その結果、内毒素血症下で、硬膜外麻酔が腸管粘膜の組織構造を保護するとともに、腸管粘膜アシドーシスの進行、腸管粘膜浮腫および腸管壁透過性の亢進を軽減することを明らかにした。さらにその機序として、炎症反応抑制、血管透過性抑制、ストレス反応抑制などによる微小循環改善効果の可能性が示唆された。

審査ではまず、内毒素血症下の腸管粘膜浮腫の成因として、粘膜絨毛組織内の血管透過性亢進だけでなく、リンパ液の停滞も成因となる可能性がある。硬膜外麻酔による腸管浮腫軽減の機序として、毛細リンパ管流に対する硬膜外麻酔の修飾も考える必要がある、との指摘を受け、腸管粘膜内のリンパ管流への神経調節も含め、今後の検討課題とされた。

ついで、硬膜外麻酔により、血清TNF- α の上昇は抑制されており、炎症反応の抑制が示唆された。内毒素によって、主に肝でTNF- α が産生されるが、肝でのTNF- α 産生に対する硬膜外麻酔の抑制効果の機序に関する質問があった。これに対し、肝でのマクロファージ・単球の活性化、あるいはTNF- α 発現・放出のいずれかの抑制が推測されたが、今回の実験からは明確な機序の解明には至らなかったと回答された。

また今回、血管内皮傷害の指標としてトロンボモジュリン (TM) を測定したところ、内毒素によるTMの上昇を、硬膜外麻酔が抑制しなかったことから、硬膜外麻酔には血管内皮傷害に対する抑制効果はないとした。これに対し、TMは必ずしも鋭敏な指標ではなく、内皮細胞の接着因子などの他の指標も測定すべきであり、硬膜外麻酔の内皮傷害に対する効果も再検討する必要がある、との助言があった。

最後に、周術期の敗血症においても、今回の実験で用いたパラメーターを測定し、臨床的にも硬膜外麻酔の有用性を証明すべきであるとの助言があった。

本研究は今後検討すべき課題はあるものの、硬膜外麻酔が、敗血症下の腸管防御機構の保護に有用であることを示唆し、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 麻酔学 武田 純三
内科学 日比 紀文 外科学 北島 政樹
医化学 末松 誠
学力確認担当者: 北島 政樹、日比 紀文
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成17年11月 8日

縦断的前向き研究からみた閉経前女性における 腰椎骨密度の経時的変化に関する検討

小 武 海 成 之

内容の要旨

(目的) 50歳以上の日本人女性の約24%が骨粗鬆症に罹患し、その大半が閉経後骨粗鬆症とされている。また、閉経後女性では骨量維持に密接な関連のあるエストロゲン分泌が著減していることにより急激な骨量の減少を認める。閉経の詳細な過程は通常1~3年を要して徐々に卵巣機能が低下、すなわちエストロゲン分泌不全が出現し、その結果として規則的な月経は頻発月経、稀発月経、月経不順に移行し恒久的な月経停止である閉経に到る例が多いことから、閉経後骨粗鬆症の病態メカニズムにおいてエストロゲン分泌不全に起因する骨量減少が閉経直前ではすでに始まっていると予想される。しかし、閉経以前より骨量減少が出現することについて一定の見解が得られるに十分な報告は存在しないのが現状である。そこで、本研究では閉経前から骨量減少が出現する可能性を検証する目的で、縦断的前向き研究モデルを用いて閉経前の健康者を対象に評価指標として以下の検査項目を設定し、経時的に検査を実施した。

(方法) 1997年4月から1998年3月までの1年間に慶應義塾大学病院産婦人科に併設されている更年期専門外来を受診した42歳から54歳までの未閉経女性197例を研究対象とし、対象集団を月経状況により閉経前期と閉経周期の2群に分類した。本研究登録時とその1年後に以下の検査を施行した。①二重X線骨密度定量装置を用いて、第2腰椎から第4腰椎までの骨密度を測定し、それらの平均値である L_{2-4} BMDから L_{2-4} BMDの変化率(% L_{2-4} BMD)を算出した。②下垂体・性ホルモンである血清follicle stimulating hormone (FSH)、luteinizing hormone (LH)、estradiol (E_2)および骨代謝の指標として血清Ca、P、alkaline phosphatase (Alp)、calcitonin、intact parathyroid hormone (i-PTH)、Osteocalcin (OC)を各々測定した。2群間における上記検査項目の経時的変化および相関を解析し比較検討した。

(結果) 以下の事実を見出した。① perimenopause群ではpremenopause群と比較して、FSHは高値を、 E_2 は低値を示した。② Ca、ALP、OCはperimenopause群ではpremenopause群と比較して、有意に高値を示した。③% L_{2-4} BMDは、premenopause群では-0.9%、perimenopause群では-2.2%と有意にperimenopause群で減少した。またFSHと% L_{2-4} BMDに負の相関を認めた。

(結論) 本研究により、閉経前でも下垂体・性ホルモンおよび骨代謝指標の変化に伴い、腰椎骨密度減少が認められることを明らかにした。また、閉経年齢だけでなく月経状況を適切に把握することにより、閉経前から始まる骨量減少を予防できる可能性を示唆した。

論文審査の要旨

原発性骨粗鬆症の一つである閉経後骨粗鬆症は、閉経後女性に好発する退行期疾患とされている。しかし、閉経は突然生じるものではなく、その前から徐々に卵巣機能の低下が進行し、その結果として閉経と判断されるため、厳密には閉経前の状態においても骨量の低下が進行している可能性がある。本研究ではその点を明らかにするために、慶應義塾大学病院産婦人科更年期外来受診者の中から、未閉経者を選出した後、さらに月経周期により閉経前期群、閉経周期群の二群に層別し、縦断的に腰椎骨密度、下垂体・性ホルモン、骨代謝関連指標の比較検討を行った。その結果、1年間の骨密度変化率は閉経周期群では-2.2%、閉経前期群では-0.9%と、閉経周期群では閉経前期群に比し、有意な骨密度減少を認めた。またFSHと腰椎骨密度変化率には有意な相関があることが示された。すなわち、閉経周期群ではすでに骨密度減少が始まっていることが示された。

審査では、まずこの対象とした214例はどういう母集団を意味しているかが問われた。それに対し、各地域から無作為に抽出した集団ではなく、東京近郊という都市部に在住する例がほとんどで、かつ自主的に骨粗鬆症のスクリーニングを行うために来院したという健康に対して意識の高い例も少数ではあるが含まれており、一般集団とは異なる集団であると思われる。今後は地域差を考慮し、全国的に一般集団から無作為に抽出した集団を用いた検討が必要であると回答された。次にベースラインデータから閉経前期群と閉経周期群を予想できるかとの質問がなされたが、それに対して、 E_2 の低下があるとそれに対してFSHの上昇が生じ、 E_2 の分泌が再開するというフィードバック機能がFSHと E_2 の間にはあり、一時点のみのデータだけでは選別は困難であり、月経状況の確認も合わせて必要であると回答された。さらに、閉経前の予防としては具体的にどのようにすべきかを問われた。それに対し、家族歴、月経歴や骨折の既往等を問診し、さらに骨密度減少が急速に起こっている可能性のある症例を月経状況により選別し、食事指導、生活指導を行い、検査結果によっては早期に薬剤投与を行っていくべきと回答された。前向き研究は1年でよいかと問われた。それに対し、閉経周期の期間が1~3年であることを考えると、今後閉経周期およびその前後数年を含めた多年度にわたる追跡調査が必要であると回答された。

以上のように、本研究ではなお検討すべき課題はあるものの、閉経後からではなく、それ以前の閉経周期より有意な骨密度の減少が認められるということを経断的に明らかにした点で、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

整形外科学 戸山 芳昭 リハビリテーション医学 里宇 明元
衛生学公衆衛生学 大前 和幸

学力確認担当者: 北島 政樹、戸山 芳昭

審査委員長: 戸山 芳昭

研究指導者: 野澤 志朗 (産婦人科学)

試問日: 平成17年 6月 2日

Surgical site infection surveillance after open gastrectomy and risk factors for surgical site infection

(開腹胃切除後の術後感染サーベイランスと術後感染リスク因子)

今井 栄子

内容の要旨

最も多い病院感染の一つに術後感染があることを多くの文献、特に Centers for Disease Control and Prevention (CDC) の National Nosocomial Infection Surveillance system (NNIS) の annual report や術後感染関連の研究は示している。また、医療の質を問われる時の臨床指標として重要視されている。術後感染防止のためには、サーベイランスを施行し、そのデータを術者・医療者にフィードバックしていくことが必須である。これら多くの文献で Surgical site infection (SSI) の risk factor について提唱されている。しかし、正確に術後感染サーベイランスを施行し、SSI の分析をした研究は少ない。特に多変量解析によって消化器手術の risk factor を評価した文献はほとんどない。今回当院の開腹胃切除例を検討し、SSI の risk factor を検討した。

手術全症例を SSI(-)、SSI(+) の群に分けて SSI rates の計算後 NNIS Manual に準じ、risk index category によって risk factor の分類をした。Univariate, Multivariate analysis, logistic regression model での検証・分析を施行、感染に対して検証項目は、age, gender, BMI, DM, アメリカ麻酔科学会 (ASA) の身体的状態分類法に基づいた、麻酔科医による患者の術前状態の評価、創分類 (アメリカ外科学会分類法に準ずる) operative procedure (ICD9), NNIS risk index category, duration of operation とした。また開腹胃切除の術式による有意差を検討するために4つのグループに分類して各術式の手術時間の平均、標準偏差を算出し、その後 logistic regression stepwise を施行した。手術時間 75 percentile を計算して duration of operation の risk factor を検証するために時間を分類して logistic regression stepwise を施行した。

Risk index category はリスクが上昇すると感染率の上昇がみられた。Age, gender, BMI, DM, の母集団に有意差はなかった。Multivariate analysis using regression model で duration of operation ($p < 0.001$), operative procedure ($p = 0.011$) に有意差があった。Operative procedure を4分類した SSI rate は胃全摘が高かった。Duration of operation は感染症例がやや長い傾向にあった。手術時間の 75 percentile は300分であり Logistic regression model predicting SSI rate after stepwise regression によって duration of operation で $p < 0.001$ を得た。

Logistic regression analysis を用いて試みたこの研究において主たる3つの検証ができた。第1に感染の risk factor といわれている年齢(高齢者)、性別、BMI、糖尿病は必ずしも SSI の risk factor にはならなかった。第2に Operative procedure を4分類したが有意差はみられないもの今後詳細分類せずに gastrectomy と総括して考えてよい。第3に一般的に手術時間が長くなる時、感染のリスクが大きいと言われているが、手術時間の 75 percentile という考えを導入することによって、開腹胃切除後における SSI のリスクの上昇過程を実証できた。

今回、開腹胃切除術における risk factor は 75 percentile を超えた手術時間に有意差があり、SSI に関与していた。NNIS と比較すると当院では、SSI 発症の頻度が高かった。その理由は NNIS の基準に則り術後30日間 follow up でき、SSI 発症を正確にサーベイランスできていたためと考える。

論文審査の要旨

本研究は、病院内感染の指標として外科術後感染 (surgical site infection: SSI) に注目し、1997年から2003年までの本塾大学病院一般消化器外科における入院手術患者を対象とし、SSI のリスク因子の解析・同定を米国 CDC で作成された National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) の基準に基づいて、単変量、多変量解析にて実施したものである。

解析には開腹胃手術が施行された984名が対象となった。これらの解析対象を SSI(+), SSI(-) 群に分類し、年齢、性別、body mass index、糖尿病、更に米国麻酔科医学会の基準に基づいた術前状態の評価、手術時間、米国外科学会による創分類の三種のスコアを基準とした NNIS risk index category (RIC) 等について検討し、RIC が上昇すると SSI rate が上昇する事を明らかにした。単変量解析によれば手術手技、手術時間、RIC 等について両群の間に有意差を認め、今回の解析対象では、手術時間の 75 percentile が NNIS 基準より長く、300分と計算されたが、この長さが300~360分、361分以上になるに従い、SSI rate の明瞭な増加が見られ、多変量解析でも明瞭な odds ratio の上昇が見られた。また、この多変量解析では年齢、及び四種類の開腹胃手術の術式のうち、胃部分切除と胃全摘との間で有意差を認めた。これらの成果は術中の抗生剤投与等の実施に反映され、SSI の減少に寄与したと判断された。

審査においては、まず NNIS による RIC のこの種の解析における信頼度、及び RIC 以外の危険因子の関与について質疑がなされ、NNIS の RIC が現時点では最も信頼度が高い事、及び他の危険因子については、例えばドレーンの有無等が挙げられるが、当院における消化器外科の背景が病棟間においてほぼ同一と見なされる事、及び NNIS の RIC 等の基準に沿って解析する事で、同一基準に立って標準的な比較検討が行われると回答され、了承された。また、術後管理の日米間の差異による本研究への影響について尋ねられ、米国では手術後の在院日数が短いデータ取得時の信頼度が低く、他方今回の調査対象では、術後30日間までフォローアップされていたため、本研究の方が信頼度が高い事が述べられた。手術時間の長さに関しては、75 percentile に日米間で大きな差異があったが、これは本研究対象例においてはリンパ節の廓清もきちんと行われていたためであると述べられた。更に、ASA スコアに関して、4段階に分かれているが、日本ではスコア1と2を区別した方が良いのではという質問がなされ、これに対しては本塾大学病院では殆どが予定入院であり、スコア1と2が事実上全てを占めるため、当面同一と考えていると回答された。

本研究に対しては、以上に加えて統計学的解析法の改良や、医師へのより確実なフィードバックの必要性も指摘されたが、単一診療科における8年間の症例と云う他に例を見ないデータを扱っており、感染症学上有意義な業績であると認められた。

論文審査担当者 主査 熱帯医学・寄生虫学 竹内 勤
内科学 日比 紀文 内科学 池田 康夫
微生物学・免疫学 小安 重夫
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11月16日

Effect of specific antigen stimulation on intraepithelial lymphocyte migration to small intestinal mucosa

(特異的抗原刺激による腸上皮間リンパ球の小腸粘膜マイグレーションへ与える影響)

高本 俊介

内容の要旨

小腸上皮は常に腸内フローラや食物抗原に曝されており、IEL (腸上皮間リンパ球) は腸粘膜防御に重要な役割を果たしている。一部のIELは血中より腸絨毛の微小血管に達しマイグレーションすると考えられるが、その機序や経路は不明であり、マイグレーション過程へのIELの抗原特異的活性化の影響も不明である。今回我々は、卵白アルブミン (OVA) 323-339に特異的なT細胞受容体 (TCR) $\alpha\beta$ を発現するOVA23-3トランスジェニック (Tg) マウスから、抗原特異的IEL細胞株を樹立し、サイトカイン産生や抗原特異的増殖能を分析するとともに、小腸粘膜の微小血管へのマイグレーションに関して検討した。

本細胞株はThy 1、TCR $\alpha\beta$ 、CD4、 α_E および β_7 インテグリン、CD11aを発現し、CD8 α 、L-セレクチンと α_4 インテグリンを発現しなかった。さらに、 α_E および β_7 インテグリンはOVAで刺激された活性化細胞株で著しく発現が低下した。本細胞株はOVA刺激に対し高い増殖能を示し、活性化によりIFN- γ 、IL-4およびIL-5のいずれも産生するのに対し、休止期の細胞株 (OVA刺激後1-4週経過したもの) ではIL-5のみを産生した。

次に、株化したIELの絨毛粘膜へのマイグレーションをマウス小腸粘膜側から蛍光生体顕微鏡下に観察した。休止期のIEL細胞株を蛍光色素にて標識し、Tgマウスの頸静脈から投与 (1×10^7 /body) し、40分間観察した。IEL細胞株は絨毛粘膜の微小血管内皮にローリングすることなく接着するのに対し、パリエル板の観察ではHEV (高内皮細静脈) にほとんど接着を認めなかった。休止期および活性化IELの絨毛粘膜への接着を比較すると、活性化IELの接着数はいずれの時間経過でも有意に少なかった。次に、表面接着分子に対する特異抗体を用いて休止期IEL細胞株の絨毛粘膜接着抑制効果について検討した。抗 β_7 インテグリン抗体あるいは抗MAdCAM-1抗体により接着数が約50%減少し、両者の関与が示唆されたが、両方の抗体を用いての接着抑制効果は約65%にとどまりそれ以外の機序の関与も考えられた。OVAを予め経口投与したTgマウスで休止期IELの絨毛粘膜への接着を観察すると、時間経過とともに接着数は徐々に増加するもののOVAを投与していないマウスに比べると少数にとどまり、また活性化IELを投与した場合は絨毛粘膜へほとんど接着が見られなかった。

本細胞株は末梢T細胞と異なるIELの特徴を有しており、そのサイトカイン産生からTh1とTh2の混在したものであることが示唆される。本研究の成績より、IELを抗原刺激すると腸管粘膜へのマイグレーション能力が低下し、絨毛粘膜での抗原特異的T細胞の割合が変化しうることを示した。抗原刺激されたIELのマイグレーションの低下が、腸管アレルギーや経口免疫寛容においてどのような意義を持つのかについては、今後明らかにすることが必要であると考えられた。

論文審査の要旨

IEL (腸上皮間リンパ球) は腸粘膜防御に重要な役割を果たしており、一部のIELは血中から腸絨毛の微小血管にマイグレーションすると考えられているが、その機序や経路は不明である。本研究では、卵白アルブミン (OVA) 323-339に特異的なT細胞受容体 (TCR) $\alpha\beta$ を発現するOVA23-3トランスジェニック (Tg) マウスから抗原特異的IEL細胞株を樹立し、抗原特異的増殖能および生体での小腸粘膜へのマイグレーションにつき検討した。その結果、本細胞株は $\alpha_E\beta_7$ インテグリン陽性で、末梢T細胞とは異なるIELの特徴を持ち、刺激後のサイトカイン産生からTh1とTh2の混在したものであること、特異的抗原刺激により絨毛粘膜へのマイグレーションが低下するが、これには β_7 -インテグリン、MAdCAM-1以外の要素も関わっている可能性が示唆された。

審査では、活性化したIELの小腸絨毛粘膜マイグレーションが低下した理由について質問され、活性化したIELでは β_7 -インテグリンの発現が低下し、これがマイグレーション低下の原因と考えられると回答された。また、休止期IELのマイグレーションが抗 β_7 -インテグリン抗体、抗MAdCAM-1抗体を併用しても完全に抑制できなかった理由に関して質問され、IELの小腸粘膜へのマイグレーションにケモカインTECK/CCL25とCCR9の関与が重要であることが最近報告されており、 β_7 -インテグリンとMAdCAM-1それぞれに対するリガンドを解明するとともに、ケモカインを中心とした他の因子に対する検討が必要と回答された。また、本細胞株はCD8およびTCR $\gamma\delta$ 陰性で、代表的なIELとは言い難いものではとの指摘に対し、IELのうちCD4 $^+$ の増殖能がCD8 $^+$ に比べ高く、これはOVATgマウスのTCRがクラスII MHC拘束性であること、またCD4 $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^+$ IELの多くは胸腺由来と考えられ、本分画が血流を介して腸粘膜へマイグレーションしている可能性があり、CD4 $^+$ IELを用いることは意義があると回答された。OVA投与Tgマウスでは、OVA非投与Tgマウスと比較して、腸粘膜の血流量が増えたり、活性化後にリンパ球の大きさが変化したりした可能性について指摘された。これに対し、血流やリンパ球の大きさについては検討しておらず他に血小板の関与も含めた研究が必要であるが、OVA投与マウスでは免疫寛容状態になり、anergicなT細胞がIELのマイグレーションを抑制している可能性もあると回答された。この回答に対し、免疫寛容状態のマウスの腸管リンパ球や血管内皮の変化を詳細に検討し、また同細胞株を正常マウスに投与した場合のマイグレーションの検討もすべきとの指摘を受けた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき課題が残っているものの、TgマウスからIELの細胞株を樹立し、特異的抗原刺激による小腸粘膜マイグレーション変化の一端を明らかにしたことで、腸管へのリンパ球ホーミングを中心とした粘膜免疫研究に有意義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
微生物学・免疫学 小安 重夫 外科学 北島 政樹
医化学 末松 誠

学力確認担当者: 池田 康夫、小安 重夫
審査委員長: 小安 重夫

試問日: 平成17年12月19日

Expression of ADAM 15 in rheumatoid synovium: up-regulation by vascular endothelial growth factor and possible implications for angiogenesis

(関節リウマチ滑膜におけるADAM15の発現:

血管内皮細胞成長因子による発現亢進と血管新生への関与について)

小 宮 浩 一 郎

内容の要旨

論文審査の要旨

関節リウマチ (RA) の特徴は表層細胞層の多層化、炎症細胞の浸潤や豊富な血管新生を伴う慢性増殖性滑膜炎で、増殖滑膜では一群のmatrix metalloproteinase (MMP) が発現され関節軟骨破壊に関与することが知られている。一方、 α disintegrin and metalloproteinase (ADAM) は近年注目されているMMP近縁遺伝子ファミリーであるが、関節疾患におけるADAMの発現情報は断片的で、制御機構についても不明な点が多い。本研究ではRAおよび変形性関節症 (OA) 滑膜組織を用いてADAMの発現スクリーニングを行うことと、RA滑膜組織におけるADAM15の発現と制御機構の解明を目的に以下の実験を行った。

人工膝関節置換術時に採取したRAおよびOA患者の滑膜組織を用いてプロテナーゼ型と考えられる10種のADAMについてRT-PCRで発現スクリーニングを行った。ADAM15の発現解析はRT-PCR、real-time PCR、*in situ* hybridization、immunohistochemistryおよびimmunoblottingで行った。滑膜組織の血管密度 (vessels/mm²) はCD31陽性血管数から算出した。発現制御解析ではRA滑膜細胞 (RA synovial fibroblasts; RA SF) とヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) を用いて刺激実験を行った。

スクリーニングの結果、RA選択的かつ全例で発現が認められたADAM15に注目した。ADAM15の発現率はRAで100%、OAで60%であり、相対的発現量もRAはOAの3.8倍と有意に亢進していた。ADAM15は滑膜表層細胞および表層下の血管内皮細胞、マクロファージ様細胞に局在し、血管密度と相対的発現量との間には正の相関が認められた。またimmunoblottingでは前駆体や活性型と考えられる種々のバンドが検出された。RA SFおよびHUVECをvascular endothelial growth factor (VEGF)₁₆₅で刺激するとHUVECでのみADAM15の発現量が増加した。この反応の相違はVEGF受容体の有無によると推察されたのでRA SFをTNF- α で刺激するとVEGFR-2の発現が誘導され、さらにVEGF₁₆₅で連続刺激を行うとADAM15の発現量が増加した。TNF- α やVEGF₁₆₅はRA滑液中に多量に含まれており、VEGFR-2を介しVEGF₁₆₅により滑膜表層細胞や血管内皮細胞で発現が亢進したADAM15はRA増殖滑膜の血管新生、炎症維持に重要な役割を演じていると考えられ、将来的にRAの治療標的の1つになりうる可能性が示唆された。

Δ Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) はMMP近縁遺伝子ファミリーであるが、関節疾患におけるADAMの発現情報は断片的で、制御機構についても不明な点が多い。そこで本研究では、関節リウマチ (RA) および変形性関節症 (OA) 滑膜組織を用いてADAMの発現スクリーニングを行い、続いてRA滑膜組織におけるADAM15の発現と制御機構の解析を行った。RT-PCRによる発現スクリーニングの結果、プロテナーゼ型と考えられる10種のADAMのうちRA選択的かつ全例で発現が認められたADAM15に注目した。ADAM15 mRNAの発現率はRAで100%、OAで60%であり、相対的発現量もRAはOAの3.8倍と有意に亢進していた。ADAM15は滑膜表層細胞および表層下の血管内皮細胞、マクロファージ様細胞に局在し、滑膜組織血管密度と相対的発現量との間に正の相関が認められた。またimmunoblottingでは前駆体や活性型と考えられる種々のバンドが検出された。RA 滑膜細胞 (SF) およびヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) をvascular endothelial growth factor (VEGF)₁₆₅で刺激するとHUVECでのみADAM15の発現量が増加した。この反応の相違はVEGF受容体の有無によると推察されたのでRA SFをTNF- α で刺激するとVEGFR-2の発現が誘導され、さらにVEGF₁₆₅で連続刺激を行うとADAM15の発現量が増加した。

審査では、まずRA滑膜とOA滑膜の違いについての質問がなされた。RA滑膜の病理組織学的特徴は滑膜表層細胞の重層化、細胞浸潤および豊富な血管新生であるが、OA滑膜も炎症が強くなれば同様の所見を呈しうることから、両者を明確に分けるのは難しいと回答された。また、ADAM15の分解基質およびRA滑膜組織中での活性の有無についての質問がなされ、分解基質としてIV型コラーゲンとゼラチンがあるが関節軟骨の主要基質であるII型コラーゲンやアグリカンの分解活性の有無は不明なこと、immunoblottingの結果からはRA滑膜組織中に活性型が含まれると考えられるが実際の活性の有無については検証していないと回答された。さらに培養細胞を用いた刺激実験で、OA SFでもRA SF同様の反応を呈するのが質問がなされ、OA SFでも同様の結果が再現されることがあると回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、RA滑膜においてVEGFR-2を介しVEGF₁₆₅により滑膜表層細胞や血管内皮細胞で発現が亢進したADAM15はRA増殖滑膜の血管新生、炎症維持に重要な役割を演じていると考えられ、将来的にRAの治療標的の1つに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

内科学 池田 康夫 医化学 末松 誠

発生・分化生物学 須田 年生

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11月30日

Reevaluation of Ultrasonography for Solid-Organ Injury in Blunt Abdominal Trauma (鈍的腹部外傷における実質臓器損傷に対する超音波断層法の再評価)

佐藤 通洋

内容の要旨

通常、鈍的腹部外傷は超音波による腹腔内の液体検出を主目的とするいわゆる Focused Assessment with Sonography for Trauma (FAST) と Computed Tomography (CT) で診断され、超音波断層法 (US) の役割は液体検出に限られている。鈍的腹部外傷における臓器損傷を対象としたUSの有用性に関しては1998年に報告したが、この時の報告ではCT、手術ばかりでなく、再US、臨床経過を基準に加えたため、USで見落とした軽症損傷は臨床経過で拾われず、その結果実際よりも感度が高くなったと考えられる。今回、US結果をCTと手術所見のみを基準に重症度を含めて詳細に検討し、実質損傷をUSで直接検出する可能性および臨床的有用性を再評価した。

14年間604人を対象に、CT及びUS画像、US報告書、手術結果を見直し、日本外傷学会分類に基づいて肝・脾・腎・膵損傷の分類を行った。施行者を日常USに携わる熟練者のAとそれ以外のBの2グループに分け、臓器別及び型別の検出率、false negative (FN) 症例などを検討した。臓器損傷は198例(肝100、脾58、腎72、膵10)で、AとBの検出感度は、肝87.5%、46.2%、脾85.4%、50.0%、腎77.6%、44.1%、膵44.4% (Bはなし)であった。Aの肝II型検出率(20%)は他型(80-100%)より有意に低く、Bの肝IIIb型検出率(78.6%)は他型より有意に高かった。Aの脾I・III型検出率は70-100%で、BはIIIc・III d型で増加した(75-85%)。Aの腎周囲血腫検出率83.3%に対し腎実質損傷は53.3%(II・IV型10-30%)と低く、Bは全体で17.1%、IIIb・IIIc型は75%であった。Aの膵はIII型に限れば80%であった。Aの肝脾腎におけるUS・CTの分類一致は80-95%であった。FN損傷は表在性、線状、等エコー、血管性を特徴とし、intervention必要症例の検出率はA86.1%、B66.7%で、腎が未検出の71.4%を占めた。

臓器損傷の約30%は初期に腹腔内出血が検出されず、FASTの限界が指摘されている。USでの臓器損傷に関する前回の報告での感度(肝92.4%、脾90.0%、腎92.2%、膵71.4%)に比べ今回の検討では5-27%低い結果を得た。今回の検討では全症例においてCTと手術所見を基準としたため、より精度の高い結果が得られたものと考えられる。International Consensus Conferenceからの報告(1999)では臓器USの必要性は低いという意見が多数であるが、本研究で示すように、熟練者は、表在性・血管損傷の検出で劣るものの、実質損傷を効率よく検出かつ分類でき、非熟練者でも重症例を多く検出している。FASTのみならず臓器USは、緊急CTの必要がない患者のスクリーニングや、循環動態が不安定でCT施行が難しい患者の臓器損傷診断に重要な役割を担うと考える。

論文審査の要旨

鈍的腹部外傷における実質臓器損傷に対する超音波断層法 (US) の診断能を再評価した。1998年に報告した前回の検討では、CT、手術、再US、臨床経過を基準にしたため、USで見落とした軽症損傷は臨床経過で拾われず、実際よりも感度が高くなったと考えられる。今回、US結果をCTと手術所見のみを基準に損傷の重症度を含めて詳細に検討し、実質損傷をUSで直接検出する可能性および有用性を再評価した。

14年間604人を対象に、CT及びUS画像、US報告書、手術結果を見直し、日本外傷学会分類に基づいて肝・脾・腎・膵損傷の分類を行った。施行者を日常USに携わる熟練者のAとそれ以外のBの2グループに分け、臓器別及び型別の検出率などを検討した。臓器損傷は198例(肝100、脾58、腎72、膵10)で、AとBの検出感度は、肝87.5%、46.2%、脾85.4%、50.0%、腎77.6%、44.1%、膵44.4% (Bはなし)であった。Aの肝II型検出率(20%)は他型(80-100%)より有意に低く、Bの肝IIIb型検出率(78.6%)は他型より有意に高かった。熟練者における検出感度を前回の報告での感度(肝92.4%、脾90.0%、腎92.2%、膵71.4%)と比較すると、今回の研究ではいずれの臓器においても5-15%低い結果を得た。今回の検討では、全症例においてCTと手術所見を基準としたため、より精度の高い結果が得られたものと考えられた。熟練者は、表在性・血管損傷の検出で劣るものの、実質損傷を効率よく検出かつ分類でき、非熟練者でも重症例を多く検出していた。超音波検査は、腹腔内出血の検出のみでなく、臓器損傷診断にも重要な役割を担うと考えられた。

審査では、評価のgold standardとして手術所見の他にCTを用いることの妥当性に関して質問されたが、臓器損傷に関するCTの感度、特異度は高く、多くの論文でもCTがgold standardに用いられていると回答された。また、本研究はretrospectiveな研究であり、対象症例がrandomizeできないので、症例の難易度や検者の習熟度によって成績に影響がでないかとの質問がされた。これに対しては、熟練者では診断能力が比較的一定しており影響は少ないが、非熟練者では能力に個人差があり、成績に多少の影響を及ぼす可能性は否定できないと回答された。さらに、本研究における検討期間が14年と長期に渡るため、この期間における超音波診断装置および診断技術の進歩が結果に及ぼす影響に関して質問された。これに対しては、非熟練者においては診断が機器の精度に影響されやすく、多少の影響は否定できないものの、それ程大きくはないと回答された。

以上のように、鈍的腹部外傷における超音波断層法による実質臓器損傷の診断は、検者の熟練度や診断機器の精度によって影響を受ける可能性はあるものの、本研究は長期に亘る多数例の検討で有意な結果が得られており、臨床的有用性が高い論文と評価された。

論文審査担当者 主査 放射線医学 栗林 幸夫
外科学 北島 政樹 救急医学 相川 直樹
内科学 日比 紀文
学術確認担当者: 池田 康夫、北島 政樹
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成17年12月 7日

Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction

(心筋梗塞後早期リモデリングにおけるG-CSFの効果)

菅野 康夫

内容の要旨

心筋梗塞に至ると、早期から壊死組織は膠原線維に置換される。梗塞後早期より梗塞部では、線維原性サイトカインの一つであるTGF- β_1 の発現が増加し、その結果、膠原線維の産生が亢進する。これは、修復的線維化 (reparative fibrosis) といわれ、左室構造を保持し、過度な梗塞部伸展を抑制するために重要な現象である。梗塞部伸展の抑止は心破裂やポンプ失調といった合併症を予防し、予後の改善につながると考えられるが、現在のところ梗塞後治癒過程をターゲットとした治療は皆無である。皮膚損傷において、G-CSFは組織修復を早めることが報告されている。しかしながら、心筋梗塞後治癒過程におけるG-CSFの効果については未だに報告はなく、今回我々は、G-CSF投与による、梗塞後治癒過程の促進効果ならびに梗塞後早期の左室伸展の抑制効果について検討した。

【方法】9週齢雄ウイスターラットの左冠動脈を結紮することにより心筋梗塞を作成した。G-CSF (20 μ g/kg/day, MI-GCSF群) ないし生理食塩水 (MI-saline群) を心筋梗塞作成3時間後に腹腔内注射し、以後24時間毎に7日間注射した。14日後に心臓超音波および左室カテーテル検査により、心機能を評価した。心筋梗塞後1, 3, 7, 14日に心臓を摘出し、梗塞部、非梗塞部それぞれにおけるTGF- β_1 およびI型ならびにIII型プロコラーゲンのmRNA発現をRT-PCR法で定量した。TGF- β_1 については蛋白の発現を免疫プロット法で定量し、経時変化を観察した。心筋梗塞後7日の摘出心で組織学的検討をおこない、梗塞サイズおよび膠原線維の沈着を解析した。

【結果】MI-GCSF群では、MI-saline群と比し、左室圧上昇速度の最大値 (max dp/dt) が有意に大で、心臓超音波での左室拡張期および収縮期径が有意に低値、左室内径短縮率はより高値であった。梗塞3日後における梗塞部TGF- β_1 のmRNA発現はMI-saline群と比べ、MI-GCSF群において有意に亢進していた。梗塞部におけるI型ならびにIII型プロコラーゲンのmRNA発現はMI-GCSF群において、梗塞3日後で有意に高く、発現のピークはより早期であった。また、MI-GCSF群におけるTGF- β_1 の蛋白の発現は、MI-saline群に比し、梗塞3日後において亢進していた。非梗塞部でのこれらのmRNAおよび蛋白の発現は、両群ともに差がなかった。組織学的検討では、梗塞サイズは両群とも同程度であったが、梗塞7日後における膠原線維の沈着はMI-GCSF群で、より著明であった。

【結語】G-CSF投与により、心筋梗塞後早期における心機能改善効果を認めた。この効果は梗塞後治癒過程における膠原線維生成の促進が梗塞部伸展を予防することによりもたらされることが示唆された。

論文審査の要旨

急性心筋梗塞後の経過とともに梗塞部伸展を生じ、梗塞部の菲薄化と左室内腔の拡大を来す。この梗塞部伸展は心筋梗塞後左室リモデリングの大きな決定因子であるが、その過程を修飾する有効な治療方法は確立されていない。本研究では、サイトカインのひとつである顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の遺伝子組み換え製剤が、梗塞後治癒過程に及ぼす影響を及ぼすかを検討した。ラット心筋梗塞モデルで、比較的少量 (20 μ g/kg/day) のG-CSFを7日間連日皮下投与した場合、投与群は非投与群と比較し、梗塞後14日目の心エコーおよび左室カテーテルで評価した心機能の改善、梗塞後3日目におけるTGF- β_1 のmRNAおよび蛋白発現の増加、I型・III型プロコラーゲンmRNAの発現促進が確認された。また、組織学的解析では、梗塞サイズは両群で差がないものの、梗塞部でのコラーゲン蓄積量がG-CSF投与群で有意に増大していた。以上の結果より、G-CSFが急性心筋梗塞後の治癒過程の促進から早期の梗塞部線維化を惹起し、梗塞部伸展を抑制する可能性が示唆された。

審査ではまず、今回のモデルでの死亡率と死因に関する質問がなされた。心筋梗塞後14日間での死亡率は両群ともに約4割で差がなかったが、大部分は梗塞後24時間以内の超急性期における心不全によるものであったこと、さらに長期的に観察した場合、梗塞後14日目の心機能改善がより長期の予後を改善することが期待される、と回答された。次いで、TGF- β_1 の発現亢進に際してG-CSFが作用した細胞についての質問がなされた。心筋梗塞後3日では梗塞部に単球・マクロファージ系の炎症細胞浸潤が認められ、これらの細胞はG-CSFレセプターを有することから、組織に浸潤した単球・マクロファージ系細胞に作用している可能性が考えられると回答された。これに対して、梗塞後3日では心筋の壊死が進行中の時期であり、炎症系細胞の効果だけではG-CSFの線維化促進作用を十分には説明しがたく、心筋細胞を含めた他の細胞も関与している可能性があるのでは、との指摘を受けた。最後に、G-CSFの臨床応用における問題点についての質問がなされた。実際の臨床では心筋梗塞後に再灌流療法が施されるため、ステント留置後の内膜増殖による再狭窄率上昇のリスクや、好中球による組織傷害性の亢進などの悪影響がある可能性を有するが、骨髄からの幹細胞動員を目的とする高用量ではなく、今回のモデルで用いたような比較的低下量のG-CSFを早期から使用することでリスクを回避できる可能性があるのではないかと回答された。

以上のように、本研究にはさらなる検討課題を残しているものの、梗塞後治癒過程の修飾を介して、G-CSFの心筋梗塞後リモデリング抑制作用を示した研究であり、将来の新しい心筋梗塞の治療法とな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 内科学 小川 聡
外科学 四津 良平 構造生物学 福田 恵一
病理学 岡田 保典
学力確認担当者: 北島 政樹、四津 良平
審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年11月28日

Association between glaucoma and gene polymorphism of endothelin type A receptor (緑内障とエンドセリンA受容体の遺伝子多型との関連)

戸 坂 果 林

内容の要旨

【緒言】緑内障は失明原因の第2位であり、世界における患者数は約7000万人と推定されている。緑内障は眼圧上昇が主な危険因子ではあるが病態生理は未だ不明で、眼圧による視神経の機械的な圧迫だけでなく、循環障害による虚血や、遺伝的要因、加齢や近視など様々な因子が関与することが明らかになり、多因子疾患として認識されるようになってきている。また、加齢とともに有病率が増加するため、早期発見と根本的治療が患者の視機能維持のために期待されている。緑内障発症の危険因子や進行する危険因子を発症前に捉えることができれば、緑内障治療に有益な情報となりうる。これらの危険因子の同定は疫学的調査だけでは限界があるため、危険因子を緑内障感受性遺伝子多型として捉え、緑内障との関連を検索することは重要と思われる。

【目的】エンドセリン-1 (ET-1) は主に血管内皮細胞で産生され、ET-A受容体やET-B受容体を介して強力な血管収縮作用を有しており、眼圧や眼循環に影響を及ぼすと考えられている。近年、緑内障の病態への関与が示唆されており、本研究では、ET-1 (EDNI) およびET-A受容体 (EDNRA)、ET-B受容体 (EDNRB) の遺伝子多型と緑内障の関連を解析し検討した。

【対象および方法】正常対照224例、原発開放隅角緑内障 (広義) (OAG) 426例 (原発開放隅角緑内障 (狭義); POAG) 176例、正常眼圧緑内障; NTG) 250例を対象とし、Invader法を用いてEDNI (K198N、+138ins/del、T4124C、T-1370G)、EDNRA (A-231G、H323H (C/T)、C+70G、C+1222T)、EDNRB (L277L(G/A)) の9つの遺伝子多型を解析後、case-control studyを行った。また、各遺伝子多型による臨床型 (診断時年齢、最高眼圧、視野スコア) の比較を行った。統計学的解析には χ^2 検定およびMann-WhitneyのU検定を用い、さらにロジスティック回帰分析を行い、有意水準は5%未満とした。

【結果】case-control studyでは、ロジスティック回帰分析により年齢補正を行うと、いずれの遺伝子多型においても正常対照とOAG間で有意差はなかった。臨床型に関しては、NTGにおいてEDNRA/C+70G多型のGG型が視野障害の進行と有意な関連があった ($p=0.014$; Mann-WhitneyのU検定、 $p=0.027$; ロジスティック回帰分析)。

【結論】EDNRA/C+70G多型はNTGの危険因子と関連がある可能性が示唆された。

論文審査の要旨

緑内障は多因子疾患として認識されるようになってきており、危険因子を緑内障感受性遺伝子多型として捉え、検索することは重要と思われる。本研究では、強力な血管収縮作用を有し、眼圧や眼循環に影響を及ぼして緑内障の病態への関与が示唆されているエンドセリン-1 (ET-1) に注目し、ET-1 (EDNI) およびET-A受容体 (EDNRA)、ET-B受容体 (EDNRB) の遺伝子多型と緑内障の関連を検討した。9つの遺伝子多型におけるcase-control studyでは正常対照と原発開放隅角緑内障 (広義) (OAG) 間で、 χ^2 検定にてEDNI (K198N、+138ins/del)、EDNRA (C+1222T) の3多型において有意差があったものの、ロジスティック回帰分析により年齢補正を行うと、いずれの遺伝子多型においても有意差はなかった。臨床型に関しては、正常眼圧緑内障 (NTG) においてEDNRA/C+70G多型のGG型が視野障害の進行と有意な関連があった。以上より、EDNRA/C+70G多型はNTGの危険因子と関連がある可能性が示唆された。

審査では、まずcase-control studyにおける年齢補正についての質疑がなされ、本研究では正常対照とOAG間で年齢に有意差があり、論文査読者の指摘により年齢補正を行い、いずれの遺伝子多型においても有意差はなかったと結論したと回答された。しかしながら年齢は交絡因子ではなく、年齢補正をすると過補正になる可能性が高い。また逆に緑内障は加齢が関与するため全く年齢を考慮しないでいいわけではなく、この点については論文には記されていないが、年齢補正をしたときのオッズ比としなかったときのオッズ比の間に本来のオッズ比があるのではないかと考察する、と具体例を挙げながら説明された。加えて、それ以前のサンプリングの段階でpopulation stratificationやage matchingに配慮がなされるべきであったと回答された。次いで、ET-1やその受容体と緑内障の危険因子の関連の程度についての質問がなされ、in vitro、in vivoとも多数の報告による傍証があるようになり力だとして考えられるが、本研究で検討した多型の機能については現段階で不明である。よって危険因子として強い断定は難しいが、多型による受容体の感度の違いなどが推測されると回答された。さらに、多型の機能が明らかとなればより説得力があるのではないかと助言がなされた。最後に、ET-1およびその受容体は全身に認められるものであり、緑内障と全身性疾患の関連についての質問がなされた。これに対し、緑内障は危険因子として高血圧、夜間低血圧、動脈硬化、血管収縮などがあり、眼局所だけでなく全身性の血管動態の異常、循環不全も関与している可能性があるとして回答された。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき課題を残しているものの、緑内障感受性遺伝子多型を検索するきっかけとして有意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
分子生物学 清水 信義 衛生学公衆衛生学 武林 亨
病理学 岡田 保典
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10月31日

Expression of basic fibroblast growth factor is associated with a good outcome in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus

(食道扁平上皮癌における塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) の発現は良好な術後成績に關与する)

中 村 威

内容の要旨

悪性腫瘍の増殖、進展には腫瘍への微小血管の発達、新生が重要な働きをしていることが知られ、多くの血管新生因子と悪性腫瘍との関連が報告されている。著者らは食道扁平上皮癌と腫瘍微小血管密度 (MVD) 及びVascular endothelial growth factor (VEGF) 発現度に相関関係があることを報告した。しかし、VEGF以外にも多くの血管新生因子の関与が推測され、basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF) 及びPlatelet-derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF) について、その発現度と食道扁平上皮癌の悪性度との関連を免疫組織学的に検討した。

【対象と方法】1990年1月から1994年11月までに教室において食道扁平上皮癌で開胸食道切除術、リンパ節郭清を施行した患者のうち、追跡調査が可能であった79例を対象とした。切除標本のパラフィン包埋ブロックより薄切切片を作製し、LSAB法にて免疫組織化学染色を施行した。一次抗体は抗ヒトb-FGFモノクローナル抗体 (Wako)、PD-ECGFはIC6-203 (日本ロシユ) を用い、光学顕微鏡下に癌細胞の細胞質が一部でも染色されたものを陽性とした。それぞれの陽性群、陰性群を組織学的所見、MVD、術後成績につき統計学的に検討した。術後成績については化学療法、放射線療法など追加治療を施行していない52例について検討した。

【結果と考察】b-FGFは41例 (51.9%) が陽性、PD-ECGFは57例 (72.2%) が陽性であった。b-FGFのMVDの平均値は陽性群 $47.9 \pm 3.2/\text{mm}^2$ 、陰性群 $67.2 \pm 7.2/\text{mm}^2$ ($p=0.014$) と陽性群は陰性群に比べMVDの平均が有意に低値であった。PD-ECGFでは陽性群 $56.0 \pm 4.1/\text{mm}^2$ 、陰性群 $60.3 \pm 9.5/\text{mm}^2$ で両群間に差はなかった。リンパ節転移個数では、b-FGF陽性群は平均3.3個、陰性群4.6個 ($p=0.275$)、PD-ECGF陽性群は平均4.7個、陰性群2.0個 ($p=0.055$) であった。術後成績においてb-FGFでは陰性群 ($n=26$) に比べて陽性群の方が有意に予後良好であった ($p=0.033$)。PD-ECGFでは陽性群 ($n=36$) 陰性群 ($n=16$) の間に有意差は認めなかった ($p=0.570$)。b-FGF陽性群においてMVDが有意に低値で、その術後成績は有意に良好であった。血管新生因子の発現が良好な術後成績と関連があったことは従来の報告と異なる結果であった。生体内において血管新生因子は他にも多くの働きを持ち、必ずしも血管新生作用が優先されるとは限らないと推測する。b-FGFは食道扁平上皮癌の血管新生に關与している可能性があり、術後成績を予測する因子のひとつと考えられた。

論文審査の要旨

従来より血管新生は固形癌の増殖、進展に關与していると考えられ、食道扁平上皮癌において、血管新生因子であるvascular endothelial growth factor (以下、VEGF) の発現が高血管密度と相関し、予後不良因子のひとつであることを報告してきた。しかし、悪性腫瘍における血管新生の機序は複雑で多数の血管新生因子が關与していると考えられる。本研究では食道扁平上皮癌の組織を材料としてbasic-Fibroblast Growth Factor (以下、b-FGF) 及びPlatelet-derived Endothelial Cell Growth Factor (以下、PD-ECGF) について、その発現と食道扁平上皮癌の悪性度との関連を免疫組織学的に検討し、PD-ECGFの関与は明らかにできなかったが、b-FGFの発現が血管密度の低下と良好な術後成績に關与することを証明した。

審査では、まず免疫染色における抗体の選択理由について質問がなされた。文献検索のより、頻用されている抗体を選択し用いたと回答された。また、抗体の特異性については参考文献が抗体資料に引用されていると回答されたが、抗体の特異性は重要な点であり、特異性に関する文献の引用、記載が必要であるという助言がなされた。得られた免疫染色の組織像については、正常粘膜上皮は染色されず、主に腫瘍細胞の細胞質が染色され濃度差がみられるも、濃度差によって三段階に分けて検討したが有意差はなく、染色の有無によって検討したところ、今回の結果が得られたと回答された。次にb-FGFが予後と関係があった理由について質問がなされた。従来では食道扁平上皮癌ではリンパ節転移が予後不良と關与していることが報告されているが、本研究ではb-FGFとリンパ節転移個数には相関関係を見出すことはできなかった。しかし、低血管密度の症例の予後が良好であることは従来の報告と一致していた。b-FGFが血管密度を低下させた理由として、血管新生因子として知られるb-FGFも生体内においては多くの機能を有しており、先に線維芽細胞の発育を促し、間質の増生が促進されて血管新生が抑制されたと想定したが、これは明らかな根拠はないと回答された。b-FGFが線維芽細胞の発育を促し、間質の増生が促進されて血管新生が抑制された可能性について、腫瘍の組織像を含めて再検討する必要性があることが助言された。今回は蛋白レベルでの発現を免疫染色のみによって判定しているため、量的な判定がなされておらず、本研究の結果をより確実な、しかも質の高い研究にするためには、更に定量的な解析やmRNA、receptorについての検討を行なう必要があることが助言された。

以上のように、本研究ではなお検討すべき課題を残しているものの、b-FGFに關してb-FGFの発現と血管密度の低下、さらに術後成績との関係を見出した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 日比 紀文 病理学 岡田 保典
病理学 坂元 亨宇
学術確認担当者：池田 康夫、日比 紀文
審査委員長：日比 紀文

試問日：平成17年11月22日

日本人脊椎骨の解剖学的、放射線学的研究

野 尻 賢 哉

内容の要旨

脊椎の変性疾患や外傷、変形、腫瘍など、脊柱の支持性の破綻に起因する疾患に対して、後方から脊椎固定術による再建術が行われる。脊椎の後方から椎弓根にスクリューや椎弓、椎間関節にフックを設置し、ロッドやプレートに連結させ、脊椎を固定する方法が広く普及している。一方で、脊髄・神経根損傷、椎弓根損傷などの合併症を伴う場合があり、脊椎の解剖学的な知識が必要である。胸腰椎の椎弓根や椎間関節の解剖学的な報告は海外のものが多く、これらの計測結果に基づいて開発された内固定材が日本人患者には適合しない場合が散見される。日本人標本を用い胸腰椎の形態計測、特に椎弓根や椎間関節を中心に計測し、日本人に適した胸腰椎の内固定材を開発する際の基礎的な解剖データを得ることを目的とした。

(対象および方法) 日本人晒淨骨の胸腰椎103例(男性56例、女性47例:20-85歳)を対象とし、椎弓根短・長径、椎弓根軸長、椎間関節縦・横径・厚みを電子ノギスで直接計測し、椎弓根軸角・下椎間関節角はデジタルカメラで撮影した画像をコンピューターに取り込んだ後に、画像解析ソフトを用いて計測した。また手術を行う前提の脊椎疾患(腰椎変性すべり症、腰椎椎間板ヘルニア、腰部脊柱管狭窄症、対照群)に対し、脊髄造影後に腰椎CTを行った136例(男性91例、女性45例:21-86歳)を対象とし、画像をコンピューターに取り込んだ後に、画像解析ソフトを用い、椎弓根短径、椎弓根軸長、椎弓根軸角を計測し、疾患による差異についても比較検討した。

(結果および考察) 本邦における同様な報告は少なく、特に胸椎の椎弓根や椎間関節に関する報告はない。椎弓根の形態計測はスクリューの径や長さを、また椎間関節の形態計測はフックの幅を選択する際には重要な指標となる。われわれは幅広い年齢層を含んだ、日本人脊椎骨の胸腰椎の椎弓根および椎間関節の解剖学的計測および日本人の生体腰椎の椎弓根の放射線学的計測を行い、標準値を明らかにした。また放射線学的計測から疾患による椎弓根軸角の差が明らかになった。腰部脊柱管狭窄症や腰椎変性すべり症の椎弓根軸角は腰椎椎間板ヘルニアや対照群に比較し有意に小さかった。本研究の結果は、脊椎手術における内固定材の選択、設置の際に有用な参照データになり、日本人の体格に合った内固定材を開発するにあたって重要な指標になると考えられた。

論文審査の要旨

近年、脊柱支持性の破綻に起因する疾患に対し、脊椎再建術が行われ、椎弓根にスクリューや椎間関節にフックなどの内固定材を設置し、脊椎を固定する方法が普及している。一方で、脊椎の解剖学的な知識が不十分であると脊髄・血管損傷などの合併症を伴う場合が散見される。従来、解剖学的な報告は海外のものが多く、その結果に基づいて開発された内固定材が日本人患者には適合しない場合が見られた。そこで、本研究は日本人胸腰椎の椎弓根や椎間関節を中心に計測し、日本人に適した胸腰椎の内固定材を開発する際の基礎データを得ることを目的とした。日本人晒淨骨の胸腰椎103例および脊椎疾患に対し腰椎CTを行った136例を対象とし、椎弓根径、椎弓根軸長、椎弓根軸角、椎間関節径を計測し、また腰椎疾患による椎弓根形態の差異についても比較した。椎弓根の形態計測はスクリューの径や長さを、また椎間関節の形態計測はフックの幅を選択する際には重要な指標となりうる。日本人脊椎骨の胸腰椎の椎弓根および椎間関節の解剖学的計測および日本人生体腰椎の椎弓根の放射線学的計測を行い、標準値を今回明らかにした。また放射線学的計測から腰部脊柱管狭窄症や腰椎変性すべり症の椎弓根軸角は腰椎椎間板ヘルニアや対照群に比較し有意に小さいことが明らかになった。本研究の結果は、脊椎手術における内固定材の選択、設置の際に有用なデータになり、日本人の体格に合った内固定材を開発するにあたって重要な指標になることが示唆された。

審査では、まず今回の結果により臨床面で有用となった点について質問された。これに対して、計測結果から従来の最小径の椎弓根スクリューよりも細い胸椎椎弓根が散見されたため、日本人やアジア人向けの細いスクリューを開発し、手術で使用していると回答された。また晒淨骨からの直接計測と生体腰椎のCTからの画像計測の結果に差異があるか否かについて質問された。これに対して、椎弓根短径は下位腰椎、特にL4やL5では椎弓根が前額面に水平化するためにCTによる画像計測の方が大きい計測値となり、術前にCTでプランニングする際はスクリュー径の選択に留意すべきであると回答された。また直接計測と画像計測の結果の差を述べるなら同一の標本で直接および画像計測を行うべきだという指摘がなされた。

以上のように、本研究ではなお検討すべき課題を残しているものの、脊椎手術における内固定材を選択する際の有用な基礎データになり、日本人の体格に合った内固定材を開発するにあたって重要な指標が明らかになった点で有意義である研究と評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭

放射線医学 栗林 幸夫 解剖学 相磯 貞和

リハビリテーション医学 里宇 明元

学力確認担当者: 北島 政樹、四津 良平

審査委員長: 栗林 幸夫

試問日: 平成17年11月22日

Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor

(腎細胞癌におけるAktの活性化：PTEN発現の低下の寄与とAkt阻害剤によるアポトーシス誘導)

原 智

内容の要旨

Aktはセリン/スレオニンキナーゼで、これまでに様々な癌腫でAktの活性化が発癌や癌の進展に重要な役割を担っていることが示唆されている。また、癌抑制遺伝子PTENはAktの活性化を抑制していると考えられている。本研究では腎細胞癌におけるAktの活性化、PTENとの関連性、標的タンパクであるBadのリン酸化について検討した。また、Akt阻害剤の腎細胞癌株に対する抗腫瘍効果ならびに細胞内シグナル伝達に及ぼす効果について検討した。

材料・方法：腎細胞癌45例について、腫瘍部分と正常部分におけるPTEN、Akt、リン酸化Akt (p-Akt)、Bad、リン酸化Bad、Bcl-xLの発現をウェスタンブロット法にて検出し、発現レベルをNIH-imageを用いて検討した。4種の腎細胞癌株SW839、Caki-1、Caki-2、KU19-20に対しAkt阻害剤を用い、殺細胞効果をアラマーブルー法で検討し、アポトーシスの有無をフローサイトメトリーを用いたTUNEL法で検出した。細胞内シグナルの変化をウェスタンブロット法で検討した。

結果：腎細胞癌45例では、Aktの発現レベルは腫瘍部分と正常部分とで同程度であった。一方、p-Aktの発現レベルは正常部分に比べ腫瘍部分で有意に上昇し、PTENは腫瘍部分で正常部分に対し有意に発現レベルが低下し、p-AktとPTENの発現レベルに逆相関が認められた。Aktの活性化とPTEN発現の抑制は淡明細胞癌にのみ認められ、乳頭状腎細胞癌、嫌色素細胞癌では認められなかった。Badのリン酸化も同様であった。腎細胞癌株ではAkt阻害剤により濃度依存性に殺細胞効果を認め、その効果はKU19-20において際立っており、Caki-2では中等度、Caki-1、SW839では軽度で、KU19-20とCaki-2でアポトーシスが確認された。Aktの活性を有するKU19-20とCaki-2においてはBadリン酸化が認められ、Akt阻害剤によりAktおよびBadのリン酸化が抑制され、Bcl-xLの発現も抑制された。

考察：本研究では、腎細胞癌においてp-Aktの発現とPTENの発現が逆相関していたことから、PTENの発現の抑制がAktの活性化に関与していることが示唆された。また、Akt阻害剤により、Akt活性化とBadのリン酸化が認められるKU19-20、Caki-2においてアポトーシスが誘導され、Akt活性化の有無がAkt阻害剤の効果に重要であることが示唆された。腎細胞癌は化学療法、放射線療法に抵抗性であり、その治療は外科的切除が中心で、進行性腎細胞癌に対しては、新たな治療法の確立が望まれている。本研究により、Akt活性を伴う淡明細胞癌に対しAkt経路の抑制が新たな治療戦略に結びつく可能性が示唆された。

論文審査の要旨

Aktは細胞の生存やアポトーシスに重要な役割を担っており、発癌や癌の進展に関与していると考えられている。本研究では、腎癌組織におけるAktの活性化と癌抑制遺伝子PTENとの関連性について検討し、腎癌細胞におけるAkt阻害剤による抗腫瘍効果について検討した。腎癌組織においてAktの活性化とPTENの発現は逆相関しており、PTENの発現の低下がAktの活性化に寄与していることが示唆された。また、淡明細胞癌においてAktの活性化、PTENの発現抑制、Badのリン酸化といった一連の変化が認められた。Akt阻害剤を用いた検討ではAktのリン酸化が阻害され、Badのリン酸化の抑制およびBcl-xLの低下を伴ったアポトーシスが誘導された。

審査では、まずAktの活性化とPTENの発現低下に関して、他の癌腫をふくめ、その関連性について質問がなされ、腎癌のほか、卵巣癌、子宮内膜癌など様々な癌腫でAktの活性化、PTENの抑制についてそれぞれに報告はされているが、Aktの活性化とPTENの発現を同時に検討した報告は少ないとの回答がなされた。また、Aktの活性化と臨床成績との関連性について質問がなされ、組織学的異型度が高い症例や転移を有する症例でリン酸化Aktの発現が高い傾向にあるとの説明がなされた。組織型におけるAktの活性化、PTENの発現の差について質問がなされ、Aktの経路以外の関与が考えられるとの返答がなされた。今後は症例数を増やす一方でc-Metなどの関与も考慮し、免疫染色や定量PCRによる評価も組み込んでいくべきであるとの助言がなされた。次にPTENの発現が低下しているメカニズム、Aktのリン酸化経路について質問がなされ、前者は遺伝子欠失、変異やpromoterのmethylationに関与していると考えられているとの返答がなされ、後者については、EGFやIGFなどの増殖因子を介した上流からのシグナルが影響しているとの返答がなされた。次いで、Akt阻害剤についての質問がなされ、PIP3と拮抗してAktのリン酸化を阻害しているとの説明がなされた。また、Akt阻害剤のAkt阻害の特異性に関して、PI3Kに対する抑制作用もわずかに認められるとの返答がなされた。これに対し、Aktに対するアンチセンスやdominant negative 変異体を用いた検討をすべきであるとの助言がなされた。また、今後、Akt阻害剤によるmTOR、HIF-1 α 、VEGFなどのシグナル経路へおよび影響、in vivoでの抗腫瘍効果について検討すべきとの助言がなされた。

以上、本研究は今後さらに検討されるべき課題を残しているものの、腎細胞癌におけるAktの活性化とPTENとの関連性を解明し、Aktを介したシグナルの抑制が今後の腎細胞癌の治療戦略に結びつく可能性を示した価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝
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：池田 康夫、岡田 保典
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成17年12月21日

Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis

(ヒト精子核タンパク質の2次元電気泳動法による解析)

吉 井 毅

内容の要旨

ヒト精子核タンパク質は、プロタミンとしてP1群とP2群の2つのタンパク質ファミリーを含んでおり、P1群はHP1から、P2群はHPI1、HPI2、HPS1、HPS2という前駆体を経て合成されるHP2、HP3、HP4からなる。一方、男性不妊患者ではP2前駆体からP2への翻訳後修飾の異常が原因でP1/P2が高いとの報告がある。プロタミンは小分子、強塩基性で、SS結合を形成しやすい分子であるため、すべてのP2関連の分子種の包括的な解析はこれまで困難であった。本研究では、RFHR (radical-free, highly reducing) 2次元電気泳動法をもちいて、ヒト精子核タンパク質の分離、定量的解析を試みた。

健康男性よりインフォームドコンセントを得た上で提出された射出精液から分離した精子を用い、Balhornらの方法により精子核タンパク質を抽出した後、RFHR 2次元電気泳動法を用いて分離し、PVDF膜に転写した後にアミノ酸配列を解析した。また、画像解析ソフトを使い、タンパク質構成比を測定した。精子核タンパク質は高い再現性をもって明瞭な12スポットに分離され、1スポットが精巢特異的ヒストン (TH2B)、5スポットがP1関連タンパク質、6スポットがP2関連タンパク質に一致していた。P2関連タンパク質の構成比は、HPI1 : HPI2 : HPS1 : HPS2 : HP2 : HP3 = 1.000 : 0.6000 : 1.116 : 2.083 : 3.267 : 2.455であった。RFHR 2次元電気泳動法は、1次元目は電荷量によって、2次元目は主に分子量によって分離を行う非平衡型の電気泳動であるが、様々な工夫により小分子量、強塩基性タンパク質に対する分離能、定量性の改良がなされている。前駆体を含めたすべてのP2関連タンパク質を1枚のゲル上で正確に分離、比較定量した報告はこれまでない。RFHR 2次元電気泳動法をもちいて解析した射出精液中の精子核タンパク質の詳細な構成比は、精子機能の新しい指標となる可能性がある。

本研究では、RFHR 2次元電気泳動法により、射出精液より抽出した精子核タンパク質、特に含まれるすべてのP2関連タンパク質、を高い精度をもって1枚のゲル上で分離、比較定量できることを示した。また、本研究は男性不妊患者検体へ応用可能であるので、男性不妊の診断や病因解明に有用な実験法となると考えられた。

論文審査の要旨

ヒト精子核タンパク質はプロタミンとしてP1群とP2群の2つのタンパク質ファミリーを含んでおり、男性不妊患者ではその構成比に異常があることが多数報告されている。プロタミンは小分子量、強塩基性であり、またシステイン残基にとみSS結合を形成しやすいため、精子核タンパク質の分離解析は困難であり、前駆体を含めたすべてのP2関連タンパク質を包括的に分離、比較定量した報告はこれまでない。本研究では、RFHR (radical-free, highly reducing) 2次元電気泳動法をもちいることにより、健康男性の射出精液より抽出した核タンパク質、特に含まれるすべてのP2関連タンパク質、を高い精度をもって1枚のゲル上に分離、比較定量できることを示した。射出精液中の精子核タンパク質の詳細な構成比は精子機能の新しい指標となる可能性がある。

審査では、まず、本研究で行われたRFHR 2次元電気泳動法の再現性について質問がなされた。これに対し、本法ではゲル中に残存するフリーラジカルを完全に除去することにより電気泳動中のタンパク質の消耗を防いでいるため回収率すなわち量的な再現性が高いこと、また泳動条件を一定にすることによりスポットの出現パターンすなわち位置的な再現性も高いこと、を多数の泳動ゲル解析により確認していると回答された。次に、分離されたスポットの同定にウェスタンブロッティング法を用いたか、との質問がなされ、精子核タンパク質は互いのアミノ酸配列の違いが僅かなタンパク質群であること、ウェスタンブロッティング法は網羅的な解析には必ずしも適していないこと、より本研究では行っていない、との回答があった。また、精子核タンパク質の構成比異常と男性不妊症の関連について質問された。これに対して、核タンパク質の構成比異常がある精子はハムスターテストの結果は悪いが顕微授精の成績には問題がないとの報告があること、ヒストンからプロタミンへの置換が起こる精子形成過程後期には先体形成など他の重要な変化も起こっていることから、精子核タンパク質構成比の差違は受精に関する他の異常を間接的に反映する可能性があるとして推測される、と回答された。最後に、プロタミン1が5スポットに分離された理由について質問があった。これに対しては、ゲル中の還元環境が相対的に不足し、プロタミン1が泳動中に複合体を形成した可能性がある、との回答がなされた。これに対し、C末端側での修飾による差異を検出している可能性があるため、質量分析法などによりさらに検討すべきである、との助言があった。

以上のように、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、ヒト精子核タンパク質を高い精度をもって包括的に分離、比較定量できることを示し、精子形成過程の解明や男性不妊症診断への可能性を示した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
医化学 末松 誠 泌尿器科学 村井 勝
産婦人科学 青木 大輔
学力確認担当者: 池田 康夫、末松 誠
審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成17年12月24日

Specific expression of an HNK-1 carbohydrate epitope and NCAM on femoral nerve Schwann cells in mice

(マウス大腿神経シュワン細胞におけるHNK-1糖鎖抗原とNCAMの特異的発現)

齋藤 治和

内容の要旨

シュワン細胞は末梢神経系におけるグリア細胞である。シュワン細胞には従来より2つのタイプがあることが知られている。一つは髄鞘を形成しているシュワン細胞 (myelin-forming Schwann cell: MFSC) であり、もう一つは髄鞘を形成していないシュワン細胞 (non-myelin-forming Schwann cell: non-MFSC) である。これらは形態的に差異が明らかで、区別は容易である。1991年、牧らはY字型シリコンチューブを用いた実験で、運動神経片と知覚神経片では軸索誘導能が異なっていることを報告した。これにより、運動神経と知覚神経を構成するシュワン細胞が異なる機能をもった細胞であることが予想された。本研究では、シュワン細胞における様々な細胞接着分子の発現を検索して両者の違いを明らかにし、その他のタイプのシュワン細胞の存在を検索することを目的とした。マウス大腿神経は運動と知覚神経束を含んでおり、これを凍結切片として抗HNK-1抗体、M6749抗体および抗NCAM抗体で免疫組織染色を行った。抗HNK-1抗体、M6749抗体による染色では運動神経束が陽性に染色され、知覚神経束はほとんど染色されなかった。一方、抗NCAM抗体による染色では知覚神経束は陽性であったが、運動神経束はほとんど染色されなかった。運動神経束に認められたHNK-1陽性細胞は、リング状に染色されており、髄鞘を形成しているシュワン細胞に属するものと考えられた。また、知覚神経束に認められたNCAM陽性細胞は、免疫二重染色でS-100陽性、L1陽性であり、知覚無髄線維のシュワン細胞であると考えられた。抗HNK-1抗体とM6749抗体を用いた免疫プロット解析では、知覚神経束よりも運動神経束の画分で100kDのバンドが強く認められた。抗NCAM抗体では140kDおよび120kDのバンドが知覚神経束に認められ、運動神経束には認められなかった。大腿神経を切断して経時的に観察すると、運動神経束のHNK-1陽性細胞は切断後1週でも認められたが、2週で徐々に減弱し、3週ではほとんど見られなくなった。一方、知覚神経束のNCAM陽性細胞は、切断後3日でほとんど見られなくなった。

成長による変化では、HNK-1陽性細胞およびNCAM陽性細胞はともに生後3週以降に出現していた。これらの結果から、運動神経束と知覚神経束を構成するシュワン細胞は異なる細胞接着分子を発現し、神経の切断や成長に際して異なる変化をすることが判明した。運動と知覚シュワン細胞は末梢神経再生において異なる機能を持ち、異なる役割をはたしている可能性がある。さらに、シュワン細胞の分化に関して、従来より知られていたMFSCとnon-MFSCへの分化の次の段階が存在する可能性が考えられた。すなわち、MFSCはHNK-1陽性細胞 (motor MFSC) とHNK-1陰性細胞 (sensory MFSC) へ分化し、non-MFSCはNCAM陽性細胞 (sensory non-MFSC) とNCAM陰性細胞 (autonomic non-MFSC) へ分化する可能性である。

近年、広範な末梢神経損傷に対して、シュワン細胞を移植した人工神経を用いて修復する研究が行われるようになってきたが、本研究の成果は人工神経における軸索再生や再髄鞘化の促進への応用が期待される。

論文審査の要旨

末梢神経系のグリア細胞であるシュワン細胞には、従来よりミエリンを形成しているものと形成していないものがあることが知られているが、運動神経と知覚神経を構成するシュワン細胞の違いに関しては明らかでなかった。本研究では、シュワン細胞における様々な細胞接着分子の発現を検索して両者の違いを明らかにすることを目的とした。運動と知覚神経束を含むマウス大腿神経を凍結切片として抗HNK-1抗体、M6749抗体および抗NCAM抗体で免疫組織染色を行った。さらに、運動枝と知覚枝から膜画分を取り出して、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、運動神経束にはHNK-1陽性細胞が存在し、その染色性から運動有髄線維のシュワン細胞と考えられた。また、知覚神経束にはNCAM陽性細胞が偏在し、免疫二重染色でS-100陽性、L1陽性であることから、知覚無髄線維のシュワン細胞と考えられた。さらに、大腿神経を切断して経時的に観察すると、運動神経束のHNK-1陽性細胞は3週で、知覚神経束のNCAM陽性細胞は切断後3日でほとんど見られなくなった。成長過程では、HNK-1陽性細胞およびNCAM陽性細胞はともに生後3週以降に出現していた。これらから、運動神経と知覚神経を構成するシュワン細胞は神経の切断や再生に際して異なる変化をすることが判明した。

審査では、まず、切断後の軸索再生過程に関する質問がなされた。近位断端からの液性因子による誘導とともに、遠位断端からシュワン細胞が遊走し、再生軸索が誘導されることも考えられると回答された。次に、臨床において運動機能と知覚機能の回復に差がみられることについて質問がなされ、実際の臨床では、神経が障害された部位によっても回復が異なることや、切断以外の病態も存在し、知覚神経片により強い軸索誘導能が存在したとしても、運動機能の回復の方が良好な場合もあると回答された。さらに、知覚神経細胞はDRGに由来する細胞であり、運動神経細胞は脊髄前角に由来する細胞であることから、両者の染色性の違いについて質問がなされたが、今回の研究では軸索の染色性については違いは見られなかったと回答された。またHNK-1糖鎖抗原の由来について質問がなされ、軸索を通じて輸送されてくるのか、軸索との接触によりシュワン細胞に糖鎖抗原を形成する酵素が発現するのかは不明であると回答された。NCAMの発現が生下時には運動枝、知覚枝ともに陽性であり、その後染色されなくなることについて質問がなされたが、生下時には未熟なシュワン細胞が残存しているためと考えられると回答された。最後に、今後の臨床応用について質問がなされ、NCAM陽性シュワン細胞が軸索誘導に有利に働くとすれば、将来開発される人工神経にも応用可能であろうと回答された。

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、運動および知覚神経を構成しているシュワン細胞が異なる糖鎖抗原および蛋白質を発現していることを明らかにした点で有意義であると評価された。

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

試問日: 平成18年 1月25日

PHOTODYNAMIC THERAPY WITH PAD-S31, A NEW HYDROPHILIC CHLORIN PHOTOSENSITIZER, IN AN ORTHOTOPIC RAT BLADDER TUMOR MODEL

(正所性ラット膀胱腫瘍モデルにおける新たな親水性クロリン光感受性物質である
PAD-S31を用いた光線力学的療法)

浅 沼 宏

内容の要旨

1. 緒言

膀胱腫瘍は再発率が高く、BCG療法や化学療法などの補助療法を要する症例が多いもののその効果は未だ十分とはいえず新たな治療方法の確立が急務となっている。光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT) は、腫瘍への特異的な集積性を有する光感受性物質とレーザー光との併用で悪性腫瘍内で光化学反応を惹起させ腫瘍を選択的に治療するものであり、照射の容易な膀胱癌はその良い適応と考えられる。本研究では、正所性ラット膀胱腫瘍モデルにおいて、新たな親水性光感受性物質であるPAD-S31の腫瘍集積性とPAD-S31を用いたPDTによる抗腫瘍効果を経尿道鏡システムおよび病理組織検査により検討した。

2. 材料・方法

メスフィッシャーF344ラットの膀胱後壁にラット膀胱癌細胞株AY-27細胞 (4×10^6 細胞/匹) を直接注入し、5日後に経尿道的内視鏡検査により腫瘍形成 (平均腫瘍径6 mm、深さ5 mm) を確認した。PAD-S31 (5 mg/kg) を尾静脈より注入し、静注直後から24時間後まで腫瘍および正常膀胱壁の450nm照射で発せられた蛍光強度を経時的に測定し、PAD-S31の腫瘍集積性を検討した。PAD-S31 (5 mg/kg) を静注し、1時間後または3時間後に経尿道的に挿入した石英ファイバーによりダイオードレーザーを光源としてPDT (照射パワー密度: 100 mW/cm^2 、照射エネルギー密度: $50 \sim 200 \text{ J/cm}^2$) を施行した。PDTによる抗腫瘍効果を照射7日後に膀胱鏡検査と摘出した膀胱の病理組織検査を行い検討した。

3. 結果

腫瘍および正常膀胱壁のPAD-S31の蛍光強度は静注後60~70分で最大となった。腫瘍の蛍光強度は正常膀胱壁の蛍光強度より常に高値を示し、静注後150~240分には10倍以上の値を示した。

PAD-S31静注3時間後 50 J/cm^2 照射 (6匹) では全てのラットで50%以下の腫瘍縮小が認められるのみであったが、 100 J/cm^2 の照射 (7匹) では全てのラットで50%以上の著明な腫瘍縮小が認められた。さらに、 150 J/cm^2 (7匹) および 200 J/cm^2 の照射 (6匹) では、それぞれ4匹 (57%) および3匹 (50%) のラットで完全な腫瘍消失、残る全てのラットにおいても50%以上の著明な腫瘍縮小が認められた。PAD-S31静注1時間後 100 J/cm^2 照射 (7匹) では1匹 (14%) で完全な腫瘍消失、残る6匹 (86%) で50%以上の腫瘍縮小が認められたが、3匹 (43%) で正常膀胱壁の障害が認められた。

4. 結論

正所性ラット膀胱腫瘍モデルにおいて、PAD-S31を用いたPDTは膀胱癌の治療として有用であることが示された。今後、膀胱腫瘍患者への臨床応用が期待される。

論文審査の要旨

膀胱癌は再発率が高く新たな治療方法の確立が急務となっている。本研究では、ラット膀胱癌由来AY-27細胞を用いて正所性ラット膀胱腫瘍モデルを作成し、新たな親水性光感受性物質であるPAD-S31の腫瘍集積性の検討とPAD-S31を用いたダイオードレーザーによる光線力学的療法 (PDT) を行なった。抗腫瘍効果の判定には申請者らが応用した細径膀胱鏡システムおよび病理組織検査により検討した。PAD-S31静注3~4時間後に腫瘍への選択的な集積性が最大となり、抗腫瘍効果は照射エネルギーの増強に応じて増大することが示された。

審査では、まず、PDTの特異性について質疑された。光感受性物質が腫瘍への特異的な集積性を示す理由については、光感受性物質はリポ蛋白やヘモベキシンに強い親和性を有するため腫瘍細胞内に能動的に取り込まれ、さらに腫瘍組織は排泄作用が乏しいため集積性が高くなることが回答された。照射光の波長の違いによる治療効果への影響に関しては長波長の光ほどヘモグロビンへの吸収や散乱が減り治療の深達度が期待でき、670nm光では10mm以上の治療が可能であることが回答された。光感受性物質の投与方法については、静注による全身投与が一般的であるが、表在性癌の場合は膀胱内注入が可能で膀胱萎縮などの副作用が軽減されることが回答された。PDTの抗腫瘍効果の機序について質問がなされた。光化学反応により生じた一重項酸素による腫瘍細胞への直接効果と腫瘍血管の血流遮断効果が考えられることが回答されたが、なお壊死・アポトーシスについての検討が望まれる旨助言があった。PAD-S31投与1時間後と3時間後の治療成績の違いについては、1時間後では正常膀胱壁にもPAD-S31が多く取り込まれているため3時間後に比べ一部の正常膀胱壁に高度の傷害が認められることが説明された。次に、本実験の動物モデルにおける膀胱容量、腫瘍の異型度について質問がなされた。膀胱容量は $0.5 \sim 0.8 \text{ ml}$ 、異型度はgrade 2~3と説明された。本研究で表在性モデルではなく膀胱壁内の大きな腫瘍モデルを用いた理由について質問がなされた。PAD-S31は670nmに吸収帯を持つため深部病変への治療効果を検討するためであることが説明された。本治療法の臨床応用については、膀胱癌のBCG療法などの補助療法が無効な症例、大きな乳頭状腫瘍症例、高齢者など外科的治療が困難な症例などの他に、肺癌など他臓器の悪性疾患や眼科領域の新生血管病変に対する治療法として応用可能であるとされた。

以上のように、本研究は長期的な生存率、膀胱萎縮などの副作用の検討が必要であるものの、正所性膀胱腫瘍モデルとその非侵襲的な評価方法を確立し、PAD-S31を用いたPDTが膀胱癌の治療として有用であり、今後臨床応用が期待できることを明らかにした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝
外科学 小林 紘一 病理学 坂元 亨字
病理学 岡田 保典
学力確認担当者: 池田 康夫、小林 紘一
審査委員長: 小林 紘一

試問日: 平成18年 2月 1日

ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis

(ADAM28は非小細胞肺癌で過剰発現し、細胞増殖とリンパ節転移と相関する)

大 塚 崇

内容の要旨

【背景】ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) はヘビ毒に構造が似たタンパク質で、現在まで30種類以上が確認されている。ADAMsの生体内での役割はまだ明らかではないが、構造上、膜に結合したタンパクの一部を切り落とす (shedding)、細胞外マトリックスの破壊、細胞接着等に関与すると考えられ、癌での役割が注目されている。しかし癌でのADAMsの役割はいまだ限られた情報しかない。近年、肺癌は先進国で増加し、この20年でも患者の生存率は目立った改善を認めていない。本研究ではADAMsの発現を非小細胞肺癌で検討し臨床病理学的検討を行い、肺癌における役割を検討した。

【材料と方法】非小細胞肺癌症例36例から肺癌組織、16例から正常肺組織を採取し、11種のADAMsに対して、RT-PCRを施行した。ADAM28 (ADAM28m ; membrane anchored type、膜結合型とADAM28s ; secreted type、分泌型) が肺癌組織で高発現していたことから、ADAM28に関して肺癌、正常肺組織で定量PCR (real time PCR)、*in situ* hybridization、免疫組織染色、immunoblottingを施行した。また定量PCRの結果と臨床病理学的パラメーターの関係を検討した。

【結果】定量PCR法で検討した組織内mRNA量は、肺癌組織でADAM28mとADAM28sがそれぞれ正常肺組織よりも16.8倍、9.0倍高発現していた。また、ADAM28mとADAM28sの高発現はリンパ節転移、腫瘍サイズが3 cmより大きいことと強く相関していた。ADAM28mとADAM28sは共にMIB1-positive cell indexとの相関が認められ、癌の増殖と関連していることが強く示唆された。*In situ* hybridizationと免疫組織染色により肺癌組織においてADAM28がmRNA、蛋白の両方のレベルで高発現していることが認められた。また肺癌組織のimmunoblottingにより、42kDaの活性型のADAM28が肺癌組織に存在することが確かめられた。

【結語】肺癌においてADAM28の高発現を認め、またADAM28が活性型として肺癌組織内に存在することが確かめられた。ADAM28は肺癌において細胞増殖、進展に関与し癌治療の新たなターゲットとなりえることが示唆された。

論文審査の要旨

本研究ではヒト非小細胞肺癌、および非腫瘍部の肺組織を材料として11種類のメタロプロテアーゼ型ADAMファミリー分子の発現を検討し、ADAM28mおよびADAM28sが非小細胞肺癌の腫瘍細胞にmRNAレベル、蛋白レベルで特異的に高発現していることが証明された。またADAM28mおよびADAM28sのmRNAの高発現がリンパ節転移、腫瘍径、細胞増殖と相関していることが明らかにされた。また非小細胞肺癌組織のimmunoblottingにより、42kDaの活性型のADAM28が非小細胞肺癌組織に存在することが確かめられた。

審査ではADAM28のヒト正常組織での発現、また他の癌での発現に関しての質問がなされた。文献上の報告ではリンパ球、リンパ節、脾臓などの組織での発現があると回答された。また他の組織の癌では、肺癌での高発現も認められると回答された。Real time PCRでのADAM28の発現の結果と各症例の予後に相関が見られるかとの質問がなされた。これに対し、症例数が少ないが、腫瘍径、リンパ節転移のある症例でADAM28の発現が高い傾向にあったため、高発現と再発は関与すると推測されるが、今後の検討が必要であるとの回答がなされた。免疫染色での肺癌組織で部位よりの染色結果に特徴があるかとの質問がなされた。これに対し癌細胞全体に強く染まるが、癌の先進部での強い染色性があるなどの所見は症例によっては認めたが、全ての症例で認められるものではなかったと回答された。ADAM28の肺癌における具体的な機能に関しての質問がされた。これに対し本論文では示されていないが、他の実験ではADAM28がインスリン様成長因子結合蛋白 (insulin-like growth factor binding protein, IGFBP) のひとつIGFBP-3を分解することが確認されていて、ADAM28がIGFBP-3を分解することによりIGFBP-3と結合しているインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF) を放出し、細胞増殖に関与している可能性が示されているとの回答がなされた。またマトリゲルアッセイなどによりADAM28の癌細胞での浸潤能における役割を検討するべきであったとの助言がなされた。In vivoでの癌の発育に関する実験は行わなかったのかという指摘がなされた。これに対し、本論文では示されていないが、ADAM28に対するsiRNAによる腫瘍抑制効果が動物モデルにおいて見られていると回答された。

以上、本研究はいくつかの検討課題を残しているものの、ADAM28のヒト非小細胞肺癌の細胞増殖における役割の一端を解明し、今後臨床的応用に発展し得る可能性を持つ研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 小林 紘一
病理学 坂元 亨宇 先端医科学 河上 裕
内科学 小川 聡
学力確認担当者: 池田 康夫、坂元 亨宇
審査委員長: 坂元 亨宇

試問日: 平成18年 1月24日

Cyclooxygenase-2 Expression during Allergic Inflammation in Guinea-Pig Lungs

(モルモットのアレルギー性気道炎症モデルにおけるシクロオキシゲナーゼ-2の発現)

小 熊 剛

内容の要旨

アラキドン酸代謝産物は気管支喘息の病態である気道収縮と炎症を修飾する。その産生酵素シクロオキシゲナーゼ (Cox) には、ほとんどの細胞で構成的に発現するCox-1と、炎症性細胞などでサイトカインなどにより誘導されるCox-2の2つのアイソフォームがある。本研究ではアレルギー性気道炎症におけるCox-2の発現と病態への関与を明らかにすることを目的に、モルモット喘息モデルを用いて検討した。

雄性ハートレー系モルモットに卵白アルブミンを反復吸入させて感作した後、抗原吸入曝露を行った。経時的にモルモット肺を摘出してRNAおよび蛋白を抽出し、ノーザンブロット法、ウェスタンブロット法でCox-1/2 mRNA、蛋白の発現を検討した。さらにCox-2依存性アラキドン酸代謝産物を同定するため、摘出肺をCox非選択的阻害剤 (インドメタシン)、Cox-2選択的阻害剤 (NS-398, JTE-522)、vehicleのいずれかで前処置後、A23187あるいはアラキドン酸存在下で培養し、上清中のアラキドン酸代謝産物濃度 (PGD₂, PGE₂, 6-keto PGF_{1α}, TxB₂) をELISA法で測定した。次にNS-398を腹腔内投与したモルモットに抗原曝露を行い、プレチスモグラフィ法でヒスタミン気道過敏性、気管支肺胞洗浄法で気道炎症 (総細胞数および白血球分画) を評価した。

Cox-1 mRNAはモルモット肺において構成的に発現しており、抗原曝露によって発現量の変化を認めなかった。一方、Cox-2 mRNAは抗原曝露1時間後に一過性に発現が顕著に増強した。Cox-2蛋白も抗原吸入6時間後に発現が2.5倍に増強した。

抗原曝露後の培養モルモット肺組織からはA23187によりすべてのアラキドン酸代謝産物が産生され、インドメタシンで抑制された。一方、選択的Cox-2阻害剤は抗原曝露群でのPGD₂, PGE₂産生のみを抑制した。モルモット個体へのNS-398投与は気道過敏性には影響しなかったが、有意に気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞数 (好酸球数、好中球数) を抑制した。

以上よりアレルギー性気道炎症では一過性のCox-2発現が誘導され、PGD₂, PGE₂産生を介してアレルギー性気道炎症の病態を修飾すると考えられた。

論文審査の要旨

アラキドン酸代謝産物は気管支喘息の病態への関与が知られているが、その産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (Cox) には、構成的に発現するCox-1と、サイトカインなどによる刺激で主に誘導されるCox-2の2つのアイソフォームがある。本研究では気管支喘息の病態におけるCox-2の関与をモルモット喘息モデルを用いて検討した。モルモット喘息モデルは卵白アルブミン (OA) を2回反復吸入させて感作した後、同様に抗原吸入曝露を行い作成した。本モデルではCox-1 mRNAは構成的に発現し、抗原曝露によって発現量の変化を認めず、Cox-2 mRNAは抗原曝露1時間後に一過性に発現が顕著に増強し、蛋白レベルでも抗原曝露6時間後に2.5倍発現が増強していた。また、抗原曝露後の摘出肺とCox-2選択的阻害剤 (NS-398, JTE-522) を用いた *ex vivo* の系で、誘導されたCox-2依存性アラキドン酸代謝産物がPGD₂, PGE₂であることが明かにされた。さらにNS-398を *in vivo* で抗原曝露後に投与すると、vehicle投与群に比し気道過敏性は変化がなかったが、気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞数 (好酸球数、好中球数) 増加が抑制されていた。以上よりアレルギー性気道炎症では一過性にCox-2発現が誘導され、PGD₂, PGE₂産生を介してアレルギー性気道炎症の病態を修飾すると結論した。

審査では、まず動物モデルに関して、同様の手技で行われた感作、曝露の区別に関する質問があった。それに対して2回目までが抗原感作、3回目が抗原曝露であること、気道収縮、炎症性細胞の気道への集積は3回目の抗原曝露後に顕著に認められ、2回目までの吸入では認められないことが回答された。Cox-2発現細胞に関する質問では、本研究では免疫組織学的検討などでの同定はされていないが、PGD₂, PGE₂がCox-2依存性に産生されていたことから気道上皮細胞、肺泡マクロファージ、肥満細胞がCox-2発現細胞である可能性があるとの回答がされた。また、本モデルでの炎症性細胞の気道への集積は抗原曝露3時間以降であることからCox-2を発現した炎症性細胞の流入である可能性は低いことが述べられた。つぎに本モデルで特徴的に認められた一過性のCox-2発現のメカニズムに関する質問がなされた。これに対しては培養肥満細胞でIgEの架橋と同様の発現が認められること、時間経過から気道に放出されたサイトカインなどによる発現誘導である可能性は低く、気道収縮によるメカニカルストレスが関与している可能性も考えられるとの回答がされた。

以上、本研究はCox-2発現細胞の同定、その発現メカニズムなど検討すべき点が残されているが、気管支喘息の病態におけるCox-2の関与を明かに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 内科学 小川 聡
外科学 小林 絢一 微生物学・免疫学 小安 重夫
医化学 末松 誠
学力確認担当者：池田 康夫、小林 絢一
審査委員長：小林 絢一

試問日：平成17年12月27日

Infusion of the β -adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats

(β 遮断薬エスマロールは敗血症ラットにおける心機能障害の進行を抑制する)

鈴木 武志

内容の要旨

論文審査の要旨

背景

敗血症は感染に伴う過剰な全身性の炎症反応であり、いまだに死亡率が高い。これまで輸液やカテコラミン投与により心拍出量を高く維持する治療法が行われてきたが、敗血症では心機能障害が早期より進行している。 β 遮断薬は心不全や虚血性心疾患患者の予後を改善することが報告されているが、敗血症心筋に対する効果を調べた報告はこれまでにない。そこで高心拍出量敗血症ラットモデルを用いて、 β 1選択性遮断薬であるエスマロールの敗血症心筋に対する効果について検討を行った。

材料・方法

ラットに対し盲腸結紮術を行い、control群 (n=11) には生理食塩水を、エスマロール-10群 (n=10) にはエスマロール10mg/kg/hr、エスマロール-20群 (n=10) には20mg/kg/hrを2 ml/hrの速度で24時間持続注入した。1および24時間後に採血を行い、TNF- α およびIL-1 β を測定した。24時間後に全身麻酔下で心臓を摘出し、順行性摘出灌流心標本にて心機能評価を行った。前負荷を10から20cmH₂Oまで2 cmH₂Oずつ増加させ、心拍数、一回拍出量、心拍出量、LVDP、dP/dt_{max}、dP/dt_{min}、心筋酸素消費量、cardiac workおよびcardiac efficiencyを算出した。正常ラット7匹 (sham群) についても上記と同様に心機能評価を行った。これとは別に、24時間後にsham群を加えた4群より3検体ずつ心筋検体を取り、心筋 β 1レセプター密度の測定を行った。心機能の比較にはtwo-way analysis of varianceを用い、群間比較はBonferroni correction補正にて行った。 β 1レセプターについてはone-way analysis of varianceを用い、群間比較はScheffe's testを採用した。結果は平均±標準偏差で表わし、p<0.05を有意とした。

結果

心拍数を除いた心機能を示す各パラメーターは、control群に比べてほぼ全ての前負荷において両エスマロール群で有意に高い値を示し、特にcardiac workおよびcardiac efficiencyについては全ての前負荷において有意に高く維持された。24時間後のTNF- α は両エスマロール群でcontrol群に比べて有意に抑制されていたが、IL-1 β には変化がみられなかった。 β 1レセプター密度については、control群に比べて両エスマロール群で高い傾向を示したが有意な差には至らなかった。

結論

敗血症に対するエスマロール持続投与は心機能障害の進行を抑制した。これは、酸素受給バランスの改善やTNF- α 放出の抑制、 β 1レセプター密度の保持などに伴う酸素利用効率の改善によるものと考えられる。

敗血症における循環動態はhyperdynamic stateと特徴付けられ、これまでの敗血症における循環管理では、酸素供給量増加を目的とした、輸液負荷やカテコラミン投与による心臓に負荷をかける治療法が行われてきた。一方、近年敗血症では、早期より心機能障害が生じていることが明らかになっている。しかし、敗血症において機能障害を呈する心臓を保護する有効な治療法は、これまでのところ報告されていない。そこで本研究では、虚血性心疾患などで心保護効果を有する β 遮断薬の敗血症に対する効果について、盲腸結紮術により作成したラット敗血症モデルを用いて検討を行った。順行性摘出灌流心標本を用いた心機能評価においては、 β 遮断薬・esmolol投与群ではcontrol群と比較して、cardiac workおよびcardiac efficiencyの両パラメーターともに有意に高く維持された。また、炎症性サイトカインであるTNF- α はcontrol群に比べて esmolol投与群で有意に低下し、 β 1レセプターのdown-regulationについても抑制する傾向を示した。

審査では、今後臨床応用するにあたり、どのようなことが必要と考えるかという質問があったが、心臓以外の重要臓器に対する影響や生存率に対する影響について、今後検討する必要があると回答された。臨床の場では低血圧を呈することが多い敗血症に対して、実際に β 遮断薬は安全に使用できるのかとの質問に対しては、循環血液量を評価して十分に補充したうえで、投与量を慎重に調節しながら使用する必要があると回答された。本論文では、esmolol投与により心機能障害の進行を抑制した機序として、TNF- α および β 1レセプターのdown-regulation抑制の関与が示唆されるとしているが、直接的な因果関係があるといえるのだろうかという質問に対しては、今回の研究では直接的な因果関係を証明するまでには至っておらず、その機序についてはさらに検討する必要があると回答された。また、Esmolol-10群とEsmolol-20群とでは、心機能評価において差があるようだが、TNF- α と β 1レセプターの評価では差がないのはどう考えるかとの質問においては、心機能評価における差については統計学的に有意ではないものの、明らかに心機能評価と、TNF- α および β 1レセプターの評価の結果は異なる傾向を示している。Esmolol投与における心機能維持については、他の機序の関与についても考える必要があると回答された。

本研究では、敗血症に対する β 遮断薬投与を臨床応用するにあたり、他の重要臓器や生存率に対する影響を検討する必要があるものの、酸素供給量増加を目的とした治療法から、重要臓器である心臓の酸素需要を減らし保護するという新しい治療の概念を示した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 麻酔学 武田 純三

内科学 小川 聡 外科学 四津 良平

薬剤学 谷川原祐介

学術確認担当者: 池田 康夫、小川 聡

審査委員長: 小川 聡

試問日: 平成18年 1月16日

INTRAVESICAL INTERLEUKIN-12 GENE THERAPY IN AN ORTHOTOPIC BLADDER CANCER MODEL

(正所性膀胱癌モデルにおける膀胱内インターロイキン-12遺伝子治療)

堀 永 実

内容の要旨

表在性膀胱腫瘍に対しては、Bacillus Calmette-Guerin (BCG) の膀胱内注入療法が術後の再発予防、浸潤癌への進展の予防、いずれの点においても最も有効であり標準的な治療法である。抗腫瘍効果の作用機序は、1型ヘルパーT細胞を賦活し、細胞性免疫を誘導すると考えられている。インターロイキン-12 (IL-12) は、1型ヘルパーT細胞の活性に重要なサイトカインの一つであり、インターフェロン γ を介し癌に対して抗腫瘍免疫を誘導する。BCG膀胱内注入療法は、激しい膀胱刺激症状や血尿、発熱、萎縮膀胱の副作用を認める。また、長期的な抗腫瘍免疫が誘導されず、腫瘍の再発を認めてしまう事も多い。そのため、BCG無効再発膀胱癌には新しい治療法が求められている。申請者は、正電荷型リポソーム法を用いてIL-12遺伝子を腫瘍細胞に遺伝子導入する新たな癌免疫療法の開発を、マウス正所性膀胱腫瘍モデルにて試みた。

〈方法〉 正所性膀胱癌モデルは、C3Hマウス由来の膀胱癌細胞株MBT-2を、雌C3Hマウスに経尿道的にカテーテルを用い膀胱内に注入し作成した。遺伝子導入は、マウスIL-12遺伝子または、大腸菌 β -galactosidase (β -gal) レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドと、正電荷型リポソームを混和し (リポプレックス)、腫瘍細胞に投与した。リポソーム法による膀胱内遺伝子導入のマウス膀胱におけるBiodistributionを、 β -galプラスミドを用いX-gal染色法にて検討した。膀胱内治療はMBT-2を膀胱内に移植後5日目より、IL-12リポプレックス、 β -galリポプレックス (コントロール)、あるいはBCGの注入を開始し、3日毎に計6回投与した。第60日目まで生存したマウスに対しては、第60日目にMBT-2を膀胱内へ再度移植し、その後は特に治療を行わず第120日目まで観察した。

〈結果〉 膀胱内IL-12遺伝子治療群では約40%において、治療前に生着させた膀胱腫瘍が完全に消退した。一方、同量の β -galの遺伝子治療群では膀胱腫瘍は成長し、マウスは膀胱腫瘍により全例60日以内に死亡した。この結果より、膀胱内IL-12遺伝子治療は、遺伝子導入された腫瘍細胞からIL-12が局所的に産生され、その結果として宿主の腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導し、抗腫瘍効果を示したと考えられる。さらに一度腫瘍を拒絶したマウスは、第60日目の二度目に移植したMBT-2腫瘍細胞をも拒絶し、計120日間生存し続けた。しかし、膀胱内BCG注入療法群で腫瘍を拒絶したマウスにおいては、IL-12遺伝子治療のように再移植された腫瘍細胞を拒絶する事ができなかった。X-gal染色では、マウスの膀胱腫瘍細胞のみに β -galを発現し、腫瘍周囲の正常粘膜には肉眼的には明らかに β -galを発現を認めなかった。また、膀胱内IL-12遺伝子治療群のマウスにおいては、重篤な副作用を認めなかった。

〈まとめ〉 リポソーム法による膀胱内IL-12遺伝子治療は、膀胱内BCG注入療法に比べ、長期的かつ腫瘍特異的な抗腫瘍効果を誘導すると考えられ、今後臨床応用の可能性が期待される。

論文審査の要旨

マウス由来膀胱癌細胞MBT-2を経尿道的にC3H/HeJマウスの膀胱へ移植する正所性膀胱癌モデルを用い、インターロイキン12 (IL-12) による膀胱内遺伝子治療について検討した。マウスIL-12遺伝子を組み込んだプラスミドを正電荷型リポソーム法により膀胱内へ注入することにより、腫瘍細胞への遺伝子導入を行なった。また同モデルを用いて膀胱内BCG療法との比較を行なった。単回、30分間の膀胱内 β -galレポーター遺伝子導入では、X-gal染色のマクロ所見では腫瘍内への比較的選択的な発現が観察された。またIL-12遺伝子導入では尿中IL-12濃度の上昇を認めた。計6回の膀胱内IL-12遺伝子治療群は、 β -gal遺伝子治療群 (コントロール) に比較して、生存期間の有意な延長が観察された。さらに、膀胱内IL-12遺伝子治療群で第60日まで生存したマウスに対してMBT-2細胞の再移植を施行したところ、全例再移植を拒絶できたため、腫瘍特異的な抗腫瘍免疫が誘導された事が示唆された。一方、計6回の膀胱内BCG治療群の生存マウスでは、同様のMBT-2細胞の再移植に対しては全例拒絶できなかった。これらの結果より、リポソーム法による膀胱内IL-12遺伝子治療は、BCG無効の再発膀胱癌に対して臨床応用の可能性が示唆された。

審査においては、今回使用されたC3H/HeJマウスは、リポ多糖 (LPS) に応答しない変異マウスであるため、膀胱内BCG療法の抗腫瘍効果を検討するには、C57BL/6マウスとMB-49膀胱癌細胞のような同種正所性膀胱癌モデルの方が良いのではないかと助言がなされた。また、腫瘍特異的な免疫が誘導される事を証明するためには、同じマウス由来の異なる癌種を再移植するなどの方法について質問がなされた。これに対しては、C3H/HeJマウス由来のメラノーマ細胞株であるK1735細胞と、今回使用したMBT-2細胞を第60日目まで生存したマウスを2群に分け、皮下に各々再移植し、その腫瘍を拒絶できるかを観察する事により検討できるのではと回答された。次に、このモデルの膀胱癌の肉眼所見からは膀胱粘膜内に限局し乳頭状に発育する表在性膀胱癌というよりは、非乳頭状の筋層浸潤性膀胱癌モデルに近いのではないかと指摘された。これに対しては、膀胱癌にて死亡したマウスの剖検では、肺や腹腔内のリンパ節へ転移を認めず、死因は膀胱内の腫瘍充満による機械的な閉塞による水腎症、腎不全が考えられるため表在性膀胱癌に近いのではと推測されるが、本研究においては膀胱腫瘍の病理組織学的な検討が不十分であったと回答された。

本研究は今後検討すべき点が残されているものの、臨床例に近い正所性膀胱癌モデルにおいて膀胱内IL-12遺伝子治療が、膀胱内BCG療法よりも有用である可能性を示唆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 泌尿器科学 村井 勝
病理学 坂元 亨宇 先端医科学 河上 裕
病理学 岡田 保典
学力確認担当者: 池田 康夫、坂元 亨宇
審査委員長: 坂元 亨宇

試問日: 平成18年 1月30日

Continuity with Ganglionic Eminence Modulates Interkinetic Nuclear Migration in the Neocortical Pseudostratified Ventricular Epithelium

(胎生期大脳新皮質pseudostratified ventricular epitheliumにおいて、
神経前駆細胞核のエレベーター運動は線条体原基により調節をうける)

三 山 佐 保 子

内容の要旨

大脳新皮質の神経細胞は、胎児側脳室を取り囲む脳室層内の神経前駆細胞 (NPC) の分裂増殖・分化誘導により産生される。脳室層で増殖する細胞集団はpseudostratified ventricular epithelium (PVE) と呼ばれる特殊上皮を形成し、その細胞核は細胞周期の進行に伴いPVE内をエレベーターのように移動する。一方、PVEを構成する細胞集団とは別に核のエレベーター運動を伴わない細胞集団が存在し、これをsecondary proliferative population (SPP) とよぶ。SPPはPVEの脳表側に位置する脳室下層を中心に分布し、大脳新皮質の発生過程後期にPVEから派生すると考えられている。

胎児大脳壁の最外側には、線状体原基であるganglionic eminence (GE) があり、その発生は大脳新皮質の発生に先行することが知られている。本研究では、大脳壁PVEにおける神経細胞産生にGEが及ぼす影響について、マウス胎仔前脳の組織培養系を用いて検討した。

胎生13日のマウス胎仔大脳壁を、GEが付着した状態または大脳壁のみの状態で組織培養した。細胞周期DNA合成 (S) 期のマーカーであるbromodeoxyuridine (BUdR) を培養液に添加し、1時間後および4時間後にエタノール固定した。パラフィン包埋後厚さ4 μmの切片を作成、抗BUdR抗体で免疫組織染色した。BUdR 1時間曝露実験 (BUdR 1hr) によりS期の細胞核が、4時間曝露実験 (BUdR 4hr) によりS期、G2期および分裂 (M) 期の細胞核が標識される。したがって、BUdR 4hrにより標識され、かつBUdR 1hrにより標識されない細胞核は、G2期およびM期の細胞核である。BUdR 1hrおよびBUdR 4hrにおけるBUdR陽性細胞の分布から、G2期およびM期の細胞核の大脳壁内での分布パターンを解析した。さらに、BUdR陽性細胞の形態からM期細胞核を特定し、その分布を解析した。

GEが付着した大脳壁では、G2期およびM期のNPC細胞核の約80%が、通常のエレベーター運動を行わず脳表側に向かって移動した。これら脳表側に向かって移動する細胞は、PVEから派生したSPPと考えられた。これらの細胞について、M期細胞がほとんど確認されなかったことから、G2期にとどまっていることが示唆された。一方、大脳壁のみで培養した場合、G2期およびM期の細胞核は、通常PVE細胞核と同様のエレベーター運動を行い側脳室側へ移動した。

以上、GEが胎生期大脳壁PVEにおける神経細胞産生過程、とくにPVE構成細胞からSPP細胞が派生する過程に深く関与していると考えられる。

論文審査の要旨

大脳新皮質神経細胞は、大脳壁脳室帯の神経前駆細胞の分化誘導により産生される。脳室帯で増殖する細胞集団はpseudostratified ventricular epitheliumと呼ばれ、細胞周期の進行にともないその細胞核がエレベーター運動する。脳室帯の脳表側に存在する脳室下帯には核のエレベーター運動を行わない細胞集団があり、secondary proliferative populationと呼ばれる。後者は発生後期に前者から派生すると考えられている。本研究は、secondary proliferative populationの発生に線条体原基が強く関与していることを示した。

審査では、組織培養では部位により所見にばらつきが多いのではないかと指摘された。部位によりBUdR (bromodeoxyuridine) のとりこみにばらつきがみられたため、分析する切片は組織の前後径において中央の切片と決めて解析したと回答された。また、細胞死に陥る細胞がBUdRを取り込むことがあるとの指摘に対し、核の形態などが正常と判断されないことから解析対象とされなかった細胞が少数あったと回答された。エレベーター運動を行わずG2期に留まったと考えられた細胞が、その後再びS期に入ったか否かを確認するための実験系について質問され、二種のS期マーカーを用いたdouble labeling法により可能であると回答された。レトロウイルスを注入して長時間培養する方法も考えられると助言された。エレベーター運動を行わない細胞の割合が、in vivoでは全体の約20%であったのに対し、組織培養では約80%であった理由について質問された。正常の組織発生でも認められる現象が、組織培養系で大規模におこったと考えられるが、その原因は不明であると回答された。大脳壁において細胞周期を制御する物質として想定されるものは何かとの質問がなされた。GABAによって脳室帯や脳室下帯の神経前駆細胞の細胞周期が変化すること、線条体原基によりGABA陽性細胞が産生されることから、GABAの関与が想定される。本研究においても線条体原基の有無による大脳壁GABA陽性細胞の数や分布の変動を検討するべきであったと回答された。Dlxの欠損マウス等を用いて、線条体原基に由来して大脳壁に進入する細胞群の有無により大脳壁の細胞のエレベーター運動に相違がみられるかを検討してみてもどうかと助言された。

以上のように、本研究はさらに検討すべき課題を残しているが、胎生期大脳壁神経前駆細胞の分裂増殖、分化誘導過程に、線条体原基が大きな影響を及ぼしていることを見出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 小児科学 高橋 孝雄
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之
外科学 北島 政樹
学力確認担当者: 池田 康夫、仲嶋 一範
審査委員長: 仲嶋 一範

試問日: 平成17年12月13日



広範囲経口抗菌製剤

指定医薬品、処方せん医薬品※

クラビット®錠・細粒

Cravit® (レボフロキサシン製剤)

薬価基準収載

※注意—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/>

前立腺肥大症に伴う
尿勢低下にも、
夜間頻尿にも。



- ◎のみやすい口腔内崩壊錠なので、
これまで以上の服薬コンプライアンスが期待できます。
- ◎水なしでも服用できるので、お年寄りでも嚥下困難な
患者さんや、水分制限のある患者さんにも適しています。
- ◎微小な徐放性粒子の開発で、サラッとした服用感を実現しました。
- ◎ハルナルカプセルと生物学的に同等で、有効性・安全性は同じです。

【禁忌(次の患者には投与しないこと)】
 (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) 重度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) 重度な腎機能障害のある患者(血漿中濃度が上昇するおそれがある。【薬物動態】の項参照) (4) 高齢者[「高齢者への投与」の項参照]
 2. 重要な基本的注意 (1) 本剤が口腔内で崩壊するが、口腔の粘膜から吸収されることはないため、唾液又は水で飲み込ませること。 (2) 本剤の過剰投与により血圧低下が予想されるので、投与量には注意すること。 (3) 立位血圧が低下することがあるので、体位変換による血圧変化に注意すること。 (4) 本剤による治療は原因療法ではなく、対症療法であることに留意し、本剤投与により期待する効果が得られない場合は、手術療法等、他の適切な処置を考慮すること。 (5) めまい等が

あらわれることがあるので、高所作業、自動車の運転等危険を伴う作業に従事する場合には注意させること。 (6) 本剤投与開始時に降圧剤投与の有無について問診を行い、降圧剤が投与されている場合には血圧変化に注意し、血圧低下がみられたときには、減量又は中止するなど適切な処置を行うこと。
 3. 相互作用【併用禁忌】(併用しないこと) 塩酸バルデナフィル水和物(レビトラ)
【併用注意】 (併用に注意すること) 降圧剤、クエン酸シトルデナフィル
 4. 副作用 ハルナ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、貧血(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。



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) 薬価基準収載

ハルナル[®]D錠 0.1mg / 0.2mg

指定医薬品、処方せん医薬品(注意・医師等の処方せんにより使用すること) **Harnal[®]D**

製造販売 **アステラス製薬株式会社**
 東京都板橋区蓮根3-17-1

[資料請求先] 本社/東京都中央区日本橋本町2-3-11