

第84卷第2号

平成19年

6月

## 慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

## 綜 説

●西洋医学の伝来とドイツ医学の選択 .....安田健次郎 .....(69)

## 原 著

●初期胚神経上皮由来神経幹細胞の脳移植ドナーとしての可能性に関する検討 .....林 拓郎 .....(85)

## 話 題

●ER：新しい救急医療の形態 .....芳賀 佳之 .....(95)

●経皮内視鏡的胃瘻造設術 (PEG:percutaneous endoscopic gastrostomy) の

貢献と課題 .....芹澤 宏 .....(96)

## 学 会 展 望

●異常死の届出義務と医療従事者の刑事責任について .....古川 俊治 .....(99)

●診療行為に関連した死亡はどのように扱われるべきか .....上家 和子 .....(108)

●私立大学病院医療安全推進連絡会議について .....落合 和徳 .....(115)

●医療安全と大学病院改革 .....永井 良三 .....(120)

●緊急時の情報リスクマネジメント .....後藤 正彦 .....(136)

## 学 位 論 文

●腫瘍性疾患および反応性肉芽組織中の多核巨細胞形成に関する

電顕組織化学的研究

-組織の環境における多核巨細胞および単核細胞の形態変化- .....穴澤 卯圭 .....(T11)

●統合失調症慢性期症例に対する薬物療法の最適化

-慢性統合失調症に対する薬物療法- .....鈴木 健文 .....(T23)

## 号 外

●博士 (医学) 学位論文-内容および審査要旨-(第184号) .....(別頁)

Vol. 84  
JuneNo. 2  
25, 2007

慶應醫學會

綜 説

西洋医学の伝来とドイツ医学の選択

慶應義塾大学名誉教授

やす だ けんじろう  
安 田 健次郎

Key Words：西洋医学の移入とその変遷，明治維新と医制創建，慶應義塾医学所と英医学

はじめに

福沢諭吉先生は明治6年(1873)、蘭医学を修めた後へボンに師事した松山棟庵(註)を校長としてイギリス医学を範とする慶應義塾医学所を創設された。時代の趨勢と財政等を勘案し明治13年に閉鎖された。それに先立ち、明治政府内では西洋医学を取り入れる方針を建て明治2年頃から何れの国の医学を採用するか検討が行われていた。初めオランダ医学とイギリス医学が候補にあがっていたが、結果としてドイツ医学を採用する事になった。それ以降昭和20年代の前半に至るまで約80年間、ドイツ医学は日本の医学に大きな影響を与える事になる。ここでは、先ず日本への西洋医学移入経過の概要を記し、次に明治維新前後における国の内外の大きな変化の中で、将来日本の範とする外国医学選択の経緯、導入されたドイツ医学の受け入れ状況及びその影響について述べる。(註)24回生松山春郎先生の祖父。

1. 西洋医学との接触

a) 南蛮医学との出会い

日本は西洋以外の国々の内、最も早く西洋式の政治、経済、社会教育等のシステムを取り入れたが、自然科学や医学もその中に入る。ポルトガル人が種子島に漂着し鉄砲を伝えたのは天文12年(1543)であった。やや遅れてスペイン人との接触が続く。これら南蛮人の来日目的はキリスト教の布教と貿易であったが、伴って医学が伝えられた。弘治3年(1557)、医師で貿易商であるポルトガル人のルイス・デ・アルメイダがイエズス会の宣教師として肥前の平戸に上陸した後豊後の府内(ふだい、大分市)に移り、領主大友義鎮の庇護を受けて日本最初の西洋式病院「慈悲院」を開いた<sup>3, 26, 31)</sup>。16世紀中頃

織田信長はイエズス会士に好意的であった。豊臣秀吉はしばらくの間イエズス会に敬意を表していたが、日本の宗教と相容れぬものであり、国民の幸福に反するものであると考え、天正15年(1587)イエズス会士の国外追放を布告したが実行には移さなかった。イエズス会士も京都から長崎に移り活動の自粛に努めた。他方、文禄2年(1593)スペインのフランシスコ会士がフィリピンから日本に来て宣教を始めた。フランシスコ会士は貧しい人々、学問のない人々を相手に活動し、イエズス会士は支配階級に属する人々、富裕な人々、知識階級の人々を対象に活動していた。フランシスコ会士は秀吉に直訴して京都に聖アナ病院と聖ホセ病院を作りハンセン病等の患者の診療に当たった。しかし、ポルトガルとスペインは歴史的に敵対関係にあった。また、明應3年(1494)に教皇アレキサンダー六世が定めた両国の活動範囲の境界線をスペインは破っていた。前述の様に両国は活動の対象も異なり、宗教上の習慣や制度も互いに反目しあっていた。秀吉はマニラとの貿易を盛んにする為フランシスコ会に好意的であったが、二つの会の争いには困惑していた。慶長元年(1596)スペイン船が難破した際に積み荷を日本人が取ったとしてスペイン船の船長がスペイン軍が日本を攻めると脅かしたのを契機に、日本に居る外国人宣教師の扱いは処刑を交え極めて厳しくなった。慶長3年に秀吉は死に、後継者の徳川家康は国の内紛処理に追われ、外国人宣教師の追放を実施する事なく17年間放置した。そうしている内にオランダ人が来て、これまで日本において優位な立場を維持してきたポルトガル人の努力は一掃された<sup>20)</sup>。

b) 紅毛医学の伝来

オランダと日本が初めて接触したのは慶長5年(1600)にオランダ船リーフデ号が豊後にやって来た時である<sup>28)</sup>。その二年後にオランダ東インド会社が設立さ

れた。そして日本との貿易を目的として初めての商館が平戸に出来たが、寛永19年(1642)に長崎の出島に移った。幕府の鎖国政策は寛永10年(1639)にオランダ人と中国人以外の外国人の入国を禁じた。商館には商館長と若干名の館員及びそれらの人々を診療する医師(商館医)が来ていた。日本の鎖国が終わる安政5年(1858)までに来た商館医は約100人であり、それ等の医師がそれぞれ程度の差こそあれ伝統的医学に漢方を取り入れた日本の医学に影響を与えた。此等紅毛人医師は主としてオランダ人であったがドイツ人、スウェーデン人その他も含まれていた<sup>9, 26</sup>。寛永19年(1642)に出島が平戸から長崎に移されてからは商館にはオランダ人医師が常駐する様になった<sup>5, 6, 10</sup>。

## II. オランダ医学伝来時の国内状況

### a) 初期の反応

出島のオランダ医は船の外科医が多かった。長崎の通詞(通訳)は初めは医師ではなかったが、だんだん興味を持ち始め、通詞の家系から紅毛流外科医が生まれ始めた。西洋外科書を翻訳する試みも出たが、本の部分的翻訳であったものが多く、一門内でのみ伝えられる場合が多かった<sup>8</sup>。

### b) やや進んだ状態

オランダ語の解剖学書の翻訳により解体新書が刊行され蘭学発展の一里塚となった。幕府は特に抑える事をせず、翻訳の全盛期を迎える。

### c) さらに進んだ状態

シーボルト事件で蘭学は一時的に停滞した。しかし、1830年代に好転する。有名な蘭学私塾が京都、大阪、江戸等に創設された。代表的なものは、緒方洪庵の適塾、佐藤泰然の佐倉順天堂等である。蘭医学の興味は外科から内科・病理に移る。翻訳書も内科書が多くなる。

### d) 幕末における西洋諸国接触の時期

西洋諸国からの軍事的脅威に対応し、オランダに依頼して長崎に海軍伝習所を作る。伴って、医学伝習の医師ポンペ来日。最初の系統的西洋医学教育が始まり、西洋式病院も創設される。派遣医も軍医学校か大学出身者となる。

## III. 出島に来た医師達の内、 顕著な影響を残した例

a) 最初に来た医師はヘルセンベルグ、次いでバルビエール、更にクラウゼンである。クラウゼンは商館長に

随伴して出府し将軍徳川家光に謁見している。

b) 次いで、カスバル・スハム・ブルヘルである。慶長2年(1649)に来日。ヨーロッパ人の内、年表上最初の人物である。ドイツの理髪外科医である。寛永20年(1643)オランダ船が南部藩の山田浦に漂着した際に水と食料を求めて上陸した船長以下が発砲した事件及び正保4年(1647)オランダ船から乗船員を借りたポルトガル船が長崎に入港し、オランダが来港を禁じられたポルトガルに加担した事がわかり、オランダと日本の関係が険悪になった。こうした事態を打開する為オランダから特使が派遣され、優秀な外科医カスバルが連れて来られたのである。慶長3年(1650)特使一行が参府の後カスバルは江戸に残り外科医療を教え、医学の熱心な伝習を行った。教えを受けた者の中には後に活躍する西玄甫、嵐山甫安、及び桂川甫築等がいる<sup>7</sup>。

c) ウイレム・テン・ライネは延宝2年(1674)に来日し2年間滞在した。二度江戸参府に随行し幕府要人の診療も行った。鋭い観察力と科学知識を持ち、日本の医学、国情、動植物を観察し「日本誌」を作成した。出島に来た医師の中で正式に大学教育課程を修了した最初の医師である<sup>26, 27, 28</sup>。

d) エンゲルベルト・ケンペルはドイツ人。元禄3年(1690)に長崎に来た。診療の傍ら日本に関して広範囲の莫大な資料を収集し海外に伝えた。「ケンペル日本誌」は正しく日本を紹介した最初の本である。二年間に二度江戸参府した。将軍綱吉と医療に関する問答を行った<sup>3</sup>。

e) フィリップ・フランツ・フォン・シーボルトはヴェルツブルグ大学医学部を出たドイツ人。東インド会社に入りオランダ政府の命令を受けてオランダ商館付きの医師として来た(文政6年, 1823)。医学の伝習と日本の自然科学的、民族的研究を目的としていた。鳴滝塾を建て蘭医学の臨床教育のみならず自然科学の初歩を教えた。臨床講義と共に実際に手術を見せ門人達に観察させて医学教育を行った。この時点で西洋の大学の医育方式が初めて日本に導入された。ヨーロッパで発展した近代科学が彼を経て日本の若き学徒に移植され明治に至って実を結んだ。大きな影響を与えた理由は大学出身の教養ある人物であった事、日本で蘭学の重要性が認識され始めた時期に来た事等が挙げられる<sup>11</sup>。

f) オットー・ゴットリーブ・モーニッケは嘉永元年(1848)に来日し3年間滞在。牛痘種を持参した。また、1816年にフランス人ラエネックが発明した聴胸器(今日の聴診器)をもたらした<sup>27</sup>。

g) ヨハネス・リデイウス・カテリーヌ・ポンペ・ファン・メルデルフォールトは安政4年(1857)に出島に

到着した。安政元年（1854）に日米親和条約が結ばれ下田と函館は開港し鎖国体制は終わった。この状況変化に対し、幕府は海防の必要性を感じ、その対策の一環として1855年にオランダ政府の援助により長崎に海軍伝習所を開いた。この海軍伝習の為に、オランダ商館医ファン・デン・ブルックが医学教育を任せられ、ブルックの後任がポンペである。ポンペは日本が招聘した医師であり、今迄の商館付き医師とは資格が異なる<sup>9)</sup>。幕府からは奥医師松本良順（佐倉の佐藤泰然の実子、松本家に養子入り）が派遣された。ポンペは自然科学の意義と内容、これが文化に及ぼす影響と医学との関連を詳しく述べている<sup>6) 11)</sup>。1861年には長崎養生所を開設して医療と医師の教育を行った。これは後に精得館と名を変え、やがて長崎府医学校病院となり長崎医科大学となった。ポンペは基礎と臨床の課程を系統的に学習し全課程を5年間とする医学教育を行った。<sup>5) 26) 27)</sup>。外人では初めて人体解剖を行い基礎医学の必要性を強調した。今日の大学教育と殆ど同じ講義形態であり、その後の日本の医学教育のあり方に大きな影響を残した。緒方洪庵はポンペの教育法を見て「我が蘭学一変の時期到来」と認識し息子平三と次男の推準をポンペの学校で学ばせた。又、適塾で福沢諭吉先生の次の塾頭であった長興専済が江戸に勉強に行く希望を持っていたが、長崎のポンペの下で学ぶ様に変えさせた。佐倉順天堂からは佐藤泰然の養継子尚中が藩命を得てポンペの学校に留学、同門の相良知安と一緒に学んだ。その他門下生には岩佐 純、佐々木東洋等がいる<sup>11) 26)</sup>。ポンペ以後、西洋医学の発展中心は長崎から江戸に移った。最初の種痘はモーニッケが嘉永2年（1849）に出島で行ったが、9年後の安政5年（1858）には江戸の種痘所で行われた。種痘所は初め個人所有であったが、翌年幕府所有となりやがて西洋医学所に変更<sup>9)</sup>。

（付記）ポンペは在日5年で、文久2年（1862）に帰国したが、亡くなる迄オランダに来る日本人の医療の面倒をみた。最後の仕事はオランダ領事大鳥氏の第三子の出産に産科医の役を勤めた事であった。その子は、後の大鳥蘭三郎慶應義塾大学客員教授（医史学、明治41年～平成8年）である<sup>9)</sup>。

h) アントニウス・フランシクス・ボードウインは、ポンペの後任として文久2年（1862）に来日。時代は江戸から明治に移り、西洋医学の窓口がオランダからイギリスを経てドイツに変化し始めた時に来た。グローニンゲン大学出身でユトレヒト陸軍軍医学校で15年間教育に携わり医学教育の経験が豊富であった。精得館教授としてキュンストレーキを用い解剖学、生理学、外科、

眼科を教えた。特に眼生理学の権威であり、ヘルムホルツ検眼鏡を改良しそれを日本に伝えた。教育に当たっては医師のみではなく15才～35才までの一般人も教育を受けられる様に長崎奉行に申し入れた。養生所は慶應2年（1866）精得館と改名。今までの医学所とは異なり、隣接して分析究理所が設置され物理と化学を医学から分離した。同年、軍医学校の同級生のクーランド・ウォルター・ハルタマを招聘した。慶應3年（1867）、江戸にオランダ軍医学校を建設する提案をし幕府との間に七ヶ条の約定書を結んだ。又、同年医学所開設の契約を幕府と結びその準備の為一時帰国。この時、緒方推準（緒方洪庵の養継子）他3人の医師をオランダに伴い、ユトレヒト大学（後に陸軍軍医学校である事がわかった）に留学させた。慶應3年、大阪の軍事病院と陸軍軍医学校が正式発足。ボードウインが再度来日した時は新政府になっていた。緒方推準が病院長を勤める大阪府病院で診療・教育に従事し、この時大村益次郎の下肢負傷を手術した。しかし、幕府との話合いで江戸に医学校を作る為にヨーロッパで購入し持参したベッド等の備品は新政府の医学校兼病院の備品として使われた<sup>7) 9)</sup>。その頃、日本の医学の分野ではイギリスの勢力が強くなっていた。英語は蘭語に代わり洋学の中心になりつつあった。一方、明治政府はドイツ医学を官立の学校に取り込もうとしていた。ボードウインは明治3年6月に帰国を準備し横浜に来ていた。その時、大学東校では雇用していたイギリス人医師ウイリスが会津の戦争の負傷者手当てに出かけ、ドイツ公使に依頼したドイツ人医師は普仏戦争で来日が遅れていたため、明治政府は横浜に居たボードウインに講義を依頼した。三ヶ月講義をして帰国した。政府は三千両を下賜してその功績に報いたと言われる<sup>27)</sup>。門下に岩佐 純、相良知安その他がおり、明治初期の医学界で活躍した人々である<sup>9)</sup>。

i) セーゲハン・マンズフェルドはボードウインの後任として慶應2年（1866）より精得館で伝習に参加した。ユトレヒト陸軍軍医学校出身で同学校での教育経験があった。人体解剖学、外科学、包帯学、診断学等を講義した。また規則正しい打診、聴診の技術指導を行った。長興専済は緒方洪庵の勧めでポンペに師事し次いで再度長崎に留学してマンズフェルドに教えを受けたが、マンズフェルドは教え方が大変上手であり、厳格な人であったが100名を越す伝習者が居たと報告して居る。この間に世の中は変化した。薩摩と長州の医学生は精得館に入学出来なくなった。同年大政奉還となり精得館は無政府状態となった。70～80人の学生が長興専済を学長に選び、長州井上 馨の助力を得て外人教師ルーヘルを呼

び、長崎医学校となり教育を続けた。これは長崎大学の前身である。長與専齊は明治3年までマンスフェルトと医学教育に関わった後、郷里の大村(長崎市)に帰って開業し藩侯の診断治療を担当していた。後に明治政府の内務省に勤務する。マンスフェルトは明治新政府になって明治4年から3年間熊本県医学校で教育と診療を行った。後年大学で活躍した緒方正規、浜田玄達、北里柴三郎を含め132人を指導した。明治7年から3年間京都府病院(京都府立医科大学の前身)、明治10年から2年間大阪医学校(大阪大学医学部の前身)で教鞭を振るった。慶應2年から13年間にわたる教育活動は日本における西洋医学の発展に大きく貢献した事になる<sup>26, 27)</sup>。

#### IV. 明治維新以後のオランダ医師来日

明治2年、日本政府はドイツ医学の採用を決めた。マンスフェルトが熊本に去った後も多くのオランダ医師が来航している。維新後は早く西洋医学を取り入れたいとの心理から、外国人を雇い入れた地域が多かった。医学以外の分野でも同様な傾向があった。外国人の中でも、今まで交流があり言葉も多少は通用するオランダ人が多かった。大部分はボードウインが教員であったユトレヒト陸軍軍医学校出身者であった<sup>28)</sup>。

#### V. オランダの医学教育体制と 来日オランダ人医師の学歴

17~18世紀のオランダには医師養成機関として、質の順に挙げると大学、アテネア、軍医学校とクリニカルスクールがあった。大学は当時三校あり質の高い教育機関で、理論重視であった。アテネアは六校あったがアムステルダムを除き1843年までに廃校になった。アムステルダムのものは大学と同じ程度の高い教育機関であった。軍医学校はライデンとルーバンの国立基幹病院に格上され、その後、両者は合併してユトレヒト国立基幹病院となり付帯して陸軍軍医学校も合併した。軍医学校は正確で実地に裏付けされた医学教育を行い、理論と実地のバランスの取れた医育機関であった。クリニカルスクールは1823年に政府が都市以外の地方における外科医と産科医の必要性を認めて許可した4年制度の医学教育機関で、臨床的訓練を主体とし理論教育は少ない教科の学校であった。来日した蘭館医の大半が後任者から犬医者または床屋医者と呼ばれるクラスの医者であったにせよ、本国またはバタビアで人の診療に従事していた医師達であったと言われる。オランダ医師の内、学歴のわかって

いるのは18人で、ポンベ以前が4人、以後が14人である。特に、ポンベ以後の14人の内、9人はユトレヒト軍医学校出身でボードウインの教え子である。4人はボードウインの出身校であるグローニンゲン大学の後輩であり、一人はクリニカル・スクール出身者である<sup>9)</sup>。

#### VI. 17~18世紀のヨーロッパの 医学教育カリキュラムの特長

- a) 自然科学系の学部は医学部しかなかった。動物学、植物学、化学、薬学などは医学部で教えられた。
- b) 狭義の医学教育科目：以下の各グループはそれぞれ一人の教員が教えた。外科と解剖で一グループ、内科と病理で一グループ、産科のみで一グループ、薬学と化学で一グループ。
- c) 臨床科目は細分化されていなかった。眼科、耳鼻科、及び泌尿器科は外科で教えられた。皮膚科、神経科及び小児科は内科で教えられた<sup>9)</sup>。

#### VII. 蘭館医を通じて日本に伝えられた カリキュラム

系統的なものとしては二種類である。一つは、1810年代にシーボルトが伝えたヴュルツブルグ大学(ドイツ)のものであり、他は、1850年代のユトレヒト陸軍軍医学校のものである<sup>9)</sup>。

#### VIII. オランダ医学からイギリスへの傾き

慶應4年(1868)1月戊辰戦争・鳥羽伏見の戦いが始まった。薩摩の島津忠義は戦傷者の治療の為イギリス公使館医を京都の官軍病院に迎える事の許可を政府に申し出て認可された。公使館からはウィリアム・ウイリスが派遣された。ウイリスは文久2年(1862)に来日しており、同年に起きた生麦事件の際には負傷したイギリス人の救援に当たった。ウイリスは公使館員アーネスト・サトウと京都入りし御所近くの相国寺養源院で治療に当たった。薩摩の武士が多かったが、薩摩・長州ばかりでなく幕府方の負傷者をも治療した。体内から弾丸を取り出す治療を見て、鹿児島藩の藩医は呆気にとられただけであったという。8日間の治療の後横浜に帰った。後日、異例の事であるが天皇は公使パークスとウイリスを謁見し感謝の贈り物を与えた。同年4月続出する東征軍の傷病者治療のため京都に次いで横浜に軍病院が開設され、ウイリスと着任直後のイギリス公使館医シッドールとは日本

人医師を指導して官軍戦傷者の治療に当たった。7月、横浜の軍病院は神田の旧津藩藤堂邸に移され御徒町にある医学所は管理上これに含め大病院と命名された。8月、ウイリスは会津・戊辰戦争への従軍が求められた。官軍の兵士のみが治療対象とされた。これらの活動を通じて、ウイリスは外科学、銃創の処理、副え木のあて方、包帯法を各藩の漢方医に教えた。1月に会津戦争は終わった。明治2年1月、北越・会津戦争から帰還していたウイリスを大病院の院長兼医学教師として雇用した。ウイリスはイギリス副公使の地位を離れ、先に雇用されていたシッドールは公使館に戻った。同年2月御徒町の医学所を神田の旧藤堂邸に移動させ、そこにある大病院と合併して医学学校兼病院とした。同年6月幕府最高学府であった昌平校を大学校と称しこれに医学学校と開成学校（幕府の洋学教育機関開成高を改名）を分局として所属させた。ウイリスはここで外科学を講義した<sup>11)</sup>。明治維新当初、イギリス医学がオランダ医学に代って日本の中心になった様な気配が感じられ、将来日本の医学にイギリス医学を取り入れようとの話題が生まれたのは、前述のウイリスとシッドールの活躍が明治政府に高く評価されたからであろう<sup>21)</sup>。

## IX. 幕末の日本で見られたオランダ、イギリス以外の国の医療

a) アメリカ：安政五年欧米五ヶ国との通商条が成立して日本が開国してから弘化三年（1846）に宣教師ヘボンが来日した。ヘップバーンが本名であるが、来日時、日本人が英語の発音に慣れずヘボンと発音した。英語の普及と教育に努力した。ミッション・スクールとして教育し、明治学院の創設に尽力した。横浜に設けたヘボン英語学校はフェリス女学院の基となった。また、ヘボン式ローマ字を開発し普及に努めた。医師としては、横浜居留地でアメリカ最新医療による施療事業を行い一日40～70人の患者を診療した。生麦事件で負傷したイギリス人の治療に当たった。戊辰戦争（明治元年、1868）では横浜に運ばれた東征軍と幕軍の双方の負傷者の治療に当たった。順天堂の創始者佐藤泰然に手術と日常医療を見せて指導した。日本人に眼病が多い事に着目し、顕著な効果の目薬を処方し、中国にまで普及させた。歌舞伎俳優の脱疽による足の切断の後、アメリカから義足を取り寄せ俳優の再度演技を可能にした。日本で初の義足となった。文久元年（1861）神奈川に施療所を創設し無料診療を行った。計13年日本で医療と英語教育を行った。

b) フランス医学：高松凌雲は慶應三年（1867）パリの万国博に行った徳川昭武の侍医として随行し、パリで有名なデュー病院で勉強する許可を得、クロロフォルム麻酔下の腹部開腹手術まで経験し幕府崩壊により帰国した。函館戦争で榎本武揚の軍に加わり、フランス流の外科技術で活躍した<sup>20, 22)</sup>。

c) ドイツ医学の実地はオランダ商館医として来日した二人以外誰も見ていない。

## X. 西洋の医育制度の導入に向けて

以上の様な経過で、西洋医学はポルトガル・スペイン人等南蛮医からオランダ・イギリス人等紅毛医を経て日本に伝来した。この過程は言わば受け身の移入であった。しかし、明治維新を境として国策としての医療制度を確立する方針が建てられ、当面西欧の先進国の医学・医療制度を積極的に探索し取り入れる事になった。指導者達は昔々の蘭学者達の努力を踏まえながら、日本を出来るだけ早く、能率的に西洋の先進国と肩を並べ得る国にしようと考え、この目的に相応しいと思われる西洋の国々の制度を採用しようとしていた。そして範とする国の選択に着手し始めていた。

### a) 維新後の新政府と他の国との関係

イギリスは慶應元年局外中立解除宣言の第一号であり慶應四年の新政府誕生の承認第一番乗りであった。これらを通じて日本との親密の度を深めていた。取り分け薩摩藩への接近を深めつつあった。フランスは、幕府への肩入れとうい前任者の失点を取り返すべく、公使ウートレーによる長州への接近が試みられていた。オランダの総領事ボルスブルックはこのフランスの動きに寄り添いながら、先着者としての優先権を模索していた<sup>26)</sup>。ドイツ（プロシヤ）との接触はない。

### b) 中世のヨーロッパ医学の動向

旧ウイーン学派、エジンバラ学派、パリ学派が隆盛であった。中世では病院は教会が管理・運営を行っており救貧院、孤児院、捨て児院、ライ収容所等を含む総合福祉施設を意味していた。16世紀末までに君主と自治体が担い手となった。近代となり1850年頃までによく病院の機能は人々の世話から患者の治療に移行した。イギリス医学は実地主義であり臨床重視の医学であった。私的または篤志病院が現れ、病院における通風や消毒等の衛生管理が発達し、女性看護人を初めて採用し、プリマスに換気の良いパビリオン型の王立海軍病院が作られて西欧に於ける端緒となった<sup>1, 2, 8)</sup>。人物としては呼吸のチェーン、循環器のストーク、甲状腺疾患のバセドウ、

結核患者の副腎機能障害を記述したアジソン、全身のリンパ節腫大を来す疾患を整理したホジキン、クロロフォルム麻酔を開発したシンプソン等がいた。フランスでは18世紀のフランス外科学の流れを汲むパリ学派が栄えていた。実地と病床観察を教育の中心におき、動物実験などから人の機能を研究する事は軽視された。しかし、病理解剖を重視した。臨床的な事実によって心理を学ぶ健康学校が出来た。病気の種類別分類及び病気の名前を決める疾病記述、薬効等を数値化する統計学、内科で診断し外科で手術する方式の確立等が特長であった。人物としては「正しい観察」に基づく疾病記述の促進、臨床講義を始めたフィリップ・ピネル、体中の細胞の膜を収縮性や浸透性により分類し、又、人の構成要素について記載し近代細胞学の出発を告げたグザヴィエ・ビシャ、病理解剖を重んじ心臓及び大血管の疾病に関する研究を発表したジャン・コルヴィザール、間接聴診法・聴診器を開発したルネ・ラエンネック等が活躍した<sup>18, 19, 20)</sup>。一方、ドイツでは17世紀後半から18世紀の前半にかけて医学は混迷の状態にあった。早くから中央集権的国家を形成したイギリスやフランスに対して、30年戦争(1618~48)による深い疲弊の中に17世紀以来多くの小国に分裂していた農業国ドイツは政治的にも経済的にもヨーロッパの中の後進国に留まっていた。文化上は稀にライプニッツの様な優れた学者を生んだとしても永く沈滞の底にあった。フリードリヒ二世のもとに出来た絶対主義国家プロイセンの興隆は18世紀中期の話だが、国民的自覚の高まりに伴ってレッシングに代表される文運の隆昌が先ず現れ、ゲーテ、シラーにおいて頂点に達する。しかしながら、やがては科学や技術の領域で卓越した天賦を示すドイツ民族も18世紀には、なお自然科学の研究分野において大きな成果を挙げる事は出来なかった<sup>17)</sup>。やがてドイツ医学にロマン派の時代が訪れる。フランスに起きた啓蒙主義の反動としてドイツには18, 19世紀の移行期に生物学及び医学の分野にロマン主義的傾向が現れた。芸術上の同じ言葉が、古典主義に対するものと理解されているのとは異なって、医学・生物学では啓蒙期の実証主義とそれが作り出した合理的な秩序に対する本質的な反抗とされた。日本における明治維新の約60~80年前、解体新書(1774)や解剖存真図(1819)が刊行された時期頃に当たる。シェリングの自然哲学の影響であり、自然科学であるべき医学を直感や思弁で片づけざる事になる。神秘的な説や非医者の行為が現れ一部のヨーロッパ人に熱狂的な歓迎を受けた。動物磁気説(メスメリズム)、類似療法(ホメオパシー)及び骨相学等である。メスメリズムはメスメルが創始者で

ある。あらゆる生物には多かれ少なかれ磁石様な内在する力があり他人に触れて移行させる事が出来る。この力により神経系の疾患は直接に治す事が出来、他の疾患も間接的に治療されると言うのである。一種の暗示療法であり、後に催眠術として発展していく。ホメオパシーはハーネマンが創始した。キニーネの作用を調べているうちに、これがマラリア類似の熱を起こすとし、ここから考えが飛躍した。即ち、或病気を治すには、その症状に似た状態を健康人に起こす様な薬を使う必要があるとした。「似た物が似た物を治す」と主張した。骨相学はガルが創始者である。頭の形と精神との間には密な関係があるとし頭蓋は脳の表面を忠実に表すとのかえりから、頭の形を調べれば大脳の働き具合が判るとした。皇帝フランス二世は悪い影響を心配して自ら禁止の手紙を書いた<sup>16, 17)</sup>。こう言う状態であったから、若し、解体新書の時代に国策として西洋医学を取り入れる動きがあったとしたら、ドイツは候補から漏れていたであろう<sup>20)</sup>。

## XI. ドイツ医学採用の経緯

慶應4年(1868)に公布された五箇条の御誓文の第五条に「知識ヲ世界ニ求メ大ニ皇基ヲ起スヘシ」とあり、新政府はアメリカや西欧諸国に使節団を派遣し、どの国のどの制度が日本医学に適しているかを検討した。又、各分野の専門の外国人を招聘した。鉄道、郵便、港湾等はイギリスをモデルとし、軍艦と海軍組織はオランダが教えてくれていたが、やがてイギリスとアメリカが取って代った。陸軍については最初フランスの制度が採用されたが、普仏戦争の後にはドイツの方式に変わった。医学については、維新当時の国内に二つの流派があった。一つは英国医学閥である。英国人ウイリスは鳥羽・伏見の戦、会津戦争の折、無報酬で負傷者を治療し維新政権に多大な貢献をした。医学界の主流は英国医学に傾いていた。福沢先生は、「医学の範をドイツに採るがごときは、人の子を毒するもの」と英国医学の採用を主張しておられた<sup>13)</sup>。他は蘭医学閥でボードウインをはじめ17世紀から幕末にかけて日本の医学の近代化に多大な実績があった。加えて両医学のどちらかを選択するに当たっては、維新政権の二大藩閥による選抜が絡んでいた。医制論争とも言われる。模式化すると次の通りである。

イギリス医学(ウイリス…石神良策<sup>1)</sup>)…英公使パークス…薩摩藩(西郷隆盛・大久保利通) \*薩摩藩医  
オランダ医学(ボードウイン…緒方惟準<sup>2)</sup>)…蘭総領事フォン・ボルスブルック…長州藩(大村益二郎・木戸孝允) \*緒方洪庵の子、医学校校長

二つの勢力の内どちらを採用するか、維新政府は選択に迫られていた。この様な場合に日本人は屢々両者の顔を立てながら、第三の可能性を選ぶ<sup>3, 8)</sup>。結局、佐藤尚中一門によるドイツ人教師招聘の建議が英蘭（薩長）という二大勢力を共に斥け、謂わば「喧嘩両成敗」という一見公平な構想に見える事により、英医学に傾いていた廟議の大勢を動かした原因となったのであろう<sup>14)</sup>。維新政府は第三の道、即ち、ドイツ医学の選択と佐藤尚中一門に東京医学校の経営を任せるという形で決着した。ドイツ医学の選択とは即ち、東京医学校にドイツ人医師を招聘し医学教育に当たらせるという事である。以上がドイツ医学採用の筋道であるが、そこに至るまでの経過は必ずしも平坦なものではなかった。明治元年、時の政府参与兼大阪府知事後藤象二郎（佐賀藩）は西洋医学を盛んにする事が国の急務と痛感し親交のあった岩佐 純（福井藩）に計った。岩佐は医育を振興させる事が先決であると述べ、嘗て長崎で共にボードウィンに学んだ相良知安と協力して画策する事を約した。岩佐を推したのは藩主の松平春嶽、相良を推したのは土佐藩主鍋島閑叟であり、共に種痘法伝来に大きな役目を果たしていた。明治2年、岩佐と相良の二人は太政官から「医学校取調御用掛」に任せられた。同年10月、岩佐は大阪医学校の、相良は東京医学校の責任者となった。二人はこの二つの大学を創設する為の御用掛りであったと言える。ここで、東京医学校を担当した相良の仕事は医制論争に決着をつける事であった。この医制論争について佐藤尚中一門の提議は相対立する英蘭医学を退け、「新医」についてドイツ人教師を招こうとするものであった。明治2年、佐藤尚中は佐倉順天堂から東京に招かれ大学博士となり大学東校で最高の位置についた。尚中の名声が高かったからであるが、相良と岩佐が昔からの師を引き出した点もあるとも思われている。明言はしていないが尚中がドイツ医学採用に賛成であった事は先ず間違いない。結果として、前記の決定が日本へのドイツ医学導入の伏石となった。しかし、これは佐藤尚中一門に東京医学校を任せた事の必然の帰結であった<sup>14)</sup>。この時点での採用という表現は、直ちに、その後のドイツ医学、医制への全面的な傾斜・傾倒の語感とは随分異なったものであった。ドイツという語は未だプロシャ絶対主義権力と同意語ではない。維新政府の要請により、明治4年二人のドイツ医師、プロシャ陸軍上等軍医正（少佐）レオポルド・ミュルレルと海軍軍医正（少尉）テオドール・ホフマンが、正式軍装に身を固め、騎兵一ケ小隊を従えて東京医学校に着任した。明治政府との契約は3年間であった<sup>13, 14, 15)</sup>。岩佐 純と相良知安は共に佐倉順天堂に学び佐藤尚中を

師とした。その上、岩佐は二度長崎に行きポンペとボードウィンに師事し、相良はボードウィンに師事した。二人はヨーロッパの医学の事情を聞ける立場にあった事は確かであろう。後に述べるが、医学の範とする西洋の国の選別に当たっては、この二人の主張とフルベッキの証言が重要視されているが、二人にドイツ医学の優秀性を印象的に強調出来る立場にあったのはボードウィンではないかとの意見もある<sup>20)</sup>。

## XII. ドイツ医学採用決定に 影響を及ぼした諸因子

a) ドイツ医学の混迷からの脱却：18世紀後期～19世紀初頭にかけては混迷していたドイツ医学は19世紀後半にはヨハネス・ミュラー（生殖器発生学、ミュラー氏管で知られる）やヨハン・シェーンライン（内科）等の努力により医学から哲学的思考を排し事実に基いた実証的な科学として独自の発展をし、世界で最高のレベルにあった。その時代には、次の様な研究者が出た。テオドール・シュワン（生物の細胞説）、ヤコブ・ヘンレ（顕微鏡解剖学）、エミル・デュ・ボア・レイモン（神経、筋の電気生理学）、ヘルマン・フォン・ヘルムホルツ（神経興奮の速さ測定）、ルドルフ・ウイルヒョウ（細胞病理学）、ヨーゼフ・スコダ（打診法、聴診法と病理解剖の所見を合わせ理学的診断法開発の開発）、カール・ロキタンスキー（病理解剖）等<sup>28)</sup>。

b) 幕末には多くの日本人蘭学者は蘭医学書の大部分はドイツ医学書の翻訳である事を知っており、原本であるドイツの優秀性に気付いていた。

c) プロシャ国王は19世紀初頭の敗戦の後の軍勢力の不足を、医学を始めとる学問の力で補う政策をとった。日本も明治維新の混乱を早く乗り越える為に、同様の方策を採る事が望ましいと判断された。国家主義を前面に押し出す方針であり、この点でドイツ特にプロイセンの体制を参考にする気配が濃厚であった。即ち、当時の支配層はプロイセンの君主政体に親近感を感じていた。日本国憲法の立案に際して大久保利通がプロイセンの宰相ビスマルクに意見を求めたところビスマルクは次のように話している。「日本はデモクラシーを排して、しっかり統制のとれた方法で選出され国民に対してではなく、天皇に対して責任を負う議会を持つ帝国性を敷くべきである」<sup>3)</sup>。

d) 長い間、医学は臨床家による病棟や病理解剖台での患者の観察・治療が中心であったが、19世紀になると医学の進歩は実験と臨床との協力によりもたらされ、



体制は研究に移行していった。

e) シーボルトの存在が大きく影響した。オランダ商館医として来たがドイツ人である事は皆知っていた。彼の医学教育活動、人的交流、旺盛な研究心、真執な性格の印象が日本人に強く残って居り、彼の名はドイツの強力な外交官としての役割を果たしていた。

f) そして相良知安の直言があった。相良は明治2年5月に医学校取調御用掛が任命されてから後で政府には英医ウイリスに全権を任せようとする気配がある事を知った。この事は自分に任されており、既に岩倉侯の指示で外務部の手を経てドイツ人医師を傭用する手配を進めている。政府の朝令暮改を語り、政府に言上して頂きたいと学校官知判事秋月種樹侯に頼んだ。秋月侯も筋の通った申出に閉口して政府に言上した。その結果、政府は相良と岩佐を呼んでウイリスを日本医師総教師にしようとしていた事に対する異議の説明を聞く事になった。明治2年(1869)2月23日、相良と岩佐は太政官にドイツ医学の採用を進言する機会を持った。岩佐は腹痛を理由に欠席した。席上大久保利通は吃となり廟議においても理解し難いので異説に基く所存を述べよと言ひ、大学(学校)知学事山内容堂は朝廷に対して奉公著しいウイリスを退けるには相当の理由がなければならず、殊に英国は我が國と格別の誼のある国であるので汝の言葉に万一の粗忽がある場合には一大事になる事を覚悟の上で述べよ、と迫った。激情家相良は、廟議ならば自分を御用掛から罷免しその上で大学知学事が外務部の手を経て英公使と公然の御照会があるべきである事、知学事の一存で外国人と約定されたという趣旨であるがそれは公事と私事との混同である事、さらに、ウイリスは多少外科に通じる点があるが、私生活に問題がある証拠があり日本の医学校総教師の器ではない事を滔々と述べた。相良は更に論鋒を転じようとした時大喝一声「知安下レッ」の声があった。旧主君鍋島侯であった。知安は「しばらく平伏したまま、どうしても頭が上がりなかつた」と後で語っている<sup>13, 14)</sup>。会議はドイツ医学を薦める理由の説明を聞く目的で開かれたが、その目的から逸脱し、筋ではあるが、手続上の流れに対して執拗な指摘を繰り返した為であろうか。鍋島侯は別にイギリス支持ではなかつたが、極めて日本的な、且つ、時代を反映した出来事であった。以上は田中潮洲述「相良知安」(医界時報、大正13年)より抽出し平易な表現に改訂した趣旨であり神谷<sup>14)</sup>の記述よりの引用である。その後如何なる経過であったか明ではないがこの議はやがてドイツ医学採用に決った訳である。ドイツ医学を薦めようとしていた相良知安の国際情勢に関する理解は次の様であったと伝えられる。

「西洋大学ノ盛ナルモノハ独逸ナリ。英仏ハ害アツテ利ナシ。蘭ハ小國日々ニ衰ルノミ。英蘭ヲ斥ケテ独ヲ採ルベシ」。「然れども仏方の奢侈は未だ國富に適せず」「蘭は已に國勢弱く」「英人は國人を侮り、米は新國にして医余り無し、独は國體稍や吾に似て且つ此時未だ重細垂に馴れず」。(金杉英五郎、医政五十年誌、大正十四年、文献14より引用)。尚、相良はドイツ医学採用主唱者であり、その導入を決定させたとして東京大学の構内に記念碑がある(小池猪一著、図説 日本の“医”の歴史、下巻、大空社、平成5年)。

g) フルベッキの献言は重く受け止められた<sup>29)</sup>。その頃のドイツ医学の卓越さは間接的な情報ではあるが程度理解されていた。しかし、ドイツから医学の教師を招く事には政府内に強い反対があった<sup>5)</sup>。長い間日本と付き合ったオランダへの遠慮と、戊辰の役の折官軍に奉仕して功績のあるウイリスの処遇の問題があった。文教の責任者山内容堂も相良等の案には賛成ではなかつた。相良等は開成校の教頭であったフルベッキの助言を求めた。フルベッキはドイツ特にプロシャの医学を選ぶべきだと薦めた<sup>3)</sup>。これが同じ土佐藩出身で、嘗て長崎でフルベッキに師事した副島種臣、大熊重信の支持を得る事になり相良等の主張が通った<sup>28)</sup>。フルベッキはオランダで生まれ、ユトレヒト工芸学校土木工学科卒業後アメリカに移住、オランダ改革派の宣教師として日本に派遣され1859年(安政6年)に来日、開成校の教頭で外国語と科学を教えていた。新しい日本建設に携わる人々の顧問役を勤めていた。ドイツ医学選定の過程での貢献は大きいと言われている。

h) 医学取り調べの役人や当時の医学校、病院の幹部がボンペ、ボードウイン及び松本良順の流れに当たる蘭方医でありイギリス医学に近親感を持っていなかった<sup>13)</sup>。

i) ここでドイツの医育制度導入論議の中で重要な因子となった佐藤尚中の立場と行動を理解する必要がある。前述の様に佐藤一門の提議で医制論争は対立する英蘭医学を退けてドイツ医学を取り入れる決着となった。佐藤尚中はドイツ医学導入に賛成であったであろうが、自ら積極的に動いた訳ではない。尚中のこの時期の立場は微妙である<sup>28)</sup>。遡って尚中の動静をみよ。慶應4年2月、鳥羽伏見の戦いの傷兵が江戸に送られて来た時、尚中は養雛子の進と共に芝の新銭座の会津藩中屋敷(幕府側)で負傷兵の治療に当たっている。これは尚中門下の会津藩侍医南部精一郎の要請によるし、義弟の松本良順(佐藤泰然の実子)が幕府の医学所長で幕府方の傷兵の救護に当たっていたので、拒む事は出来なかつたであろう。ところが同年5月、大総督府(官軍、参謀西郷隆盛)

の命令で神田に開業していた関寛齋（佐藤泰然門下、尚中とは長崎伝習同行）が彰義隊攻めの負傷者を横浜軍陣病院（大総督府により設立）に護送した折、同病院の中で尚中と接触した記録があり、尚中が薩摩藩設立の官軍側の病院にいた事が知れている。この病院には後に英医ウィリスとシッドール及び薩摩藩医石神良策が来た。事実上薩摩藩との関係が尚中の政府との接触の発端であり、関寛齋が橋渡しをしたものであろうと言われる。関は長崎伝習の後に徳島藩主の侍医となり、慶應4年東征軍に従って江戸に来ていた。徳島藩と薩摩藩とは親密な関係にあった事から、関東医学界への案内役であったであろう。元来、佐藤泰然の血縁の人々は大部分幕府軍に投じている。佐倉藩は関東譜代の名門として会津と共同体制をとりながら官軍に恭順か抵抗か決しなかった。尚中は5月には横浜病院に出張、6月以降の会津戦争には養継子の進と門弟を送り、自分は参加していない。動乱の中、佐藤門下の名声が高まれば高まる程、尚中と順天堂一門の動向が佐倉藩の興廃に影響するので、容易に動かない。一方、関寛齋は奥羽出張病院頭取を命じられて平で負傷兵の救護に当たり、会津白河口・三春口では佐藤進が治療に当たり、越後口では松本門下の医師が担当し、後に、越後藩で尚中門下の橋本兄弟及びウィリスが加わった。軍医の配置における大村益次郎（適塾出身）の手腕は見事であったが、活動した軍医の大部分は、長崎伝習後の松本良順、佐藤尚中の門下であり、所属する藩と敵味方を問わず、ポンペ、松本、佐藤の三師匠により長崎で育成された日本医学が実地に役立った貴重なケースと言えよう。そして佐藤一門の活躍は医学医療で長州に遅れをとっていた薩摩藩にとっても好ましい結果となり、幕府軍に走った松本は別として、維新政府に於けるその後の尚中とその一門の登用が薩摩藩の政治力を背景として推進される様になった事は理解出来る事である<sup>9, 14, 20)</sup>。幕末には六種の私学塾があり、中でも西（大阪）の適々齋塾（適塾、緒方洪庵）と東（佐倉）の順天堂塾（佐藤泰然）が注目されていた。順天堂から出た松本良順、佐藤尚中、相良知安等の活動は前述の通りであるが、適塾関係者の立場をしてみる。先ず、適塾には医師に限らず多くの俊才が集まり難解なる蘭文の解読、文法の勉強、工学、医学、兵法等多岐にわたる分野の闇本を競って読んだ。福沢先生によると「皆活発有為の人物で、およそ勉強ということについては此の上に為やうはないと言う程に勉強した」。また、「宝歴明和以来八九十年間の学は医師を蘭学にしたものであったが、弘化嘉永以後の蘭学は士族を蘭学にしたものである」<sup>14)</sup>と言われ、適塾が医学以外の分野の本を広く学ばせる場であった事を示して

いられる。これに対して、順天堂塾は純粋に医学塾であり、出身者の松本良順は緒方洪庵の後の西洋医学所の頭取になった時に蘭語の勉強に関しても、難文の解読や文法の勉強よりも物理、薬劑、解剖、生理、病理、療養、内外科を勉強する様に変える事を提案している。この提案は、幕府から新政府への移行期に出会った為に実現しなかったが、両塾の性格の差を表している。日本の医育体制の事実上の創始者とも言われるポンペは、幕府が海軍伝習をオランダに依頼した折に第二次派遣隊来日の際に、医学の伝習も依頼した事によって来日した。そして、ポンペにつける日本側代表に幕府は松本良順を任命した。即ち、幕府による依頼と代表指名という医学の官製モデルが造成され、官学という独特な伝習が生まれた。緒方洪庵はポンペの来日を「蘭学一変」と高く評価し、門弟の長與専吉が江戸に勉強に行く希望を告げた時に長崎のポンペに師事する事に翻意させている。この時の長與のポンペの下での勉学は私的な遊学であって、幕府の命令による公的なものではないという扱いになるのであろう。長與は明治4年以後新政府の中で活躍するが、西洋医学の選択時には論議に加わっていない。江戸における廟議が公卿や旧藩主や上級藩士によって行われる状況の下では、官にあるもの以外に参加の可能性は少なかったであろうとも思われる。また、論議が江戸で行われていた事も一つの理由であろう。この様な状況で、少なくとも、西洋医学選択の論議では、適塾の意向は述べられてはいない。

### XIII. ドイツ医学導入決定後の医育界の状況

明治初期から中期にかけて、医学や医師に関する言葉として、ドイツ医学だけではなくイギリス医学もアメリカ医学もあるぞという意味を込めて「日本橋から南にドイツ風吹かず」という風刺言葉が多くの人々の口から洩れた。ドイツ医学を学んだ者でなければ一人前の医師ではないとする風潮に反対する意味であった。日本橋から南とは京橋、銀座、芝、横浜方面を指し私立の成医会講習所（慈恵医大発祥）、海軍省医務局、海軍軍医学校及び海軍病院があった。成医会講習所は米医ヘボンに師事した慶應義塾出身の松山棟庵とイギリスのセント・トーマス病院に留学した高木兼寛が開設したものであった。海軍は明治3年に公布された布令では「イギリス海軍に倣う」となっており、従って海軍軍医学校ではイギリス人医師アンダーソンを招聘して教育していた。日本橋から北とは神田、本郷から戸山原にかけての地域を指し、東京医学校、陸軍軍医学校及び同病院があった。陸軍は幕

府の陸軍の時代からフランス式できており、公布された布令では「フランス陸軍に倣う」であったが、フランスが普仏戦争に破れた為急速ドイツ式に改められた経緯がある<sup>22)</sup>。前述の様に、ドイツ医学採用後もオランダから多くの医師が教えに来ており、又、イギリス系やフランス系の私立医学校も存在した。当時、英学、英医学の進出は目覚ましかった。人文、社会、自然科学等の領域では少なくとも明治14年の政変までは、そして多くは明治19年に帝国大学の教科がドイツ語一辺倒に改められるまでは英米系の教育が盛んであった。医学でも、慶應義塾医学所(明治6~13年)、大阪専門学校医学所(明治12~13年)、幾つかの地方医学校及び第一~第五高等中学校医学部(後の官立医学専門学校)では実地医学教育が買われて英医教育が行われていた。ドイツ医学が浸透し出したのはドイツからの留学生が帰国しだしてからである<sup>19)</sup>。明治20年に地方都市から医学校への財政援助は打ち切れ、医学校の数を減らす法律が定められた。これ等の条件が重なってドイツ医学に集中し易い状況となっていた。

#### XIV. ドイツ医師着任と日本側の反応

二人の軍医は明治4年7月10日に着任した。東京医学校(東校)の授業を視察し、ミュルレルは約300人の学生が10~16人ずつ大きな机を囲み各自大きな声で用語はまちまちの教科書を吟誦で朗読していて、ユダヤ教の教会にいるようであった、と表現している。午前中は教壇に座り、学生の質問を受けたり、講義をしたりし、午後は日本の医師と一緒に患者を診察し、授業を教えたり処置をしたりした。そして、我々が何でも知っていて、質問すれば文献を調べたり、観察したり思索するまでもなく即座に答えてくれる生き字引兼処方方便覧のように思い込んでいるようである、と記載している。ミュルレルとホフマンはこの様な様子を見てから医学校の改革に着手した。当時ミュルレルの通訳を勤め、後に東京帝国大学医学部長になった三宅 秀は次の様に述べている。「二人のドイツ人教師は、当時のドイツ式自由教育制度をとらず、主としてドイツ陸軍(医学校)の厳格な教則に準じ学生を寄宿舎に收容し、制服を着せしめ、寮も仮借しなかった。教育上の事は両人が実権を握り、日本官吏の口出しを許さず、当時の条約文の写しを持って思う存分に自分の主張を通した」。明治2年12月、神田の医学校(幕府時代のお玉ヶ池種痘所)は大学東校となり、佐藤尚中が大学大博士として最高責任者となっていた。ドイツ人教師の建議で明治4年9月25日に大学東校を一旦

閉鎖し、文部卿と申し合わせの上、学生に一般的な試験をした。合格者は59人であった。10月から学則を改めた。即ち「小学校と中学校の課程を終へた14才以上16才まで(翌年19才と改正)の者に入学を許し、予科3年(後に2年)、本科5年の終業年限を課す。変則生制度を廃止する」であった。これは、既に日本にあった教則とは可なり異なる。その頃、長崎医学校(長興専齋学長)では予科課程を含めて5年、明治3年に定めた大学東校規則では小学校から普通の学科を終了した17~18才の者に正則5年、変則3年の修業を課していた。又、正則生は洋書を読み学制の順序に従い卒業大成する内容であり、変則生は訳本を読み每学科の要領を得早く成業する制度である。ところが、上記のミュルレルの提案を文部省(大木喬任文部卿)は受け入れた。学則は明治5年に交付されたが、大学東校の運営に努力し諸事を積み上げて来た佐藤尚中は学則自体の見解の相違、特に、変則制度の廃止と当時の責任者である自分に一言の相談も無しに提案され承認された事に対し抗議書を提出し大学を辞し、文部省兼任のみとなった。これが、後の順天堂医院開設の原動力となったと言われる。変則制度は、一時閉校の後の試験に合格しなかった学生も含め3年の課程で日本人教官により日本語で行われた医学授業であった。当時の多くの日本人関係者の意見は次の様である。「洋方医の数が不足しており医師促成も必要である。講義や読書をドイツ語とする事は便宜上の事であり、日本人には日本語で教えるのが本当である。教育内容は立派であるから制度は存続するべきである」。変則制度についての結末としては、ミュルレルとホフマンが解任になった翌年即ち明治8年に通学生(後の別課生)制度が出来、医師の促成が行われることになった。明治4年8月、これまで教育機能と行政機能をあわせて持っていた大学東校から、行政機能を分離して文部省として独立した。尚中は東京医学校から出仕を命じられ大丞準席(文部大丞兼文部大教授大典医正五位叙任)に変わっていた。その後、ドイツ医学導入以後の学制と医制の論議が新政府内で行われた。医制についてドイツ医師は付属病院規程を作り、それは学制121章の内7章を占めるものであるが、本来学制に盛るべき医科教則が別冊とされ、付属病院規程が草案にのせられた異質なものであった。生徒研業に支障を来すので入院患者数を予め限定する事及び日本ではとった事がなかった診察料徴収等が含まれていた。学制に関しては東京医学校を作り上げてきた尚中一門は東京を例として、地方に官立の医学校等の高等教育施設を充実させる事を主張したのに対し、ドイツ医師団及び維新政府は、小学、中学、大学の三種の設

定、プロシヤの特長である就学脅迫制（義務教育）による国民教育の普及とその為の教師養成機関（小教校）の充実の必要性を強調した。そして、ホフマンの建議により初等教育普及への重点移行、師範学校、欧米先進諸国に学ぶ為に必要な外国語学校の設立は即維新政府の方針ともなり、高等教育の促進は遅々として進まなかった。これらはやがて順天堂一門の医学校からの退去に繋がる事になる。一方、漢方は数千年にわたって日本人の苦痛を救って来た功は大きい。しかし、「不開明の時期に功があっても開明の時期に用のないものを、有為少壮者に学ばせる事は出来ない」というのが、明治医界第一世代共通の意見であった。理由は、伝染病の予防に無力、法医学（裁判医学）的知識欠如、及び、軍陣医学に役立たない（現に日清、日露戦争では漢方は使われていない）等であった。それに対して、竹山晋一郎は著書（漢方医術復興の理論、昭和16年初版）に「本質的に個人的な臨床医術であり、明治の社会医学の要求に応じきれない、臨床的であったから、経験を通じて術として会得され、学としての体系が無かった為に科学的批判と対抗し得なかった。臨床にかけては洋法に勝るものである」と言っている。相良知安等佐藤尚中一門が東京医学校（大学東校）の運営過程で医制度及び学制度の案を作っている頃は維新時代の軍事医学として西洋医学が圧倒的に優位にあり従来の漢方に置き換わっていた。そして、天皇を中心とする国家形成の国策の中で医学を国政の一つとして西洋の医学を早く取り入れようとしていた。医学として体系をなす事が出来なかった国学（和医方）の中身を西洋医学で充実させようという時代である。漢方医のグループは大学の中に「皇漢医道御用掛」を設置、国学者と共に参加して和医方のテキストとして日本古医方の本を選んだりした。要するに和方医を全面に立てて西洋医と対峙していた。やがて相良は退き、明治6年に長興専齊が文部省医務局長になった。これに先立ち、長興は明治4年から6年にかけて、医学・医療観察のためヨーロッパに派遣されていた。医療の欧化の方向は更に展開した。明治7年、長興は西洋医学六科のみによる医術開業試験を布達。従来医業の医者は試験免除、漢方医による医療は一代のみとする内容であった。それに対して、漢方医は漢方六科による開業試験を求めたが容れられなかった。また、大久保利通は漢方鼈屾であったが彼は脚気病院を設定し、漢方医と西洋医に治療を競わせた。結果は漢方の方がやや良かったが、大久保の暗殺により此の試みはうやむやになってしまった。その後も漢方医に開業免許を下付されたいとの願いは続いた。長谷川泰（尚中一門）は両医学の国家的損失を比較し、「医師免許証を有する

者が漢方を行ってはならぬという法律ではない。医師の免許を取得してから漢方を行う様」に主張している<sup>11</sup>。明治17年から西洋医学にもとづく医術勸業試験が実施された。従来から開業の25才以上の医師は試験免除で、これと引き替えに和漢医の開業試験は拒否された<sup>14, 15, 26</sup>。以上が、ドイツ医師着任後の国内の状況である。医制に厳しい内容の実施を建議し政府はそれを受けて欧化は実施に移されたが、同時に論議されていた学制の評議にもドイツ医師の関与が見られた結果となった。

## XV. ドイツ医学採用の評価と考察

低迷から脱却して世界の最高峰になった時代のドイツ医学を採用した日本の選択は誤りではなかった。時期的にも最適であったと言える。前述した様に、解体新書が刊行された頃に外国医学を導入する事態となっていたらドイツは候補の国のリストから漏れていたであろう<sup>28</sup>。植民地支配下にあるわけでもない一國が他国の制度を全面的に模倣した例は他には無いであろうと言われている<sup>31</sup>。日本はドイツ医学導入の約20年後には北里や山極の様な世界に伍する研究者を輩出している。即ち略1/4世紀で列強に追い付いた事になる。ただ、基礎医学の研究面では確かに最高の国を選んだが、ドイツが臨床分野で冠絶していた訳ではない<sup>29</sup>。実技・経験を主とし学理を従とする英米医学に対し、思弁的であり学理を重んずドイツ医学が、元々訓詁の学である日本的、士族的教養にとって、より高尚・高遠に映じた事も確かであろう。又、絶対主義、君主主義のプロシヤの医学制度の採用は日本政治上の保守勢力には安全な選択であった<sup>14</sup>。しかし、その中にはその後の日本の医学が負はなければならなかった封建性も含まれていた（安芸基夫・ドイツ医学採用に関するフルベッキの証言とその時代的背景、文献14より引用）。明治初期に於ける西洋医学導入の段階で、その内容はオランダ軍医学校からドイツ軍医学校へと受け継がれた。既に記した様に安政3年（1856）幕府は諸外国の接触が多くなったので海軍訓練の為習得所を作りオランダに海軍の指導を依頼した。この時、オランダ軍医に長崎で医学を教授する様に頼み、ボンベがその医師として選ばれた。ボンベは日本の医学に最初に西欧の医育制度を紹介した功績は大きい。ユトレヒト軍医学校出身であり、これが軍医来日の第一歩となった。次に来日したボードウインは同校で15年の教育歴を持つ医師であった。それ以後来日した医師もボードウインが軍医学校で教えた軍医達であった。ドイツ医学採用という事は大学東校にドイツ人医師を招聘する事で実

現し、プロシヤ陸軍および海軍の軍医二人が赴任してきた。そして初期に受けた医学システムは軍医学校のものそのものであった<sup>9)</sup>。ドイツの場合、軍医採用の理由としては軍医は日本の武士階級に相当する上級の身分であると受け止められ、それに反し、文民の医師は平民階級と受け取られていた<sup>10)</sup>。政府が医師二人の派遣を要請した時、ドイツ代理大使フォン・プラントがベルリンに伝えた内容は次の通りであった。「軍医は士族階級とみなされ、文句なしに比較的高い尊敬を払われ、貴族社会に迎え入れられ、恐らくは天皇陛下の侍医になる見込みがある」<sup>11)</sup>。

## XVI. 軍医学校の医学を採用した影響

a) カリキュラムが硬直性であり全学科必修であり学科に選択の余地がない。これは実地に役立つ医師を促成に作らなければならない立場から見ると尤もな事である。当時、日本の大学には学生や教師が自由に討論して受講科目を決めるという習慣は無かった。管理者が考えて作成した教科課程をそのまま順守する事が、急速な発展を期待する政府の医育方針に沿った道であったのであろう<sup>23)</sup>。

b) 医学哲学、医学概論、医史学、医療経済、看護学等の教育科目又は講座が無い大学が多い<sup>6)</sup>、<sup>10)</sup>。

c) 医師の自由な発想に依らず、上からの命令一下ひたすら医療に専念する医師の養成の習慣のある場合がある。

d) 専門臨床科目重視の傾向が強くと、その結果哲学は無く医療技術の習得・開発のみに走る場合がある。

e) 専門科の中に閉じこもり医学内の他の科や医学以外の学科との連係による活動が少ない。

f) 軍医学校のみの影響ではないが、ヨーロッパでのプロフェッショナルという語は「大学で講義出来る程の専門家」という資格の名称であり一生の呼称であるが、日本では教授という職階を指し、退職と共に消える<sup>10)</sup>、<sup>13)</sup>。

## XVII. ドイツ医学採用の過程で 不思議に思われている事項

a) 明治初期にドイツ医学の優秀性を果たしてどの程度理解していたであろうか<sup>14)</sup>。

b) 理路整然としていても、徹士相良知安の直言のみで、イギリス医学採用に傾いていた廟議が変わるものであろうか<sup>10)</sup>。

c) 当時のドイツの国家体制と政局を年代別に見てみ

ると、プロイセン立憲国家の誕生は1850年、ビスマルクが宰相となるのは1862年、北ドイツ連邦の形成は1867年、普仏戦争勃発は1870年、そしてドイツ帝国発足宣言は1871年である<sup>17)</sup>、<sup>22)</sup>。明治政府で外国医育制度誘致の論議が行われていたのは明治2年(1869)であるから1850~67年の間にプロシヤの国家体制の情報を得ていたのであろうが、ドイツ帝国は未だ発足していない。現に、前記のドイツ代理大使の正式肩書きは北ドイツ連邦大使であった。

d) フルベッキが相良・岩佐にドイツ医学を薦めた事が大きく影響したと伝えられるが、工学系でありアメリカに移住していたのに、ドイツ医学の正当な評価が出来ていたのであろうか。ドイツ医学採用決定後、来日したドイツ医師ミュルレルは開成校で彼に会っているが「配管工(一説には錠前師)として育ったアメリカ宣教師で日本の官庁の偉い人の言う事ならそれが馬鹿げた事とわかってでも追従してしまう」と評価は低い<sup>3)</sup>、<sup>8)</sup>、<sup>14)</sup>。此等の指摘は事後に誰かがつけ加えた説明の可能性があるのではないかと後世の歴史家が記載している諸事項である。加えて案ずるに、一連の医療選択論議の経過中に、維新時に発揮されたイギリス人医師による戦陣医学の腕前は別として、純粋な学事としてイギリスやフランス等の医学をドイツのそれと比較検討した記載は見当たらない。それにしても、シーボルト以後ドイツの医学・医療の実体に触れる機会が殆ど無かった状態で、オランダ医師及び他国人から得た間接的な情報や、翻訳を通じての僅かな経験のみからドイツ医学採用に踏み切った訳だが、結果としては誤りでなかった事は幸いであった。

## おわりに

以上西洋医学との出会いと移入からドイツ医学選定・導入に至る迄の経過の概要を記した。皇国の医制、列強に伍する医学の確立を目指して明治維新政権が官立医学校を設立する時に、手探りで捜し当てた西洋医学モデルはこのようなものであった<sup>15)</sup>。医学とは離れ社会面から維新以後の西欧化の過程をみると、三種に分ける事が出来る。第一は維新から10年頃までで、旧文物一洗の段階であり、イギリス起源の功利主義の思潮であった。やがて10~20年にはフランスの自由思潮であり、その後、ドイツ流の国家主義が唱えられた。この内、最も勢力があったのがイギリス流の功利主義であったと言われる<sup>29)</sup>。医制論議はこの第一の段階の折に起ったのであるが、論議の基礎資料は、遡って徳川幕府の末期までの日本の医療におけるオランダ医学習得の過程で蓄積された

ものを用いている。福沢先生はこの第一段階の時期に慶應医学校を発足させられた訳である。先生は適塾で医学書を読まれ、又、維新前に三回外遊しておられ等、西洋医学についてかなりの基礎見解を持って居られた。最初は万延元年（1860）に咸臨丸で木村拱津守の従者としてアメリカのサンフランシスコに行かれ、数病院を見学されている。第二回は文久元年（1861）遣欧使節団の一員として、フランス、イギリス、オランダ、プロシヤ、ロシア、ポルトガルを訪問し、公務の外にかなりの数の病院を視察された。第三回目は軍艦受け取り委員の随員として再度のアメリカ訪問であった。後の啓蒙思想家として開化期の日本を指導する先生の西洋に関する知識と体験の大部分は第二回のヨーロッパ歴訪において得られたものであったと伝えられる。医事に関してもこの機会に多くを見学し、医療の現場に接する事によって理解を深められたと思われる。訪問・見学された医学関係の施設は病院であったがかなりの数である。一部の例を挙げると、パリではラリボアジェル病院（1962年3月9日）、ロンドンのキングス・カレッジ病院（5月6日）、セント・メアリー・マグダーレン教会の唾院、ベツレム病院（癲院、註：精神病院）、盲院、等。プロシヤではベルリンのシャリテ病院（7月25日）等が挙げられる<sup>30, 32, 34</sup>。また、ベルリンではプロシヤ国王の侍医ラウエル博士に会っておられる。同じく国王の侍医でありベルリン大学の初代医学部長のフーフランドが話題になったであろう。福沢先生の師である緒方洪庵がドイツ語の原文からオランダ語に翻訳されていたフーフランドの医戒<sup>27</sup>に関する著書を日本語に訳し「扶氏経験遺訓」と題して刊行しているのでフーフランドの書<sup>11</sup>には接しておられた<sup>32</sup>。さて、前述の病院は何れもそれぞれの国の代表的な病院でありその時期には病院は従来の様に教会等が貧困者や老人などの世話をする場としての性格から、病人の診療を任務とする機構に性格が変わっており、所謂病院医学<sup>16</sup>の場として繁栄していた時期であった。入院ベッド数、医師の数、手術場、看護の状況などの報告は福翁自伝に見られる。大学や研究所は見えておられないが、少なくとも欧米の医療事情の現場を可なり精密に観察され理解されていた事は確かである。先生は元来医学に接する機会が多かった。列挙すると次の通りである。適塾の時代には緒方洪庵、新井白石、大村益二郎他多くの医師に接しておられた。塾にある10数種類の蘭語の本の大部分は医学書であり、悉く読破されたといわれる。就中、三部から成るリセランドの生理学書を三度も通読された<sup>12</sup>。咸臨丸で渡米の折、太平洋で船は30~40度も傾き、艦長の勝海舟をはじめ医師も船酔いになった時、

先生は酔わず、医師の指示で薬を調合し配って飲ませた経験もある。即ち臨時ながら看護師としての、一部薬剤師としての役目を果たした経験もある<sup>25</sup>。新銭座の慶應義塾には日本で初めて医務部を置かれたし、明治12年東大医学部学位授与式の祝辞で、「自分は医者ではないが本と医の門にあり洋学を学んだ者なれば、医に対して同情憐惜するの感なきを得ず」と言われている<sup>30</sup>。これが先生の本心であろう。先生の基本方針は「我が国は西洋文明を取り入れなければならない。西洋の中では英米をよしとする。英語は世界中何処でも通用する。英語を通じて、文化を摂取しなければならない」であった。この基本方針の上に立って上記の様な医に関する基礎知識と知ろうとする探求努力が慶應義塾医学所発足の動機付けになったのであろう。更に、イギリスとフランスでその時期に最も充実していた病院中心の医学の現場を見ておられる事、当時の社会一般のイギリス思潮、江戸から東京時代にかけて慶應義塾が唯一の英語塾であった事等から明治6年の慶應義塾医学校の設立に際しイギリス医学を採用された意図を察する事が出来る。

大正6年（本科は大正9年）に北里柴三郎先生は慶應義塾大学に医学部を設置された。その折に先生は「基礎医学と臨床との緊密な関係の必要性」を強調された。明治3年に、日本は大学と研究所での活動を主体として医学を推進しようとするドイツの医育制度を導入し、その制度に漬かって略半世紀が経過したこの時期に、臨床医学との密接な関係の必要性を指摘された訳である。この事は、別の表現をするならば、大学における教育・研究に基礎を置くドイツ医学と病院における診療と研究に主眼をおく臨床指向のイギリス医学の両者を合わせてこそ真の医学としての発展がある事を示唆されている。先生自身は、病院医学よりも大学・研究所の活動に重点を置くドイツ医学を取り入れた東京大学に学び、しかも、その宗家であるドイツの大学に留学して研究の成果を挙げられた。それなればこそ、この指示は、ドイツ医学の特長に加えて臨床医学の重要性にも目を配られた高次元の判断によるものであり、明治初期に、基礎医学を重視するか、臨床医学に主眼を置くかを考慮に入れる余裕なく、どれか一つの国の制度に限定して相手国を探索せざるを得なかった医制論争の結果からは数段抜け出た次元の理解であったと言える。

アメリカのジョーンズ・ホプキンス大学の医学部も、1876年にドイツ医学方式を取り入れて発足した<sup>2, 4, 39</sup>。日本に二人のドイツ医師が赴任した時期、即ちドイツ医学受容の開始時期は1871年（明治4年）であるからほぼ同時期である。アメリカの医学教育の歴史の中で

17~18世紀は不毛の時期であったと言われる。独立の初めに存在した医科系の学校はペンシルヴァニア大学(1765)、キングス・カレッジ(1767、後のコロンビア大学)、ハーヴァード大学(1782)、ダートマス・カレッジ(1798)とトランシルヴェニア・カレッジ(1789)の五校のみである。世間では非医者横行があり、又、程度の低い医学校(修業2年)が乱立しており1886年までに60校を数えた。ハーヴァード大学のエリオット学長は医学生の学力の低下を警告し、アメリカ医学を支えているものは、ヨーロッパ諸国に留学した少数の医師のみであると極言した。留学先はその国の医学の隆盛の程度に平行してイギリス、フランスからドイツへと移動した。1749~1800年の間にはエジンバラ大学に117名、その後バリの大学に移っていった。やがて、ドイツ医学が思弁医学の混迷から脱却し復興してからは、1825~1914年の間に留学先はドイツが多くなった。留学者はゲッチンゲン大学(204人、1825~1910)、ハイデルベルグ大学(1200人、1840~1910)、ヴュルツブルグ大学(185人、1870~1914)の様な状況であった。当時ジョン・モルガンは、今日の教養課程に相当する基礎科学を重視し、科学の段階を経て達成される調和のとれた医学教育を理想とすると論説しているが、現実には遥かに掛け離れた状態であった。ジョーンズ・ホプキンス大学はこの様な異常な環境の中で創設された。初めページェット(ロンドン)、ローレンス(オックスフォード)、ターナー(エジンバラ)等の意見で、オックスフォードのシステムを採用する予定であった。ドイツ医学を採用する事にはウィリアム・H・ウエルチ(後記)の貢献が大きかった<sup>2)</sup>。彼は医学の教育の知識が豊富であった。全ての面でイギリス色の強いニューイングランド地区でどの様にしてドイツ医学をイギリス医学と調和させて発展して来たのであろうか。そこには、設立の初めから特色のある状況があった。ボルチモアの商人であり銀行家であったジョーンズ・ホプキンスの遺言は「遺産の半分を大学医学部の設立に、半分を病院の設立に使って欲しい」であった。加えて彼は生前に、大学と病院について「医学校は大学区の中になければならず、さらにレヴェルの高い病院と深い関係を持ち、互いに治療・教育・研究という協力体制を作らなければならない」と言い残している<sup>3)</sup>。これは、基礎医学重視か病院主体の臨床医学に重点を置くかの二者選一を迫られていた当時の医育機関に対して、まさに卓越した見識のある提言であった。今日の大学医学部に求められる姿勢そのものですらある。加えて、同大学は発足の初期に次々と新しい方針を打ち出し実行していった。例を上げると、次の通りである。

a) 優れた教員を集めた。カリフォルニア大学学長のダニエル・コイト・ギルマンがジョーンズ・ホプキンス大学の学長となり、中心となって世界中から若くて優れた教授を集めた。最初に採用したのがウィリアム・H・ウエルチであり、新大学建設に大きな力となった。後に初代病理学教授となる。

b) 学生の選抜において、初めて女子学生をとった。ハーヴァード大学は1945年まで女子はとらなかった。

c) 入学資格は「大学卒業又はそれと同等の学力を持つもの」とした。即ち医学部を理科系大学の大学院相当に位置付けた形となる。これを見て、ハーヴァード大学やコロンビア大学は改革をしたと言われる。この方式は、現在のアメリカの大学医学部及び医科大学全体で採用している受験資格でもある。

d) 基礎科目にフランス語とドイツ語をいれた。即ち、アメリカにとって全く新しい事を実行し、成功させた訳である。又、後に教授になったウィリアム・オスラーはインターンとレジデントの制度を作り上げた<sup>2, 4, 3)</sup>。この様に後発の大学ではあったが、創始者の卓見に支えられた、新しさに溢れた出発であった。医師ではない創始者が語った希望の内容は、大学を主体とするドイツ医学と病院における実地医学に重点を置くイギリス医学との密接な連係を求めているものである。敢えて想定するならば、ニューイングランド地区に既に存在していたイギリス式病院医学との協調を示唆していたのかも知れない。両者の特長の重視・融合の方針が医学部の特長である事が知れ渡ったお陰で一躍名をあげ、加えて、独立時の旺盛な開拓精神に則り新鮮な学校運営を実行に移した事もあり、数年でジョーンズ・ホプキンス方式をアメリカ全土に広げる結果となった。これが同大学の創設時の状況であった。現在の目で見てみると、同大学はドイツを手本として発足し、従来からアメリカにあるイギリス寄りの医学の特長を取り込み、自ら医育制度に新しい発想を盛り込んだ。その力が、アメリカでの次のステップの発展への活力になった。ドイツ医学による大学・研究所中心の活動の特長を生かした例の一つは研究所の設置である。有名なロックフェラー研究所(1913年に設立)は前記のジョーンズ・ホプキンス大学病理学教授のウエルチ等の努力によって作られた。また、これはジョーンズ・ホプキンス大学の独創ではないが、アメリカの一般の大学では、ドイツ医学における基礎医学と臨床医学との画然たる区別の体制を排除し、医学において、基礎・臨床両分野の医者による活動と科学者による活動とを混在したまま、医学の発展・専門分野の細分化に投入して来た。この方式は別としても、同大学の設立は大学としては後

発であったが、従来存在していたイギリス医学傾向の強い医学体制の中にドイツ系の優れた部分を選んで移入し、初期のアメリカの大学の医育体制に大きな影響を与えたのである。

前述のジョーンズ・ホプンス大学の創立はアメリカの独立から既に70年が経過してはいるとは言え独立という社会変動の時期においてであり、同じく政治体制の大変革があった日本の明治維新直後に医育制度の選択が行われていた時期の状況に似ている。一大学の場合と一国の場合とは場が異なるが、敢えて、ドイツ医学の受け入れ方を比較してみる。前者の場合、国家の方針として「人民の為に」が全ての考え方の根本にあった。科学の為の科学という見解の下で発達したドイツの医学制度とどの様につき合っていくかを考える事が求められていたであろう。他面、独立後五つしかなかったにせよ、既に観察し批判する対象となる先行の大学医学部があった。又、主として欧州人から成る移民が欧州以外の土地、即ちアメリカ大陸に来て、以前に同じ欧州人が作った医学の体制を改新する事になる訳であり、前人の業積の成否を直視し諸種の矛盾を比較的に見つけ易い環境にはあった。いずれにせよ、創始者の医学に対する素朴ではあるが秀でた期待を背景として、当時の不毛な医育環境を新天地開拓という時流に乗ったパワーで改めていったのが特長である。一方、日本の場合、ドイツ医学導入は西洋に追い付く為の使命感からの国策の一環であった。医学は欧州から東洋に向けて来たのであり、両地域間の文化の差は大きく、受け入れた時には違和感があったであろうと想像される。それは、驚きでもあり、一種の畏敬の念を以て迎えられたと思われる。そして、先行する医科大学もなく、和医方、漢方と僅かな蘭方の蓄積があるのみで、国内には導入されたドイツ医学を吟味或は比較検討する材料も無かったので、ただドイツ医学の移植を有り難く受け入れるしかなかったと言えよう。加えて、日本の場合には、国家が先導して導入したドイツ医学は軍医学校医学であった。これらの事情が、アメリカと略同じ時期に同じくドイツ医学を導入しても、後の段階において両国の医学の展開の方向が異なった原因になったのであろう。

日本に移入された西洋医学の中、南蛮医学は略半世紀間であったが、蘭医学は約2世紀半続いた。その主体は実学であり、医学思想として受容されたものは幕末の短期間のみであった。蘭学医学思想の基盤は大別して三時期に分けられる<sup>1)</sup>。

a) **ライデン学統医学移入時代** 18世紀半ばまで約1世紀半である。18世紀前半にヨーロッパを風靡した

ブールハーヴェを中心にオランダのライデンで栄えた学統である。臨床観察の正確なる把握を第一義的のものとし自然の良能を尊重し無益に術を施さない事を強調している。杉田玄白の著書「瘍家大成」の中の挿絵に引用されている。又、華岡清洲などの乳腺手術に与えた影響は大きいと言われる。和書への翻訳が多い時期である。エジンバラ派やウイーン派はこの学統に属する。

b) **ドイツ生氣論医学移入時代** 18世紀後半から19世紀にかけて約40年、ドイツのフーフランドを中心にしてドイツで行われた医学であり、医学は哲学と密接な関係にある事を説いた。医戒についての緒方洪庵の翻訳書がある事は既に述べた。

c) **病理解剖を主体とした医学移入時代** 19世紀前半の近代ドイツの医学を主とし、明治の時期に至り蘭学を離れ、一時英米医学を移入する時期である<sup>2)</sup>。以上三種の基盤は、蘭館医が日本人に教えた内容の中に、それぞれの時期に相当して背景になっている事を意味するが、個々の医師が具体的に教示したものではない。長い蘭学の時代が終わり、短期間の英米医学との接触に次いで明治初年にドイツ医学が導入された。オランダ医学はその伝来の前半においては特に体系的なものは無かったと思われるが、後半、特にボンベ以後では軍医学校の医学であったとしても、或る体系化された医育制度の下での教示であった。しかし、今日、オランダ医学の痕跡と思われる医学思想や技術は指摘出来るであろうか。或は、それらは後に来るドイツ医学の中に埋没してしまったのであろうか。

日本の近代医学はドイツ医学の移植から始まったと表現される事が多い。しかし、本来のドイツの大学の特長は教育、学習、研究において選択の自由がある事であった<sup>3)</sup>。明治初期に日本に移植されたドイツ医学は軍医によるものであり、ドイツの大学で教えられる本来のドイツの教育制度の中の医学教育とは異なるものであったが、それなりの成果はあった。導入後、日清と日露の両戦では、オランダ医学、イギリス医療を経験した後にドイツ医学を加えた西洋医学の体験はおおいに役立ち、自信をつけた。そして、大正3年(1914)の第一次世界大戦に至って日本はドイツに敵対する立場となり、この時点で日本の医学はドイツから離れ自立して日本化したと言える<sup>4)</sup>。以後、独自に発展して来たが、昭和20年(1945)の終戦以後はアメリカの影響を受ける事が多くなった。この様な経過を辿って来た日本の医学である。

福沢先生が医学所を設立された時に英医学を範とされた事の背景を探索してきたが、それは即ち、南蛮医学が渡来して以来日本の医学が歩んだ道を辿ってみた上で察



する事であった。今日、日本の医学をここまで育成された先人の努力に感謝しつつ、現在に残る一世紀半前の医学移植とその後の多様な修飾によって生じた正と負の遺産を直視し、内容を再認識する時期に来ている。そして正なるものはよく吟味して更なる発展に導き、負なるものは分析してこれを改め、この様な努力を重ねながら世界の医学・医療情勢の中で、より高い自立の医学を目指すのが我々の進むべき道であろう。

参考文献

- 1) 阿知波五郎, 近代医学史論考 阿知波五郎論文集 上 思文閣出版 1986
- 2) 阿知波五郎, 医学史点描 同上 下 同上 1986
- 3) パワーズ, ジョン, G. 日本における西洋医学の先駆者達 金久卓也, 鹿島友義訳 慶應義塾大学出版 1998
- 4) ダフィー, ジョン, アメリカ医学の歴史 網野 豊訳 二瓶社 2002
- 5) 後藤由夫, 医学と医療 文光堂 1999
- 6) 後藤由夫, 医学概論 文光堂 2004
- 7) 服部 敏, 日本史小百科: 医学 近藤出版社 1985
- 8) 石田純郎, ルム・ホイケルス, 西洋医学教育システム受容の歴史 医薬復刊 55号 15-22頁 1987
- 9) 石田純郎, 江戸のオランダ医 三省堂 1988
- 10) 石田純郎, 蘭学の背景 思文閣出版 1988
- 11) 石原 明, 醫史学概説 医学書院 1955
- 12) 石河幹明, 福沢先生と医学 福沢諭吉伝 第四巻 岩波書店 1994
- 13) 梶田 昭, 医学の歴史 講談社学術文庫 1614 講談社 2003
- 14) 神谷昭典, 日本近代医学のあけぼの 維新政権と医学教育 医療図書出版社 1979
- 15) 神谷昭典, 日本近代医学の定立 医療図書出版社 1984
- 16) 川喜田愛郎, 近代医学の史的基盤 上 医学書院 1997
- 17) 川喜田愛郎, 近代医学の史的基盤 下 医学書院 1997
- 18) 木村靖二, ドイツの歴史 有斐閣 2000
- 19) 北里文太郎, 慶應義塾医学所 日本医史学雑誌 第1309巻 昭和17年
- 20) 吉良枝郎, 日本の西洋医学の生い立ち 築地書館 2000
- 21) 吉良枝郎, 幕末から廃藩置県までの西洋医学 築地書館 2005
- 22) 小池猪一, 醫(意)外史 (株)日本小児医事出版 1996
- 23) 中川米造, 日本医史学雑誌 28巻 日本医史学会 1982
- 24) 坂井栄八郎, ドイツ史10講 岩波新書 826 岩波書店 2005
- 25) 柴田利雄, 福沢諭吉と医学 福沢諭吉のレガシー 丸善株式会社 平成17年
- 26) 新村 拓, 日本医療史 吉川弘文館 2006
- 27) 杉本つとむ, 江戸の阿蘭陀流医師 早稲田大学出版部 2002
- 28) 小川鼎三, 医学の歴史 中公新書 39 中央公論新社 1964
- 29) 尾形裕康, 西洋教育移入の方途 野間教育研究所紀要 講談社 昭和36年
- 30) 太田臨一郎, 福沢諭吉と医学 福沢手帳 福沢諭吉協会 昭和57年
- 31) 東野利夫, 南蛮医アルメイダ 戦国日本を生きぬいたポルトガル人 柏書房 1993
- 32) 山口一夫, 福沢諭吉の西航巡歴 福沢諭吉協会叢書 文化総合出版 昭和55年
- 33) 山本和利, 医学生からみる医学史 診断と治療社 2005
- 34) 山内慶太, ロンドンの福沢先生の足跡を辿って 三田評論 No.1049 2002

原 著

初期胚神経上皮由来神経幹細胞の  
脳移植ドナーとしての可能性に関する検討

慶應義塾大学医学部外科学教室脳神経外科

はやし たくろう  
林 拓郎

ABSTRACT

Feasibility of using proliferated neural stem cells of  
early embryonic neuroepithelial origin as donor cells for intracerebral grafting

*Takuro Hayashi, M.D.*

Department of Neurosurgery, School of Medicine, Keio University

The biological character of neuroepithelial stem cells (NESCs) was assessed *in vitro* and *in vivo* to confirm the feasibility of using them as donor cells for intracerebral grafting. All of the NESCs, which were derived from mesencephalic neural plates, were immunohistochemically positive for both nestin and fibroblast growth factor (FGF) receptor. Isolation and proliferation of NESCs was attempted from culture under various conditions. Neurospheres formed in medium containing FGF2, and NESCs were able to grow at a maximum proliferation rate of approximately 7.3 fold in seven days. The single cells derived from primary spheres differentiated into neurons that extended long neurites in two days and expressed several neurochemical markers, suggesting maturation of the cells, but hardly any glial cells were observed. The growth potential of the NESCs, however, subsequently diminished even in the medium containing FGF2, and NESCs derived from FGF2-responsive neurospheres after serial weekly passages tended to differentiate into glial cells more than into neurons. The NESCs proliferated in seven days with FGF2, which was transplanted into normal rat striata, also expressed nestin and TuJ1, but GFAP positive cells were hardly seen. These experimental results indicated that the neural stem cells were not always equal in their differentiation paths and that the features of neural stem cells could be changed with the duration of culture. NESCs could be proliferated with the addition of FGF2 with having preserved vigorous neuronal differentiation depending on the required amount at its maximum under FGF2 at the 7-day time point, suggesting that 7-day-old NESCs proliferated with FGF2 may be favorable donor cells for intracerebral grafting to restore damaged neuronal circuits in diseased brain.

**Key Words :** neural stem cell, neuroepithelium, intracerebral grafting, fibrillary growth factor 2, neuronal differentiation

---

緒 言

神経幹細胞は自己再生能と多分化能を有する細胞と定義され<sup>1,3)</sup>、中枢神経系を構成する神経細胞、グリア系細胞(星状細胞、希突起膠細胞)の元となる細胞である。これまで、損傷した神経回路網の修復に関して、神経幹細胞をドナーとして用いた多くの神経移植実験が諸施設により報告されてきた。これらの中で、成体型神経幹細胞は自家移植に関して量的にも倫理的にも問題点は少ないと考えられるが、神経細胞よりもグリア系細胞等に分化しやすいとの報告が散見され<sup>4,6)</sup>、神経回路網の再構築のためのドナーとしての臨床応用には困難と考えられる。神経幹細胞は発生初期から生体に至るまでのすべての年齢の脳に存在するものと理解されているが<sup>9,12)</sup>、近年、神経幹細胞は自己と同一の細胞を複製し続けているわけではなく、成長に伴って性格の異なる細胞を複製している可能性が示唆されている<sup>10)</sup>。すなわち、神経発生初期において神経幹細胞は神経上皮細胞として現れ神経細胞のみを産生し、その後、星状細胞、希突起膠細胞が産生されるようになり、中枢神経が形成されていると考えられる。我々は神経幹細胞による神経回路網を再構築するドナーとして、神経細胞に分化する発生初期の神経幹細胞すなわち神経上皮型幹細胞に着目し、初期胚中脳部神経板から得られた神経上皮型幹細胞につき *in vivo* および *in vitro* において検討をしてきた。これまで、我々は神経上皮型幹細胞の①旺盛な神経細胞への分化能、②旺盛な神経突起伸展能、③移植片と宿主間の旺盛な細胞移動能を証明してきた<sup>13-16)</sup>。このような特長を有する神経上皮型幹細胞を損傷部に移植すれば新たな神経回路網の再建を介して機能再生を達成できる可能性がある。しかしながら、この中脳部神経板からは少量の神経上皮型幹細胞しか得られず、移植ドナーとして応用するには実用的な問題が残されている。

本研究においては、以上の背景を踏まえ、神経上皮型幹細胞が脳移植ドナーとしての可能性を有するかを明らかにするため、①神経上皮型幹細胞の生物学的特長、特に分離し、増殖させられるかについて *in vitro* において検討した。②増殖させた神経上皮型幹細胞は旺盛な神経細胞への分化能を維持しているのか、移植ドナーとしての可能性を有するのか *in vitro* において検討した。③正常ラット線条体に FGF2 を添加して増殖した神経上皮型幹細胞を移植し、その組織片を免疫組織学的に検討した。

方 法

1 E10 ラット初期胚の抽出、中脳部神経板の分離

妊娠 10 日雌ウィスターラットを株式会社埼玉実験動物供給所より購入し使用した。十分に腹腔麻酔した妊娠 10 日ウィスターラットの子宮から胎生 10 日初期胚を抽出し、4% ゲンタマイシン入りの Phosphate-Buffered Saline (PBS, Gibco) に移した。5-15 の初期胚を N-2suppliment と 20 μg/ml インスリン入りの Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, 以上 Gibco) 内でよく洗浄した後、実体顕微鏡下 (Olympus) で頭部原基のみ切断し、0.5% トリプシン、0.25% パンクレアチン (以上 Gibco) 入り溶液内で 4℃, 15 分間反応させた。PBS でよく洗浄した後、頭部原基をトリプシンインヒビター (Boeringer-Mannheim) 内に移した。その後、Hank's buffer (Gibco) 内で実体顕微鏡下に mesenchyme 等の周辺組織を除去し中脳部神経板を分離した。

2 初期胚中脳部神経板の免疫組織学的検討

中脳部神経板における nestin, fibroblast growth factor receptor (FGFR), epithelial growth factor receptor (EGFR) の発現を免疫組織学的に検討した。E10 ラット初期胚をパラフィンで包埋した後、ミクロトームを用いて 4 μm の中脳部神経板の切片を作成した。切片は脱パラフィン後、一次抗体 (anti-nestin 抗体 (Rat 401), 1 : 10 ; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, anti-FGFR 抗体, 1 : 100 ; Santa Cruz, anti-EGFR 抗体, 1 : 2000 ; Sigma-Ardrich) と 4℃ で一晩反応させた。PBS で 6 回洗浄後二次抗体 (Alexa 568, 488) と反応させ PBS で 5 回洗浄した。

3 神経上皮型幹細胞の分離培養、継代培養

神経上皮型幹細胞を分離し、増殖させられるか培養系で検討した。中脳部神経板を解離 (dissociation) し、生存している細胞 (viable cell) を、① 3% FBS を含む medium (control), ② 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF, Upstate-Biotech) を含む medium, ③ 10 ng/ml fibroblast growth factor 2 (FGF2, Upstate-Biotech) + 2 μg/ml ヘパリン (Hoechst) を含む medium の 3 条件下で 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, humidified incubator 内で 7 日間培養した。細胞数は 10000 viable cells/ml (5000/well) とし、well との接着を防ぐため<sup>11)</sup>, poly(2-

hydroxy-ethylmethacrylate) (poly-HEME, Sigma-Aldrich) でコートした直径 35 mm-well plate (Iwaki) を用いた。

また、FGF2 添加培養 7 日後に得られた神経塊 (neurosphere) を dissociation した後、800x g, 5 分間遠心し、5000 viable cell を同様の FGF2 添加条件下でさらに 7 日間培養した。継代による FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の増殖能の相違を評価するため neurosphere を 7 日毎に同様に dissociation して 28 日後まで継代培養した。7 日毎に primary sphere (初代, Day7), secondary sphere (2 代, Day14), tertiary sphere (3 代, Day21), quaternary sphere (4 代, Day28) とし、dissociation 後、5000 viable cell を poly-HEME でコートした coverslip を敷いた 16 mm-well 内で上記と同様の incubator を用いて培養した。培養液は各継代時に半量交換した。

#### 4 神経上皮型幹細胞の増殖能

CellTiter 96 Aqueous assay with MTS tetrazolium (MTS: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]) (MTS アッセイ) を用いて、神経上皮型幹細胞の EGF と FGF2 に対する増殖能を定量化した。また、FGF2 を用いて継代しても増殖させられるか、継代時にも行った。5000 viable cell を poly-HEME でコートした 96-well plate (Iwaki) 内で 3 と同様に各条件で培養した。初代培養では Day 0, 1, 3, 7 で、FGF2 を添加した継代培養では継代と同日の Day 7 (primary sphere), 14 (secondary sphere), 21 (tertiary sphere), 28 (quaternary sphere) に測定した。測定時に 20  $\mu$ l MTS 溶液を各 well に加え、上記と同様の incubator 内で 1 時間さらに培養した後、490 nm での吸光度を測定した。

#### 5 FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の免疫組織学的検討

FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の nestin の発現について評価するため、免疫組織学的検討を行った。

Day 7, 14, 21, 28 に得られた各 neurosphere を室温で 4% パラホルムアルデヒド用いて 20 分間固定し、0.1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) を添加した PBS で 5 分間ずつ 4 回洗浄した。5% BSA/PBS-Triton X で 37°C, 30 分間ブロックした後、一次抗体 (1:10 anti-nestin 抗体) と 4°C で一晩反応させた。0.1% BSA/PBS で 6 回洗浄後、二次抗体 (Alexa 488; Molecular Probe) と反応させ、PBS で 5 回洗浄した。

また、FGF2 反応性神経上皮型幹細胞は FGF2 存在下で神経細胞への分化能を維持できるか検討するため分散培養を行い、免疫組織学的検討を加えた。Day 0 の神経板 (control) および Day 7 (primary), 14 (secondary), 21 (tertiary), 28 (quaternary) に得られた各 neurosphere を dissociation し、5000 viable cell を 3% FBS 添加して培養した。上記と同様の poly-HEME でコートした coverslip を敷いた 16 mm-well と incubator を用いた。2 日後、coverslip を上記と同様に免疫組織染色を施した。一次抗体は anti-TuJ1 ( $\beta$ tubulin-III) 抗体 (1:500; Babco), anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (1:400; Sigma-aldrich), 二次抗体は Alexa 488, 568 (Molecular Probe) を用いた。1 coverslip で無作為に選んだ 5 視野の TuJ1 陽性細胞と GFAP 陽性細胞数の比率を算出した。

さらに Day 7 の FGF2 反応性神経上皮型幹細胞では、分化によって得られた神経細胞の種類 (phenotype) を免疫組織学的に検討した。Day 0 の中脳脳部神経板 (control) と Day 7 の primary sphere を dissociation し、上記と同様に、PLL コートした well で培養した。2 日後 coverslip を上記と同様に免疫組織染色を加えた。一次抗体は anti-TuJ1 抗体と各 neurochemical marker (1:1000 anti-glutamate 抗体; Sigma-Aldrich, 1:1000 anti- $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 抗体; Sigma-Aldrich, 1:500 anti-tyrosine hydroxylase (TH) 抗体; Sigma-Aldrich, 1:100 anti-choline acetyl transferase (ChAT) 抗体; Diasorin), 二次抗体は Alexa 488 と 568 を用いた。1 coverslip で無作為に選んだ 5 視野の TuJ1 陽性細胞の合計数に対する TuJ1/neurochemical marker の二重陽性 (double-positive) 細胞の合計数の比率を算出し、control と Day7 で比較した。

#### 6 FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の移植片の免疫組織学的検討

FGF2 反応性神経上皮型幹細胞が移植環境において *in vivo* と同様に旺盛な神経細胞への分化能を有するか *in vitro* で検討した。Day 7 に得られた FGF2 反応性 primary sphere を dissociation し 30  $\times$  10<sup>8</sup> viable cell を、8 週齢雄ウィスターラット (株式会社埼玉実験動物供給所より購入) の右線条体に定位的に移植した。移植 7 日後に移植脳を摘出し、パラフィン包埋した後、ミクロトームを用いて 5  $\mu$ m の切片を作成し、脱パラフィン後、hematoxylin and eosin (H&E) 染色した。また別の切片は室温でメタノール (0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含む) と 20 分

間反応させた後、一次抗体 (anti-nestin 抗体, anti-TuJ1 抗体, anti-GFAP 抗体) と 4℃で 16 時間反応させた。室温で biotinylated anti-mouse IgG (1:200; Amersham) と 5 回反応させ、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Muto Pure Chemicals) で発色した。隣接切片を用いて検討した。

## 7 統計学的手法

データは平均±標準偏差で表記し、群間の差を評価するにあたり post-hoc テストを用いた多重比較を行った。危険率が 0.01 未満のものを統計学的に有意とした。

## 結 果

### 1 E10 ラット中脳胞部神経板の nestin, FGFR の発現

E10 ラット中脳胞部神経板の切片標本では同様に nestin 陽性細胞から成るが、これらの細胞は FGFR 陽性でもあった。EGFR 陽性細胞は明らかには認められなかった (第1図)。

### 2 神経上皮型幹細胞の分離, 増殖, 神経細胞への分化能

MTS アッセイによれば、Day 1 ではいずれの条件でも増殖しており、有意差は認めなかったが (control; n=13, EGF; n=12, FGF2; n=11) ( $p>0.01$ )、Day 3 では FGF 添加群において細胞の増殖効果は他の 2 群に比べ有意差を認めた (control; n=17, EGF; n=10, FGF2; n=11) ( $p<0.01$ )。Day 7 では FGF2 添加群では Day 0 の 7.3 倍に細胞を増殖させることが可能であり、この群でのみ neurosphere の形成も認めた (control; n=16, EGF; n=10, FGF2; n=12) ( $p<0.01$ ) (第2図A)。神経上皮型幹細胞は Day1 までは成長因子に依存せず増殖するが、その後は FGF2 添加により増殖させることが可能と考えられた。FGF2 添加による継代培養では継代毎に増殖できるが、その細胞の増殖効果は低下した (各継代とも n=24) (第2図B)。FGF2 のみの添加では継代により神経上皮型幹細胞の自己増殖能は維持されないと考えられた。

Day7 において得られた primary sphere を構成する多くの細胞が nestin 陽性であった。分化させた際には多くの TuJ1 陽性細胞を認め、GFAP 陽性細胞は観察されず、control も同様の結果であったことから Day7 までは旺盛な神経細胞への分化能を維持していると考えられた。継代により neurosphere の形成は認められたが、形成された neurosphere での nestin 陽性細胞の発現は次第に低下し、分化後は GFAP 陽性細胞が増加し

た。quinternary sphere では TuJ1 陽性細胞はほとんど観察されなかった (第3図)。各 sphere の TuJ1 陽性細胞:GFAP 陽性細胞比は secondary で 52.8:47.2 (n=6), tertiary では 3.3:96.7 (n=6), quinternary sphere では、1.1:98.9 (n=9) となり (第4図)、FGF2 のみでは神経上皮型幹細胞の分化を長期間制御する効果はないと考えられた。

### 3 FGF 反応性神経上皮型幹細胞由来神経細胞の phenotype

Day 7 に得られた FGF2 反応性神経上皮型幹細胞を分化させると多くの TuJ1 陽性細胞が得られた (前項)。この TuJ1 陽性神経細胞の neurochemical marker の発現を免疫組織学的に検討した。glutamate (第5図A-C), GABA (第5図D-F), TH (第5図G-I) を発現していたが、ChAT の発現は認められなかった (第5図J-L)。TuJ1 陽性細胞に対する比率は glutamate/TuJ1 double-positive cell は  $79.9\pm 1.83\%$  (n=6), GABA/TuJ1 double-positive cell は  $12.4\pm 1.94\%$  (n=7), TH/TuJ1 double-positive cell は  $1.3\pm 0.27\%$  (n=5) であった。control では glutamate/TuJ1 double-positive cell は  $75.1\pm 4.66\%$  (n=6), GABA/TuJ1 double-positive cell は  $9.93\pm 1.41\%$  (n=6), TH/TuJ1 double-positive cell は  $1.41\pm 0.69\%$  (n=5) であり、両者とも ChAT/TuJ1 double-positive cell は明らかには観察されなかった (各 n=6)。control と Day 7 に得られた FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の neurochemical marker の発現に有意差は認められず ( $p>0.01$ ) (第1表)、増殖した FGF2 反応性神経上皮型幹細胞は成熟した神経細胞に分化したと考えられた。

### 4 FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の移植環境における免疫組織学的検討

ホストの線条体には HE 染色では明らかな壊死像は認められず移植片は生着していると考えられた。免疫組織染色では移植片には nestin および TuJ1 陽性細胞が多く認められた。ホスト組織に比し、移植片内の GFAP 陽性細胞はわずかであり (第6図)、Day 7 での FGF 反応性神経上皮型幹細胞は移植環境においても旺盛な神経細胞への分化能を維持していると考えられた。

## 考 察

多分化能と自己複製能を有すると考えられる神経幹細胞<sup>3)</sup>は、近年では神経系の発達段階によって神経幹細胞

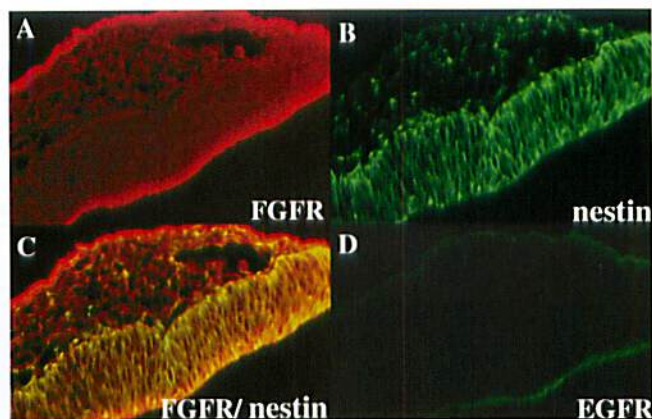


図1 胎生10日ラット初期胚中脳細胞神経板の nestin, FGFR, EGFR の抗体を用いた免疫染色像 (パラフィン切片). 抗 nestin 抗体, 抗 FGFR 抗体に陽性であったが, 抗 EGFR 抗体に明らかに陽性な細胞は認められなかった. A, 抗 nestin 抗体, B, 抗 FGFR 抗体, C, 抗 nestin 抗体, 抗 FGFR 抗体の二重染色, D, 抗 EGFR 抗体

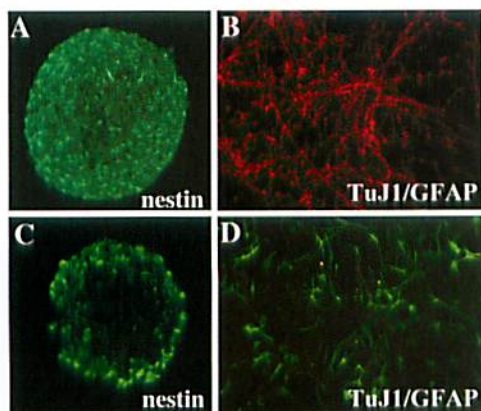


図3 継代して得られた neurosphere を免疫組織学的に検討した. Primary sphere は抗 nestin 抗体に陽性細胞から構成されていたが, その発現は継代により低下した. また, 分化培養の TuJ1 と GFAP の免疫染色では, 培養後 Day7 であれば TuJ1 陽性細胞のみ認められたが, Day28 では GFAP 陽性細胞が大多数であった. A, Day7 に得られた primary neurosphere の抗 nestin 抗体染色像, B, primary neurosphere の分化培養後の TuJ1 (緑) /GFAP (赤) 二重染色像, C Day28 に得られた quinternary neurosphere の抗 nestin 抗体染色像, D, quinternary neurosphere の分化培養後の TuJ1 (緑) /GFAP (赤) 二重染色像

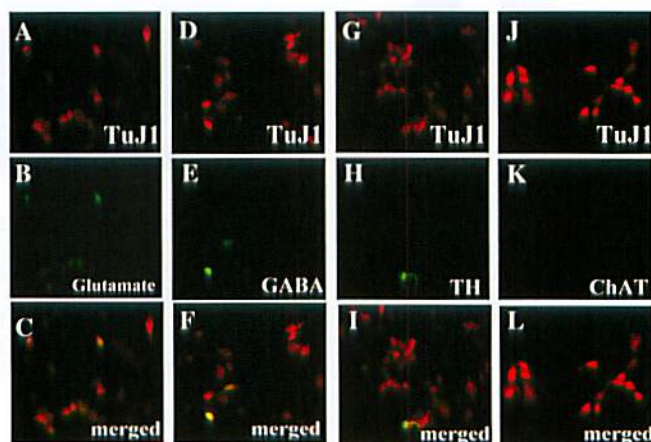


図5 増殖後 Day7 の FGF2 反応性神経上皮型幹細胞が分化して得られた神経細胞を各 neurochemical marker で免疫組織学的に検討した. Glutamate, GABA, TH の各抗体に陽性細胞を認め, 成熟した神経細胞へ分化したと考えられた. 抗 ChAT 抗体陽性細胞は明らかに認められなかった. A-C, 抗 TuJ1 抗体 (緑) と抗 glutamate 抗体 (赤), 二重染色像, D-F, 抗 TuJ1 抗体 (緑) と抗 GABA 抗体 (赤), 二重染色像, G-I, 抗 TuJ1 抗体 (緑) と抗 TH 抗体 (赤), 二重染色像, J-L, 抗 TuJ1 抗体 (緑) と抗 ChAT 抗体 (赤), 二重染色像

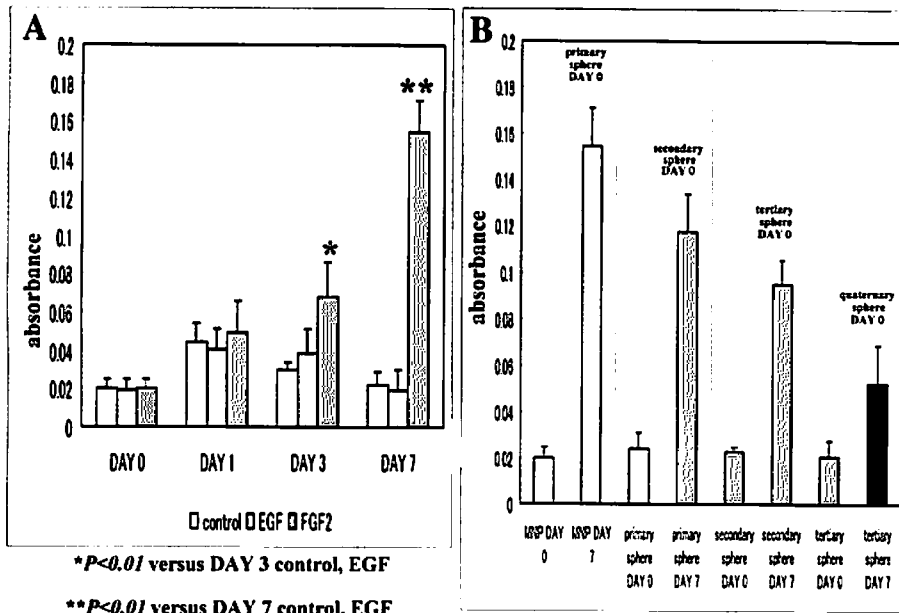


図2 神経上皮型幹細胞の増殖能について MTS アッセイを用いて検討した。Day1 までは神経上皮型幹細胞は成長因子に非依存性に増殖したが、Day3 以降は FGF2 添加群の方が他の 2 群に対して細胞増殖に有意差を認めた。しかし、継代培養では FGF2 添加をしても細胞の増殖効果は低下していた。A、初代浮遊培養の MTS アッセイ、B、継代培養での MTS アッセイ (MNP: 中脳脳部神経板の初代培養、各 Day 7 は次の Day0 と同じものを意味する)

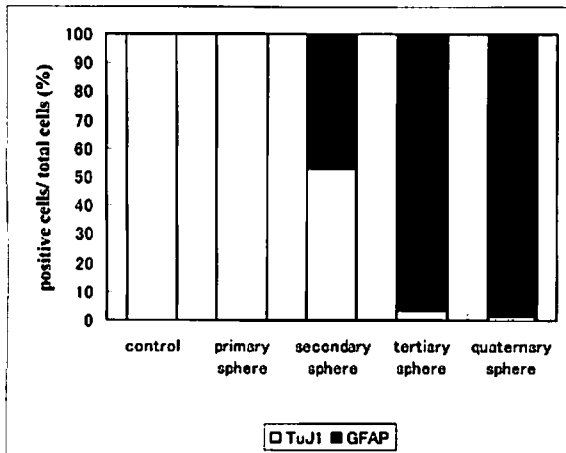


図4 神経上皮型幹細胞と増殖した神経上皮型幹細胞の分化培養での TuJ1 および GFAP 陽性細胞の比率を算出した。Day7 の FGF2 反応性神経上皮型幹細胞は control と同様に旺盛な神経細胞への分化能を維持していたが、継代につれてグリア系細胞への分化能を獲得した。

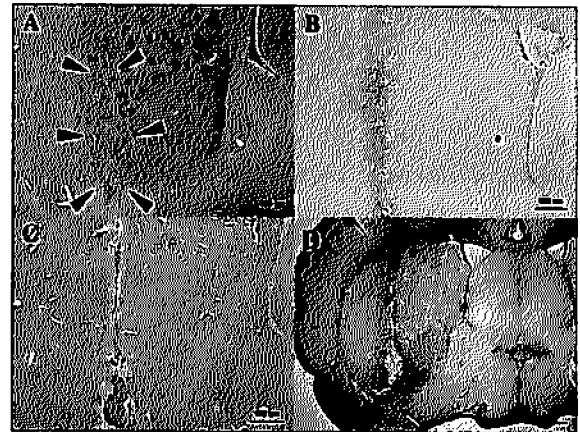


図6 増殖後 Day7 の FGF2 反応性神経上皮型幹細胞を正常脳へ移植し、組織片を検討した。移植片のホスト脳との生着は良好であり、移植片は抗 nestin 抗体、抗 TuJ1 抗体に陽性であり、抗 GFAP 陽性細胞に乏しかった。A、HE 染色 (arrowhead で囲まれた部分が移植片)、B、抗 nestin 抗体の免疫組織染色像、C、抗 TuJ1 抗体の免疫組織染色像、D、抗 GFAP 抗体の免疫組織染色像

胞の生物学的特長は異なり、比較的発生初期段階に得られた神経幹細胞はグリア系細胞よりも神経細胞に分化する傾向にある<sup>9, 10, 12, 20)</sup>と提唱されている。我々は神経細胞への旺盛な分化能を有するドナー細胞こそ損傷した神経回路網を再構築するにはふさわしいと考えている。そ

こで中脳脳部神経板由来の神経上皮型幹細胞の移植ドナーとしての有用性に注目し、これまでその旺盛な神経分化能に関して検討してきた。本研究では移植ドナーとしての有用性に関して検討するため、培養系において分離し、増殖させることが可能であるか、移植環境ではどのよう

表 1

|                       | Glutamate/TuJ1   | GABA/TuJ1        | TH/TuJ1          | ChAT/TuJ1 |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|-----------|
| Day0 control          | 75.1±4.66% (n=6) | 9.93±1.41% (n=6) | 1.41±0.69% (n=5) | 0 (n=6)   |
| Day7 FGF2 反応性神経上皮型幹細胞 | 79.9±1.83% (n=6) | 12.4±1.94% (n=7) | 1.3±0.27% (n=5)  | 0 (n=6)   |

な挙動を示すか考察した。

まず、中脳脳部神経板由来神経上皮型幹細胞の特有の生物学的特徴を評価するため、成長因子受容体 (receptor) の発現や成長因子への反応について免疫組織学的に検討した。諸家の報告によれば FGF2 や EGF の存在下に様々な発生段階において神経幹細胞を分離できるとされ<sup>21-24)</sup>、また、発生初期段階でも FGFR のみを発現しているため FGF2 のみの存在下で未分化なドナーソースから neurosphere として神経幹細胞が得られると報告されている<sup>25, 26)</sup>。本研究でも中脳脳部神経板を構成する細胞は抗 nestin 抗体および抗 FGFR 抗体に陽性であり、EGFR 抗体の発現は認めなかった。神経板の培養では control 群、EGF 添加群では著明な神経突起の伸展を認めたが、FGF2 添加群では突起の伸展は明らかに認められず、neurosphere の形成が認められた。したがって、神経上皮型幹細胞は FGF2 により分離できる可能性があるとともに未分化のまま増殖できる可能性も考えられた。この結果を踏まえ、神経上皮型幹細胞の分散培養を行ったが、同様に FGF2 添加群のみに著明な細胞増殖が認められ、MTS アッセイによれば FGF2 無添加に比して 7.3 倍まで増殖させることが可能であった。FGF は濃度や Notch pathway, tau の発現などある特定のメカニズムにより神経分化を制御しているとの報告があり<sup>23, 27-30)</sup>、本研究でも同様に FGF2 は中枢神経系の発生初期段階において神経細胞への分化を抑制し、自己複製能を加速させる重要な役割を持つことが示唆された。遺伝子の発現や神経成長因子の相互関係など他の因子も幹細胞の分化に関与しており<sup>11, 31-37)</sup>、神経上皮型幹細胞の分化制御を解明することが重要である。一方で control 群や EGF 添加群でも Day 1 までは増殖を認めており、神経上皮型幹細胞は自律的な自己複製能を有することも示唆された。したがって、神経上皮型幹細胞は成長因子に非依存性に分裂し、培養系でも増殖や性質の維持が可能なため、遺伝子操作などの人為的修飾が比較的容易とも考えられる<sup>18)</sup>。

次に増殖した FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の分化能が年齢に相関しているか検討するため、神経上皮型幹細胞を FGF2 の存在下でさまざまな期間、継代培養を

行った。FGF2 添加により neurosphere は各培養で繰り返し形成され、neurosphere を構成する細胞は免疫組織学的に nestin 陽性であった。さらに FGF2 を添加することで神経上皮型幹細胞数を増殖させることが可能であり、その神経細胞への分化傾向は primary sphere の分散培養で維持されていることも分かった。しかしながら、継代により sphere の nestin 陽性細胞数や神経上皮型幹細胞の FGF2 による増殖効果は徐々に低下し、グリア系細胞への分化傾向が発現されるようになった。FGF2 反応性神経上皮型幹細胞は遅くとも培養開始 14 日後にはグリア系細胞への分化能を獲得すると考えられ、さらに 28 日後にはほとんどの神経上皮型幹細胞はグリア系細胞へ分化した。このことは神経上皮型幹細胞の神経細胞への分化能は FGF2 存在下では少なくとも 7 日間で最大になり、その後グリア系細胞への分化能を獲得するというを示唆している。Qian らは E10 マウスの初期神経管から得られた幹細胞の時間経過を検討した結果、皮質の発達のタイミングにおける神経幹細胞の役割を提唱している<sup>10)</sup>。彼らの仮説によれば、初期の胎生幹細胞は非対称性分裂をしており、神経細胞への分化能は減衰し、ある switch-point を過ぎると幹細胞はグリア系の細胞へと分化してゆく。この仮説は、本研究にもあてはまり、本研究で用いた神経上皮型幹細胞は *in situ* での中枢神経系の発達に類似しており、internal biological time clock を *in vitro* で反映しているとも解釈できる。かつてはすべての神経幹細胞が、神経細胞とグリア系細胞に分化する多分化能と自己複製能を有する幹細胞として同一の範疇に分類されていたが、本研究では神経幹細胞は発達段階においてすべてが同一とは限らないと考えられた。神経幹細胞の特長は年齢により変化し、神経上皮由来のより初期の幹細胞ほど胎仔型あるいは成体型神経幹細胞よりも神経細胞へ分化する能力を有する可能性が示唆された。

我々の *in vivo* における電子顕微鏡を用いた検討では神経上皮型幹細胞からなる中脳脳部神経板は移植環境においてホストとシナプスを形成することが証明されており<sup>17)</sup>、また別の検討でも虚血モデルラットにこの神経板を移植し機能回復を認めた<sup>19)</sup>。最近の知見においてはブ



タの神経上皮型幹細胞をパーキンソン病モデルラットの線条体に移植し、髄鞘化された軸索の形成やドナー由来の未分化な神経細胞と求心性/遠心性シナプスの形成、TH陽性ドナー細胞を確認した<sup>38)</sup>。これらの電子顕微鏡による解剖学的な検討および免疫組織学的な検討の結果は、異種間移植ドナーとしての神経上皮型幹細胞の将来的な有用性を示唆している。しかし、ヒトのような大きな脳では損傷した神経回路網の再建には多くの神経上皮幹細胞が必要であり、充分量の神経上皮型幹細胞を確保しなければならない。しかし、本研究で示したようにFGF2で少量の神経上皮型幹細胞を増殖させることで充分量を確保することが可能となる。神経幹細胞のパーキンソン病モデルラットへの移植実験で、移植ドナー細胞がTH陽性の神経細胞に分化し、機能回復も認めたとの報告が散見される<sup>39-42)</sup>。本研究では正常ラットへの移植実験ではあるが、神経上皮型幹細胞は宿主脳に生着しており、多くのnestinおよびTuJ1陽性細胞が移植片内に認められるが、一方GFAP陽性細胞は明らかに認められない。我々の別の検討においても、移植2および4週間後でも、増殖した神経上皮型幹細胞は依然として神経細胞への分化能を維持しており<sup>43)</sup>、これらの結果は、FGF2により増殖した神経上皮型幹細胞も移植環境においても旺盛な神経細胞への分化能を有することを示唆している。さらに、Day7のFGF2反応性神経上皮型幹細胞は、神経細胞に分化するとneurochemical markerを発現することも分かった。我々の最近の知見ではこの神経細胞はパッチクランプ法を用いた電気生理学的な検討において活動電位を発生しており<sup>44)</sup>、この細胞は成熟した神経細胞に自発的に分化すると考えられた。長期間の免疫組織学的検討や疾患モデルホストの機能回復の評価などさらなる検討は必要であるが、胎仔型および成体型神経幹細胞とは異なり、神経上皮型幹細胞は少なくともFGF2添加7日後までなら旺盛な神経細胞への分化能を維持したまま増殖させることが可能であり、少量ではありながら損傷した神経回路網を再構築するための移植ドナー細胞として応用され得る可能性を有すると考えられた。

## 総括

神経上皮型幹細胞の神経移植ドナーとしての可能性について明らかにするため、*in vivo*、*in vitro*において、ラット初期胚中脳胞部神経板から得られた神経上皮型幹細胞を検討し、以下の結果が得られた。

1. 神経上皮型幹細胞はFGF2を添加することによ

り、増殖させることが可能であった。

2. FGF2反応性神経上皮型幹細胞は少なくとも増殖後7日以内であれば旺盛な神経細胞への分化能を維持しており、自発的にneurochemical markerを発現する神経細胞に分化した。

3. 正常宿主脳ではあるが、移植環境においても増殖7日後のFGF2反応性神経上皮型幹細胞は神経細胞への分化能を維持していた。

以上の結果より、神経上皮型幹細胞は、神経細胞への分化能を維持したまま増殖させることが可能であり、移植環境でもその性質を維持しているという質的、量的な面から考えて、損傷した神経回路網の再構築のための移植ドナーとして可能性を有することが示唆された。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部外科学教室河瀬斌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外科学教室内田耕一講師に感謝いたします。

なお、本研究の一部は第61回日本脳神経外科学会総会(2002年、松本)、第2回日本再生医療学会総会(2003年、神戸)において発表した。

## 文献

- 1) Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25-34, 1999
- 2) Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines W A, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D: Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13: 1071-1082, 1994
- 3) Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S: A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12: 4565-4574, 1992
- 4) Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN: Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 19: 475-479, 2001
- 5) Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi A: Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16: 1091-1100, 1996
- 6) Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG,

- Vescovi AL : Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 15 : 437-445, 2002
- 7) Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH : Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19 : 8487-8497, 1999
  - 8) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M : Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 172 : 115-127, 2001
  - 9) Lillien L, Raphael H : BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Development* 127 : 4993-5005, 2000
  - 10) Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S : Timing of CNS cell generation : a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28 : 69-80, 2000
  - 11) Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M : Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126 : 443-456, 1999
  - 12) Zhu G, Mehler MF, Mabie PC, Kessler JA : Developmental changes in progenitor cell responsiveness to cytokines. *J Neurosci Res* 5 : , 131-145, 1999
  - 13) Fukunaga A, Uchida K, Hara K, Kuroshima Y, Kawase T : Differentiation and angiogenesis of central nervous system stem cells implanted with mesenchyme into ischemic rat brain. *Cell Transplant* 8 : 435-441, 1999
  - 14) Hara K, Uchida K, Fukunaga A, Toya S, Kawase T : Implantation of xenogeneic transgenic neural plate tissues into parkinsonian rat brain. *Cell Transplant* 6 : 515-519, 1997
  - 15) Hara K, Uchida K, Fukunaga A, Kuroshima Y, Yamada M, Kawase T : Neurite growth capability of rat fetal neuronal cells against matured CNS myelin *in vitro*. *Cell Transplant* 9 : 717-724, 2000
  - 16) Hayashi T, Uchida K, Mine Y, Yamada M, Kawase T : Feasibility of using early mesencephalic neural plate for intracerebral grafting. *Cell Transplant* 11 : 465-470, 2002
  - 17) Uchida K, Kawaja MD, Toya S, Roach AH : Transgenic neural plate contributes neuronal cells that survive greater than one year when transplanted into the adult mouse central nervous system. *Exp Neurol* 132 : 194-208, 1995
  - 18) Uchida K, Toya S : Grafting of genetically manipulated cells into adult brain : toward graft-gene therapy. *Keio J Med* 45 : 81-89, 1996
  - 19) Uchida K, Roach AH, Kawaja MD, Toya S : Successful survival of grafted transgenic neural plate cells in adult central nervous system environment. *Cell Mol Neurobiol* 19 : 79-86, 1999
  - 20) Tropepe V, Sibilio M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D : Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 208 : 166-188, 1999
  - 21) Gage FH : Mammalian neural stem cells. *Science* 287 : 1433-1438, 2000
  - 22) Martens DJ, Tropepe V, van Der Kooy D : Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J Neurosci* 20 : 1085-1095, 2000
  - 23) Quinn SM, Walters WM, Vescovi AL, Whittemore SR : Lineage restriction of neuroepithelial precursor cells from fetal human spinal cord. *J Neurosci Res* 57 : 590-602, 1999
  - 24) Ray J, Gage FH : Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 14 : 3548-3564, 1994
  - 25) Cai J, Wu Y, Mirua T, Pierce JL, Lucero MT, Albertine KH, Spangrude GJ, Rao MS : Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Dev Biol* 251 : 221-240, 2002
  - 26) Kalyani AJ, Mujtaba T, Rao MS : Expression of EGF receptor and FGF receptor isoforms during neuroepithelial stem cell differentiation. *J Neurobiol* 38 : 207-224, 1999
  - 27) Bartlett PF, Brooker GJ, Faux CH, Dutton R, Murphy M, Turnley A, Kilpatrick TJ : Regulation of neural stem cell differentiation in the forebrain. *Immunol Cell Biol* 7 : 414-418, 1998
  - 28) Faux CH, Turnley AM, Epa R, Cappai R, Bartlett PF : Interactions between fibroblast growth factors and Notch regulate neuronal differentiation. *J Neurosci* 21 : 5587-5596, 2001
  - 29) Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S : FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18 : 81-93, 1997
  - 30) Tatebayashi Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I : Dynamic regulation of expression and phosphorylation of tau by fibroblast growth factor-2 in neural progenitor cells from adult rat hippocampus. *J Neurosci* 19 : 5245-5254, 1999
  - 31) Arsenijevic Y, Weiss S, Schneider B, Aebischer P : Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* 15 : 7194-7202, 2001
  - 32) Chevet E, Lemaitre G, Janjic N, Barritault D, Bikfalvi A, Katinka MD : Fibroblast growth factor receptors participate in the control of mitogen-activated protein kinase activity during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol*

- Chem 274 : 20901-20908, 1999
- 33) Hossain WA, Brumwell CL, Morest DK : Sequential interactions of fibroblast growth factor-2, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and their receptors define critical periods in the development of cochlear ganglion cells. *Exp Neurol* 175 : 138-151, 2002
- 34) Li W, LoTurco JJ : Noggin is a negative regulator of neuronal differentiation in developing neocortex. *Dev Neurosci* 22 : 68-73, 2000
- 35) Santa-Olalla J, Baizabal JM, Fregoso M, del Carmen Cardenas M, Covarrubias L : The *in vivo* positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. *Eur J Neurosci* 18 : 1073-84, 2003
- 36) Takahashi J, Palmer TD, Gage FH : Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 38 : 65-81, 1999
- 37) Wislet-Gendebien S, Bruyere F, Hans G, Leprince P, Moonen G, Rogister B : Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. *BMC Neurosci* 5 : 33, 2004
- 38) Uchida K, Okano H, Hayashi T, Mine Y, Tanioka Y, Nomura T, Kawase T : Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons. *J Neurosci Res* 72 : 661-669, 2003
- 39) Baker KA, Hong M, Sadi D, Mendez I : Intrastriatal and intranigral grafting of hNT neurons in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 162 : 350-360, 2000
- 40) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S : Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344 : 710-719, 2001
- 41) Sanchez-Pernaute R, Studer L, Ferrari D, Perrier A, Lee H, Vinuela A, Isacson O : Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (cyno-1) after transplantation. *Stem Cells* 23 : 914-922, 2005
- 42) Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Itakura T, Okano H : Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci* 21 : 3895-3903, 2001
- 43) Yamada M, Uchida K, Hayashi T, Mine Y, Kawase T : Vigorous neuronal differentiation of amplified and grafted basic fibroblast growth factor-responsive neurospheres derived from neuroepithelial stem cells. *Cell Transplant* 13 : 421-428, 2004
- 44) Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuzaki M, Koizumi A, Mine Y, Kawase T : Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin. *Neurosci Res* 52 : 276-286, 2005

## ER：新しい救急医療の形態

昭和38年（1963年）の救急搬送義務化以来、わが国の救急医療体制は3次救急を中心として官主導のトップダウンの形で整備されてきたが、一般の救急病院の実際は1次～3次救急という単純な階層化では的確に捉えることが難しい。たとえば急性心筋梗塞、急性大動脈解離などの循環器緊急症は寸刻を争う最重症の病態でありながら3次救急医療機関である救命救急センターが常に対応できるとは限らず、逆に2次救急病院であっても対応可能な場合が多い。

また近年の急激な救急患者増加の主因は軽症患者の増加であり、救命救急センターでの治療の適応となる、いわゆる「3次救急患者」の数には大きな変化はない。このため2次救急病院が中心となって増え続ける軽症～中等症の救急患者に対応してゆくことが時代の要請となり、一般病院において少数の人員で運営可能なER型救急医療が、限られた医療資源を有効に活用する救急医療体制の一選択肢であると認識されつつある。

### ER型救急医療とは

わが国の多くの救命救急センターは重症救急患者を主な対象として診断、初期治療だけでなく、入院後の専門治療をも担当し、自己完結的な診療を行っている。こうした診療形態は、重症患者の集中治療を目的として人員と設備が充実した救命救急センターでこそ可能であるといえよう。しかし一般の病院においては救急部門の専属スタッフはいまだ極めて少数、もしくは皆無であって、救命救急センターの様に救急患者の診療の全過程を救急部門だけで自己完結的に担当することは事実上不可能である。

救命救急センターに代表される自己完結型救急医療に対し、米国、カナダなど北アメリカにおける救急医療はER型（部署として呼称する場合はED：Emergency Department）と通称され、米国のドラマ「ER」に見られるように、救急部門は救急患者の診断と初期治療のみに特化した機能を果たしている。すなわちER（型救急部）の医師は原則的に入院患者を持たず、診療方針が決定した患者は必要に応じ専門各科に診療を引き継いでゆく。この様なER型救急医療はわが国においても従来の自己完結型救急医療の対極にある診療形態として次第に認知されつつある。

ER型救急医療は従来の医療に見られる臓器別や軽症/重症といった病態の縦割り区分でなく、時系列に沿った横割り区分の中で、診断・初期治療という医療の先頭部分を担当する方式であるため1次、2次、3次といった旧来の救急医療区分にはなじまない側面がある。ERの使命は重症・軽症に関わらず、どんな救急患者でも診療し、臨床各科による専門治療につなげてゆくことであるといえよう。

### ER型救急医療の特徴

ER型救急医療と救命救急センターに代表される自己完結型救急医療を比較するとそれぞれに長所短所があるが、ER型の特徴としては以下の様な点があげられる。

- 診断、初期治療と専門医への診療引き継ぎが主な職務で、入院患者を原則として持たないため、少人数のスタッフで救急部門の運営が可能である。反面、ERの救急医は同時に複数の患者を診療し、重症度を判定して適切に専門医による治療へ移行する能力を求められる。
- 疾患の重症度を問わず原則的にどのような病態にも対応するため、患者数（特に軽症者）が多くなる。またERの患者の大多数は内因性疾患であり、外傷、中毒など外因性の病態が多い救命救急センターとは疾病構造に際立った差が見られる。
- 患者診療を的確に引き継ぐことができれば、その後の治療は各科の専門医が行うため、全体として高い医療水準を維持することが可能である。
- ER型救急医療は救急部門と臨床各科の連携の上に成り立つものであるため、救急部門から診療依頼された専門各科がスムーズに患者を受け入れる体制が整備されていなければならない。専門医のオンコール体制などについては院内で十分なコンセンサスがなくてはならず、病院指導部がイニシアチブをとって制度の運用を保証する必要がある。
- ER型救急医療は単一の臨床科で対応可能な病態には有効に機能するが、重症多発外傷など同時に複数科の診療を要する病態への対応に限界がある。わが国では外傷を専門に扱う臨床科が存在しないため、多発外傷患者を一科で診療することは難しく、救命救急センターがその機能を担っているといえる。
- ER型救急医療機関では重篤な病態だけでなく多数のcommon diseasesを診療しプライマリ・ケアを行っ

ている。このことは新臨床研修医制度において一般病院のERが良い初期研修の場を提供できることを示しており、3次救急病院以外でも救急医療の研修が十分可能であることを示唆する。

### ER型救急医療の展望

わが国においてER型救急医療はまだ一般的であるとは言いきく、外来診療への特化やシフト制など他科の医師には理解を得にくい勤務体制とあいまって、いまだにER救急医に対する偏見が見られる。こうした中でER型救急医療を実践してゆくためには、病院指導部のリーダーシップによる組織的なバックアップとともに、各科専門医と同等のER型救急医のアイデンティティ確立が重要である。

現在ERの現場では救急医が極端に不足しており、今後優秀な人材を養成してゆくためには教育制度を充実させてゆかなければならない。現在日本救急医学会では特別委員会が後期臨床研修プログラム整備に取り組んでおり、近い将来ER型救急医を目指す若い医師の教育の規範となると期待される。

「救急医療は肉体的にも精神的にも過酷な労働である」というのが社会的な通念となっているが、個人の「頑張り」や「根性」に期待する医療制度はいたずらに若い力を燃え尽きさせ、制度として早晚破綻することは避けられない。理想的なERの体制とはスタッフのモチベーションのいかによらず一定したレベルの診療を保証するシステムであり、人員、施設の充実とともにシフト制による過剰労働の回避などスタッフの労働環境の整備が重要である。このためには3次救急医療に偏りがちな社会の注目をERに向けさせて環境を改善してゆくことが必要で、今後ERを労働集約的な救命救急センターとは対照的な救急医療のあり方として位置づけてゆくことが可能になると思われる。

芳賀佳之(さいたま市立病院救急科)

## 経皮内視鏡的胃瘻造設術 (PEG: percutaneous endoscopic gastrostomy)の貢献と課題

経皮内視鏡的胃瘻造設術(percutaneous endoscopic gastrostomy)は既にPEG(ペグ)とも親しく呼ばれるほど普及している。1980年内視鏡外科医Gaudereと小児外科医Ponskyにより開発され、開腹せずに内視鏡を用いての胃瘻造設法で、生後6ヶ月の神経障害をもつ小児患者で最初に報告された。手技的な簡便さ、造

設術後早期より経管栄養が開始できる点から欧米では当初より、わが国でも1995年頃から急速に普及し、介護保険導入に伴う在宅療養推進といった社会的背景も加わり現在では年間10万件を超えているといわれる。原法のpull法の他にpush法、introducer法といった手技の改良や感染防止キットなど合併症対策の関連器具の開発もあり、より安全に実施できるようになっている。

北里研究所病院では平成7年に導入し、当初は年間2-3件だったものが年々増加し平成17年には20数件/年となり累計100例を超えた。今後も増加が予想されるが、対象患者が多い他の救命救急施設や療養型施設ではさらに多くの件数が実施されている。

PEGのこのような件数の急増に伴って医療現場にもたらした恩恵と同時に課題も論じられるようになった。

まずPEGの普及の要因として何よりもその手技と術後管理の簡便さが挙げられる。経口摂取困難な患者での栄養確保の方法の選択肢としてまず、経静脈的に行うか、経消化管的に行うかである。前者では十分な栄養確保のためには中心静脈カテーテル留置が必要で、刺入部や連結部の感染対策、刺入部の縫糸の管理には細心の注意が求められるとともに、生理的な経消化管的補給に比べ消化管粘膜の萎縮に伴う局所免疫能低下なども指摘されている。後者においても経鼻チューブでは胃食道逆流や鼻や胃の粘膜傷害をおこしやすいと同時に患者、家族への精神的、肉体的負担となり、さらに自己抜去の危険性もある。胃瘻造設術に関して従来は開腹下に行っていたが、目的が栄養確保という点を考えるとその手技の簡便さでPEGが圧倒的に優位である。

PEGは手技が簡便だけでなく術後1~2日で栄養剤が投与でき、嚥下リハビリテーションへのスムーズな移行が報告されている。また昨今行政面からも推進されている在宅医療推進による入院期間の短縮、ひいては医療費減少といった経済的効果も指摘されている。

1990年代はこのようなPEGの簡便性が強調され急速な普及を遂げ、単に栄養確保のみならず、癌などによる消化管狭窄の減圧、PEGの瘻孔を利用した内視鏡下治療へ適応が拡大し、手技の改良や感染などの合併症対策も進歩した。

また、PEGは『チーム医療』の促進にも貢献している。実際の患者の担当医は内視鏡担当医と異なり、脳血管障害や呼吸器感染症に携わる診療科であることが多く、患者の病態に関する理解とPEGの適応について議論が必要となる。コメディカルの役割も極めて重要で、PEGを実施する場である内視鏡室での看護、スキンケア、栄養剤注入など実際に患者のケアに関与する病棟看護部門

や嚥下訓練を行うリハビリテーション部門、栄養や薬剤を管理する栄養士、薬剤師、在宅への移行であれば相談業務を担うソーシャルワーカーや訪問看護部門、さらに介護者の理解や協力など緊密な連携が不可欠である。

さて、このような PEG の急速な普及に伴って、一方では PEG に関連した重篤な偶発症の報告や、生命予後や機能的予後への効用に関する議論がなされるようになってきた。

PEG の偶発症は手技自体に関連するもの、胃瘻チューブ管理、栄養剤投与に関連するものに分けられる。内視鏡を行うこと自体がすでに全身状態不良な患者に心肺機能への負担となり、誤穿刺や出血は生命の危機に直結する。術後早期には瘻孔周囲の皮膚潰瘍や壊死、チューブ自己抜去など、長期的にはバンパー埋没症候群 (buried bumper syndrome)、瘻孔周囲炎や不良肉芽などが生じうる。そしてチューブ交換時の出血や誤挿入では訴訟となった事例も報道されている。我々も実施数時間後の大量の消化管出血、ボタン交換時の粘膜損傷による出血やボタンの誤挿入を経験した。これら偶発症予防の工夫もなされてきているが確実な方法はなく、事前の十分なインフォームドコンセントとともに偶発症が発症した場合の迅速な対応が何より大切である。

また、PEG による生命予後の延長効果については賛否両論で明らかなエビデンスがない。予後因子として年齢、性別 (男性)、栄養状態、糖尿病や尿路感染症の有無、そして認知障害の有無などが挙げられているが、追跡調査の困難さや多種多様の因子のため研究自体がむずかしい。

特に、重度の認知症を有する患者に関して否定的な報告も散見され、機能的予後を考慮した『PEG の適応』の見直しも論じられるようになった。

PEG の適応は消化器内視鏡ガイドラインでは『自発的に経口摂取できず、4 週間以上の生命予後が見込まれる患者への栄養経路、消化管閉塞患者の減圧ドレナージが大きな柱で、栄養経路としても一時的なものという考えが重要である』と示されているが、寝たきりで意思疎通ができず恒久的使用が予測される症例にも実施され、その割合が増加していることから欧米においても適応について改めて議論がなされるようになってきている。実際、残念なことに方針決定に際して患者個人の意思確認が不可能で、家族等親権者による代理意思決定となることが多い。種々の医療行為に際してインフォームドコンセントの重要性がうたわれているが、PEG に関しては決して容易でなく、家族にいかにか文書をふまえて説明しても

実際に十分理解されているのか疑問に感じることも少なくない。PEG を実施した患者に関する看護師の調査で、QOL が望めなければ自身の PEG を望まないという結果もあり、われわれも自身や近親者が寝たきりで意思疎通困難となった場合 PEG を望むだろうかという問題に直面する。

高齢者の『終末期』、いわゆる老衰過程での「摂食不能」状態に対して欧米では人工栄養を施さずに自然経過で、というのが社会的合意となっているのに対してわが国ではそのような意識統一はできていない。PEG の実施が『生命延長の強要』ともなりうるが、これは単なる医療行為の適否ではなく生命倫理問題となる。本来の『目的は何か?』という原点に戻って適応を見直し、くれぐれも安易な実施とならないよう心して取り組まなければならない。

これらの問題もあまりに PEG の手技やその管理が簡便で急速な普及を遂げた故かもしれない。消化管止血や、腫瘍切除やステント留置など内視鏡治療の進歩は著しいがそれらはそれ自体で疾病の治療となりうるのに対して、PEG 自体は目的ではなくあくまで手段である。PEG は画期的な手技であり医療現場への多大な貢献はいうまでもない。手技や偶発症対策もさらに進歩していくだろうが、技術開発が一段落したところで、目的を再認識して PEG の適応を考える時期で、種々の施設からの経験に基づいた成績の蓄積により本来のあるべき姿が示されることを期待したい。

#### 参考文献

- 1) Gauderer MWL, Ponsky JL, et al : Gastrostomy without laparotomy : A new technique. J Pediatr Surg 15, 872-875, 1980
- 2) 上野文昭, 他 : 経皮内視鏡的胃瘻造設術ガイドライン. 消化器内視鏡ガイドライン第 2 版, 日本消化器内視鏡学会卒後教育委員会編, p295-309, 2002, 12 月
- 3) 上野文昭 : PEG の歴史. 臨床看護 29 : 630-632, 2003
- 4) Todd V, et al : Percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) : the role and perspective of nurses. Issues in clinical nursing 14 : 187-194, 2005
- 5) Shah PM, et al : Survival after percutaneous endoscopic gastrostomy : the role of dementia. J Nutrit Health Aging 9 : 255-259, 2005
- 6) 益田雄一郎, 他 : 終末期医療の敷衍 日医雑誌 135 : 1269-1274, 2006

芹澤 宏 (北里研究所病院 消化器内科、  
内視鏡センター)

## 学会展望

### 第86回慶應医学会総会・シンポジウム

#### 〈総会・シンポジウム〉

日 時 平成18年11月10日（金）15時～18時30分  
場 所 慶應義塾大学病院 新棟11階大会議室  
主 催 慶應医学会  
共 催 慶應義塾大学医学部

#### 『病院としての安全対策と危機管理』

##### I. 「異状死の届出義務と医療従事者の刑事責任について」

古川 俊治（慶應義塾大学法科大学院教授  
医学部外科学教室，TMI 総合法律事務所（弁護士））

##### II. 「診療行為に関連した死亡はどのように扱われるべきか」

上家 和子（厚生労働省大臣官房参事官（健康・医政担当））

##### III. 「私立大学病院医療安全推進連絡会議について」

落合 和徳（東京慈恵会医科大学附属病院副院長）

##### IV. 「医療安全と大学病院改革」

永井 良三（東京大学医学部附属病院病院長）

##### V. 「緊急時の情報リスクマネジメント」

後藤 正彦（株式会社博報堂コーポレートコミュニケーション局長）

# I. 異状死の届出義務と医療従者の刑事責任について

慶應義塾大学法科大学院教授 医学部外科学教室, TMI 総合法律事務所 (弁護士)

ふるかわとしはる  
古川 俊治

## はじめに

異状死の届出に関する問題に対しては、これまで長期にわたり、医療と法律を加味した点から取り組んできた。本日はその過程の報告とともに今後の私の考える方向性を示したい。

異状死問題に関する議論で大きく取り上げられたのが、2000年、ヘパリンを静注すべきところにヒピテンを静注してしまい患者が死亡した広尾病院事件である(図1)。当時、異状死に関するガイドラインは、事件の6年前に日本法医学会が作成したもののみであった。この事件はマスコミ等でも大きく扱われ、厚生労働省は基準を統一すべきであると考えた。しかし、法医学会が作成したガイドラインの内容が臨床的にはどうなのかという議論が各医学会・病院団体から起こり、2001年に日本外科学会が提言を発表した。その後、内科学会と外科学会が共同し、2004年2月には病理学会・法医学会が加わり、国民にわかりやすい医学会が統一した指針を作ろうという声明を、2004年9月には19学会が共同声明を出した。私はここまでの共同声明全てを起草してきた。そして2005年9月、共同声明に基づいて厚生労働省がモデル事業を開始した。

## 「異状死」をめぐる論議

医療事故報告制度を考える場合、様々な検討事項が挙げられる(図2)。対象については、何を報告したらいいのか、どのような事故なのか、現在問題になっている異状死だけではなく重症の障害等を含めて報告すべきなのかという問題がある。誰が報告するのかについては、担当医師本人なのか、病院の管理者なのか、遺族等を含めた他の関係者なのか、という問題がある。報告するタイミングについてであるが、医師法21条においては24時間以内という規定がある。24時間がふさわしいのか、あるいは発覚したらすぐに行ったほうがよいのかについての議論もある。何に基づいて報告すべきかの基準も必要である。報告は法律上の義務なのか、倫理上の義務なのか、報告は警察署へすべきか、あるいは他の専門機関なのか、こういった問題が多々あり、最もふさわしい制度が設けられるべきである。

医師法21条では、24時間以内に死体又は妊娠死別異常の

## 「異状死」問題に関する議論の経過

|            |  |
|------------|--|
| 1994年5月    | 日本法医学会ガイドライン                           |
| 2000年      | 広尾病院事件における医師法21条違反の議論                  |
| 2001年3月～6月 | 四病院団体協議会報告、国立大学附属病院長会議提言、日本外科系13学会共同声明 |
| 2002年4月～7月 | 日本内科学会・日本外科学会ガイドライン                    |
| 2004年2月    | 日本内科学会・日本外科学会・日本病理学会・日本法医学会共同声明        |
| 2004年4月    | 広尾病院事件最高裁判決                            |
| 2004年9月    | 19学会共同声明                               |
| 2005年9月    | 厚生労働省モデル事業開始                           |

図1

## 医療事故報告制度

1. 何を報告すべきか？  
どのような事故が対象か？  
傷害も報告するのか？
2. 誰が報告すべきか？  
担当医師本人か、管理者か、他の関係者か？
3. 何時報告すべきか？
4. 何に基づいて報告すべきか？  
法的義務か、倫理的義務か？
5. 何処へ報告すべきか？  
警察署か、他の専門機関か？

図2

死産児を検査して異常がある場合には、24時間以内に所轄警察署に届けでることになっており、罰則規定も設けられている(図3)。この立法趣旨は、死体や死産児は殺人傷害致死、死体損壊、墮胎等の重い犯罪の痕跡をとどめている場合があり、これらの捜査を容易にするために医師に届出の義務を課すということである。鑑定に際し、日本法医学会は平成6年にガイドラインを作っている(図4)。中でも



## 医師法第21条

医師は、死体又は妊娠4月以上の死産児を検案して異状があると認めるときは、24時間以内に所轄警察署に届け出なければならない。(第33条の2に罰則規定)

### 立法趣旨:犯罪捜査への協力

死体又は死産児については、殺人、傷害致死、死体損壊、墮胎等の犯罪の痕跡を止めている場合があるので、司法警察上の便宜のためにこれらの異状を発見した場合の届出義務を規定したものである。(厚生省:医師法解第16版)

「死体検案書」:診療中以外の者が死亡した場合あるいは診療中の傷病とは全く別の原因で死亡した場合にその死因等についての医学的判断を証明する文書(昭24. 4. 14医発385)

図3

## 日本法医学会ガイドライン(平成6年)

診療行為に関連した予期しない死亡、およびその疑いがあるもの

- ・ 注射・麻酔・手術・検査・分娩などあらゆる診療行為中、または診療行為の比較的直後における予期しない死亡
- ・ 診療行為自体が関与している可能性のある死亡
- ・ 診療行為中または比較的直後の急死で、死因が不明の場合、
- ・ 診療行為の過誤や過失の有無を問わない。

図4

## 法医学会ガイドラインの 作成責任者の見解

「作成に際しては、委員間でもかなり意見の相違があり、とくに医療行為関連の事例については議論があった。とにかく、ひとつの考えかたとして、参考資料として、作成したものであり、法律や規則ではない。」  
(柳田純一著、あなたの死亡診断書—法医学者の検死ファイル—、東京出版株式会社、210、2000。)

図5

特に問題になるのが、診療行為に関連した部分の規定である。

診療行為自体に関連した予期しない死亡およびその疑いがあるもの、診療行為直後の急死で死因が不明の場合である。これは非常に広い概念で、死亡率が高いと見込まれる重大な手術を行い、手術室で亡くなった場合にも診療行為自体が関与している可能性があるといわれるであろう。

(結果的には死亡に至ったが、診療行為について) 家族が感謝をしているような場合にも警察署の介入は行われてしまうのか、このような疑問があって概念が広すぎるといった議論が起こった。法医学会のガイドラインを作った責任者は、本学名誉教授の柳田純一先生であるが、著書に「作成に関しては委員の間でもかなり意見の相違があった、特に医療行為の関連の事例については議論があった」と書いてある(図5)。当時は異状死に関する唯一のガイドラインであったため、広尾病院事件等でマスコミや厚生労働省は、基準として用いたのである。

広尾病院事件については、平成16年4月、最高裁が判決を下した。この判決では、医師自らが診療していたか否かは問われず、医療過誤によって死亡が生じた場合に医師法21条の適応がありうるということが明確になった(図6)。しかしながら、どういう場合に届出を行うかについては、警察署が犯罪趣旨の端緒を得ることを容易にする、場合によっては「公益的な意味から被害の拡大防止を講ずる」ということが書いてある。警察官が犯罪捜査の端緒を得る目的で、医療過誤の疑い、患者の不審死の全てについて届けを出すのはいかがなものかと言われたていた。重い犯罪が関わっているような場合のみ届ける、というのが、この趣旨にふさわしいと読めるわけである。

この事件では、医師法21条の義務を課すと自分が診療中の患者が医療過誤の疑いで亡くなった場合に届けなくてはならない、そうすると刑事上で不利なことを申し述べなくていいという黙秘権、憲法38条1項の規定に反するのでは

## 最高裁平成16年4月13日判決 (都立広尾病院事件)

「医師法21条にいう死体の「検案」とは、医師が死因等を判定するために死体の外表を検査することをいい、当該死体が自己の診療していた患者のものであるか否かを問わない」

「本件届出義務は、①警察官が犯罪捜査の端緒を得ることを容易にするほか、②場合によっては、警察官が緊急に被害の拡大防止措置を講ずるなどして社会防衛を図ることを可能にするという役割をも担った行政手続上の義務と解される。そして、異状死体は、人の死亡を伴う重い犯罪にかかわる可能性があるものであるから、上記のいずれの役割においても本件届出義務の公益上の必要性は高いというべきである。」

図6

## 最高裁平成16年4月13日 (都立広尾病院事件)

「死体を検案して異状を認めた医師は、自己がその死因等につき診療行為における業務上過失致死等の罪責を問われるおそれがある場合にも、本件届出義務を負うことは、憲法38条1項に違反するものではない」

「本件届出義務の性質、内容・程度及び医師という資格の特質と、本件届出義務に関する前記のような公益上の高度の必要性に照らすと、医師が、同義務の履行により、捜査機関に対し自己の犯罪が発覚する端緒を与えることにもなり得るなどの点で、一定の不利益を負う可能性があっても、それは、医師免許に付随する合理的根拠のある負担として許容されるものというべきである」

→ 法律学上は批判的見解が多数

図7

ないかという議論になった(図7)。しかしながら最高裁判所は、医師免許は重い社会的責務性を担っており、届出規定というのが公益上の高度な必要性を持っているという点から、一免許に付随する一定の負担として刑事事件に関する取締りを受けても仕方がないと述べた。これが憲法に反しないといったわけであるが、法律学の専門家からは非常に批判的な見解が多かった。

このような問題を含んだ事件であるが、最高裁の判決が出る以前の2003年12月に、初めての見解を示す公文書が出された。東京都監察医務院ではこの例に関して、診断な

いし推察できる場合には届ける必要がないとした。「推察」は診断ではないため、必ずしも明確に診断されたものとはいえないが、この点ですでに法医学会の基準とはかなり違っていることがわかる(図8)(ただし、本シンポジウム後の2007年2月、東京都監察医務院は新たな通知を出し、ここでは「推察」は削除された)。

同時に、遺族が診断面や治療法に疑念を抱いている場合には警察署あるいは監察医務院に相談することと書かれており、家族の疑念の有無を考慮している。「異状死」か否かの判断については、客観的な解釈でなければならない。

## 2003年12月1日東京都監察医務院

収容病院先で病死であることが画像や心電図等(他院からの情報提供を含む)で診断(ないし推定)できる場合で、上記に当たらないもの(例:くも膜下出血、脳内出血、心嚢血腫等)は、異状死体に当たらず、届出をする必要はない。

遺族が診断名や治療方法に疑念を懐いている場合には、警察署、監察医務院に相談することとする。

→ 明らかに医療過誤における制度の転用の矛盾が意識されている。

図8

### 達成すべき課題 (2004年9月19学会共同声明)

1. 医療事故の防止  
明らかな過失による医療事故、及び重大な結果に至った予期せぬ有害事象を収集・分析し、再発を防止する必要がある。
  2. 透明性の確保と説明責任  
医療における透明性を確保し、国民から信頼される医療を構築するため、予期せぬ結果に至った診療行為について疑問がある場合、死体解剖その他の分析方法を含む第三者による公正な検証が行なわれることが望ましい。
- 行政と連携した中立的第三者機関創設の決意を宣言

図9

### 一般的にみた異状死の領域

- 医師法21条の公益的立法趣旨から、届出の範囲は領域的に広範であるべき
- 例1:日本学術会議(2部・7部)の見解(2005年6月)
- ① 純然たる病死以外の状況が死体に認められた場合のほか、
  - ② まったく死因不詳の死体等、
  - ③ 不自然な状況・場所などで発見された死体及び人体の部分等もこれに加えるべきである。
- 例2:日本法医学会異状死ガイドライン(1994年)  
(医療関連死以外)

図10

たとえば、家族が殺害を行っていたとしたら、当然家族は疑念を示さないため、異状死が明るみに出ることにはなくなってしまふ。「警察署に相談」という記述についても、法文では「届出」の義務についての記述はあるものの、「相談」については何処にも書かれていない。監察医務院は、医療過誤問題について現場が混乱しているということを意識し、このような助け舟を出してくれるのだと考えられ、私はこれに大変共感している。

最高裁の意向も、具体的にどんな場合で届出し医師法21条の適応があるのか、患者が現に死亡した臨床の現場でこれを届出するべきかどうか、この点について明確な基準は全くない。実際のところ何を達成すればいいのか、これは報告制度によって、まずは医療事故の防止、そのために情報を集めること、それとともに、国民にわかりやすい医療における透明性を確保し、第三者で公正な組織が検証手続きを行う、この点が重要であり、これを満たすような制度考

えていく必要がある(図9)。

警察は必ずしも死体解剖等で公正な手続きをすることに適した組織ではない。警察の職務は犯罪捜査であるため、犯罪を想定し、犯罪があるのではないかと疑って入る。すでに被疑者という立場におかれていることになる。そのため医学会としては中立的な第三者機関を作ることを考えていった。

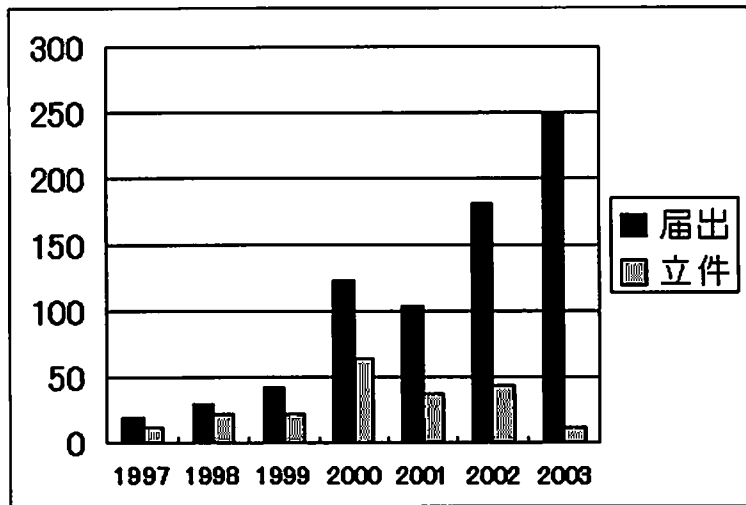
一般的にみた異状死はどういう風に考えたらいいかについて、日本学術会議が2005年にひとつの基準を出した(図10)。これによると、一般的に見た異状死は広いほうがいいという考えである。医療に関わらない部分の異状死というのは、何処かに犯罪が隠されている可能性があるため、できるだけ死因がわかったほうがいいという理由からであり、これで話題になったのは和歌山のカレー砒素事件である。この事件でなかなか届出がなされなかったのは、医師が保険金殺人だったものを病死で届けていたためである。この

## 医療関連死について警察署への届出

1. 「医療関連死」とは何か？  
 例: 日本学術会議見解  
 「診療、服薬、注射、手術、看護及び検査などの途上あるいはこれらの直後における死亡」
2. 「医療関連死」における「異状」とは何か？  
 例: 日本学術会議見解  
 ① 明確な過誤・過失があった場合  
 ② 過誤・過失の疑いがあったとき  
 ③ 直接的医療担当者が医療過誤がなく、死に至った経過が合理的に説明できるとする場合は、第三者医師(医師団)の見解を求め、この第三者医師、または遺族を含む関係者がその死因の説明の合理性に疑義を示す場合。

図11

## 異状死の届出数と立件数



警察庁調べ(中:社会技術研究論文集, 2004年)

図12

ようなケースが届け出られないのは問題ではないかと国会でも問題になった。一般的な異状死、医療に関わらないような異状死というのはなるべく広く届けられたほうがいい、これによって犯罪がわかるかもしれないという風潮になった。まずは日本学術会議で、純然たる病死以外のものが認められる場合、すべてを加えるということになった。日本法医学会の異状死のガイドラインはかなり広くとっている。では、医療に関連する部分をどう解釈したらいいのか、これが我々の今の問題点である。第一段階として、医療に関連する死亡とは何かということがクライテリアとして問題になる。参考のひとつとして、日本学術会議の見解は診療・

服薬・注射・手術・看護および検査などの途上あるいはこれらの直後とかなり限定している。こういったケースは極めてまれである。先ほどの法医学会のガイドラインのように、診療行為自体が関わっている可能性のある死亡までを含めているのは大きく違う。医療行為中または直後で、明確な過誤過失があるかその疑いがある、あるいは直接的な担当者が医療過誤がないと思いついて死に至った過程が合理的に説明できる場合には、第三者の医師の見解を求め、第三者の医師、あるいは遺族を含む他の関係者がその説明に疑念を示す場合も含まれる。第三者医師というのは、同じ病院内の医師でも診療に係わっていないければよいといわれて

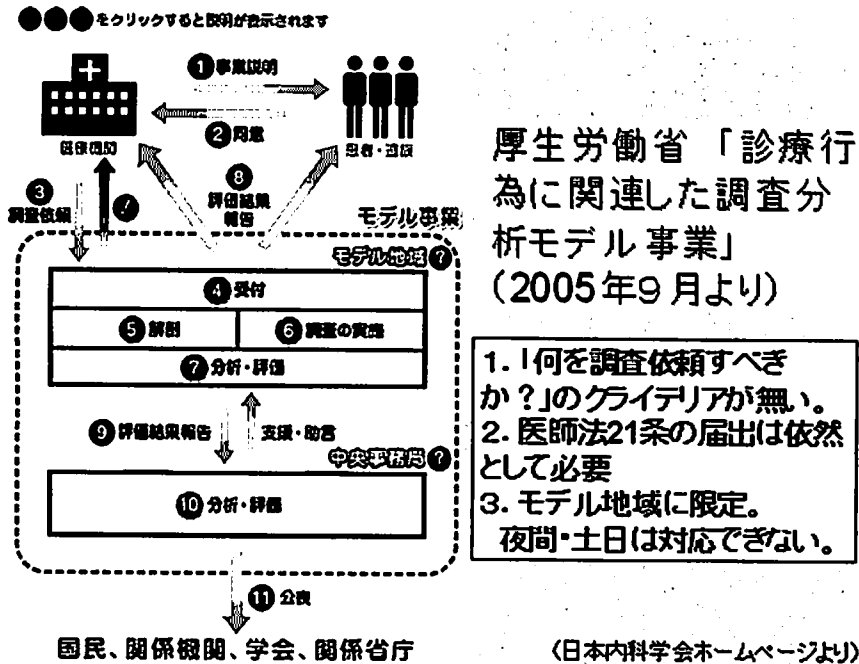


図13

## 近年の主要な刑事医療過誤(厳罰化)

1. 横浜市立大患者取り違え事件(東京高判平15・3・25)  
医師4名(執刀医ら3名、麻酔科医)、看護師2名(病棟の看護師、手術室の看護師)が有罪(5名は罰金50万円、麻酔医は罰金25万円)
2. 埼玉医大抗がん剤過量投与事件(さいたま地判平成15・3・20、東京高平15・12・24)  
主治医(禁錮2年執行猶予3年)、指導医(禁錮1年6月執行猶予3年)、教授(禁錮1年執行猶予3年)
3. 都立広尾病院薬剤取り違え事件(東京地判平12・12・27)  
準備看護師禁錮1年執行猶予3年、投与看護師禁錮8月執行猶予3年)
4. 慈恵医大青砥病院腹腔鏡手術事件(東京地平16・6・15)  
主治医(禁錮2年6ヵ月執行猶予5年)、執刀医(禁錮2年執行猶予4年)、助手(禁錮2年執行猶予4年)

図14

いる。日本学術会議が出した「異状」の定義は極めて限定的なものであった(図11)。これは法律家と医学の専門化の共同して作成したものである。

異状死の届出数は、広尾病院以降の99年から増え続けている(図12)。そのうち立件されたものには変化がなく増え

ていない。本当は届出が必要がない、事案がどんどん届け出られていることから、現場の混乱が見取れる。2004年以降データ発表がされていないが、年間約250件と聞いている。

そこで、厚生労働省がモデル事業を始めたわけであるが、

## 医療事故に関する医師の逮捕事件

1. 鹿児島造影剤事件(昭和63年)  
誤った造影剤を投与して患者2人を死亡させたとして、業務上致死の疑いで担当医を逮捕
2. 東京女子医科大学事件(平成14年6月)  
心臓手術事故とカルテ改竄について、業務上過失致死・証拠隠滅の疑いで担当医と上司の医師を逮捕
3. 東京慈恵医科大学事件(平成15年9月)  
泌尿器科腹腔鏡下手術における出血死亡事故について業務上過失致死の疑いで手術担当医らを逮捕
4. 福島産科医事件(平成18年2月)  
帝王切開における癒着胎盤処置に関する母体出血死について業務上過失致死・医師法違反の疑いで担当医を逮捕

図15

このモデル事業について現在の問題点を挙げてみる。まず何をこのモデル事業に依頼するべきかについてのクワイエリアがないという問題がある(図13)。依頼すべきか否かについて迷う原因となる。また、医師法21条の届出は依然として必要となるため、モデル事業に依頼したからといってあまり意味がない、という問題もある。モデル地域も限定されており、モデル地域においても夜間や土日には対応できない。人の死亡の多くが夜間や土日を占めることを考えると、極めて限定的な制度だといえる。進展が予想以上に遅いというのが現状である。

## 医療従事者の刑事責任について

医療過誤の罰刑は、従来は罰金のみで済んでいた。近年の死亡する医療過誤は、執行猶予はついているものの、刑務所に行かなければならない禁固刑の判決が出るようになった。

広尾病院や慈恵医大の医療事故もそうである(図14)。執行猶予はついても、執行猶予中に再度犯罪を繰り返した場合には、執行猶予が取り消される恐れがある。そうすると医療は不確実な危険性があるため、事実上医療行為ができなくなる。慈恵医大の場合は執行猶予が5年であることから、5年間臨床から離れざるを得ない。そうすると、事実上医師を続けることが難しくなる。このように、厳罰化されてきているといえる。

また、医師の逮捕事件も多発している(図15)。鹿児島の造影剤事件以来、14年間逮捕事件がでなかったが、東京女子医大の事故、慈恵医大の事故、福島の産科の事故と昨今医師が逮捕される率が高くなってきた。特に福島の産科事件というのは、今年の2月に起こったもので、マスコミでも話題になった。

逮捕のための要件は決まっていかなり厳格である。一つが逮捕の理由、これは罪を犯したと疑われる相当な理由がなくてはならない(図16)。医療過誤においては、理由が

## 逮捕の合理性

### 逮捕の要件(刑事訴訟法199条)

1. 逮捕の理由: 罪を犯したと疑うに足る相当な理由
2. 逮捕の必要性: 証拠隠滅や逃亡のおそれ

福島産科医事件の場合:

すでに2005年4月に同院に対する強制捜査・証拠書類の押収が行われており、また、福島県も事故調査を行ったうえで報告書を作成し、同容疑者の判断ミスをもって遺族に謝罪した上で、6月には同容疑者を減給1カ月の懲戒処分、病院長を戒告処分としていた。また、同医師はその後も大野病院唯一の産婦人科医として献身的に勤務し続け、逮捕当日も診療中であった……

図16

## 医療過誤に刑事制裁を適用することに本当に意義があるのか?

- 本来、法律上の過失を問うためには、行為者に予見可能性が無ければならないが、刑事罰の対象になるような実行上の過誤には、予見可能性がない。
- 米英では、医療過誤に対しては刑事制裁はほとんど適用されていない。
- 目的と(刑事制裁という)手段の関係の合理性
  - 社会防衛なら、行政処分が有効。
  - 一般予防なら、予見可能性がないから、機能しない。
  - 応報刑なら、民事賠償と、行政処分で足りる。

図17

## 刑事被疑での病院側の問題

立件されなければ良いわけではない。

捜査対象となること自体の問題点

1. 警察署が介入することによる患者との信頼関係の崩壊
2. 診療に関与した医療従事者の長期の大きな精神的・時間的負担
3. 院内における不信感
4. マスコミの一面的な報道
5. 萎縮医療

図18

ある場合が大半である。逮捕の必要性については、証拠隠滅や逃亡の恐れが考慮されるべきである。逃亡の恐れについては、住居不定無職の者に多いため、医師は職業上最も遠い存在であるはずだ。また、逮捕の理由ができるころにはカルテ等の証拠はほとんど押さえられており、もはや証

## 達成すべき課題への緩徐な対応

1. 医療事故の防止  
明らかな過失による医療事故、及び重大な結果に至った予  
期せぬ有害事象を収集・分析し、再発を防止する必要がある。  
→ 日本医療評価機構への報告制度  
(ただし、現行事務処理方法の内容については、再検討  
の余地が大きい)
2. 透明性の確保と説明責任  
医療における透明性を確保し、国民から信頼される医療を  
構築するため、予期せぬ結果に至った診療行為について疑  
問がある場合、死体解剖その他の分析方法を含む第三者に  
よる公正な検証が行なわれることが望ましい。  
→ 厚生労働省のモデル事業開始  
(ただし、未だ届出基準と医師法21条との関係は不明)

図19

(仮に厚労省の現施策の目的が達成されるとして...)  
なお検討の必要な問題点

- ①全国的・永続的な中立的第三者機関による医  
療事故の新しい報告制度の創設、そのための  
費用負担
- ②医師法21条関係の法令を改正するか否か  
(第三者機関と医師法21条との関係)
- ③医療事故情報の保護と公開の問題
- ④重大な傷害事例への対応
- ⑤医療事故に関する刑事・民事制裁、および行政  
処分の適切な適応関係

図20

抱隠滅しようがないというような状況である。福島産科医  
大の事件では、調べはすべて済み、報告書も作成し、県  
も病院長に戒告、医師に減給処分を行い、その医師がもう  
一度反省をして働き始めたという時期に逮捕を行った。も  
ちろん医学会は反論声明を出したが、これは本当に刑事訴  
訟法上適法な逮捕なのか疑われる。もうひとつ根本的な  
問題として、医療過誤に刑事制裁を適応する意味があるの  
か、という問題がある(図17)。本来、法律上の過失を問う  
ためには行為者に予見の可能性がなければならない。人は  
誰でも間違えるものといわれているから、そういう事故に  
ついて本当に予見の可能性があるのか問題である。

英米では刑事制裁は適応されていない、目的と刑事制裁

の関連性については、危ない従事者を放置しておく事故  
が起きるといわれている。それならば、危ない医療従事者  
は行政処分によって処理をできなくしてしまえば、社会防  
御はできる。一般予防としては、医療事故を起こしたら重  
い罪が科せられることを周知しておけば、注意を払って事  
故は防げるであろう、というものである。しかし、事故が  
予見できれば注意するが、予見できないのであるから機能  
しない、という反論の可能性がある。遺族の思いをはらすた  
めに医師にも刑事罰を課すことについては、社会的な制裁  
と民事賠償で足りるのではないかという見解があり、それ  
ゆえ英米では医療過誤に対して刑事制裁を適応していない。  
よく、立件されなければ調べられても構わないという声

を聞く(図18)。しかし、警察が介入すること自体が問題なのである。まず、患者との信頼関係が崩壊してしまう。また、診療に関与した医療従事者は調べを受けることに非常に大きな時間を拘束され、1年半くらいかかることもある。マスコミが一面的な報道すれば、院内における不信感にもつながってしまう。

## おわりに

現在、医療事故防止のために医療評価機構への報告制度ができたが、まだ十分な機能を果たしていない(図19)。そして透明性かつ説明責任についてモデル事業がはじまったが、期待されたような対応は困難とされているのが現状で

ある。今後厚生労働省の報告制度のモデル事業において目的が達成されたとしても、モデル事業を全国的永続的な中立機関に育てなければいけないという課題が残り、つまりは医師法21条関係の整備をしないといけない(図20)。すなわち、施行令を作って医療系関係は別にするような法条をおかないとならない。それから医療事故情報の保護と公開の問題、傷害例をどうするか、今は死亡だけを問題にしているが、重大な傷害は同じことが考えられ、この検証等をどうするか、などの問題が挙げられる。医療事故に関する制裁のあり方、刑事・民事・そして行政処分といったものをもう一度本来の目的に戻って見直す必要があると考える。



## Ⅱ. 診療行為に関連した死亡はどのように扱われるべきか

前厚生労働省大臣官房参事官（健康・医政担当）、環境省国立水俣病総合研究所センター所長

かみ や かず こ  
上 家 和 子

### 1. 医療事故等の現状

医療事故の全国的発生頻度を平成15年～17年に実施した調査（平成17年度厚生労働科学研究：主任研究者：堺 秀人、神奈川県病院事業庁長）でみると、対象とした4,389冊の入院診療録の分析結果では、有害事象は297件6.8%であった。この場合の有害事象の種類と程度は表1のとおりである。このうち、予防可能性が低い又は予防困難な事例が4分の3以上を占めており、結局、予防の可能性があった事例は67件1.6%であった。

上記の有害事象の発生率をカナダにおける判定基準に基づき国際的に比較しても、決してわが国が突出して高率というわけではない（表2）。

一方、医療過誤についての社会的関心は近年急速に高まっており、新聞紙面でも大きく報道されるようになってきている（図1）。そして、医事関係訴訟件数も徐々に増加している（図2）。従来、長期間かかると指摘されてきた医事関係訴訟の審理期間は、近年、迅速化が図られている（図3）。しかしながら、今も、当事者、関係者の負担はきわめて大きい。

医事関係訴訟事件数の年次推移を診療科目別にみると、内科、外科、整形・形成外科に次いで産婦人科、歯科となっており、いずれも最近とくに増加傾向にある（図4）。訴訟件数を医師1000人あたりでみると（表3）、産婦人科医では11.8件、外科医で9.8件となっており、外科系、特に産婦人科では訴訟の割合が高くなっており、医師のいわゆる外科系離れ、産科離れや「萎縮医療」の原因のひとつと指摘されている。

### 2. 医療安全に係るこれまでの取り組み

厚生労働省における医療安全に係る最近の取り組みは、2001年医療安全対策検討会を設置し、翌年4月に医療安全推進総合対策を策定したことから始まっている。2003年12月には厚生労働大臣より「医療事故対策緊急アピール」が発出され、2005年6月には医療安全対策検討会議報告書がとりまとめられた。そして、2006年6月、医療法等の改正をはじめとする医療制度改革が開始されたが、その中で、医療安全は大きな項目として取り上げられるに至っている（図5、表4）。

改正医療法のうち、医療安全に関する内容としては、患者等からの相談に応じ助言等を行う医療安全支援センターの制度化、医療機関の管理者に医療安全の確保の義務づけ、医療機関における安全管理体制の充実・強化、院内感染制御体制の充実、医療機関における医薬品・医療機器の安全管理体制の確保、行政処分を受けた医師等への再教育の義務化等、および国・地方公共団体の責務・役割の明確化である。

医療法・薬事法におけるその他の改正内容のうち、医療機能情報の公表制度の創設も、医療安全に関する項目を含んで運用されようとしている。たとえば、管理・運営・体制に関する事項のなかには安全管理体制等が含まれ、また、情報提供や医療提供体制に関する事項では、クリティカルパスの実施、他の医療機関との連携状況、セカンドオピニオンの実施等、さらに、医療の内容、実績に関する事項においても代表的具体的な診療内容についての情報が都道府

表1 有害事象の障害の種類と程度

| 有害事象            | 297件 (6.8%) <sup>1)</sup> |
|-----------------|---------------------------|
| 患者の死亡が早まった      | 14件 (3.2%) <sup>2)</sup>  |
| 退院時、患者に障害が残っていた | 29件 (6.6%)                |
| 新たな入院の必要が出た     | 190件 (43.1%)              |
| 入院期間が延長した       | 143件 (32.4%)              |
| 濃厚な治療が新たに必要となった | 74件 (16.8%)               |

注1. わが国における調査結果を国際比較するにあたり、カナダにおける判定基準を用い、再計算した値。

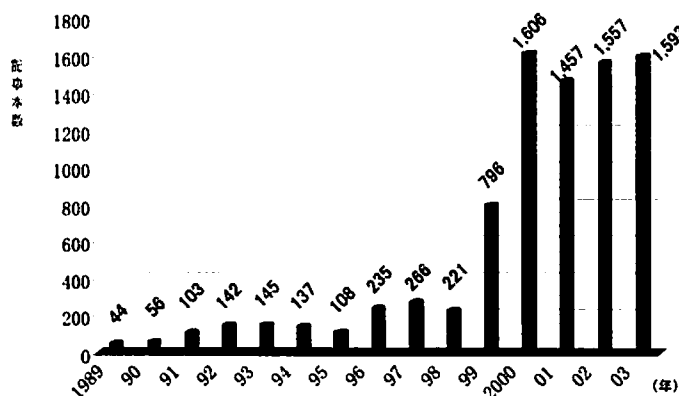
注2. 障害の種類等重複あり合計は100%にならない

平成17年度厚生労働科学研究「医療事故の全国的発生頻度に関する研究班」  
主任研究者：堺 秀人神奈川県病院事業庁長

表2 医療事故の頻度に関する国際比較

|         | 日本    | カナダ       | 英国        | デンマーク | ニュージ<br>ランド | オースト<br>ラリア | 米ユタ・<br>コロラド | 米NY    |
|---------|-------|-----------|-----------|-------|-------------|-------------|--------------|--------|
| 調査年     | 2005  | 2000-2001 | 1999-2000 | 1998  | 1998        | 1992        | 1992         | 1984   |
| 対象病院数   | 18病院  | 20        | 2         | 17    | 13          | 28          | 28           | 51     |
| カルテ数    | 4,389 | 3,745     | 1,014     | 1,097 | 6,579       | 14,655      | 14,565       | 30,195 |
| 発生率 (%) | 6.8   | 6.8       | 10.8      | 9.0   | 12.9        | 10.6        | 3.2          | 3.7    |

平成17年度厚生科学研究「医療事故の全国的発生頻度に関する研究」  
(主任研究者: 堺 秀人 神奈川県病院事業庁長)



注1) 日経テレコン21(日本経済新聞社)による記事検索で、「医療過誤」「医療ミス」を題材(見出し、本文、キーワード、分類語)にした記事本数(ダブルは除外)をカウントした。89年に実際に起きた過誤(ミス)を扱ったものではない。  
注2) メディカル朝日 平成16年3月号より引用  
注3) 記事本数=過誤+ミス-重複

図1 全国紙5紙(朝日、読売、毎日、産経、日経)にみる医療過誤(ミス)をテーマにした記事本数

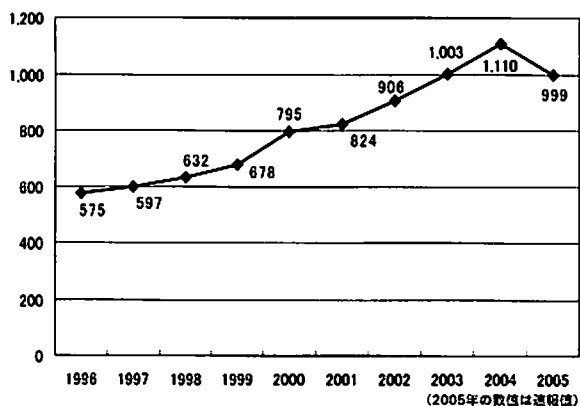


図2 我が国の医事関係訴訟新規受付数(最高裁判所調べより)

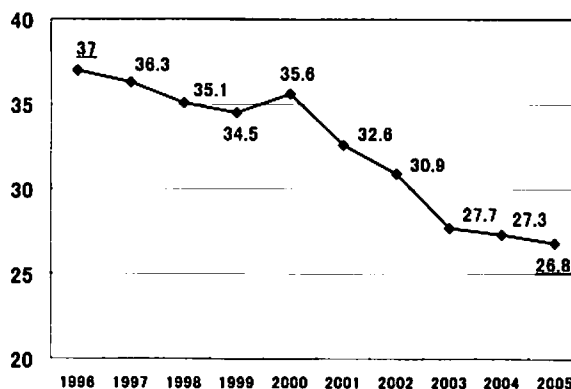


図3 医事関係訴訟事件の平均審理期間(最高裁判所調べより)

県に報告され、公表されることとなった。

一方、医療安全を推進するための環境整備としては、医療安全に有用な情報の提供以外に、図6に示すような医療事故情報収集等事業(ヒヤリ・ハット事例を含む)、都道府県等において患者の相談等に対応する医療安全支援セン

ター(図7)の整備、医療安全に必要な研究を厚生労働科学研究として計画的に推進すること等を進めている。

このうち、都道府県医療安全支援センターに寄せられた相談内容を見ると(表5)、医療安全に関連する可能性のある医療行為や医療内容に関するものは4分の1以下であり、

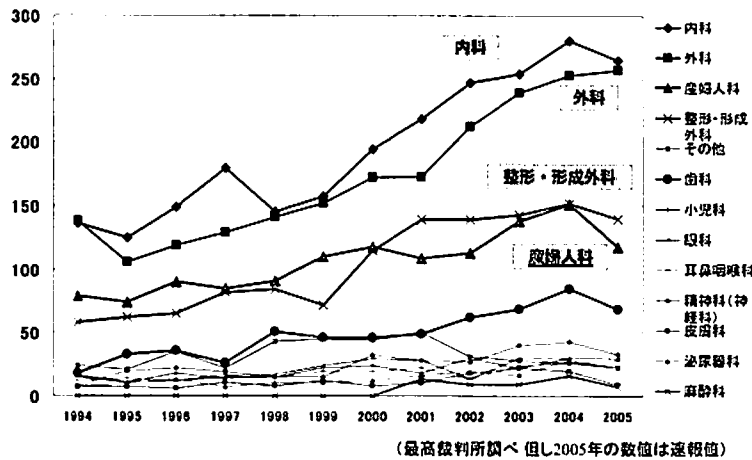


図4 医事関係訴訟事件の診療科目別新受付件数

表3 診療科別の医事関係訴訟件数

|      | 平成15年       | 平成16年       | 平成16年度医事関係訴訟事件の新受付件数(医師1000人当たり) | 平成17年       |
|------|-------------|-------------|----------------------------------|-------------|
| 内科   | 254 (24.6%) | 280 (24.6%) | 3.7件                             | 256 (25.7%) |
| 外科   | 239 (23.2%) | 253 (22.2%) | 9.8件                             | 257 (24.9%) |
| 産婦人科 | 138 (13.4%) | 151 (13.2%) | 11.8件                            | 118 (11.4%) |
| 小児科  | 22 (2.9%)   | 30 (2.6%)   | 2.0件                             | 30 (2.9%)   |

(最高裁判所調べ 但し、平成17年の数値は速報値)

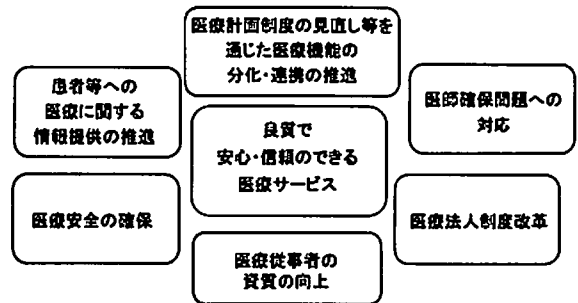


図5 医療制度改革の概要

また、相談内容を苦情と相談に分けてみると、苦情13,527件(58.7%)、相談9,516件(41.3%)で、むしろ全般的な医療相談や接遇の問題などでの相談や苦情の受け皿の必要性も示唆される内容となっている。

### 3. 診療行為に関連した死亡の調査分析モデル事業

医師は、死体又は妊娠4月以上の死産児を検査して異状があると認めるときは、24時間以内に所轄警察署に届け出

なければならない(医師法21条)。医師法21条については、平成16年4月13日の最高裁判所判決によって

- ・「検案」とは、医師が死因等を判定するために死体の外表を検査することをいい、当該死体が自己の診療していた患者のものであるか否かを問わない
- ・死体を検案して異状を認めた医師は、自己がその死因等につき診療行為における業務上過失致死等の罪責を問われる恐れがある場合にも、医師法21条の届出義務を負うとすることは、憲法38条1項(自己に不利益な供述の強要禁止)に違反するものではない

表4 医療法 第一条

この法律は、医療を受ける者による医療に関する適切な選択を支援するために必要な事項、医療の安全を確保するために必要な事項、…(中略)…医療を受ける者の利益の保護及び良質かつ適切な医療を効率的に提供する体制の確保を図り、…(略)。

旧 この法律は、病院、診療所及び除算所の開設及び管理に関し…(中略)…医療を提供する体制の確保を図り、…(略)。

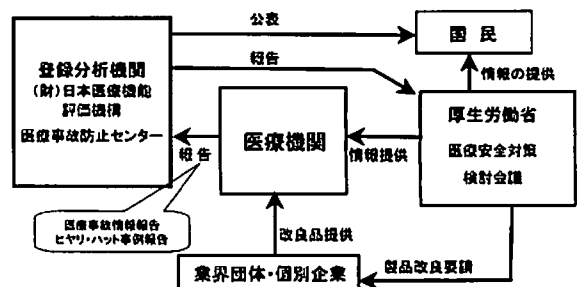


図6 医療事故情報収集等事業

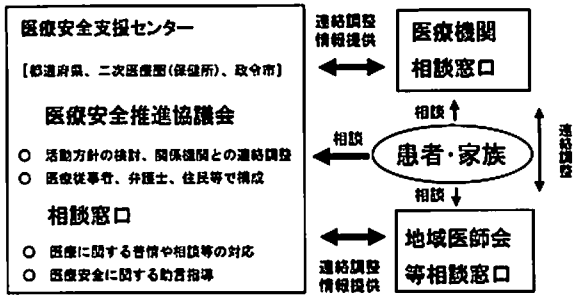


図7 医療安全支援センター

とされた。もともとは、それまでの検案した医師が（診療行為と関連なく、死因に関連した）犯罪を疑った場合に届け出ることが想定されていたものが、この判決によって、医療関連死は届け出なければならない、というように、解釈が拡大されたことを意味すると捉えられる。

業務上過失致死が極めて重く捉えられているわが国の制度と相まって、意図した犯罪と同じように刑事事件として取り上げられる事態が生じて来ている。

たしかに、非意図的であっても過失によって不幸な転帰をもたらした場合には処罰も含め一定の対応がなされるべきである。しかし、一方で、医療という結果の不確定な行為について、徹底的な結果責任を負わされることは、いわゆる萎縮医療をもたらし、国民の福祉に資する方向とはならないと考えられている。

また、医療は結果の積み重ねによって向上していくものであり、医療の質と安全・安心を高めていくためには、不幸な事故について科学的に検証し、結果を広く提供することが重要である。

表5 都道府県医療安全支援センターにおける相談内容

| 相談件数（平成17年度上期） | 23,043件        |
|----------------|----------------|
| 医療行為、医療内容      | 5,663件 (24.6%) |
| 健康や病気にすること     | 3,387件 (14.7%) |
| 医療機関従事者の接遇     | 2,944件 (12.8%) |
| 医療費関係（診療報酬等）   | 1,727件 (7.5%)  |
| 医療機関の紹介、案内     | 1,653件 (7.1%)  |

現状としては、刑事事件あるいは民事事件として司法でなされる判断はすべて個別の事案についての判断であり、また、多方面からの専門家が集まって十分に検討するという体制には程遠い環境での判断とならざるを得ない。

診療行為に関連した死亡については、正確な死因の調査分析を行い、同様の事例の再発を防止するための方策が、専門的、学際的に検討され、広く改善が図られることが必要である。そこで、平成17年度から診療行為に関連した死亡の調査分析モデル事業が開始された。これは、モデル地域となった都道府県等において、遺族と医療機関双方が了解し、かつ、医師法21条における異状死ではないと判断された、もしくは異状死として届け出られても検視の結果司法解剖を行わないということになった事案について、総合調整医のもとで、複数の医師により解剖を行い、複数の臨床医による調査が実施されてとりまとめられた評価結果報告書が、遺族と依頼医療機関に同時に報告される、という仕組みである。そして、遺族が了解した範囲内で、評価結果報告書の概要は広く公表される（図8）。（社）日本内科学会を実施主体とし、多くの学会の協力を得て（表6）実施に移された。

なお、現在モデル地域となっているのは、東京、愛知、

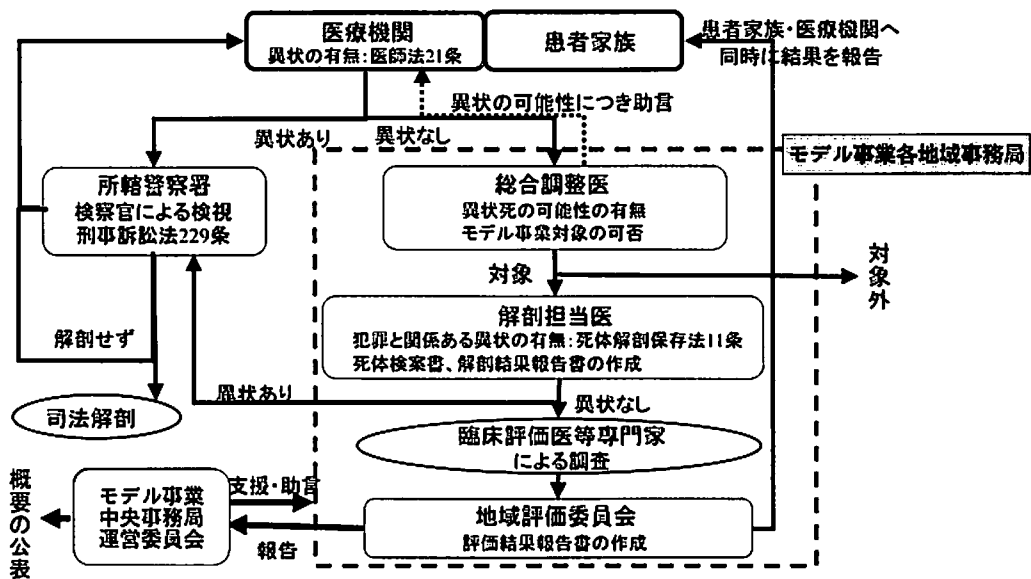


図8 診療行為に関連した死亡の調査分析モデル事業

表6 協力学会一覧

|   |   |
|---|---|
| 【日本医学会基本領域19学会】   |   |
| ・日本内科学会 ・日本外科学会 ・日本病理学会 ・日本法医学会 ・日本医学放射線学会<br>・日本眼科学会 ・日本救急医学会 ・日本形成外科学会 ・日本産科婦人科学会<br>・日本耳鼻咽喉科学会 ・日本小児科学会 ・日本整形外科学会 ・日本精神神経科学会<br>・日本脳神経外科学会 ・日本泌尿器科学会 ・日本皮膚科学会 ・日本麻酔科学会<br>・日本リハビリテーション医学会 ・日本臨床検査医学会 |   |
| 【内科サブスペシャリティ】   | 【外科サブスペシャリティ】   |
| ・日本消化器病学会 ・日本肝臓学会<br>・日本循環器学会 ・日本内分泌学会<br>・日本糖尿病学会 ・日本腎臓学会<br>・日本呼吸器学会 ・日本血液学会<br>・日本神経学会 ・日本感染症学会<br>・日本老年医学会 ・日本アレルギー学会<br>・日本リウマチ学会 ・日本皮膚科学会   | ・日本胸部外科学会<br>・日本呼吸器外科学会<br>・日本消化器外科学会<br>・日本小児外科学会<br>・日本心臓血管外科学会 |
| 【日本歯科医学会】   |   |
| ・日本歯科医学会  |   |

表7 調査が終了した事例

|     |          |  |
|-----|----------|--|
| 事例1 | 60歳代男性   | A病院において、肝内胆管癌の疑いの診断の下に行った肝切除手術の際に、血管損傷に伴う大量出血を来し、出血性ショックに陥った。手術終了後ICUにて管理されたが、手術の翌日に死亡。  |
| 事例2 | 20歳代女性   | 統合失調症にて外来治療中、幻覚、興奮などのためA病院へ入院後、隔離室にて加療。約2週間後、夜に睡眠薬を服用し入眠。翌日の朝に死亡。  |
| 事例3 | 70歳代男性   | A病院において、大腸多発ポリープに対して行われた内視鏡摘除術により大腸穿孔が合併し、それによる腹膜炎に対する開腹手術が行われた。軽快退院した後3日目に死亡。   |
| 事例4 | 60歳代女性   | 前日より発熱がみられた状態で、予定されていた整形外科の手術を受ける目的でA病院に入院した。入院当日に、発熱、低血糖、意識障害を伴うショックとなり、急速な経過で深夜に死亡。  |
| 事例5 | 80歳代(男性) | 下肢閉塞性動脈硬化症に対し局所麻酔下で経皮経カテーテル血管形成術を受けたが、当日、夕食摂取直後に心肺停止となった。一旦蘇生し2日目には気管内チューブを抜去したものの4日目には再挿管となった。その後、徐々に全身状態が悪化し、敗血症、成人呼吸促迫症候群、多臓器不全のため、14日目に死亡。 |
| 事例6 | 30歳代男性   | 頸椎椎間板ヘルニアの患者に対して、第5・6頸椎間椎間板ヘルニア前方摘出、骨移植・プレート固定術を施行したところ、手術後、呼吸困難を生じ、呼吸停止から脳死状態に陥り、約5ヶ月後に死亡。  |
| 事例7 | 60歳代女性   | 閉塞性動脈硬化症のバイパスグラフトが閉塞したため、カテーテル治療を実施後、後腹膜出血を認め緊急手術。2週間後に死亡。   |

<http://www.med-model.jp/all.php>

大阪、兵庫(以上平成17年9月開始)、茨城(平成18年2月開始)、新潟(同3月開始)、札幌(同10月開始)であり、平成19年3月16日までの受付件数は47件に上っている。

平成19年3月16日現在までに調査が終了し評価結果報告書の遺族への説明が終了したのは17件である(表7)が、このモデル事業を通じて個別事例における具体的な内容のみならず、必要な制度がどのようなもので、どのような運用が必要か、といった観点で、さまざまな課題や方策が明らかとなってきている。

#### 4. おわりに

平成18年8月31日に地域医療に関する関係省庁連絡会議でとりまとめた新医師確保総合対策においても、医療事故が発生した場合に、裁判によって解決を図るという現状では、医療従事者が萎縮し、高度先進医療や産科医療等、リスクの高い医療を担う医師がいなくなるとの懸念がある、と指摘している。このため、医療事故に係る死因究明の在り方について、平成18年度内を目途に厚生労働省から試案

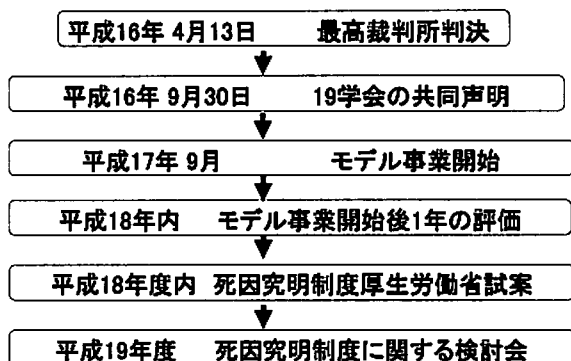


図9 死因究明制度へ向けてのロードマップ

を提示し、平成19年度に有識者による検討会を開催し、その議論を踏まえ必要な措置を講じることを、制度創設等についての中期的検討の項目として掲げている。(図9)。

平成19年度には、試案をもとに、診療行為に関連した死亡の調査分析モデル事業の成果を踏まえつつ、新たな制度の構築に向けた検討が行われることとなっている。

厚生労働省では、平成19年3月、「診療行為に関連した死亡の死因究明等のあり方に関する課題と検討の方向性」と題する試案を公表し、平成19年4月から「診療行為に関連した死亡に係わる死因究明等の在り方に関する検討会」において検討を開始している。

## 参考：診療行為に関連した死亡の死因究明等のあり方に関する課題と検討の方向性

### 1 策定の背景

- (1)患者・家族にとって医療は安全・安心であることが期待されるため、医療従事者には、その期待に応えるよう、最大限の努力を講じることが求められる。一方で、診療行為には、一定の危険性が伴うものであり、場合によっては、死亡等の不幸な帰結につながる場合があり得る。

また、医療では、診療の内容に関わらず、患者と医療従事者との意思疎通が不十分であることや認識の違いによる不信感により、紛争が生じることもある。

- (2)しかしながら、現在、診療行為に関連した死亡(以下「診療関連死」という。)等についての死因の調査や臨床経過の評価・分析等については、これまで、制度の構築等行政における対応が必ずしも十分ではなく、結果として民事手続や刑事手続に期待されるようになってきているのが現状である。また、このような状況に至った要因の一つとして、死因の調査や臨床経過の評価・分析、再発防止策の検討等を行う専門的な機関が設けられていないことが指摘されている。

- (3)これを踏まえ、患者にとって納得のいく安全・安心な医療の確保や不幸な事例の発生予防・再発防止等に資する観点から、今般、診療関連死の死因究明の仕組みやその届出のあり方等について、以下の通り

課題と検討の方向性を提示する。

今後、これをたたき台として、診療関連死の死因究明等のあり方について、広く国民的な議論をいただきたい。

### 2 診療関連死の死因究明を行う組織について

#### (1)組織のあり方について

- ①診療関連死の臨床経過や死因究明を担当する組織(以下「調査組織」という)には、中立性・公正性や、臨床・解剖等に関する高度な専門性に加え、事故調査に関する調査権限、その際の秘密の保持等が求められる。こうした特性を考慮し、調査組織のあり方については、行政機関又は行政機関の中に置かれる委員会を中心に検討する。

- ②なお、監察医制度等の現行の死因究明のための機構や制度との関係を整理する必要がある。

#### (2)組織の設置単位について

- ①調査組織の設置単位としては、以下のものが考えられる。

- ア 医療従事者に対する処分権限が国にあることに着目した全国単位又は地方ブロック単位の組織  
イ 医療機関に対する指導等を担当するのが都道府県であることや、診療関連死の発生時の迅速な対応に着目した都道府県単位の組織

- ②なお、都道府県やブロック単位で調査組織を設ける

場合、調査組織に対する支援や、調査結果の集積・還元等を行うための中央機関の設置も併せて検討する必要がある。

(3)調査組織の構成について

- ①調査組織には、高度の専門性が求められる一方で、調査の実務も担当することとなると考えられる。このため、調査組織は、
  - ア 調査結果の評価を行う解剖担当医（例えば病理医や法医）や臨床医、法律家等の専門家により構成される調査・評価委員会（仮称）
  - イ 委員会の指示の下で実務を担う事務局から構成されることが基本になると考えられる。
- ②また、併せて、こうした実務を担うための人材育成のあり方についても検討する必要がある。

### 3 診療関連死の届出制度のあり方について

- (1)現状では、医療法に基づく医療事故情報収集等事業以外には、診療関連死の届出制度は設けられておらず、当事者以外の第三者が診療関連死の発生を把握することは困難となっている。このため、診療関連死に関する死因究明の仕組みを設けるためには、その届出の制度を併せて検討していく必要がある。今後、届出先や、届出対象となる診療関連死の範囲、医師法第21条の異状死の届出との関係等の具体化を図る必要がある。
- (2)届出先としては、例えば以下のようなものが考えられる。
  - ア 国又は都道府県が届出を受け付け、調査組織に調査をさせる仕組み
  - イ 調査組織が自ら届出を受け付け、調査を行う仕組み
- (3)届出対象となる診療関連死の範囲については、現在、医療事故情報収集等事業において、特定機能病院等に対して一定の範囲で医療事故等の発生の報告を求めているところであり、この実績も踏まえて検討する。
- (4)本制度による届出制度と医師法21条による異状死の届出制度との関係を整理する必要がある。

### 4 調査組織における調査のあり方について

- (1)調査組織における調査の手順としては、「診療行為に関連した死亡の調査分析モデル事業」の実績も踏まえ、例えば以下のものが考えられる。
  - ①死因調査のため、必要に応じ、解剖、CT等の画像検査、尿・血液検査等を実施
  - ②診療録の調査、関係者への聞き取り調査等を行い、臨床経過及び死因等を調査
  - ③解剖報告書、臨床経過等の調査結果等を調査・評価

委員会において評価・検討（評価等を行う項目としては、死因、死亡等に至る臨床経過、診療行為の内容や再発防止策等が考えられる）

- ④評価・検討結果を踏まえた調査報告書の作成
  - ⑤調査報告書の当事者への交付及び個人情報を削除した形での公表等
- (2)なお、今後の調査のあり方の具体化に当たっては、例えば以下のような詳細な論点についても、検討していく必要がある。
- ①死亡に至らない事例を届出及び調査の対象とするか否か
  - ②遺族等からの申出による調査開始の可否や遺族の範囲をどう考えるか
  - ③解剖の必要性の判断基準、解剖の執刀医や解剖に立ち会う者の選定の条件、臨床経過を確認するため担当医の解剖への立会いの是非
  - ④電話受付から、解剖実施の判断、解剖担当医の派遣調整等を迅速に行うための仕組み
  - ⑤事故の可能性がないことが判明した場合などの調査の終了の基準
  - ⑥院内の事故調査委員会等との関係と一定規模以上の病院等に対する院内事故調査委員会等の設置の義務付けの可否
  - ⑦調査過程及び調査報告における遺族等に対する配慮

### 5 再発防止のための更なる取組

調査組織の目的は、診療関連死の死因究明や再発防止策の提言となるため、調査報告書の交付等の時点でその任務は完了するが、調査報告書を踏まえた再発防止のための対応として、例えば以下のものが考えられ、その具体化の為には更なる検討が必要である。

- ①調査報告書を通じて得られた診療関連死に関する知見や再発防止策等の集積と還元
- ②調査報告書に記載された再発防止策等の医療機関における実施について、行政機関等による指導等

### 6 行政処分、民事紛争及び刑事手続との関係

また、併せて、以下の点についても検討していく。

- ①調査組織の調査報告書において医療従事者の過失責任の可能性等が指摘されている場合の国による迅速な行政処分との関係
- ②調査報告書の活用や当事者間の対話の促進等による、当事者間や第三者を介した形での民事紛争（裁判を含む）の解決の仕組み
- ③刑事訴追の可能性がある場合における調査結果の取扱い等、刑事手続との関係（航空・鉄道事故調査委員会と捜査機関との関係も参考になる）

### Ⅲ. 私立大学病院医療安全推進連絡会議について

東京慈恵会医科大学附属病院副院長

おち あい かず のり  
落 合 和 徳

#### はじめに

安全な医療提供に当たって、われわれ私立大学附属病院はそれぞれの病院が独自に工夫しながら取り組んできた。医療安全管理体制に若干の差はあるものの、当然のことながら目的は同じであり、それぞれの施設で行っているノウハウを取り入れることにより、少しでも効率的な運用ができるのではないかと考えていた。その矢先、厚生労働省関東信越局の医療監査があり、国立大学病院間の連携に関する情報がもたらされた。このままでは私立大学病院の医療安全管理は個々の病院の努力だけに終わってしまい、やがては取り残されてしまうという危惧が「私立大学病院医療安全推進連絡会議」発足のきっかけとなった。今回、国立大学附属病院には遅れをとったが、私立大学病院医療安全推進連絡会議（以下「本会議」）が発足したのでその概要と取り組みについてご紹介したい。

#### 1. 国立大学附属病院のあゆみ（表1）

平成11年に発生した重大な医療事故をきっかけに、全国で医療安全に対する機運が高まった。それをうけ国立大学附属病院では、平成11年から附属病院長会議を通じて医療安全管理体制の確立に取り組んでいる。医療事故防止方策策定作業部会の設置、「医療事故防止のための安全管理体制の確立に向けて（提言）」、「研修医に対する安全管理体制について（問題点および改善策）」、「国立大学附属病院における医療上の事故等の公表に関する指針」など重要事項に対する提言、基準策定などをおこなってきた。相互チェックについては、体制を確立しそれを実行に移し現在もこれを継続しているとのことである。

#### 2. 本会議の目的と沿革

本会議の目的は、私立大学病院として医療安全に関する情報を共有し、協力して効率的な医療安全管理体制を確立することである。私立大学附属病院も医育機関としてまた医療を提供する場として重要な役割を担っている。大学病院のベッド数について東京都を例に取り比較すると、国立大学附属病院、国立病院のベッド数は全体の18%に過ぎず、

表1 医療安全に関する国立大学附属病院の取り組み

- 平成11年6月 第53回国立大学病院附属病院長会義 文部省から医療安全管理体制再点検の緊急要請
- 平成11年7月 常置委員会 組織のあり方問題小委員会 内に医療事故防止方策の策定に関わる作業部会設置
- 平成12年8月 「医療事故防止のための相互チェック」実施。現在も実施
- 平成13年6月 「医療事故防止のための安全管理体制の確立に向けて（提言）」
- 平成16年2月 「研修医に対する安全管理体制について（問題点および改善策）」
- 平成17年3月 「国立大学附属病院における医療上の事故等の公表に関する指針」

#### 東京都の大学附属病院ベッド数

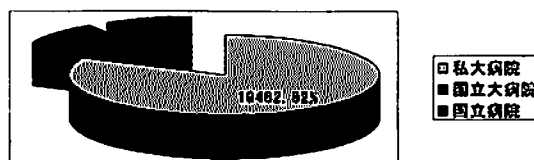


図1 東京都の大学附属病院ベッド数

82%は私立大学病院が占めている（図1）。東京ではまさに私立大学附属病院が連携しなければ医療安全が確保できないということになりかねない。そこでまず、東京都の私立大学附属病院に声をかけ意見交換をはじめた。平成18年1月26日、東京都内の大学に声をかけ第1回の会議をもち、その後2回、実務者会議を4回開催した。

#### 3. 検討事項

本会議では本会議と私立医科大学協会の関係、私立大学附属病院間の医療安全相互チェック、医療上の事故等の公



表に関する基準と指針、事故調査委員会の協力体制などについて作業部会で原案を作成して意見交換を行った。

1) 本会議と私立医科大学協会との関係について

私立医科大学を束ねる私立医科大学協会（私大協）と本会議の活動が重複する可能性が考えられたので、私大協内に設置された病院部会の中にある医療安全対策委員会と協議した結果、本会議は同委員会の実務的な作業部会として機能することとした（図2）。

2) 医療上の事故等の公表に関する基準と指針

「国立大学附属病院における医療上の事故等の公表に関する指針」（図3）をたたき台にし、私立大学附属病院としての整合性を持たせるようマイナーチェンジを行なった。公表に関する基準が施設あるいは経営母体によって異なる

ということは避けるべきであり、今後は「病院における医療上の事故等の公表に関する指針」として国立、公立、私立を問わず大学病院として同一の指針となるよう最終調整が行われている。なお公表の実務についても意見交換が行われ、公表のタイミングについて重大事故、警鐘的事故については発生後可及的速やかに行われるべきで、公表の方法としては個別に調査後 HP 等により公表すること、また私立大学附属病院全体として一定期間の事例をとりまとめて報告するなどが検討されている。

3) 事故調査委員会の協力体制

医療事故の発生にともない、事故調査委員会が設置されることになる。議論の公平性を担保することから、調査委員会には院内関係者のみならず院外医療従事者を委員として参加させる必要がある。この際の協力支援を約束し、さらに体制作りについて検討する予定である。

医療安全対策委員会と私立大学病院医療推進連絡会議

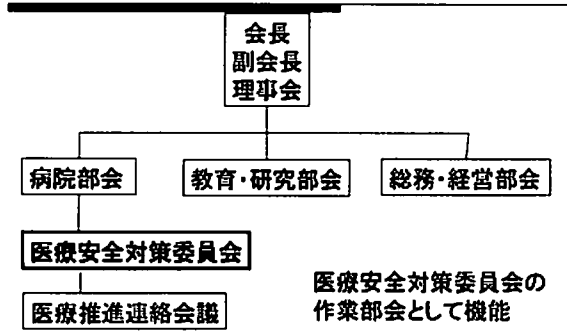


図2 医療安全対策委員会と私立大学病院医療推進連絡会議

4) 医療安全相互チェック

第三者による検証を行い、医療事故の防止・安全性向上を図ること、さらに評価する側、受ける側の双方が医療事故防止の創意工夫を学び共有することが病院間相互チェックの目的である。本年11月から12月にかけて、図4にあるように全国を6ブロックにわけ、所属する施設同士が相互にラウンドして評価することとした。本会議においてラウンドの実施要綱（表2）、およびチェックリストを作成した（図5）。ラウンドの評価は、ラウンドをした施設から医療安全対策委員会に報告され、委員会はこれを取りまとめて各施設に伝える。この中で改善の必要がある事項については、同委員会から改善勧告を行なうものとする予定である。

公表する医療上の事故等の範囲及び方法

|   |                       |                                    |                            |                                    |
|---|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 過失あり<br>(医療過誤)<br><br>過失なし<br>(合併症・副作用を含む)<br>予期しなかった<br>予期したもの<br>予期していた | 死亡 ①                  | 重篤・永続的 ①                           | 非重篤・永続的 ③、重大な過失の場合は②       | ヒヤリ・ハット<br>公表が再発防止に<br>繋がる場合は<br>③ |
|   |                       | 重篤・濃厚な処置、治療後に回復 ②、重大な過失の場合は①       | 非重篤・一時的 ③                  |                                    |
|   | 死亡 ④及び公表が再発防止に繋がる場合は③ | 重篤・永続的 ④及び公表が再発防止に繋がる場合は③          | 非重篤・永続的 ④及び公表が再発防止に繋がる場合は③ |                                    |
|   |                       | 重篤・濃厚な処置、治療後に回復 ④及び公表が再発防止に繋がる場合は③ | 非重篤・一時的 ④及び公表が再発防止に繋がる場合は③ |                                    |
|   | 死亡 公表が再発防止に繋がる場合は③    | 重篤・永続的 公表が再発防止に繋がる場合は③             | 非重篤・永続的 公表が再発防止に繋がる場合は③    |                                    |
|   |                       | 重篤・濃厚な処置、治療後に回復 公表が再発防止に繋がる場合は③    | 非重篤・一時的 公表が再発防止に繋がる場合は③    |                                    |

図3 公表する医療上の事故等の範囲及び方法

## 相互チェックの方法

- 全国を6ブロックに分け、29私立大学附属病院(本院)が所属する施設同士が相互にラウンドしチェックする
1. 北海道、東北、北関東ブロック(4)  
岩手医大、自治医大、獨協医大、埼玉医大
  2. 東京ブロック(11)  
日大、帝京大、日本医大、順天堂大、東邦大、慈恵医大、昭和医大、東京医大、女子医大、慶應大、杏林大
  3. 神奈川ブロック(3)  
北里大、聖マリアンナ大、東海大
  4. 中部・北陸ブロック(3)  
藤田保健衛生大、愛知医大、金沢医大
  5. 近畿ブロック(4)  
関西医大、大阪医大、兵庫医大、近畿大学
  6. 中国・九州ブロック(4)  
久留米大、福岡大、産業医大、川崎医大



図4 相互チェックの方法

表2 相互チェックの実際

1. ラウンド実施者(以下1), 2)のいずれか
  - 1) 医療安全管理部門責任者, 医療安全管理者を含む3名以上で構成する。
  - 2) 複数の病院から参加し4名程度の構成メンバーを編成する。
2. ラウンドの実際
  - 1) 午後1時～4時までの3時間とする。
  - 2) 初回は双方の情報共有を目的とするため, 詳細なチェックは以降の課題とする。
  - 3) 評価項目, 評価の実際は共通チェックシート(図5)を用いて行う。  
(私立医科大医療安全チェックシート(東京版)を参照)
  - 4) 医療安全を担当するスタッフ間でのヒヤリングを行い, その後に現場を視察する。
  - 5) ラウンドを受ける側は, 病院長, 医療安全管理部門責任者, 医療安全管理者が対応する。
3. ラウンドの評価と報告
  - 1) 実施した結果は4週間以内に私立医科大学協会医療安全対策委員会へ報告する。
  - 2) 医療安全対策委員会は報告を取りまとめ, 各施設に報告するとともに公表する
  - 3) 改善の必要がある場合は, 私立医科大学協会医療安全対策委員会より勧告を行う。
  - 4) 評価は, 医療安全対策委員会に報告され, 委員会はこれを取りまとめて各施設に報告する。
  - 5) 改善の必要がある場合には同委員会から改善勧告を行なう。

### 4. Peer review の重要性

品質管理の分野では、職場におけるQCサークル(異職種間コミュニケーションによる改善項目の発見、改善策の実施、その評価)が行われ成果をあげている。医療現場は医師、看護師、薬剤師、臨床検査技師、放射線技師、臨床工学士、メディカルソーシャルワーカーなど異職種により構成されており、多職種によるチームワーキング環境そのものである。異職種間で話し合うことで、問題点をいろいろな角度からみることになり改善項目が発見されやすくなり対策・実施もしやすくなる。

異職種間コミュニケーションとは、とりもなおさず職場における「Peer Review System」そのものである。お互

いに見る、見られる環境作りの目的のひとつに「Reflective practice」(内省的実践)を促すことがある。内省的実践とは自らの問題点を自らが気づき、それを自ら改善し、自らを変化させていくことである。peer reviewが他者によるreviewとすれば、Reflective practiceは自己によるpeer reviewである。

ところで日本人はpeer reviewが下手だといわれている。これは仲間を監視・監督し、正しく評価し指導するという事に慣れていないためであろう。人間は見られていないと悪さをするが、見られているとわかると悪さはしないとされる。しかしpeer reviewは悪さをしない・させないために見張っているのではなく「見られ合っていること」に気づき、基本を思い出し襟を正して職務を遂行するよう

私立医科大学病院医療安全チェックシート【東京版】

| 1 医療安全管理体制の整備・改善の進展                       |                             |                              |                              |
|---|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 医療安全管理体制が整備されている                        | <input type="checkbox"/> いる | <input type="checkbox"/> いない | <input type="checkbox"/> その他 |
| 2 安全管理体制に医療従事者の同意に基づく委員会が設置されている          | <input type="checkbox"/> いる | <input type="checkbox"/> いない | <input type="checkbox"/> その他 |
| 3 安全管理体制に対する関係者の役割が明確に規定されている             | <input type="checkbox"/> いる | <input type="checkbox"/> いない | <input type="checkbox"/> その他 |
| 4 安全管理体制の導入、維持、改善、評価、フィードバック、事故発生時の対応について | <input type="checkbox"/> いる | <input type="checkbox"/> いない | <input type="checkbox"/> その他 |
| 5 関係者への周知が徹底している                          | <input type="checkbox"/> いる | <input type="checkbox"/> いない | <input type="checkbox"/> その他 |
| 6 どのような体制に採用しているか                         |                             |                              |                              |
| 7 医療従事者のインセンティブの整備が図られている                 | <input type="checkbox"/> いる | <input type="checkbox"/> いない | <input type="checkbox"/> その他 |
| 8 医療従事者は、責任を共に担っているか                      | <input type="checkbox"/> いる | <input type="checkbox"/> いない | <input type="checkbox"/> その他 |
| 9 医療従事者は、責任を共に担っているか                      | <input type="checkbox"/> いる | <input type="checkbox"/> いない | <input type="checkbox"/> その他 |
| 10 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 11 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 12 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 13 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 14 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 15 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 16 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 17 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 18 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 19 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 20 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 21 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 22 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 23 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 24 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 25 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 26 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 27 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 28 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 29 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 30 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 31 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 32 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 33 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 34 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 35 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 36 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 37 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 38 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 39 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 40 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 41 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 42 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 43 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 44 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 45 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 46 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 47 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 48 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 49 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 50 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 51 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 52 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 53 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 54 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 55 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 56 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 57 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 58 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 59 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 60 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 61 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 62 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 63 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 64 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 65 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 66 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 67 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 68 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 69 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 70 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 71 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 72 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 73 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 74 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 75 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 76 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 77 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 78 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 79 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 80 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 81 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 82 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 83 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 84 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 85 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 86 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 87 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 88 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 89 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 90 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 91 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 92 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 93 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 94 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 95 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 96 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 97 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 98 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 99 関係者に対する                                |                             |                              |                              |
| 100 関係者に対する                               |                             |                              |                              |

私立大学病院医療安全推進会議において作成

(平成15年度・16年度国公立医療安全ラウンドのチェック表を参考にして作成)

図5 相互チェックのための医療安全チェックシート

にするものである。

今回取り上げた私立大学病院間の医療安全相互チェックも peer review のひとつである。慈恵医大では院内の医療安全ラウンドを毎月行っている。当初はリスクマネジメント委員会、医療安全推進室のメンバーがラウンドしていたが、今年からそれぞれの部署から推薦されたフロアリスクマネージャーにラウンドを担当してもらっている。まさに「見る・見られる環境」作りの一環である。さらに院内のラウンドから附属4病院間のラウンドへと発展し、情報や創意工夫の共有にはかり、より効率的な医療安全管理を進めている。

このほか慈恵医大では教育センター、医療安全推進室が中心となり医療安全と医療倫理を考えるワークショップを年7回開催し、医学生、看護学生、コメディカルスタッフ、医師、看護師、事務職員などからなる少人数グループで、われわれの実際に体験した医療事故を題材に議論し、改善策などの提案を作成している。毎年800名を越える参加者があり、今後益々充実させていかねばならない分野である(図6)。

5. チームワーキング 結びにかえて

多職種の教職員がひとつの目標に身かって働くためには、まず共通の目標を持ち、他者の役割を認めるところから始まる。他職種の役割とその人が医療に思う気持ちを知って、はじめて、チーム医療が成り立つ。そのためには、自分の

Peer Review の重要性 -見られあう世界を作る-

私立大学病院間の相互チェック

慈恵医大の取り組み

- 附属病院内の医療安全ラウンド
- 附属病院間の相互ラウンド

■ 医療安全と医療倫理を考えるワークショップ

図6 Peer Review の重要性-見られあう世界を作る-

専門性を磨くことが大事である。管理者はそれぞれの職種の専門性が100%発揮できる環境の整備に努めなければならない。医療に携わるそれぞれの職種が出せる力を出し合っ初めて安全で安心な医療提供が可能となるであろう。そのために今回設置された私立大学病院医療安全推進連絡会議の果たす役割も大きいのではないかと考えている。しかし何にも増して重要なのは医療界全体のチームワーキングで、これがあってはじめて国民に対して安全で安心な医療提供がなされるものと考えている。

## 医療安全と医療倫理を考えるワークショップ (慈恵医大)

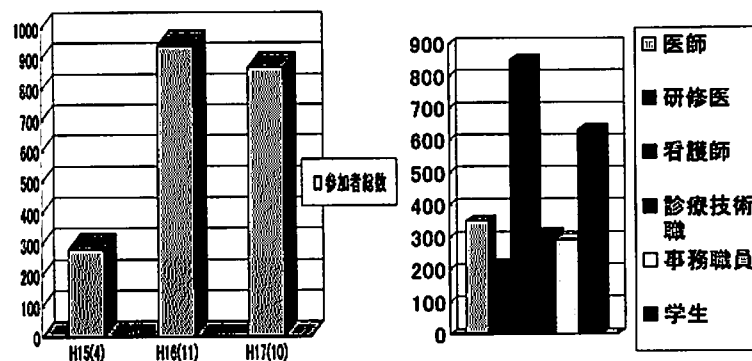


図7 医療安全と医療倫理を考えるワークショップ (慈恵医大)

### 謝 辞

本日発表の機会を与えていただいた吉村副院長，慶應医学  
学会の皆様のご好意に深謝し稿を終えたい。

## IV. 医療安全と大学病院改革

前東京大学医学部附属病院長 循環器内科教授

なが いりょう ぞう  
永井良三

医療安全や医療の質、さらに大学病院改革に対する関心がかつてないほど高まっていますが、これらの問題は医療のマネジメントという視点から一元的にとらえることができると思います。本日は現在の医療をめぐるいろいろな問題点について、特に大学病院改革という点からお話したいと思います。

### 東大医学部紛争の背景と影響

東大医学部に端を発した昭和40年代の医学部紛争（図1）は多くの教訓を含んでいます。医学部紛争はインターン闘争がきっかけになったこともあり、今日、臨床研修必修化をきっかけに医療界が混乱しているのも当時と非常によく似た状況にあります。東大紛争の要因を分析しますと、今日でも問題の本質はほとんど解決されていないことがわかります。とくに大病院としてのガバナンスの欠如、患者中心の医療という視点の欠如、徒弟制度的なトレーニングシステム、無理な診療体制、診療科や講座の独立などは今でも本質的に変わっていないと思います。また、この時代に世界的な学生運動の潮流やベトナム戦争などの国際紛争が大きな影を落としていました（図2）。

東大紛争のもたらした影響をみるために、東大病院の過去40年間の運営を振り返ってみました（図3）。昭和36年当時、東大病院の病棟稼働率は96%という高い実績をしていました。外来の患者数も72.3万人でした。その後、国民皆保険、国家公務員総定員法、大学紛争、新設医大、ドルショック、円高などの影響により、東大病院の経営の落ち込みは深刻でした。そして、回復するのに40年かかりました。落ち込みのきっかけは、臨床研修必修化の問題であったことは先ほど触れたとおりです。臨床研修問題の怖さというのは、東大紛争で明らかです。私が入学した年に東大紛争になり、紛争を間近に見ておりましたので、今回の臨床研修必修化に対して東大病院は早めに手を打ってきました。

落ち込んだ東大病院が立ち直るきっかけとなったのは財政投融資（財投）の借入金です。国立大学病院はある時期から財投を病院建設に利用するようになりました。一般会計とは異なり財投はすべて自分たちで働いて返済しなければなりません。国立大学時代には財投償還金は国によって

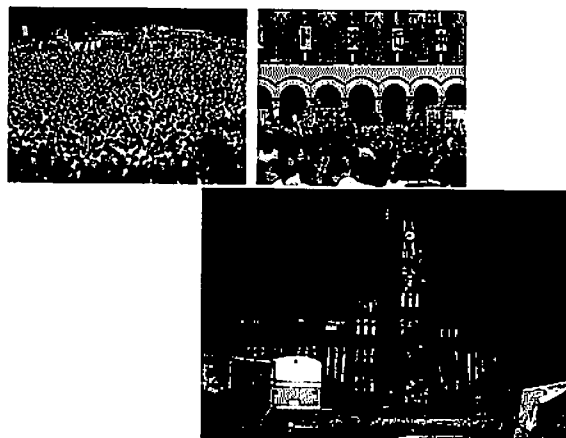


図1

### 医学部紛争の背景

- 1 病院、学部、全学におけるガバナンスの欠如
- 2 患者中心医療の視点の欠如
- 3 徒弟制度的なトレーニングシステム
- 4 無理な体制による診療
- 5 各診療科、講座の独立
- 6 世界的な人権・学生運動の潮流  
公民権運動、UCパークレイ、カルチエラタン  
60/70年安保

図2

保証されていましたが、法人化後はこれが全部借金として重くのしかかってきました。ある程度は運営費交付金でカバーされますが、その交付金は急激に減少していきます。

東大病院の40年間の歴史を見ると、大学紛争が非常に大きな影響を与えることがわかりだと思えます。また、世界レベルの政治・経済変動などに大きく影響されていたということがわかります。

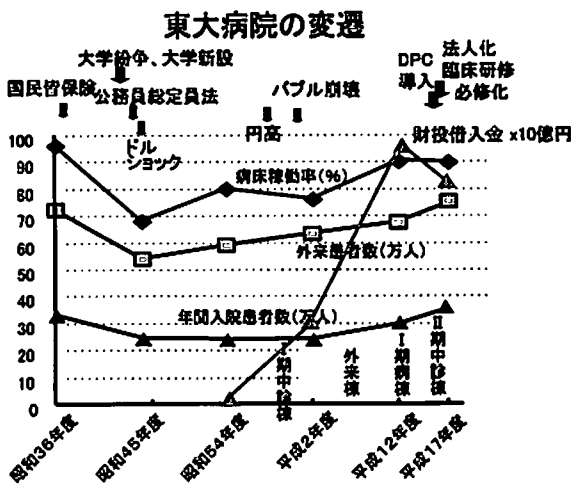


図3

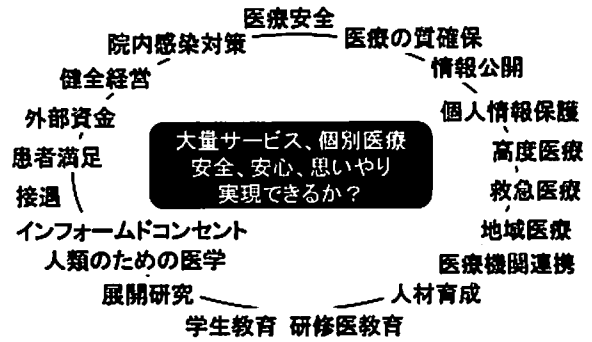


図4

### 大学病院をめぐる状況

今日、医療界では、医療安全、医療の質、情報公開、個人情報保護、高度医療、救急医療、地域医療、医療機関連携、人材育成、研修医教育、展開研究 (TR)、院内感染対策、経営改善、これらのキーワードが一斉に出てまいります (図4)、これに一つ一つ対応していかないといけないわけです。人間がシステムをつくって生きていく以上は、これらは避けて通れない問題ですし、それにきちんと対応できた組織が次の時代を迎えられるのだらうと思います。後に述べますように、現在、病院が医療資源をめぐる大競争時代に入っている以上、これらの問題に逐一对応できない場合は淘汰される可能性があります。

そういう状況の中で、大学病院の特徴を考えてみるときに、幾つかのポイントが浮かび上がってきます。まず、病院運営に大学の考え方が相当強く反映されます。価値観が大変多様です。医療自体がそうですが、大学は非常にさまざまな価値観がありどれも正論なのですが、全体のシステムとしての発想が乏しいことが特徴です。大学は学問の場ですので、独立と相互不干渉が色濃く存在します。大学病院ではそうは言っておれないのですが、未だにその性格が残っていることが大きな問題です。

戦後の日本は非常に民主化され、いろいろな権威が崩壊しました。民主主義では機会の平等性が強調されますが、同時に指導者にある程度の権限委譲をしなければ全体はうまく動きません。この権限委譲というシステムが日本全体、とくに大学では十分に機能してこなかった、あるいは権限委譲を余り好まない風土があるために、大学病院ではいろいろな問題を生じていたように思います。

また、大学病院に限らず、大きな病院は経営難にあります。特に大学病院では、理念は非常に高く、果たす役割も非常に大きい。しかし、職員数はアメリカの一流大学病院

と比べると、5分の1から10分の1ぐらいの人間で運営しています。少ないポストで多くの使命を果たそうとすると無理をせざるを得ず、弊害が出てきます。

次に閉鎖的な医局の集合体であった大学病院において、病院長は多くの責任を負いながら調整役としてしか機能していませんでした。病院がこういう状況では運営はうまくいきません。例えば定員の再配置や組織の統廃合などの大きな改革は大変困難です。

平成16年度より国立大学は法人化され多くの制約から解放されると共に、責任も重くなりました。ありがたいのは国家公務員総定員法が適応されなくなったということです。昭和43年に国家公務員総定員法が施行されてから、医療は進歩していたにも関わらず、看護師などのコ・メディカルも教員も増やせなかったわけです。結局、大学病院は研修医や大学院生などの若い労働力に依存せざるを得ない体質をつくってしまいました。これが法人化によって適用除外になったということは、ある意味では救いになっています。

一方で法人としての倫理の遵守、透明性、情報公開がより厳格に求められるようになりました。

### 大学病院改革の方針

大学病院を改革するためには職員が言い訳できないことから始め、患者中心の医療を実践するよう意識改革を進める必要があります (図5)。例えば医療安全、カルテ記載、院内感染防止などで、そのための院内の教育・研修体制を強化します。また病院の医療を数値化し経時的にチェックしていきます。また、医局や職種ごとに閉鎖的な集団とならないように病院職員としての教育が重要です。診療科により臨床負荷が大きく異なるように定期的なスタッフ数の見直しが必要であり、施設を有効活用するためには病床を病床化しなければなりません。さらに講座の教授が自動的に診療科長になるのではなく、科長には任期を定めておくことも重要です。

ただこれらの改革は一朝一夕にはならず、院内の意識改革を同時に進める必要があります。例えば日本の医療制度の特質を理解して医療状況を動かす力学的法則を知ること

## 病院改革

- 1 言い訳のできないことから、「しつけ」と意識改革(患者中心の医療)  
医療安全、カルテ記載、院内感染防止など  
院内の教育・研修体制強化  
状況の数値化、経時的チェック
- 2 職域の縄張り意識の制御(医局・職種ごとの教団化阻止)  
病院職員としての教育、スタッフ数の見直し、共通病床化
- 3 教員としての位階と病院職員としての役職の分離  
人事権  
教授、助教授、講師は教授会  
科(部)長、副科(部)長は病院長(1年任期)  
病院講師は病院執行諮問会議  
執行部に決定権、諮問会議(病院会議)に院長リコール権  
トップダウンとボトムアップの組み合わせ
- 4 日本の医療の特質から、医療状況を動かす力学的法則を知る
- 5 病院の歴史を知る  
独自の改革(迅速な試行錯誤が必要)

図5

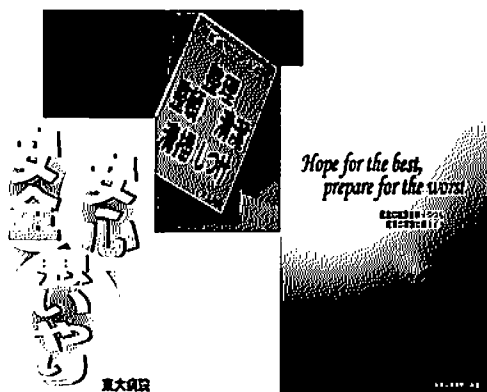


図6

## わが国の医療安全問題

- ・ 医療紛糾事件が明らかになる件数が上昇
- ・ 一般市民の医療サービスに対する不満
- ・ 政府の医療機関に対する不満

## 衛生部2005年決定

患者中心で、医療サービスの質の向上をテーマとした「病院管理年」活動を展開する

図7

も重要です。私が東大病院長になって行ったことはまず言い訳できないことに関する意識改革です。例えば、退院後のカルテ提出が遅い、サマリーが書かれていない、手術記録がない、そういうところから取り組みを始めました。医療事故も幾つかありましたので、標語も作りました。よく「安心・安全の社会」といいますが、安全・安心だけでは何か足りない。それは心の問題です。「思いやり」がなければ「安全、安心」では不十分です。そこで「安全・安心・思いやり」ということを病院の標語にしております(図6)。

その他、いろいろなポスターをつくりました。「医療安全の基本、整理・整頓・清潔・清掃・しつけ」、これは工業界で20年前からしている5S運動です。それから、「Hope for the best, prepare for the worst」というポスターです。これはアメリカの学会へ出かけたときに、機内誌で見つけ

た言葉で、「最良の結果を祈りつつも、最悪の事態に備えよ」ということです。医師は良いことばかり考えがちです。良いことだけを患者さんに伝える傾向があります。しかし、治療が裏目に出たときの話は余りしていない。それが医療不信のもとになっています。

## 医療の世界的な転換

今日医療問題が大きく取り上げられているのは日本だけではありません。図7と図8は2005年12月に北京で開催された中日医院管理フォーラム、すなわち病院管理に関する講演会の際に中国側の講演で使用された資料です。さきほど60年代の医学部紛争は世界的な流れが背景に存在していたとお話しましたが、今日の医療改革も実は世界の潮流

第一回中日両国医院管理高級フォーラム

|               |              |
|---------------|--------------|
| <b>4C</b>     | <b>4Pの失敗</b> |
| Client needs  | Price        |
| Cost          | Product      |
| Convenience   | Place        |
| Communication | Promotion    |

信用(ブランド)の形成

- 100%原則 有言実行
- ゼロ欠陥原則
- ヒダントインの法則(ハインリッヒの法則?)
  - 1件の重大な事故の背景に
  - 30の小さな事故、300のリスク
- 1%原則 些細なことでもきちんと対応
  - 持続的な改善、小走りで前進

図8

医療の近代化と情報化への対応を実践する  
病院システムの構築

**近代化**

- 多数の人手による高度な技術の提供  
(規格大量医療サービス)
- 他人と同じであることを望む
  - 高度医療、患者数の増加

**情報化**

- ネットワークとメディアを介する情報の氾濫
- 他人と違うことを望む
- 人権尊重の再認識
  - テラーメイド医療(個別医療)
  - インフォームドコンセント

医療資源をめぐる競争時代の始まり

図10

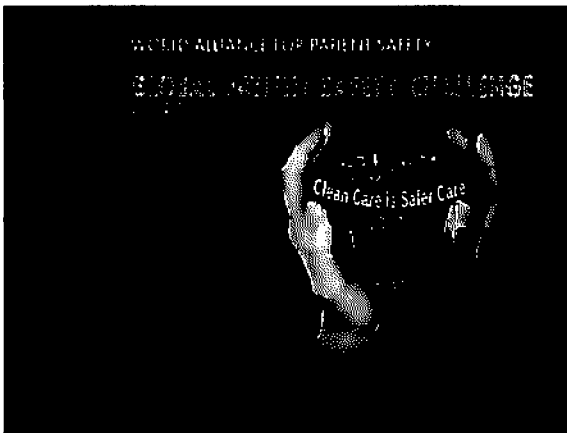


図9

などの重要性が高まります。大量の医療サービスを提供しつつ、個別医療を行わなければならないのですが、意識も組織のインフラも整備されていないことが、今日の医療における混乱を生じているといえるように思います。

日本の医療提供体制の問題：薄く広い体制

医療安全あるいは医療の質は良い医療を提供するためですが、医療機関側にとっては病院集約化の流れの中で、生き残りのかかった問題でもあります。このことを理解するには日本の医療提供体制の特質と今後の動向を知っておく必要があります。逆にこのような医療提供体制であるがゆえに医療事故が起こりやすいともいえます。したがって医療安全を図る上でも、病院運営を改革するうえでも日本の医療体制の理解は必須といえます。

1ベッド当たりの職員数、とくに看護師数が病院機能を規定します。東大病院は、他の国立大学に比べて職員数が多いといっても、1ベッド当たり1.9人です(図11)。わが国では、亀田総合病院や東京女子医大病院が多くの職員を雇用しており、1床あたり2.4人、あるいは2.2人という数字が挙げられています。看護師数については、東大病院は1床当たり0.65人ですが、多い病院で1床当たり1人です。

ちなみに米国では、マサチューセッツジェネラルホスピタル、メイヨークリニック、バンダービルドなどの大きな病院の1床当たりの職員数は18人から8人です(図12)。日米の差は想像を絶するものです。さらに看護師数は1床当たり、少ないところで1.5人、多いところで3人です。無論、米国は在院日数が非常に短いですから、一概に比較は出来ませんが、日本の病院で高度医療を担おうとすれば現場の若い人への負担も大きくなります。これが最近の研修医の大学病院離れ、あるいはかつての医学部紛争の原因にも関わる問題と考えられます。アジアの大病院と比較しても日本の大病院は特異です。シンガポールの大病院を見ると、1ベッド当たりの看護師が1.22人から1.45人、台湾が1.03人、ソウル大学が0.77人程度です(図13)。

だということが分かります。もうひとつお見せしたいのは図9の手洗いのポスターです。これは世界保健機構 WHO が現在進めている病院感染対策のポスターです。世界中で「医療従事者は手を洗いましょう」というキャンペーンを進めています。このような世界的潮流を日本の医療機関も無視することなく、対応することが求められています。

世界中で医療がなぜ変革を迫られているかは興味深い問題です。私の個人的な考えですが、これは「医療の近代化」および「医療における情報化」と関係があるように思います(図10)。産業界でいえば「近代化」は規格大量生産の時代でもあったわけですが、医療では規格大量医療サービスの時代といえます。これは画像診断装置の進歩や検体検査の自動化を待たなければなりませんでしたが、それと踵を接するように医療にも情報化時代が到来しました。製造業や建築業では近代化と情報化の間には数十年の期間がありました。医療では10年くらいの期間しかなかったように思います。近代化は他人と同じものを欲しがるといわれます。情報化時代は他人と異なるものを欲しがるといわれています。当然、個別医療、インフォームドコンセント



|            | 東大      | 京大      | 42国立<br>大学平 | 慶応        | 東京女<br>医大 | 竹田綜<br>病院 | 亀田総<br>合 |
|------------|---------|---------|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| ベッド数       | 1,193   | 1,240   | 766         | 1,072     | 1,423     | 1,097     | 858      |
| 職員数        | 2,224   | 1,800   | 1118        | 2,069     | 3,441     | 1500      | 1,856    |
| 1ベッドあたり職員数 | 1.9     | 1.5     | 1.5         | 1.9       | 2.4       | 1.4       | 2.2      |
| 医師数        | 815     | 633     | 398         | 660       | 1138      | 101       | 231      |
| 1ベッドあたり医師数 | 0.68    | 0.51    | 0.52        | 0.62      | 0.80      | 0.09      | 0.27     |
| 看護師数       | 776     | 709     | 462         | 1,013     | 1,502     | 672       | 633      |
| 1ベッドあたり看護  | 0.65    | 0.57    | 0.603       | 0.94      | 1.06      | 0.61      | 0.74     |
| 入院患者数      | 16,461  | 11,696  | 8,264       | 23,002    | 23,097    | 17,905    |          |
| 平均在院日数     | 22.8    | 29.9    | 27.2        | 15.9      | 18.9      | 18.0      |          |
| 稼働率        | 86.2    | 83.6    | 86.4        | 93.4      | 84.0      | 80.5      |          |
| 1日平均外来患者数  | 3,036   | 2,340   | 1,363       | 4,650     | 3,749     | 2,193     |          |
| 外来延べ患者数    | 743,941 | 573,356 | 333,924     | 1,139,250 | 918,505   | 537,369   |          |

図11

|            | MGH       | MC        | JHH     | CHP     | VUH     |
|------------|-----------|-----------|---------|---------|---------|
| ベッド数       | 875       | 1,951     | 892     | 1,334   | 658     |
| 職員数        | 16,000    | 26,209    | 7,889   | 11,117  | 5,872   |
| 1ベッドあたり職員数 | 18.3      | 13.4      | 8.8     | 8.3     | 8.9     |
| 看護師数       | 2,900     | 2,946     | 2,287   | 3,191   | 1,474   |
| 1ベッドあたり看護師 | 3.31      | 1.51      | 2.56    | 2.39    | 2.24    |
| 入院患者数      | 43,312    | 59,228    | 42,468  | 55,655  | 33,854  |
| 平均在院日数     | 5.9       | 5.8       | 6.0     | 6.2     | 5.4     |
| 稼働率        | 79.88     |           | 78.3    | 70.3    | 76.1    |
| 1日平均外来患者数  | 5,572     | 5,633     | 2,990   | 3,755   | 2,853   |
| 外来延べ患者数    | 1,365,161 | 1,380,000 | 732,485 | 919,896 | 698,960 |

MGH: Massachusetts General Hospital, Boston  
 MC: Mayo Clinic, St. Mary's hosp. and Rochester Methodist hosp., Roches  
 JHH: Johns Hopkins Hospital  
 CHP: Clarian Health Partners (IU & Methodist Hospitals), Indianapolis  
 VUH: Vanderbilt University Hospital, Nashville

図12

### アジアの病院との比較

|           | Singapore National<br>General Hospital | Tan Tock Seng<br>Univ. Hospital | Seoul Univ.<br>Hospital | Taiwan Univ.<br>Hospital |
|-----------|--|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| ベッド数      | 1545                                   | 951                             | 1312                    | 1320                     |
| 医師数       | 503                                    | 581                             | 427                     | 1872                     |
| レジデント数    | 73                                     |                                 |                         |                          |
| 看護師・看護助手数 | 1948                                   | 1381                            | 1597                    | 1012                     |
| 在院日数      | 6.4                                    | 3.5                             | 6.2                     | 1924                     |
| 看護師数/ベッド  | 1.26                                   | 1.45                            | 1.22                    | 0.77                     |
|           |  |                                 |                         | 1.03                     |

図13

このような無理な体制は現場の活動、意識、さらに制度全体にひずみを生じますから、医療のあり方を論ずる際に必ず共通認識としておく必要があります。改革の第一歩はこの状況を職員に知らせることではないかと思ひます。

### 医療事故の背景

広く薄い医療提供体制ではさまざまな医療行為をダブルチェックすることが困難ですから医療事故が起こりやすい。一方、社会が医療の質と安全を求めようとすると医療機関の集約化をしなければなりません。つまり説明できない医療事故が頻発すれば、社会はその医療機関を淘汰する方向に動く状況にあることを医療スタッフはよく理解しておく必要があります。ここにリスクマネジメントを中心とした病院運営の重要性があります。国立大学病院も法人化されて、競争的環境にさらされる、経営責任もあります。今やコンプライアンスが強調される時代となりました。労働基準法や労働安全衛生法を我々も守っていかないといけないわけで、医療事故は経営面を非常に圧迫する要因になります。

先年のJR西日本の事故を見てもおわかりのように、医療事故は、患者さんだけでなく組織、社会、医療体制全体にとっても大変不幸なことです。医療事故は医療あるいは病院というシステムの問題でもあり、現場では問題点を認識しにくいところがあります。しかしよく分析すれば医療制度、病院管理、医療器具、個人の資質などの問題が見出されます。その上で「ヒトは間違える」という人間の本质があります。あたかもタマネギのような重層構造になっていることに気づきます日(図14)。

一番外側には医療制度の問題があります。そもそも医療

### 医療過誤の背景

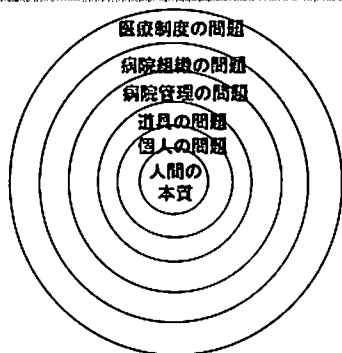


図14

安全は人が多ければ良いということではないのですが、あらゆる医療行為をダブルチェックできれば安全性は絶対が高まります。しかし、診療報酬が低く人件費を十分注げない、そのためダブルチェックができなければ、当然安全性は低下します。

次に病院組織の問題があります。病院長に決定権がなければ当然問題が発生します。これらの要因とは別に、道具の問題もあります。後にも触れますが単純な医療器具がしばしば重大な事故を起こします。

さらに個人の問題もあります。賢い人はすなわち他人の失敗から教訓を得ます。新聞で医療事故が報道されたら、自分の足元がどうなっているかチェックしようと思うわけです。ところが鈍感な人はそういうことが起きていることも知らない。新聞も読んでいないことが多い。話を聞いても他人事で、自分は大丈夫だと思ってしまう。そういう姿勢の人はいずれ事故を起こす確率が高いわけです。

最後の「ヒトは間違える」という点ですが、人間の本质だから仕方ないではなくて、これを考慮に入れたシステム設計が求められるというように理解すべきでしょう。いかに平素の研修や管理をしっかり行うか、またできるだけ fail safety のシステムを構築するかが重要だということです。

### 医療に求められる安全確率

どのくらいの確率、精度が求められるかということを経験してみました。多くの医療従事者にとって臨床現場で仕事をするのは20~30年間のことが多いと思います。したがって50年に1回程度の頻度で重大なミスをおかすことはやむを得ないように思います。問題は、多くの医療行為が単独で行われていることです。ダブルチェックがほとんどされていません。大病院では職員も手数も多い、道具も多い。1,000人看護師や医師がいると、1人当たり50年に1回の重大なミスをおかせば、病院としては年に20回起こります。すなわち規模が大きければ病院としての事故が多くなる。

### 医療過誤防止に求められる安全基準

現在の医療は単独パイロットによる小型旅客機の操縦

各人が重大なミスをする確率を1回/50年とすると  
1000人の医師、看護師が勤務する病院では

$$1000人 \times 1回/50年 = 20回/年/病院$$

病院として医療過誤の発生を1回/50年とするためには、  
1000人の医師、看護師の勤務する病院における  
個人レベルの過誤発生率は

$$1回/50年/1000人 = 1回/500000人$$

品質管理における6σの発想が必要

図15

### 安全のための障壁

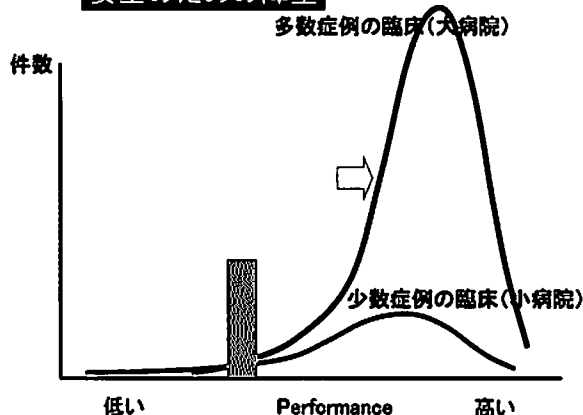


図16

これが大学病院で医療事故が頻発している理由です(図15)。

これがなかなか実感として若い人たちにはわからない。多分、到達目標を一人一人に聞くと、キャリアのうちの1回、50年に1回ぐらいはやむを得ないと思いがちです。その姿勢で大きい病院で勤務をすると事故が頻発するのです。大きい病院は小さい病院と同じような教育や研修システムをしていてはだめで、より厳格なシステムを作らなければいけないということを意味します。

病院として重大な医療事故の発生率を50年間に1回までに減少させるためには、1000人の医療従事者が働く病院では、一人当たりの事故率は実に5万年に1回となります。少なくともこれだけの安全率を達成するためには高度の管理体制を作らなければなりません。研修も徹底する必要があります。しばしば医療安全を厳しく指導すると、「人手が足りないからできない」という反応が返ってきます。しかし実際には職員数が増えるとかえってリスクが高まることとなります。逆に徹底した安全教育ができた病院が職員を増員できると考えるべきでしょう。

またこのことは医療における品質管理と深い関係があり

大学病院における  
薬・点滴の誤投与率(平均値)

薬の誤投与率 = 2.3件/100人(新入院)

輸液の誤注入率 = 1.4件/100人

大学病院の医療の質・安全に関する調査(2004)

図17

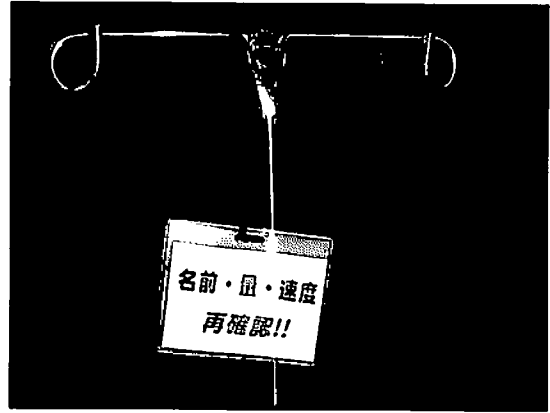


図19

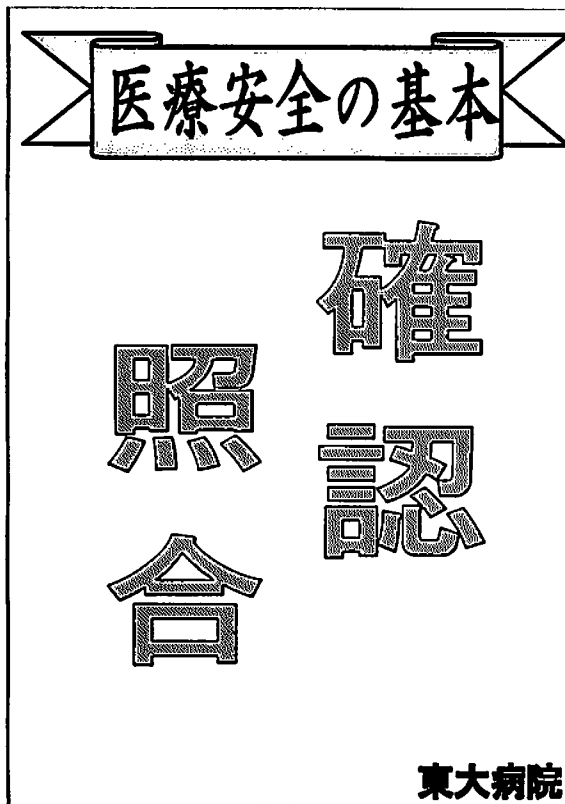


図18



図20

けです (図16)。

### 現場における医療安全対策の実例

多くの医療事故を見ておきますと、問題は実施直前の最後の確認をしていないということに気づきます。数年前に全国医学部長病院長会議で大学病院の医療の質、安全に関する調査を行いました。このなかで薬剤投与の際の、患者誤認、薬の取り違い、薬の量や投与速度の間違いなどの発生率は、実に新入院患者100人に対し3.7人、30人に1人は入院中に間違えられてしまうのです(図17)。いかにこれを低減させるか、意識改革だけでなく管理体制など体系的な取り組みが求められます。

私たちは最後の確認を徹底するために、まず「確認・照合」のポスターの作成(図18)、全部の点滴台に「名前・量・速度再確認」を吊るす(図19)、全部の輸液ポンプに「名前・速度指差し確認」のラベルを貼るなどをしましたが(図20)、このようなことでは取り違いは余り減りませんでした。

比較的的成功したのは、患者さんに点滴をつなぐときに、

ます。医療の近代化によって短期間に多くの患者を診療することが可能になりました。手数がかかり多くの人手が必要な高度の医療も進歩します。しかしながら少数の患者を診療していた時代の感覚で病院が活性化すると医療事故が増大して社会的信用が失墜します。これを防止するためには医療のばらつきをなくす、すなわち標準化が必要になります。標準化によって必ずしも卓越性が損なわれるわけではなく、むしろ平均値を改善し卓越性を向上させながら、はずれ値を発生しないように管理することが求められるわ



図21



図23

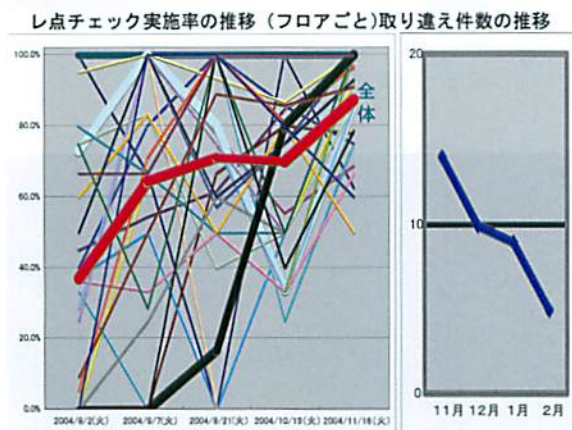


図22

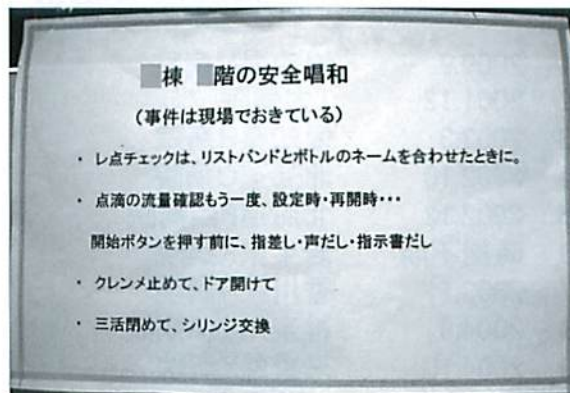


図24

患者名と量を確認したことを示すレ点を点滴ボトルにつけるようにしました(図21)。これで大分減りました。しかし、まだ根絶までは行っていません。レ点をつけずに間違えたということがありますし、中にはレ点がついているのに間違えたということも起こるので、結局バーコードを導入しないといけないと思いますが、なかなか安全意識は徹底しないことを痛感しています。

点滴の確認にレ点をつけるというのは管理を容易にします。安全意識がどのくらい徹底しているかが管理者にわかる、つまり抜き打ち調査を各フロアで行えば、ルールがどの程度守られているかわかります。ルールを決めて1ヶ月後は40%程度、2ヶ月後に60%になって、今は大体100%になりました(図22)。フロアによっても対応が違うのを見ると、看護師の安全意識は決して高くないことを実感しました。しかし看護部も次第に意識改革が進み、全看護師に対する輸液ポンプの使用法に関する試験(図23)や朝の引継ぎの際に各フロアで安全唱和をするなど(図24)、積極的に取り組むようになりこの問題も解決しつつあります。

## カルテ調査

2004.1

退院後1週間以内のカルテ提出率  
63% (505/802)

指導医のカルテ不記載  
24% (182/748)

手術症例の退院1週間以内の手術誌未記載率  
6.8% (21/310)

図25

医療従事者の抜き打ち調査はカルテ記載や手洗いについても同様です(図25, 26)。特に病室の出入りの際に速乾性消毒液で手洗いをしているかは院内感染対策上、大変重要です。いろいろな注意喚起を無視する医師、看護師は依然多いのですが、徐々に意識改革が進み、平成18年度の入院

**手洗い実施率**

●医師の病室出入りの際の手洗い実施率  
(実施期間2月21日～27日)

B棟3/4:62%(16/26)  
13南:57%(8/14)  
11南:53%(9/17)  
12南:50%(5/10)  
14北:45%(9/20)  
12北:40%(8/20)  
11北:35%(9/26)  
13北:30%(6/20)

図26

**胃管の気管内誤挿入事故**

- |    |         |          |
|----|---------|----------|
| 1  | 2000.9  | 岩手県M病院   |
| 2  | 2001.12 | T大病院     |
| 3  | 2002.3  | 愛知県H病院   |
| 4  | 2002.10 | 北海道O病院   |
| 5  | 2002.12 | 北海道F西病院  |
| 6  | 時期不明    | 岩手県K病院   |
| 7  | 2003.11 | 香川県N病院   |
| 8  | 2004.8  | 神奈川県A病院  |
| 9  | 2004.10 | 三重県Y病院   |
| 10 | 2005.3  | 千葉県Jセンター |
| 11 | 2005.5  | 長野県K病院   |
| 12 | 2006.9  | 新潟県N市民病院 |
| 13 | 2007.1  | 徳島県H病院   |

図27

後の新規 MRSA 発生患者は平成15年度に比べて絶対数で1/2, 新入院患者の割合では, 1.5%から0.6%にまで低下しました。このことはいかに医療従事者が院内感染の原因となっているかを示しています。

薬を間違えて患者さんが亡くなった場合には, 看護師は当然, 業務上過失致死罪を問われます。間違えた看護師本人だけの問題ではなくて, 指示を出した医師や, 救命できなかった場合は近くにいた医師にも責任がかかる可能性があります。取り間違えというヒューマンエラーは, 徹底して社会全体で抑えるようにしていけないと思えます。

次に医療器具の危うさです。高度な器具の話ではなく, 簡単な医療器具でたくさんの事故が起こります(図27)。例えば, 胃管の気管内誤挿入事故は繰り返し報道されています。東大病院でも平成13年に起こりました。胃に入れるべ

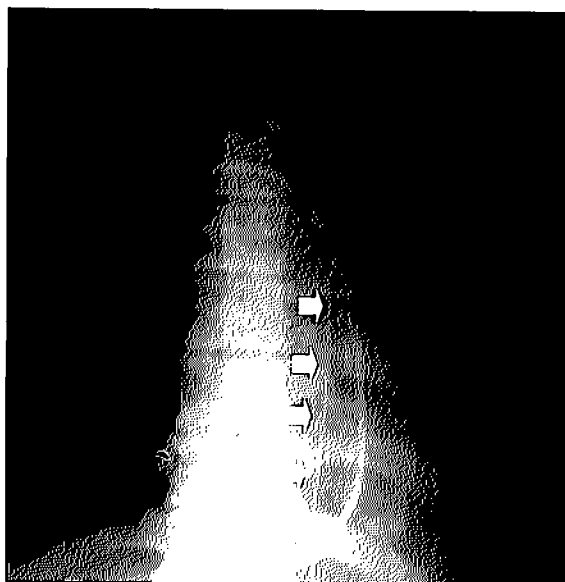


図28

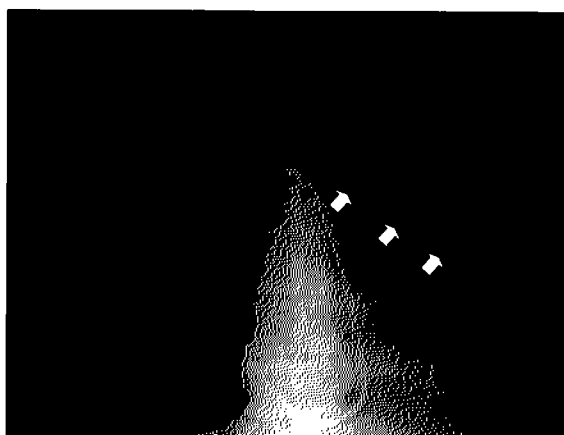


図29

きところ, 肺に入ってしまうことがあるのです。肺に入ったら, 苦しくてせきが出るだろう, 声も出ないはずだといっても, 高齢者ではまったくわからないことがあります。そのまま経管栄養剤を入れてしまうと, 重症肺炎を起こし死亡率は極めて高率です。

実は胃管が前日は胃に入っていたも, 翌日たまたまレントゲンを撮ったら気管に入っていたケースを経験したことがあります(図28, 29)。これは人間の問題というよりも, 器具の問題です。安価な器具ですからメーカーも本気になって開発しようとしなないわけです。2, 3カ月前にアメリカからこんな道具が届きました。磁石を胃管の先端に当てると手元でランプが光るという仕掛けになっていました(図30)。

もう一つ深刻な話として, 輸液ポンプの問題があります。

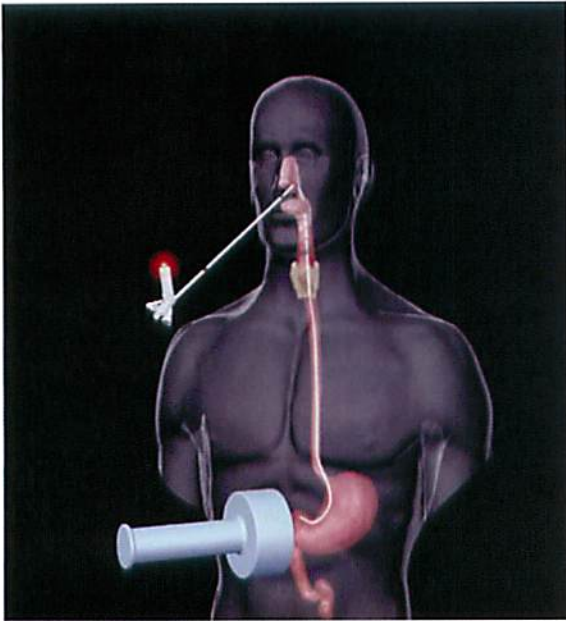


図30

## 輸液ポンプのフリーフローによる事故

### 薬剤過剰投与で男性患者が意識不明

〇〇大病院で〇県内の60代の男性が、通常の5-10倍の不整脈用剤を過剰に投与されたことから一時心肺停止になり、現在も意識不明の重体であることが3日、分かった。

病院側の説明によると、男性は〇〇市内の別の病院に入院していた時から不整脈があり、不整脈用剤「リドカイン」による治療をしていた。

1月中旬、この病院から胸水の治療のため〇〇大病院へ転院。病室で搬送用のストレッチャーからベッドへ移動後、30代の女性看護師がリドカインの輸液ポンプを取り換える際に点滴ラインのクレンメを閉め忘れ、通常の5-10倍当たる約500ミリグラムが1-2分で投与されたとみられるという。

【産経新聞HP:2004年2月】

図31

輸液をとめるクレンメを閉めてからラインをはずさないといけませんが、うっかりしてクランプしないでラインをはずすと輸液が全開となり、カテコラミンや抗不整脈薬では患者さんは死亡します(図31)。

これについても注意喚起を繰り返していますが、何千人もの人が勤務しており、毎年2~3割の人がどんどん入れかわっているために徹底しない。現在、メーカーもいろいろ考えて絶対に全開の事故が起こらないポンプを開発しました(図32)。我々が便利なように使っている道具には、さまざまな危険が潜んでいるということ、メーカー側も実態を知って安全な製品の開発に努力すべきと思います。

## フリーフロー防止装置付の輸液ポンプ

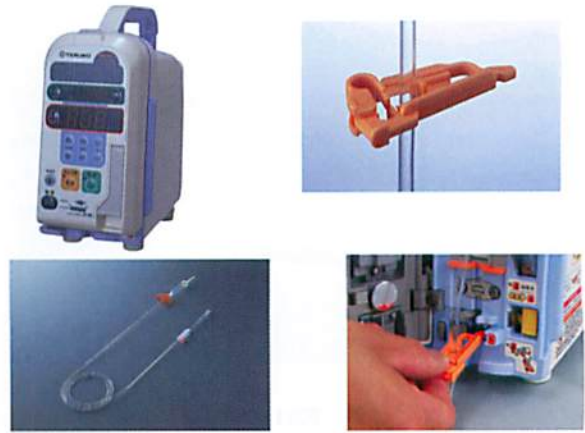


図32

## 問題

2% 静脈用キシロカイン注射液(主成分 塩酸リドカイン) では50mgは何mlに相当するか。

正解率 11%

図33

## 基礎知識の危うさ

時代や世代が変わると基本的な医療知識が浸透しなくなります。その典型例が%表示の注射液の濃度です。最近では小学校で食塩水の濃度を%で表すことを学習しますが、その後はほとんど%濃度を使用しません。そのため1%リドカイン注射液50mgをワンショット静注といっても理解していない学生や研修医、看護師がたくさん存在します(図33)。そのことに指導医たちが気づいていないことが大きな問題です。試験をしてみると希釈計算も満足にできません。医学教育と現場での教育を徹底すると共に、できるだけ%表示の注射液を排除する、アンプルを保管している薬品棚に〇〇mg/mlという表示を行い注意喚起することが大切です(図34)。また、医薬品メーカーにもわかりやすい表示をするよう働きかけをすべきです。メーカーに相談することによって表示法を変更してもらったこともあります(図35)。



図34

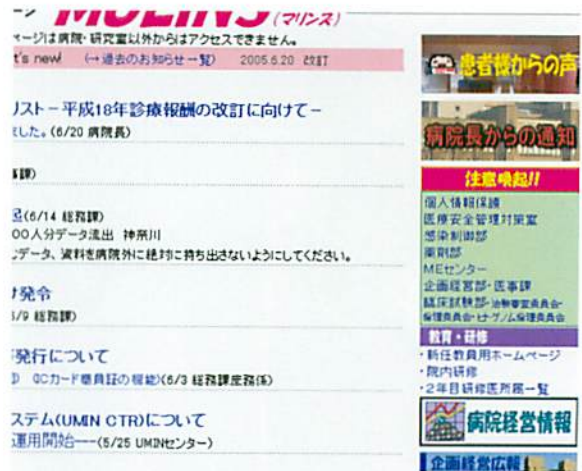


図36



図35

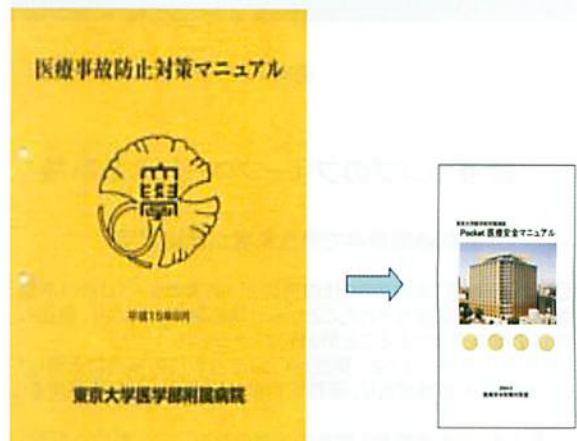


図37

## IT や映像の活用

東大病院ではITの活用も積極的にすすめています。職員用のホームページには、患者さんの声、病院長の通知、注意喚起をたくさん挙げています(図36, 37)。あるいは、新任の人のための欄、経営問題などの情報を提供しています。大学病院は、医学は教えるけれども、医療学は教えないという指摘がありますが、この院内ホームページに医療学の課題がたくさん掲載されています。

これらの情報を医療安全の感受性のある人はきちんと見るのですが、無視する人もたくさんいます。そこで最近ではまず医療安全マニュアルをポケット版にして全員に配布し(図38)、その上でeラーニングを用いて、医療安全に関する問題、レントゲンの読影、個人情報保護などの問題を出題して、業務の合間に全職員が取り組むということも始め

## 手首拇指側の採血は神経損傷を起こす可能性があります

手首拇指側の静脈の裏側や脇には橈骨神経の知覚枝が走っており、これを損傷すると手知覚障害だけでなく難治性の疼痛やしびれ感を残す恐れがあります。これは反射性交感神経性ジストロフィーと呼ばれる重篤な合併症です。

これにより最近多数の訴訟が発生しており、150万円から4600万円までの賠償が命じられています。できるだけ手首拇指側の静脈、とくに利き腕側は避けてください。やむを得ない場合は、皮膚から血管に至る経路だけを刺すようにしてください。詳しい合併症と解剖図は、医療安全管理対策室HIPをご覧ください。



図38

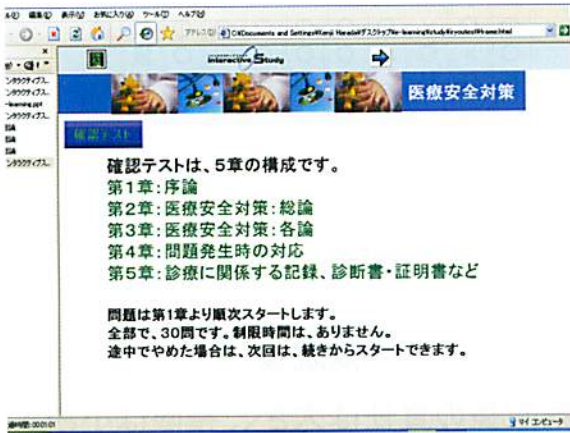


図39



図41



図40

### 患者中心のチーム医療

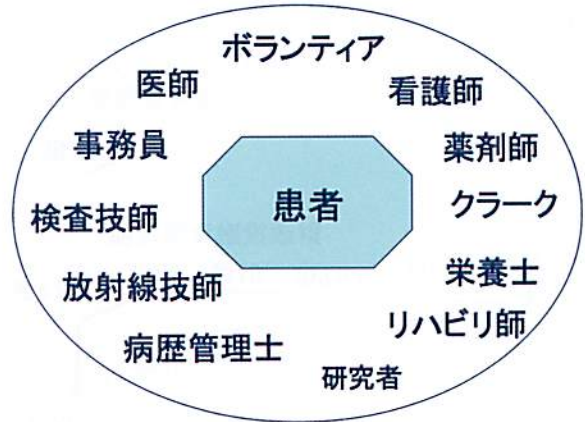


図42

ました (図39)。

最近ではメーカーに協力を求めて、医療安全のビデオを作製しました (図40)。これは典型的な医療事故がどのようにして起こるかを役者によって再現したもので、視覚的に理解してもらうのに有用です。このような教材を多数用意することによって、医療安全も徹底するはずですが、その他、心理学の研究者と一緒に、職場のセクショナリズムを克服するための「小さな躊躇を乗り越えよう」という教育ビデオも作成し教材としています (図41)。これは患者中心の医療を忘れて職種間や診療科間のセクショナリズムに走る傾向を認識すると共に、これを克服してもらうのに有用と考えています (図42, 43)。このビデオではイングループ、アウトグループという概念が紹介されています。これを受けて、全病院をあげて院内感染を防止するための「私は手を洗っています」というバッジを全員につけてもらいました (図44)。これは後に述べますように院内 MRSA 新規発生の著明な減少に役立ったと思います。

### イングループとアウトグループによる患者軽視の医療

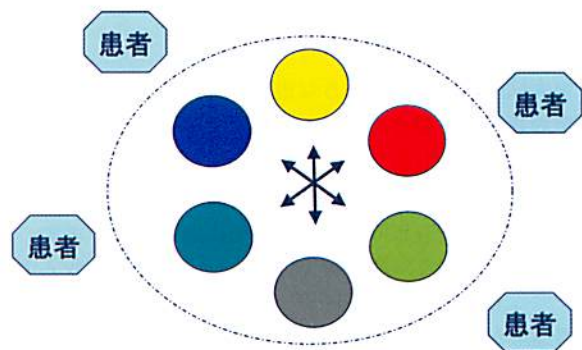
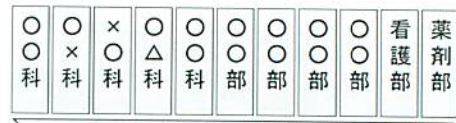


図43





図44



病院長

病院長の責任は大きく、権限は小さい。  
調整役としての機能

⇒ 意識改革、組織改革は困難

図46

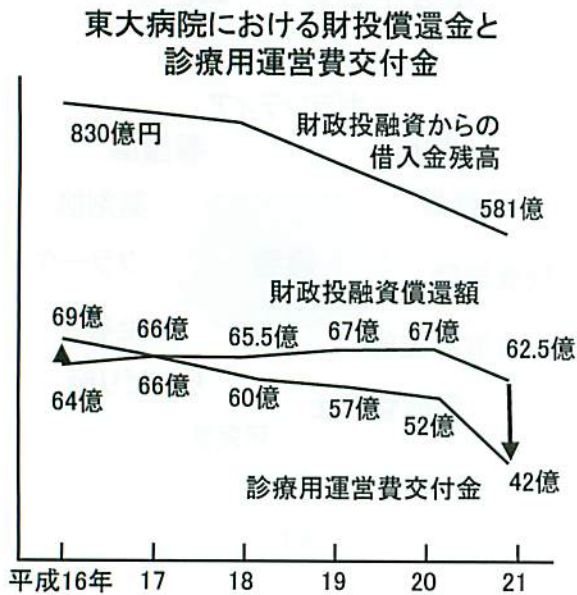


図45

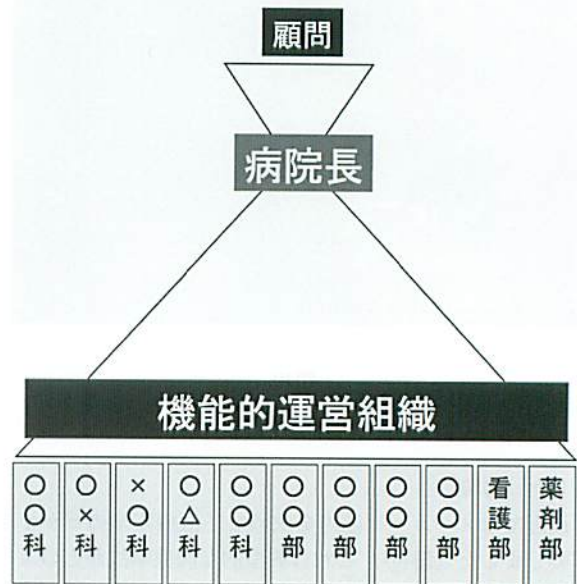


図47

### 東大病院の組織改革

東大病院には非常に大きな借金があります。一般に国立大学の建物は一般会計すなわち税金で建築され返済の義務はありません。しかし、国立大学病院の施設は返済の義務を負う財政投融資によって建てられます。東大病院にはその借金残高が現在830億円あり必死に返済しています。そういう状況の中で、運営費交付金が平成15年度の収入の2%、すなわち5億5千万円ずつ毎年減っていきます。財投の償還額が今後増加する中で、交付金が減少することは深刻な影響をもたらしています(図45)。大学病院によっては破綻する可能性があり、東大病院も平成21年度には極めて厳しい状況に陥ると懸念されています。このような状況で

は、医療安全が病院の存亡に関わる問題となります。これは単に経営の問題というだけではなく、医療に対する社会の信頼回復という視点から考えなければならない問題だと思います。

東大病院改革は体制の見直しから始めました。病院長の責任は重いのに権限は少ない、いわば下向きの三角形の頂点にいるわけで、調整役としての機能しか与えられていませんでした(図46)。やはり上向きの三角形の頂点にいないといけない。また病院長の後ろには顧問を従えておいて、責任を分担してもらえるような組織が必要です(図47)。さらに各診療科や診療部、中央部門、看護部、薬剤部を縦割

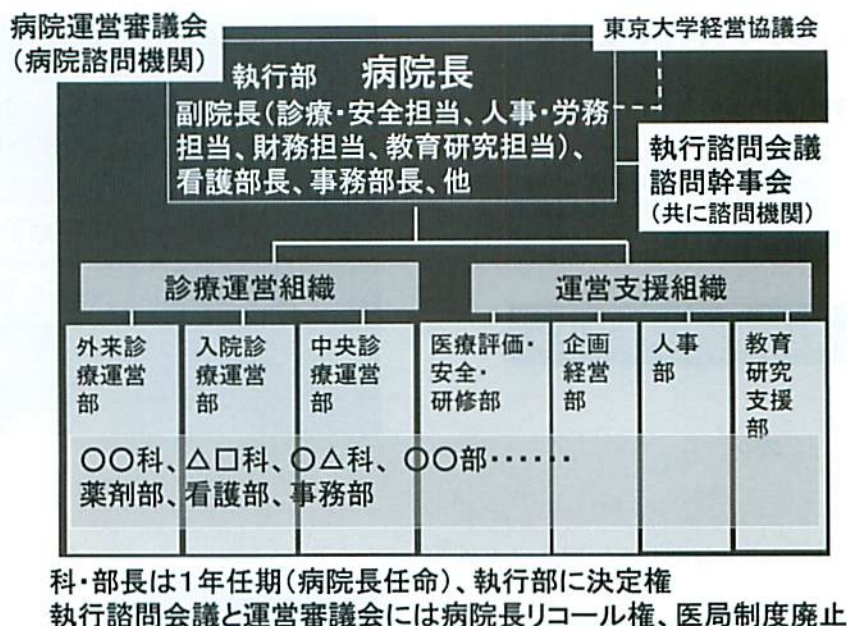


図48

りの組織から機能的な運営組織に変換させようと考えました。

機構改革の中心課題は決定権です。従来、臨床系の教授会、病院会議といいますが、ここに全決定権が集約されていました。下部組織である委員会の決定も重みがあり、覆すことは困難でした。病院長は「統治せず」、まさに象徴あるいは調整役としての存在でした。大学病院の機構改革は連鎖的に多くの変革を必要とします。そこでまず病院の執行部に権限を集中することにしました。後見人である病院運営審議会には総長に指名された方や外部の方にも入ってもらっています。この審議会では、組織の統廃合、大型予算、人事などについて意見をいただいています。なお従来の病院会議(臨床教授会)は執行諮問会議という形にいたしました(図48)。

病院において各臨床科や部はいわばテナントであり、自分たちの領土ではないという意識改革も進めました。各科を横断する組織、すなわち外来診療運営部、入院診療運営部、中央診療運営部、医療評価安全研修部、企画経営部、人事部、教育研究支援部が各科・各部を統括していきます。看護部、薬剤部、事務部についても独立した存在ではなく、全てテナントとして位置づけをしました。

さらに科長、部長は1年任期とし、病院長に決定権を与えました。従来は教授であればa prioriに科長、部長となりましたが、法人化後は必ずしも一致しない、科長、部長の決定は病院長の権限とし、しかも1年任期としました。別に毎年交代するわけではなく、お互いに緊張感をもつという意識改革に役立ったと思います。とくに医療安全対策や各科の方針と病院の方針の調整などには必要なシステム

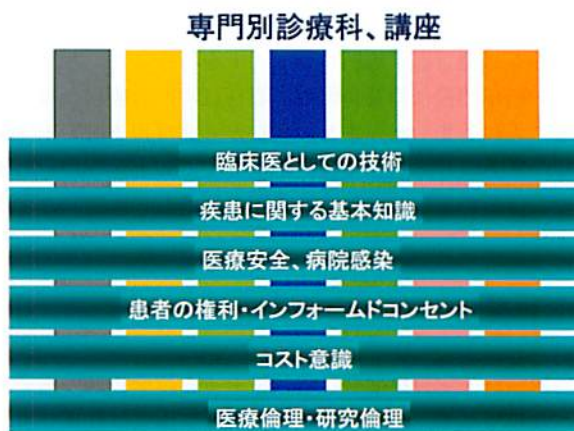


図49

と考えています。なお、病院長の独裁体制にならないように、病院運営審議会と執行諮問会議(病院会議)には、病院長のリコール権を与えてあります。

専門家集団は縦割りの組織です。高度な医療、安心な医療を提供するには専門家集団が必要ですが、縦糸だけでは甚だ心もとないわけです。例えば、専門分野のことは知っていても、広く臨床医としての技術、病気に関する基本的な知識、抗生物質の基本的な知識に問題がある専門医も多くおられます。一方、横糸だけではとても病院は成り立たない。やはり縦糸と横糸がうまく織りなされて、布のように強くなったときに非常に力が出てくるのだらうと思います。ただし状況は時代によって異なります。横糸が非常に強調

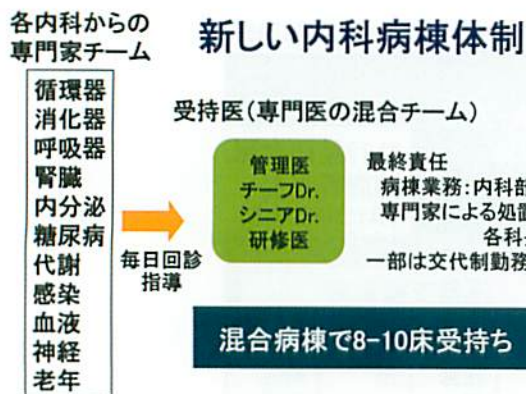


図50

される今のような時代と、もっと縦糸を走らせないとだめだという時代が交互にやってきます (図49)。

この機構改革を利用して内科の診療体制の改革を行いました。平成10年度より臓器別の診療科体制となったため、内科の専門分化は進みましたが統合をどのように図るかが課題でした。そこで研修必修化をきっかけに内科の混合病棟では複数の診療科が受け持ちチームを作って、非専門領域であっても診療するという体制としました (図50)。各診療科からは毎日必ず専門コンサルトを行うこと、ケアの責任は内科部門長に検査や治療の責任は専門診療科の科長ということにしました。また、各科から病棟担当医を出す場合は一人当たりの負担は各科平等とすることが決められました。これによって内科診療科間の風通しが改善したと見えます。

### 定員再配置

各診療科の定員再配置は時代にあった診療体制の構築というだけでなく、医療安全からも極めて重要な課題です。これは従来、大学病院改革の中では手をつけられなかった部分ですが、東大病院では平成12年から助手ポストの1割を(現在は3割)臨床実績に応じて再配置を行うようになりました。診療科の歴史によりポストは必ずしも臨床のアクティビティを反映していませんでしたが、2年に1度の再配置を行うことにより不平等感に対応することができるようになりました。

### おわりに：医療安全の考え方

医療事故を絶対起こさないということは至難の業です。むしろ問題は医療事故防止のためにどのような教育や意識改革を行い、管理体制をとっていたかが重要です。その意味では、トップダウン式の安全対策は長続きせず、自発的な取り組みが求められます。このような取り組みとして最近、医療KY(危険予知)活動が注目されています。建築

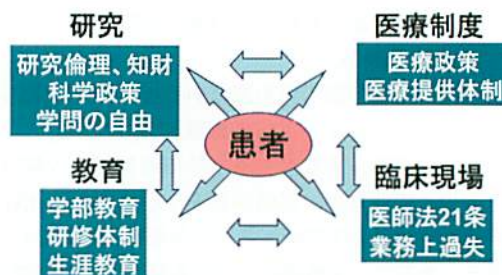


図51



図52

### 医療の全体像



- ・全体が円滑に連動したときに医療の質が向上し、患者の権利が保証される。いずれの独善性も排除すべき。
- ・全体の体系を自律形成能をもって成長させるための学術体系の構築が必要。
- ・当面は透明性、評価系の強化で対応

図53

現場では最近、KY という標語が掲げられていることに気づきます (図51, 52)。インシデントや事故が起こってから対策を考えるのではなく、身近にある危険を全員で指摘し早めに対策を取ろうという活動です。労働災害の防止のために厚労省が力を入れています。同じように医療現場でも患者さんと医療従事者を守るために積極的にこの活動を取り入れる必要があります。

医療は医療現場だけでなく、教育、研究さらに医療行政すべての活動を含みます。これらは相互に連携しており、非常に複雑なシステムを構成しています。いずれが機能不全に陥っても、逆に原則論に走りすぎても医療は崩壊します。とくにそれぞれの要素が排他的な独善主義に陥る危険性を常に意識しておく必要があります。医療事故はあってはならないことで、すべて刑事責任を問うとなれば、現場

から医師は立ち去ることになるでしょう。したがって医療事故という結果を問題にするのではなく、防止や発生した後のプロセスが重要なのです。そのため、平素の病院管理体制をしっかりと行うことと、その状況に関する透明性を高める必要があります。おそらく医療という複雑系を理念に向けて動かすためには、独善性を排除しながら透明性や公正な評価システムを作っていくことしかないのではと思います。これによって社会の医療に対する信頼は回復するはずで、医療従事者も患者、社会が協力して医療というシステムを健全な形で動かすことが出来るようになります。病院ガバナンスの一環としての医療事故防止の取り組みを、新しい学際的な医学の研究領域として開拓する必要があると思います (図53)。

# V. 緊急時の情報リスクマネジメント

株式会社博報堂 コーポレートコミュニケーション局長

後藤 正彦

## はじめに

広告会社は元気な会社の広告で成り立ち、企業が病んだ際には、早く直す機能として、かなり以前から広報上のリスク対応を行ってきた。本稿は緊急時を中心に述べていきたい。

組織を病院に置き替えて想定すると、どんなリスク環境下にあるか。天災、犯罪、医療事故、医療過誤、職員のトラブル、権利問題等々、病院を取り巻くリスク環境は多岐にわたる。その都度対応がなされているが、対応を誤るとマスコミに流れ、誤報あるいは過熱取材という形で戻ってくる。このサイクルが今、民間企業における風評の主流になっている(図1)。

## 第一報入手、情報入手

病院はニュースバリューが高い組織である。本来病院は事故がゼロであるという前提に立っている。医療事故が起こるわけではないと患者は思っている。それでは緊急事態が起きたとき、最小のダメージで食い止めるにはどうすればいいのか。

活動レベルが、一定レベルにある組織において、何か事態が発生するとその組織は凋落していく。一般企業であれば市場から退場、倒産、あるいは社名を変えないと存在しえなくなる。そういった事態に陥った企業は緊急時対応をし、一定レベルに戻ろうと努力する。

クライシスマネジメントという言葉をよく聞くが、それはこの緊急時の対応だけを指す。本来リスクマネジメントというのは、平常時から緊急時、リカバリーも含めた終

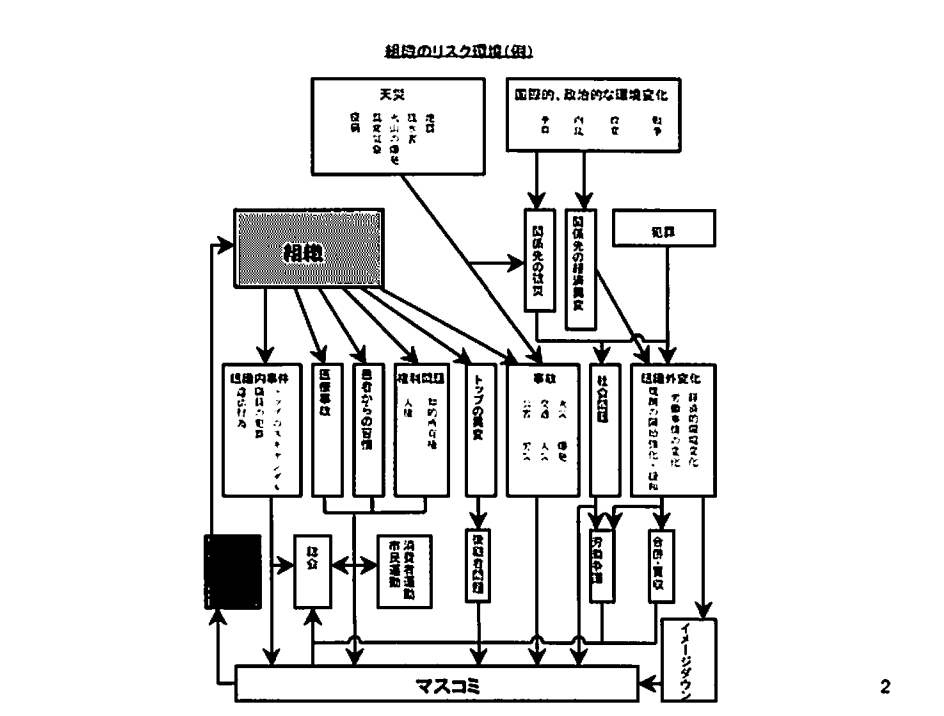


図1

## リスクマネジメントとは

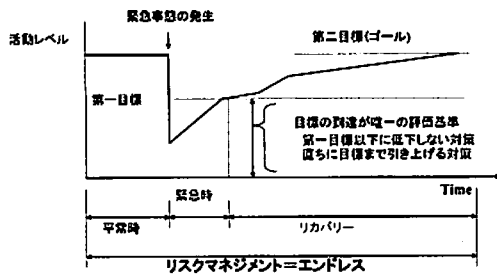


図2

わりのない活動、これを総合したものをいう(図2)。

緊急時のリスクマネジメントでは平常時の対応が8割を占めるといわれている。平常時の活動がしっかりしていれば8割は顕在化しないでリスクで止まる。不測の事態や新しいリスクがどうしても出てくるため2割ぐらいが顕在化するが、顕在化するものが全て悪いわけではない。上手に対処できれば幸運であるが、上手に対処をされるケースは非常に少ない上に、世間の目に留まるものも少ない。メディアは失敗事例を喜んで取り上げるが、成功事例は取り上げない。

不測の事態が起きたときに最初にしなければならないのは、情報の入手である(図3)。ほとんどの場合、情報がジグソーパズルのような状況下で事態が発生する。5W1Hは揃っておらず、噂・憶測が飛んでくるかもしれない。その時にどうやって情報を集めるか、平常時から事前の対応を作っておかなければならない。まずは窓口を一本化する。縦割り組織の中では情報は加工されることが多いため最終的に判断する人が、真の情報を知らずに判断をすると大変なことになる。

第一報は不完全・不正確である。噂・憶測もあるので、責任者は必ず情報の出所と誰が確認をしたのかを併せて報告させる。これは非常に重要である。事故などは、定期連絡・定時連絡をさせることが大原則である。特に医療過誤、病院の事故等、人命に関わる、しかも進行型の事象の場合には、30分、1時間おきに定時連絡をする。そのときに報告の内容が前と何の変わりもない、このこと自体が非常に重要な情報になる。そして与えられた時間を計算すること。新聞では事件や事故が1回しか報道されないケースが8割である。1回しか報道されないケースはコメントを載せるチャンスも1回しかないので、取材に対して組織コメントをきちんと作る必要がある。

## 対応機能と体制

組織が持つとよい対応機能が5つある(図4)。調査機能

## 緊急時対応のポイント

### ※第一報入手、情報入手

- ☑情報窓口の一本化
- ☑第一報は不完全、不正確
- ☑「変化無し」も情報
- ☑与えられた時間を計算する

図3

## 緊急時対応のポイント

### ※対応機能、体制

- ☑調査、渉外、広報、対策立案 + 連絡
- ☑トップに直結
- ☑組織を代表できるスポークスマン
- ☑健康管理

図4

(起こった現場に一番近い専門家が調べに行く)、渉外機能(警察・消防等や役所関係の対応)、広報機能、対策立案(基本対応を考える)、プラス連絡である。連絡は調査担当者が途中で議論をはじめるとその機能が止まるので、連絡だけ別にする。

緊急時には人・物・金が必要になるのでトップに直結し、組織を代表できるスポークスマンを選ぶ必要がある。メラビアンの法則によると、初対面の場合、55%は外見、38%が喋り方、内容は7%しか残らないという。信頼を得られ、話す内容が真実として伝わる、そういう人選が重要になる。企業ではスポークスマンに対して、いざという時の表情や喋り方をトレーニングするメディア訓練を行っているところもある。

また、健康管理も重要となってくる。事は一瞬で終わるわけではなく、長い場合には数週間続く。特にメディア対応をする人は、不眠不休が続く中で、記者対応をするのは無理があるので休息が必要である。企業には産業医の協力を得て健康管理体制を作ることをお勧めしている。

## 緊急時対応のポイント

### ※抗議対策

- ☑標準対応話法
- ☑クレーム対策

7

図5

## 緊急時対応のポイント

### ※取材対応

- ☑メディアの関心事
  - ☑事実、経過、原因、対応策、コメント
  - ☑過去のケース、関与する人々
  - ☑ポジション・ペーパー
- ☑取材の制限
- ☑プレスルーム

8

図6

## 抗議対策

抗議対策も必要になる。予想外に早い段階で代表電話、事務局などの電話が鳴ることがある。半分は同業他社、半分はマスコミである。マスコミは取材側として、直接広報担当に取材しても情報は得られないことは解っているから、現場の声を聞きたがる。同業他社は何が起こったか知りたいが、身元が分かるところに電話するわけにはいかない。抗議対策としてよくとられるのは標準対話法である(図5)。「ただ今原因究明と対応策の決定を急いでおります。お知らせできるようになりましたら、ご連絡しますので、恐れ入りますがお名前とご連絡先をお聞かせください」。これだけのフレーズを印刷して用意しておく。必要であれば先方は名乗って連絡先を伝え、マスコミ取材や同業他社はその場で切れる。対応者がそれぞれ勝手に答えると、後になって問題になることが多いので、情報コントロールという意味でも標準対話法をお勧めする。大組織の株主総会の前には、電話をかけてきて内容をICレコーダー等で音声録音をして言質をとることもある。

## 取材対応

メディアの関心事は、事実、原因(何故それが起こったのか)、経過(起こった後のプロセス)、対応策、コメント(謝るのか謝らないのか)の5つである(図6)。

この5つが全部入っているのが車のリコールである。例えば、「この春以降ブレーキ系統に問題があるというお問合せを多数いただきました。調べたら部品の欠陥です。全てリコールにします。ごめんなさい」と言うのが全部入っている。最近の企業は、原因究明に時間がかかり対応策が不十分で追求されるケースが多くなってきている。

必ず聞かれるのが過去のケースである。この病院では過去にどういうことがあったのか、なければ他の病院で同様の事例があったのではないか。メディアはリストを持って

いて、有名な事例はすぐに出てくる。

そして関係者の個人の住所が電話帳や卒業生名簿などでオープンになっていると、記者が待ち伏せして家族も含めて迷惑を被る可能性があり、大きな事例になると当人と家族が一時避難をすることもある。

企業に勧めているのは、ポジション・ペーパー(公式見解)を作るということである。メディアの関心事で挙げた事実からコメントまで5つの部分を、何時何分現在というバージョンで作り上げ、関係者で共有するというにより同じ対応ができる。ポジション・ペーパーは広報が真っ先に手がけるリスクマネジメントの作業と言われている。

取材には制限があり、記者にどこでも自由に取材許可して良いわけではない。一般に取材お断りが3つあるといわれていて、人命に係わる場合・企業機密に係わる場合・取材現場が危険な場合である。緊急事態が起きた時に記者を待たせる場所を決めておいたほうがよく、建物内に入ると記者は対策室や院長室のある階のトイレの個室に潜んで、情報収集することもありうる。

## 調査と評価

調査と評価は早い段階で実施すべきで、記者やジャーナリストが基本として聞きたいのは、ダメージの大きさ、人数、金額である(図7)。従って数的な把握が必要になり、一桁も違う数字は許されない。もちろんそれは良くないが、わからないことはわからないと答えてもよいのが緊急時の対応である。

次に世論の把握。警察に係わるような事件・事故が起こった場合、テレビニュースを見て関係者が初めて知ることがある。その時に事態を世の中がどうとらえているか、加害者としてみているのか被害者としてみているのか中立に扱っているのか、これを把握する必要がある。モニター分析をすることが重要で、テレビニュースのモニターは録画しておくことをお勧めする。

## 緊急時対応のポイント

### ※調査と評価

- ☑ 事態の確認、正確な把握
- ☑ 世論の把握
- ☑ モニター分析

図7

## 緊急時対応のポイント

### ※対応方針の決定

- ☑ 「世の中尺度」で考える
- ☑ 最悪の事態を想定
- ☑ 方針や命令の訂正、修正は極力避ける
- ☑ 警察、消防等の関係先への協力姿勢

図8

## 対応方針の決定

対応方針を決める時に重要なのは、「世の中尺度」で、事態によって変わる。「世の中尺度」としてどこまでの高さの対応策ならクリアできるか、これは常に考えていただく必要がある(図8)。それから最悪の事態を想定しておく必要がある。楽観的なシナリオで作った対応策は事態が一段悪くなると作り直しになり、これまでやり直しの対応がうまくいったケースというものはほとんどない。最悪の事態で考えた対応策、これは事態がよくなれば実行しなければよいだけだから、この差がいかに大きいかは理解いただけだろう。一度決めた方針は、効果が現れるまでは本来は変えてはいけませんが、誘拐などの場合は情報を出せないで事案が明らかになった場合に修正する。警察・消防、マスコミには情報開示も含めて協力姿勢は早い段階で明らかにし、発表をする。緊急的な事案の場合にはここまで30分から2時間ぐらいで対応することが望ましい。スポークスマンは記者会見慣れしていても、緊急時の会見は頭が真っ白になることがあるので、文章を持たせて壇上にあげる。これは事務方も含めて是非覚えておいて欲しい。医療関係の場合、口頭での説明は難しく、専門用語が出てくることがある。可能であればイラストあるいはVTRを用意すると、非常に有効になる(図9)。以前にアメリカで缶入りの飲料に注射針が入っていて、それを3大ネットワークが放映、3日後ぐらいには全米で50件以上「飲んでしまった」と大騒ぎになった。飲料メーカーは、充てん工程の映像を配信して、絶対入るわけがないことを納得してもらい終息した事案がある。

## 発表

緊急時の発表で言えないこともあるが、言えないときは何故言えないのか理由を添え、わかっている範囲の事実を伝える。記者会見は1回で終わるわけではなく、長引く場

## 緊急時対応のポイント

### ※発表

- ☑ 発表は出来るだけ文書で
- ☑ VTRやイラストも有効
- ☑ 分っている範囲内の事実だけ
- ☑ 発表内容の一貫性
- ☑ 冷静な対応
- ☑ ノーコメント、オフレコ
- ☑ 発表のタイミングを考える

図9

合には1日2回あることもある。記者は朝の会見と午後の会見の違いを微妙に見極める腕を持っているので発表内容の一貫性を必ずとること。よくノーコメントやオフレコという言葉を使うが、ノーコメントは「私はこの件について何も言いません、そのかわり何処の誰にどういうことを取材してどう書いていただいても文句を言いません」ということ。そうすると、トラブルがあった人や他社の関係者、地域住民などに取材して報道することになる。抗議しても「ノーコメントといたから」という返答が返ってくるのが現状である。

オフレコとは「ここだけの話、書かないで下さい」ということ。緊急時の場合は聞けないことを聞きにきているから、オフレコはなく、言ったことは全て取材として使われる。



### 緊急時対応のポイント

#### ※組織内部への対応

- ☑組織内オピニオンの標準化
- ☑この時期の責任追及はしない

13

図10

### 3.緊急時対応のポイント

#### ※対策の決定

- ☑对被害者
- ☑对患者(外来・入院)
- ☑对行政
- ☑对医学界
- ☑...

14

図11

### 組織内部への対応

発表のタイミングも重要で、締め切り時間に遅れた情報は意味がなく、情報が出ないと記者はノーコメントと同じ様に取材に応じてくれる人を必ず探しに行く。どの組織の中にも喋りたがりの人がいる。記者は喋りたがりの人を上手に見つけ、情報ルートをかなり早い段階で確保する。そういう人の口を閉ざす手はないのか、よく質問されるが唯一それがあろうとしたら、あらかじめ正しい情報を彼らにインプットしておくことであろう。

記者発表の20分後ぐらいには「今何が起こっていて、どうしようとしていて、関係者にはどういう行動をとってほしいのか」を伝えることが理想である(図10)。これをしないと、喋りたがりの人が取材者と「近くのホテルでゆっくりお茶を飲みながらお話を」ということになりうる。

### 対策の決定

早い段階で責任追及をしようとする、原因は組織風土の問題であるのに個人を追及して終わるということになる。これをやると、リスクは種であるので組織風土という土壌に落ちてまた同じ花を咲かせる。人事異動などで重大事態の対応経験者がいなくなった後に同じテーマで再び大きな花が咲くということが企業では起こる。

対策の決定に当たっては、当たり前だが、被害者がいたら最優先にし、対応はショットガン方式で同時並行して行っていく(図11)。対応に順番を決めないほうがよい。順番を決めると「うちは遅かった」などの声がかかることがある。行政等に関しては少し早めに動いたほうが得策である。

最後になるが、今まで述べてきた事象はその時々の中環境が決める基準である。リスク環境は常に変わるので、一度覚えたものをそのまま遂行するのではなく、可能であれば3ヶ月に1回ずつ組織の置かれたリスク環境を見直していくのが良いであろう。

## 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、会員の皆様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

本学会は、(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様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

本学会は、以下の方法で会員の皆様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) 本学会は、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) 本学会は、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. 安全管理措置・委託先の監督

本学会は効率的に会員宛のサービスの提供を行うため、本学会が信頼できると判断し、機密保持契約を締結した法人等（以下、「業務委託先」とします）に個人情報を提供した上で業務を委託することがあります。業務委託先に対しては必要な目的の範囲内で必要な情報のみを開示し、サービスの提供を目的とする以外での情報の利用を禁止しております。

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

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

### 論文の受付

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

原稿はオリジナルとコピーを一部ずつ下記あてに届けて下さい。

〒160-0016

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

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9:00～午後 5:00

(土曜日は受付をしません)

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

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

### 論文原稿の作成上の注意

1. 原稿 文章は現代かなづかいにしたがって平仮名混じりとす。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、「研究結果及び考察」の一章にまとめるようにする。

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

9. 見出しの振り方 (参照例)

研究成績

1. 臨床的事項

1) 頻度

a) ……………

(1)……………

(i)……………

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

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

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

14. 文献 本文中では引用された順とし、“Smith”によれば、……という報告がある<sup>2,3)</sup>。”のように肩に番号をふる。文献表は本文とは別とする。共著者のある場合すべての著者名を書き、スタイルはバンクーバー方式とする。論文のタイトルの文頭のみ大文字とし、あとは小文字で書く。雑誌名は公式の略号を用い、頁は最初と最後を必ず書く。（下記の例を参照する。）

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

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

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

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

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

16. 単位、符号 基本単位：10<sup>3</sup>→k, 10<sup>6</sup>→M, 10<sup>9</sup>→μ, 10<sup>12</sup>→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<sup>2</sup>, cm<sup>2</sup>, m<sup>2</sup>, a=m<sup>2</sup>×10<sup>2</sup>, ha=a×10<sup>2</sup>。容積：m<sup>3</sup>, mm<sup>3</sup>, 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) ; mΩ, Ω, kΩ, MΩ, (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：<sup>131</sup>I, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H。

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

18. フロッピーディスクによる入稿について 印刷工程の効率向上を図るため、フロッピー入稿を希望する。受理が決定した最終稿を入力したフロッピーディスクを印字原稿と共に提出する。入力は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, *Excepta Medica*, Amsterdam, 1979

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

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

20. その他 詳細に関しては事務局に問い合わせして下さい。

(2003年1月)

# 「学位申請論文」投稿の手引き

## 「学位申請論文」について

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

### 1. 学位取得の十分条件ではない。

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

### 2. 二重投稿が回避できる。

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

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

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

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

### 3. プライオリティ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展を明らかにすること。英文例：(Keio T et al : Nature 690 : 76-77, 1994 の Fig 1 を許可を得て転載)、和文例：(慶應太郎、他：内科、87 : 112-118, 1994 の第2図を許可を得て転載)。また、これらの図表、データのうち学位申請者がファーストオーサーでない論文から引用した場合には「図 X は（筆頭著者氏名）の論文から引用したが、このデータに関しては学位申請者がその主たる貢献者であり、共著者の同意を得て転載した」旨を謝辞の最後に記載するものとする。

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

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

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

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

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

なお、ご不明の点については事務局にお問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

## 編集後記

昨日、六大学野球の早稲田大学優勝のちょうちん行列パレードに出くわした。その中に“identify ourselves, Waseda”という言葉を見つけた。Identityを持ち続けるのは昨今特に困難になりつつある。“慶應らしい”とは、言葉で定義できなくとも何となくおぼろげな概念が存在するのは私だけではないと思う。慶應医学もいつまでも慶應らしさを失わないでいて欲しいと願っている。

(饗庭 了)

## 編集委員 (◎副会長, ○理事)

◎相磯貞和 ○岡田保典 ○末松 誠 ○戸山芳昭  
饗庭 了 上田政和 梅澤明弘 斎藤英胤  
林 松彦 村田 満 村松太郎

平成 19 年 6 月 18 日 印刷

平成 19 年 6 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

〒160-0016 東京都新宿区信濃町35番地

国際医学情報センター内

電話(5363)3736

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

### 複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写したい方は、財団法人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84卷第2号別頁  
平成 19 年 6 月 25 日

# 学位論文

慶應医学会

学位論文

腫瘍性疾患および反応性肉芽組織中の多核巨細胞形成に関する  
電顕組織化学的研究  
—組織の環境における多核巨細胞および単核細胞の形態変化—

慶應義塾大学整形外科教室

(指導：戸山芳昭教授)

あなざわ う けい  
穴澤 卯 圭

(平成 18 年 12 月 26 日受付)

Key Words : multinuclear giant cells, tartrate resistant acid phosphatase, ultrastructure

緒 言

一般に運動器における多核巨細胞としては、骨の吸収に携わる破骨細胞、感染などの炎症、異物反応の結果として生じる多核巨細胞が挙げられる。さらに、骨軟部腫瘍性疾患においては破骨細胞とほぼ同様の形態およびマーカーを示す破骨細胞様巨細胞が、骨および腱鞘巨細胞腫などで観察される。いずれの多核巨細胞も、その前駆細胞である単核細胞が互いに細胞融合という特殊な過程を経て複数の核を有する巨大な細胞になる<sup>1)</sup>。多核巨細胞の起源については、破骨細胞、異物巨細胞とともに単核食細胞系 (mononuclear phagocytic system : MPS) に属し、破骨細胞については、近年その分化形成のメカニズムの研究が急速に進み、造血幹細胞の単球マクロファージ系由来の前破骨細胞より形成されると考えられている。一方、異物巨細胞は血液単球由来のマクロファージが前駆細胞と考えられているが、その形成の詳細は明らかでない。また、腫瘍に存在する破骨細胞様多核巨細胞についても、腫瘍組織内に観察される単核間質細胞の一部が融合して形成されると考えられているが、間質細胞自体

の由来は明らかでなく、腫瘍に反応性に生じた MPS 由来か腫瘍細胞の一部かは明らかでない。

形態学的に、それぞれの多核巨細胞は多数の核を持つ大型の細胞として認識され、光顕的に破骨細胞、反応性多核巨細胞、破骨細胞様多核巨細胞の区別が困難な場合が多く、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase : TRAP) が *in vivo*, *in vitro* の系において超微形態学的特徴と共に破骨細胞およびその前駆細胞のマーカーとして用いられている<sup>2, 3)</sup>。しかし、腫瘍性疾患に生じる破骨細胞様巨細胞も TRAP 陽性で、様々な異物粉に対する反応性の巨細胞についても *in vitro* モデルで TRAP 活性を呈することが報告されている。また、Radzun ら<sup>4)</sup>は刺激された単球や肺泡マクロファージの TRAP 活性を示し、*in vitro* の系で TRAP が MPS 細胞の分化時のマーカーであることを示唆した。

多核巨細胞の超微形態については、破骨細胞は骨接着面に波状縁 (brush border) と呼ばれる突起が存在し明体を形成することが大きな特徴で、細胞内小器官としては発達したミトコンドリア、核周辺の多数のゴルジ装

本論文は、Anazawa U, Hanaoka H, Morioka H, Morii T, Toyama Y : Ultrastructural cytochemical and ultrastructural morphological differences between human multinucleated giant cells elicited by wear particles from hip prostheses and artificial ligaments at the knee. *Ultrastructural Pathology* 28 (5-6) : 353-359 ; 2004 の一部、Anazawa U, Hanaoka H, Shiraishi T, Morioka H, Morii T, Toyama Y : Similarities between giant cell tumor of bone, giant cell tumor of tendon sheath, and pigmented villonodular synovitis concerning ultrastructural cytochemical features of multinucleated giant cells and mononuclear stromal cells. *Ultrastructural Pathology* 30 (3) : 151-158, 2006 の一部を、許可を得て引用した。

置を有する。腫瘍性疾患に生じる破骨細胞様巨細胞は、破骨細胞様の特徴に加え、粗面小胞体が発達し線維芽細胞様の特徴を示す例や、組織球の特徴で貪食能を示唆するシデロゾームが観察される場合もある。一方、異物巨細胞については発達した偽足、突起が最大の特徴で、核内の核小体が発達し、核膜に沿って偏在するヘテロクロマチンと発達したユークロマチンが特徴的な場合があるが、経時的に細胞の微細構造は変化し破骨細胞と区別が困難な場合がある<sup>5)</sup>。

骨巨細胞腫 (GCTB)、腱鞘巨細胞腫 (GCTTS)、色素絨毛性結節性滑膜炎 (PVNS) は単核間質細胞と破骨細胞様多核巨細胞で形成され、それぞれの疾患の発生母地が異なるにもかかわらず、3疾患ともにその間質細胞間に散在する破骨細胞様多核巨細胞が共通の特徴とされる。GCTB は長幹骨に好発する良性骨腫瘍であるが、再発傾向が強く局所的に骨破壊を生じる<sup>6, 8)</sup>。一方、GCTTS と PVNS は、良性 fibrohistiocytic tumor に分類されるが、真の腫瘍性疾患なのか、腱鞘および関節滑膜より発生する特発性の増殖性疾患なのかは明らかでない<sup>9, 10)</sup>。破骨細胞様巨細胞の臨床的意義は不明であるが、*in vitro* では骨吸収能も確認され<sup>11)</sup>、GCTB の破骨細胞様多核巨細胞は破骨細胞のモデルとして使用されている。GCTB の単核間質細胞については、光顕的にその形態は類円形と短紡錘型に<sup>8)</sup>、電顕的には多彩な形態を呈するが、細胞突起とライソゾームが特徴的なマクロファージ様小円形型、紡錘系の形態と発達した粗面小胞体が発達した線維芽細胞型とその他の超微形態の細胞に分けられる<sup>12-16)</sup>。GCTTS、PVNS の単核間質細胞については、光顕的にその形態は類円形あるいは多形性を呈し、様々な頻度で泡沫細胞、ヘモジデリン貪食細胞など炎症性の細胞が観察される<sup>17)</sup>。電顕的にこれらの間質細胞も多彩な形態を呈するが、正常滑膜細胞の A 細胞に類似するマクロファージ様細胞、および B 細胞に類似する線維芽細胞様細胞に分類され<sup>18, 19)</sup>、さらに Carstens ら<sup>20)</sup> は、豊富なミトコンドリア、粗面小胞体 (RER) と核に隣接したゴルジ装置を特徴とする単核細胞を骨芽細胞様細胞として報告した。しかし、各腫瘍の組織起源、各間質細胞の関係、および破骨細胞様巨細胞の起源となる腫瘍組織内の単核間質細胞の同定は、未だなされていない。

一方、人工関節置換術後の骨吸収を伴う人工関節弛み組織はヒト組織内の骨吸収を伴う異物反応の場であり、人工関節を構成する高分子ポリエチレン粉による慢性的な炎症反応に誘導されたマクロファージ、異物巨細胞および骨吸収を担う破骨細胞が同時に出現し、相互作用を

有していると考えられる。同部では、多核巨細胞が周囲の単核細胞とともに TRAP 陽性であり<sup>21-23)</sup>、マクロファージ、異物巨細胞、破骨細胞のサイトカイン受容体が類似したパターンを示す。また TRAP 陽性多核巨細胞と破骨細胞は光顕的に形態がきわめて類似していることが報告されているが<sup>23)</sup>、骨吸収能をもつのか、異物巨細胞なのか、また TRAP 陽性多核細胞と破骨細胞との関係についても、未だ不明な点が多い<sup>24-29)</sup>。また、弛み組織のポリエチレン粉の多くはサブミクロン単位の大きさで、光顕的に確認することは困難であるが<sup>30, 31)</sup>、人工関節弛み組織および同部の TRAP 陽性多核、単核細胞によるポリエチレン粉の貪食を電顕的に詳細に検討した報告もない。一方、臨床的にヒト膝前十字靭帯断裂時にはダクロンメッシュで構成された人工靭帯が大腿骨と脛骨の骨孔に固定され、膝関節内に移植される。人工靭帯断裂時の周囲組織の検討では人工靭帯の断裂した線維、その粉末、および、それらに誘導されたマクロファージや多核巨細胞が観察されることが報告されている<sup>32, 33)</sup>。同部での骨吸収はまれであり、人工靭帯周囲の反応性の肉芽組織はヒト組織での人工物に対する骨吸収を伴わない異物反応の場と考えられる。

本研究は、骨、軟部発生腫瘍性疾患、および骨吸収を伴う人工関節弛み組織、骨吸収を伴わない人工靭帯周囲反応性組織に生じる多核巨細胞および単核細胞について超微形態学的に TRAP を指標として比較、検討を行い、多核巨細胞の形成過程を明確化することを目的とした。

## 対象と方法

### 1. 腫瘍性疾患群

骨原発腫瘍は GCTB 4 例で、いずれも大腿骨遠位発生例であった。軟部腫瘍として GCTTS が 4 例で、3 例が手指発生例、1 例が膝窩部の発生例、PVNS は 3 例でいずれも膝関節発生例であった。それぞれ各腫瘍の外科的治療時に組織を採取した。いずれの例も再発例はなかった。

### 2. 反応性組織群

反応性組織として、骨吸収を伴う人工物周囲の肉芽組織は 4 例で、人工股関節置換後の弛みが 3 例、人工骨頭挿入術後の弛みが 1 例であった。それぞれ人工股関節の再置換時に骨吸収部の肉芽組織を採取した。

骨吸収を伴わない人工物周囲の肉芽組織は 3 例で、い

ずれも膝前十字靭帯断裂に対し Leeds-Keio 人工靭帯で再建を行った例であり、人工靭帯断裂後の再置換術時に人工靭帯と骨孔部の間に生じていた肉芽組織を採取した。

以上の検体の使用に当たって、十分に患者に説明し、同意を得て本研究を遂行した。

### 3. 電顕組織化学

手術中に採取した各種肉芽組織と反応性組織を、直ちに細切し 0.1 M カコジレート緩衝液で緩衝した 0.5% グルタルアルデヒド、4% パラフォルムアルデヒド混合液で 4℃、90 分間の前固定を行い、8% ショ糖、0.1 M カコジレート緩衝液で一夜洗浄した。TRAP 活性の検出のため 50 mM 酒石酸と 0.2 mM アセテート緩衝液 (pH: 5.5) で 37℃、2.5 時間前処置を行った後、ショ糖 2 g、3% β グリセロン酸 2.5 ml、硝酸塩 25 mg を 0.05M アセテート緩衝液 (pH: 5.0) で緩衝した反応液に 37℃、30 分の浸漬を行った。次に 0.1M カコジレート緩衝液と 1% OsO<sub>4</sub> で 4℃、1 時間の後固定を行い、次いでエタノール系列で脱水、エポキシ樹脂に包埋した。包埋した組織を透過型電子顕微鏡 (Hitach HU-12AS) で観察した。

## 結 果

### 1. 腫瘍性疾患群

#### 1) 多核巨細胞

GCTB、GCTTS および PVNS における多核巨細胞は主にゴルジ装置に TRAP 活性を認め、ライソゾームにも TRAP 活性を認めた。超微形態については、GCTB と GCTTS の多核巨細胞は破骨細胞様の特徴、すなわち豊富なミトコンドリア、RER、ゴルジ装置、中程度に発達したライソゾーム、小胞、さらに部分的にはシデロゾームを認めた。また、核は卵円形、あるいは楕円形で、しばしば陥凹を認め、クロマチンは核周辺部に薄く濃縮していた (第 1 図 A)。また、GCTB および GCTTS では、より発達した RER、およびシデロゾームが特徴的な 2-3 個の核を有する小さな多核細胞がしばしば観察された (第 1 図 B)。さらに、GCTTS の 1 例では、破骨細胞の特徴である波状線を呈する TRAP 陽性の多核巨細胞が観察された (第 2 図)。一方、GCTTS と PVNS ではライソゾーム、シデロゾーム、中程度に発達した偽足、突起、RER が発達したよりマクロファージに近い形態学的特徴を持った多核巨細胞が低頻度で観察され、微弱な TRAP 活性をゴルジ装置に認めた (第 3 図)。PVNS については、典型的な電顕的特徴をもつ

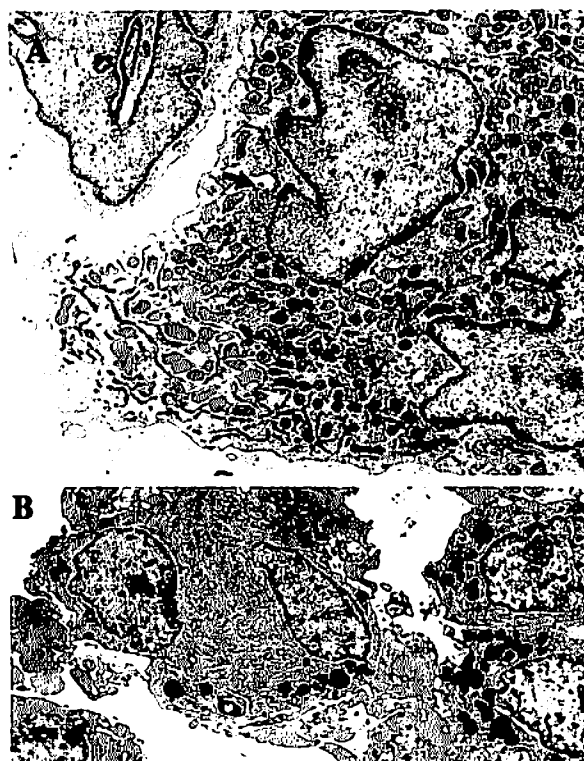


図 1 TRAP 陽性多核巨細胞

A: GCTTS の多核巨細胞。TRAP 活性をゴルジ装置 (矢印)、ライソゾーム (矢頭) に認める (×2000)。

B: GCTB の小さな多核巨細胞。RER の発達に否明で TRAP 活性をライソゾームに認める (×1500)。

(Anazawa U et al: Ultrastruct Pathol 30: 151-158, 2006 の Fig 1 を許可を得て転載)

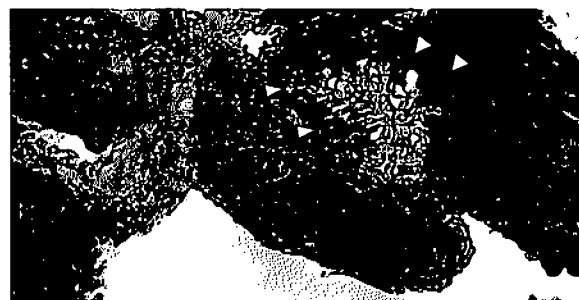


図 2 波状線を呈する GCTTS の多核巨細胞と隣接する破骨細胞様単核細胞

多核巨細胞の波状線の周囲に TRAP 活性を示すライソゾームを認める (矢頭)。さらに、隣接する破骨細胞様単核細胞に極性をもった偽足、突起が観察される (×2500)。

(Anazawa U et al: Ultrastruct Pathol 30: 151-158, 2006 の Fig 2 を許可を得て転載)

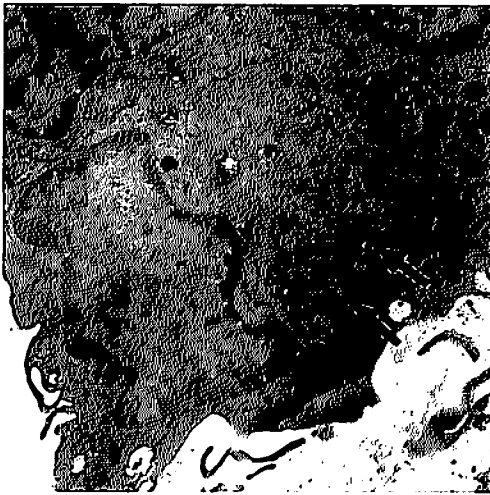


図3 マクロファージ様多核巨細胞

偽足が観察され、TRAP 活性はゴルジ装置に弱く陽性 (矢印) である (×2400).  
(Anazawa U et al : Ultrastruct Pathol 30 : 151-158, 2006 の Fig 3 を許可を得て転載)

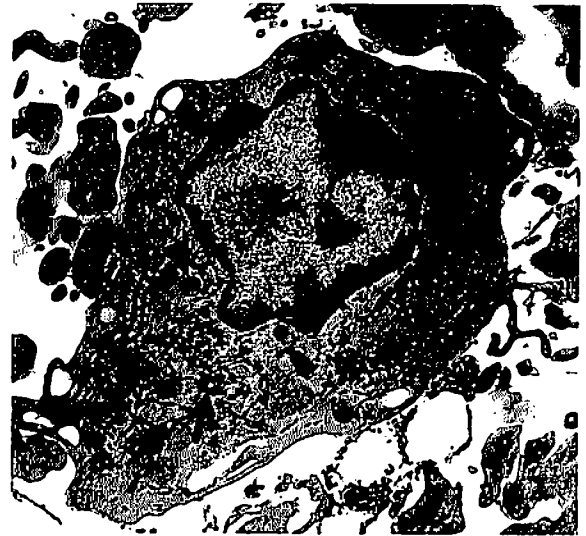


図5 マクロファージ様細胞

TRAP 活性をゴルジ装置 (矢印)、ライソソーム (矢頭) に認める (×4800).  
(Anazawa U et al : Ultrastruct Pathol 30 : 151-158, 2006 の Fig 5 を許可を得て転載)

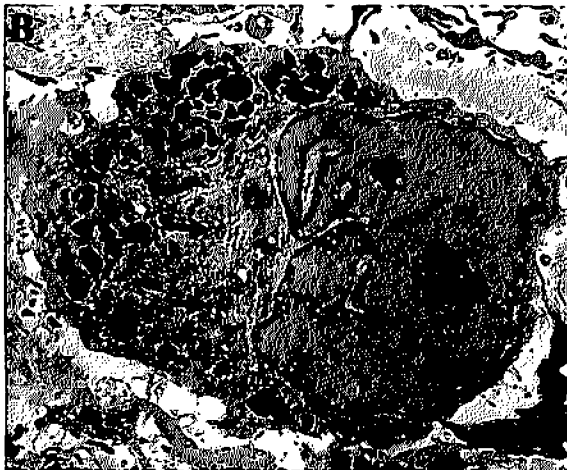


図4 破骨細胞様単核細胞

A : GCTB の破骨細胞様単核細胞, TRAP 活性をライソソームに認め (矢頭), 隣接するマクロファージ様単核細胞との間に細胞接着を認める (inset) (×2400).  
B : GCTTS の破骨細胞様単核細胞, TRAP 活性をライソソーム, ゴルジ装置に認め (矢印), 発達したシテロソームも観察される (×3000).  
(Anazawa U et al : Ultrastruct Pathol 30 : 151-158, 2006 の Fig 4 を許可を得て転載)

破骨細胞様多核巨細胞は確認できなかった。

## 2) 単核細胞

GCTB, GCTTS, PVNS においては、諸家の報告と同様に多彩な超微形態を呈する単核細胞が観察され、マクロファージ様、線維芽細胞様、その他の特徴をもつ細胞を認めた。一方、TRAP 陽性単核細胞も同様に各種瘍に観察され、超微形態学的に以下のように3つに分類できた。

### a) 破骨細胞様単核細胞

これらは GCTB に観察された小さな破骨細胞様多核細胞に形態が酷似し、豊富なミトコンドリアと発達した RER が特徴的で、TRAP はゴルジ装置とライソソームに陽性であった (第4図A), また、シテロソームも観察され、貪食能を持つものと推測した (第4図B)。さらに GCTTS の1例では、波状緑様の構造を呈した巨細胞に隣接した部分で、破骨細胞様単核細胞にも極性をもった波状緑様の発達した偽足、突起が観察された (第2図)。

### b) マクロファージ様細胞

これらの細胞はマクロファージ様の超微形態である多数のライソソーム、中程度に発達したミトコンドリアと RER を特徴とし、TRAP 活性はゴルジ装置とライソソームに陽性であった (第5図)。

### c) 未分化単核細胞

これらの細胞は乏しい細胞内小器官と細胞質が特徴的で、TRAP 活性はゴルジ装置とライソソームに陽性で



図6 未分化単核細胞

A：TRAP 活性をゴルジ装置（矢印）に認める（×2100）。  
B：隣接したマクロファージ様細胞との細胞接着を認める（×4000）。  
(Anazawa U et al：Ultrastruct Pathol 30：151-158, 2006 の Fig 6 を許可を得て転載)

あった（第6図）。さらにGCTTSの1例では、これらの未分化単核細胞が集束し細胞膜融合を呈していた（第7図）。

GCTBとGCTTSにおいて、これらの3つのTRAP陽性細胞と他の細胞の間に細胞間基質を介在した細胞間接着構造が様々な頻度で観察された（第4A、6図）。

## 2. 反応性疾患群

### 1) 人工関節周囲組織

多核巨細胞は様々な超微形態学的特徴を示し以下のよう  
に分類できた。一つは破骨細胞様の超微形態であるミ  
トコンドリアの発達が著明でTRAP活性をライソゾ  
ームとゴルジ装置に呈する破骨細胞様多核巨細胞で、ポリ  
エチレン粉の取り込みも細胞質内に認めた（第8図）。  
他の一つは超微形態学的に異物巨細胞様の特徴である発  
達した偽足、突起、異物粉の取り込み、比較的発達した  
ミトコンドリアを呈し、TRAP活性がライソゾームに  
陽性であった異物巨細胞様多核巨細胞であった。これら  
のTRAP陽性多核巨細胞には、明らかに異物の取り込  
みを認めたため、機能的には異物巨細胞と考えられた。  
さらに、細胞膜の偽足、突起を認めるものの、乏しい細  
胞内小器官と細胞質の部分的な消失、核の変性を認め、  
細胞質中が多数のファーゴゾームで満たされた多核巨細  
胞も観察された。細胞外基質中にはTRAP陽性のライ  
ソゾーム様デブリスと細胞内小器官の断片が観察された  
ことより、この多核巨細胞は変性した多核巨細胞と考え  
た。

TRAP陽性単核細胞は超微形態学的にマクロファ  
ージに類似し、中程度に発達した偽足とライソゾーム、お  
よびゴルジ装置とphagocytic vacuolesを呈した。  
TRAP活性はゴルジ装置に陽性であった（第9図）。一  
方、破骨細胞様、あるいは前破骨細胞様の特徴である豊



図7 未分化単核細胞

A：集束し細胞融合を呈する未分化単核細胞（×1600）。  
B：細胞膜融合を認め（矢頭）、TRAP活性をゴルジ装置に認める  
（矢印）（×10000）。  
(Anazawa U et al：Ultrastruct Pathol 30：151-158, 2006 の Fig 7 を許可を得て転載)

富なfreeリボソーム、乏しいRER、を呈したTRAP  
陽性単核細胞は観察されなかった。

### 2) 人工靭帯周囲組織

観察された多核巨細胞は、超微形態学的に異物巨細胞  
様の特徴である極めて発達した偽足、突起、豊富なライ  
ソゾーム、中程度に発達したミトコンドリアを呈し、  
TRAP活性をライソゾームに強く、ゴルジ装置とRER  
に弱く認めた。さらに、これらのTRAP陽性多核巨細  
胞には人工靭帯の断片の取り込みを認め、超微形態学的  
、機能的に異物巨細胞と推測された（第10図）。TRAP陽  
性単核細胞は、TRAP活性をライソゾームとRERに認  
め、TRAP陽性多核巨細胞と同様に極めて発達した偽  
足、突起および発達したライソゾームと中程度のミトコ  
ンドリアを呈し、超微形態学的には貪食細胞であるマク  
ロファージと考えた。

## 考 察

本研究では、腫瘍性疾患および反応性組織にそれぞれ  
TRAP活性を呈する多核巨細胞と単核細胞が観察され

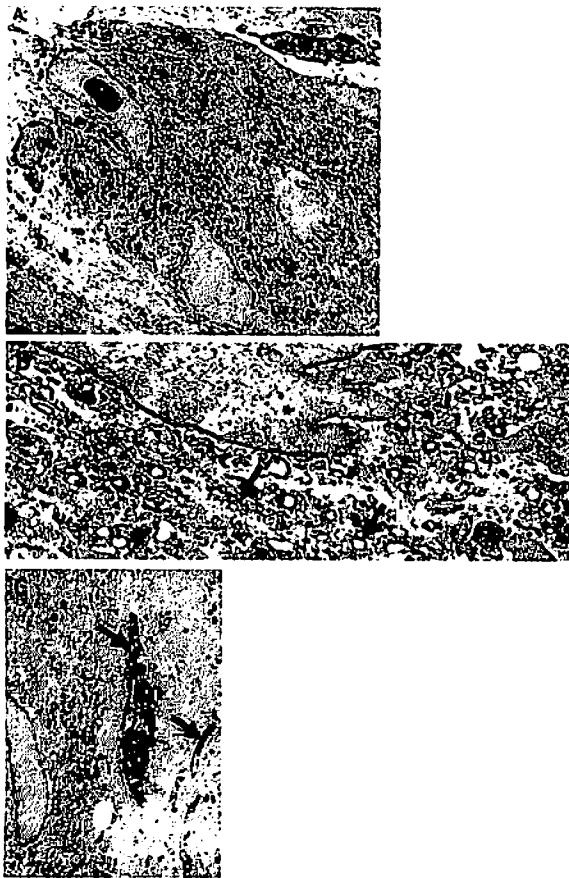


図8 破骨細胞様多核巨細胞

A : 豊富なミトコンドリアを認める (×3300).  
 B : TRAP 活性をライソソーム, ゴルジ装置 (矢印) に認める (×9000).  
 C : 細胞内に取り込まれたポリエチレン粉 (矢印) を認める (×6000).  
 (Anazawa U et al : Ultrastruct Pathol 28 : 353-359, 2004 の Fig 1 を許可を得て転載)

ることを示し, さらに, 超微形態学的には TRAP 陽性多核巨細胞が各疾患, 病態において異なる超微形態を呈することを示した. 一方, 単核細胞については, 腫瘍性疾患では多彩な超微形態を呈したが, 共通の超微形態を呈する TRAP 陽性の単核細胞群が各種瘍に存在することを明らかにし, 反応性組織では骨吸収の有無にかかわらず TRAP 陽性単核細胞はマクロファージ様の形態を呈していることを示した (表1).

破骨細胞様多核巨細胞の出現が共通の特徴とされる GCTB, GCTTS, PVNS については, 破骨細胞様巨細胞の前駆細胞は同定されておらず, 各間質単核細胞の起源も未だ明確でない. GCTB については, 破骨細胞様多核巨細胞が腫瘍内の骨破壊の場で一般の破骨細胞と同様に形成されるのか, あるいは腫瘍に反応した MPS 由来なのか, あるいは腫瘍由来の単核細胞より形成された

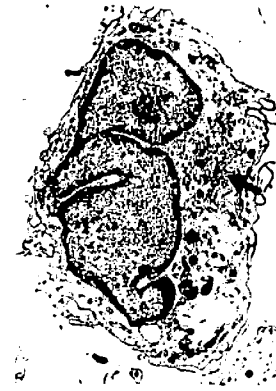


図9 TRAP 陽性単核細胞

TRAP 活性をゴルジ装置に認め (矢印), 中程度に発達した偽足とライソソーム, およびゴルジ装置と phagocytic vacuoles を認める (×6000).  
 (Anazawa U et al : Ultrastruct Pathol 28 : 353-359, 2004 の Fig 4 を許可を得て転載)



図10 人工靭帯周囲組織の TRAP 陽性異物細胞様巨細胞

超微形態学的に異物巨細胞様の特徴: 極めて発達した偽足, 突起, 豊富なライソソーム, 中程度に発達したミトコンドリアを認め, TRAP 活性をライソソームに認める (矢頭). また, 人工靭帯の断片の取り込み (矢印) を認める (×6700).  
 (Anazawa U et al : Ultrastruct Pathol 28 : 353-359, 2004 の Fig 5 を許可を得て転載)

のか明らかではなく, また様々な形態をとる各単核間質細胞についても, 腫瘍性と反応性のものが混在していると考えられ, その発生由来については間葉系あるいは MPS 由来との報告があり, 現在でもきわめて混乱している<sup>13, 34)</sup>. 一方, GCTTS, PVNS の組織起源については, その間質細胞と滑膜細胞の超微形態学的な類似性より従来は滑膜細胞由来と考えられていた<sup>18, 35)</sup>. しかし, 近年, 各種瘍の単核細胞に組織球様マーカーが陽性であること, 単核細胞が融合して形成される多核巨細胞が破骨細胞様の形態, 形質を呈することより, 増殖性の部分は MPS 由来であることが示唆されている<sup>9, 36, 37)</sup>. さらに, その成因については慢性的な炎症の存在が関連する

表1 TRAP陽性細胞群

| 超微形態  |          | 腫瘍性疾患 |       |      | 反応性疾患        |              |
|-------|----------|-------|-------|------|--------------|--------------|
|       |          | 骨発生   | 軟部発生  |      | 人工関節<br>弛み組織 | 人工靭帯<br>周囲組織 |
|       |          | GCTB  | GCTTS | PVNS |              |              |
| 多核巨細胞 | 破骨細胞様    | ●     | ●     |      | ○            |              |
|       | 異物巨細胞様   |       | ●     | ●    | ○            | ○            |
| 単核細胞  | 破骨細胞様    | ●     | ●     | ●    |              |              |
|       | マクロファージ様 | ●     | ●     | ●    | ○            | ○            |
|       | 未分化      | ●     | ●     | ●    |              |              |

との報告もある<sup>39)</sup>。しかし、GCTTS、PVNSの組織起源、各間質細胞の関係、および多核巨細胞を形成する単核細胞についてはGCTB同様、未だ明らかでない。

TRAPを指標とした破骨細胞様多核巨細胞および単核細胞の検討については報告が限られており、超微形態学的な検討はMiiら<sup>39)</sup>がGCTBについて報告しているのみで、破骨細胞様多核巨細胞およびマクロファージ様単核細胞がTRAP活性を呈することを示した。また、GCTTSとPVNSについては、光顕的にDarlingら<sup>9)</sup>が多核巨細胞と単核細胞の一部がTRAP活性と破骨細胞様形質を呈することを報告し、多核巨細胞がMPS由来であり、骨組織以外の場である滑膜組織で多核巨細胞が破骨細胞様の形質をとりうることを示唆したが、破骨細胞様多核巨細胞の起源である間質単核細胞については同定されていない。

本研究において、骨および腱鞘、関節滑膜と異なった発生母地より生じた腫瘍性組織に、共通の超微形態をとるTRAP陽性多核巨細胞と単核細胞群が存在することが明らかとなった。

多核巨細胞については、本研究においてGCTBとGCTTSに従来報告されている破骨細胞様多核巨細胞だけでなく、破骨細胞様超微形態に加え発達したRERとシテロゾームを特徴とする小型の多核巨細胞がTRAP活性を呈することが観察された。GCTBやGCTTSの多核巨細胞の核の数は様々であるが、一般的に10個以上より形成される<sup>7, 40)</sup>。小型多核巨細胞についての報告は限られており、Kusuzakiら<sup>41)</sup>がGCTBの2核の巨細胞を蛍光顕微鏡で観察し、2核の巨細胞と多核巨細胞の数は相関すること、さらにSekiら<sup>42)</sup>は骨巨細胞腫のproliferating cell nuclear antigen (PCNA)の発現を検討し、PCNAを単核細胞と2核の多核巨細胞には認められたが、一般の多核巨細胞にはその発現を認めなかったことを報告した。これらのことより、小型多核巨細胞は活

動性の高い細胞で多核巨細胞の形成の初期段階であることが推測される。本研究で示したTRAP陽性小型多核巨細胞と破骨細胞様単核細胞との電顕組織化学的類似性は、多核巨細胞の形成初期の段階で両者がきわめて密接な関係にあることを強く示唆していると考えられた。

単核間質細胞については、超微形態学的に各種瘍で様々な形態を示したが、TRAP陽性単核細胞群は破骨細胞様、マクロファージ様、未分化型の三つに分類できた。各種瘍に観察された破骨細胞様単核細胞は豊富なミトコンドリア、RERとゴルジ装置のTRAP活性が特徴的であり、しばしばシテロゾームも観察された。これらの超微形態は、GCTTSの超微形態学的検討でAlguacil-Garciaら<sup>18)</sup>が報告した、RERが発達したA細胞様単核細胞、あるいはCarstensら<sup>20)</sup>が報告した骨芽細胞様細胞に超微形態学的に類似していると考えられた。また、マクロファージ様細胞は中程度のミトコンドリア、RER、ライソゾームの発達の特徴的で、未分化型は細胞質、細胞内小器官が乏しく、いずれもTRAP活性はライソゾーム、ゴルジ装置に陽性であった。上記の各種瘍に共通に観察された単核細胞群はTRAP陽性であること、ライソゾームやシテロゾームの存在より、MPSに属する一連の細胞群であることが強く示唆された。

一方、本研究ではGCTBとGCTTSのTRAP陽性単核細胞に、細胞膜の裏打ち構造を認める細胞接着構造が観察された。自験例と同様の細胞接着はAlguacil-Garciaら<sup>18)</sup>もGCTTSの間質細胞に観察し、これらの細胞接着は、一般にヒト正常滑膜には存在せず外傷性の滑膜炎やリウマチ性滑膜炎に観察されることから、GCTTSは真の腫瘍性疾患でなく滑膜の炎症性、増殖性疾患であると結論付けた。一方、近年、炎症性の滑膜組織のMPS細胞から破骨細胞様細胞への分化モデルも、Danksら<sup>43)</sup>が報告している。また、自験例と同様の細胞接着構造をNakamura and Ozawa<sup>44)</sup>は、ラットにお



ける間質細胞と破骨細胞の間に観察し、破骨細胞の分化形成における細胞間相互作用の重要性を強調し、さらに、Ejiriら<sup>45)</sup>は、活性型ビタミンD投与下の *in vitro* の系でマクロファージが細胞接着を呈し多核化することを超微形態学的に報告した。これらのことより、何らかの刺激を受けた MPS 細胞は細胞接着を呈し多核化することが推測される。本研究で観察された TRAP 陽性単核細胞群も、MPS 細胞の分化能を反映すると考えられる TRAP 活性を呈していることより、細胞が何らかの刺激を受け、細胞間接着構造を呈し、多核能が亢進している可能性が示唆された。

以上より、破骨細胞様単核細胞が、破骨細胞様多核巨細胞の骨内、骨外腫瘍組織における共通の前駆細胞で、さらに TRAP 陽性多核、単核細胞群が各腫瘍に共通に観察された事実より、これらの TRAP 陽性細胞群の由来は腫瘍性のものでなく、異なる各腫瘍性組織に誘導された反応性の MPS に属すると推測された。

一方、GCTTS と PVNS に観察された微弱な TRAP 活性を呈するマクロファージ様多核巨細胞は細胞突起とシデロゾームが特徴的で、機能的に貪食能の保持を示唆した。電顕的にマクロファージ様多核巨細胞の報告はないが、光顕的には Rao and Vigorita<sup>46)</sup>が GCTTS と PVNS の腫瘍間質細胞内に貪食巨細胞様の巨細胞の存在を報告しており、今回の電顕的検討で認められたものと同じものと考えられた。超微形態学的に貪食能の保持が示唆されるマクロファージ様多核巨細胞の存在は、GCTTS、PVNS における炎症性の病態を反映しているのではないかと考えられた。また、本研究では多核巨細胞の波状縁様の極性を持った細胞突起の発達を示す破骨細胞様単核細胞、未分化細胞の細胞間の膜融合が GCTTS 例で観察された。これらの所見については GCTB では報告がなく、この事実は間質単核細胞の多核化の経路が骨組織である GCTB と滑膜増殖性疾患である GCTTS、PVNS では異なり、より未分化な細胞からの多核化、および破骨細胞様形態への分化傾向が GCTTS に存在し、その経路が多彩である可能性を示唆するものと考えられる。さらには、一般の破骨細胞と異なった MPS 単核細胞からの多核化および破骨細胞化の経路が滑膜増殖性病変に存在する可能性を示唆するものとして着目すべき所見と考えられた。

一方、本研究では TRAP 陽性多核巨細胞が、骨吸収を伴う人工関節弛み組織において異物の貪食能を保持しつつ破骨細胞様の超微形態を呈すること、骨吸収を伴わない人工関節周囲組織では TRAP 活性を示しても異物巨細胞の超微形態を保持していることを示した。また人

工関節周囲組織には多核、単核細胞とも破骨細胞様の超微形態を呈したものは観察されず、これらの TRAP 陽性多核、単核細胞は MPS 由来の活発な食細胞と考えられた。

人工関節弛み組織の骨吸収については、摩耗粉が異物反応を誘発し、活性化したマクロファージから分泌された炎症物質が破骨細胞を分化誘導、活性化し骨吸収を誘発する<sup>47-51)</sup>との考えが一般的であるが、異物反応に誘導されたマクロファージが多核巨細胞に分化し直接骨吸収を行う可能性も示唆されている<sup>52)</sup>。 *In vivo* モデルにおいては、異物巨細胞と破骨細胞の超微形態学的類似性が以前より示されており、骨粉に誘導された異物巨細胞と破骨細胞の両者が細胞間にまたがる細胞突起の構造を示すこと<sup>53)</sup>、さらに骨粉あるいはハイドロキシアパタイトに誘導された異物多核巨細胞は TRAP 活性と波状縁および破骨細胞に類似した細胞内小器官の特徴を呈すること<sup>26, 27)</sup>が報告されている。一方では破骨細胞が異物の貪食能を持つ可能性を示唆する報告も散見され、Isaki and Hanaoka<sup>3)</sup>は、高濃度の上皮小体ホルモンを投与した胎児マウスのモデルで石灰化軟骨を貪食していると思われる破骨細胞を示し、Wang ら<sup>54)</sup>は *in vitro* の系で、破骨細胞が骨吸収能を保持しつつ、貪食能を呈することを報告した。以上のことは、異物巨細胞と破骨細胞の両者が何らかの条件下では互いの機能を持ちうる可能性を示している<sup>55)</sup>。しかし、実際にヒト組織内で異物巨細胞が破骨細胞様の機能を持ちうるのか否かは未だ明らかでない。本研究ではヒト組織内でも骨吸収を伴う人工関節弛み組織においては、異物反応で生じた反応性巨細胞が TRAP 活性を示し破骨細胞様の超微形態を示すことが明らかとなり、これらの細胞が異物の貪食能をもちながら、破骨細胞と同様に骨吸収能を持つ可能性が示された。

また、本研究では人工関節弛み組織および人工関節周囲組織の両者で、前破骨細胞のような破骨細胞様の超微形態を示す TRAP 陽性単核細胞を確認できなかった。TRAP 陽性単核細胞がいずれもマクロファージの形態を維持していたこと、人工関節周囲組織では多核巨細胞が TRAP 活性を呈しつつ異物巨細胞の形態を維持していた一方で、人工関節弛み組織では多核巨細胞が異物巨細胞の形態や破骨細胞様の超微形態など多彩な超微形態を示した事実は考慮すべき点である。これらの所見より、多核巨細胞の超微形態学的変化は単核細胞ではなく多核化した後に生じ、その変化は骨吸収等の周囲の組織環境に影響されることが推測された。

多核巨細胞の形成については、単核細胞が融合して形成されると考えられ、破骨細胞の前駆細胞である前破骨

細胞は破骨細胞とほぼ同様の細胞内小器官の特徴を示す。本研究では、腫瘍性疾患においても破骨細胞様多核巨細胞の前駆細胞と考えられる破骨細胞様単核細胞が観察されたが、人工関節弛み組織においては破骨細胞様の多核巨細胞を観察したものの、破骨細胞様の超微形態を示す TRAP 陽性単核細胞は確認できなかった。破骨細胞の形成については、その制御因子としてマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、および Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) の両者が重要とされる。しかし、RANKL から独立した系でも、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子：TNF (tumor necrosis factor) - $\alpha$  とインターロイキン 1 (IL-1) の併用処理でマウスの骨髄細胞より破骨細胞の分化誘導が認められ<sup>56)</sup>、人工関節弛み組織より採取されたマクロファージも M-CSF と TNF- $\alpha$ 、IL-1 の存在下で、破骨細胞のマーカーが陽性で骨吸収能を持つ多核巨細胞へ分化することが示されている<sup>57)</sup>。さらに、本研究では骨外環境で炎症性環境が存在する GCTTS で TRAP 陽性細胞群の活発な多核化、破骨細胞様変化が観察された。これらのことは、正常ヒト組織でも RANKL から独立した系で破骨細胞様の形質を呈する多核巨細胞が生じ得ることを強く示唆している。また、本研究で示したように腫瘍性の破骨細胞様巨細胞については、機能的には貪食細胞である組織球様特徴も示し、前駆細胞が前破骨細胞ではない事実、また、骨外増殖性疾患である GCTTS では TRAP 陽性細胞群がより強く破骨細胞様の特徴、および多核化の傾向を示していたこと、さらに、異物反応組織では TRAP 陽性異物巨細胞の段階で破骨細胞様の超微形態を呈したことより、実際のヒト組織内で破骨細胞が単球、前破骨細胞の分化経路だけでなく、周囲の組織環境によっては分化したマクロファージ系の単核細胞より形成される可能性、また多核化した後に破骨細胞化する可能性など複数の経路をもつことが推測された。

## 総 括

腫瘍および異物反応性組織に生じる多核巨細胞の形成過程を調べるため、TRAP を指標とした電顕組織化学的検討を行い、以下の結果を得た。

1. TRAP 陽性多核巨細胞と単核細胞が GCTB、GCTTS、PVNS の各種腫瘍組織に、また骨吸収を伴う人工関節弛み組織および骨吸収を伴わない人工靭帯周囲組織に観察された。
2. 腫瘍性疾患の組織では各種腫瘍組織に共通の超微形態学的特徴をもつ TRAP 陽性多核巨細胞と単核細胞

群が観察され、小型多核巨細胞と破骨細胞様単核細胞が超微形態学的にきわめて類似し、細胞間接着構造も確認された。

3. 骨外病巣である GCTTS の TRAP 陽性単核、多核巨細胞は GCTB に比して多彩な超微形態を示し、より強い破骨細胞様特徴が破骨細胞様多核巨細胞および単核細胞の段階で確認された。
4. 反応性組織では異物の貪食を認め機能的には異物巨細胞と考えられる多核巨細胞が、人工関節弛み組織では TRAP 活性を呈し破骨細胞様の超微形態を示すことを観察したが、TRAP 陽性単核細胞、および人工靭帯周囲組織の TRAP 陽性多核細胞は一般のマクロファージや異物巨細胞と同様の超微形態であった。
5. 以上の結果より、腫瘍性の破骨細胞様多核巨細胞と TRAP 陽性単核細胞群は共通の MPS 細胞群で、TRAP 陽性で破骨細胞様多核巨細胞を形成する組織の環境がヒト組織内の骨内外の組織に存在することが推測され、さらに多核巨細胞は骨吸収を伴う反応性の組織では、異物巨細胞への分化後であっても周囲の組織環境で形態が破骨細胞様に変化し、ヒト組織内でも異物巨細胞が TRAP 活性を呈し破骨細胞様の形態をとりうることを示された。これらのことから、ヒト組織内で MPS 細胞が様々な経路で破骨細胞様の性質を持ちうることを示唆された。

本稿を終えるにあたり、ご指導、御高閣を賜りました慶應義塾大学整形外科教室戸山芳昭教授に深甚なる謝意を表します。また、直接研究のご指導をいただきました元慶應義塾大学整形外科教室助教授、現井上記念病院名誉院長花岡英弥博士に深謝いたします。また、臨床材料を提供していただき、適切なるご助言、ご協力くださいました整形外科教室諸兄に感謝いたします。また、電子顕微鏡の実験にご協力いただいた慶應義塾大学医学部付属電子顕微鏡研究室諸兄に深謝いたします。なお、本論文の要旨の一部は、第 29 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (1996, 札幌)、第 4 回 Combined Meeting of the American and European Musculoskeletal Tumor Societies (1998, ワシントン DC)、および第 28 回日本人工関節学会 (1998, 金沢) において発表した。

## 文 献

- 1) Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K,

- Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T : DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 202 ; 345-351, 2005
- 2) Minkin C : Bone acid phosphatase : tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34 : 285-290, 1982
  - 3) Isaki H, Hanaoka H : The effects of high dose of parathyroid hormone on fetal osteoclasts and their precursors *in vivo* : an ultrastructural-cytochemical study. *Anat Rec* 243 : 421-429, 1995
  - 4) Radzun HJ, Kreipe H, Parwaresch MR : Tartrate-resistant acid phosphatase as a differentiation marker for the human mononuclear phagocyte system. *Hematol Oncol* 1 : 321-327, 1983
  - 5) Sutton J and Weiss L : Transformation of monocytes in tissue culture into macrophage, epitheloid cells, and multinucleated giant cells : An electron microscope study. *J cell Biol* 28 : 303-332, 1966
  - 6) Goldenberg RR, Campbell CJ, Bonfiglio M : Giant-cell tumor of bone. An analysis of two hundred and eighteen cases. *J Bone Joint Surg Am* 52 : 619-664, 1970
  - 7) Unni KK : Giant cell tumor (osteoclastoma). *Dahlin's Bone Tumors*. (Ed) Unni KK, Rippincott-Raven, Philadelphia, p.263-283, 1996
  - 8) Joyner CJ, Quinn JM, Triffitt JT, Owen ME, Athanasou NA : Phenotypic characterisation of mononuclear and multinucleated cells of giant cell tumour of bone. *Bone Miner* 16 : 37-48, 1992
  - 9) Darling JM, Goldring SR, Harada Y, Handel ML, Glowacki J, Gravalles EM : Multinucleated cells in pigmented villonodular synovitis and giant cell tumor of tendon sheath express features of osteoclasts. *Am J Pathol* 150 : 1383-1393, 1997
  - 10) Neale SD, Kristelly R, Gundle R, Quinn JM, Athanasou NA : Giant cells in pigmented villonodular synovitis express an osteoclast phenotype. *J Clin Pathol* 50 : 605-608, 1997
  - 11) Athanasou NA, Quinn J, Ferguson DJ, McGee JO : Bone resorption by macrophage polykaryons of giant cell tumour of tendon sheath. *Br J Cancer* 63 : 527-533, 1991
  - 12) Hanaoka H, Friedman B, Mack RP : Ultrastructure and histogenesis of giant-cell tumor of bone. *Cancer* 25 : 1408-1423, 1970
  - 13) Zheng MH, Robbins P, Xu J, Huang L, Wood DJ, Papadimitriou JM : The histogenesis of giant cell tumour of bone : a model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. *Histol Histopathol* 16 : 297-307, 2001
  - 14) Aparisi T, Arborgh B, Ericsson JL : Giant cell tumor of bone : detailed fine structural analysis of different cell components. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 376 : 273-298, 1977
  - 15) Steiner GC, Ghosh L, Dorfman HD : Ultrastructure of giant cell tumors of bone. *Hum Pathol* 3 : 569-586, 1972
  - 16) Anazawa U, Hanaoka H, Shiraishi T, Morioka H, Morii T, Toyama Y : Similarities between giant cell tumor of bone, giant cell tumor of tendon sheath, and pigmented villonodular synovitis concerning ultrastructural cytochemical features of multinucleated giant cells and mononuclear stromal cells. *Ultrastruct Pathol* 30 : 151-158, 2006
  - 17) O'Connell JX, Fanburg JC, Rosenberg AE : Giant cell tumor of tendon sheath and pigmented villonodular synovitis : immunophenotype suggests a synovial cell origin. *Hum Pathol* 26 : 771-775, 1995
  - 18) Alguacil-Garcia A, Unni KK, Goellner JR : Giant cell tumor of tendon sheath and pigmented villonodular synovitis : an ultrastructural study. *Am J Clin Pathol* 69 : 6-17, 1978
  - 19) Ferrer J, Namiq A, Carda C, Lopez-Gines C, Tawfik O, Llombart-Bosch A : Diffuse type of giant-cell tumor of tendon sheath : an ultrastructural study of two cases with cytogenetic support. *Ultrastruct Pathol* 26 : 15-21, 2002
  - 20) Carstens HB : Giant cell tumors of tendon sheath. An electron microscopical study of 11 cases. *Arch Pathol Lab Med* 102 : 99-103, 1978
  - 21) Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH : Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop* 258 : 95-107, 1990
  - 22) Kadoya Y, al-Saffar N, Kobayashi A, Revell PA : The expression of osteoclast markers on foreign body giant cells. *Bone Miner* 27 : 85-96, 1994
  - 23) Kadoya Y, Revell PA, al-Saffar N, Kobayashi A, Scott G, Freeman MA : Bone formation and bone resorption in failed total joint arthroplasties : histomorphometric analysis with histochemical and immunohistochemical technique. *J Orthop Res* 14 : 473-482, 1996
  - 24) Athanasou NA, Quinn J : Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons : immunohistological distinction and implications for osteoclast for osteoclast ontogeny and function. *J Clin Pathol* 43 : 997-1003, 1990
  - 25) Holtrop ME, Cox KA, Glowacki J : Cells of the mononuclear phagocytic system resorb implanted bone matrix : a histologic and ultrastructural study. *Calcif Tissue Int* 34 : 488-494, 1982
  - 26) Kawaguchi H, Ogawa T, Shirakawa M, Okamoto H, Akisaka T : Ultrastructural and ultracytochemical characteristics of multinucleated cells after hydroxyapatite implantation into rat periodontal tissue. *J Periodontal Res* 27 : 48-54, 1992
  - 27) Glowacki J, Jasty M, Goldring S : Comparison of multinucleated cells elicited in rats by particulate bone, polyethylene, or polymethylmethacrylate. *J*

- Bone Miner Res 1 : 327-331. 1986
- 28) Kamakura S, Sasano Y, Homma-Ohki H, Nakamura M, Suzuki O, Kagayama M, Motegi K : Multinucleated giant cells recruited by implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat bone marrow share ultrastructural characteristics with osteoclasts. *J Electron Microsc (Tokyo)* 46 : 397-403. 1997
- 29) Takeshita N, Akagi T, Yamasaki M, Ozeki T, Nojima T, Hiramatsu Y, Nagai N : Osteoclastic features of multinucleated giant cells responding to synthetic hydroxyapatite implanted in rat jaw bone. *J Electron Microsc (Tokyo)* 41 : 141-146. 1992
- 30) Campbell P, Ma S, Yeom B, McKellop H, Schmalzried TP, Amstutz HC : Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biomed Mater Res* 29 : 127-131. 1995
- 31) Kobayashi A, Bonfield W, Kadoya Y, Yamac T, Freeman MA, Scott G, Revell PA : The size and shape of particulate polyethylene wear debris in total joint replacements. *Proc Inst Mech Eng* 211 : 11-15. 1997
- 32) Prescott RJ, Ryan WG, Bisset DL : Histopathological features of failed prosthetic Leeds-Keio anterior cruciate ligaments. *J Clin Pathol* 47 : 375-376. 1994
- 33) Ryan WG and Banks AJ : A failure mechanism of Leeds-Keio ligaments. *Injury* 25 : 443-445. 1994
- 34) Wulling M, Engels C, Jesse N, Werner M, Delling G, Kaiser E : The nature of giant cell tumor of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 : 467-474. 2001
- 35) Eisenstein R. Giant-cell tumor of tendon sheath : Its histogenesis as studied in the electron microscope. *J Bone Joint Surg Am* 50 : 476-486. 1968
- 36) Wood GS, Beckstead JH, Medeiros LJ, Kempson RL, Warnke RA : The cells of giant cell tumor of tendon sheath resemble osteoclasts. *Am J Surg Pathol* 12 : 444-452. 1988
- 37) Tashiro H, Iwasaki H, Kikuchi M, Ogata K, Okazaki M : Giant cell tumor of tendon sheath : A single and multiple immunostaining analysis. *Pathol Int* 45 : 147-155. 1995
- 38) Oehler S, Fassbender HG, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Kirchner T, Aigner T : Cell populations involved in pigmented villonodular synovitis of the knee. *J Rheumatol* 27 : 463-470. 2000
- 39) Mii Y, Miyachi Y, Morishita T, Miura S, Honoki K, Aoki M, Tamai S : Osteoclast origin of giant cells in giant cell tumors of bone : ultrastructural and cytochemical study of six cases. *Ultrastruct Pathol* 15 : 623-629. 1991
- 40) Weiss SW, Goldblum JR. Benign tumors and tumor-like lesions of synovial tissue. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*, 4rd ed. Mosby, St Louis, p 1037-1060, 2001
- 41) Kusuzaki K, Takeshita H, Murata H, Hashiguchi S, Nozaki T, Emoto K, Ashihara T, Hirasawa Y : Relationship between binuclear and multinuclear cells in giant cell tumor of bone. *Anticancer Res* 20 : 2463-2467. 2000
- 42) Seki K, Hirose T, Hasegawa T, Hizawa K : Giant cell tumor of tendon sheath. An immunohistochemical observation on the characteristics and the capacity of proliferation of tumor cells. *Zentralbl Pathol* 139 : 287-294. 1993
- 43) Danks L, Sabokbar A, Gundle R, Athanasou NA : Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 61 : 916-921. 2002
- 44) Nakamura H, Ozawa H : Immunohistochemical localization of heparan sulfate proteoglycan in rat tibiae. *J Bone Miner Res* 9 : 1289-1299. 1994
- 45) Ejiri S, Segawa A, Miyaura C, Abe E, Suda T, Ozawa H : An ultrastructural study on the multinucleation process of mouse alveolar macrophages induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Bone Miner Res* 2 : 547-557. 1987
- 46) Rao AS, Vigorita VJ : Pigmented villonodular synovitis (giant-cell tumor of the tendon sheath and synovial membrane). A review of eighty-one cases. *J Bone Joint Surg Am* 66 : 76-94. 1984
- 47) Kadoya Y, Kobayashi A, Ohashi H : Wear and osteolysis in total joint replacements. *Acta Orthop Scand Suppl* 278 : 1-16. 1998
- 48) Maloney WJ, Smith RL : Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty : the role of particulate wear debris *J BJS* 77 : 1448-1461. 1995
- 49) Neale SD, Athanasou NA : Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts. *Acta Orthop Scand* 70 : 452-8. 1999
- 50) Chiba J, Rubash HE, Kim KJ, Iwaki Y : The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop* 300 : 304-312. 1994
- 51) Hirashima Y, Ishiguro N, Kondo S, Iwata H : Osteoclast induction from bone marrow cells is due to pro-inflammatory mediators from macrophages exposed to polyethylene particles : A possible mechanism of osteolysis in failed THA. *J Biomed Mater Res* 56 : 177-183. 2001
- 52) Sabokbar A, Fujikawa Y, Neale S, Murray DW, Athanasou NA : Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. *Ann Rheum Dis* 56 : 414-420. 1997
- 53) Popoff SN, Marks SC Jr : Ultrastructure of the giant cell infiltrate of subcutaneously implanted bone particles in rats and mice. *Am J Anat* 177 : 491-503. 1986
- 54) Wang W, Ferguson DJ, Quinn JM, Simpson AH, Athanasou NA : Osteoclasts are capable of particle phagocytosis and bone resorption. *J Pathol* 182 : 92-

98. 1997
- 55) Anazawa U, Hanaoka H, Morioka H, Morii T, Toyama Y : Ultrastructural cytochemical and ultrastructural morphological differences between human multinucleated giant cells elicited by wear particles from hip prosthesis and artificial ligaments at knee. *Ultrastruct Pathol* 28 : 353-359. 2004
- 56) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ : Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK. *J Exp Med* 17 : 275-286, 2000
- 57) Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA : Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 21 : 73-80, 2003
-

学位論文

統合失調症慢性期症例に対する薬物療法の最適化

慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室

井之頭病院

(指導：鹿島晴雄教授)

すずき たけふみ  
鈴木 健文

(平成 19 年 1 月 23 日受付)

Key Words : antipsychotic, dose reduction, high-dose polypharmacy, monotherapy, schizophrenia, second-generation antipsychotic, single dosing

統合失調症治療において薬物療法が果たす役割は非常に大きい。その際、薬剤選択、その用量および使用期間が非常に重要な要素となる。薬剤選択に関し、我が国における特徴の一つは、抗精神病薬の多種併用・大量療法である。概して、そうした治療法が選択される確率は我が国では圧倒的に高い<sup>1)</sup>。海外においても、抗精神病薬多種併用療法は実際治療の場で頻用されてきているようであるが、最大の問題は有効性および安全性に関する検証が依然不十分である点にある。

Stahl と Grady による包括的レビューによると<sup>2)</sup>、抗精神病薬併用の有用性に関するエビデンスはほとんどない。更には、異なる薬理学的効果が期待しうる向精神病併用の効果ですら、気分安定（抗てんかん）薬であるバルプロ酸による治療増強効果を除いては、十分に立証されていない。原則は抗精神病薬単剤治療を順番に試していくこととされる<sup>3, 4)</sup>。また用量に関しては、従来型抗精神病薬の大量療法は古くは有効とされていたが<sup>5, 6)</sup>、

以降の研究から一般的に有用性に乏しいとされており<sup>7-9)</sup>、1996 年以降本邦で導入されてきている第二世代抗精神病薬に関しても、少なくとも錐体外路系副作用の相対的リスクが低いオランザピン、クエチアピンを除いては<sup>10, 11)</sup>、大量投与が一般的とはいえない。

我が国における統合失調症の薬物療法は一種独特であるが、経験主義に基づく治療を漫然と行ってきたための結果であると推測される。最近海外で報告されている併用には少なくとも 1 種類の第二世代抗精神病薬を含む場合が多いようである<sup>12-14)</sup>。しかしながら日本では、理論的根拠に乏しいとされる<sup>15)</sup>、従来型低力価薬（クロルプロマジンなど）と高力価薬（ハロペリドールなど）の併用が依然一般的である。しかも近年、第二世代抗精神病薬は急速に普及しつつあるものの、その使用法は依然として専ら追加としての使用であることが多いということが問題視されている<sup>16)</sup>。

現在に至るまでの、抗精神病薬に関するエビデンスの

本論文は、Suzuki T, Uchida H, Tanaka KF, Tomita M, Tsunoda K, Nomura K, Takano H, Tanabe A, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : Reducing the dose of antipsychotic medications for those who had been treated with high-dose antipsychotic polypharmacy : an open study of dose reduction for chronic schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 18 : 323-329, 2003 の一部、Suzuki T, Uchida H, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : A clinical case series of switching from antipsychotic polypharmacy to monotherapy with a second-generation agent on patients with chronic schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28 : 361-369, 2004 の一部、Suzuki T, Uchida H, Tanaka KF, Nomura K, Takano H, Tanabe A, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : Revising polypharmacy to a single antipsychotic regimen for patients with chronic schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 7 : 133-142, 2004 の一部、Suzuki T, Uchida H, Takeuchi H, Nomura K, Tanabe A, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : Simplifying psychotropic medication regimen into a single night dosage and reducing the dose for patients with chronic schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 181 : 566-575, 2005 の一部を含む。

ほとんどすべては単剤治療を扱ったものである<sup>5,9,17,29)</sup>。抗精神病薬併用療法の頻度は海外でも増加してきているといわれるが<sup>13,30)</sup>、これまでの報告は実態調査<sup>12,13,30,31)</sup>や、処方者側の理由を調査した程度のも<sup>32)</sup>に終始している。臨床試験のゴールドスタンダードとされる、二重盲検無作為割り付け試験で抗精神病薬併用療法を検証した研究は過去に少なく<sup>33,37)</sup>、結果も一致していない<sup>38)</sup>。特筆すべきはこれらの研究<sup>34,37)</sup>が、クロザピンに対する治療反応が不十分な症例を対象としていることである。クロザピン治療は、無顆粒球症などの重篤かつ致死的作用を引き起こすこともあるため、通常第一選択とはならないが、治療困難例に対する有効性が示唆されている<sup>24,39)</sup>。つまり換言すると、抗精神病薬併用療法の位置づけはまさに最終手段といえる<sup>3)</sup>。

その一方、東アジア6カ国における処方調査の結果においても、やはり日本での抗精神病薬併用率は79%と最頻であり、総服用量の概算値であるクロルプロマジン換算での平均抗精神病薬剤量は1034 mg/dayと最も高かった<sup>31)</sup>。クロザピンが未承認である現状を勘案しても、我が国における極端な傾向から判断すると、エビデンス

に基づく治療が軽視されてきた可能性が示唆される。そこで我々は、根拠に乏しい治療法が漫然と行われている現状を問題視し、主に統合失調症慢性期症例に対して、しばしば行われている治療法を批判的に検討するための研究を行った。

## 対象および方法

### 研究1. 抗精神病薬多種併用療法から主剤による単剤治療への移行<sup>1,40)</sup>(以降、単剤化研究と称す)

47名の慢性統合失調症(International Classification of Diseases-10th edition: ICD-10<sup>41)</sup>に基づくコードF2)症例を対象として、抗精神病薬多種併用療法から、主剤による単剤治療への移行を行った。エントリー前6ヶ月以上処方が固定化し、同じ抗精神病薬2剤以上による併用療法を受けていた症例を選択し、処方調整の影響を明確にする目的で、その間Global Assessment of Functioning (GAF<sup>42)</sup>、第1表に示す機能の全体的評定)で、10点以上の症状変動を伴う症例は除外した。

第1図に示したように、各症例において、抗精神病薬

第1表 (Global Assessment of Functioning: GAF 機能の全体的評定, American Psychiatric Association 1994)

|        |  |
|--------|--|
| 100~91 | 広範囲の行動にわたって最高に機能しており、生活上の問題で手に負えないものは何もなく、その人の多数の長所があるために他の人々から求められている。症状は何もない。  |
| 90~81  | 症状が全くないか、ほんの少しだけ(例:試験前の軽い不安)。すべての面でよい機能で、広範囲の活動に興味をもち参加し、社会的にはそつがなく、生活に大満足し、日々のありふれた問題や心配以上のものはない(例:たまに、家族と口論する)。                                    |
| 80~71  | 症状があったとしても、心理的社会的ストレスに対する一過性で予期される反応である(例:家族と口論した後の集中困難)、社会的、職業的または学校の機能にごくわずかな障害以上のものはない(例:学業で一時遅れをとる)。   |
| 70~61  | いくつかの軽い症状がある(例:抑うつ気分と軽い不眠)、または社会的、職業的または学校の機能に、いくらかの困難がある(例:時に不眠をきたしたり、家の金を盗んだりする)が、全般的には、機能はかなり良好であって、有意義な対人関係もかなりある。                               |
| 60~51  | 中等度の症状(例:感情が平板的で、会話がまわりくどい、時に、恐怖発作がある)、または社会的、職業的または学校の機能における中等度の障害(例:友人が少ない、仲間や仕事の同僚との葛藤)。  |
| 50~41  | 重大な症状(例:自殺の考え、強迫的儀式がひどい、しょつ中万引きする)、または社会的、職業的または学校の機能において何か重大な障害(例:友人がない、仕事が続かない)。   |
| 40~31  | 現実検討や意思伝達にいくらかの欠陥(例:会話は時々、非論理的、あいまい、または関連性がなくなる)、または仕事や学校、家族関係、判断、思考または気分など多くの面での粗大な欠陥(例:抑うつ的な男が友人を避け家族を無視し、仕事ができない。子供が年下の子供を殴り、家で反抗的で、学校では勉強ができない)。 |
| 30~21  | 行動は妄想や幻覚に相当影響されている、または意思伝達か判断に粗大な欠陥がある(例:時々、滅裂、ひどく不適切にふるまう、自殺の考えにとらわれている)、またはほとんどすべての面で機能することができない(例:1日中、床についている、仕事も家庭も友達もない)。                       |
| 20~11  | 自己または他者を傷つける危険がかなりあるか(例:死をはっきり予期することなしに自殺企図、しばしば暴力的、躁病性興奮)、または時には最低限の身の清潔維持ができない(例:大便を塗りたくる)、または意思伝達に粗大な欠陥(例:ひどい滅裂か無言症)。                             |
| 10~1   | 自己または他者をひどく傷つける危険が続いている(例:何度も暴力を振るう)、または最低限の身の清潔維持が持続的に不可能、または死をはっきり予測した重大な自殺行為。   |
| 0      | 情報不十分。   |

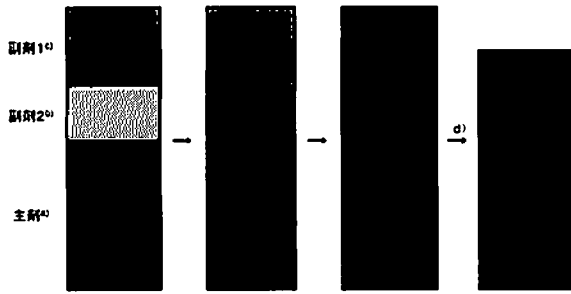


図1 単剤化研究の概要

①クロルプロマジン換算値で最大の抗精神病薬 ②相対用量の低い併用抗精神病薬 ③相対用量の高い併用抗精神病薬 ④原則総用量を保ちつつ主剤による単剤治療へ移行したが、副作用が問題になった場合はベースライン程度にまで改善するまで減薬した経過中 GAF と CGI を用い、最終評価は単剤治療移行24週後に行った

の総用量を稲垣らの換算表<sup>43)</sup>改訂版を基に算出し、原則等価を保ちつつ、相対的用量の少ないものから順に主剤へ移行した。この際、副作用が問題となった場合はベースライン程度に改善するまでの減薬を許容するとともに、もともと使用されていた場合に限り、それ単独では抗精神病作用が十分には期待されず、その鎮静作用のため睡眠補助薬として汎用される、従来型低力価抗精神病薬のクロルプロマジンやレボメプロマジン 25 mg 程度などを、主に夜間に継続して使用することは許容した。

GAF、および第2表に示す臨床的全般改善度 (Clinical Global Impression : CGI ; 疾患重症度 Severity of Illness : SOI、および、概括改善度 Global Improvement : GI<sup>44)</sup>) (第2表) で経過観察し、単剤移行後24週間経過した段階で最終評価を行った。抗精神病薬以外の他の向精神薬は原則期間中継続した。

**研究2. 向精神薬の一日複数回投与から就寝前一回投与への移行と用量削減<sup>45)</sup> (以降、単回投与研究と称す)**

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th edition (DSM-IV<sup>42)</sup>)に基づく慢性統合失調症症例で、抗精神病薬をはじめとする向精神薬を一日2回以上服用していた50例において、薬剤を就寝前1回投与に移行し、その後有用性に乏しいと考えられる薬剤の用量を削減した。エントリー前6ヶ月以上同じ向精神薬による治療を受けていた症例を選択し、処方調整の影響を明確にする目的で、その間 GAF<sup>42)</sup>で10点以上の症状変動を伴う症例は除外した。

症例は次のいずれかの方法で処方調整を受けた。1群：第2図上に示したように、まず抗精神病薬のみを就寝前投与とし、12週後にその他の向精神薬も就寝前に移行する、または2群：第2図下に示したように、全ての向

第2表 (Clinical Global Impression : CGI 臨床的全般改善度, Guy 1976)

| Severity of Illness : SOI<br>疾患重症度 | Global Improvement : GI<br>概括改善度 |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 1 正常                               | 非常に大きな改善を認めた                     |
| 2 精神疾患の境界線上                        | 大きな改善を認めた                        |
| 3 軽度の精神疾患                          | 軽度の改善を認めた                        |
| 4 中等度の精神疾患                         | 変化なし                             |
| 5 顕著な精神疾患                          | 軽度の悪化を認めた                        |
| 6 重度の精神疾患                          | 大きな悪化を認めた                        |
| 7 非常に重度の精神疾患                       | 非常に大きな悪化を認めた                     |

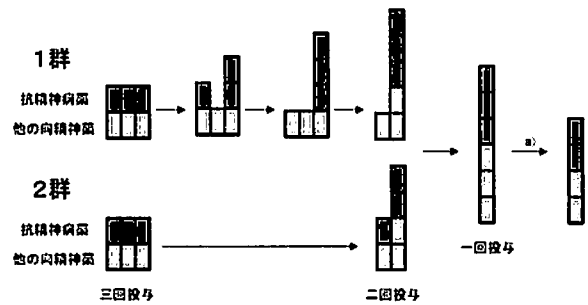


図2 単回投与研究の概要

1群では、最初に抗精神病薬を就寝前一回投与とし、12週間の維持期を経て、その他の向精神薬も一回投与とした  
2群では、抗精神病薬、および、その他の向精神薬も同時に就寝前一回投与とした  
a) 就寝前一回投与として12週後、もしくは、副作用が問題であった場合はそれ以前に、有用性に乏しい薬剤を削減した  
最終評価は減量完了12週後に行った

精神薬を同時期に就寝前一回投与とする、という方法である。単回投与として12週後、または副作用が問題となった場合にはそれ以前に、主に多種併用治療を受けていた症例を対象として、有用性に乏しいと判断される向精神薬を減量した。

GAF<sup>42)</sup>、CGI<sup>44)</sup>、18項目簡易精神病評価尺度 (Brief Psychiatric Rating Scale : BPRS<sub>17</sub><sup>46)</sup>) により臨床評価を行った。抗精神病薬による錐体外路症状の判定には、Drug-Induced Extra-Pyramidal Symptoms Scale (DIEPSS<sup>47)</sup>)を用いた。最終評価は単回投与に引き続き減量完了後12週で行った。また最終評価時に単回投与移行に成功した症例において、自覚的印象を主観的GI (圧倒的改善 : 1、不変 : 4、圧倒的悪化 : 7、の7段階で示される概括改善度)を用いて聴取した。

**研究3. 抗精神病薬総用量の削減<sup>48)</sup> (以降、減量研究と称す)**

クロルプロマジン換算抗精神病薬総量<sup>49)</sup>で1000 mg以上を服用していた(33名)、またはそれより少量でも



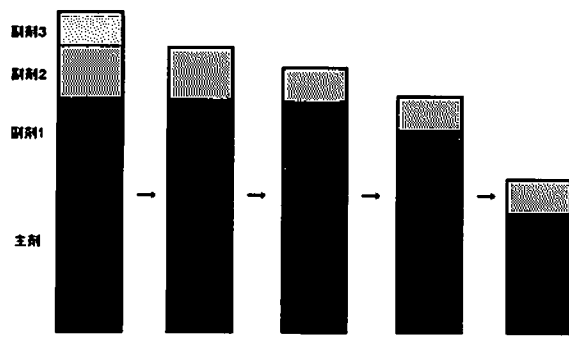


図3 減量研究の概要

クロルプロマジン換算値で相対的用量の低い抗精神病薬から減量を行った経過中 GAF と CGI を用い、最終評価は減量完了24週後に行った

副作用が問題となっていた、DSM-IV<sup>(2)</sup>に基づく合計 41 名の慢性統合失調症症例を対象として、第 3 図に示したように、相対用量の少ないものから順に可能な範囲で、慎重に抗精神病薬用量の削減を行った。

エントリー前 6 ヶ月以上固定された抗精神病薬による治療を受けていた症例を選択し、処方調整の影響を明確にする目的で、その間著明な症状変動を伴う症例は除外した。各症例において、もともと使用していた場合に限り、その用量単独では抗精神病作用を期待しにくい、クロルプロマジン 25 mg 程度の従来型低力価抗精神病薬を、専ら夜間に継続して使用することは許容した。

臨床評価として GAF<sup>(2)</sup> と CGI<sup>(4)</sup> を用い、減量後 24 週間に最終評価を行った。抗精神病薬以外の他の向精神薬は原則経過中継続した。

治療者と評価者が同じであるという問題点を考慮し、各症例は評価者による定期的な会合において検討され、治療転帰に関するコンセンサスを得た。またこれらの会合において評価尺度のトレーニングを行った。それぞれの研究において、Fisher 検定、Mann-Whitney's U 検定、または Wilcoxon signed rank 検定を用いて統計学的比較を行い、両側  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  で有意とした。いずれの研究においても、治療成功群を改善および不変の症例で定義した。全症例で治療法に関して説明の後、口頭および書面による同意を得た。また、それぞれの研究は当該医療機関の倫理委員会による承認を受けた。

## 結 果

### 1. 単剤化研究

治療開始時症例背景のデータを第 3 表に示した。入院 27 例、平均年齢、罹病期間、GAF、SOI はそれぞれ 51 歳、24 年、36、4.7 (顕著な精神障害) であった。単剤治療移行後の結果を第 4 表に示した。1 例は (再発は確認されなかったが) 治療中断、1 例は単剤移行が可能であったものの開始時より用量がかなり増加した。もう 1 例は最初スルトブリドに統一された際にジストニアが生じ、その後クロルプロマジン単剤への移行に成功した。これら 3 例を除いた 44 例が評価対象となった。24 名は不変、各 10 名ずつが改善、悪化した。全体では GAF36、SOI4.8 で不変、GI は 4.1 で変化なしであった。

単剤移行成功群において抗精神病薬剤数は、平均 4.8 週間 (0-20 週) で 3.0 剤から 1.4 剤に有意に減少した

第 3 表 (治療介入前症例背景)

|                                   | 入院 27 症例                          | 外来 20 症例                                  | 全症例   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---|---|
| 男性/女性                             | 19 名/8 名                          | 14 名/6 名                                  | 33 名/14 名   |
| 下位分類                              | 妄想型 10 名/残遺型 11 名/破瓜型 4 名/緊張型 2 名 | 妄想型 9 名/残遺型 6 名/破瓜型 1 名/分類不能型 3 名/単純型 1 名 | 妄想型 19 名/残遺型 17 名/破瓜型 5 名/分類不能型 3 名/緊張型 2 名/単純型 1 名 |
| 年齢 (歳)*                           | 57.0 (31-72)                      | 42.9 (22-69)**                            | 51.0 (22-72)  |
| 罹病期間 (年)*                         | 29.0 (15-49)                      | 17.4 (3-50)*                              | 24.1 (3-50)   |
| 総入院期間 (年)*                        | 21.3 (3-47)                       | 2.6 (0-21)***                             | 13.3 (0-47)   |
| 抗精神病薬剤数*                          | 2.96 (2-5)                        | 2.85 (2-4) n.s.                           | 2.91 (2-5)  |
| Global Assessment of Functioning* | 27.7 (15-41)                      | 46.0 (33-61)***                           | 35.5 (15-61)  |
| Severity of Illness*              | 5.30 (3-7)                        | 4.00 (3-6)***                             | 4.74 (3-7)  |
| 抗精神病薬総用量 (クロルプロマジン換算一日量)*         | 1362 (151-6030)                   | 769 (188-1975) n.s.                       | 1109 (151-6030)                                     |

\*平均 (範囲)。

\*\* $p < 0.01$  \*\* $p < 0.001$  \*\*\* $p < 0.0001$  (Mann-Whitney's U test)。

対象は平均 2.9 剤の抗精神病薬で治療されており、平均一日量は 1000 mg を超えていた。

(Suzuki et al : Int J Neuropsychopharmacol 7 : 133-142, 2004 の第 2 表を許可を得て転載、一部改変)

第4表 (多種併用療法から単剤治療移行後の結果)

|                                      | 入院症例                                  | 外来症例                               | 全症例                                   |
|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 改善/不変/悪化<br>症例数                      | 4/13/8<br>評価不能2例                      | 6/11/2<br>評価不能1例                   | 10/24/10<br>評価不能3例                    |
| Global Assessment of Functioning*    | 27.8 (20-41)→27.0<br>(10-41) n.s.     | 45.7 (33-61)→47.2<br>(33-65)*      | 35.5 (20-61)→35.5<br>(10-65) n.s.     |
| Severity of Illness*                 | 5.32 (4-6)→5.36 (4-7)<br>n.s.         | 4.05 (3-6)→3.95 (3-5)<br>n.s.      | 4.77 (3-6)→4.75 (3-7)<br>n.s.         |
| Global Improvement*                  | 4.24 (2-7)                            | 3.79 (3-5) n.s. <sup>b</sup>       | 4.05 (2-7)                            |
| 成功例における抗精神病薬剤数*                      | 3.12 (2-5)→1.47 (1-3)***              | 2.94 (2-4)→1.35 (1-2)***           | 3.03 (2-5)→1.41 (1-3)****             |
| 成功例における抗精神病薬総用量 (ク<br>ロルプロマジン換算一日量)* | 1484 (151-6030)→<br>1062 (150-4041)** | 858 (233-1975)→<br>742 (67-1800)** | 1171 (151-6030)→<br>952 (67-4041)**** |

成功例=改善+不変例 (入院 17 例, 外来 17 例).

全体的には GAF は 35.5 で不変, GI4 で変化なしであった. 成功 34 例においては抗精神病薬剤数, 用量ともに有意に削減された.

\*平均 (範囲).

<sup>b</sup>有意差なし (Mann-Whitney's U test).

\*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p<0.0001 (Wilcoxon signed rank test).

(Suzuki et al : Int J Neuropsychopharmacol 7 : 133-142, 2004 の第 4 表を許可を得て転載, 一部改変)

( $p<0.0001$ ). 22 例 (50.0%) では完全に単剤治療に移行でき, 12 例では少量の低力価薬併用を要した. 抗精神病薬剤量削減は当初の目的ではなかったが, 成功群においてクロルプロマジン換算総用量は, 1171 mg/day から 952 mg/day と有意に減少した ( $p<0.0001$ ).

悪化 10 例のうち, 2 例は非常に悪化して亜昏迷状態を示したが, 後に第二世代抗精神病薬であるオランザピンに切り替えたところ, 治療反応は良好であった. 6 例では興奮が悪化し, うち 4 例では鎮静不十分と考えられ, 2 例では錐体外路症状増悪の関与が疑われた. 1 例では開始時には認めなかった痙攣発作を認めた. もう 1 例は死亡例であったが, 変薬中止後ずっと後に感染症を発症したものであり, 本介入とは無関係と考えられた. 悪化例のうち, 9 例は低力価薬と高力価薬の併用で治療されていた.

単剤移行成功群と悪化群の比較を第 5 表に示した. 後者で総入院期間が有意に長く ( $p<0.01$ ), 開始時 GAF が有意に低かった ( $p<0.05$ ). 有意差は無かったものの, 入院 27 例 (2 例評価不能) 中 8 例が悪化したのに対し, 外来 20 例 (1 例評価不能) のうち悪化したのは 2 例のみであった. 本研究が行われたときに唯一採用されていた, 第二世代抗精神病薬であるリスペリドンを服用していた症例は 5 名のみで, うち 4 例で単剤移行が成功した. 低力価薬が主剤として使用されていた症例は 8 例 (17.0%) のみであった.

## 2. 単回投与研究

治療開始時の症例背景を第 6 表に示した. 外来 39 例,

平均年齢, 罹病期間, GAF, SOI, BPRS, DIEPSS はそれぞれ 47 歳, 21 年, 50, 4.3 (中等度の精神障害), 5.4, 7.0 であり, 27 例は 1 日 3 回投与であった. 就寝前単回投与後の結果を第 7 表に示した. 50 例中改善 11 例 (減薬後改善: 7 例, 単回投与後改善: 1 例, 経過中一貫して改善: 3 例), 不変 29 例, 悪化 7 例 (日中の不安定増悪: 4 例, 服薬不遵守から再入院: 2 例, 減薬後悪化: 1 例), 評価不能 3 例 (転居, 不変で同意取り下げ, 試験前より服薬不遵守, 各 1 例) であった. 総じて BPRS と SOI は不変であった. GAF と DIEPSS は僅かに改善した (ともに  $p<0.05$ ).

抗精神病薬総量, その剤数および総向精神薬剤数は 957 mg/day から 722 mg/day ( $p<0.0001$ ), 1.9 剤から 1.6 剤 ( $p<0.01$ ), および 4.0 剤から 3.2 剤 ( $p<0.0001$ ) へと有意に削減された. 先に抗精神病薬のみ, 次にその他の向精神薬を一回投与とした 1 群では, 全ての向精神薬を一括して一回投与とした 2 群と比し, 治療開始時より重症で使用薬剤も多く, 治療介入後薬剤がより有意に削減されたが, 全般的には 2 群における治療結果の方が良好であった.

35 例 (74.5%) において, 平均 9.7 週の間 1 種類以上の向精神薬の用量削減が可能であった. 経過中, 臨床的に重大な副作用は認めなかったが, 翌朝の過鎮静のために途中で薬剤削減を必要としたのは 10 例 (21.3%) で, うち 8 例はクロルプロマジン換算 1000 mg 以上の大量療法を受けていた. 単回投与成功群と悪化群の比較を第 8 表に示した. 悪化群全ての症例は一日三回向精神薬を服用しており, この項目でのみ有意差を

第5表 (単剤治療移行成功群と悪化群との比較)

|   | 入院症例 |                 | 外来症例 |                | 全症例  |                 |      |
|---|------|-----------------|------|----------------|------|-----------------|------|
| 年齢(歳)                                   | 成功群  | 56.2 (31-72)    | n.s. | 42.9 (22-69)   | n.s. | 49.6 (2-72)     | n.s. |
|   | 悪化群  | 57.8 (41-72)    |      | 43.5 (36-51)   |      | 54.9 (36-72)    |      |
| 罹病期間(年)                                 | 成功群  | 27.3 (15-49)    | n.s. | 17.3 (3-50)    | n.s. | 22.3 (3-50)     | n.s. |
|   | 悪化群  | 30.8 (20-41)    |      | 19.0 (10-28)   |      | 28.4 (10-41)    |      |
| 開始時抗精神病薬剤数                              | 成功群  | 3.12 (2-5)      | n.s. | 2.94 (2-4)     | n.s. | 3.03 (2-5)      | n.s. |
|   | 悪化群  | 2.63 (2-4)      |      | 2.50 (2-3)     |      | 2.60 (2-4)      |      |
| 開始時抗精神病薬総用量(クロ<br>ルプロマジン換算一日量)          | 成功群  | 1484 (151-6030) | n.s. | 858 (233-1975) | n.s. | 1171 (151-6030) | n.s. |
|   | 悪化群  | 1088 (325-2500) |      | 301 (226-375)  |      | 930 (226-2500)  |      |
| 開始時 Severity of Illness                 | 成功群  | 5.24 (4-6)      | n.s. | 4.00 (3-6)     | n.s. | 4.62 (3-6)      | n.s. |
|   | 悪化群  | 5.50 (4-6)      |      | 4.50 (4-5)     |      | 5.30 (4-6)      |      |
| 抗精神病薬変更期間(週)                            | 成功群  | 6.6 (0-20)      | n.s. | 3.0 (0-12)     | n.s. | 4.8 (0-20)      | n.s. |
|   | 悪化群  | 5.9 (5-12)      |      | 0.0            |      | 4.7 (0-12)      |      |
| 開始時 Global Assessment of<br>Functioning | 成功群  | 28.5 (20-41)    | n.s. | 46.6 (33-61)   | n.s. | 37.6 (20-61)    | *    |
|   | 悪化群  | 26.3 (20-34)    |      | 38.5 (37-40)   |      | 28.7 (20-40)    |      |
| 過去の総入院期間(年)                             | 成功群  | 17.6 (3-47)     | *    | 2.8 (0-21)     | n.s. | 10.2 (0-47)     | **   |
|   | 悪化群  | 26.1 (19-37)    |      | 2.0 (1-3)      |      | 21.3 (1-37)     |      |

平均(範囲).

\*p<0.05 \*\*p<0.01 (Mann-Whitney's U test).

単剤移行失敗群では有意に過去の総入院期間が長く、開始時 GAF 評点が低かった。

(Suzuki et al : Int J Neuropsychopharmacol 7 : 133-142, 2004 の第5表を許可を得て転載、一部改変)

第6表 (治療介入前症例背景)

|   | 1群(25例)                  | 2群(25例)                 | 合計(50例)                      |
|---|--------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 性別(男性/女性)   | 18/7                     | 13/12                   | n.s.* 31/19                  |
| 外来/入院   | 22/3                     | 17/8                    | n.s.* 39/11                  |
| 抗精神病薬服用回数(t.i.d./b.i.d.) <sup>c</sup>                         | 15/10                    | 12/13                   | n.s.* 27/23                  |
| 年齢(歳) <sup>c</sup>  | 49.6 (12.0, 29-77)       | 43.4 (12.5, 25-73)      | n.s. 46.5 (12.5, 25-77)      |
| 罹病期間(年) <sup>c</sup>  | 25.3 (12.1, 8-48)        | 17.0 (9.5, 2-37)        | * 21.2 (11.5, 2-48)          |
| 教育(年) <sup>c</sup>  | 11.2 (2.2, 9-16)         | 13.0 (2.5, 9-16)        | * 12.1 (2.5, 9-16)           |
| 総入院回数 <sup>c</sup>  | 4.0 (3.0, 1-11)          | 3.2 (3.6, 0-18)         | n.s. 3.6 (3.3, 0-18)         |
| 総入院期間(年) <sup>c</sup>   | 8.4 (11.4, 0.5-45)       | 4.7 (8.1, 0-33)         | n.s. 6.6 (10.0, 0-45)        |
| Global Assessment of Functioning <sup>c</sup>                 | 48.4 (8.1, 25-60)        | 52.2 (11.6, 32-72)      | n.s. 50.3 (10.1, 25-72)      |
| Severity of Illness <sup>c</sup>                              | 4.5 (0.7, 3-6)           | 4.2 (0.9, 3-6)          | n.s. 4.3 (0.8, 3-6)          |
| Brief Psychiatric Rating Scale <sup>c</sup>                   | 56.8 (8.8, 31-71)        | 51.4 (12.0, 27-70)      | n.s. 54.1 (10.7, 27-71)      |
| Drug-Induced Extra-Pyramidal Sym-<br>ptoms Scale <sup>c</sup> | 8.0 (5.1, 1-22)          | 5.9 (3.9, 2-17)         | n.s. 7.0 (4.6, 1-22)         |
| 抗精神病薬総用量(クロルプロマジン<br>換算一日量) <sup>c</sup>                      | 1122 (911, 100-<br>4188) | 773 (543, 100-<br>1973) | n.s. 947 (763, 100-<br>4188) |
| 抗精神病薬剤数 <sup>c,d</sup>  | 2.2 (1.3, 1-5)           | 1.7 (1.1, 1-4)          | 1.9 (1.2, 1-5)               |
| 向精神薬総数 <sup>c,e</sup>   | 4.5 (2.2, 1-10)          | 3.5 (1.9, 2-8)          | 4.0 (2.1, 1-10)              |

<sup>a</sup>Fisher's exact test による。

<sup>b</sup>t.i.d.: 抗精神病薬を一日三回服用。b.i.d.: 一日二回服用。

<sup>c</sup>平均(標準偏差, 範囲)。

<sup>d</sup>1, 2, 3, 4, 5 剤の抗精神病薬がそれぞれ 27, 9, 6, 7, 1 例に使用されていた。

<sup>e</sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 剤の(抗精神病薬を含む)向精神薬がそれぞれ 2, 13, 12, 5, 4, 9, 4, 1 例に使用されていた。

\*p<0.05 (Mann-Whitney's U test).

(Suzuki et al : Psychopharmacology (Berl) 181 : 566-575, 2005 の第2表を許可を得て転載、一部改変)

第7表 (就寝前一回投与後の結果)

|  | 1群 (24例)  | 2群 (23例)                            | 合計 (47例)                |
|--|---|-------------------------------------|-------------------------|
| 改善/不変/悪化症例数  | 5 (GI=2:2例, GI=3:3例)/14/5 (GI=5:2例, GI=6:2例, GI=7:1例) | 6 (GI=2:2例, GI=3:4例)/15/2 (GI=5:2例) | 11/29/7 <sup>a</sup>    |
| Global Assessment of Functioning <sup>b</sup>            | 48.0→48.2 n.s.  | 51.8→53.7**                         | 49.9→50.9 <sup>a</sup>  |
| Severity of Illness <sup>b</sup>                         | 4.54→4.54 n.s.  | 4.26→4.22 n.s.                      | 4.40→4.38 n.s.          |
| Brief Psychiatric Rating Scale <sup>b</sup>              | 56.8→56.8 n.s.  | 51.2→50.3 n.s.                      | 54.0→53.6 n.s.          |
| Drug-Induced Extra-Pyramidal Symptoms Scale <sup>b</sup> | 8.25→7.71 <sup>a</sup>                                | 6.13→6.13 n.s.                      | 7.21→6.94 <sup>a</sup>  |
| 抗精神病薬剤量 (クロルプロマジン換算一日量) <sup>b</sup>                     | 1149→786***   | 756→656**                           | 957→722****             |
| 抗精神病薬剤数 <sup>b</sup>                                     | 2.21→1.71 <sup>a</sup>                                | 1.65→1.57 n.s.                      | 1.94→1.64**             |
| 総向精神薬剤数 <sup>b</sup>                                     | 4.58→3.25***  | 3.48→3.09 <sup>a</sup>              | 4.04→3.17****           |
| Global Improvement                                       | 4.08  | 3.74                                | 3.91 <sup>c</sup>       |
| 主観的 Global Improvement <sup>d</sup>                      | 2.63 (19例)  | 2.67 (21例)                          | 2.65 (40例) <sup>e</sup> |

<sup>a</sup>各群で有意差無し。GI: Global Improvement.

<sup>b</sup>開始時→終了時のデータ。

<sup>c</sup>各群で有意差無し (Mann-Whitney's U test)。

<sup>d</sup>成功40例 (改善11例, 不変29例) における評価。主観的GI2=大きな改善を認めた。主観的GI3=軽度の改善を認めた。

<sup>e</sup>p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p<0.0001 (Wilcoxon signed rank test)。

(Suzuki et al: Psychopharmacology (Berl) 181: 566-575, 2005 の第3表を許可を得て転載。一部改変)

第8表 (就寝前一回投与で成功群と悪化群との比較)

|  | 成功40例                                       | 悪化7例                                     | *                                      |
|--|---|--|--|
| 性別 (男性/女性)   | 25/15                                       | 4/3                                      | n.s. <sup>a</sup>                      |
| 外来/入院  | 29/11                                       | 7/0                                      | n.s. <sup>a</sup>                      |
| 抗精神病薬服用回数 (t.i.d./b.i.d.)                                | 19/21                                       | 7/0                                      | * <sup>a</sup>                         |
| 年齢 (歳)   | 48.0 (12.4, 25-77)                          | 45.1 (10.2, 32-59)                       | n.s. <sup>b</sup>                      |
| 罹病期間 (年)   | 22.1 (11.4, 2-48)                           | 21.7 (12.2, 4-39)                        | n.s. <sup>b</sup>                      |
| 教育 (年)   | 11.8 (2.3, 9-16)                            | 13.1 (3.4, 6-16)                         | n.s. <sup>b</sup>                      |
| 総入院回数  | 3.7 (3.6, 0-18)                             | 3.7 (1.9, 2-6)                           | n.s. <sup>b</sup>                      |
| 総入院期間 (年)  | 7.2 (10.7, 0-45)                            | 5.4 (7.3, 1-21)                          | n.s. <sup>b</sup>                      |
| Global Assessment of Functioning <sup>c</sup>            | 49.6 (10.6, 25-72)→51.2 (10.9, 25-73)***    | 51.9 (7.8, 43-67)→48.9 (8.8, 39-67)*     | n.s. <sup>b</sup><br>n.s. <sup>b</sup> |
| Severity of Illness <sup>c</sup>                         | 4.4 (0.8, 3-6)→4.3 (0.8, 2-6) n.s.          | 4.3 (0.8, 3-5)→4.7 (1.0, 3-6) n.s.       | n.s. <sup>b</sup>                      |
| Brief Psychiatric Rating Scale <sup>c</sup>              | 53.3 (11.5, 27-70)→52.1 (11.1, 27-70)**     | 58.1 (7.4, 50-71)→62.0 (7.2, 52-73)*     | n.s. <sup>b</sup><br>n.s. <sup>b</sup> |
| Drug-Induced Extra-Pyramidal Symptoms Scale <sup>c</sup> | 7.6 (4.7, 2-22)→7.3 (4.3, 2-18)*            | 4.9 (3.0, 1-9)→4.9 (2.8, 1-9) n.s.       | n.s. <sup>b</sup><br>n.s. <sup>b</sup> |
| 抗精神病薬総用量 (クロルプロマジン換算一日量) <sup>c</sup>                    | 954 (806, 100-4188)→710 (445, 100-1614)**** | 971 (618, 300-1800)→794 (434, 300-1500)* |  |
| 抗精神病薬剤数 <sup>c</sup>                                     | 2.0 (1.2, 1-5)→1.7 (0.9, 1-4)*              | 1.9 (1.1, 1-3)→1.4 (0.5, 1-2) n.s.       |  |
| 向精神薬総数 <sup>c</sup>                                      | 3.9 (2.1, 1-10)→3.1 (1.4, 1-7)***           | 5.0 (2.0, 2-8)→3.7 (1.1, 2-5) n.s.       |  |
| Global Improvement                                       | 3.63  | 5.57                                     |  |

<sup>a</sup>治療開始時データで比較。

<sup>b</sup>平均 (標準偏差, 範囲)。Mann-Whitney's U test で比較。

<sup>c</sup>開始時→終了時のデータ。

<sup>d</sup>p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p<0.0001 (Wilcoxon signed rank test)。

<sup>e</sup>Fisher's exact test による (p<0.05)。

(Suzuki et al: Psychopharmacology (Berl) 181: 566-575, 2005 の第4表を許可を得て転載。一部改変)

第9表 (治療介入前症例背景)

|                                   |                 |
|-----------------------------------|-----------------|
| 男性/女性                             | 27/14           |
| 入院/外来                             | 23/18           |
| 年齢 (歳)*                           | 46.1 (17-81)    |
| 罹病期間 (年)*                         | 20.9 (1-47)     |
| Global Assessment of Functioning* | 30.6 (8-55)     |
| Severity of Illness*              | 4.7 (3-7)       |
| 抗精神病薬剤量 (クロルプロマジン換算一日量)*          | 1984 (250-5735) |
| 抗精神病薬剤数*                          | 3.6 (1-5)       |

\*平均 (範囲).

(Suzuki et al : Int Clin Psychopharmacol 18 : 323-329, 2003 の第2表を許可を得て転載, 一部改変)

第10表 (減量後の結果)

|                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| 改善/不変/悪化症例数                      | 23/13/5          |
| Global Assessment of Functioning | 37.2 (20-80)**   |
| Severity of Illness              | 4.2 (2-7)*       |
| 抗精神病薬用量 (クロルプロマジン換算一日量)          | 812 (50-4823)*** |
| 抗精神病薬剤数                          | 2.2 (1-5)***     |
| Global Improvement               | 3.2 (1-6)        |

\*p<0.01 \*\*p<0.001 \*\*\*p<0.0001 (Wilcoxon signed rank test).

(Suzuki et al : Int Clin Psychopharmacol 18 : 323-329, 2003 の第3表を許可を得て転載, 一部改変)

認めた。

成功40例中26例が主観的に改善したと評価し、うち18例は服用する回数が減って楽になったためと答えた。抗精神病薬単剤治療を受けていた25例を末梢血中半減期に基づき検討したところ、複数回投与が推奨されている薬剤で治療されていた12例中10例で、単回投与への移行が可能であった。その一方、末梢半減期が約25時間と長いプロムペリドールによる治療を受けていた2例が悪化した。

### 3. 減量研究

治療開始時症例背景のデータを第9表に示した。入院23例、平均年齢、罹病期間、GAF, SOIはそれぞれ46歳、21年、31、4.7 (顕著な精神障害)であった。クロルプロマジン換算平均抗精神病薬総用量は1984 mgであり、33例 (80.5%)は1000 mg以上の大量療法による治療を受けており、そのうち21例では主剤のみの用量だけで1000 mgを越えていた。抗精神病薬剤数は平均3.6剤で、抗精神病薬単剤治療を受けていたのは2例のみであった。

抗精神病薬減量後の結果を第10表に示した。23例は改善、13例は不変、5例が悪化した。改善例中、5例は陽性症状に関して、10例は陰性症状に関して、16例は副作用に関して改善した。悪化例における減量開始から中止までの期間は平均3.5ヵ月 (1.5-6ヵ月)であり、精神病症状と精神運動興奮が増悪したが、うち2例は副作用に関しては改善した。

3ヵ月 (中央値、平均7.2ヵ月、0.5-48ヵ月)の間に平均抗精神病薬総用量は59.1%削減されて812 mgとなり、抗精神病薬剤数は2.2剤にまで有意に削減された (ともに p<0.0001)。GAFは37 (p<0.001)、SOIは4.2 (p<0.01)へと有意な改善を認めた。

第11表に、減量成功群と失敗群とを年齢、罹病期間、治療開始時抗精神病薬剤量および薬剤数、GAF, SOI、減量率、減量速度に関して比較した結果を示したが、失敗群において開始時抗精神病薬剤量が高かったこと以外有意な差を認めなかった。しかしこの結果は、開始時用量が約5600 mgと超大量療法を受けていた症例が悪化したため、この極端な1例を除いて検討すると有意差は消失した。純粋な抗精神病薬単剤治療への移行が可能であったのは11例 (26.8%)に過ぎなかったが、低力価薬50 mgまでの併用を許容すると、約半数の20例

第11表 (減量成功群と悪化群との比較)

|                                      | 成功群             | 悪化群              | p 値*   |
|--------------------------------------|-----------------|------------------|--------|
| 年齢 (歳)                               | 45.7 (17-81)    | 49.0 (26-60)     | 0.473  |
| 罹病期間 (年)                             | 20.9 (1-41)     | 27.2 (12-38)     | 0.2817 |
| 開始時抗精神病薬剤量 (クロルプロマジン換算一日量)           | 1769 (250-5735) | 3528 (1002-5639) | 0.0383 |
| 開始時抗精神病薬剤数                           | 3.6 (1-5)       | 2.8 (2-5)        | 0.6477 |
| 開始時 Global Assessment of Functioning | 31.1 (8-55)     | 27.2 (25-30)     | 0.8398 |
| 開始時 Severity of Illness              | 4.6 (3-7)       | 5.0 (4-7)        | 0.448  |
| 削減率 (開始時用量-最終用量/開始時用量)×100 (%)       | 62.1 (6.1-96.3) | 54.9 (14.5-91.9) | 0.8421 |
| 削減のベース (削減率/削減に要した月数)                | 23.0 (1.4-97.9) | 20.4 (5.7-53.5)  | 0.8891 |

成功群=Global Impressionが4以下。悪化群=5以上。平均 (範囲)。

\*Mann-Whitney's U testによる。

(Suzuki et al : Int Clin Psychopharmacol 18 : 323-329, 2003 の第4表を許可を得て転載, 一部改変)

で事実上の単剤治療への移行が可能であった。

## 考 察

### 1. 単剤化研究

統合失調症に対する抗精神病薬多種併用療法の是非は議論的である<sup>55)</sup>。併用療法から単剤治療へ移行することにより、治療効果を判定した先行研究はほとんどない。単剤化移行の結果、総じて対象の重症度や全般的機能が不変であった。その意味では、本介入法は全般的には有効であったといえないかもしれない。しかし、比較的重症例を対象とした研究であったにもかかわらず、多くの場合で併用療法が避けられることが示唆され、原則とされる抗精神病薬単剤治療を概して支持する結果が得られた。

おそらくは内因性の抗コリン活性等に基づく副作用の問題で、従来型低力価薬が主剤として使用されることは少ないようである。減量は当初の目的ではなかったにもかかわらず、抗精神病薬総用量が有意に削減されたことより、従来型低力価薬から高力価薬による単剤治療に移行する場合は、とくに錐体外路症状に注意が必要である。また、単剤移行により悪化した症例では総入院期間が長く、GAFで示される全般的機能も低かったことより、慢性重症例などにおいては、併用療法が避けられない症例も確実に存在するものと考えられる。

### 2. 単回投与研究

服薬不遵守は医学領域全般で大きな問題であり、特に統合失調症では再発と大いに関連がある<sup>59)</sup>。また、維持用量に関しては1日あたりのクロルプロマジン換算抗精神病薬用量として300-600 mg/dayが推奨されているが<sup>60)</sup>、用量をどのように分割するかに関する研究はこれまで少ない。今回の治療介入により症状の大幅な改善は認めなかったものの、抗精神病薬総量、総向精神薬剤数は有意に削減された。また、対象の多くは当治療介入に対して好印象を示した。

さらに、就寝前単回投与により有効性に乏しい薬剤が削減でき、患者が専ら好印象を示すことから判断すると、服薬遵守が向上する可能性がある。統合失調症における服薬遵守は困難であるという事実を考えると<sup>61)</sup>、服用回数簡素化から得られた結果は臨床的示唆に富むものであると考える。この際、特に朝の鎮静には注意すべきで、必要時には用量削減によって対応すべきであると考えられる。

また、悪化した全例が一日三回服用していたことより、一日あたり頻りに服用している症例における投薬回数削減

には注意を要する。その一方、末梢半減期が短く、複数回投与が推奨されている薬剤でも単回投与できる可能性<sup>62)</sup>が示唆された。

### 3. 減量研究

通常抗精神病薬は、症状のコントロールが思わしくない場合に増量されるであろうと考えられる。しかし逆説的ではあるが、特に用量が多い場合は、薬剤量削減が積極的な治療選択肢になり得ることが判明した。減量によりGAFで示される全般的機能、およびSOIで示される概括重症度が有意に改善したことは特筆に値する。過去同様に抗精神病薬薬剤量削減を行った研究はいくつか認められ<sup>53-57)</sup>、結果は概して良好とする先行研究と一致する。

統合失調症治療では通常長期にわたる薬物療法を要する<sup>58)</sup>。大量療法の減量が治療選択肢となるという事実は、抗精神病薬総服薬量が増加するにつれリスクが上昇し、QOLにも多大な影響を及ぼす遅発性ジスキネジア<sup>59)</sup>等の長期的副作用を考えても非常に重要である。

本研究の対象は重症で多大な機能障害を認めており、この点のみを重視した場合は増薬を選択する人がいるかもしれない。また、過去には大量療法を余儀なくされた病状を認めた可能性は否定できない。しかし先行研究同様、減量により対象の病状が改善した。処方妥当性を継続的に判断しつつ、特に用量が多い場合は、抗精神病薬薬剤量削減を積極的な治療選択肢の一つとして考慮する必要があると考える。この際、どの程度の速度で、どの用量まで削減するかに関する明確な指標はないが、病状を注意深く観察し、徐々に慎重に減量することが望ましい。

上述の研究は専ら従来型抗精神病薬により治療されていた慢性期症例を対象としたものであるが、近年第二世代抗精神病薬の使用頻度は増加してきており、我が国も例外ではない<sup>60)</sup>。また、有用性の過大評価には注意が必要だが<sup>60-61)</sup>、最近の研究では後者の有効性が指摘されてきている<sup>62)</sup>。我々は以下に示すように、多種併用大量療法を第二世代抗精神病薬に移行した成功例の後方視的評価<sup>63)</sup>(以降、スイッチング研究と称す)を行っている。

過去にクロルプロマジン換算抗精神病薬総量<sup>64)</sup>が1日1000 mg以上で、6週間以上にわたる治療を受けた既往を有する、DSM-IV<sup>65)</sup>に基づく慢性統合失調症患者のうち、第二世代抗精神病薬(Kupfer and Sartoriusによる<sup>64)</sup>単剤治療に移行し、症状に有意な改善を認めた症例を後方視的に評価した。最終転帰は薬剤変更12週後とし、ルーチンに評価されていたGAF<sup>62)</sup>およびCGI<sup>66)</sup>に基づいて効果判定を行った。また、抗精神病薬以外の

第12表 (治療介入前症例背景)

|                                  | 平均±標準偏差 (最小値-最大値)     |
|----------------------------------|-----------------------|
| 年齢 (歳)                           | 40.8±13.0 (21-67)     |
| 罹病期間 (年)                         | 16.8±12.7 (2-52)      |
| 総入院回数                            | 4.4±4.3 (1-20)        |
| 総入院期間 (年)                        | 4.6±6.5 (0.5-33)      |
| 教育 (年)                           | 12.0±2.6 (6-16)       |
| Global Assessment of Functioning | 31.5±7.8 (15-51)      |
| Severity of Illness              | 5.8±0.5 (5-7)         |
| 抗精神病薬剤数                          | 3.5±1.0 (2-5)         |
| 抗精神病薬剤量 (クロルプロマジン換算一日量)          | 2203±1085 (1050-5183) |
| 向精神薬総数                           | 6.8±1.7 (3-11)        |

(Suzuki et al : Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28 : 361-369, 2004 の第2表を許可を得て転載, 一部改変)

第13表 (第二世代抗精神病薬による単剤治療移行後の結果)

|                                  | 平均±標準偏差 (最小値-最大値)                         |
|----------------------------------|---|
| Global Assessment of Functioning | 31.5±7.8 (15-51)→47.2±7.1 (31-59)*        |
| Severity of Illness              | 5.8±0.5 (5-7)→4.6±0.6 (4-6)*              |
| 抗精神病薬剤数                          | 3.5±1.0 (2-5)→1.1±0.3 (1-2)*              |
| 抗精神病薬剤量 (クロルプロマジン換算一日量)          | 2203±1085 (1050-5183)→619±231 (300-1200)* |
| 向精神薬総数                           | 6.8±1.7 (3-11)→2.6±0.7 (2-4)*             |
| Global Improvement               | 2.4±0.5 (2-3)                             |

p<0.0001 (Wilcoxon signed rank test).

\*Suzuki et al : Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28 : 361-369, 2004 の第4表を許可を得て転載, 一部改変)

向精神薬も通常臨床の範囲内で簡素化された。この際スイッチング前のSOIが5以上で、第二世代抗精神病薬への変更により、GAF評点が少なくとも10点改善した症例を選択した。

25名の症例を同定した(入院18例)。第二世代抗精神病薬に移行する前の症例背景を第12表に示し、第二世代抗精神病薬変更後の最終転帰を第13表に示した。GAF, SOI, 抗精神病薬剤量, 抗精神病薬剤総数, 向精神薬総数はそれぞれ32から47, 5.8から4.6, 2203mg/dayから619mg/day, 3.5剤から1.1剤, 6.8剤から2.6剤となり、いずれも有意差を認めた(p<0.0001)。入院11例は退院でき、更に4例は退院可能と判断された(計83.3%)。

従来型抗精神病薬治療による病状のコントロールが思わしくないとき、安易に更に追加するのみでは多種併用療法に繋がる。こうした治療は根拠に欠け、副作用を増悪させる可能性がある<sup>15, 63)</sup>。治療反応が乏しい場合は薬剤変更の候補となる。結果より、抗精神病薬多種併用・大量療法にすら反応せず、かつては治療困難と考えられていたであろう症例においてですら、第二世代抗精神病

薬単剤治療が奏効する場合があることが示唆された。

以上を総括すると、大量療法からの用量削減は対象の病状を改善し、ゆえに推奨に値する治療法であること、抗精神病薬併用療法は多くの場合単剤治療に移行でき、さらに就寝前一回投与とすることにより、多くの場合有用性に乏しい薬剤の削減が可能であるとともに、自覚的好印象が得られることが判明した。また、多種併用・大量療法から第二世代抗精神病薬治療へ移行することにより好転する可能性が伺われた。

筆者らは、以前より薬物療法が特異的である我が国における現状を問題視してきたが<sup>66, 67)</sup>、実証性に乏しい治療法が汎用されているなか、有用性に関するエビデンスが極めて乏しい抗精神病薬の多種併用・大量療法の検証がなされたことは意義深いと考える。我々の研究結果は、そうした治療法を日常的に行うことを支持しない。

## 限 界

単剤化研究, 単回投与研究, および減量研究に関して

は、専ら従来型抗精神病薬を扱ったものである。さらに、前向きオープン試験であり、治療者、評価者が処方内容を知っていること、比較対照群がないこと、症例数が少ないことなどの問題点が指摘される。また、単剤化研究、減量研究では、全般的機能、臨床的印象のみの評価に終始しており、評価尺度の面で不十分であることなどが問題点として挙げられる。

また単剤化研究では、ベースラインの抗精神病薬総用量が1171 mgと高用量であることより、むしろ薬剤減量が先行すべきだった可能性がある。一般的に従来型抗精神病薬は一括して扱われており、結果として抗精神病薬剤量は有意に減少したため、ある種の減量研究であったとの解釈も成立しうる。

単回投与研究では、症例は様々な半減期を有する抗精神病薬のみならず、半減期の異なる種々の向精神薬を服用していたため、かつ薬剤削減の影響も相まって結果が不明確となっている。抗精神病薬削減率は24.6%と低く、最終量の722 mgは更に減量できたかもしれないなどの問題点がある。

減量研究では、対象が一般的には十分量、十分期間にわたる単剤治療に反応しない場合に定義される治療抵抗例<sup>24)</sup>として分類されるか、単剤治療に移行できたのは半数に満たない、最終量の812 mgは推奨される維持用量より依然高く、どのベースでの用量まで削減できるかが判然としないなどの限界がある。

スイッチング研究においては、後方視的評価であるため、対象がどの程度一般的であるか、すなわち治療反応性や代謝能力における個人差の問題に関する検討が不十分であり、薬剤変更の方法が不均一である、複数の第二世代抗精神病薬を扱ったなどの限界がある。

診断基準としてはDSM-IVとICD-10を用いたが、臨床的には問題ないものと思われる。本研究では特性の異なる種々の抗精神病薬を扱った。従来型抗精神病薬はドーパミンD<sub>2</sub>受容体を遮断するという共通の作用機序を有し、しばしば総称されているが、単剤化研究において等価を保つことを原則としたものの、薬剤量が削減されたことからそれぞれの薬剤の特性が異なることが示唆され、特定の薬剤に関しての治療介入は今後の検討課題として残る。

また、血中濃度やPositron Emission Tomographyなどを用いて末梢および中枢における薬物動態、さらには薬力学的作用などを加味しつつ検討する可能性が示唆される。治療反応もしくは非反応に関するより正確な予想因子、どの治療介入をどの順序で適応するのが最善なのか、という問題点に関しても検討を要する。

このような限界を認識しつつ結果を評価する必要があるが、実際臨床においては全般的機能、臨床的印象は簡便であり有用性が高い。減量研究により過去の研究結果との一致を見た。スイッチング研究に関しては、治療抵抗例に対する効果に関しては結果の一致をみていないものの<sup>39)</sup>、第二世代抗精神病薬治療への移行により、一見安定した症例においてですら更なる改善を見たとする先行研究を認める<sup>28, 29)</sup>。統合失調症薬物療法の原則であるべきとされる、単剤治療に関する研究は依然不十分である。単回投与は、薬剤量削減とともに主観的好印象をもたらすため、ひいては長期的服薬遵守につながる可能性がある。これらの課題に関しては更なる研究が必要である。

## 総括

我々は主に慢性期の統合失調症症例に対して、しばしば経験的に行われてきた治療法を批判的に検討した。治療転帰を第14表に要約した。大量療法からの用量削減、もしくは就寝前一回投与への移行は有用となりえる。また、抗精神病薬併用療法は多くの場合単剤治療に移行できることが示された。第二世代抗精神病薬による治療の有用性も確認された。

精神症状のみならず社会機能、認知機能の改善、更には社会的自立という観点から判断すると、統合失調症の治療は困難である場合が少なくない<sup>68)</sup>。その病因も依然判明していない。Endophenotypeなどを利用してより均一な集団を同定する試みがなされてきてはいるものの<sup>69)</sup>、現在までのところ、患者の臨床的プレゼンテーションのみに基づき診断される統合失調症の不均一性は古くからよく知られている<sup>70-72)</sup>。

エビデンスは臨床試験からもたらされ、既存のエビデンスを集約して治療ガイドライン<sup>73)</sup>やアルゴリズム<sup>3)</sup>が作成されるが、それらを個人レベルで適応することの限界も認識しておく必要がある。エビデンスの基となる臨床研究における高い脱落率<sup>25, 74)</sup>、種々のバイアス<sup>74, 75)</sup>などの問題点にも留意する必要がある。本来そうあるべきとされるが<sup>3)</sup>、薬物療法を順序立てて行うという一連の治療に関する研究結果は、ようやく最近になって報告されてくるようになった<sup>4, 25-27)</sup>に過ぎないのが実情である。

しかし、現在の薬物療法を最適化する際には既存のエビデンスに拠るしかない。薬剤反応性の個人レベルでの差異<sup>76)</sup>などを念頭におきつつ、個別の症例に柔軟に適応していくことが最適な薬物療法であろう。病状が思わしくない場合に、薬剤量を増やすか、または他の薬剤を追



第14表 (各治療介入による治療転帰の要約)

|   | 単剤化研究                      | 単回投与研究            | 減量研究         | スイッチング研究 <sup>a)</sup> |
|---|----------------------------|-------------------|--------------|------------------------|
| Global Assessment of Functioning            | 36→36 n.s.                 | 50→51*            | 31→37***     | 32→47****              |
| Severity of Illness                         | 4.8→4.8 n.s.               | 4.4→4.4 n.s.      | 4.7→4.2**    | 5.8→4.6****            |
| 抗精神病薬剂量 (クロロプロマジン換算一日量)                     | 1171→952**** <sup>a)</sup> | 957→722****       | 1984→812**** | 2203→619****           |
| 抗精神病薬剤数                                     | 3.0→1.4**** <sup>a)</sup>  | 1.9→1.6**         | 3.6→2.2****  | 3.5→1.1****            |
| 向精神薬剤総数                                     | 評価せず                       | 4.0→3.2****       | 評価せず         | 6.8→2.6****            |
| Brief Psychiatric Rating Scale              | 評価せず                       | 54→54 n.s.        | 評価せず         | 評価せず                   |
| Drug-Induced Extra-Pyramidal Symptoms Scale | 評価せず                       | 7.2→6.9*          | 評価せず         | 評価せず                   |
| Global Improvement                          | 4.1                        | 3.9               | 3.2          | 2.4                    |
| 主観的 Global Improvement                      | 評価せず                       | 2.7 <sup>a)</sup> | 評価せず         | 評価せず                   |

n.s. 有意差無し \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 \*\*\*\*p<0.0001 (Wilcoxon signed rank test).  
<sup>a)</sup>成功例における評価

加するという狭い選択肢だけでは不十分である。エビデンスがない以上、抗精神病薬併用・大量療法が妥当なのは、(それ以外の薬物療法では効果不十分で、かつ)その治療による反応性および忍容性が良好な場合のみであり、十分な効果判定なしにそうした治療法が漫然と継続されることは問題視されるべきである。現在の一般的位置づけは、クロザピンに対しても治療反応が不十分な例などに対する、まさに最終手段である<sup>2, 3)</sup>ことを認識する必要がある。

最後に、今後治療ガイドライン、アルゴリズム<sup>3)</sup>の是非を判断するなどの方法を通じて<sup>7)</sup>、統合失調症急性期治療を最適化することより、慢性期における薬物療法を見直す必要が出てくるであろうと考える。

### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室鹿島晴雄教授に深謝いたします。また、本研究を直接御指導頂いた慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室非常勤講師、翠星ヒーリングセンター八木剛平総長、慶應義塾大学医学部精神・神経科渡邊衛一郎講師に深く感謝いたします。さらに、終始御協力と御助言を頂いた防衛医科大学校精神科田辺英講師、慶應義塾大学精神・神経科学教室内田裕之博士をはじめとする慶應義塾大学精神・神経科学教室精神薬理研究室の先生方に御礼申し上げます。

本研究の一部は、第11回日本臨床精神神経薬理学会(2001, 広島)、XII World Congress of the World Psychiatric Association (2002, Yokohama)、第13回日本臨床精神神経薬理学会(2003, 弘前)、XXIV

Collegium Internationale Neuro-psychopharmacologicum (2004, Paris)、で発表した。

### 文 献

- 1) 鈴木健文, 渡邊衛一郎, 八木剛平, 鹿島晴雄: 統合失調症における抗精神病薬多種併用療法は妥当か?. 日本神経精神薬理学雑誌, 25: 159-168, 2005
- 2) Stahl SM, Grady MM: A critical review of atypical antipsychotic utilization: Comparing monotherapy with polypharmacy and augmentation. *Curr Med Chem* 11: 313-327, 2004
- 3) Miller AL, Hall CS, Buchanan RW, Buckley PF, Chiles JA, Conley RR, Crismon ML, Ereshefsky L, Essock SM, Finnerty M, Marder SR, Miller del D, McEvoy JP, Rush AJ, Saeed SA, Schooler NR, Shon SP, Stroup S, Tarin-Godoy B: The Texas Medication Algorithm Project antipsychotic algorithm for schizophrenia: 2003 update. *J Clin Psychiatry* 65: 500-508, 2004
- 4) Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Byerly MJ, Glick ID, Canive JM, McGee MF, Simpson GM, Stevens MC, Lieberman JA: The National Institute of Mental Health Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) project: schizophrenia trial design and protocol development. *Schizophr Bull.* 29: 15-31, 2003
- 5) Prien RF, Cole JO: High dose chlorpromazine therapy in chronic schizophrenia. Report of National Institute of Mental Health-psychopharmacology research branch collaborative study group. *Arch Gen Psychiatry* 18: 482-495, 1968
- 6) McClelland HA, Farquharson RG, Leyburn P, Furness JA, Schiff AA: Very high dose fluphenazine decanoate: a controlled trial in chronic schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 33: 1435-1439, 1976

- 7) Van Putten T, Marder SR, Mintz J : A controlled dose comparison of haloperidol in newly admitted schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 47 : 754-758, 1990
- 8) Rifkin A, Doddi S, Karajgi B, Borenstein M, Wachspress M : Dosage of haloperidol for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 48 : 166-170, 1991
- 9) Volavka J, Cooper T, Czobor P, Bitter I, Meisner M, Laska E, Gastanaga P, Krakowski M, Chou JC, Crowner M, Douyon R : Haloperidol blood levels and clinical effects. *Arch Gen Psychiatry* 49 : 354-361, 1992
- 10) Citrome L, Jaffe A, Levine J : Dosing of second-generation antipsychotic medication in a state hospital system. *J Clin Psychopharmacol* 25 : 388-391, 2005
- 11) Citrome L, Jaffe A, Levine J, Lindenmayer JP. Dosing of quetiapine in schizophrenia : how clinical practice differs from registration studies. *J Clin Psychiatry* 66 : 1512-1516, 2005
- 12) Hamann J, Ruppert A, Auby P, Pugner K, Kissling W : Antipsychotic prescribing patterns in Germany : a retrospective analysis using a large outpatient prescription database. *Int Clin Psychopharmacol* 18 : 237-242, 2003
- 13) Ganguly R, Kotzan JA, Miller LS, Kennedy K, Martin BC : Prevalence, trends, and factors associated with antipsychotic polypharmacy among Medicaid-eligible schizophrenia patients, 1998-2000. *J Clin Psychiatry* 65 : 1377-1388, 2004
- 14) Lerner V, Libov I, Kotler M, Strous RD : Combination of "atypical" antipsychotic medication in the management of treatment-resistant schizophrenia and schizoaffective disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28 : 89-98, 2004
- 15) Stahl SM : Focus on antipsychotic polypharmacy : evidence-based prescribing or prescribing-based evidence? *Int J Neuropsychopharmacol* 7 : 113-116, 2004
- 16) 富田真幸, 稲垣中, 高野晴成, 菊地俊暁, 竹内啓善, 島内智子, 岸本泰士郎, 野村健介, 中川敦夫, 山澤涼子, 内田裕之, 鈴木健文, 野崎昭子, 角田健一, 富田敦子, 船山道隆, 渡邊衛一郎, 岩下覚, 八木剛平 : 非定型抗精神病薬の普及度と適応に関する研究. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費統合失調症の治療及びリハビリテーションのガイドライン作成とその実証的研究総括研究報告書 (主任研究者 浦田重治郎). 49-58, 2004
- 17) Csernansky JG, Mahmoud R, Brenner R, Risperidone-USA-79 Study Group : A comparison of risperidone and haloperidol for the prevention of relapse in patients with schizophrenia. *N Engl J Med* 346 : 16-22, 2002 (Erratum in : *N Engl J Med* 346 : 1424, 2002)
- 18) Volavka J, Czobor P, Sheitman B, Lindenmayer JP, Citrome L, McEvoy JP, Cooper TB, Chakos M, Lieberman JA : Clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in the treatment of patients with chronic schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 159 : 255-262, 2002 (Erratum in : *Am J Psychiatry* 159 : 2132, 2002)
- 19) Conley RR, Mahmoud R : A randomized double-blind study of risperidone and olanzapine in the treatment of schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 158 : 765-774, 2001 (Erratum in : *Am J Psychiatry* 158 : 1759, 2001)
- 20) Tran PV, Hamilton SH, Kuntz AJ, Potvin JH, Andersen SW, Beasley C Jr, Tollefson GD : Double-blind comparison of olanzapine versus risperidone in the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders. *J Clin Psychopharmacol* 17 : 407-418, 1997
- 21) Small JG, Hirsch SR, Arvanitis LA, Miller BG, Link CG : Quetiapine in patients with schizophrenia. A high- and low-dose double-blind comparison with placebo. Seroquel Study Group. *Arch Gen Psychiatry* 54 : 549-557, 1997
- 22) Lambert M, Haro JM, Novick D, Edgell ET, Kennedy L, Ratcliffe M, Naber D : Olanzapine vs. other antipsychotics in actual out-patient settings : six months tolerability results from the European Schizophrenia Out-patient Health Outcomes study. *Acta Psychiatr Scand* 111 : 232-243, 2005
- 23) Fujita K, Fukuchi T, Yuasa S, Inada E, Tarao Y, Kanemoto K : Switch from risperidone to perospirone in patients with chronic schizophrenia. *Clin Drug Investig* 24 : 295-299, 2004
- 24) Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H : Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 45 : 789-796, 1988
- 25) Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK ; Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators : Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353 : 1209-1223, 2005
- 26) McEvoy JP, Lieberman JA, Stroup TS, Davis SM, Meltzer HY, Rosenheck RA, Swartz MS, Perkins DO, Keefe RS, Davis CE, Severe J, Hsiao JK ; CATIE Investigators : Effectiveness of clozapine versus olanzapine, quetiapine, and risperidone in patients with chronic schizophrenia who did not respond to prior atypical antipsychotic treatment. *Am J Psychiatry* 163 : 600-610, 2006
- 27) Stroup TS, Lieberman JA, McEvoy JP, Swartz MS, Davis SM, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis CE, Severe J, Hsiao JK ; CATIE Investigators : Effectiveness of olanzapine, quetiapine, risperidone, and ziprasidone in patients with chronic schizophrenia following discontinuation of a previous atypical antipsychotic. *Am J Psychiatry* 163 : 611-622, 2006

- 28) van Os J, Bossie CA, Lasser RA : Improvements in stable patients with psychotic disorders switched from oral conventional antipsychotics therapy to long-acting risperidone. *Int Clin Psychopharmacol* 19 : 229-232, 2004
- 29) Casey DE, Carson WH, Saha AR, Liebeskind A, Ali MW, Jody D, Ingenito GG behalf of the Aripiprazole Study Group. Switching patients to aripiprazole from other antipsychotic agents : a multicenter randomized study. *Psychopharmacology (Berl)* 166 : 391-399, 2003
- 30) Faries D, Ascher-Svanum H, Zhu B, Correll C, Kane J : Antipsychotic monotherapy and polypharmacy in the naturalistic treatment of schizophrenia with atypical antipsychotics. *BMC Psychiatry* 5 : 26, 2005
- 31) Chong MY, Tan CH, Fujii S, Yang SY, Ungvari GS, Si T, Chung EK, Sim K, Tsang HY, Shinfuku N : Antipsychotic drug prescription for schizophrenia in East Asia : rationale for change. *Psychiatry Clin Neurosci* 58 : 61-67, 2004
- 32) Sernyak MJ, Rosenheck R : Clinicians' reasons for antipsychotic coprescribing. *J Clin Psychiatry* 65 : 1597-1600, 2004
- 33) Potter WZ, Ko GN, Zhang LD, Yan WW : Clozapine in China : A review and preview of US/PRC collaboration. *Psychopharmacology* 99(Suppl) : S87 - 91, 1989
- 34) Shiloh R, Zemishlany Z, Aizenberg D, Radwan M, Schwartz B, Dorfman-Etrog P, Modai I, Khaikin M, Weizman A : Sulpiride augmentation in people with schizophrenia partially responsive to clozapine. A double-blind, placebo-controlled study. *Br J Psychiatry* 171 : 569-573, 1997
- 35) Anil Yagcioglu AE, Kivircik Akdede BB, Turgut T, Tumuklu M, Yazici MK, Alptekin K, Ertugrul A, Jayathilake K, Gogus A, Tunca Z, Meltzer HY : A double-blind controlled study of adjunctive treatment with risperidone in schizophrenic patients partially responsive to clozapine : efficacy and safety. *J Clin Psychiatry* 66 : 63-72, 2005
- 36) Josiassen RC, Joseph A, Kohegyi E, Stokes S, Dadvand M, Paing WW, Shaughnessy RA : Clozapine augmented with risperidone in the treatment of schizophrenia : a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 162 : 130-136, 2005
- 37) Honer WG, Thornton AE, Chen EY, Chan RC, Wong JO, Bergmann A, Falkai P, Pomarol-Clotet E, McKenna PJ, Stip E, Williams R, MacEwan GW, Wasan K, Procyshyn R : Clozapine and Risperidone Enhancement (CARE) Study Group : Clozapine alone versus clozapine and risperidone with refractory schizophrenia. *N Engl J Med* 354 : 472-482, 2006
- 38) Mouaffak F, Tranulis C, Gourevitch R, Poirier MF, Douki S, Olie JP, Loo H, Gourion D : Augmentation strategies of clozapine with antipsychotics in the treatment of ultraresistant schizophrenia. *Clin Neuropharmacol* 29 : 28-33, 2006
- 39) Chakos M, Lieberman J, Hoffman E, Bradford D, Sheitman B : Effectiveness of second-generation antipsychotics in patients with treatment-resistant schizophrenia : a review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Psychiatry* 158 : 518-526, 2001
- 40) Suzuki T, Uchida H, Tanaka KF, Nomura K, Takano H, Tanabe A, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : Revising polypharmacy to a single antipsychotic regimen for patients with chronic schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 7 : 133-142, 2004
- 41) WHO : The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders : clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva : World Health Organization, 1992
- 42) APA : Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed). Washington, DC : American Psychiatric Association, 1994
- 43) 稲垣中, 稲田俊也, 藤井康男, 八木剛平, 吉尾隆, 中村博幸, 山内惟光 : 向精神病薬の等価換算. 星和書店, 1999
- 44) Guy W : ECDEU assessment manual for psychopharmacology. Washington DC : Department of health, education and welfare, pp.217-222, 1976
- 45) Suzuki T, Uchida H, Takeuchi H, Nomura K, Tanabe A, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : Simplifying psychotropic medication regimen into a single night dosage and reducing the dose for patients with chronic schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 181 : 566-575, 2005
- 46) Overall JE, Gorham DR : The brief psychiatric rating scale. *Psychol Rep* 10 : 799-812, 1962
- 47) Inada T, Yagi G, Miura S : Extrapyramidal symptom profiles in Japanese patients with schizophrenia treated with olanzapine or haloperidol. *Schizophr Res* 57 : 227-238, 2002
- 48) Suzuki T, Uchida H, Tanaka KF, Tomita M, Tsunoda K, Nomura K, Takano H, Tanabe A, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : Reducing the dose of antipsychotic medications for those who had been treated with high-dose antipsychotic polypharmacy : an open study of dose reduction for chronic schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 18 : 323-329, 2003
- 49) Lacro JP, Dunn LB, Dolder CR, Leckband SG, Jeste DV : Prevalence of and risk factors for medication nonadherence in patients with schizophrenia : a comprehensive review of recent literature. *J Clin Psychiatry* 63 : 892-909, 2002
- 50) Lehman AF, Kreyenbuhl J, Buchanan RW, Dickerson FB, Dixon LB, Goldberg R, Green-Paden LD, Tenhula WN, Boerescu D, Tek C, Sandson N, Steinwachs DM : The Schizophrenia Patient Outcomes Research Team (PORT) : updated treatment recommendations 2003. *Schizophr Bull* 30 : 193-217, 2004

- 51) O'Donnell C, Donohoe G, Sharkey L, Owens N, Migone M, Harries R, Kinsella A, Larkin C, O'Callaghan E. Compliance therapy : a randomised controlled trial in schizophrenia. *BMJ* Oct 11 ; 327 (7419) : 834, 2003
- 52) Chengappa KN, Parepally H, Brar JS, Mullen J, Shilling A, Goldstein JM : A random-assignment, double-blind, clinical trial of once- vs twice-daily administration of quetiapine fumarate in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder : a pilot study. *Can J Psychiatry* 48 : 187-194, 2003
- 53) Inderbitzin LB, Lewine RR, Scheller-Gilkey G, Swofford CD, Egan GJ, Gloersen BA, Vidanagama BP, Waternaux C : A double-blind dose-reduction trial of fluphenazine decanoate for chronic, unstable schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 151 : 1753-1759, 1994
- 54) Smith RC : Lower-dose therapy with traditional neuroleptics in chronically hospitalized schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 51 : 427-429, 1994
- 55) Hirschowitz J, Hitzemann R, Piscani K, Burr G, Frecska E, Culliton D, Mann M, Curtis C. The Dose Reduction in Schizophrenia (DORIS) Study : a final report : *Schizophr Res* 23 : 31-43, 1997
- 56) Carpenter WT Jr, Buchanan RW, Kirkpatrick B, Lann HD, Breier AF, Summerfelt AT : Comparative effectiveness of fluphenazine decanoate injections every 2 weeks versus every 6 weeks. *Am J Psychiatry* 156 : 412-418, 1999
- 57) Volavka J, Cooper TB, Czobor P, Lindenmayer JP, Citrome LL, Mohr P, Bark N : High-dose treatment with haloperidol : the effect of dose reduction. *J Clin Psychopharmacol* 20 : 252-256, 2000
- 58) Muller N : Mechanisms of relapse prevention in schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 37 Suppl 2 : S141-147, 2004
- 59) Latimer PR : Tardive dyskinesia : a review. *Can J Psychiatry* 40 (7 Suppl 2) : S49-54, 1995
- 60) Lieberman JA : Comparative effectiveness of antipsychotic drugs. A commentary on : Cost Utility Of The Latest Antipsychotic Drugs In Schizophrenia Study (CUtLASS 1) and Clinical Antipsychotic Trials Of Intervention Effectiveness (CATIE). *Arch Gen Psychiatry* 63 : 1069-1072, 2006
- 61) Jones PB, Barnes TR, Davies L, Dunn G, Lloyd H, Hayhurst KP, Murray RM, Markwick A, Lewis SW : Randomized controlled trial of the effect on Quality of Life of second- vs first-generation antipsychotic drugs in schizophrenia : Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study (CUtLASS 1). *Arch Gen Psychiatry* 63 : 1079-1087, 2006
- 62) Leucht S, Wahlbeck K, Hamann J, Kissling W : New generation antipsychotics versus low-potency conventional antipsychotics : a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361(9369) : 1581-1589, 2003
- 63) Suzuki T, Uchida H, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : A clinical case series of switching from antipsychotic polypharmacy to monotherapy with a second-generation agent on patients with chronic schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28 : 361-369, 2004
- 64) Kupfer DJ, Sartorius N (Eds) : The usefulness and use of second-generation antipsychotic medications. *Curr Opin Psychiatry* 15 (suppl 1) : s1-s51, 2002
- 65) Stahl SM : Antipsychotic polypharmacy, part 2 : tips on use and misuse. *J Clin Psychiatry* 60 : 506-507, 1999
- 66) 鈴木健文, 高野晴成, 渡邊衛一郎, 八木剛平 : 抗精神病薬の多剤併用大量療法への対応ガイドライン. *臨床精神薬理*, 4 : 1423-1430, 2001
- 67) 鈴木健文, 内田裕之, 渡邊衛一郎, 八木剛平 : 抗精神病薬多剤併用療法に対する減量・減薬の試みー対応ガイドラインー. *精神科治療学*, 18 : 899-906, 2003
- 68) Rosenheck R, Leslie D, Keefe R, McEvoy J, Swartz M, Perkins D, Stroup S, Hsiao JK, Lieberman J : CATIE Study Investigators Group : Barriers to employment for people with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 163 : 411-417, 2006
- 69) Gottesman II, Gould TD : The endophenotype concept in psychiatry : etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160 : 636-645, 2003
- 70) Ciompi L : The natural history of schizophrenia in the long term. *Br J Psychiatry* 136 : 413-420, 1980
- 71) Davidson L, McGlashan TH : The varied outcomes of schizophrenia. *Can J Psychiatry* 42 : 34-43, 1997
- 72) Andreasen NC, Carpenter WT Jr, Kane JM, Lasser RA, Marder SR, Weinberger DR : Remission in schizophrenia : proposed criteria and rationale for consensus. *Am J Psychiatry* 162 : 441-449, 2005
- 73) Lehman AF, Lieberman JA, Dixon LB, McGlashan TH, Miller AL, Perkins DO, Kreyenbuhl J : American Psychiatric Association ; Steering Committee on Practice Guidelines : Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition. *Am J Psychiatry* 161(Suppl) : 1-56, 2004
- 74) Kemmler G, Hummer M, Widschwendter C, Fleischhacker WW. Dropout rates in placebo-controlled and active-control clinical trials of antipsychotic drugs : a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 62 : 1305-1312, 2005
- 75) Montgomery JH, Byerly M, Carmody T, Li B, Miller DR, Varghese F, Holland R : An analysis of the effect of funding source in randomized clinical trials of second generation antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Control Clin Trials* 25 : 598-612, 2004
- 76) Basile VS, Masellis M, Potkin SG, Kennedy JL : Pharmacogenomics in schizophrenia : the quest for individualized therapy. *Hum Mol Genet* 11 : 2517-2530, 2002
- 77) Miller AL, Crismon ML, Rush AJ, Chiles J, Kashner

TM, Toprac M, Carmody T, Biggs M, Shores-Wilson  
K, Chiles J, Witte B, Bow-Thomas C, Velligan DI,  
Trivedi M, Suppes T, Shon S. The Texas medication

algorithm project : clinical results for schizophrenia.  
Schizophr Bull 30 : 627-647, 2004

---

慶應医学 第84卷第2号号外  
平成 19 年 6 月 25 日

# 博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第184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<br>学位記号            | 氏名        | 生年月日        |
|----------------------------|-----------|-------------|
| 平成19年 2月26日<br>慶大博士甲第2716号 | 藤 倉 加 奈   | 昭和46年 3月 1日 |
| 同<br>同 第2718号              | 星 山 行 基   | 昭和49年 2月 6日 |
| 同<br>同 第2719号              | 山 崎 理 絵   | 昭和50年 1月22日 |
| 平成19年 3月12日<br>慶大博士甲第2771号 | 金 子 慎 二 郎 | 昭和46年10月 6日 |
| 平成19年 3月23日<br>慶大博士甲第2706号 | 荒 卷 道 彦   | 昭和49年10月10日 |
| 同<br>同 第2707号              | 大 林 邦 衣   | 昭和50年12月28日 |
| 同<br>同 第2708号              | 小 山 太 郎   | 昭和51年 8月 8日 |
| 同<br>同 第2709号              | 権 田 裕 子   | 昭和50年 9月 1日 |
| 同<br>同 第2710号              | 白 木 文 子   | 昭和53年 7月16日 |
| 同<br>同 第2711号              | 田 久 保 圭 誉 | 昭和53年 4月 5日 |
| 同<br>同 第2712号              | 多 田 敬 典   | 昭和52年10月21日 |
| 同<br>同 第2713号              | 中 原 仁     | 昭和53年 4月11日 |
| 同<br>同 第2714号              | 芳 賀 純 子   | 昭和50年 4月26日 |
| 同<br>同 第2715号              | 長 谷 川 一 宏 | 昭和53年 2月13日 |
| 同<br>同 第2717号              | 藤 田 順 之   | 昭和48年 4月25日 |
| 同<br>同 第2720号              | 山 田 真 吏 奈 | 昭和49年 4月 3日 |
| 同<br>同 第2721号              | 渡 邊 昌 紀   | 昭和47年 2月 8日 |
| 同<br>同 第2772号              | 立 松 覚     | 昭和47年 7月 8日 |

| 学位授与年月日<br>学位記号            | 氏名      | 生年月日        |
|----------------------------|---------|-------------|
| 平成19年 3月23日<br>慶大博士甲第2773号 | 長 島 隆   | 昭和47年 2月22日 |
| 同<br>同 第2774号              | 東 口 教 司 | 昭和48年 3月 6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<br>学位記号            | 氏名        | 生年月日        |
|----------------------------|-----------|-------------|
| 平成19年 2月26日<br>慶大博士乙第4096号 | 井 上 宗 信   | 昭和34年 7月18日 |
| 同<br>同 第4097号              | 岩 崎 靖 士   | 昭和43年 5月12日 |
| 同<br>同 第4098号              | 浦 上 秀 次 郎 | 昭和45年 2月21日 |
| 同<br>同 第4099号              | 川 久 保 博 文 | 昭和43年10月15日 |
| 同<br>同 第4100号              | 小 杉 道 男   | 昭和47年 4月 9日 |
| 同<br>同 第4101号              | 篠 島 利 明   | 昭和45年10月 2日 |
| 同<br>同 第4102号              | 鈴 木 健 文   | 昭和49年 3月13日 |
| 同<br>同 第4103号              | 鈴 木 雅 美   | 昭和40年10月23日 |
| 同<br>同 第4104号              | 鈴 木 昌     | 昭和42年 6月16日 |
| 同<br>同 第4105号              | 瀬 口 秀 孝   | 昭和33年12月13日 |
| 同<br>同 第4106号              | 千 葉 斉 一   | 昭和51年 1月10日 |
| 同<br>同 第4107号              | 永 井 紀 博   | 昭和48年 5月 4日 |
| 同<br>同 第4108号              | 長 崎 和 仁   | 昭和45年 5月19日 |
| 同<br>同 第4109号              | 中 村 哲 也   | 昭和48年 7月 8日 |



| 学位授与年月日<br>学位記号            | 氏名        | 生年月日        |
|----------------------------|-----------|-------------|
| 平成19年 2月26日<br>慶大博士乙第4110号 | 林 田 哲     | 昭和47年 6月27日 |
| 同<br>同 第4111号              | 藤 田 尚 代   | 昭和45年 7月15日 |
| 同<br>同 第4112号              | 藤 田 貴 也   | 昭和44年 1月18日 |
| 同<br>同 第4113号              | 松 川 英 彦   | 昭和43年10月28日 |
| 同<br>同 第4114号              | 茂 呂 和 久   | 昭和47年 8月14日 |
| 同<br>同 第4115号              | 八 木 洋     | 昭和48年 6月24日 |
| 同<br>同 第4116号              | 山 中 ひ か る | 昭和45年10月 9日 |
| 同<br>同 第4117号              | 龍 庸 之 助   | 昭和42年 6月 7日 |
| 平成19年 3月12日<br>慶大博士乙第4137号 | 秋 好 沢 林   | 昭和49年 6月 9日 |
| 同<br>同 第4138号              | 小 熊 潤 也   | 昭和48年 8月17日 |
| 同<br>同 第4139号              | 河 村 朗 夫   | 昭和43年 9月 1日 |
| 同<br>同 第4140号              | 佐 藤 裕 之   | 昭和46年 8月 6日 |
| 同<br>同 第4141号              | 渋谷 慎 太 郎  | 昭和46年 8月31日 |
| 同<br>同 第4142号              | 清 水 隆 之   | 昭和48年 1月14日 |
| 同<br>同 第4143号              | 杉 浦 功 一   | 昭和47年 2月14日 |

## 目 次

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 藤倉 加奈 | Effects of Ultrasonic Exposure Parameters on Myocardial Lesions Induced by High-Intensity Focused Ultrasound<br>(高密度焦点式超音波を用いた心筋傷害に対する超音波照射条件の影響) …………… 8  | 8  |
| 星山 行基 | Altered Action Potential Dynamics in Electrically Remodeled Canine Atria; Evidence for Altered Intracellular Ca <sup>2+</sup> Handling<br>(電気的リモデリングを生じたイヌ心筋にみられる非定常状態における活動電位の電気生理学的特性の変化には細胞内カルシウム制御機構の異常が関与する) …… 9   | 9  |
| 山崎 理絵 | Prolonged thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: associations with impaired platelet production and increased platelet turnover<br>(同種造血幹細胞移植後遷延する血小板減少には、血小板産生不全と血小板破壊の両者が関与する) …………… 10  | 10 |
| 金子慎二郎 | A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord<br>(セマフォリン3A選択的阻害剤による損傷脊髄の再生および運動機能回復の促進) …… 11  | 11 |
| 荒巻 道彦 | PHENOTYPIC SPECTRUM OF CHARGE SYNDROME WITH CHD7 MUTATIONS<br>(CHD7遺伝子変異陽性CHARGE症候群患者の表現型のスペクトラム) …………… 12   | 12 |
| 大林 邦衣 | Dendritic cells suppress IgE production in B cells<br>(樹状細胞はB細胞のIgE産生を抑制する) …………… 13   | 13 |
| 小山 太郎 | 脱神経により廃用性萎縮をきたしたラット骨格筋に対する培養筋芽細胞の移植 …… 14  | 14 |
| 榎田 裕子 | Expression profiles of Insulin-like growth factor binding protein-like 1 in the developing mouse forebrain<br>(マウス発生期前脳におけるIGFBPL-1遺伝子の発現様式) …………… 15  | 15 |
| 白木 文子 | The p85 $\alpha$ regulatory subunit of class IA phosphoinositide 3-kinase regulates $\beta$ -selection in thymocyte development<br>(クラスIA PI 3-キナーゼの制御サブユニットp85 $\alpha$ の胸腺T細胞成熟過程における $\beta$ -セレクションへの関与) …………… 16  | 16 |
| 田久保圭啓 | Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of <i>Atm</i> -null testis<br>( <i>Atm</i> 遺伝子欠損精巣における精原細胞の異常) …………… 17  | 17 |
| 多田 敬典 | Identification and Evaluation of High-titer Anti-Sox Group B Antibody in Limbic Encephalitis<br>(辺縁系脳炎患者血清中に存在する高力価抗Sox Group B抗体の同定と評価) …………… 18  | 18 |
| 中原 仁  | Fc Receptor-Positive Cells in Remyelinating Multiple Sclerosis Lesions<br>(多発性硬化症髄鞘再生病変におけるFc受容体陽性細胞の解析) …………… 19  | 19 |
| 芳賀 純子 | <i>In Vivo</i> Visualization and Partially Repeated Transplantation of Bone Marrow Cells in Rats with Liver Damage<br>(肝障害ラットにおける骨髓細胞の <i>In Vivo</i> での可視化と経門脈複数回投与) …………… 20   | 20 |
| 長谷川一宏 | Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 Increases Vascular Endothelial Growth Factor Expression Through Sp1 Transcription Factor in Endothelial Cells<br>(DDAH2 (ジメチルアルギニン-ジメチルアミノヒドロラーゼ 2) は転写因子Sp1を介して血管内皮細胞におけるVEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) の発現を亢進する) …………… 21 | 21 |
| 藤田 順之 | CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs<br>(CD24は特異的に椎間板の髄核に発現している) …………… 22  | 22 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 山田真吏奈 | Development of a Femtomolar-Acting Humanin Derivative Named Colivelin by Attaching Activity-Dependent Neurotrophic Factor to Its N Terminus: Characterization of Colivelin-Mediated Neuroprotection against Alzheimer's Disease-Relevant Insults In Vitro and In vivo<br>(最強ヒューマニン誘導体「コリベリン」の開発:ADNFとヒューマニンのハイブリッドペプチドの抗アルツハイマー病細胞死抑制作用) ..... | 23 |
| 渡邊 昌紀 | Haplotype analysis of the estrogen receptor $\alpha$ gene in male genital and reproductive abnormalities.<br>(男児外陰部異常症および精子形成障害におけるエストロゲン受容体1型遺伝子のハプロタイプ解析) .....  | 24 |
| 立松 寛  | Role of Nitric Oxide Producing and Degrading Pathways in Coronary Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease<br>(慢性腎臓病における冠動脈内皮機能障害に対する一酸化窒素の合成・代謝経路の役割) .....  | 25 |
| 長島 隆  | Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis<br>(マウス卵の減数分裂時および有糸分裂時におけるヒストンアセチル化ならびに核蛋白BRD4の細胞内局在) .....   | 26 |
| 東口 敦司 | Specific Expression of Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$ in the Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma and its Application to Cytological Diagnosis<br>(卵巣明細胞腺癌におけるHepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$ の特異的発現と細胞診断への応用) .....   | 27 |
| 井上 宗信 | Flow-Independent Myocardial Ischemia Induced by Endothelin-1 An NADH Fluorescence Analysis<br>(エンドセリン-1による冠血流非依存性心筋虚血の検討:NADH蛍光による解析) .....  | 28 |
| 岩崎 靖士 | Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles<br>(ヒト肝細胞特異的ナノ粒子を用いた肝腫瘍に対する遺伝子治療) .....   | 29 |
| 浦上秀次郎 | Divergent roles of superoxide and nitric oxide in reduced-size liver ischemia and reperfusion injury: Implications for partial liver transplantation<br>(肝部分虚血・再灌流障害における活性酸素・一酸化窒素が有する多面性:部分肝移植との相関について) .....   | 30 |
| 川久保博文 | Alterations of p53, cyclinD1 and RB expression in the carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma<br>(食道癌癌化過程におけるp53, cyclinD1, RB遺伝子異常の解析) .....   | 31 |
| 小杉 道男 | Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist Candesartan as an Angiogenic Inhibitor in a Xenograft Model of Bladder Cancer<br>(膀胱癌異種移植片モデルにおける血管新生阻害薬としてのアンギオテンシンII 1型受容体拮抗薬カンデサルタン) .....  | 32 |
| 篠島 利明 | RENAL CANCER CELLS LACKING HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)-1 $\alpha$ EXPRESSION MAINTAIN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION THROUGH HIF-2 $\alpha$<br>(HIF-1 $\alpha$ が欠損した腎癌細胞株ではHIF-2 $\alpha$ によりVEGFの発現が維持される) .....  | 33 |
| 鈴木 健文 | 統合失調症慢性期症例に対する薬物療法の最適化 .....   | 34 |
| 鈴木 雅美 | Polisialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells<br>(グリオーマ細胞の浸潤におけるポリシアル酸の促進的役割について) .....   | 35 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 鈴木 昌  | Orthostatic Decrease in Cardiac Chaos During the Head-up Tilt Test in Patients With Vasovagal Syncope<br>(血管迷走神経性失神患者における傾斜負荷時の心カオスの減少) ……………  | 36 |
| 瀬口 秀孝 | Propagation of Ca <sup>2+</sup> release in cardiac myocytes: Role of mitochondria<br>(心筋細胞における細胞内Ca <sup>2+</sup> の伝播について: ミトコンドリアの役割) ……………   | 37 |
| 千葉 斉一 | Development of Gene Vectors For Pinpoint Targeting To Human Hepatocytes by Cationically Modified Polymer Complexes<br>(MPCポリマーによるヒト肝細胞特異的な遺伝子ベクターの開発) ……………  | 38 |
| 永井 紀博 | Selective Suppression of Pathologic, but Not Physiologic, Retinal Neovascularization by Blocking the Angiotensin II Type 1 Receptor<br>(アンジオテンシンII 1型受容体阻害による網膜病理性血管新生の選択的抑制) ……   | 39 |
| 長崎 和仁 | Effects of Preinjury Administration of Corticosteroids on Pseudointimal Hyperplasia and Cytokine Response in a Rat Model of Balloon Aortic Injury<br>(ラット大動脈挿入モデルにおける術前ステロイド投与によるサイトカイン産生と内膜肥厚抑制効果の検討) ……………                                   | 40 |
| 中村 哲也 | <i>Candida albicans</i> aggravates duodenal ulcer perforation induced by administration of cysteamine in rats<br>(カンジダアルビカンスがシステアミン十二指腸潰瘍ラットモデルの潰瘍穿孔を増悪する) ……………   | 41 |
| 林田 哲  | Anti-angiogenic effect of an insertional fusion protein of human basic fibroblast growth factor and ribonuclease-1<br>(ドメイン内挿入融合蛋白質による血管新生阻害効果の検討) ……………   | 42 |
| 藤田 尚代 | ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF-β expression in renal tubular cells<br>(高糖環境下尿細管細胞肥大、TGF-β発現におけるERKおよびp38の役割) ……………   | 43 |
| 藤田 貴也 | Tetraspanin CD151 Is Expressed in Osteoarthritic Cartilage and Is Involved in Pericellular Activation of Pro-Matrix Metalloproteinase 7 in Osteoarthritic Chondrocytes<br>(4回膜貫通蛋白質CD151は変形性関節症軟骨に発現し、軟骨細胞における潜在型MMP-7の細胞膜上での活性化に関与している) …………… | 44 |
| 松川 英彦 | A novel apoptosis -inducing monoclonal antibody (anti-LHK) against a cell surface antigen on colon cancer cells<br>(大腸癌細胞表面抗原に対する新しいアポトーシス誘導抗体(抗LHK抗体)) ……   | 45 |
| 茂呂 和久 | Adenoviral gene transfer of BDNF and GDNF synergistically prevent motoneuron loss in the nucleus ambiguus<br>(アデノウイルスベクターを用いたBDNFとGDNF遺伝子導入による相乗的な疑核運動ニューロン脱落防止効果の検討) ……………  | 46 |
| 八木 洋  | Anti-tumor effect in an <i>in vivo</i> model by human-derived pancreatic RNase with basic FGF insertional fusion protein through anti-angiogenic properties<br>(FGF挿入型ヒト組み替えRNase-bFGFの血管新生阻害作用を介した <i>in vivo</i> モデルにおける抗腫瘍効果) ……………         | 47 |
| 山中ひかる | Efficacy and Immunologic Responses to Influenza Vaccine in HIV-1-Infected Patients<br>(HIV-1感染者におけるインフルエンザワクチンの有効性と免疫応答) ……………   | 48 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 龍 廡之助 | Deinstitutionalization of long-stay patients with schizophrenia: the 2-year social and clinical outcome of a comprehensive intervention program in Japan<br>(長期入院統合失調症の脱施設化：日本における包括的介入プログラム2年後の社会的・臨床的成果) ..... | 49 |
| 秋好 沢林 | Induction of Indefinite Survival of Fully Mismatched Cardiac Allografts and Generation of Regulatory Cells by Sarpogrelate Hydrochloride<br>(組織適合抗原完全不一致マウス心移植モデルにおいて塩酸サルポグレラートは移植心の無期限生着と免疫制御細胞を誘導する) .....     | 50 |
| 小熊 潤也 | Knot-tying Force during Suturing and Wound Healing in the Gastrointestinal Tract<br>(消化管における至適結紮力と創傷治癒の解析) .....   | 51 |
| 河村 朗夫 | Predictors of Vessel Remodeling Following Directional Coronary Atherectomy<br>(冠動脈方向性アテローム切除術後の血管リモデリングの予測因子) .....  | 52 |
| 佐藤 裕之 | Intravesical Ultrasonography for Tumor Staging in an Orthotopically Implanted Rat Model of Bladder Cancer<br>(ラット正所性膀胱腫瘍モデルにおける病期診断のための膀胱内超音波検査) .....   | 53 |
| 渋谷慎太郎 | Effects of Immunosuppressants on Induction of Regulatory Cells After Intratracheal Delivery of Alloantigen<br>(拒絶反応を抑制する免疫制御細胞の誘導に対する非特異的免疫抑制剤の影響) .....   | 54 |
| 清水 隆之 | Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways<br>(レスベラトロールによるヒトB細胞性悪性腫瘍に対するカスパーゼ-3とp38 MAPキナーゼ経路の活性化を介したアポトーシス誘導) .....                        | 55 |
| 杉浦 功一 | Co-expression of aFGF and FGFR-1 is predictive of a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma<br>(aFGFとFGFR-1の共発現は食道扁平上皮癌の予後増悪因子である) .....  | 56 |

# Effects of Ultrasonic Exposure Parameters on Myocardial Lesions Induced by High-Intensity Focused Ultrasound

(高密度焦点式超音波を用いた心筋傷害に対する超音波照射条件の影響)

藤 倉 加 奈

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

高密度焦点式超音波 (HIFU) は温度効果とキャビテーション効果により、非侵襲的あるいは低侵襲的に、組織内のある特定の深さの部位を、通過経路の組織を損傷することなく焼灼する技術である。この技術はLynnらが1942年に報告し、その後Fryらが1950年代に研究をすすめ、泌尿器科、眼科、腫瘍科の各領域で応用されている。

一方、循環器領域の臨床では、不整脈に対する高周波アブレーション治療、閉塞型肥大型心筋症に対するアルコールアブレーションが施行されている。本研究では、次世代の非侵襲的治療法として、HIFU心筋アブレーションの臨床応用の可能性を探るため、HIFUの効果に影響すると推定される諸因子の影響を検討した。HIFU治療を心臓に应用する際に問題となるのは、心臓の拍動に伴う心筋の位置の移動、そして心臓の複雑な構造である。特に、心周期に伴う心臓の位置をトラッキングする方法は確立されていない。そこで本研究では、心電図を用いて心周期に同期したHIFUをパルス照射する方法を検討した。

HIFUトランスデューサーより5 MHzの超音波を心筋ブロックに照射した。超音波の組織内空間平均インテンシティは、心筋表面からの距離が10mmおよび25mmの深さでは各々13kW/cm<sup>2</sup>、7.4kW/cm<sup>2</sup>であった。診断用AモードトランスデューサーをガイドにしてHIFUトランスデューサーと標的領域との距離を一定に保った。HIFU照射後、心筋ブロックを切開してリージョンを露出し、リージョンの長さおよび幅を計測した。照射時の諸パラメーターのうち、使用した心筋ブロックの部位、心筋ブロック自体の温度、心筋ブロック表面からのリージョンの深さという諸因子がリージョンの大きさに与える影響を検討した。HIFUの総照射時間 (パルス照射1回分の長さ×照射回数) が長いほど照射リージョンの大きさは大きかった。また、心筋表面から標的領域までの距離が長いほどリージョンのサイズは縮小した。また、解剖学的に構造が複雑な右室を貫通して照射した場合は、構造が比較的単一な左室自由壁に他の条件を一致して照射した場合と比較してリージョンの大きさは減少する傾向を示した。また、心筋ブロック自体の温度が、37度の時と比較して23度の時にはリージョンの大きさは小さかった。

HIFUを用いて生体外の心筋ブロック内に境界鮮明なリージョンを作成できた。HIFUの通過経路および遠位の組織は損傷されなかった。この初期実験により、HIFUによる心筋アブレーションによって、非侵襲的に特定の心臓病を治療できる可能性が示唆された。HIFUによる心筋アブレーションを行う際に、心筋表面から標的領域までの距離、解剖学的構造に合わせて、諸照射パラメータを設定する必要である。特に実際の拍動心では心周期に同期させてHIFU照射を行う際の照射パラメータの選択が制約されるため、今後、更なる検討が必要と考えられた。さらに、心周期に伴う特定心筋の位置をトラッキングする技術の確立が必要と考えられた。

高密度焦点式超音波 (HIFU) は、子宮筋腫、前立腺肥大および腫瘍などに対して次第に臨床応用されてきている。本治療法は、非侵襲的あるいは低侵襲的に、組織内のある特定の深さの部位を、通過経路の組織を損傷することなく組織焼灼する。HIFU治療を心疾患に適用する場合、拍動心にかに焦点を固定するかということが課題である。心周期に伴う心臓の位置をトラッキングする方法は確立されていない。そこで本研究では、将来拍動心に対して心電図に同期した短時間のHIFU照射を複数回繰り返して行うことを想定し、数秒毎にHIFUの短時間照射を複数回繰り返すことで標的部位に心筋傷害を作成した。心筋傷害に影響を与える因子として、パルスパラメータ (パルス一回分の長さ、パルス間の間隔)、傷害の心筋表面からの深さ、傷害を作成した心筋ブロックの部位、心筋組織の温度について検討した。HIFUの総照射時間が長いほど傷害は大きく、心筋表面から標的領域までの距離が長いほど傷害は小さくなった。また、右室を貫通して心室中隔に作成した傷害は、左室自由壁に他の条件を一致して作成した傷害よりも小さくなる傾向を示した。また、心筋ブロック自体の温度が37度の場合、23度で作成した傷害よりも大きかった。以上より、HIFUを用いた心筋焼灼術によって非侵襲的に特定の心臓病を治療できる可能性が示唆された。

審査においては、HIFUを心疾患治療に臨床応用するにあたり、画像診断などと組み合わせて傷害を作成する部位の特定を行うことの重要性、さらに、呼吸に伴う標的部位の位置偏位に対して、画像診断を用いて横隔膜の位置をモニターすることで呼吸同期が可能となると助言された。HIFU傷害作成時に傷害をモニターする方法について質問され、超音波を用いた温度測定が可能であり、これをHIFU傷害作成時に応用する別の実験が行われている旨回答された。HIFU傷害の大きさの計測方法について質問され、HIFU傷害の形の詳細や計測箇所が説明された。また、標的部位の深さが症例あるいは焼灼目的によって異なると考えられ、本研究で傷害作成した深さよりも深い位置に傷害を作成する必要性が出てくる可能性が考えられるが、その点をどう克服するかと問われ、トランスデューサーの形を工夫することで組織表面から深い位置に焦点を合わせることができ旨説明された。本研究ではパルス1回分の長さを200msや300msと設定しているが、これらの時間の長さではHIFU照射中に心筋の位置が若干偏位すると考えられ、さらに短いパルスを選択しなかった理由について質問がなされ、別途行われた実験で1回のパルスの長さについて100msと設定して複数回照射した結果、傷害作成が困難であった旨回答された。

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、HIFUを拍動している心臓に照射し、心疾患治療に応用することによって種々の心臓病を治療できる潜在的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 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 再生医学 福田 恵一  
放射線医学 栗林 幸夫  
学術確認担当者：  
審査委員長：四津 良平

試問日：平成19年1月18日

# Altered Action Potential Dynamics in Electrically Remodeled Canine Atria; Evidence for Altered Intracellular Ca<sup>2+</sup> Handling

(電氣的リモデリングを生じたイヌ心房筋にみられる非定常状態における活動電位の電気生理学的特性の変化には細胞内カルシウム制御機構の異常が関与する)

星 山 行 基

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

### (背景)

高頻度電気刺激によって生じる電気生理学的な不安定性はこれまで細胞膜のイオンチャネルの変化によるものとされてきた。カルシウム制御機構の異常も活動電位の動的変化の異常に関与し、不整脈を発生・持続させやすくする可能性がある。(方法) 正常犬および左心耳にペースメーカーリードを縫着し6~8週間400bpmで高頻度刺激を行って作成したリモデリング犬を各6頭ずつ使用した。ペントバルビタールナトリウムによる静脈麻酔後に心臓を摘出し、直ちにTyrode液に浸し主に右心耳の櫛状筋を切除して実験用に供した。最初に正常心筋とリモデリング心筋の両者においてフィールド電気刺激を行いつつ、特に刺激周期が突然変化する前後の変化に注目しつつ活動電位と筋の張力(twitch force; TF)を計測した。次に細胞内カルシウム制御機構に影響を与えると推測される薬剤(リアノジン、イソプロテレノール、シクロピアゾン酸)を投与した際の上記の変化について計測を行った。リモデリング心筋においても同様の実験を行い正常心筋と比較した。更に細胞内カルシウム制御機構に関与する蛋白質の定量をウエスタンブロット法により行い、正常心筋とリモデリング心筋とで比較した。(結果) 刺激周期を突然延長させると直後の第1拍目ではTFと活動電位持続時間(APD)が共に増大し、第2拍目以降は共に漸減していく現象がみられた。刺激周期を突然短縮させた場合は反対に第1拍目でTFとAPDは共に減少し、第2拍目以降は漸増していく現象がみられた。刺激周期を変化させた際に1拍目が大きく変化し2拍目以降のTFとAPDが並行して変化するというこれらの変化はリアノジンの投与により消失し、筋小胞体のカルシウムポンプの阻害薬であるシクロピアゾン酸の投与により増大した。リモデリング心筋においても刺激周期の変化に伴いTFとAPDは並行して変化した。1拍目の変化の割合も2拍目以降の変化も正常心筋と比較してより大きかった。リモデリング変化の割合も2拍目以降の変化も正常心筋と比較してより大きかった。リモデリング心筋ではAPDとTFのrestitution curveの傾きはより平坦で、刺激周期が短い時に観察されるaltereansは減少していた。蛋白定量ではリモデリング心筋では筋小胞体のリアノジン受容体(RyR2)とカルシウムポンプ(SERCA2)は有意に減少していた。(結論)我々は刺激周期が一定したいわば“定常”状態だけでなく、刺激周期が変化した(“非定常”)状態においてもリモデリング心筋で活動電位の動態に変化がみられ、これらの非定常状態における活動電位の変化には細胞内カルシウム制御機構の異常が関与していることを示した。これはこれまで定常状態における活動電位の異常が主に細胞膜のイオンチャネルの異常によって説明されていたこと対照的であり、細胞内カルシウム制御機構の異常が不整脈の原因や新たな治療の標的となりうることを示唆するものである。

心筋の電氣的リモデリングは細胞膜のイオンチャネルの変化によってのみ説明されてきた。本研究では細胞内Ca<sup>2+</sup> handlingが関与する可能性について検証した。

イヌ心筋に電氣的連続刺激を加え、その刺激周期(CL)を突然延長させると第1拍目では張力(TF)と活動電位持続時間(APD)が共に増大し、第2拍目以降は共に漸減していく現象がみられた。TFの変化は細胞内Ca<sup>2+</sup> handlingを反映することから以下の様な仮説を立てた。CLを突然延長させると筋小胞体(SR)からより多くのCa<sup>2+</sup>が放出されTFが増大する。この際に細胞膜のNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構(NCX)を介してより多くのCa<sup>2+</sup>が細胞外へ流出し大きな内向き電流が生ずる為に1拍目のAPDが延長する。2拍目以降はSRに汲み上げられるCa<sup>2+</sup>が漸減していく為にSRから放出されるCa<sup>2+</sup>及びNCXを介した電流も減少し、APDも短縮していく。TFとAPDの変化(dynamics)はCa<sup>2+</sup>-ATPase阻害薬であるcyclopiazonic acidの投与により増大しリモデリング心筋にみられる変化と類似し、逆にCa<sup>2+</sup>-ATPaseを賦活化させるisoproterenolによりdynamicsは減弱し正常心筋にみられる変化に近くなることからリモデリング心筋におけるCa<sup>2+</sup>-ATPase機能の低下が示唆された。実際にリモデリング心筋ではSERCA2は有意に減少していた。以上より電氣的リモデリングに細胞内Ca<sup>2+</sup> handlingが関与する可能性が示唆された。

審査においては細胞内Ca<sup>2+</sup> handlingに関与するphospholambanやFKBP等の測定も検討すべきであると助言された。Ryanodine受容体蛋白の減少でSR Ca<sup>2+</sup> releaseの増加を説明するのは困難ではないかと問われ、phospholambanの過リン酸化によりCa<sup>2+</sup> leakageが増加するという報告もあり単純に蛋白発現量だけではSR Ca<sup>2+</sup> releaseは決まらない可能性がある旨回答された。また部位による差異の検討の有無について質問され、右心耳と左心耳では両者のdynamicsに差は認めなかったが、Bachmann束ではAPD dynamicsが減少しており心耳以外の部位では蛋白発現量にも差が生じる可能性がある旨回答された。心筋細胞モデルとして適切かどうか問われ、近年は心筋細胞の原因として肺静脈の細胞の電気生理学的特性の変化がfocusとなることが指摘されており、心筋刺激を行う本研究は限定されたモデルと答えることと回答された。

以上のような今後改善すべき点は認められるが、電氣的リモデリングに細胞内Ca<sup>2+</sup> handlingが関与し不整脈の原因解明や治療につながる可能性が示唆された点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 麻酔学 武田 純三

再生医学 福田 恵一

学術助成担当者:

審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成19年1月18日

# Prolonged thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: associations with impaired platelet production and increased platelet turnover

(同種造血幹細胞移植後遷延する血小板減少には、血小板産生不全と血小板破壊の両者が関与する)

山 崎 理 絵

## 内容の要旨

同種造血幹細胞移植後遷延する血小板減少症は、移植後の後期合併症として5-37%の患者に認められるという報告がある。移植後の血小板減少は生着不全、原病の再発、血管内皮障害、薬剤、ウイルス感染などいろいろな原因で起こるが、原因のはっきりしない症例も多い。移植後の遷延する血小板減少症の機序を解明するため、今回我々は、血小板破壊のマーカーとして血漿中グライコカリシン・インデックス (GCI) を、骨髄での血小板産生不全のマーカーとして血漿中トロンボポエチン (TPO) を、抗血小板抗体反応の評価の指標として抗GP II b-IIIa抗体産生B細胞数を測定した。前二者の解析にはELISA法を用い、抗GP II b-IIIa抗体産生B細胞の解析にはELISPOT法を用いた。

対象は移植後患者50例である。このうち23例に遷延する血小板減少を認めた。コントロールとして42例のITP患者、9例の再生不良性貧血患者、22例の健常人を解析した。これら3つの因子は、血小板減少を認める移植後患者群において血小板減少を認めない患者群より有意に高く、血小板数との相関を示した (全て $P < 0.001$ )。血小板減少を認める移植後患者群と他の疾患群と比較すると、GCI値はITP患者群で有意に高かった ( $P < 0.001$ ) が、TPO値は再生不良性貧血患者群とほぼ同等、抗GP II b-IIIa産生B細胞数はITP患者群とほぼ同等であった。これらの測定データにつきステップワイズ多変量解析を行い、GCIおよびTPOが移植後の血小板数を予測する重要な因子となることが分かった ( $P < 0.001$ および $0.01$ )。移植後血小板減少患者のGCIおよびTPOの分布パターンは、再生不良性貧血患者に類似しており、移植後の血小板減少の主たる要因は骨髄における血小板産生能の低下にあることが示された。加えて45例の移植後患者で骨髄検査を施行したところ、巨核球低値を示す症例は移植後血小板減少を認める群において有意に多く認められた ( $P = 0.03$ )。

多くの移植後症例で抗GP II b-IIIa抗体産生B細胞を認めたが、血小板減少を認めない症例でも陽性となる場合があり、抗体産生が必ずしも血小板破壊につながらない可能性がある。抗体が血小板に付着しない可能性も考えたが、血小板付着抗GP II b-IIIa抗体と血漿中抗GP II b-IIIa抗体の解析を行い、抗体は血小板表面に存在することを確認した。移植前処置などの影響で脾機能不全がおこり、効率のいいオプソニン化が行えないためとも考えられる。

本研究において我々は、移植後遷延する血小板減少症がいくつかの機序により複合的に起こることを確認した。簡便な2つの血漿マーカー、GCIおよびTPOを測定することにより、各症例における移植後血小板減少症の機序を評価することができると考えられる。

## 論文審査の要旨

同種造血幹細胞移植後の遷延する血小板減少症の機序を解明するため、血小板減少を来した移植後患者23例を対象として、血小板破壊のマーカーとして血漿中グライコカリシンインデックス (GCI) を、骨髄での血小板産生不全のマーカーとして血漿中トロンボポエチン (TPO) を、抗血小板抗体産生の指標として抗GP II b-IIIa抗体産生B細胞数を測定した。これら3つの因子は、血小板減少を認める移植後患者群で血小板減少を認めない移植後患者コントロール群より有意に高く、血小板数との相関を示した。多変量解析の結果、GCIおよびTPOが移植後の血小板数を予測する重要な因子となることが分かった。移植後血小板減少患者のGCIおよびTPOの分布パターンは、再生不良性貧血患者に類似しており、移植後血小板減少の主たる要因は骨髄における血小板産生能の低下にあることが示唆された。

審査において、本研究で抽出されたTPO、GCIの違いが、臨床経過やその治療にどのようなつながるかどうかが尋ねられた。これに対し、TPO高値である症例では血小板減少に対する特別な治療を必要とせず、経過観察をするのみで良い事が多いが、一方、抗血小板抗体産生が高まっている症例ではステロイドを含む免疫抑制療法が有効である事も多く、今後症例を積み重ねて検討する必要があるとの回答がなされた。さらに、数症例で臨床症状とTPO、GCI値の経時的相関が認められたことが示された。

今回の研究で認められた抗GP II b-IIIa抗体が同種抗体か自己抗体か、という点に関しては、現時点で明らかではないが、日本人におけるGP II b-IIIaのSNPが存在しないことから、自己抗体の可能性が高いのではないかと指摘された。移植後の自己抗体産生については、赤血球、好中球などを標的とする症例が臨床的に経験されることもあり、免疫再構築過程におけるオリゴクローナルな自己反応性クローンの増殖が原因となる可能性があることが説明された。

血小板数とGCI、TPOの相関について、直線的な関係というより、むしろ対数曲線となるのではないかと、との指摘を受けた。TPOおよびGCIがある閾値を超えて高値、あるいは低値となった場合、その値と血小板数の間に相関は認められない事が示唆され、これについては再度統計的解析を行い、再検討する必要があると考えられた。

血中TPO濃度は主にその受容体であるc-Mplの発現状況によりコントロールされると考えられており、主に骨髄中の巨核球数を反映する。巨核球数、血小板数を反映して肝臓でのトロンボポエチン産生が変化することに関して、その調節機構の詳細がたずねられた。従来から指摘されていたsponge-theoryに対して、骨芽細胞がトロンボポエチンの産生に関与しているという、新たな見解につき指摘があった。

以上のように本研究では、検討すべき課題は残されているものの、移植患者の臨床検体を用い、臨床上有意味な情報を提供した有意義な研究である事が評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫

微生物学・免疫学 小安 重夫 発生・分化生物学 須田 年生

臨床検査医学 村田 満

学術確認担当者:

審査委員長:小安 重夫

試問日:平成18年12月29日



# A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord

(セマフォリン3A選択的阻害剤による損傷脊髄の再生および運動機能回復の促進)

金子 慎 二 郎

## 内容の要旨

末梢神経系と比べて中枢神経系において軸索の再生が乏しい理由の一つとして、中枢神経系においては損傷部で軸索の再生を阻害する因子が存在することが指摘されてきた。中枢神経系で軸索の再生を阻害する因子は、髄鞘（ミエリン）中に存在するNogo-A、MAG、OMgpなどのミエリン関連蛋白質と、損傷部瘢痕組織中に存在するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンやSemaphorin3A (Sema3A) などのいわゆる細胞外基質の2つに大きく分けられる。近年Verhaagenらは中枢神経系に存在するこれらの軸索再生阻害因子の中で、Sema3Aがその中心的役割を果たしている可能性を指摘している。そこで本研究では、Sema3A阻害剤を開発し、ラット脊髄損傷モデルにおける有効性を検討した。

実験では、約14万種類の化合物の中からSema3Aに対する選択性および阻害活性の高い薬剤のスクリーニングをgrowth cone collapse assayなどを用いて行い、その結果得られたSM-216289を、ラット胸髄完全切断モデルに対して、損傷後4週間持続的に損傷部に注入し、14週間運動機能評価を行った後、組織学的検討も行った。その結果、組織学的にはSM-216289投与群でNeurofilament、GAP43、CGRPなどに対する免疫組織染色で軸索再生の有意な促進を認め、また網様体脊髄路の特異的マーカーであるSHTに対する免疫組織染色でも、SHT陽性軸索の再生の有意な促進を認めた。またSM-216289投与群における再生軸索の多くに末梢神経型の髄鞘形成を認めるとともに、SM-216289投与群においては損傷部に多くのシュワン細胞を認めた。そこで*in vitro*においてシュワン細胞のmigration assayを行ったところ、Sema3Aにはシュワン細胞のmigrationを抑制し、またSM-216289を投与することによって、シュワン細胞はmigrationの機能を回復することを見出した。これらの実験結果から、胸髄完全切断モデルの損傷部においてSM-216289投与群で有意に多く観察されたシュワン細胞は、SM-216289の作用により損傷部へより多くmigrateして来たものである可能性が高いと考えられた。これらのシュワン細胞は、軸索再生に対するguidance的役割も果たした可能性も高いと考えられた。また運動機能評価においても、SM-216289投与群において運動機能の回復の有意な促進を認めた。

これらの結果から、脊髄損傷後の損傷部における軸索再生を阻害する因子としてSema3Aがその中心的役割を果たしている可能性が強く示唆されるとともに、このSema3Aを標的とした阻害剤を用いた治療の脊髄損傷に対する有効性が示唆された。

## 論文審査の要旨

中枢神経系においては軸索の再生が乏しいことは知られている。その理由の一つとして中枢神経系においては軸索再生を阻害する因子が存在し、損傷部瘢痕組織中に存在するセマフォリン3A (Sema3A) がその中心的役割を果たしている可能性が指摘されてきたが、Sema3Aノックアウトマウスの致死性が高いことなどから損傷後脊髄内におけるSema3Aの役割を明確に示した報告はなかった。そこでSema3Aに対する阻害活性および選択性の極めて高い阻害剤を用いてラット脊髄損傷モデルに対する有効性を検討した。その結果、損傷部における網様体脊髄路の軸索再生の促進、損傷部へのシュワン細胞のmigrationの促進とそれに伴う再生軸索に対する末梢神経型の髄鞘形成の促進、損傷部におけるアポトーシスの抑制、損傷部における血管再生の促進効果などが明らかとなり、運動機能の有意な回復も認められた。本研究により、Sema3A阻害剤の脊髄損傷治療への有効性が示されたとともに、損傷後の脊髄内においてSema3Aが様々な再生反応を阻害する因子として中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

審査では、皮質脊髄路の再生が認められなかったにも関わらず、なぜ運動機能の回復が認められたのかとの質問がなされた。これに対して、一般的に本実験系で用いた脊髄完全切断モデルにおいては皮質脊髄路の再生を得るのは非常にハードルが高いこと、また過去の報告においても網様体脊髄路の軸索再生がある程度の運動機能の回復につながる事が報告されており、皮質脊髄路の再生は運動機能の回復には必ずしも必要ないと考えられるとの回答がなされた。次に、損傷部へSema3A阻害剤投与群において多く認められた末梢神経型の髄鞘形成の意義についての質問がなされた。これに対して、一般的に末梢神経型の髄鞘は中枢神経型の髄鞘中に含まれる軸索再生阻害因子を含まないため、軸索再生にとって有利であり、またシュワン細胞が軸索再生のガイダンス的役割を果たした可能性が考えられるが、その一方、これら末梢神経型の髄鞘を有する損傷部の再生軸索が末梢神経由来である可能性も否定できず、現時点では、それらを判別するための良い手段はないとの回答がなされた。また本Sema3A阻害剤の作用機序に関する質問がなされたが、本薬剤はSema3Aの化学構造を変化させることにより、その受容体への結合能を失わせるという作用機序を有するため、損傷部にSema3Aが分泌され続けている限りその効果を維持するには本剤を持続投与する必要があるとの回答がなされた。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、損傷脊髄内におけるSema3Aの役割を明らかにし、脊髄再生医療への道を切り開い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 整形外科学 戸山 芳昭

解剖学 仲嶋 一範 内科学 鈴木 則宏

生理学 柚崎 通介

学力確認担当者：

審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成19年2月13日

# PHENOTYPIC SPECTRUM OF CHARGE SYNDROME WITH CHD7 MUTATIONS

(CHD7遺伝子変異陽性CHARGE症候群患者の表現型のスペクトラム)

荒 巻 道 彦

## 内容の要旨

CHARGE症候群はcoloboma (C) コロボーマ、heart defect (H) 心奇形、atresia choanae (A) 後鼻孔閉鎖、retarded growth and development (R) 成長障害・発達遅滞、genital hypoplasia (G) 外陰部低形成、ear anomaly (E) 耳奇形を主症状とする多発奇形症候群であり、これらの徴候の頭文字の組み合わせにより命名された。原因遺伝子はChromodomain helicase DNA binding protein-7 (CHD7) であることが2004年に同定されたが、その機能は不明である。本研究では、CHARGE症候群と臨床診断した日本人患者24名を対象にCHD7の変異解析を行い、変異陽性患者17名の表現型のスペクトラムについて検討した。両親から書面による同意を得たのち患者末梢血からゲノムDNAを抽出し、CHD7の各エクソンをPolymerase chain reaction法により増幅した。PCR産物を熱変性高速液体クロマトグラフィー法により解析し、異常なクロマトグラム波形を認めた場合にPCR産物の塩基配列を直接シーケンス法によって決定した。患者24例中17例に変異が同定された。その内訳はナンセンス変異7例、フレームシフト変異6例、スプライシング変異3例、エクソン8～12の欠損が1例であり、全ての変異はヘテロ変異であり、カルボキシ端を欠くタンパクが産生されることから、CHARGE症候群はCHD7のハプロ不全により発症すると考えられた。変異の種類や変異の遺伝子内における位置と臨床症状との間に明らかな相関を認めなかった。変異陽性患者において高頻度に認められた症状は、コロボーマ(15/17例)、難聴(15/15例)、発達遅滞(17/17例)であった。コロボーマを認めた15症例のうち、虹彩のコロボーマを認めた症例は2例のみであり、CHARGE症候群を疑う場合には、視診により虹彩にコロボーマを認めなくても、眼底検査により網膜・視神経乳頭のコロボーマの有無を確認することが必須であると考えられた。難聴を認めた15例では、難聴の程度はいずれも80dB以上と高度であったことから、CHARGE症候群を疑う場合には乳児期早期に聴力の評価を行い、補聴器装着などの適切な治療計画を立てる必要があると考えられた。CHARGE症候群の古典的な症状とされる後鼻孔閉鎖は、17例中5例のみに認められ、後鼻孔閉鎖のない症例でも、CHARGE症候群が除外できないことが明らかになった。CHD7変異陽性患者のほぼ全例にコロボーマ・難聴・発達遅滞を認めたことから、CHD7が眼・耳・中枢神経の初期発生に重要な役割を果たすと結論した。初期胚においてCHD7がこれらの器官の原基に発現しているかどうか、今後の検討課題である。

## 論文審査の要旨

CHARGE症候群はコロボーマ(C)・心奇形(H)・後鼻孔閉鎖(A)・成長障害・発達遅滞(R)・外陰部低形成(G)・耳奇形(E)を主症状とする多発奇形症候群である。原因遺伝子はChromodomain helicase DNA binding protein-7 (CHD7) であるが、その機能は不明である。本研究ではBlakeの診断基準に合致する日本人CHARGE症候群患者24名を対象にCHD7の変異解析を行い、人類遺伝学的な見地からCHD7の役割を検討した。変異陽性例ではコロボーマ(15/17例)・難聴(15/15例)・発達遅滞(17/17例)を高率に認めることを示した。心奇形を13/17例、外陰部低形成を男児8例全例に認めた。また、本研究に並行してニワトリCHD7相同遺伝子を同定し、ニワトリ胚における本遺伝子の発現部位をin situ hybridizationで検討し、変異陽性例の臨床症状との相関を明らかにした。

審査では、変異を認めなかった7例についていかなる発症機序が推定されるか、と質問され、解析範囲外にある発現調節領域に変異が存在する可能性、CHD7以外にも原因遺伝子が存在する可能性などが想定される、と回答された。また、既に臨床診断されている症例においてさらに変異を同定することは、遺伝カウンセリング上、具体的にどのようなメリットがあるのか、と質問され、de novo変異であることが証明されれば、次子の再罹患率は極めて低いと説明しうると回答された。ついで、CHD7変異陽性例において奇形が高率に認められた器官と、その原基におけるCHD7遺伝子発現パターン、発現時期の関連について議論された。神経胚期ニワトリ胚でCHD7の発現を認めたのは、眼原基・耳原基・神経管全長であり、これらはいずれもヒトにおいて高頻度に奇形、機能異常を認めた器官である、と回答された。CHD7変異陽性例における先天性心疾患の特徴について質問され、フォロー四徴症・大血管転位など鰓弓由来とされる部位に発生異常が多いと回答された。さらに、CHD7の鰓弓形成への関与を示すデータがあるかと質問され、ニワトリ胚鰓弓にCHD7の発現を認めたとの自身のデータが示された。CHARGE症候群の性腺機能低下の発症機序について質問された。まず、鼻原基からGonadotropin releasing hormone (GnRH) 産生細胞が嗅神経に沿って視床下部へ移動することが説明され、ニワトリ胚鼻原基にCHD7の発現を認めたことに基づき、CHD7のハプロ不全により鼻原基・嗅神経の発生異常を生じ、その結果、GnRH産生細胞の移動が障害され、性腺機能低下を発症する、との仮説が述べられた。

以上、本研究はCHD7遺伝子の変異が様々な器官の奇形を惹起する機序についてさらに検討すべき課題を残しているものの、CHARGE症候群の奇形好発部位を明らかにし、これらの部位の原基とニワトリ胚におけるCHD7の発現部位に明確な対応があること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 小児科学 高橋 孝雄  
病理学 岡田 保典 産婦人科学 吉村 泰典  
解剖学 相磯 貞和  
学力確認担当者：  
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成19年2月2日

# Dendritic cells suppress IgE production in B cells

(樹状細胞はB細胞のIgE産生を抑制する)

大林 邦衣

## 内容の要旨

IgE抗体は寄生虫感染に対する防御に重要であるが、過剰なIgE抗体反応は花粉症や喘息などのアレルギー性疾患を引き起こす。そのため、生体内でIgE抗体は他の抗体より低く抑えられている。抗体遺伝子はクラススイッチ組み換えを介して、抗原に対する特異性を変えることなく機能を変えることが出来る。クラススイッチ組み換えはB細胞上のCD40分子とT細胞上のCD40Lとが相互作用することによって引き起こされ、誘導される抗体の種類はT細胞を含めた他の細胞によって、サイトカインなどを介して厳密に制御されている。生体内でIgE産生細胞はCD40LとIL-4刺激によってIgM産生細胞から、クラススイッチによって誘導されるが、同様にCD40LとIL-4で誘導されるIgG1産生細胞より遥かに誘導効率が低い。しかし、試験管内で精製B細胞にIgE産生を誘導した時にはIgG1と比較してそれ程低いことから、IgE産生は他の細胞によって積極的に抑制されていることが示唆される。樹状細胞はT細胞に対する抗原提示細胞であるが、様々なサイトカインを産生しT細胞やB細胞の反応性を調節している。最近の研究では樹状細胞がB lymphocyte stimulator protein (BLySまたはBAFF) やa proliferation-inducing ligand (APRIL) など を介して直接B細胞にクラススイッチ組み換えを誘導出来ることが報告されている。

私は本研究において樹状細胞によるクラススイッチ組み換えの制御機構を検討し、樹状細胞がCD40LとIL-4刺激によって引き起こされるB細胞のIgE産生を2つの異なる機構で抑制するということを発見した。IgE産生の抑制は樹状細胞に特異的であり、T細胞や線維芽細胞には見られなかった。抑制機構は分化段階や樹状細胞の由来の違いによって異なっており、抑制機構は細胞表面の接触を介した抑制機構とTGF- $\beta$ やIFN- $\gamma$ などの液性因子による抑制機構があることが判明した。未熟な段階の骨髄由来樹状細胞や肺から分離した初代培養の肺樹状細胞は液性因子を介して強くIgEクラススイッチ組み換えを抑制した。一方、LPSを用いて成熟活性化させた骨髄由来樹状細胞ではIgEクラススイッチ組み換えを抑制する能力を失っていたが、クラススイッチ組み換えを抑制せずにIgEタンパク質レベルで抑制する機構があることが分った。さらに未熟な段階では液性因子の関与が強いことが判明し、成熟状態では細胞接触の関与が強いことが分った。以上のことは、生体内におけるIgEの特異的な抑制に樹状細胞が関与していることを示唆し、アレルギー発症や抑制機構の解明や、治療法の探索につながると考えられる。

## 論文審査の要旨

本論文では生体内でIgE抗体の産生が他の抗体より低く抑えられている理由を探り、樹状細胞がB細胞のIgE産生を抑制することを報告した。本研究においてはIgEクラススイッチ組み換えの制御機構を検討し、樹状細胞がCD40リガンド (CD40L) とIL-4刺激によって引き起こされるB細胞のIgE産生を2つの異なる機構で抑制することを見いだした。共培養によるIgE産生の抑制は樹状細胞に特異的であり、T細胞や線維芽細胞には見られなかった。トランスウエルを用いた実験などから、抑制機構は分化段階や樹状細胞の由来の違いによって異なっており、抑制機構は細胞表面の接触を介した抑制機構とTGF- $\beta$ やIFN- $\gamma$ などの液性因子による抑制機構があることが判明した。未熟な段階の骨髄由来樹状細胞や肺から分離した初代培養の肺樹状細胞は液性因子を介して強くIgEクラススイッチ組み換えを抑制した。一方、LPSを用いて成熟活性化させた骨髄由来樹状細胞ではIgEクラススイッチ組み換えを抑制する能力を失っていたが、クラススイッチ組み換えを抑制せずにIgEの発現をタンパク質レベルで抑制する機構があることが分った。さらに未熟な段階では液性因子の関与が強いことが判明し、成熟後は細胞接触の関与が強いことが分った。以上のことは、生体内におけるIgEの特異的な抑制に樹状細胞が関与していることを示唆する。

審査で最も議論の中心となったのは、樹状細胞によるIgEの発現制御が*in vivo*においても同様に機能しているか否かという点であった。この点に関しては樹状細胞特異的にジフテリア毒素受容体を発現するマウスを用いて樹状細胞を消去する方法などを含めていくつかの実験を行ったが、証明するには至っていないと回答された。文献的には寄生虫感染時にはIgE発現が亢進するが、この場合に樹状細胞の機能が抑制されるという報告があることが紹介された。さらに、樹状細胞やT細胞との相互作用によるIgEの発現調節を示唆する報告もあり、今後の課題と考えられる。IgE産生抑制の際に細胞間相互作用において機能している分子や液性因子の本体についても質問されたが、現在のところ不明であり、さらに探索中であると回答された。樹状細胞のサブセットによる違いや樹状細胞への刺激方法を変えたときにどのような違いが現れるかについても質問された。今のところ系統的な検討は行っていないが将来的には興味深い点であり検討したいと回答された。また、本研究ではCD40LとIL-4刺激という人工的な刺激によるIgEクラススイッチの実験系を用いているが、抗原特異的なIgE産生系を用いてさらに検討することが必要ではないかという意見も出された。さらに、臨床的な視点から見た場合に喘息やアトピーなどで樹状細胞がどの程度の役割を果たすかという点に対しても議論がされたが、実験系の難しさなどからきちんとしたアプローチがなされていないと回答された。

本研究は、さらに詳細な分子機構を解明する必要があることは明らかであるが、アレルギー発症や抑制機構の解明、さらに治療法の探索につながる価値のある論文であると評価された。

論文審査担当者 主査 微生物学・免疫学 小安 重夫  
先端医科学 河上 裕 皮膚科学 天谷 雅行  
内科学 池田 康夫

学力確認担当者：

審査委員長：河上 裕

試問日：平成19年2月7日

# 脱神経により廃用性萎縮をきたしたラット骨格筋に対する 培養筋芽細胞の移植

小 山 太 郎

## 内容の要旨

脱神経された骨格筋は筋線維が縮小し、廃用性萎縮が進行し筋力は急速に低下する。骨格筋の筋線維の基底膜下には筋原性幹細胞である筋衛星細胞が存在し、筋損傷時にはこの筋衛星細胞が増殖し、損傷部位の筋再生が起こる。ラットの骨格筋を脱神経すると、3週間は筋衛星細胞は増殖し続けるが、筋肉への神経再支配が起こらない限り増加した筋衛星細胞による筋再生は起こらず、やがて筋衛星細胞は枯渇していく。よって脱神経後、神経再支配までの期間が長くなるほど、筋衛星細胞の減少は進行し、神経筋接合部位の進行変性もあわせて、神経再支配後の筋力の回復は低下する。

われわれは筋芽細胞を移植することで脱神経後の萎縮筋内における筋衛星細胞の減少を補充することができれば、神経再支配後の筋再生、筋力改善を向上させられるとの仮説を立てた。

筋芽細胞を用いた細胞移植治療としてはデュシェンヌ型筋ジストロフィーや心筋梗塞後の心不全に対する治療報告がある。筋ジストロフィーmdxマウスの筋内に、ジストロフィン産生能をもった正常マウスの筋芽細胞を注射したところ、移植筋芽細胞がジストロフィンの欠損した筋細胞と融合し、筋細胞膜にジストロフィンを発現することに成功している。また虚血性心疾患の患者に対して、自家培養筋芽細胞を移植して心機能が改善したという報告もある。

しかしながら、廃用性萎縮骨格筋に対する筋芽細胞移植の報告は少なく、移植した筋芽細胞が神経再支配の起きていない脱神経下の筋肉に生着しうのかどうかは不明である。

われわれは、green fluorescent protein transgenicラットの下腿筋から筋芽細胞を採取、培養し、この培養筋芽細胞を脱神経から40日経過したラット廃用性萎縮腓腹筋に移植し、移植した筋芽細胞が神経再支配なしに生着しうのか、さらに筋線維に分化しうのかをvimentin、desmin、myosin、 $\alpha$ SMAに対する蛍光免疫染色をおこない、検討した。

脱神経後40日目に移植された筋芽細胞は、神経再支配がなくとも移植後1週で生着しており移植後2週には筋線維への融合が確認された。移植後4週においても筋線維に融合した移植細胞が確認できた。筋重量の計測では、脱神経後、筋重量は減少していったが、移植後2週までは筋重量の減少はわずかであった。これらの結果から脱神経後の神経縫合前の時期に筋芽細胞を移植することで廃用性萎縮の進行を抑制し、神経縫合後の筋力回復結果を改善できる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

廃用性萎縮に陥りつつある骨格筋への筋芽細胞移植の報告は少なく、移植した筋芽細胞が神経再支配の起きていない脱神経下の筋肉に生着しうのかどうかは不明である。green fluorescent protein transgenicラットの下腿筋から筋芽細胞を採取、培養し、この培養筋芽細胞を脱神経から40日経過したラット廃用性萎縮腓腹筋に移植し、移植した筋芽細胞が神経再支配なしに生着しうのか、さらに筋線維に分化しうのかをvimentin、desmin、myosin、 $\alpha$ SMAに対する蛍光免疫染色をおこない検討した。脱神経後40日目に移植された筋芽細胞は、神経再支配がなくとも移植後1週で生着しており移植後2週には筋線維への融合が確認された。移植後4週においても筋線維に融合した移植細胞が確認できた。

審査ではまず移植細胞の量の妥当性について質問がなされた。これに対して、マウスで $1 \times 10^4$ 個、ウサギで $1 \times 10^7$ 個の筋芽細胞を移植した報告があり、本実験に用いたラットの体重から移植細胞数を $1 \times 10^6$ 個に決定したと説明がなされた。また、各種サイトカインが廃用性萎縮に及ぼす影響については報告があるかとの質問がなされた。これに対して、IGFの投与で脱神経による廃用性萎縮の進行が抑制されたという報告があるが、サイトカイン単独よりも細胞成分を含んだ移植の方がより効果があると考え、この実験を行っているとの回答があった。次に細胞移植後に筋重量の計測を行っているが、筋重量には廃用性萎縮に伴うfibrosisの重量が含まれている可能性があり、筋萎縮の程度を評価する為には筋重量計測単独ではなく筋組織の断面積の計測の併用が望ましいとの指摘がなされた。また筋芽細胞移植が廃用性萎縮に及ぼす効果を検討する為には、細胞移植群のnを増やすとともに、細胞移植を行わなかった廃用性萎縮筋モデル群を作成し両群の比較を行う必要があると指摘された。最後に、今後、筋再生を目指すのであれば細胞移植単独ではなく、神経縫合や電気刺激、各種サイトカインの併用などが必要であろうと指摘された。

以上のように本研究にはさらに検討すべき課題を残しているものの、脱神経下においても萎縮筋内で移植細胞が生着しうることが示されたことから、今後、細胞移植による廃用性萎縮進行の予防や、細胞移植と神経縫合の併用による筋力の改善といった臨床応用の可能性が期待されるという点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 形成外科学 中島 龍夫

耳鼻咽喉科学 小川 郁 整形外科 戸山 芳昭  
外科学 河瀬 斌

学力確認担当者：

審査委員長：小川 郁

試問日：平成18年12月29日

# Expression profiles of Insulin-like growth factor binding protein-like 1 in the developing mouse forebrain

(マウス発生期前脳におけるIGFBPL-1遺伝子の発現様式)

権田 裕子

## 内容の要旨

大脳皮質神経細胞は、主として終脳の脳室に面した脳室帯で誕生し、脳室帯から脳表面へと放射状に移動することにより、6層からなる多層構造を構築する。従来の実験により、神経細胞の最終配置決定には細胞自体の潜在的な能力と脳室帯における分泌因子及び膜貫通領域を持つ因子が重要であると考えられているが、その分子基盤は未だに解明されていない。それらの分子を同定するために、DNAマイクロアレイと物理化学的アルゴリズムを用いて解析を行い、発生早期に発現の高い分泌性分子の1つとして、Insulin-like growth factor binding protein-like 1 (IGFBPL-1) が得られた。脳内でのIGFBPL-1の分布および機能はまだ全くわかっていないため、本研究では、発生期におけるIGFBPL-1遺伝子の発現様式を明らかにするために、*in situ* hybridization法を用いてマウス発生期の前脳におけるIGFBPL-1 mRNAの分布様式を解析した。

胎生12日目では、IGFBPL-1 mRNAの発現は新外套のプレプレート、背側視床、視床上部の分化の進んだ部分および海馬に認められた。視床上部の発現は神経上皮では認められず、その周りの分化の進んだ部分に見られた。また、新外套の背内側は外側よりも発現が強く、最も内側の海馬の部分で強い発現が認められた。胎生14日目になると、強い発現が新外套の脳室下帯と中間帯、海馬、視床上部の分化の進んだ部分および背側視床に認められた。新外套において、IGFBPL-1 mRNAの発現は脳室帯ではわずかであったが、脳室帯から脳室下帯に移動して神経分化を開始し始めた細胞 (NeuroD陽性細胞) では発現が劇的に増加していた。胎生14日目の発現は解析した全ての発生時期の中で最も強く、その後、IGFBPL-1 mRNAのシグナルは減少した。胎生16日目、18日目ではIGFBPL-1 mRNAはかなり減少し、海馬と新外套の脳室下帯に認められた。海馬での発現は吻側から尾側にかけて見られ、新外套ではIGFBPL-1 mRNAは脳室帯では全く認められなかった。生後8日目では、IGFBPL-1 mRNAの発現は胎生期よりさらに減少し、歯状回の顆粒細胞層でのみ認められた。さらに生後20日目になると、IGFBPL-1の発現は遅生まれの歯状回神経細胞が局在する顆粒細胞層深部に認められ、NeuroD陽性細胞の分布と一致していた。次にIGFBPL-1タンパク質の分布についてウエスタンブロッティング法を用いて検討した。その結果、胎生14日目まではタンパク量の増加が見られたが、その後、タンパク量は減少し、この結果はmRNAと一致していた。以上の結果より、IGFBPL-1は、神経細胞として分化を開始し始めた細胞が局在している部分に発現する傾向があることが示唆された。

## 論文審査の要旨

大脳皮質神経細胞の多くは脳室面で誕生し、最終分裂を終えた細胞がその後脳表面に移動して皮質層構造を形成することが知られている。本研究では、このプロセスを制御する分子基盤を解明するためにGeneChip等による解析を行い、脳室面近くで強く発現する分泌性分子の1つとして、Insulin-like growth factor binding protein-like 1 (IGFBPL-1) を同定した。IGFBPL-1の分布および機能はまだ全く知られていないため、本研究では、発生期におけるIGFBPL-1遺伝子の発現様式を解析した。IGFBPL-1 mRNAの分布は、胎生期では胎生14日目特に強く、新外套の脳室下帯と中間帯、背側視床、視床上部の分化の進んだ部分および海馬に認められた。その後発現は減少し、生後20日目になると、IGFBPL-1遺伝子の発現は遅生まれの歯状回神経細胞が局在する顆粒細胞層深部に認められ、NeuroD陽性細胞の分布と一致していた。以上の結果より、IGFBPL-1は、神経細胞として分化を開始し始めた細胞が局在している部分に発現する傾向があることが示された。

審査では、今回検討したIGFBPL-1と類似したドメイン構造を持ち、IGFと結合することが既に証明されているIGFBP群も脳の発生と関係するものなのか、またその発現は見ているのかという質問がなされた。これに対して、先行研究よりIGFBP-1、IGFBP-2は脳形成との関連性が示唆されているが、IGFBP-3、IGFBP-4のトランスジェニックマウスでは脳の表現型には特に異常が認められないとの返答がされた。また、IGFBP群の発現に関しては既に多数の報告があること、及び、申請者が行ったBiacoreを用いた解析によりIGFBPL-1にはIGFは結合しないことが示唆されたため、IGFBPL-1の“IGF結合ドメイン”は実は別の機能を有している可能性を今後検討する必要があると回答された。さらに、IGFBPL-1は神経細胞移動に関わる分子なのか、またどのように神経細胞移動を制御するかとこの質問がなされた。これに対し、現在、子宮内マウス電気穿孔法を用いて神経細胞移動に関する解析を行っているが、IGFBPL-1過剰発現細胞は大脳皮質の下方に留まる傾向があり、今後さらに検討が必要であるとの返答がされた。また、神経細胞移動の制御機構に関しては、IGFBPL-1はプロテアーゼインヒビターのドメインを持つことが推測されたことより、過剰発現した細胞は神経細胞移動の際に周囲のタンパク質を分解できなくなったために移動が阻害された可能性があるとの返答がされた。

以上のように、本研究は未だに検討されるべき点を残しているものの、今まで全く知見のなかったIGFBPL-1の大脳における詳細な発現様式を明らかにした点、さらにIGFBPL-1が生後においても神経細胞の産生が起こっている部位に発現し続けるという知見を見いだ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 解剖学 仲嶋 一範  
解剖学 相磯 貞和 内科学 鈴木 則宏  
小児科学 高橋 孝雄  
学力確認担当者：  
審査委員長：相磯 貞和

試問日：平成18年12月27日

# The p85 $\alpha$ regulatory subunit of class IA phosphoinositide 3-kinase regulates $\beta$ -selection in thymocyte development

(クラスIA PI 3-キナーゼの制御サブユニットp85 $\alpha$ の胸腺T細胞成熟過程における $\beta$ -セレクションへの関与)

白 木 文 子

## 内容の要旨

胸腺T細胞は、最も未熟なCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>細胞 (DN) からCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞 (DP) を経て、最終的にCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>もしくはCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の成熟細胞 (SP) へと分化する。この過程において、 $\alpha\beta$ 鎖のT細胞受容体 (TCR) が機能的か否かの2段階のセレクションを受ける。すなわち、DNからDPへの分化過程におけるpre-TCRによる $\beta$ -セレクション、およびDPからSPへの分化過程におけるTCRによる正負の選択である。本研究では、この2段階のセレクションのそれぞれにおけるクラスIA PI 3-キナーゼ (PI3K) の機能解析を行った。クラスIA PI3Kは、リンパ球においては、主として制御サブユニットp85 $\alpha$ および触媒サブユニットp110 $\delta$ からなるヘテロダイマーとして機能していることが知られている。まず、制御サブユニットp85 $\alpha$ のDNからDPへの分化への関与を検証するために、p85 $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウスとRag-2<sup>-/-</sup>マウスをかけ合わせ、 $\beta$ -セレクションの*in vivo*モデル実験を行った。Rag-2<sup>-/-</sup>マウスの胸腺T細胞はDN段階で分化が停止しているが、Rag-2<sup>-/-</sup>マウスに抗CD3 $\epsilon$ 抗体を投与することで、その刺激がpre-TCRシグナルの代わりとなってDP段階まで分化が進行する。抗CD3 $\epsilon$ 抗体投与後のp85 $\alpha$ <sup>-/-</sup>Rag-2<sup>-/-</sup>マウスにおいてはDPへの分化が制御されており、細胞数もp85 $\alpha$ <sup>-/-</sup>Rag-2<sup>-/-</sup>マウスの場合に比べ減少していた。また、単一のTCRのみを発現するTCRトランスジェニックマウス (DO11.10)、Rag-2<sup>-/-</sup>マウスならびにp85 $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウスの交配により作製したマウス (p85 $\alpha$ <sup>-/-</sup>DO11.10Rag-2<sup>-/-</sup>) を解析した結果、正負の選択への異常はないものの、DP細胞の絶対数が減少するという表現型が認められた。次に、触媒サブユニットp110 $\delta$ の特異的阻害剤であるIC87114の存在下・非存在下に胎児胸腺器官培養 (FTOC) を行った。T細胞の分化段階がDNにある14.5日期胚の胎児胸腺を5日間器官培養することで、DPまでの分化過程を解析可能であるが、IC87114を加えた場合には、このDPへの分化が抑制された。一方、すでにDP段階にある17.5日期胚の胎児胸腺T細胞は、IC87114を加えたにもかかわらず、加えてない場合と同様にSPへと分化が進んでいた。さらに、クラスIA PI3Kと拮抗的に機能するPtenの胸腺特異的欠損マウスを用いて、 $\beta$ -セレクションの*in vivo*モデル実験を行った。抗CD3 $\epsilon$ 抗体投与後のPten<sup>-/-</sup>Rag-2<sup>-/-</sup>マウスでは、対照となるPten<sup>+/+</sup>Rag-2<sup>-/-</sup>マウスの場合と比べ、DNからDPへの分化の促進・細胞数の増加が認められた。以上の結果から、クラスIA PI3KはDPからSPへの分化過程にはほとんど関与せず、pre-TCRの刺激によるDNからDPの分化過程に特異的な役割を担うことが明らかとなった。

## 論文審査の要旨

本論文では胸腺内におけるT細胞の分化過程に脂質キナーゼの一つであるクラスIA-PI3-キナーゼ (以下PI3K) がどのような機能を持つかを検討した。具体的にはPI3Kの制御サブユニットであるp85 $\alpha$ のノックアウトマウス (以下PI3Kノックアウトマウス) やT細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウスなどを用いてT細胞の分化を検討した。ダブルネガティブ細胞からダブルポジティブ細胞への移行には機能的なTCR $\beta$ 鎖の再構成が必須であり、再構成したTCR $\beta$ 鎖を含むpreTCRを介したシグナルが伝達されて細胞増殖とTCR $\alpha$ 鎖の再構成が誘導される。このチェックポイントを $\beta$ -セレクションと呼ぶ。本研究から、PI3Kが $\beta$ -セレクションに関与すること、その一方でダブルポジティブ細胞からシングルポジティブ細胞への分化段階でTCRの特異性や自己反応性をチェックするポジティブセレクションやネガティブセレクションには必要でないこと、などを明らかにした。

審査では、ダブルネガティブT細胞からダブルポジティブT細胞への分化に有意差があるとはいえ分化が停止するわけではないことから、PI3Kの生理的な機能をどのように解釈すべきなのか、が問われた。これに対し、PI3Kが細胞増殖や生存にかかわる可能性や分化の引きがねにかかわる可能性があり、これらを区別する実験を計画中でと回答された。また、用いたPI3KノックアウトマウスにおいてはT細胞のみならず他の細胞でもp85 $\alpha$ が欠損しており、観察された表現型が上皮細胞などのストローマ細胞の表現型による可能性に関して質問された。これに対しては、その可能性は否定しきれないが、さらに検討するために培養ストローマ細胞を用いた実験を行い、予備的にはT細胞におけるPI3Kの活性が重要であるという結果を得ていると回答された。また、上皮細胞におけるPI3Kの機能に関しては自分ではデータをもっていないと回答された。さらに、p85 $\alpha$ のノックアウトによって酵素活性がどの位低下しているかを評価したかが質問された。これに対して、試みはしたが胸腺細胞においてPI3Kの産物であるPIP3の検出は極めて難しく、成功していないと回答された。PI3Kの逆反応を司る脱リン酸化酵素であるPtenの欠損によってどのような表現型が得られるかとの質問には、これまでに自己免疫反応の惹起やダブルポジティブ型の胸腺腫の発症などが報告されていると回答された。事実この研究においてもT細胞特異的にPtenを欠損させた場合、異常な表現型を持つダブルポジティブ細胞がある頻度で出現することが観察されたことが報告された。以上の観察を背景にして医学的にはどのような応用が考えられるか、という質問に対しては、直接PI3Kを標的にすることは難しく、下流のシグナル伝達系を含めた分子機構を解明し、より特異的な標的を探しだすことが重要であると回答された。Notchシグナル経路とT細胞白血病の関係が注目されていることから、PI3Kの上流に関しても質問され、これに対して培養ストローマ細胞にNotchのリガンドを発現させた型を用いた研究を計画中でと回答された。

本研究は、さらに詳細な分子機構を解明する必要があるとはいえ、T細胞の分化におけるPI3Kの機能を示したことで価値があると評価された。

論文審査担当者 主査 微生物学・免疫学 小安 重夫  
発生・分化生物学 須田 年生 皮膚科学 天谷 雅行  
微生物学・免疫学 石川 博通

学力確認担当者:

審査委員長: 須田 年生

試問日: 平成19年1月17日

# Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of *Atm*-null testis

(*Atm*遺伝子欠損精巣における精原細胞の異常)

田久保 圭 菅

## 内容の要旨

哺乳類の精子形成は精巣の中にある精細管で行われる。精子は精原細胞から分化して造られる。精原細胞分画の中に、自己複製によって自己を維持する精子幹細胞が存在し、この幹細胞分画によって個体の精子形成が生涯に亘り維持されていく。このように精子形成において重要な役割を担う精子幹細胞であるが、その完全な純化と、性状解析はいまだ行われていない。

我々の研究グループはこれまでに成体骨髄の造血幹細胞の未分化性維持と自己複製機構でヒトの毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia: A-T) の原因遺伝子であるAtaxia Telangiectasia-Mutated (*Atm*) に注目してきた。このノックアウトマウスの骨髄造血幹細胞は活性酸素種 (ROS) の上昇により、p38MAPKおよびp16<sup>INK4a</sup>が活性化し、最終的に枯渇することが明らかとなった。このマウスの精子形成不全は、減数分裂期のDNA修復の異常が寄与しているとされているが、幹細胞を含む精原細胞分画についての解析はほとんどなされていない。近年になって幹細胞システム間で共通の分子基盤がその未分化性維持に寄与していることが明らかとなっているため、今回われわれは精巣の幹細胞システムの未分化細胞分画を維持する分子基盤について、*Atm*ノックアウトマウスを用いて検討を行った。

まず、ATMは精原細胞では核内にドット状の染色パターンで活性化していることが明らかとなった。これまで*Atm*遺伝子を欠損した精巣では減数分裂期の異常しか言及されてこなかったため、改めて*Atm*遺伝子欠損マウスの精細管の形態学的変化を経時的に観察したところ進行性の精原細胞の喪失を認めた。これらの観察を併せると、精原細胞の維持に*Atm*遺伝子が寄与している可能性が示唆された。

次いで精巣においても*Atm*欠損マウスにNACを経口投与して、この精原細胞の喪失も回復できるかを検討したが、ほとんど回復できないことが明らかになった。また、*Atm*欠損造血幹細胞の枯渇に寄与するp16<sup>INK4a</sup>の上昇も認められなかった。すなわち、造血幹細胞の異常とは異なるメカニズムの寄与が強く疑われた。

その一方、8週齢のマウスでは*Atm*ノックアウトでBrdU陽性の精細管が25.0±5.8%と、野生型 (61.1±4.4%) に比して著大な減少を認め、またTUNEL法およびFACSによって精原細胞は野生型に比べて有意にアポトーシスが亢進していることが確認された。これらの異常の分子基盤を検討するために、EpCAM陽性の精原細胞でのcyclin DファミリーとBaxの遺伝子発現をリアルタイムPCRによって検討したところ、精原細胞ではcyclin D1とD2の発現が低下とBaxの発現の上昇を認めた。これらの遺伝子発現の変化は*Atm*欠損精原細胞の細胞周期停止とアポトーシスの分子基盤の一端に寄与していると考えられる。

本研究から、*Atm*遺伝子を欠損した精巣では、これまで他のグループによって記載されてきた減数分裂期の異常に加えて、それ以前の分化段階の精原細胞にも細胞周期停止とアポトーシスの亢進という異常があることが明らかになった。精原細胞分画は精子幹細胞を含む分画であり、*Atm*遺伝子欠損によって造血幹細胞以外の幹細胞システムにも異常がある可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

哺乳類精巣の精細管内にある精子幹細胞システムは、幹細胞を含む未分化細胞から終末分化した精子にいたるまでを核の染色性をもとに容易に峻別できるという点で特異な幹細胞システムである。その一方、幹細胞分画の維持に関与する分子基盤や、表面抗原等の分子マーカーについては未だ明らかとなっていない部分が多い。本研究では、ノックアウトマウスモデルを用いた*Atm*遺伝子の機能解析を通じて、幹細胞分画を含む精原細胞の維持にATMが必要であり、*Atm*欠失条件下では進行性の精原細胞の消失が見られることを明らかにした。また、そのメカニズムとしては細胞周期の停止とアポトーシスの亢進の関与が示唆されることも明らかとなった。本研究はこれまで知られていた減数分裂期におけるATMの機能に加えて、より未分化な細胞分画においてもATMが活性化し、その機能が精原細胞分画の維持に寄与していることを明らかにした。

審査では、まず、抗酸化剤N-acetyl-L-cysteine (NAC) が血液精巣関門を通過して作用しているかについての質問があり、活性酸素の指標となるジハイドロエチディウム染色の染色性の亢進が、NAC投与群によって低減していることから通過していると考えられるとの回答がなされた。さらに、ジハイドロエチディウム染色の具体的方法についての質問があり、精巣の未固定新鮮凍結切片を作成後、可及的速やかに37℃のインキュベーションチャンパーにおいて染色を行うとの回答がなされた。

次に、*Atm*欠損マウスにおける精子形成不全は、精細胞そのものではない、体細胞成分であるライディッヒ細胞やセルトリ細胞の異常による機序を除外することはできるかについて議論された。これに対し、ノックアウトモデルにおいて進行性の幹細胞減少が見られること、早期の、ライディッヒ細胞の過形成がみられない時期においても、*Atm*欠損マウス由来の精巣細胞は精細管への移植実験において移植生着能が強度に障害されていること、さらには*in vitro*の精子幹細胞培養系においてもATM阻害によって幹細胞の喪失がみられることなどから、幹細胞自体の欠陥と結論したとの回答があった。

また、*Atm*欠損マウスにおける造血幹細胞減少と今回発表された精子幹細胞の減少の機序の違いについての質問があった。これに対し、前者は、p16<sup>INK4a</sup>の発現上昇を介した老化シグナルによる幹細胞の枯渇であり、後者は、細胞周期停止とアポトーシスシグナルによるもので、おそらくは、組織ごとのDNA損傷に対する反応の違いではないかと説明された。その他、ATMの標的遺伝子、小脳失調の機序などについても、質問があったが、おおむね的確な回答が得られた。

本論文は精子幹細胞を含む未分化精巣細胞分画の検討により、ATMの新たな精子形成における役割を明らかにした意義は大きく、学位論文としてふさわしいと評価された。

論文審査担当者 主査 発生・分化生物学 須田 年生  
生理学 岡野 栄之 泌尿器科学 村井 勝  
医化学 末松 誠

学力確認担当者：  
審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成19年1月18日

# Identification and Evaluation of High-titer Anti-Sox Group B Antibody in Limbic Encephalitis

(辺縁系脳炎患者血清中に存在する高力価抗Sox Group B抗体の同定と評価)

多田 敬典

## 内容の要旨

中枢神経系の自己免疫疾患と考えられている傍腫瘍性神経症候群 (paraneoplastic neurologic disorder ; PND) は悪性腫瘍患者において腫瘍細胞の直接の浸潤や転移によらず腫瘍の遠隔作用による神経症状を呈する疾患である。PND患者では血清や髄液中に腫瘍と神経細胞の両方に結合する自己抗体の存在が認められており、その標的抗原は神経細胞において重要な機能を担う神経特異的タンパク質であることが明らかとなり、注目を集めている。

本研究では、新規のPND標的抗原を同定することを目的とし、悪性腫瘍が疑われ、神経症状を呈する患者の血清を集め、生化学的および免疫組織学的手法を用いて新規PND自己抗体の検出、評価を行った。その結果、肺癌が疑われる辺縁系脳炎患者血清中に存在する高力価の自己抗体を同定した。この自己抗体はマウス脳タンパク質抽出液に特異的に反応し、胎生期のマウス脳タンパク質に強く反応した。成体脳においては、患者血清に反応するほとんどの細胞が側脳室、海馬歯状回に局在しており、成熟神経細胞マーカーであるNeuN陰性であった。これら細胞はBrdUを取り込んだ分裂中の細胞であり、また成体脳における神経細胞新生部位とされている脳室下帯および海馬歯状回顆粒層下部に存在することから神経幹・前駆細胞と考えられた。

次に自己抗体の標的分子の探索を試みた。患者血清中にはこれまでに報告されているPNDの自己抗体 (Hu, Nova, Cdr2) は全く存在していなかった。最近の報告で、神経障害を伴わない肺小細胞癌患者血清中にグループB Soxタンパク質 (Sox B) に対する抗体が同定されていること、さらに本研究で神経幹・前駆細胞が自己抗体の標的となっていることから発生段階の中枢神経に発現するSox Bが本患者の自己抗体の標的分子である可能性を考えた。ウェスタンブロット、免疫組織学的解析の結果、患者血清中には高力価の抗Sox B抗体が確認され、また抗体吸着実験により、抗Sox B抗体を取り除いた結果、観察されていた血清の免疫反応性が失われた。

本研究はSox Bタンパク質が新しいPNDの標的抗原分子候補であることを示した。また成熟神経細胞だけではなく成体脳に存在する神経幹・前駆細胞が自己抗体の標的とされる可能性を示唆した。Sox Bタンパク質を標的抗原とするPNDの新たな発症機序の解明につながると考えられ、臨床においても腫瘍の早期発見、治療に役立つものと期待される。

## 論文審査の要旨

中枢神経系の自己免疫疾患と考えられている傍腫瘍性神経症候群 (paraneoplastic neurologic disorder, PND) の新たな標的抗原を同定する目的で、神経症状を呈する腫瘍の存在が疑われる患者の血清を用いた網羅的なスクリーニングを行った。今回得られた結果は発生段階での神経誘導や中枢神経系の領域化において重要な役割を果たす転写因子Sox Bタンパク質が新しいPNDの標的抗原である可能性を示唆し、さらに自己免疫の攻撃対象となる細胞が成熟した神経細胞だけではなく、成体脳における神経幹・前駆細胞も標的となりうることを明らかにした。今回の成果は、将来PNDの新たな発症機序の解明につながると考えられる。

審査ではまず、PNDにおいて抗体がどのように脳血液関門を通過するのかが質問がなされた。いまだ不明とされているが、神経細胞がエンドサイトーシスによって細胞外にある大きな分子を細胞内に取り込み得ること、また実際PND患者血清に含まれるIgGをマウス脳内に投与すると小脳プルキンエ細胞の細胞質内にIgGが検出されるという報告もされていることを紹介し、自己抗体が細胞内に侵入して標的抗原に結合することは不可能ではないと回答された。続いて動物に患者自己抗体を投与することにより動物でPND様の症状が観察されるか質問がなされた。現在まで抗神経抗体や標的抗原の動物への投与など様々な試みがなされてきたが、いまだ成功した例はないと回答された。またPNDの治療法として血漿交換療法による改善が見られるかという質問には、抗神経抗体除去の目的で血漿交換療法が施行されており、有効例の報告もあると回答された。さらに神経症状の検討が、腫瘍の早期発見に役立つかと質問がなされたが、神経症状は腫瘍の発見より以前に出現することが多く、患者血清にみられる抗神経抗体は腫瘍の早期発見のマーカーとしても有用であり、肺小細胞癌患者の17%が抗神経抗体の一つ抗Hu抗体をもつと回答された。

次に患者血清が本当にSox Bを特異的に標的としているのか質問がなされた。抗体吸着実験によりSox Bだけを患者血清中から選択的に除去した結果、Sox Bに対する免疫応答性が失われたことから本患者血清中に存在する自己抗体は抗Sox B抗体のみであることが示唆されると回答された。続いてPNDにおいて自己抗体の出現が神経症状を引き起こすと示唆する根拠についての質問がなされた。自己抗体がPND発症の直接の原因であるかどうかはいまだ定かでないが、PND患者における抗神経抗体は、神経症状の悪化とある程度の相関関係をもって高くなることが報告されていると回答された。

最後にPND患者血清を用いた免疫染色において大脳皮質内で陽性となっている細胞の性質が不明のため、様々なマーカーを用いた詳細な検討が必要であると指摘がなされた。また、神経幹・前駆細胞が選択的に標的とされていることに関し、腫瘍幹細胞という概念も考慮に入れて今後研究を進めていくと非常に興味深いと助言がなされた。

以上、本研究は今後さらに検討すべき点はあるものの、多くの抗Sox B抗体をもつ患者の症例を集めることおよび他標的抗原を同定し機能解析することが、PND発症機序の解明につながると期待され、さらには臨床医学、免疫学、腫瘍学、神経生物学にまたがる非常に有意義な研究であると高く評価された。

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

試問日：平成19年1月11日



# Fc Receptor-Positive Cells in Remyelinating Multiple Sclerosis Lesions

(多発性硬化症髄鞘再生病変におけるFc受容体陽性細胞の解析)

中原 仁

## 内容の要旨

多発性硬化症 (MS) は最も罹患者の多い中枢神経系脱髄疾患であり、世界中で百万人以上が本症を診断されている。MSにおける脱髄病変では髄鞘の自然再生能力に限界があり、完全なる治癒は得られず神経障害が残存する。しかしながら現時点では髄鞘再生療法は未開発であり今後の研究が期待されている。過去にはMSの脱髄病変における髄鞘形成細胞、即ちオリゴデンドロサイトは死滅しており、そのために髄鞘再生不全が生じると推定されていたが、最近の知見では同病変においてオリゴデンドロサイト前駆細胞並びに未熟オリゴデンドロサイト (OPC/iOligs) が多数残存していることが示されている。従って、これら残存細胞を髄鞘形成細胞へと分化誘導することが可能になれば、究極的には新規の髄鞘再生療法が開発されるものと期待される。我々は以前の研究において、齧歯類のOPC/iOligsにおいては、それら細胞に発現している免疫グロブリンFc受容体鎖 (FcRγ) が、分化を誘導する重要な役割を担っていることを示している。このFcRγがMS病変に残存している上記のOPC/iOligsに発現しているか否かについては未だ説明が為されていない。本研究において我々は、死後神経病理解剖を施行されたMS計10症例に関して、それぞれの髄鞘自然再生病変 (髄鞘再生病変) と慢性脱髄病変 (脱髄病変) の双方におけるFcRγの発現を解析した。その結果、MS脳において、OPC/iOligs及びミクログリアにおいてFcRγが発現していることが確認され、特に髄鞘再生病変においてはFcRγ陽性の髄鞘再生細胞の存在も確認された。統計学的解析を行った結果、FcRγ陽性OPC/iOligsの密度は、髄鞘再生病変においては脱髄病変の約3倍に増大しており、一方でFcRγ陽性ミクログリアの密度についてはこれと正反対の結果が得られた。FcRγ陰性のOPC/iOligsの密度については、この二者の病変間で有意差は検出されなかった。従って、FcRγ陽性OPC/iOligsの増加とFcRγ陽性ミクログリアの減少が、MS病変における髄鞘の自然再生に関連しており、一方でFcRγ陰性のOPC/iOligsの密度と髄鞘再生には関連性が認められないことが示唆された。脱髄病変の辺縁に位置し、髄鞘再生病変に隣接する“plaque edge”においては、脱髄病変としては例外的にFcRγ陽性OPC/iOligsの増加が認められ、かつこれら細胞に髄鞘再生時に関与する転写因子Olig1が発現が認められた。これまでの我々の研究結果を踏まえると、以上の結果はFcRγがMS脳における髄鞘再生の誘導に役割を担っている可能性を示唆しており、またFcRγが将来的な髄鞘再生療法の標的分子となる可能性を示唆している。

## 論文審査の要旨

多発性硬化症の罹患者は世界に約250万人と言われ、現在も病因は明らかにされていない。残存する脱髄による神経機能障害を回復させるには脱髄巢の再髄鞘化が必要であるが、これまで脱髄巢においては髄鞘形成細胞 (オリゴデンドロサイト) は死滅していると推定されていた。1998年頃からこの脱髄巢にオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) が残存していることが相次いで報告され、これら内在性OPCを分化誘導することで再髄鞘化を可能にする手法が考えられるようになった。副論文に示されるように、中原らはマウスにおけるOPCからオリゴデンドロサイトへの分化機構を解明し、免疫グロブリンFc受容体鎖 (FcRγ) がその分化トリガーとなっていることを示した。しかしながらFcRγが多発性硬化症を含めたヒト脳におけるOPCに発現し、同様の機構に関与しているかは未解明であった。そこで本研究では多発性硬化症剖検例のヒト脳におけるFcRγの発現解析が為された。その結果、FcRγが脱髄巢における残存OPC及びミクログリアに発現していることが示され、また自然髄鞘再生巣では脱髄巢に比してFcRγ陽性OPCの密度が上昇すること、FcRγ陰性OPCの密度に病変間有意差が認められないこと、髄鞘再生巣付近では髄鞘再生細胞に発現することが知られているOlig1が核内陽性となるFcRγ陽性OPCが存在することから、多発性硬化症脳においても副論文の結果が支持されることを示した。逆に、FcRγ陽性ミクログリアの密度はFcRγ陽性OPCの密度と反比例し、髄鞘再生巣では有意に減少していることから、FcRγ陽性ミクログリアがFcRγ陽性OPCに分化している可能性が示唆された。以上の結果から、FcRγを刺激する薬剤が、多発性硬化症における髄鞘再生促進薬として機能する可能性が示唆された。

審査では先ず、本研究で光学顕微鏡を用いて自然髄鞘再生巣と定義した病変が、電子顕微鏡レベルでも髄鞘再生巣として示され得るものか質問が為された。これに対し、剖検脳の保存状態から電子顕微鏡での解析は困難であり、本研究では髄鞘再生細胞に核内陽性となるOlig1が同領域において陽性であることも踏まえて髄鞘再生巣と判断したと回答された。次にFcRγ陽性ミクログリアについて、本研究で検討されたMHC class II以外のマーカーの検討の有無の質問に対して、ミクログリアの定義は銀鍍法に切り同定マーカーについては一義的なものが示されておらず、その定義に曖昧さが残っていると回答された。続いて骨髄系由来のミクログリアがOPCとなり得るかの見解を問われ、これに対し、本研究で示した結果並びに昨今の報告によるとその可能性があるものの、ミクログリアの定義に曖昧さが残った状態での議論であるが故に、真に骨髄系由来の細胞がOPCとなっているのかどうかは判断できないと回答された。またFcRγ陽性OPCが脱髄後どの段階で出現してくるかの質問が為され、その確認の為に発症直後に剖検された症例等を検討する必要があるが、その検体入手は極めて困難であると回答された。最後に本研究で示される髄鞘再生促進薬によって多発性硬化症は完治するかの質問に対し、本研究によってもたらされるであろう治療は脱髄による神経障害の克服には大変有用であるが、完治のためには再発脱髄を防ぐ研究も必要であり再発抑制薬を併用する必要があると回答された。

以上のように、本研究には更なる検討課題を残しているものの、将来的に髄鞘再生促進薬を開発する上でFcRγが重要なドラッグターゲットとなることをヒト脳で示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 解剖学 相磯 貞和  
内科学 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範  
生理学 岡野 栄之

学力確認担当者：  
審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成19年1月16日

# In Vivo Visualization and Portally Repeated Transplantation of Bone Marrow Cells in Rats with Liver Damage

(肝障害ラットにおける骨髄細胞のIn Vivoでの可視化と経門脈複数回投与)

芳賀 純子

## 内容の要旨

末期肝硬変に対する治療法は、肝移植が唯一の根本的な治療法であるが、ドナー不足が深刻なのが現状である。そこで、新たな治療法として、幹細胞が移植されている。骨髄細胞は肝細胞へと胚葉を超えた分化が報告される一方、融合によるものであるとの報告、さらには、肝細胞にならないとの報告もある。また、投与プロトコルに関する報告は少ない。肝硬変患者へ対する骨髄移植の臨床応用もされているが、さらなる基礎的研究が必要と考えられる。

本研究では、骨髄細胞が肝再生に与える影響を評価するため、移植骨髄細胞の動態の可視化と、至適投与方法の検討を行った。効果的な投与方法の検討が、臨床応用時の最適な投与方法の選択につながることを期待できる。

骨髄細胞の可視化として、正常肝及び障害肝レシピエントラットへ、門脈より移植したGreen fluorescent protein (GFP) ラット及びfirefly luciferaseラット骨髄細胞をCharge-coupled-device (CCD) カメラ及びin vivo imaging system (IVIS) で評価した。至適投与方法の検討として、GFPラット骨髄細胞を肝障害モデル無アルブミンラット(NAR)へ移植し、単回投与群と複数回投与群を比較した。単回投与群は、末梢からと門脈から、複数回投与は、DMEMを門脈から投与するコントロール群と、骨髄細胞を末梢からと門脈から移植する群とした。評価項目は、生存日数、組織染色(HE染色、アザン染色、アルブミン染色)、血液データとした。経門脈投与群に対しては、同一個体の門脈内へ長期間繰り返し細胞を移植することが可能なポート付カテーテルを上腸間膜静脈より肝門部付近まで挿入した。

CCDカメラにより、骨髄細胞は移植翌日より当日、正常肝より障害肝で、肝臓に有意に多く生着している事が認められた。IVISにより、移植直後の骨髄細胞は、多くが肺へ取り込まれると判明した。移植翌日は、肝障害モデルでのみ、肝内へ骨髄細胞が生着していた。

投与方法を検討した所、単回投与群では、全例投与翌日に死亡した経末梢投与群に対し、経門脈投与群は80%が犠牲まで生存した。複数回投与群では、経門脈投与群で生存日数が長期化した。コントロール群では、明らかなBridging fibrosisを認めたが、経門脈複数回骨髄投与群では、線維化の改善とアルブミン産生細胞の集団を認めた。

本研究では、骨髄細胞の肝臓への効果を評価するため、様々なimaging systemとトランスジェニックラットを用い、また、様々な方法で骨髄細胞を移植した。顕著な生存率の向上と血液データの改善は認められなかったが、経門脈経路複数回投与が有効である可能性が示され、骨髄細胞も実際に障害肝に生着している事が認められた。効果的な方法を組み合わせる事で、移植成績の向上につながると考えられる。

## 論文審査の要旨

肝移植適応でありながら移植を受けられない末期肝硬変患者に対する骨髄細胞移植が報告され、新たな治療法としての可能性が示唆されている。しかし、骨髄細胞の肝細胞への分化に関しては様々な議論がある。本研究では、骨髄細胞の生着部位の可視化と肝再生への影響を検討した結果、移植骨髄細胞の動態と線維化の改善を明らかにした。

審査ではまず、骨髄細胞の肝内および全身での生着部位が問われ、接着因子の関係が指摘された。肝内では、骨髄細胞は線維化に沿って生着するとの報告があり、線維化部位に生着した骨髄細胞によって線維化が改善されるのではないかと回答された。体表付近の細胞は検出されやすいため、肺や骨髄に多く生着しているようにみられるが、移植細胞が生着しやすい障害部位である肝臓には表示されたより多くの細胞が生着している可能性があるかと回答された。移植細胞が肺に多く取り込まれる事は、投与経路による生存率の違いに対する質問への回答にもつながった。末梢から投与した細胞が肺に生着する事が死因の一つとなる可能性があり、組織での検討で明らかになるとの考えが述べられた。また、血中アルブミン濃度の変化と、骨髄投与群と非投与群でのアルブミン染色結果の違いが問われた。骨髄投与前後で血中アルブミン濃度の変化は認められず、無アルブミンラットも僅かにアルブミンを産生するため、アルブミン染色で染まる細胞もあるが、アルブミン産生細胞の集団が認められない骨髄非投与群とは明らかに異なると説明された。アルブミン産生細胞の由来の問いに対しては、骨髄非投与群にはないアルブミン産生細胞の集団を認めるため、ドナー由来と考えたと回答された。なお、骨髄細胞が分化して肝細胞になるのか、肝細胞との融合により肝細胞化するのか、に関する議論は現在も続いており、本研究でも今後検討する必要があると回答された。臨床応用時の投与経路の選択の問いに対して、経門脈投与群で効果が得られたため、低侵襲である末梢からの投与よりも、門脈からの投与の方が治療効果を期待できると回答された。しかし、門脈カテーテルは生体肝移植血液型不適合症例等の限られた症例にしか挿入されていない事を考慮すると、経動脈投与の方が現実的であるとの考えが述べられた。再生においては移植細胞の生着部位が重要であり、臨床応用のためには長期経過観察が必要であるため、肝臓への生着細胞数の変化と血液データ・組織染色による肝再生の検討を長期間行うべきとの指摘があった。

以上、本研究は今後検討すべき点はあるものの、経門脈複数回骨髄細胞移植によって治療効果が得られた事と、imaging systemによって可能になった経時的観察で移植細胞の生着場所を明らかにした点が評価された。今後の臨床応用に寄与し得る有意義な研究であると結論づけられた。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
内科学 日比 紀文 外科学 小林 絃一  
生理学 岡野 栄之

学力確認担当者：

審査委員長：日比 紀文

試問日：平成19年1月9日

# Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 Increases Vascular Endothelial Growth Factor Expression Through Sp1 Transcription Factor in Endothelial Cells

(DDAH2 (ジメチルアルギニン-ジメチルアミノヒドロラーゼ-2) は転写因子Sp1を介して血管内皮細胞におけるVEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) の発現を亢進する)

長谷川 一 宏

## 内容の要旨

一酸化窒素合成酵素の内因性阻害物質asymmetrical dimethylarginine (ADMA) はdimethylarginine dimethylaminohydrolase1,2 (DDAH1,2) により代謝される。ADMAを代謝し、NO活性を亢進するDDAHは抗動脈硬化・降圧作用を持ち、一方で血管新生因子のvascular endothelial growth factor (VEGF) 発現を亢進し血管新生作用を持つ。ある条件においてNOはVEGF発現を惹起し、DDAHのVEGF発現亢進もNOによると推察される。しかし、DDAHによるNO亢進とVEGF誘導の関連を示した既報は無く、その機序並びに生理学的意義につき検討した。

実際の方法は培養血管内皮細胞としてBAEC (bovine aortic endothelial cells) とHUVEC (human umbilical vein endothelial cell) を使用し、DDAH1,2の発現ベクターをtransfectし、VEGFmRNA発現・蛋白濃度測定・Proliferation assay・Migration assayを施行した。さらにDDAH1,2ベクターとpromoter下流にLuciferaseを持つベクターもしくはSp1結合部位に変異を生じたVEGFベクターを共発現し、Luciferase assayを施行した。この際、NOS阻害薬前投与による活性変化も検討した。次にtransfectした細胞のnuclear extractを採取し、Sp1プローブ使用のGel shift assay・Sp1抗体を使用したウェスタンブロット・Sp1抗体とリン酸化スレオニン抗体使用の免疫沈降を施行した。

結果としてDDAH2によりVEGF mRNA (2.19±0.26倍)・蛋白発現亢進 (1.52±0.21倍) が認められ、血管内皮細胞増殖・遊走が亢進した。DDAH2によるVEGFプロモーター活性化はNOS阻害薬前投与で抑制されなかった。機序としてSp1蛋白発現亢進 (1.3±0.2倍)、Sp1スレオニン残基リン酸化亢進 (1.7±0.1倍) を介したSp1蛋白結合亢進が考えられた。PKA阻害薬投与はSp1スレオニン残基リン酸化を阻害し、VEGFプロモーター活性を低下し、Sp1siRNA投与はVEGFpromoter活性亢進を阻害した。

今回の結果が示す通りDDAH2はPKAを介しSp1蛋白スレオニン残基リン酸化を亢進し、Sp1蛋白発現も亢進する。その結果、NO非依存性にVEGFプロモーター活性・蛋白発現が亢進し、血管内皮増殖・遊走を惹起する。NOは報告例によりVEGF発現を亢進もしくは抑制する場合も有るが、本研究によりDDAH2がNOを介さずにVEGF発現を亢進させ、血管内皮の増殖、遊走を惹起する事が明らかになり、DDAH2の血管新生における意義が示唆された。

## 論文審査の要旨

NO合成酵素(NOS)の内因性阻害物質Asymmetric DimethylarginineはDDAH 1,2により代謝される。DDAH2は血管内皮細胞でVEGF発現を増加すると報告されたが、その機序は不明であった。今回、DDAH2がPKAと結合し、Sp1蛋白スレオニン残基リン酸化を惹起し、また核内Sp1蛋白発現を誘導し、NO非依存性にVEGF蛋白発現を亢進させる機序を解明した。

まず審査では本研究においてDDAH2はVEGF産生を亢進させ、DDAH1ではその作用が見られなかったが、これはマウスDDAHcDNAを組み込んだベクターをHUVEC (ヒト)、BAEC (ウシ) にtransfectionしたための生物種の差異が影響しているのではないかという討論があった。VEGF測定ELISAはウシあるいはヒトVEGFの測定が可能である事、DDAH1,2は酵素活性としては同一で、transfectionの有意性はDDAH1,2蛋白及び酵素活性の上昇を確認したと回答された。又、NOS阻害薬のL-NAME投与が無効であったことからNO非依存性のVEGF誘導機構が存在するとしているが、L-NAME投与で培養上清NO濃度が低下する事を確認する必要があるとの指摘があった。またL-NAMEによるNOS uncouplingの結果、酸化ストレスが上昇する事が実験結果に影響した可能性についても指摘があった。これに対しては過去の論文を参照し、培養血管内皮細胞上清中NO低下を来すL-NAMEの濃度を採用した事、活性酸素阻害剤を併用投与するとDDAH活性自体にも影響するため指摘された可能性の除外は難しい事が回答された。更に、DDAH2は血管内皮細胞の遊走・増殖を約1.3倍・1.4倍増殖させるに留まり、生体においてはどれだけ意義があるか、あるいは実際DDAH2により亢進したVEGFは動脈硬化を促進させるかにつき討議があった。これに対して現在DDAH2過剰発現マウスを開発し、in vivoでの解析を行なっていると回答された。今回使用した細胞の結果から、DDAH2のVEGF発現に対する効果が全身の血管内皮細胞で同様に認められるかにつき討議がされた。血管内皮ではDDAH2がDDAH1に比して発現が高いとの既報があるが、血管部位による差異を検討した既報は無く、今後の課題であると回答された。更に、PKAとDDAH2との蛋白結合がDDAH2酵素活性自体を変化させ、Sp1スレオニン残基リン酸化、Sp1蛋白発現上昇を惹起した可能性もあり、さらに詳細な分子生物学的検討が望まれるとの指摘があった。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、DDAH2のVEGF発現に対する新たな制御機構を明らかにし、今後の治療標的となる可能性を示した点において、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 伊藤 裕  
内科学 池田 康夫 病理学 岡田 保典  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者:  
審査委員長: 池田 康夫

試問日: 平成18年12月18日

# CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs

(CD24は特異的に椎間板の髄核に発現している)

藤 田 順 之

## 内容の要旨

椎間板変性は腰痛の主要な原因の一つに挙げられる。近年、分子生物学的な研究により、椎間板変性に関与する幾つかの分子が明らかにされてきたが、変性にいたる分子メカニズムは完全には解明されていない。これまで椎間板を構成する髄核と線維輪にどのような遺伝子が発現しているのかを検討している報告は少なく、それぞれの細胞を特徴づける分子マーカーの報告はまだない。本研究において、我々は椎間板変性のメカニズム解明の第一歩として髄核特異的な分子マーカーを同定することを目的に、ラット50匹を用いて髄核、線維輪と他9種類の組織と共にマイクロアレイ解析を行った。今回の解析によって得られた10490個の候補遺伝子の情報の中で、他の組織に比べて髄核に高く発現する5つの細胞表面蛋白を同定し、それらの中で、CD24が髄核に最も特異的に発現していることを見出した。CD24はGPIアンカー型の細胞表面タンパクであり、pre B cellやT cell、そして様々なガン細胞に発現し、顆粒球やBリンパ球の分化に関与しているという報告があるが、髄核におけるCD24の発現を検討している報告はまだない。我々はreal-time PCR法、フローサイトメトリー、免疫染色法を用いて髄核におけるCD24の発現を検討し、他の組織に比べてmRNAレベルとタンパクレベルで共にCD24が髄核において特異的に発現していることを確認した。CD24の髄核における発現が病理的な環境下においても維持されるか否かを検討する為、ラット椎間板ヘルニアモデルを作成した。免疫学的染色法にてCD24はヘルニアとなった髄核細胞と残存している母髄核細胞いずれにおいても発現していることが確認された。これらの事実はCD24が髄核特異的なマーカーとなりうることを示唆している。脊索腫の起源は脊索であると考えられているが、これまで特異的な分子マーカーによって比較、評価されていない。我々は脊索細胞由来である髄核細胞の特異的なマーカーとしてCD24を同定したことから脊索腫におけるCD24の発現と鑑別疾患に含まれる軟骨肉腫に対するCD24の発現を検討した。脊索腫は7例中6例にてCD24が陽性であったのに対し、軟骨肉腫7例中全例が陰性であった。これらの結果は脊索腫が脊索細胞由来であることを支持すると共に、CD24の発現解析によって脊索腫と軟骨肉腫の鑑別が可能であることを示唆している。

髄核や脊索腫におけるCD24の機能は未だ明らかではないが、今後、髄核における恒常性の維持機構や変性にいたるメカニズム、更に脊索腫の発生のメカニズムを解明する上でCD24は分子マーカーとして有用であると思われる。

## 論文審査の要旨

近年、分子生物学的な研究により、椎間板変性に関与する幾つかの分子が明らかにされてきたが、変性にいたるメカニズムは完全には解明されていない。これまで椎間板を構成する髄核と線維輪にどのような遺伝子が発現しているのかを検討している報告は少なく、それぞれの細胞を特徴づける分子マーカーの報告はまだない。本研究では、髄核に特異的な分子マーカーを同定することを目的に、ラットを用いて髄核、線維輪と他9種類の組織と共にマイクロアレイ解析を行った。今回の解析によって得られた10490個の候補遺伝子の情報の中で、他の組織に比べて髄核に高く発現する5つの細胞表面蛋白に注目し、それらの中でCD24が髄核に最も特異的に発現していることを見出した。その発現は、蛋白レベルでも髄核に特異的に発現していることを確認し、更にラット椎間板ヘルニアモデルにて、CD24がヘルニアとなった髄核細胞と残存している母髄核細胞いずれにおいても発現が保たれていることを確認した。今回、脊索細胞由来である髄核細胞の特異的なマーカーとしてCD24を同定したことから、脊索腫との鑑別が問題となる軟骨肉腫におけるCD24の発現を検討した。脊索腫では7例中6例においてCD24が陽性であったのに対し、軟骨肉腫では7例中全例が陰性であったことから、脊索腫が脊索細胞由来であることと共に、CD24が脊索腫と軟骨肉腫の鑑別マーカーとなり得ることが示唆された。

審査では、まず他の無血管性組織におけるCD24の発現の有無について質問がなされた。マイクロアレイの結果では関節軟骨や線維輪にCD24の発現はほとんど認められなかったが、水晶体において髄核と同様の高い発現を示していたと回答された。次に、髄核におけるCD24の発現制御機構について質問がなされた。少なくとも髄核細胞においては低酸素によるHIF-1 $\alpha$ がその発現制御に関与していることが確認されており、B細胞における発現制御機構とは異なる可能性があることが回答された。また、CD24の髄核における機能についての質問がなされた。CD24はGPIアンカー型の細胞表面蛋白で、細胞内ドメインを有しておらず、髄核において機能分子である可能性は低いと思われるが、CD24欠損マウスの椎間板については検討していないと回答された。さらに、CD24は種を超えて髄核に発現しているのかとの質問がなされた。マウスとラットにおいてはその発現は認められるが、ヒトの場合、げっ歯類と異なり脊索由来細胞が思春期までに消失することから、成人の髄核では認められないと回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、CD24が特異的に椎間板の髄核に発現していることを明らかにし、さらに、本分子が脊索腫と軟骨肉腫の鑑別マーカーとなりうること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

病理学 岡田 保典 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：

審査委員長：岡田 保典

試問日：平成19年1月16日

# Development of a Femtomolar-Acting Humanin Derivative Named Colivelin by Attaching Activity-Dependent Neurotrophic Factor to Its N Terminus: Characterization of Colivelin-Mediated Neuroprotection against Alzheimer's Disease-Relevant Insults In Vitro and In vivo

(最強ヒューマニン誘導体「コリベリン」の開発：ADNFとヒューマニンのハイブリッドペプチドの抗アルツハイマー病細胞死抑制作用)

山田 真 吏 奈

## 内容の要旨

アルツハイマー病（ア病）は全世界に1,000万人の有病者が存在する原因不明の神経変性疾患であり、進行性の記憶認知障害と神経脱落を主徴とする。治療法はドネペジルなど症状をわずかに改善するもののみで、根本的な治療薬開発が望まれている。我々は、ア病特異的神経細胞死に拮抗する新規の短鎖ペプチド、ヒューマニン（Humanin：HN）をア病脳後頭葉から同定した。

本研究では、HNの神経保護作用をさらに強化するため、HNの強力な誘導体であるAGA-(C8R) HNGI7のN末端にActivity-dependent neurotrophic factor (ADNF) という9アミノ酸からなるペプチドを結合させた誘導体コリベリン (Colivelin) を作成した。コリベリンは初代培養神経に対するAβ毒性に対して100fMという極めて低い濃度で神経保護作用を発揮した。また、培養神経細胞株F11においてV642I-APPを高発現した際に誘導される神経細胞死に関しても同様に100fMの濃度で作用した。この際にコリベリンの神経保護作用がCa<sup>2+</sup>/calmodulin依存性タンパクキナーゼIV (CaMK IV) およびSTAT3のドミナントネガティブ変異体を同時に発現させた際に阻害されたことから、コリベリンの神経保護作用がこの両者を介していることが示唆された。M146L-PS1の高発現による神経細胞死はADNFでは拮抗できないことが報告されているが、コリベリンはこれも100fMの濃度で拮抗した。これは、N末端側に結合したADNFによりHN部分の神経保護作用が増強されていると考えられる。その一方で、HNが有効でなくADNFが有効であると報告されているグルタミン酸の神経毒性に対するコリベリンの効果を検討したところ、100fMの濃度でこれを抑制した。この結果から、コリベリンのN末端側のADNF配列それ自身が神経保護作用を発揮するということが示唆された。

我々はさらに、コリベリンのin vivoにおける効果を検討した。この際にまずAβ脳室内反復投与モデルを用い、コリベリンの脳室内投与による治療効果を検討したところ、Aβによって誘導される記憶障害が顕著に改善された。またこの作用は同量のADNFを用いた際よりも強力であった。さらにin vivoにおける神経細胞死抑制効果を検討する為、Aβ1-42海馬内注入モデルを用いた。このモデルではAβによって海馬CA1領域の神経細胞死が誘導されるが、コリベリンを24時間前に脳室内投与することによって細胞死が完全に抑制された。また、ムスカリン型アセチルコリン受容体阻害剤3-quinuclidinyl benzilate (3-QNB) の誘導する機能的記憶障害モデルを用いてコリベリン腹腔内投与の効果を検討すると、コリベリンが用量依存性に記憶障害を改善した。これらの結果から、コリベリンは神経細胞死抑制作用を有するという点で今までに無い新規ア病治療薬シードとして非常に有望であるということが示された。

## 論文審査の要旨

アルツハイマー病（ア病）は認知症の最大の原因であり、高齢社会を背景に大きな問題となっている。治療薬としてドネペジルや抗酸化剤が臨床的に使用されているが、その効果は十分ではなく、有効な治療薬開発が望まれている。本研究では、ア病関連神経毒性に特異性の高い神経保護作用を示すHumanin (HN) と短鎖の神経保護ペプチドActivity-dependent neurotrophic factor (ADNF) に着目し、両者を結合させることによりコリベリンと名付けた新たな神経保護ペプチドを作成した。in vitroにおいてコリベリンは100fMという超低濃度でAβ依存性、非依存性神経細胞死を抑制する効果を発揮した。また、in vivoにおいても、コリベリンはAβ誘導性記憶障害抑制作用、Aβ誘導性神経細胞死抑制作用を示した。さらにコリベリンを腹腔内投与することによって、ムスカリン型アセチルコリン受容体阻害剤誘導性記憶障害が抑制されたことから、コリベリンが脳血液関門を通過して、ア病関連記憶障害に拮抗することが示唆された。以上の知見から、HN誘導体であるコリベリンが有望なア病治療薬候補であると考えられた。

審査ではまず、本研究においてア病治療薬の効果を迅速に判定するために作成した、Aβ脳室内反復投与モデルに関する質問がなされた。これに対して、このモデルは従来存在したAβを大量に脳室内投与するモデルを改良したものであり、ア病患者で想定されている脳内の可溶性Aβが増加した状態を再現したモデルであることが回答された。また、このAβ脳室内反復投与モデルにおいて大脳中核のコリン作動性神経障害が誘導されることから、特に初期のア病者の病態、記憶障害を模倣したモデルである点も併せて回答された。ついで、ア病の病理学的特徴の一つである神経原線維変化に関して、その構成成分であるタウへのコリベリンの作用について質問がなされた。この点に関しては現在のところ詳細な検討がなされていないが、重要な指摘であることが確認された。さらに、コリベリンの構成成分であるADNFが実際にコリベリンの2量体化を促進するかとの質問がなされた。これに対して、免疫沈降実験によってコリベリンがADNF部分でも結合すること、BIAcoreを用いた検討でコリベリン同士の解離定数がHN同士のそれより10<sup>3</sup>程度小さいことが回答された。コリベリンの作用機序に関しても、本研究によってSTAT3が関与することが示唆されたが、実際にどのようにその効果を発揮しているのかという質問がなされた。これに対しては、現在検討中であるが、細胞死抑制遺伝子の発現を誘導することや、記憶に関連する分子に作用することを現在検討しているとの回答がなされた。また、今後はコリベリンの副作用を早急に検討し、速やかに臨床応用へと研究を推進することが望ましいとの助言を受けた。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき点が多く残されているもの、現在有効な治療法が存在しないア病に対して有望な治療薬シーズを創成し、今後の発展により臨床応用に結びつく可能性が高い有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 解剖学 相磯 貞和  
内科学 鈴木 則宏 薬理学 安井 正人  
生理学 岡野 栄之

学力確認担当者：  
審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成19年1月16日

# Haplotype analysis of the estrogen receptor $\alpha$ gene in male genital and reproductive abnormalities.

(男児外陰部異常症および精子形成障害におけるエストロゲン受容体1型遺伝子のハプロタイプ解析)

渡 邊 昌 紀

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

近年、男児外陰部異常症や精子形成障害の増加を示す疫学的データが日本や欧米諸国から報告されている。この現象は、遺伝因子では説明できず、内分泌攪乱物質 (EEDs) を含む多くの環境因子に起因すると考えられる。特に、多くのEEDsが有するエストロゲン様効果の暴露がヒトおよび実験動物において男性機能低下を招くことから、エストロゲン様EEDsが男性機能障害の主因と推測される。このエストロゲン様EEDsの効果には、個体の遺伝的感受性が関与すると考えられる。そして、その効果が、通常エストロゲン受容体 (ER) を介して発揮されることから、ER遺伝子多型は遺伝的感受性に大きく寄与すると推測される。既に我々は、63例の日本人停留精巢 (CO) 患者を対象として、エストロゲン受容体1型遺伝子 (ESR1) 上の15個のSNPを用いてハプロタイプ解析を行い、SNP10-14で決定される同遺伝子の3'側約50kb領域に連鎖不平衡領域 (LD) が存在し、このLD内に存在するAGATAハプロタイプのホモ接合性がCO発症と強く関連することを見いだしている ( $P=0.0040$ , オッズ比 7.6)。

今回、エストロゲン様EEDsとの関連が示唆される尿道下裂 (HS) 患者43例、小陰茎 (MP) 患者70例、年齢適合小児対照群 (CB) 82例、精子形成障害 (SF) 患者80例、男性対照群 (CM) 135例において、ESR1遺伝子のハプロタイプ解析を行い、同様の成績の再現性について検討した。その結果、各々の患者群と対照群において、SNP10-14を包含するLD (連鎖不平衡係数 $|D'|$ , 0.8以上) が同定され、領域内に4つの主要ハプロタイプ (GAGCC, AGATA, GGGTA, AGGTA) が推定された。この主要ハプロタイプ頻度は、HS患者、SF患者の90%以上、MP患者、CM群の80%以上を占めた。この4つのハプロタイプのうち、AGATAハプロタイプのホモ接合体頻度は、HS患者においてCM群より顕著に高く ( $P=0.0000033$ , オッズ比 11.26)、MP患者においてCM群より軽度の高値であった ( $P=0.034$ , オッズ比 3.64)。これに一致して、AGATAハプロタイプは、劣性効果を仮定したときに、HSと密接に相関し ( $P=0.0000022$ , オッズ比 11.26)、MPと弱く相関した ( $P=0.040$ , オッズ比 3.64)。AGATAハプロタイプとSFの間には有意の関連性は認められなかった。残る3つのハプロタイプ頻度は、患者—対照群において同等であった。

以上の成績は、COのみならず、HSやMPにおいても、ESR1の特定ハプロタイプのホモ接合性が遺伝的感受性に関与することを示唆する。この特定ハプロタイプは、エストロゲン様作用効果を増強することで、アンドロゲン効果およびINSL3効果を抑制し、男児外陰部異常発症感受性を亢進させると推測される。そして、HSにおける顕著な成績は、HSが性分化臨界時期におけるアンドロゲン効果減弱を反映する表現型であることから、EEDsが性分化臨界時期を含む全妊娠経過を通じて影響することに一致する。なお、この特定ハプロタイプとSFに関連性が認められなかったことは、生殖細胞で強く発現するESR2がSFの感受性に関与することを示唆する。現在、ESR2ハプロタイプ解析を実施中である。

近年尿道下裂、停留精巢等、男児外陰部異常症や精子形成障害患者の増加を示す疫学的データが日本や欧米諸国から報告されている。原因に関して未だ明確なエビデンスは示されていないが、1つには内分泌攪乱物質 (EEDs) を含む多くの環境因子の関与が示唆されている。特にヒトおよび実験動物において、エストロゲン様効果をもつEEDsの曝露により、外陰部異常症や精子形成障害が引き起こされることがその理由である。このエストロゲン様EEDsの効果は、主に1型エストロゲン受容体 (ESR1) を介して発揮されることから、ESR1遺伝子多型が個体のエストロゲン様EEDsに対する感受性に関与し、また男児外陰部異常症や精子形成障害発症感受性に関与することが推測される。本研究は尿道下裂、ミクロペニス、精子形成障害患者及び対照群を対象にESR1遺伝子ハプロタイプ解析を行い、ESR1遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体が尿道下裂、ミクロペニスの発症と強く相関する可能性について示唆した。

審査では、第一に、抽出した疾患群、対照群における、研究結果に影響を及ぼす潜在的な偏りの有無について質問された。解析対象者に対して、問診表の記載内容の確認及び面接による十分な問診を行ったこと、また完全に網羅することは困難であるが、居住地域による特定物質の曝露の有無や、就業状況、食習慣等について十分に確認したこと、かつ人類遺伝学的には対象者間で偏りはなく、遺伝的に均質であると回答された。

第二に、解析対象数の適否について質問された。本解析で用いたアルゴリズムの性質上、解析対象数は適していると解釈しているが、今後解析対象数を増やして結果の再現性が得られるか否かにつき検証する必要があると回答された。

第三に、ESR1遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体を診断することの臨床的意義について質問された。理論上、発症リスクの高い症例のエストロゲン様EEDs曝露を可及的に回避することが疾患発症を予防する対策となる可能性があるとして回答された。

また、EEDsに関する研究はその性質上、社会的影響力が極めて大きいことが予想されるため、特にSNPs解析による疾患との相関解析結果の評価は厳格になされなければならないこと、かつ研究成果の社会への還元は極めて慎重になされなければならないとの指摘があった。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているものの、尿道下裂、ミクロペニスの発症におけるESR1遺伝子特定ハプロタイプの関連性を示した点で非常に有意義な研究であり、エストロゲン様EEDsの曝露による尿道下裂、ミクロペニスの発症機序の解明につながることを期待されると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
産婦人科学 育木 大輔 小児科学 高橋 幸雄  
分子生物学 清水 伯義  
学力確認担当者：  
審査委員長：育木 大輔

試問日：平成19年2月1日

# Role of Nitric Oxide Producing and Degrading Pathways in Coronary Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease

(慢性腎臓病における冠動脈内皮機能障害に対する一酸化窒素の合成・代謝経路の役割)

立 松 覚

## 内容の要旨

慢性腎臓病の患者において心血管イベントの発症率が非常に高いことが報告されている。一酸化窒素 (NO) の産生障害や内因性NO合成酵素阻害物質であるasymmetric dimethylarginine (ADMA) は血管内皮機能障害を引き起こすが、慢性腎臓病における冠動脈内皮機能障害についての直接的な証明は報告されておらず、その検討を行った。

雄のハイブリッド犬を片腎摘 (1/2Nx) あるいは6分の5腎摘 (5/6Nx) により慢性腎臓病モデルを作成した。モデル作成4週間後において糸球体濾過率は低下し (control; 76 (54-85), 1/2Nx; 38 (29-47), 5/6Nx; 15 (12-46) ml/min)、血漿ADMA値は上昇した (control; 1.88 (1.68-2.54), 1/2Nx; 2.51 (2.11-3.55), 5/6Nx; 3.84 (2.16-3.95)  $\mu\text{mol/L}$ )。冠動脈へのアセチルコリン投与によりコントロール群 (83 $\pm$ 17%増加) では著明な冠血流量の増加を認めたが、1/2Nx群 (34 $\pm$ 8%増加) および5/6Nx群 (20 $\pm$ 4%増加) では反応の減弱を認めた。ニトロプルシッド投与による血管拡張反応は3群間で有意な差を認めなかった。Charge-coupled device (CCD) カメラを用いて計測した心外膜側冠血管細動脈径による評価でも、アセチルコリン、ニトロプルシッドによる血管拡張反応は冠血流量の結果と同様の変化を認めた。1/2Nx群, 5/6Nx群において血漿NOx (nitrite + nitrate) 値は低下し (control; 22.1 $\pm$ 2.8, 1/2Nx; 13.4 $\pm$ 0.9, 5/6Nx; 10.6 $\pm$ 2.4  $\mu\text{mol/L}$ )、ADMAの分解酵素であるdimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)-IIおよび内皮型NO合成酵素 (eNOS) のmRNA発現も低下した。また蛍光免疫組織染色によりDDAH, eNOSの蛋白発現についても同様の変化が確認された。更に4週間のall-trans retinoic acid (atRA) の投与により慢性腎臓病モデルにおいて障害された内皮依存性血管拡張反応は回復し、eNOSの発現がコントロールのレベルまで改善した。ただしatRAはDDAHの発現に関しては影響を与えなかった。

冠動脈内皮機能は慢性腎臓病の早期の段階においてすでに障害されていた。その機能障害はeNOS, DDAH-IIの発現低下が関与していると考えられた。さらに慢性腎臓病における冠動脈内皮機能障害の予防に対して、NO代謝の制御が有効であることが推察された。

## 論文審査の要旨

慢性腎臓病においては、心血管疾患の発症率が高いことが知られている。本研究では部分腎摘犬を用いて、慢性腎臓病の早期の段階において冠動脈硬化の前段階である冠動脈内皮機能障害が起こることを証明した。その原因として冠動脈におけるNOS3発現の低下およびdimethylarginine dimethylaminohydrolase発現低下に起因するasymmetric dimethyl arginine (ADMA) の上昇が関与する可能性を明らかにした。さらにall-trans retinoic acid (atRA) がNOS3発現を回復し、冠動脈内皮機能障害が改善することを示した。

審査においては、まず慢性腎臓病に伴う心血管疾患の発症においては冠動脈の太い領域での病変が問題になるが、申請者の方法では冠動脈の細い領域の血管反応性を検討していると考えられるため不適切ではないかとの指摘があった。それに対して、長期になれば太い血管も障害されると推論されること、NOS3やDDAHの遺伝子発現の検討では左前下行枝の太い血管を用いているため、臨床的な問題と結びつけることができる回答された。更にatRA投与時のCCDカメラのデータがあれば、超音波プローブで測定した冠血流量の結果と相違があった場合、atRAが冠動脈のどの領域に効果を示したかを類推することができたため、検討すべきであったことを指摘された。次に血中ADMA値上昇の機序について質問された。それに対して、本研究に加えて部分腎摘犬で腎臓のDDAH-IIが低下しているという報告や部分腎摘ラットにおいて肝臓および腎臓のprotein arginine N-methyltransferase (PRMT) 発現が増加、DDAH発現が低下しているという報告があり、種々の臓器におけるADMAの産生亢進、分解抑制が血中ADMA上昇の原因として考えられると回答された。また慢性腎臓病に伴う異化亢進によりADMA分子の解離が亢進することも一因と考えられるが、ADMAの腎臓からの排泄低下はあまり関与していないと回答された。その回答に対し、肝臓はメチルアルギニンの大きな供給源と考えられ、各臓器におけるADMA組織濃度を測定することが望ましいとの指摘を受けた。また部分腎摘により腎臓でメチル化が亢進する機序として、残存腎への血流が増加してshear stressが上昇し、ストレス応答の結果メチル化が亢進する可能性も考えられるとの指摘があった。本研究結果をどのように臨床に結びつけるのかとの質問があり、腎臓病が早期の段階ですでに冠動脈に内皮機能障害が生じていることを認識し、その段階からできる限り危険因子を除去し、DDAHを誘導するPPAR $\gamma$ リガンド等の使用を検討するなどの対策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を残しているものの、慢性腎臓病の早期の段階において冠動脈内皮機能障害が起こり、さらにその分子メカニズムを明らかにしたことは臨床的にも意義深く、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 伊藤 裕  
医化学 末松 誠 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平

学力確認担当者:

審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成19年2月13日

# Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis

(マウス卵の減数分裂時および有糸分裂時におけるヒストンアセチル化ならびに核蛋白BRD4の細胞内局在)

長 島 隆

## 内容の要旨

アセチル化ヒストンH3/H4 (Ac-H3/H4) は、そのパターンにより結合する転写因子が異なるため、転写因子の認識コードと考えられている。有糸分裂(体細胞分裂)時には、ヒストンの低アセチル化状態により転写因子が染色体から遊離することで、グローバルな転写抑制が起きる。ただし、一部の転写因子や染色体関連蛋白は、分裂時においても染色体上に留まり、細胞の基本的な情報と記憶 (cell memory) を次世代の細胞へ伝達すると考えられている。一方、卵のH3/H4は減数分裂時では全て脱アセチル化されており、卵から全分化能を有する細胞へ転換する際のリプログラミング (cell memoryの消去) に、脱アセチル化が深く関与することを示唆する。しかし、有糸分裂時にヒストンアセチル化依存性に染色体に結合する一部の蛋白が、減数分裂時においてどのような振る舞いをするかについては未だよく知られていない。

染色体結合蛋白のひとつであるプロモドメイン蛋白BRD4は、ヒストンアセチル化依存性にクロマチンに結合するとともに、有糸分裂時においても低アセチル化ヒストンとの結合を通じて染色体上に留まるユニークな核蛋白である。本研究では、マウス卵の減数分裂時におけるヒストンのアセチル化状態とBRD4の振る舞いを調べることにより、卵のリプログラミング機構とBRD4の役割の一端を明らかにすることを目的とした。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるtrichostatin A (TSA) の存在下および非存在下で、NIH3T3細胞に対し蛍光免疫染色を行った。その結果、TSAによりH3/H4は強アセチル化されるとともに、BRD4の有糸分裂染色体への共局在が増強した。さらにドキシサイクリン誘導性にEGFP-BRD4を強発現する細胞株を用いて経時的に観察したところ、EGFP-BRD4は有糸分裂染色体との強い共局在を認めた。次に、卵におけるBRD4の局在を同様に解析したところ、有糸分裂時とは異なり減数分裂時では細胞質に一樣に分布し、TSAによる強アセチル化状態でも変化しなかった。さらにEGFPとBRD4-EGFPのmRNAをGV期卵にmicroinjectionした後に培養することで、卵成熟におけるBRD4の局在を解析した。その結果、BRD4-EGFPは蛍光免疫染色の結果と同様の分布を示したが、強発現に加えTSAによる強アセチル化状態で初めて減数分裂染色体と共局在した。

以上より、減数分裂時におけるBRD4の染色体への局在は、H3/H4のアセチル化状態のみに規定されるものではないと考えられた。強アセチル化状態に加え強発現により初めて減数分裂染色体へ結合したことから、体細胞とは異なり、マウス卵は、染色体関連蛋白を能動的にAc-H3/H4から遊離させるメカニズムを有することが示唆された。

## 論文審査の要旨

近年、エピジェネティックな転写制御と遺伝子発現調節が注目されているが、そのなかでヒストンのアセチル化と脱アセチル化が重要であることが明らかになってきている。本研究は、アセチル化ヒストンH3/H4と、その結合モジュールを有するBRD4との相互作用をもとに、卵におけるリプログラミングへの関与が示唆されている減数分裂特異的ヒストン脱アセチル化の生物学的意義を、BRD4の細胞内分布と共に検討した。その結果、有糸分裂時とは異なり減数分裂時では、ヒストンのアセチル化状態によらずBRD4は染色体と共局在しなかったため、ヒストンのアセチル化がBRD4の染色体への局在を決定づける唯一のものではないことが判明した。また、ヒストンの強アセチル化に加え、BRD4の過剰発現により初めてBRD4が減数分裂染色体と共局在したことから、未知のBRD4結合因子やBRD4の翻訳後修飾によって、BRD4と減数分裂染色体との相互作用が妨害されている可能性が示唆された。よって、減数分裂時では、ヒストンの脱アセチル化に加え、BRD4などの染色体結合因子を染色体から遊離させるメカニズムが存在し、分化した未受精卵から全能性を有する初期胚へと細胞転換するための遺伝子リプログラミング (cell memoryの消去) に寄与していると考えられた。

審査ではまず、卵と初期胚に関する研究であるのに、なぜ既に報告されている有糸分裂の実験が必要であったのかとの質問があり、ヒストンH3/H4のアセチル化レベルならびにBRD4の細胞内分布を、体細胞と卵および初期胚で比較検討するために必要であったと回答された。次に、Western blotによるEGFP-BRD4を発現する体細胞の確認実験で、EGFP-BRD4とBRD4のバンドが重なって見えるのはなぜかとの質問には、EGFP-BRD4は巨大な蛋白であり、ポリアクリルアミド濃度の薄いゲルを用いた電気泳動でも、BRD4との分離が難しかったと回答された。アセチル化リジン残基を認識する抗体の特異性は確認したのかとの質問には、ペプチド吸収試験によって確認したと回答された。さらに、なぜアセチル化ヒストンとBRD4の多重染色を行わなかったのかとの質問には、同じ動物種由来の抗体であるため、行うことができなかったと回答された。また、蛍光強度の差を客観的に評価できるのかとの質問には、同じ条件下で撮影したため比較検討は可能であると回答された。次に、BRD4は本当に卵の細胞質に存在するのかとの質問には、Western blotにて存在を確認したと回答された。最後に、今後の方向性とこの知見は生殖医学にどのような意味があるのかとの質問には、cell memoryへの関与が示唆されている染色体結合因子の染色体遊離メカニズムを明らかにすることで、全能性獲得と細胞系譜特異的プログラム伝達を担う機構の解明を通じて、ヒト配偶子および胚を扱う生殖補助医療の発展に貢献する可能性があるかと回答された。

以上、本研究は今後解明されるべき課題が残っているものの、減数分裂時における染色体結合因子の染色体遊離に関する新たな知見を示した点で、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  
産婦人科学 青木 大輔 小児科学 高橋 孝雄  
発生・分化生物学 須田 年生  
学術確認担当者:

審査委員長: 青木 大輔

試問日: 平成19年2月15日



# Specific Expression of Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$ in the Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma and its Application to Cytological Diagnosis

(卵巣明細胞腺癌におけるHepatocyte Nuclear Factor-1 $\beta$ の特異的発現と細胞診断への応用)

東 口 敦 司

## 内容の要旨

卵巣癌の代表的組織型である明細胞腺癌では、他の組織型と異なり早期であっても予後不良であることが知られており、腹水中への癌細胞の出現は卵巣癌の予後不良因子の一つとなっていることから、その診断的意義は重大である。これまでに、我々の研究グループはDNA microarrayを用いて明細胞腺癌におけるhepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ ) の組織型特異的発現を示してきた。本研究では、卵巣癌手術検体におけるHNF-1 $\beta$ の発現を検索し、さらに細胞診標本を用いてHNF-1 $\beta$ が明細胞腺癌の細胞診断マーカーとして応用可能であるかを検討した。

まず、定量PCR法および免疫組織化学的手法により卵巣癌手術検体55例におけるHNF-1 $\beta$ の発現を検索した。mRNAおよびタンパク発現の両者について、HNF-1 $\beta$ は非明細胞腺癌（漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌）と比較して明細胞腺癌において有意に高発現していた ( $P < 0.05$ )。また、パラフィン包埋切片におけるHNF-1 $\beta$ の発現は主として明細胞腺癌細胞の核内に均一に認められ、類内膜腺癌細胞にわずかに発現が認められたほかには背景に見られる間質細胞や非明細胞腺癌細胞にはほとんど認められなかった。

次に、パバニコロウ染色によって陽性と判定された腹水細胞診標本60例におけるHNF-1 $\beta$ の発現を免疫細胞化学的に検索した。細胞診標本におけるHNF-1 $\beta$ の発現はパラフィン包埋切片と同様に主として明細胞腺癌細胞の核内に均一に認められ、明細胞腺癌以外の腺癌細胞にはほとんど認められなかった ( $P < 0.05$ )。同一症例における組織標本と細胞診標本の抗HNF-1 $\beta$ 抗体反応性は相関していた。統計学的に解析したところ、細胞診標本においても、HNF-1 $\beta$ は非明細胞腺癌に比べ明細胞腺癌において有意に高発現していたことが明らかとなった ( $P < 0.05$ )。抗HNF-1 $\beta$ 抗体を用いた免疫細胞化学的手法による明細胞腺癌検出の感度および特異度はそれぞれ0.955、0.921であった。

一方、反応性中皮細胞は時として癌細胞との鑑別が困難である。そこで、上述の手法によって明細胞腺癌細胞と反応性中皮細胞との鑑別が可能であるか否かを検討するため、卵巣明細胞腺癌由来培養細胞株RMG-1と培養中皮細胞とを混合して作製した細胞診標本と、卵巣明細胞腺癌症例から臨床的に採取された陽性腹水細胞診標本に対し、抗HNF-1 $\beta$ 抗体および中皮細胞に特異的なモノクローナル抗体HBME-1を用いた二重染色を施行した。その結果、抗HNF-1 $\beta$ 抗体は明細胞腺癌細胞の核のみに陽性となりHBME-1反応陽性となる中皮細胞には全く反応しなかったことから、抗HNF-1 $\beta$ 抗体によって明細胞腺癌細胞と中皮細胞は鑑別可能であった。

本研究の所見から、HNF-1 $\beta$ は明細胞腺癌に組織型特異的に高発現していることが明らかとなった。その発現は腹水中に出現した明細胞腺癌細胞でも維持され、非明細胞腺癌細胞ばかりでなく中皮細胞との鑑別にも有用であることから、HNF-1 $\beta$ は明細胞腺癌の細胞診断マーカーとして応用可能であることが明らかとなった。

## 論文審査の要旨

婦人科悪性腫瘍の中でも最も予後不良な卵巣癌の中のうち、明細胞腺癌は抗がん剤に抵抗性であるため早期であっても予後不良である。その一方で、早期の卵巣癌では腹水中への癌細胞の出現は予後不良因子の一つであることから、卵巣癌、殊に明細胞腺癌症例における腹水細胞診の診断的意義は重大である。しかしながら、腹水中の癌細胞は変性が加わることがあるため通常パバニコロウ染色による組織型診断は困難な場合がある。さらに、腹水細胞診標本によく見られる反応性中皮細胞はその腫大した核やクロマチンの不整分布などの所見から癌細胞と誤認されやすい。こうした背景の中、DNAマイクロアレイを用いて、卵巣癌の中でも明細胞腺癌細胞株において高発現することが明らかにされた転写因子であるhepatocyte nuclear factor-1 beta (HNF-1 $\beta$ ) が、明細胞腺癌に組織型特異的に高発現し、細胞診断マーカーとしても応用可能であることを本研究において明らかにした。

審査では、明細胞腺癌の中でもHNF-1 $\beta$ の発現量に差があることについての考察が求められた。現時点における検討では、HNF-1 $\beta$ の発現量はグリコーゲンの発現量および予後との相関が認められ、明細胞腺癌の分化の指標となりうるとの考察が示された。続いて、明細胞腺癌のほかに類内膜腺癌でもわずかながらHNF-1 $\beta$ の発現が認められる理由について質問がなされた。両者とも子宮内膜症との合併が比較的高頻度に認められ、それぞれ子宮内膜症からの発癌の可能性が示唆されており、類似した性質を保持している可能性があることが説明された。さらに、明細胞腺癌において、HNF-1 $\beta$ が組織型特異的に高発現するメカニズムについての説明が求められたことに対し、現在そのメカニズムは明らかにされていないが、CGHによって明細胞腺癌には組織型特異的にHNF-1 $\beta$ が座位する遺伝子座周辺領域における増幅が見出されたものの、実際にHNF-1 $\beta$ をコードする領域も増幅しているか否かについては現在検討中であると回答された。最後に、HNF-1 $\beta$ を細胞診断マーカーとして臨床へ応用するにあたり、前方視的な研究が必要であるとの助言がなされ、今後の課題とされた。

以上のように、本研究はさらに検討すべき点を残しているものの、HNF-1 $\beta$ が明細胞腺癌において組織型特異的に高発現し、腹水細胞診における組織型診断マーカーとして応用可能であることを示したことから、卵巣癌の診断・治療に有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 青木 大輔  
産婦人科学 吉村 泰典 病理学 岡田 保典  
先端医科学 河上 裕  
学力確認担当者：  
審査委員長：吉村 泰典

試問日：平成19年1月11日

# Flow-Independent Myocardial Ischemia Induced by Endothelin-1

## An NADH Fluorescence Analysis

(エンドセリン-1による冠血流非依存性心筋虚血の検討：NADH蛍光による解析)

井上 宗信

### 内容の要旨

エンドセリン-1 (ET-1) は血管内皮由来の最も強力な血管収縮ペプチドで、虚血性心疾患における病態生理学的役割が高いと推察されているが未だ充分には解明されていない。比較的少量のET-1を冠動脈内投与した際には、軽度の血流減少に見合わない心電図ST上昇と心尖部の収縮障害を示し、従来の標準的な心筋虚血基準では説明できない現象であることがin vivoモデルで示されていた。さらにET-1受容体拮抗薬が局所心筋血流に関係なく心筋梗塞サイズを減じる知見も考慮すると、内因性ET-1には血流非依存性的心筋虚血誘発作用が存在することが推察された。本研究ではET-1の冠動脈内投与による血流分布の変化からどのような心筋虚血が発現するかを明らかにするために、心筋虚血の指標として心断面NADH蛍光を適応することで従来は検出できなかった心筋虚血を高感度で検出し定量化した。

雑種成犬22頭に対して全身麻酔開胸により左鎖骨下動脈左前下行枝バイパスを作成した。冠狭窄あるいはET-1冠動脈内持続投与 (10-150pmol/min) により冠血流を軽度 (20-40%) 減少させ虚血発現を比較検討した。虚血の指標として心電図ST、冠動脈入口部血流、心筋組織血流 (非放射線マイクロスフェア法)、特別に開発された拍動心高速切断圧迫凍結法を用いた心断面NADH蛍光写真による心筋虚血領域の分析および心筋組織代謝の化学分析を行い心筋虚血の心筋壁内分布を検討した。

ET-1群では冠狭窄群と比較して血流減少が同等でも心表面ST上昇が大きく、NADH蛍光領域 (心筋虚血領域) が大きく、心内膜下優位でなく貫壁性虚血を呈し、NADH値増加およびNAD/NADH比低下で示される高度の嫌気性代謝を示した。古典的な虚血指標であるATPあるいはcreatine phosphateに変化はなかった。また心外膜下優位に冠血管抵抗を増加させNADH蛍光を増大させた。拡大蛍光写真ではより小さな虚血巣を微小循環に生じた (61 $\mu$ m vs. 76 $\mu$ m)。

冠狭窄と比較してET-1群では冠血流減少と心筋虚血の進行とが明らかに解離していることを示した。つまりET-1が心筋細胞に対して血流非依存性の直接の催虚血作用をin vivoで有することが示された。本研究では催虚血作用の直接の原因機序は不明であるが、心筋細胞への直接作用として細胞内カルシウム増加やNa-H交換の活性化、心筋ミトコンドリア機能障害の誘発、血中ノルエピネフリンとの相乗作用などが心筋細胞の酸素需要を増大させる可能性が示唆された。また心外膜下細動脈をより選択的に収縮して貫壁性に心筋虚血を進展しST上昇の原因となることが示された。冠狭窄と比較してより小さな虚血巣を微小循環に生じたが、末梢の細動脈レベルでの冠微小循環がET-1に影響を受けることを示唆した。

### 論文審査の要旨

エンドセリン-1 (ET-1) は血管内皮由来の最も強力な血管収縮ペプチドで、心筋への直接作用も報告された。本研究はET-1の冠血流に依存しない虚血増悪作用の特徴を、高感度な虚血指標である拍動心高速切断圧迫凍結法による心断面NADH蛍光法を用いることで心筋全層にわたって検討し得た初めての報告である。実験犬には左前下行枝バイパスを作製し、ET-1冠動脈内投与あるいは冠狭窄により冠血流を軽度 (20-40%) 減少させ、ET-1による薬物的虚血を機械的狭窄と比較して様々な虚血指標を検討した。ET-1群は冠狭窄群より心筋組織血流減少が同等でも心電図上のST偏位の程度が約10倍増強し、NADH蛍光領域 (心筋虚血領域) が4倍大きく、心内膜下優位でなく貫壁性虚血を呈し、NADH値増加で示される高度の嫌気性代謝を示したが、乳酸、ATPあるいはcreatine phosphateに変化なかった。心外膜下優位に冠血管抵抗を増加させ、微小虚血巣を生じた (短径61 $\mu$ m vs. 76 $\mu$ m)。この結果、ET-1の血流非依存性催虚血作用がin vivoにて示された。また心外膜下細動脈を収縮して貫壁性的心筋虚血とST上昇の一因となった。小さな微小虚血巣の存在は、冠微小循環がET-1に影響されることを示した。

審査では、まずNADH蛍光増大で示される虚血について質問がなされた。血流減少が少なくNADH増大を示す代謝状態は、心筋酸素消費増大あるいはミトコンドリアの酸素利用低下により結果として心筋収縮不全を示す状態であり、これは虚血と判断されると回答された。しかし、NADH増大の機序は今後の研究課題とされた。また心拍200/分のペーシング下で行われた実験条件について質問がなされた。予備実験のコントロール標本では虚血のないことを確認したと回答された。また血流測定法について質問され非放射線マイクロスフェアを用いた蛍光測定法を用い、15 $\mu$ より末梢の冠微小循環を精度高く示すことを回答した。ET-1による生理的冠血流調節とカテコラミンについて質問がなされた。冠血流調節は主として冠溜流圧と左室圧で規定され、ET-1による血管収縮や神経性調節の関与は少なく、カテコラミンとの共役作用なども種差や濃度による働きの違いがあり十分解明されていない部分であると回答された。最後に、本研究の臨床的な意義について質問がなされた。急性心筋梗塞でno-reflow現象を生じると血中ET-1濃度が高く予後も不良と報告され、こうした末梢の細動脈血流不全と著明なST上昇機序の1つにET-1が関与する可能性もあると回答された。

以上のように、本研究には更なる検討課題を残しているものの、ET-1による血流非依存性心筋虚血の増悪を証明した有意義な基礎研究であると評価され、世界的にも稀有な高感度の代謝固定法を用いた研究が今後も期待された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 医化学 末松 誠  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：四津 良平

試問日：平成19年1月31日

# Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles

(ヒト肝細胞特異的ナノ粒子を用いた肝腫瘍に対する遺伝子治療)

岩 崎 靖 士

## 内容の要旨

遺伝子治療は肝細胞癌 (HCC) に対する新たな治療法として期待され、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) とガンシクロビル (GCV) を用いた自殺遺伝子法 (HSV-tk/GCVシステム) もその一つである。しかし、治療遺伝子が標的細胞以外の細胞で発現した場合に予期せぬ副作用を起こす可能性があるため、治療遺伝子が正しくその効果を発揮するためには、遺伝子を標的細胞へ特異的に送達するベクターが望まれる。肝細胞特異的ナノ粒子 (HBsAgLナノ粒子) の表面には、B型肝炎ウィルスが肝細胞に感染する際に必要なヒト肝細胞レセプターを含むpre-S1領域が提示されており、かつウィルスゲノムが完全に排除されている。前報でこのLナノ粒子がマウスモデルにおいてヒト肝細胞を特異的に認識することを報告した。本研究では、Lナノ粒子を治療遺伝子のベクターとして用い、肝腫瘍に対するHSV-tk/GCVシステムの抗腫瘍効果をラットモデルで検討することを目的とした。

遺伝子組換え酵母*Saccharomyces cerevisiae* AH22Rより分離精製したHBsAgLナノ粒子を遺伝子ベクターとして用いた。GFP発現プラスミドおよびHSV-tkプラスミド、それぞれ20 $\mu$ gをLナノ粒子100 $\mu$ gと混合し、エレクトロポレーション法にて封入した。F344/Nヌードラット皮下にヒト肝腫瘍培養細胞株NuE、ヒト大腸癌培養細胞株WiDrを移植した。GFP発現実験ではGFPプラスミド封入Lナノ粒子をラットに静注後7日目に皮下腫瘍、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、腸管、骨格筋を摘出し、樹脂固定後、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡にて各組織のGFP発光の有無を比較検討した。自殺遺伝子治療実験では腫瘍移植日よりラットに持続的にGCVを投与し、腫瘍移植日から5日目にHSV-tk封入Lナノ粒子を静注した。粒子静注後2、4、7日目に腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果を検討した。

GFP発現実験で摘出した皮下腫瘍 (NuE、WiDr)、肝臓、脾臓、腎臓の大きさと重量をコントロール群と比較したところ各組織の大きさ、重量には差は認められなかった。GFP発光はNuE腫瘍のみに認められ、PBSを静注したコントロール群ではNuE腫瘍を含まない組織も発光を認めなかった。自殺遺伝子治療実験では、HSV-tk封入Lナノ粒子静注群のNuE腫瘍の成長がコントロール群に比べ有意に抑制された一方、WiDr腫瘍の成長は粒子静注群と、コントロール群で差が認められなかった。

以上の結果よりLナノ粒子がヒト肝細胞を特異的に認識し、ヒト肝腫瘍に対して安全な治療遺伝子ベクターになりうる可能性が示された。

## 論文審査の要旨

本研究では、従来より報告してきた、遺伝子治療のベクターとしてヒト肝細胞特異的Lナノ粒子の生体に対する安全性、ならびに、HSV-tkを導入したLナノ粒子を作製し、ヒト肝腫瘍株の皮下移植ラットモデルにてヒト肝腫瘍に対するGCVの抗腫瘍効果を実験的に明らかにした。

審査ではまず、酵母から産生されるLナノ粒子中の酵母由来のタンパク質の混入に対する安全性の確認がなされた。酵母の全可溶性タンパク質の約40%がLナノ粒子のタンパク質を構成しており、そのタンパク質の安全性は、同様の産生過程をとっているB型肝炎ワクチンがすでに市販されていることから高い安全性を確保していると考えられると回答された。続いてLナノ粒子のヒト肝細胞への結合様式に対する質問がなされた。ヒト肝細胞への特異的結合部位は粒子のpreS1領域に存在することまで明らかになっている一方で、その結合様式についてはまだ完全に解明されておらず、今後の検討課題とされた。HSV-tk/GCVシステムのbystander effectによる腫瘍組織周囲の正常肝細胞への影響や、未分化肝癌に対する本ベクターの認識能についての質問がなされたが、このLナノ粒子には正常肝組織と癌組織を判別する能力はなく、腫瘍への特異性を向上させるためにはAFP等の腫瘍組織に特異的なプロモーターを導入する必要があると回答された。リポソームやアデノウィルス等の遺伝子導入ベクターとの比較において、遺伝子導入効率の高さ、導入できる遺伝子の大きさが、最大40kbまで確認されている点、ウィルスDNAを含まず、生体に対する安全性の高さ、そしてヒト肝組織に対する高い特異性や、preS1領域の変更による組織再標的化が可能という点で、現状で存在する遺伝子ベクターに対する有利点が示された。一方で、治療ベクターとして生体に用いた際には大量かつ複数回の投与を必要とされるため、宿主に対する免疫原性の克服が重要であると指摘された。B型肝炎ワクチン接種者の中に生じるHBVエスケープ変異体を今後Lナノ粒子に導入する予定であり、実験を行っているとは回答された。

また今回はヒト肝腫瘍に対する治療効果の検討をしたが、非腫瘍性疾患に対する臨床応用の可能性について質問された。血友病等の単一遺伝子欠損症に対する遺伝子補充療法や、インターフェロン遺伝子を導入した、マラリア、肝炎、肝硬変治療に応用が期待されると回答されたが、腫瘍移植モデルではなく、ヒト正常肝組織を移植した動物実験モデルでの検討が必要であるとの助言がなされた。

以上のように、本研究は今後、粒子構造のヒト肝細胞に対する親和性についての詳細な検討や、免疫原性の克服など検討されるべき課題を残しているものの、肝疾患に対する新しい治療遺伝子ベクターになりうる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 外科学 北島 政樹  
内科学 日比 紀文 先端医科学 河上 裕  
分子生物学 清水 信義  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成18年12月26日

# Divergent roles of superoxide and nitric oxide in reduced-size liver ischemia and reperfusion injury: Implications for partial liver transplantation

(肝部分虚血・再灌流障害における活性酸素・一酸化窒素が有する多面性  
：部分肝移植との相関について)

浦上 秀次郎

## 内容の要旨

肝移植は劇症肝不全や末期慢性肝疾患に対する有効な治療法であるが、ドナー臓器不足問題は深刻である。グラフト肝のviabilityはグラフト容量と冷保存時間に依存していることが臨床経験から指摘されているが、その病態生理は不明な点が多い。

肝温虚血・再灌流障害モデルにおける肝障害に活性酸素、炎症性サイトカインなどが関与し、またsuperoxide dismutase (SOD)、eNOSなどがこれらの抑制に寄与していることが知られているが、部分肝移植と虚血・再灌流障害により引き起こされる肝障害や機能不全の機序の相同性は明らかではない。

本報ではグラフト容量と冷保存時間がグラフト肝機能・生存に与える影響を評価し、虚血・再灌流障害モデルで得られた活性酸素・一酸化窒素の知見を基に、部分肝移植モデルにおける病態生理の類似性、相違性について検討した。

Lewis系雄性ラットを用いて30%、40%、50%部分肝グラフトモデルを作成し、2、4、6時間冷保存後に肝移植を行い、生存を観察した。別に各群を肝移植24時間後に屠殺し、血液・グラフト肝を採取し、肝機能・炎症性サイトカイン、肝組織を評価した。別に各群で7日間生存例を屠殺し、肝再生率を検討した。

6時間冷保存30%グラフト群にpolycationic form SOD fusion protein (MnSOD2/3)、 $\alpha$ -lipoic acid (LA)、S-nitrosoglutathione (GSNO)、補体のC5a receptor (C5aR) antagonistを用い、各々冷保存液中に添加ならびにドナー・レシピエントに投与し、生存を観察した。

4、6時間冷保存した30%グラフト群の生存率は各々50%、25%であったが、その他の群は全例生存した。40%以上のグラフト群は6時間冷保存でも全例生存しており、40%以上がfeasibleなグラフト容量であると考えられた。ALT、T-Bilは、グラフト容量・冷保存時間依存性に高値であった。IL-6、TNF- $\alpha$ は6時間冷保存の30%グラフト群において極めて高値であった。肝組織像は、4、6時間冷保存した30%グラフト群でのみ壊死性変化が見られた。移植7日後の肝再生は6時間冷保存の30%グラフト群においてのみ著しく傷害されていた。以上より、グラフト容量と冷保存時間がグラフトのviabilityとレシピエントの生存の重要な規定因子であることが示された。

長時間冷保存の過小グラフト肝移植においては、antioxidants、NO donor、C5aR antagonistの投与はグラフトのviability、レシピエントの生存率改善に寄与しなかった。これより、部分肝移植モデルでのグラフト肝機能障害の病態生理は、虚血・再灌流障害モデルに観察された結果と異なり、活性酸素・一酸化窒素の関与機序が異なる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

肝虚血・再灌流障害、冷保存障害の機序・メカニズムなどに関する実験研究はこれまで多くの研究者により報告されているが、その病態生理には依然として不明な点が多い。移植医療を含んだ肝臓外科の術後成績の向上のためにも、肝虚血・再灌流障害の詳細なメカニズムの解明は急務である。我々は、マウス肝部分温虚血・再灌流モデルならびに肝切除を伴う温虚血・再灌流モデルにおいて得られた知見をもとに、冷保存を伴うラット部分肝移植モデルを確立し、生存率・肝機能を系統的に評価した。また、これらのモデルにおける活性酸素・一酸化窒素の関与に関しても併せて検討した。

審査では、まず抗酸化物質として実験に使用されたMnSOD2/3の特性に関して質問がなされた。これに対し、同物質は比較的半減期の長いmitochondrial MnSOD (SOD2)に、血管内皮細胞表面への結合能力が極めて高いextracellular SOD (SOD3)のC末端部を遺伝子導入することにより得られたfusion protein SODであり、その半減期は30時間と極めて長く、より強力に、より長時間その抗酸化効果を期待できるものであると回答された。次に、6時間冷保存を伴う30%グラフト肝移植モデルにおいて観察された肝実質細胞の空胞変性や細胞質褪色などの壊死性変化が肝小葉内において特異な分布が認められたか否かの質問がなされ、一定の傾向は認められなかったこと、他家の報告と比較して本報の所見は組織障害が軽微であったことが回答された。また、抗酸化物質の一つとして薬酸を用いた理由について質問がなされ、老化抑制を見るための経口投与モデルとは異なり、腹腔内投与により細胞内グルタチオン濃度を上昇させ、その抗酸化作用を期待したと回答された。ラット肝切除の具体的な方法についての質問がなされ、右側中葉(30%)、中葉(40%)、中葉+右葉(50%)を基準にしてモデルを作成したと回答された。また、マウス肝温虚血再灌流モデルにおいて認められた抗酸化物質ならびに補体阻害剤投与による肝障害抑制効果がラット部分肝移植モデルにおいて認められなかった理由についての質問がなされた。これに対し、各薬剤の投与量・投与方法はマウスを用いた自験結果ならびにラット隔離肝灌流モデルによる他研究者からの報告を参考に実験がなされたが、マウスとラットの種差による影響、温虚血と冷虚血による病態機序の相違の可能性などが示唆され、薬剤の投与量・方法、時期を含めて今後更に解析・検討が必要であると回答された。最後に、冷保存を伴う微小グラフト肝移植モデルにおいては、糖代謝・脂質代謝の変化、さらに増殖因子の関与の可能性が指摘され、今後の検討課題であると回答された。

以上のように、本研究は今後更に検討すべき課題を残しているものの、冷保存を伴う部分肝移植グラフトモデルを確立し、その術後機能を系統的に評価した点、また将来的に生体肝移植におけるsmall-for-size graftの病態解明にむけて有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
医化学 末松 誠 内科学 日比 紀文  
解剖学 相磯 貞和  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 末松 誠

試問日:平成19年1月24日

# Alterations of p53, cyclinD1 and RB expression in the carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma

(食道癌癌化過程におけるp53, cyclinD1, RB遺伝子異常の解析)

川久保 博文

## 内容の要旨

近年の内視鏡的食道粘膜切除の発展に伴い食道癌の治療成績は向上している。現在我々は食道癌早期発見を目的に上部内視鏡検査時に食道ヨード染色を施行している。本論文では炎症、dysplasia、carcinoma in situを含む食道ヨード不染帯におけるKi67標識率、p53、cyclinD1、pRB遺伝子異常を調べ、食道癌の癌化過程においてそれらの遺伝子異常の重要性を検討した。また、食道癌は食道全体を発生母地とした多中心性の発癌が考えられている。癌に併存したdysplasia病変の増殖能と遺伝子異常を解析し、多中心性発癌の危険性について検討した。1996年から2000年の慶応義塾大学病院における食道ヨード不染帯からの内視鏡生検材料105検体を用い、ki67発現およびp53、cyclinD1、pRB遺伝子異常を免疫組織学的に解析した。組織診断の内訳は、炎症31病変、mild dysplasia 29病変、moderate dysplasia 10病変、severe dysplasia 10病変、carcinoma in situ 25病変で、正常食道上皮から採取した15検体をコントロールとした。Ki67標識率の平均値は正常上皮が3.8%、炎症が11.6%と比較し、dysplasia 19.6%、carcinoma 32.5%と癌化過程に従い上昇した。p53、cyclin D1、pRBの発現頻度はmild dysplasiaがそれぞれ31%、0%、52%、moderate dysplasiaが40%、0%、70%、severe dysplasiaが40%、20%、70%、carcinomaが48%、32%、80%であった。p53異常の頻度は正常上皮や炎症と比較しmild dysplasiaで有意に上昇した ( $p=0.016, 0.005$ )。一方cyclin D1とpRB異常の頻度はcarcinomaで有意に上昇したことからp53異常は癌化過程のearly eventであり、cyclin D1とpRB異常はlate eventと考えられた。それぞれの遺伝子発現と増殖能の比較では、食道腫瘍性病変 (dysplasia, carcinoma) におけるKi67標識率の平均値はp53陽性で32.4%、陰性で18.5%、cyclinD1陽性で34.6%、陰性で22.3%、pRB陽性で29.7%、陰性で12.6%といずれも陽性において陰性と比較し有意にKi67標識率が上昇していた ( $p=0.003, 0.030, <0.0001$ )。p53、cyclinD1、pRB異常は食道腫瘍性病変において増殖能と関連を認めた。癌を併存したdysplasia 24例のKi67標識率とp53遺伝子異常は27.0%、50%、癌を併存していないdysplasia 25例は12.5%、20%であった。癌を併存したdysplasiaはKi67標識率およびp53遺伝子異常の頻度が有意に高く ( $p=0.0005, 0.027$ )、癌化の高危険群と考えられた。以上により食道癌の発癌過程においてKi67標識率、p53、cyclin D1、pRB遺伝子異常は重要であり、dysplasiaにおけるこれらの遺伝子異常は癌化の危険性が高いことが示唆された。さらに癌を併存したdysplasiaは増殖能が高くp53遺伝子異常の頻度が高いことから多中心性発癌の危険性が高いと考えられた。

## 論文審査の要旨

近年、食道表在癌に対する内視鏡診断は急速に進歩している。早期食道癌の診断を目的にヨード染色が普及しているが、ヨード不染帯症例のなかには内視鏡的に腫瘍性変化を示すが異型度の低いdysplasiaと診断されるものもある。さらに前癌病変であるdysplasiaの組織診断は病理医の間でも診断基準が異なることもあり、より客観的な指標が求められている。本研究は食道ヨード不染帯症例の内視鏡生検材料を用い、ki67標識率を増殖能の指標として、またp53、cyclinD1、RBの発現異常を遺伝子異常の指標として免疫組織学的に検討した。p53異常はmild dysplasiaの31%の症例で認められ癌化過程の早期に、cyclinD1異常はsevere dysplasiaではじめて認められることより癌化過程の晩期に起こることを証明し、それらの指標の重要性を示した。さらに癌に併存したdysplasiaと癌に併存していないdysplasiaとを比較し、前者は増殖能が高くp53異常の頻度が高いことから多中心性発癌の危険性が高いことを証明した。

審査では、まずdysplasiaの概念、定義についての質問がなされた。本研究では腫瘍性で異型を有するが癌とは診断しえないものを前癌病変であるdysplasiaと定義し、その異型度によってmild, moderate, severeと分類した。Dysplasiaをより客観的に評価する指標が必要であり、遺伝子異常が指標となると考え本研究を施行したと回答した。形態学的変化と遺伝子異常を比較している研究なので、形態変化をさらに詳細に定義すべきという助言があった。次にp53やcyclinD1の免疫染色は10%以上染色された場合を陽性としているが、免疫染色陽性の症例で遺伝子異常を有していることは確認したかという質問がなされた。これに対してp53の免疫染色に関しては、使用した抗体は遺伝子異常を有するp53蛋白に特異性がないが、遺伝子異常を有していると蛋白の半減期が長くなることから免疫染色陽性のものは遺伝子異常を有するとの報告もある。しかし、本研究においては遺伝子レベルの検討は施行していない。また、cyclinD1に関しては進行癌の切除検体においてDNAの過剰増幅を有する症例が免疫染色陽性となることを実際に確認していると回答した。さらに本研究の質をあげるためには生検材料において蛋白レベルの検討のみならず遺伝子異常の検討も併せて行う必要であることが指摘された。次に、mild dysplasiaにおいてp53蛋白の発現異常を示しているが、p53陽性のdysplasiaは実際に癌に進展していくのかとの質問がなされた。今回の研究でp53陽性のmild dysplasiaのうち、5年後に癌となり治療された症例を1例認めたと回答した。遺伝子異常を認めるdysplasiaが前癌病変であることを証明するためにはdysplasiaを経過観察し、経時的な遺伝子異常の有無と組織学的な変化を詳細に観察する必要があると助言された。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、食道ヨード不染帯における内視鏡生検材料を用いてその組織学的変化とp53、cyclinD1、RBの発現異常を比較し、それらの発現異常が前癌病変の新しい指標となる可能性を証明した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
内科学 日比 紀文 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  
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成18年12月28日

# Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist Candesartan as an Angiogenic Inhibitor in a Xenograft Model of Bladder Cancer

(膀胱癌異種移植片モデルにおける血管新生阻害薬としての  
アンギオテンシンII 1型受容体拮抗薬カンデサルタン)

小 杉 道 男

## 内容の要旨

アンギオテンシンII 1型受容体(AT1R)拮抗薬は、いくつかの癌で抗腫瘍効果を持つことが報告されているが、その作用機序については未だ不明な点が多い。本研究ではAT1R拮抗薬の一つであるカンデサルタンの膀胱癌に対する抗腫瘍効果について検討した。

膀胱癌細胞株KU-19-19、T24、BC47、MBT-2と膀胱癌手術時に得られた臨床検体52例を使用した。はじめにAT1R発現をフローサイトメトリーと免疫染色で検討した。次にKU-19-19細胞をカンデサルタンとともに培養し、細胞毒性の有無をアラマーブルー法で検討し、培養上清におけるG-CSF、IL-8、VEGFなどのサイトカインをELISA法で測定した。そしてヌードマウスを用いたKU-19-19膀胱癌異種移植片モデルにおいてカンデサルタンの経口投与を行ない、その抗腫瘍効果、血管新生、VEGF分泌、アポトーシスへ与える影響について検討した。

KU-19-19の細胞と腫瘍組織におけるAT1Rの発現を確認した。受容体は主に腫瘍の細胞質と微小血管の上皮細胞で観察された。さらに他の膀胱癌細胞株T24、BC47、MBT-2の細胞においても同様に発現が確認され、臨床検体では52人中17人(32.7%)の組織に発現がみられた。カンデサルタンの細胞毒性の検討では、投与期間や濃度によってもKU-19-19細胞の生存率とその増殖に影響を与えなかった。サイトカインの検討においては、KU-19-19細胞に対するアンギオテンシンII投与により、濃度依存性でVEGF、IL-8、G-CSFの分泌増加が認められ、アンギオテンシンII存在下でカンデサルタンが投与された場合、VEGFとIL-8の分泌は $2.6 \pm 0.3$ 、 $6.6 \pm 0.5 \text{ pg}/10^3 \text{ cells}$ であり、コントロール( $3.2 \pm 0.4$ 、 $7.9 \pm 0.7 \text{ pg}/10^3 \text{ cells}$ )に比し有意な抑制が認められた。KU-19-19膀胱癌異種移植片モデルにおいて、コントロール群に対しカンデサルタン2mg投与群で35.4%、10mg投与群では33.5%の腫瘍縮小を認めた。カンデサルタン治療群の微小血管密度はコントロール群に比して有意に低値を示した。腫瘍組織のVEGFの免疫染色においても、カンデサルタン治療群のVEGFの発現がコントロール群に比して有意に抑制されていた。アポトーシスを検討したところ両群のアポトーシス指数に有意差は認められなかった。

膀胱癌細胞株におけるAT1R拮抗薬投与によりVEGFやIL-8などの血管新生因子の分泌抑制を介した血管新生阻害による腫瘍の増殖抑制が示され、膀胱癌に対する新しい治療薬として、AT1R拮抗薬の抗腫瘍効果が期待された。

## 論文審査の要旨

本研究ではアンギオテンシンII 1型受容体(AT1R)拮抗薬の一つであるカンデサルタンの膀胱癌に対する抗腫瘍効果について検討され、4種の膀胱癌由来細胞株や膀胱癌臨床検体でのAT1R発現を証明するとともに、KU-19-19を用いた膀胱癌異種移植片モデルにおいて、カンデサルタン投与によるVEGF分泌抑制を介した血管新生阻害とその抗腫瘍効果が示された。

審査ではまずAT1RとAT2Rの発現と抗腫瘍効果について質問された。AT1Rは各種膀胱癌細胞株において発現に差を認めたものの、本研究ではAT1R・AT2Rの発現の差とAT1R拮抗薬の抗腫瘍効果の差については検討されていないと回答され、各種癌におけるアンギオテンシンIIのレセプター発現の差がAT1R拮抗薬の抗腫瘍効果に影響を与える可能性について議論された。またAT1Rの局在について質問があり、腫瘍の細胞質や細胞膜、宿主の間質細胞や血管内皮細胞などに存在すると回答された。次にAT1R拮抗薬の抗腫瘍効果の機序について質問され、それに関連して腫瘍細胞のVEGF染色について質問がなされた。AT1R拮抗薬による抗腫瘍効果は、KU-19-19細胞に対する効果により発揮されるのか、腫瘍が移植されたマウスのマクロファージや血管内皮などに対する効果によって発揮されるのか、VEGF発現や血管新生の実験とともに議論された。本研究ではその詳細な機序を追及する実験は行われていなかったが、免疫組織染色において、マウスの間質細胞、マクロファージ、内皮細胞でのVEGF発現がカンデサルタン投与により抑制されていることから、腫瘍細胞に対する直接的な効果だけでなく腫瘍細胞を移植されたマウス側においても抗腫瘍効果を発揮されている可能性について議論された。次にAT1R拮抗薬の投与量について質問され、本研究では2つの投与量で実験されより少ない量でも十分抗腫瘍効果がみられていたと回答されたが、臨床応用するうえでは薬剤の血中濃度の検討も重要であると指摘された。最後に抗腫瘍効果の強さについての質問があり、単独治療ではその効果が十分強力なものではない可能性を指摘された。そのことに関して、追加実験で既に行なわれていたカンデサルタンと各種抗腫瘍薬の併用治療による強力な抗腫瘍効果が示され、実際の臨床応用においては各種抗腫瘍薬との併用治療なども視野に入れる必要がある旨回答された。

以上のように本研究ではいくつかの検討課題を残しているものの、膀胱癌細胞株や臨床検体においてAT1Rの発現を確認し、AT1R拮抗薬であるカンデサルタンが膀胱癌に対し抗腫瘍効果を持っているというはじめての報告であり、既に降圧薬として広く使用されているカンデサルタンが膀胱癌治療において現実的な臨床応用が期待されることを示した点で、有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
病理学 坂元 亨宇 先端医科学 河上 裕  
内科学 伊藤 裕  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 坂元 亨宇

試問日: 平成18年12月28日

# RENAL CANCER CELLS LACKING HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)-1 $\alpha$ EXPRESSION MAINTAIN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION THROUGH HIF-2 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ が欠損した腎癌細胞株ではHIF-2 $\alpha$ によりVEGFの発現が維持される)

篠 島 利 明

## 内容の要旨

腎細胞癌においてはvon Hippel-Lindau (VHL) 腫瘍抑制遺伝子の不活化を頻りに認める。VHL蛋白はユビキチンリガーゼとしての機能を有し、正常酸素濃度化ではHypoxia inducible factor (HIF) の分解を行う。VHLの不活化によりHIFは恒常的に活性化され、vascular endothelial growth factor (VEGF) を誘導している。このことが腎細胞癌における特徴的な血管増生の主要なメカニズムと考えられる。本研究ではヒト腎癌細胞株における、VHL遺伝子の変異、HIFのサブタイプであるHIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ の発現、VEGFの産生を検討した。

9種のヒト腎癌細胞株からDNA、mRNAの抽出を行った。VHL遺伝子変異に関してダイレクトシーケンス法、メチル化特異的PCR法で検索した。各HIFサブタイプmRNAの発現をRT-PCR法、ノーザンブロット法で検討した。またバイサルファイシーケンス法によりHIF-1 $\alpha$ 遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析を行った。HIF蛋白の発現は、細胞株を正常酸素、低酸素(1%O<sub>2</sub>、6時間)条件下に培養しウェスタンブロット法にて比較した。HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ をそれぞれターゲットとしたsiRNAを用いて発現のノックダウンを行った。VEGFの発現は培養上清中の濃度をELISA法により測定した。

4つの腎癌細胞株にVHL遺伝子の変異、プロモーター領域のメチル化を認めた。これらの細胞株ではHIF-1 $\alpha$  mRNAの3'末端の欠損や、mRNA発現量が極めて低いことなどにより、HIF-1 $\alpha$ 蛋白の発現が認められなかった。VHL変異を認めない5株では4株に低酸素刺激により増強されるHIF-1 $\alpha$ 蛋白の発現を認めたが、1株では欠損していた。HIF-1 $\alpha$ 遺伝子のメチル化解析では各細胞株間でプロモーター領域のメチル化の頻度に大きな差を認めず、mRNAの発現量を調節している因子としてトランスエレメントの関与が示唆された。HIF-2 $\alpha$ 蛋白の発現は8株で明らかであったが、VHL変異を有する1株でmRNA低発現によりHIF-2 $\alpha$ 蛋白が欠損していた。siRNAによるHIFサブタイプの特異的なノックダウンにより、HIF-1 $\alpha$ の発現が欠損している細胞株ではHIF-2 $\alpha$ が、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ がともに発現している細胞株ではHIF-1 $\alpha$ が、それぞれVEGFの発現に強く関与していることが示された。以上から腎細胞癌においてVHL/HIF pathwayを利用した治療戦略を計画する場合、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ の両者が分子標的として重要である可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

Hypoxia inducible factor (HIF) はvon Hippel-Lindau (VHL) 蛋白を介した翻訳後制御により低酸素状態で活性化される転写因子であり、血管内皮増殖因子(VEGF)の産生を誘導する。本研究では9種のヒト腎癌(RCC)細胞株の解析をおこない、HIF-1 $\alpha$ の発現欠損が多くの細胞株で見られることを明らかにした。またsiRNAを用いたHIF $\alpha$ サブタイプの特異的なノックダウンにより、HIF-1 $\alpha$ の発現が欠損している細胞株ではHIF-2 $\alpha$ が、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ がともに発現している細胞株ではHIF-1 $\alpha$ が、それぞれVEGFの発現に強く関与していることを明らかにした。

審査では、まずVHL遺伝子変異に関してヘテロ接合性の喪失(LOH)の解析、VHL蛋白発現の検討がなされていない点について指摘があり、LOHによりVHL mRNAの発現量に変化が生じる可能性、またwild-typeでもVHL不活化が起きる可能性が問われた。それに対し、VHL蛋白はmonomerで働くため、1つのアレルの不活性化のみでは機能を失わないとされているが、発現量が異なる可能性はあること、またウェスタンブロットによる蛋白発現の検討は至適な抗体がなく困難であったとの回答がされた。臨床検体でのVHL遺伝子変異、メチル化の頻度の具体的な数字に関して、さらに今回VHL遺伝子変異を有する細胞株で、HIF-1 $\alpha$ 発現がすべて欠損していた事実は、臨床的に合致するか否かの質問がなされた。散発性淡明細胞型RCCではVHL変異、メチル化の頻度はそれぞれ50-70%、5-10%であるが、VHLが不活である場合のHIF-1 $\alpha$ の発現は70-80%とする報告があり合致しないとの回答がされ、その理由の考察を求められた。それに対し細胞内のHIF-1 $\alpha$ の恒常的な発現がp53の安定化やBnip3の転写といったpro-apoptoticな因子の誘導に関わることであり、株として樹立される際にselectionがかかっている可能性があるとの回答がされた。またsiRNAを用いる際には複数の配列を用いて同じ結果を示すことが必要であること、各細胞株を皮下移植した場合の腫瘍組織内発現の検討も重要であることが指摘された。さらにHIF $\alpha$ サブタイプの転写選択性にかかわるメカニズム、HIF $\alpha$ の分子標的治療の可能性に関して考察が求められ、今回の結果を今後発展させてゆく重要性が返答された。

以上のように本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、腎細胞癌におけるVEGFの誘導にHIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ の両者が関与していることを明確に示した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 亨字  
先端医科学 河上 裕  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成19年1月16日

# 統合失調症慢性期症例に対する薬物療法の最適化

鈴木 健文

## 内容の要旨

統合失調症治療に関して、有用性を示唆するエビデンスはほとんどないにもかかわらず、我が国では抗精神病薬多種併用・大量療法が経験的に汎用されてきた。我々はこうした治療法が漫然と継続されている現状を問題視し、主に従来型抗精神病薬により治療されていた慢性期の症例を対象として、抗精神病薬多種併用療法から単剤治療への移行、向精神薬の複数回投与から就寝前一回投与への移行と用量削減、および、抗精神病薬大量療法に対する総用量の削減を行った。

その結果、47例の対象において、抗精神病薬多種併用療法から単剤による単剤治療へ移行することにより、不変24例、改善、悪化は各10例であり（評価不能3例）、社会機能と疾患重症度で示される病状に大きな変化を認めなかったものの、平均抗精神病薬剤数は3.0剤から1.4剤へと有意に削減された。また、50例を対象として向精神薬を就寝前一回投与へ移行することにより、11例が改善し、29例が不変であり、7例が悪化した（評価不能3例）。平均向精神薬剤数は4.0剤から3.2剤へと有意に削減され、抗精神病薬剤量も有意に削減されたと同時に、多くのケースにおいて簡素化された処方に対する好印象が得られた。更に、41例においてクロルプロマジン換算平均抗精神病薬剤量を1984mgから812mgまで削減したところ、23例は改善し、13例は不変であり、5例が悪化し、社会機能と疾患重症度で示される対象の病状に有意な改善を認めた。

大量療法の用量削減は病状の改善をもたらし、それゆえ積極的検討に値する治療法であること、また、併用療法は多くの場合単剤治療に移行できること、更には服用回数を就寝前一回投与へ変更することにより、多くの場合有用性に乏しい薬剤の削減が可能であると同時に、自覚的な好印象がもたらされることが判明した。

加えて後方視的ながら、多種併用・大量療法から、近年汎用されてきている第二世代抗精神病薬治療への移行が著効した25症例を確認した。我々の研究結果は、経験的に汎用されている抗精神病薬多種併用・大量療法を通常的に行うことを支持しない。我が国における統合失調症薬物療法の特殊な事情を鑑み、そうした治療法が選択されている症例に関しては、全ての症例でその妥当性が検証されるべきであろう。同時に、今後は急性期治療の最適化により、そうした特異的な治療法が再評価される必要があると考える。

## 論文審査の要旨

我が国の統合失調症治療においてはエビデンスに乏しい抗精神病薬の多剤併用・大量療法が多く行われている。本研究は慢性期例を対象とし、抗精神病薬の単剤化、単回投与、減量などの可否につき多面的、臨床的に検討したものである。単剤化研究では、主剤単剤への移行により47例中、不変24、改善、悪化は各10、評価不能3例で、症状の有意な変化を認めず、平均薬剤数を3.0から1.4へ有意に削減しえた。単回投与研究では、就寝前1回投与へ変更した50例中、改善11、不変29、悪化7、評価不能3例で、平均薬剤数、平均薬剤量も有意に削減された。また減量研究においては、41例でクロルプロマジン換算平均薬剤量を1984mgから812mgまで削減し、改善23、不変13、悪化5例で、病状に有意な改善を認めた。加えて多剤併用・大量療法から第二世代抗精神病薬治療への移行が有効であった25症例の後方視的検討（スイッチング研究）も行った。結論として、統合失調症の慢性期治療における、抗精神病薬の単剤化、単回投与、減量、第二世代抗精神病薬（リスペリドン、オランザピン等）への切り替えの有効性が確認された。

審査においては、まず我が国において従来型抗精神病薬の多剤併用・大量療法が多い理由につき質問がなされた。我が国には薬物治療ガイドラインがなく、低力価薬と高力価薬が経験的に併用され、単剤治療の有効性に関するエビデンスも不十分であり、また社会文化的な要因の関与も推測されると回答された。総薬剤量の指標としてクロルプロマジン換算値を用いているが、個々の薬剤の特性を考慮し薬剤別にも検討すべきではとの質問があり、それに対し従来型抗精神病薬はドパミンD<sub>2</sub>受容体遮断を共通の作用機序と考えクロルプロマジン換算で検討されているが、単剤化研究の成功群で総薬剤量が削減しえたことは、各薬剤の特性の相違を示唆しており、今後は薬剤別の検討も行いたいと回答された。また研究により診断基準がICD-10とDSM-IVと異なることにつき問われたが、両者は類似した基準で大きな相違はないと回答された。さらに症状や副作用に関し評価尺度を用いていない点につき指摘があり、単回投与研究以外では臨床的に症状、副作用を評価したと説明され、今後の研究では複数の評価尺度を用いたいと回答された。また単剤化、単回投与、減量による症状の改善ないし悪化の予測に関し質問があり、症例数が少なく、薬剤別の評価、疾患の下位分類などの検討も不十分であり、今後検討したいと答えられた。さらに本研究では、単剤化、単回投与、減量の結果が専ら臨床的に評価されているが、今後は血中濃度やPETなどを用い末梢と中枢での薬物動態を検討することで、より客観的な資料が得られるのではとの示唆がなされた。

本研究は今後検討すべき課題はあるものの、統合失調症治療における抗精神病薬の単剤化、単回投与、減量の有効性を確認した点で、臨床的にきわめて意義ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 精神神経科学 鹿島 晴雄  
薬剤学 谷川原祐介 内科学 鈴木 則宏  
薬理学 安井 正人  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：谷川原祐介

試問日：平成18年12月13日



# Polisialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells (グリオーマ細胞の浸潤におけるポリシアル酸の促進的役割について)

鈴木 雅 美

## 内容の要旨

糖鎖抗原は細胞認識分子として機能することが知られており、わずかな糖鎖構造の変化が腫瘍の接着、転移、浸潤能に多大な影響を及ぼす。特に細胞接着に重要な役割を果たす糖鎖構造としてシアル酸を末端に有する構造が注目されている。ポリシアル酸 (PSA) は、神経細胞接着分子 (NCAM) の接着能を制御することにより、神経細胞の突起伸長を促していると考えられている。PSAが結合したNCAMは、神経上皮細胞が神経細胞に分化し突起を伸ばし始める胎生期の脳に多く認められるが、成人においても神経細胞が増殖、発生している嗅球、梨状皮質、海馬などには認められることがわかっており、NCAMにPSAを発現することが、神経細胞の突起の動きを促し、さらにその分化を促していると考えられる。またPSAは、悪性腫瘍では小細胞性肺癌、多発性骨髄腫等の腫瘍細胞の増殖に関与することが報告されているが、最も多く認められる脳腫瘍であるgliomaではPSAの発現が腫瘍にどのような影響を及ぼすかは明らかにされていない。

そこでまずgliomaの手術検体にPSA修飾されたNCAMに対する抗体を用いて免疫組織化学を施行し、PSAの染色強度を検討した。各種gliomaの中でも臨床的に悪性度が高いastrocytomaでPSAが最も多く認められ、さらに、術後再発した症例にPSAが多く発現していることも明らかにした。次に、2種類のポリシアル酸転移酵素 (ST8Sia II, ST8Sia IV) の発現ベクターをglioma細胞株のC6細胞にトランスフェクションし、フローサイトメトリーにて分類し、コントロール細胞であるC6-mock細胞およびPSAを強制発現させたC6-ST8Sia IIとC6-ST8Sia IV細胞を確立した。これらの細胞の腫瘍増殖速度について、*in vitro*で差が認められないことを確認し、PSAの*in vivo*での作用を検討する目的で、C57B6マウスにstereotactic injectionを用い、各種細胞を脳内の被殻に同所性移植し、数週間後に形成された腫瘍の浸潤形態を比較検討した。その結果C6-mock細胞と比し、C6-ST8Sia II、C6-ST8Sia IV細胞ではともに対側脳への浸潤の基盤と考えられる脳梁への強い浸潤を認めた。一方、NCAMノックアウトマウスに同様の同所性移植を行ったところ、PSAの発現の有無にかかわらずglioma細胞は脳梁に浸潤していることがわかった。

以上の結果より、PSAはglioma細胞の浸潤能を促し、NCAM分子間の結合にはPSAを介した腫瘍の浸潤抑制効果が働くことが示唆された。今後はPSA発現を示す他臓器の腫瘍におけるPSAの役割等生体内でのPSAの役割を糖鎖生物学的手法を用いて検討し、細胞接着に対するPSAを含めたシアル酸修飾による生物学的役割を解明することが必要と考えられる。

## 論文審査の要旨

生物学的に大きな役割を持つ糖鎖の一つとして、neural cell adhesion molecule (NCAM) の糖鎖修飾をするポリシアル酸 (PSA) が考えられる。PSAは小細胞性肺癌等で腫瘍細胞の増殖に関与していることが報告されているが、グリオーマにおいてPSAの影響は明らかにされていない。本研究では、ヒト手術検体における免疫組織化学等や*in vivo*脳内浸潤モデルを用い、gliomaにおけるPSAの影響を検討した。PSAはdiffuse astrocytoma等腫瘍の浸潤によって予後不良と考えられる症例に多く発現していた。PSAを発現したST8SialII, ST8SialIV細胞では脳梁への浸潤を認めたが、コントロール細胞では認められなかった。一方、NCAMノックアウトマウスでは、PSAの発現の有無に関わらず脳梁への浸潤が認められた。

審査では、まず各細胞間で増殖速度に差がなくても形態等に違いがあるのではないかと質問がなされた。培養細胞では特に差は認められなかったが、脳梁に浸潤しているST8SialII, ST8SialIV細胞では、腫瘍がより突起を伸ばした形態になっていたと回答がなされた。次にポリシアル酸の長さにより、機能は変わるのかという質問がなされた。高等動物ほどより多くのシアル酸を発現し、陰性荷電がより強く、またPSAがらせん状の構造となっかきざることにより、その働きが強くなっていると回答された。続いて、ST8SialII, ST8SialIVの役割分担はあるのかという質問に対し、ST8SialIIは胎生期の脳や成熟マウスの精巣に発現し、成人では発現が減少する。一方、ST8SialIVは、心臓や肺に発現が認められ、成人になっても発現に変化がない。以上より、時間的、空間的にそれぞれの酵素が機能しており、ST8SialII, ST8SialIVはそれぞれ独立してPSAを作るが、協同しても働いていると回答された。また、ST8SialII, ST8SialIV細胞のクローン間での差が認められるのではないかとという質問に対し、数種のクローンで実験を試み同様の結果が得られたことを報告した。最後に、ヒト手術検体における検討で予後不良であるglioblastomaではPSAの発現は低く、予後との関連がないのではないかと質問がなされた。diffuse astrocytomaに多く認められ腫瘍の浸潤様式に関連する可能性が示唆されるのではないかと回答された。また、WHO分類のdiffuse astrocytomaの中には浸潤様式がdiffuse typeとbulky typeのもの含まれており、それらを分けて検討するとより明らかになるのではないかと指摘があった。

以上のように、本研究では更に検討されるべき課題を残しているが、初めてPSAがグリオーマの浸潤に関与していることを明らかにした点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
外科学 河瀬 斌 産婦人科学 青木 大輔  
病理学 坂元 亨宇  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：河瀬 斌

試問日：平成19年1月29日

# Orthostatic Decrease in Cardiac Chaos During the Head-up Tilt Test in Patients With Vasovagal Syncope

(血管迷走神経性失神患者における傾斜負荷時の心カオスの減少)

鈴木 昌

## 内容の要旨

失神は頻度の高い症候で、その原因は多岐にわたる。最も頻度の高い原因は、失神の中でも予後良好な血管迷走神経性失神 (VVS) と考えられている。VVSの診断は病歴や器質的疾患の否定と、傾斜台試験における血管迷走神経反射の誘発に基づく。しかし、傾斜台試験の感度は40~60%と報告されており、偽陰性が多い。このため、傾斜負荷時の自律神経機能の検出が心拍変動解析によって行なわれてきたが、明らかな特徴を見出すには至っていない。そもそも、心拍のゆらぎは多数の因子が相互に影響しあった決定論的カオスを含む複雑系であり、従来の心拍変動解析が定常系における解析を前提としているため評価が困難な系である。そこで、本研究では決定論的カオス理論に基づいた検出を試みた。対象はVVS患者26名 (患者群) と年齢および性別の一致した健常対象者14名 (健常群) の計40人であり、傾斜角80度で最大30分間の傾斜負荷を行った。患者群26人中13人は血管迷走神経反射が傾斜負荷によって誘発され、陽性 (陽性群) であったが、残り13人は誘発されず陰性 (陰性群) であった。また、健常群はすべて陰性であった。傾斜台試験では心電図モニターを行い、RR間隔を記録した。カオスの出現はリアプノフ指数  $> 0$  で示されるので、200心拍分のRR間隔を用いて、リアプノフ指数を連続的に算出し、リアプノフ指数  $> 0$  となる頻度を心カオスと定義した。仰臥位5分間と傾斜負荷開始2分後から5分間の心カオスと従来の心拍変動指標であるLF (low frequency)、HF (High frequency)、LF/HFおよびSDNN (RR間隔の標準偏差) を比較した。陽性群、陰性群、および健常群の3群において、仰臥位と傾斜負荷時のLF、HF、LF/HF、およびSDNNに群間差を認めなかったが、心カオスは3群間に差を認めた。健常群では傾斜負荷による心カオスの変化は認められなかったが、VVS患者では陽性群ならびに陰性群ともに傾斜負荷によって心カオスが有意に減少した。また、陽性群と陰性群間には差を認めなかった。傾斜負荷による心カオスの減少は傾斜台試験の結果に依存せず、失神群に特異的であることが示された。傾斜負荷時の心カオスをROC曲線を用いて検討すると、カットオフ値0.36で感度92%、特異度96%の精度でVVSの診断が可能であることが明らかになった。以上の検討から、傾斜負荷時に観察された心拍変動における心カオスの減少がVVS患者に特異的であることが明らかになった。VVSは重力負荷に対する耐性の低下が病態に関与すると考えられるので、心拍変動のカオス性は重力負荷に対する適応に寄与している可能性が考えられた。

## 論文審査の要旨

失神は救急外来において頻度の高い症候である。失神の原因別分類では、迷走神経反射が原因の血管迷走神経性失神 (Vasovagal syncope: VVS) の頻度が最も高く、診断は病歴、器質的疾患の否定、および傾斜台試験 (Head-up tilt test: HUT) におけるVVS誘発によって行なわれる。病態には立位耐性の低下が関与していると考えられてきたが、心拍変動解析でその病態を明らかにすることは従来できなかった。本研究はVVS患者の心拍変動を決定論的カオス理論に基づいて解析し、HUT時にカオス性が減少することを初めて示した。

審査では、カオスの概念についてまず質問された。カオスは乱雑に見えるがノイズとは異なる複雑なゆらぎであり、自然界に広く認められている現象で、健常者では認められるが病的状態では低下するとの複数の報告が既に行なわれており、このゆらぎが生体の恒常性維持に有用と考えられていることが述べられた。本研究で観察されたVVS患者におけるカオス性の低下は立位耐性の低下を示唆し、カオスの持つ不安定なゆらぎが環境変化に対する適応を容易にしている可能性が考えられるので、立位耐性の機序の一端を説明しようとの見解が述べられた。

次に、VVSにおける自律神経機能の評価方法に関して質問された。HUT以外の検査としてはSchellong testを施行しており、その陽性率は20%以上であるが、Valsalva法などの他の自律神経機能検査は今回の対象患者に施行していないことが説明された。また、交感神経の評価に関しては、HUT時の心拍変動のLF/HF (低周波成分と高周波成分の比) が上昇しており、交感神経機能は亢進していることが説明された。

カオス性の検出方法に関しては、心電図記録における200個のRR間隔を一組として連続的にカオス性を算出したことに対する妥当性の説明が求められた。先行研究において、25~1,000個のRR間隔のうち、200個を用いることがROC曲線の曲線下面積から最も妥当であったことが説明された。

最後に、対象患者群の患者背景とVVSの診断根拠についての説明が求められた。患者はVVS以外の器質的疾患や12誘導心電図の異常を認めない若年者であること、一過性意識障害の原因診断は欧米の診療指針で示されるとおり、病歴と傾斜台試験によって行なったことが説明された。しかし、VVS診断のgold-standardは存在しないため、本研究対象の患者群におけるVVS診断の妥当性がstudy limitationであると指摘された。

本論文では、上記のようなstudy limitationはあるものの、心拍変動の解析において、従来は医学的検討に用いられることが稀であった決定論的カオス理論を応用した斬新な着想と、HUT時のカオス性減少がVVSの診断に有用であるとの新知見が評価された。

論文審査担当者 主査 救急医学 相川 直樹  
内科学 小川 聡 内科学 鈴木 則宏  
外科学 四津 良平  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 小川 聡

試問日: 平成18年12月12日

# Propagation of Ca<sup>2+</sup> release in cardiac myocytes: Role of mitochondria

(心筋細胞における細胞内Ca<sup>2+</sup>の伝播について：ミトコンドリアの役割)

瀬口 秀孝

## 内容の要旨

心筋細胞の収縮は、Ca<sup>2+</sup>チャネルからのCa<sup>2+</sup>流入により起こる筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出、Ca<sup>2+</sup> induced Ca<sup>2+</sup> releaseによる細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇により起こることから知られている。L型Ca<sup>2+</sup>チャネルから流入したCa<sup>2+</sup>はL型Ca<sup>2+</sup>チャネル近傍にあるごく少数のリアノジン受容体を刺激し局所での筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出が生じる (local control)。Ca<sup>2+</sup>過負荷のない正常の心室筋細胞では、生理的条件下で、このCa<sup>2+</sup>放出が隣接する部位でのCa<sup>2+</sup>放出を引き起こすことはない。このlocal controlに影響を与える要因としては心筋細胞におけるCa<sup>2+</sup>取り込み、放出、バッファー効果等が考えられているが、詳細は明らかではない。本研究では、心筋細胞内におけるCa<sup>2+</sup>放出のlocal controlに影響を与える因子についての検討を行った。Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素 fluo-3を用い、マウスの心筋細胞、心室筋細胞の局所に10mMカフェインを500ms作用させ、局所のCa<sup>2+</sup>放出を誘発し、細胞内Ca<sup>2+</sup>の動態について観察した。生理的条件下で、この局所のCa<sup>2+</sup>放出は、心筋細胞では次々と隣接する部位のCa<sup>2+</sup>放出を誘発し、あたかも波のごとく細胞内を伝播した。この現象は心室筋細胞では認められなかった。

この差異は①リアノジン受容体の密度、Ca<sup>2+</sup>感受性、②細胞内Ca<sup>2+</sup>の筋小胞体への再取り込み及びNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系によるCa<sup>2+</sup>の細胞外への排泄、または③細胞内でのCa<sup>2+</sup>に対する緩衝効果によると考えられる。心室筋細胞で、主な細胞内Ca<sup>2+</sup>低下機序である筋小胞体のCa<sup>2+</sup>取り込みとNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系によるCa<sup>2+</sup>の細胞外への排泄を抑制しても細胞内のCa<sup>2+</sup>伝播は生じなかった。リアノジン受容体とミオフィラメントの細胞内密度は、心筋筋と心室筋では同程度であったが、ミトコンドリアの細胞内密度は心筋筋より心室筋で大であった。ミトコンドリアのuniporterを介したCa<sup>2+</sup>取り込みを部分的に抑制すると、ペーシングにより得られた心室筋細胞のCa<sup>2+</sup> transientは増加し、細胞内のCa<sup>2+</sup>伝播が認められた。この現象は筋小胞体のCa<sup>2+</sup>量の変化に依存しなかった。これらのことから、ミトコンドリアのuniporterを介したCa<sup>2+</sup>取り込みが局所における筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出の制御に関与していると考えられた。また、心筋細胞で細胞内Ca<sup>2+</sup>の伝播がみられるのは、ミトコンドリアの細胞内密度が心室筋細胞より低いことが一因であると考えられた。

## 論文審査の要旨

心筋細胞の収縮は、calcium-induced calcium release (CICR) による細胞内カルシウム濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の上昇により起こる。L型Ca<sup>2+</sup>チャネルから流入したCa<sup>2+</sup>によりチャネル近傍にあるごく少数のリアノジン受容体 (RyR) からのCa<sup>2+</sup>放出が生じる。Ca<sup>2+</sup>過負荷のない正常の心室筋細胞では、このCa<sup>2+</sup>放出は隣接する部位のCa<sup>2+</sup>放出を引き起こさない。本研究では、心筋細胞内におけるCa<sup>2+</sup>放出の局所的制御に影響を与える因子についての検討を行った。Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素 fluo-3を用い、マウスの心筋、心室筋細胞の局所に10mMカフェインを500ms作用させ、局所のCa<sup>2+</sup>放出を誘発し、細胞内Ca<sup>2+</sup>動態について観察した。局所のCa<sup>2+</sup>放出は、心筋細胞では細胞内を伝播し、心室筋細胞では伝播しなかった。この差異は①RyRの密度、Ca<sup>2+</sup>感受性、②[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の筋小胞体 (SR) への再取り込み及びNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系 (NCX) によるCa<sup>2+</sup>の細胞外への排泄、③細胞内でのCa<sup>2+</sup>に対する緩衝効果によると考えられた。RyRとアクチンの細胞内密度は、心筋筋と心室筋では同程度であったが、Mitの細胞内密度は心筋筋で低かった。Mitのuniporter (U) を介したCa<sup>2+</sup>取り込みを抑制すると、心室筋細胞の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が増加し、Ca<sup>2+</sup>の伝播が認められた。以上から、Mit-Uを介したCa<sup>2+</sup>取り込みが局所のSRからのCa<sup>2+</sup>放出の制御に関与していると考えられた。また、心筋細胞での[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の伝播は、Mitの細胞内密度が心室筋細胞より低いことが一因であると考えられた。

審査において、細胞の一部に500msという超短時間薬物を作用させる方法についての質問があり、使用したrapid solution exchanger deviceの構造、使用法が説明された。また、蛍光色素による実験ではしばしば蛍光の減衰が問題となるが、rhod-2の減衰はなかったかとの質問がなされたが、蛍光の減衰がないことを確認した上で実施されたと返答され実験モデルの妥当性が評価された。さらに、Mitによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>制御がbeat to beatで行われていた点は新しい知見であるが、この際、取り込みはMit-Uだが、放出はどこからかとの質問に対しては、今後の課題と返答された。MitのCa<sup>2+</sup>取り込み抑制が心筋保護につながるかとの質問に対しては、逆に細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷を助長するため保護にはつながらないと返答された。

以上、さらに検討する余地はあるものの、MitのCa<sup>2+</sup>制御と代謝との関連についての検討が可能な良い実験系であり、心不全などMit障害が生じる病態への応用にも期待ができ、学位論文として高く評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 再生医学 福田 恵一  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：四津 良平

試問日：平成19年1月25日

# Development of Gene Vectors For Pinpoint Targeting To Human Hepatocytes by Cationically Modified Polymer Complexes

(MPCポリマーによるヒト肝細胞特異的な遺伝子ベクターの開発)

千葉 育一

## 内容の要旨

HBs抗原と遺伝子とを結合させた生体適合性を有するCationically MPC polymerを用いて、ヒト肝細胞に対して特異的に発現するgene delivery systemを開発することを目的とした。

1. 生体適合性を有した2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) と、遺伝子に結合可能なCation unitであるN,N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) と、蛋白質のNH<sub>2</sub>基とエステル結合し特異性を持たせることを可能にさせるp-nitrophenylcarbonyloxyethyl methacrylate (NPMA) とがpolymer結合した化合物 (PMDN) をVectorの骨格として用いた。まずPMDNに細胞特異性を持たせる目的でHBs抗原を結合させたPMDN-HBsを作製した。さらにそのPMDN-HBsに遺伝子発現を確認する目的で蛍光物質を発現するGFPのcDNA、または生体内で血管新生抑制作用を有するsFlt-1のcDNAをそれぞれ結合させたPMDN complex (sFlt-1またはGFP/PMDN-HBs) を作製した。2. 前記PMDN complexを用いて、肝癌細胞株HepG2、大腸癌細胞株WiDrをそれぞれtransfectionさせ、sFlt-1発現量とGFP発現量を検討した。3. HepG2とWiDrの皮下担癌マウスモデルを作製し、それらに前記PMDN complexを経静脈内投与し各組織中のsFlt-1発現量とGFP発現量を検討した。4. 前記3. の皮下担癌マウスモデルに同様の試薬を経静脈内投与した際の主要組織重量・肝機能障害の有無・主要組織の病理組織学的所見についてそれぞれ検討した。

HepG2にsFlt-1またはGFP/PMDN-HBsをtransfectionさせた群で有意にsFlt-1発現が高値であり、GFP発色も認められた。さらにHepG2皮下担癌マウスにsFlt-1あるいはGFP/PMDN-HBsを静脈内投与した群で有意にsFlt-1の発現が高値であった。またPMDN complexを投与したマウスでは主要組織重量の変化、肝機能障害、病理組織学的所見において異常は認められなかった。

HBs抗原を結合させたPMDN complexはin vitro、in vivoにおいて肝細胞癌に対して特異的に遺伝子を発現させることが可能であり、新しい遺伝子治療のVectorとなりうる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

Vectorの骨格として生体適合性を有した2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) および、遺伝子に結合可能なCation unitであるN,N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) と、蛋白質のNH<sub>2</sub>基とエステル結合し特異性を維持するp-nitrophenylcarbonyloxyethyl methacrylate (NPMA) とがpolymer結合した化合物 (poly MPC-co-DMAEMA-co-NPMA (PMDN)) を用いた。本研究では、組織特異性をもたせるために上記のPMDNにHBs抗原と、腫瘍の新生血管増殖に関与しているVEGF Receptorの阻害作用を有する可溶性VEGF受容体遺伝子 (sFlt-1 plasmid) とを結合させ、組織特異性・安全性を併せ持った遺伝子delivery systemについて検討を行った。

審査では、まずPMDNによる遺伝子導入効率について質疑がなされた。PMDNによる遺伝子導入効率は他の遺伝子VectorであるVirus vectorやLiposomeに比較して低値である理由について質問があり、その原因としてはPMDNとHBs抗原との結合率の問題やPlasmidを結合させた複合体の粒子径の問題、さらにはPlasmidのpromoterの問題などが想定されるが、明確に究明はなされていないとの説明がなされた。ただしVectorの骨格であるMPC polymerは生体適合性に優れており安定状態の大量生産が可能である点で他のVectorに比較して有利であると共に、組織特異的な遺伝子発現が可能であることから肝細胞癌の遺伝子治療だけでなく蛋白欠損疾患に対する治療への可能性が示唆されていると回答された。

また、PMDNのマウスにおける薬理的体内動態について質疑がなされた。PMDNにHBs抗原が結合した複合体の静脈内投与による免疫応答や投与後の体内分布について質問があり、それらについてはいまだ明確には解明されていないとの説明がなされた。しかしPMDNの骨格であるMPC polymerは血管グラフトなどに臨床応用されており免疫応答が非常に低いことが報告されており、また体内分布については今後の検討課題であるとの回答がなされた。

以上のように本研究には今後検討すべき課題が残されているものの、PMDNは組織特異性を有し遺伝子をpin-pointに運搬できる可能性を示し、癌や代謝性疾患に対する新しい遺伝子治療 (安全で効率的な腫瘍細胞の増殖抑制、腫瘍細胞のアポトーシス誘導、抗腫瘍免疫増強など) のVectorとなりうる点で、意義のある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
内科学 日比 紀文 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  
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成18年12月28日

# Selective Suppression of Pathologic, but Not Physiologic, Retinal Neovascularization by Blocking the Angiotensin II Type 1 Receptor

(アンジオテンシンII 1型受容体阻害による網膜病理的血管新生の選択的抑制)

永井 紀博

## 内容の要旨

【目的】網膜病理的血管新生は成人の失明原因の首位を占める増殖糖尿病網膜症の主要病態であり、その形成に炎症機序が関与する。網膜病理的血管新生へのレニン・アンジオテンシン系の関与についてヒト手術検体、マウス虚血網膜症モデルを用いて検討する。

【対象と方法】網膜病理的血管新生モデルとしてマウス虚血網膜症モデルを用いた。このモデルではC57BL/6マウス新生仔を生後7日目(P7)からP12まで高酸素下(80%酸素)で飼育し、高酸素による網膜血管の退縮を誘導する。引き続きP12からP17まで通常大気下で飼育し、虚血網膜を基盤とした網膜病理的および生理的血管新生を誘導する。網膜病理的血管新生では新生血管が網膜から異所性に硝子体に侵入し、コイル状の不規則な形態と血管透過性亢進を特徴とし、白血球接着などの炎症を基盤として形成される。一方網膜生理的血管新生では新生血管は網膜内を秩序だって伸展する。このモデルにP12からP16までangiotensin II 1型受容体(AT1-R)拮抗薬(telmisartan, 3 mg/kg/日)またはvehicle (0.25% DMSO PBS液)を投与し、P17に網膜血管新生および炎症の評価を行った。網膜血管新生と網膜血管接着白血球の評価にはconcanavalin Aレクチン液流ラベル法を用い、網膜病理的および生理的血管新生の全網膜に占める割合、網膜血管接着白血球数を評価した。また網膜におけるintercellular adhesion molecule (ICAM)-1、vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1、VEGFR-2の発現をRT-PCR法、ELISA法で検討した。さらに増殖糖尿病網膜症患者から手術中に得られた線維血管組織、マウス網膜におけるAT1-Rの発現を免疫組織化学染色で検討した。

【結果】増殖糖尿病網膜症患者の線維血管組織およびマウス網膜においてAT1-Rは主に血管内皮に局在していた。虚血網膜症マウスにおいてtelmisartan投与群の全網膜に占める病理的血管新生領域の割合(3.2±1.8%)は、vehicle群(9.7±1.2%)に比し有意に減少していたが、網膜生理的血管新生に有意差はなかった。また網膜血管接着白血球数は、telmisartan投与群(21.3±7.0)で、vehicle群(53.7±9.4)に比し有意に減少していた。網膜におけるICAM-1、VEGFR-1の発現はtelmisartanによって有意に抑制されたが、VEGFR-2の発現には有意差はなかった。

【結論】AT1-Rシグナルの阻害によって、ICAM-1を介した網膜血管白血球接着といった網膜病理的血管新生に先行する炎症が抑制され、結果として網膜生理的血管新生を保護しながら病理的血管新生が選択的に抑制された。

## 論文審査の要旨

網膜血管新生は増殖糖尿病網膜症や未熟児網膜症の主要病態である。本研究ではangiotensin II 1型受容体(AT1-R)シグナルの阻害によって、intercellular adhesion molecule (ICAM)-1を介した網膜血管への白血球接着といった網膜血管新生に先行する炎症機序が抑制され、結果として網膜生理的血管新生を保護しながら病的血管新生が選択的に抑制されることが明らかになった。

審査では虚血網膜症モデルの妥当性と高酸素誘導による血管退縮の機序に対する質問がなされた。ストレプトゾトシン等によって誘導される高血糖動物モデルでは網膜病的血管新生が誘導されないため、虚血網膜症モデルは増殖糖尿病網膜症などの網膜病的血管新生のモデルとして広く用いられているとの回答がなされた。高酸素誘導による血管退縮の機序として、網膜血管に接着した細胞傷害性白血球によるFas-FasLを介した血管内皮細胞のアポトーシス、高酸素によって血管のサバイバルファクターでもあるvascular endothelial growth factor (VEGF)の発現が低下することが回答された。網膜におけるVEGFの産生源と虚血網膜症におけるVEGFの発現変化についての質問があり、ミュラー細胞やアストロサイトなどのグリア細胞が白血球とともに重要であり、虚血網膜症モデルにおけるVEGFの発現は高酸素期に低下し、それに引き続く増殖期に発現が上昇するとの回答がなされた。そしてAT1-R阻害による網膜のVEGFの発現変化についての検討の必要性が指摘された。

AT1-R阻害による網膜のVEGFR-1の発現低下の機序について質問があり、VEGFR-1を有する白血球の網膜への浸潤が減少したことが一因であると回答がなされた。次に白血球におけるAT1-Rの発現とAT1-Rシグナルの作用について質問があり、AT1-Rは白血球に発現しており、AT1-Rシグナルは白血球からのサイトカイン分泌のみならず、白血球自身の分化・増殖も促進することが回答された。血管新生にマクロファージなどの骨髄由来の細胞が関与することが指摘され、本モデルにおいてもレニン・アンジオテンシン系が骨髄由来細胞に作用して網膜血管新生に関与するか検討する価値があるとの助言を受けた。さらにtelmisartanのAT1-R阻害作用の特異性についての質問がなされた。TelmisartanはAT1-Rへの親和性が高い薬剤であるが、抗炎症・抗血管新生に作用する核内受容体であるPPAR-gammaの刺激作用を有するため、本研究における抗血管新生作用はPPAR-gamma刺激作用を介する可能性が回答された。実際、脈絡膜新生血管の動物モデルではtelmisartanによる血管新生抑制作用は部分的にPPAR-gamma刺激作用を介していた(Nagai N et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006)と回答された。

以上のように本研究は今後の検討課題も残されているが、AT1-Rシグナルを介した炎症機序が網膜病的血管新生に関与することを証明し、AT1-R阻害薬は降圧薬として用いられていることから臨床応用に向けても意義のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 坪田 一男  
病理学 岡田 保典 内科学 伊藤 裕  
医化学 末松 誠  
学術確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成18年12月18日

# Effects of Preinjury Administration of Corticosteroids on Pseudointimal Hyperplasia and Cytokine Response in a Rat Model of Balloon Aortic Injury

(ラット大動脈挿過モデルにおける術前ステロイド投与による  
サイトカイン産生と内膜肥厚抑制効果の検討)

長 崎 和 仁

## 内容の要旨

血管疾患の治療においてバイパス術は有効な手段として多く使われているが、約3割の患者において血管内膜肥厚による術後再狭窄が生じている。Methylprednisolone (MP) は、抗炎症性作用を示す薬剤として広く使用されているが、術後再狭窄への有用性を示す報告例は少ない。ステロイド投与には適切な投与時期のみならず投与量に関係があるのではないかと考え、本研究において、術前MP投与量の変化によって術後再狭窄がどのように影響されるかを検討した。

ラット大動脈挿過モデルを使用し、MP投与群 (0.5、5.0、50、500mg/kg MPを術2時間前に静注 (n=20))、Control群 (生食2mlを静注 (n=20))、そしてSham群 (動脈挿過をせず開腹術のみ (n=3))の間で、術後のサイトカイン測定と組織学的変化を評価した。まず、術4時間後に5mlの血液と擦過した動脈 (50mg) を採取し、血液から血清を動脈片からホモジェナイズ後上清液を分離し、Interleukin-6 (IL-6)、Interleukin-10 (IL-10)、Migratory inhibitory factor (MIF) 値を測定した。血清中のIL-6、IL-10、MIF値は、Control群においてSham群よりも高値であった。MP投与群においては、血清IL-6値がControl群に比べ有意に抑制され ( $p<0.05$  (0.5mg/ml MP群、50mg/ml MP群)、 $p<0.01$  (5.0mg/ml MP群))、組織内のIL-6値においても、5.0mg/ml MP群において有意に抑制されていた ( $p<0.05$ )。しかし、IL-10、MIF値においては、血清、組織中ともに両群間において有意な差が認められなかった。次に、術2週間後の擦過動脈を採取後、elastica van Gieson染色を施行し、血管断面から新生内膜面積、中膜面積を測定し、新生内膜/中膜比 (PI/M) を算出した。細胞増殖能を評価するためPCNA染色も施行し、PCNA比 (新生内膜陽性細胞数/新生内膜全細胞数) を算出した。新生内膜、PI/M比は、5.0mg/ml MP群、50mg/ml MP群でControl群に比べ有意に抑制され ( $p<0.05$  (抑制率64.3%)、 $p<0.05$  (抑制率64.6%))、またPCNA比も5.0mg/ml MP群で有意に抑制されていた ( $p<0.01$ )。以上の結果より、バルーン擦過術後新生内膜形成の抑制作用には、MP投与の適用時期のみならず適用量があることが示された。

## 論文審査の要旨

血管疾患におけるバルーン拡張術やバイパス術は有効な手段として多く使われているが、合併症の一つである術後再狭窄に対するステロイド投与の有用性を示す報告例はない。本実験では、ステロイド投与に関し適切な投与時期および投与量があることが想起され、ラット大動脈挿過モデルを用いて再狭窄の原因である新生内膜肥厚の抑制効果について検討した。その結果、術前2時間に5.0mg/ml methylprednisoloneを静脈内に投与することによって、術後血清ならびに組織中の炎症性サイトカインであるinterleukin-6値の抑制を認め、新生内膜そしてその増殖能の抑制も確認することができた。これらの結果より、バルーン擦過術後新生内膜形成の抑制作用には、適用量のステロイドが有効であるということが示された。

審査ではまず、薬剤としてステロイドの使用理由に対する質問がなされた。それに対し、関節リウマチにて長期間ステロイド服用後閉塞性動脈硬化症と診断された患者を受け持っていた経験から、ステロイドが動脈硬化に直接関与しているのではないかと考え、ステロイド投与量と動脈硬化との関係を究明したいと考え使用したと回答された。次いで、一般的に動脈挿過モデルでは頸動脈を使用するのになぜ大動脈を使用したかの質問があり、頸動脈同様に内膜肥厚が大動脈では擦過2週間後までに生ずること、頸動脈より構造上人間の動脈に近いことや検体量が多くとれると回答した。総じて、ステロイド療法がPTCA術後の再狭窄を有意に抑制しなかったとする1990年の臨床報告と比較して、本実験との結果の相違に対してどのように考えるのかという質問に対して、ステロイドの効果を十分に発揮するにはその投与時期が重要であるとの報告例があることや、本実験結果においてステロイドを多量投与するとバルーン擦過後の内膜肥厚が増大するという成績があり、ステロイドの投与に際しその適用量と投与時期が重要であると回答した。また、問題点としては、本実験では術後2週間の内膜肥厚を検討しているが更なる長期間経過を観察する必要があるということ、ステロイド使用に最適用量があるとするそのメカニズムを十分に究明する必要があるという指摘があった。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、新生内膜抑制に対するステロイド療法において、その投与効果を十分に示すためには、投与時期のみならず投与量が重要であることを明確に示した点において、有意義な論文であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
病理学 岡田 保典 外科学 四津 良平  
内科学 小川 聡  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成18年12月26日

# *Candida albicans* aggravates duodenal ulcer perforation induced by administration of cysteamine in rats

(カンジダアルビカンスがシステアミン十二指腸潰瘍ラットモデルの潰瘍穿孔を増悪する)

中 村 哲 也

## 内容の要旨

*Candida*は、胃・十二指腸潰瘍穿孔における腹水培養、創感染部位の培養から陽性となることを経験するが、消化管においては常在菌とされ、日常臨床においてその重要性はそれほど認識されてこなかった。今回我々は潰瘍穿孔機序における重要性を実験的に検討した。

投与後72時間後に約1/3が潰瘍穿孔を起こす、十二指腸潰瘍穿孔の動物実験モデルであるCysteamine潰瘍にて実験した。Cysteamine-HCl 31mg/kgをWistar系雄性ラット(220-240g)に胃内投与し、*Candida albicans* 10<sup>8</sup>を前投与、12時間後、24時間後投与の3回経口投与し、*Candida albicans*投与群と生食投与群の、穿孔率、潰瘍の深さ、潰瘍面積、生存率を比較検討した。H&E染色、PAS染色、Grocott染色、Luna染色を行い、病理組織学的に検討した。また、抗secretory asparatyl protease2 (SAP2)抗体を用いて免疫染色を行い、*Candida*の組織傷害因子であるSAP2の分布を検討し、ELISAで蛋白量も検討した。また、Cysteamineは投与せず*Candida albicans*のみを投与した群も併せて検討した。

十二指腸潰瘍の穿孔は生食投与群の26.7% (4/15)に対し、*Candida*投与群では94.1% (16/17)と有意に多く認められ、潰瘍面積(16.53 V.S. 40.89mm<sup>2</sup>)、生存率においても有意差が認められた。病理組織学的検討において*Candida*投与群の潰瘍底に*Candida*が菌糸を伸ばしており、周囲に顆粒球の浸潤が観察され、PAS染色・Grocott染色にて*Candida*菌糸のみならず*Candida*酵母も識別が可能であった。低倍率の観察で、*Candida*が菌糸を伸ばしている部位で潰瘍が特に深くなっていることが観察された。Luna染色による検討では、*Candida*投与群の潰瘍表面に好酸球浸潤を有意に多く認めた。*Candida*投与群の病理組織学的検討では、潰瘍部にSAP2の分布を認め、ELISAでSAP2の蛋白量も有意に高値であった。*Candida*のみの投与では胃・十二指腸に潰瘍形成を認めなかった。

上部消化管穿孔の実験モデルにおいて*Candida*感染が消化管穿孔を増悪することが示された。その機序のひとつは顆粒球などの*Candida*感染による宿主側の因子である。ヒトの潰瘍穿孔症例の検体で潰瘍底部に好酸球の浸潤が認められたという報告があるが、今回の実験でもその関与が示唆された。他の機序としては*Candida*自身が産生し、上皮に浸潤する際に分泌されるSAP2などの蛋白分解酵素である。今回の実験では潰瘍穿孔において重要な役割があることが示唆された。

## 論文審査の要旨

上部消化管潰瘍の穿孔は潰瘍の発生と異なる病態を持つといわれ続け、酸分泌抑制剤や*Helicobacter pylori*除菌の普及にもかかわらず、潰瘍穿孔の患者数は減少していない。本研究では十二指腸潰瘍ラットモデルを用い、*Candida albicans*に焦点をあててその感染と穿孔機序について検討した。

審査においては、臨床上の問題点をとらえた実験は評価できるとされたうえで、まず、cysteamineの潰瘍形成の機序について質問があり、投与後速やかに十二指腸粘膜に集積し、顆粒球の浸潤を促し、潰瘍が発生することが確認された。

次に*C.albicans*の正常粘膜への感染についての質問に対し、粘膜損傷がある部分にのみ感染し、また、潰瘍穿孔術後の食道粘膜からの8例の生検培養では*C.albicans*を1例も認めず、口腔内あるいは小腸が感染源となっている可能性があるという回答された。ただし、仮にPCRを行った場合には十二指腸の細菌叢に確認できる可能性があるというコメントされた。*C.albicans*感染により、allergyを起こす可能性について質問がなされたが、mast cellの存在が証明されており、histamineなどメディエーターの関与が示唆されていると説明された。

さらに、SAP2に関しての質問があり、基質はIgA、keratin、hemoglobinなどであり、至適pHは3.5と確認されており、障害粘膜にSAP2が存在すると、組織破壊が起こり、*C.albicans*の浸潤を助長することが確認された。すなわち*C.albicans*が産生するSAP2は宿主の蛋白質を分解して自己の増殖を促進している、というコメントがなされた。SAP2の免疫染色部位に関して質問があったが、菌体自体ではなく顆粒球が集積している部分が染色されており、分泌されて菌体外に出たものが染色されている可能性があるという回答された。また、ELISAではコントロール群もSAP蛋白が検出されているが、免疫染色では認められない点についての指摘がなされた。

また、顆粒球由来の組織障害因子としてMMP-1があるが、ラットの場合にはその遺伝子はなく、MMP-8,9,13が関与している可能性を指摘され、消化管壁を傷害するのは好中球のMMP、セリンプロテアーゼが重要な因子なのではないかとの質問がなされた。白血球のsticking、rollingを抑えるセレクチンインヒビターをこの実験モデルに投与すると、潰瘍の増悪を抑制し得たことから、白血球由来のMMPが潰瘍増悪因子である可能性について回答された。

以上のように本研究はいくつかの検討を要する点が残されたものの、*C.albicans*による消化管潰瘍穿孔の機序が示された点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
内科学 日比 紀文 医化学 末松 誠  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成18年12月18日

# Anti-angiogenic effect of an insertional fusion protein of human basic fibroblast growth factor and ribonuclease-1

(ドメイン内挿入融合蛋白質による血管新生阻害効果の検討)

林 田 哲

## 内容の要旨

近年分子標的療法が提唱され、国内外で積極的に研究・推進されているが、中でもbasic fibroblast growth factor (bFGF) を含む血管新生促進因子が標的分子として注目を集めている。我々は遺伝子融合によりbFGF遺伝子をヒト臍由来ribonuclease1 (RNase1) 遺伝子内部に挿入することにより、新しい融合蛋白質：CL-RFN89を作製した。RNase1は細胞質内へ取り込まれることで初めて殺細胞効果を発揮するが、細胞質内ではRNase inhibitor (RI) により強力な抑制効果を受けることが知られている。CL-RFN89はRI結合部位にbFGFが挿入され、立体構造的にその結合を阻害するため、酵素比で200倍のRI濃度中においても約85%の活性を保ち、同時にFGF受容体陽性細胞に対し殺細胞効果を示すことが確認された。今回我々はこの融合蛋白質が血管新生に及ぼす影響を検討した。

血管内皮細胞が有するFGF受容体への結合特異性を確認するため、蛍光色素物質によりCL-RFN89を標識し、human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) と15日間共培養し、洗浄した。これらを蛍光顕微鏡にて観察したところCL-RFN89による細胞の蛍光が観察されたが、過剰量のbFGFをCL-RFN89と同時に添加した群では認められなかった。これは過剰量のbFGFが細胞膜上のFGF受容体を占拠し、競合的にCL-RFN89の結合を阻害したと考えられた。次に*in vitro*での血管新生阻害効果を観察するために、HUVECをコラーゲンゲルで挟み込んで培養し、3次元的に管腔形成を生じさせた。その際培養液中にCL-RFN89を各濃度で添加した。48時間後に得られた管腔の長さを測定したところ、これらはCL-RFN89により濃度依存性に阻害され、2  $\mu$ Mの濃度においてControl群に対し約43%の管腔形成を認めるのみであった。

さらに、膜フィルターで両面を覆ったチャンバーを作製し、内部にヒト扁平上皮由来細胞：A431を挿入して、マウス背部皮下に移植した。5日後これを切除し、皮下に形成された新生血管を観察した。その際にCL-RFN89をチャンバー内へ同時に添加したところ、腫瘍のみの群では、3 mm以上の新生血管を平均4.4本認めたが、2  $\mu$ MのCL-RFN89を添加した群では、平均0.8本認めるのみであった。

これらの結果により、CL-RFN89は特異的にFGF受容体を介して血管内皮細胞へ結合すると考えられ、さらに*in vitro*, *in vivo*の系でともに血管新生阻害効果が確認された。今後の研究の進捗により、FGF受容体への特異性を有する血管新生阻害剤として期待されると考えられた。

## 論文審査の要旨

分子標的治療の実現には、標的分子を発現する細胞への特異的結合と同時に、その細胞の細胞死を何らかのメカニズムで誘導することが必要である。これらを両立するため、本研究では細胞質内で殺細胞効果を発揮するribonuclease-1 (以下RNase-1) のRNase inhibitor (以下RI) 結合部位に、basic fibroblast growth factor (以下bFGF) が遺伝子組換えにより挿入された。この挿入融合法により、FGF受容体への結合能力を持たせると同時に、細胞質内でのRIの結合を阻害し、RNase-1の活性を維持することによって、FGF受容体発現細胞に対し、高い殺細胞効果が観察された。また、この新しい挿入融合蛋白質“CL-RFN89”によるFGF受容体への特異的結合、及び*in vitro*, *in vivo*における血管新生阻害効果について検証がなされた。

審査では、まず精製された挿入融合蛋白質の立体構造が、正常に巻き戻されていることが確認されたかが問われた。これに対し、直接立体構造の確認は実現されていないものの、本研究に先立ち挿入融合蛋白質のRNase-1活性が確認され、また本研究によりFGF受容体への特異的結合が確認されたため、機能的な面から立体構造の再構築がなされている可能性が高いと回答された。またRNase-1蛋白にシステイン残基を導入し、そのジスルフィド結合による、立体構造安定化が図られている、と説明された。次に、*in vitro*におけるCL-RFN89によるヒト臍帯血管内皮細胞増殖抑制効果、及び3次元培養法における血管新生抑制効果を調べた両実験において、RNase-1のみの添加群をコントロールとして実施すべきではなかったかの指摘があり、論文には記載されていないが、RNase-1のみの添加群も検証され、これによる増殖抑制及び血管新生阻害効果は認められなかった、と回答された。また、腫瘍形成初期の、血管新生を未だ伴わない腫瘍への対応について質問があり、FGF受容体を発現する腫瘍であれば、CL-RFN89による直接的な増殖抑制効果が期待できると回答された。これに関連し、腫瘍周囲血管が未成熟である状態や、また血管新生阻害剤により、腫瘍血管新生が抑制された状態でのdrug deliveryがどの様になされるべきかとの問題について、これらは血管新生阻害剤における恒常的な問題ながら、今後解決する必要性がある、との指摘がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているが、ドメイン内挿入融合蛋白質CL-RFN89がFGF受容体に特異的に結合し、また血管新生阻害効果を示すことを明らかにしたことで、将来的に分子標的治療の一候補になり得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 外科学 北島 政樹  
発生・分化生物学 須田 年生 医化学 末松 誠  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：須田 年生

試問日：平成18年12月19日



# ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF- $\beta$ expression in renal tubular cells

(高糖環境下尿細管細胞肥大、TGF- $\beta$ 発現におけるERKおよびp38の役割)

藤田 尚代

## 内容の要旨

糖尿病性腎症は初期に腎腫大が認められる。一方、糖尿病性腎症ではTGF- $\beta$ 発現が亢進している。TGF- $\beta$ は糸球体肥大、尿細管肥大を誘導すると共に糸球体硬化、尿細管間質線維化を媒介する。糖尿病ラット腎糸球体、高糖環境下培養メサンギウム細胞において、ERK、p38の発現・活性が亢進し、TGF- $\beta$ 発現を媒介することが報告されている。本研究では尿細管に着目し、高糖環境下尿細管細胞肥大、TGF- $\beta$ 発現におけるERKおよびp38の役割を検討した。

Sprague-Dawleyラットにストレプトゾトシンを投与、糖尿病を惹起した。一部の糖尿病ラットにインスリン投与を行った。3週後に腎を摘出、免疫組織染色を行った。近位尿細管細胞LLC-PK<sub>1</sub>を高糖濃度(グルコース25mM)、正常糖濃度(5.5mM)下で培養後、蛋白発現をウェスタンブロットで解析した。細胞肥大を、細胞あたりの蛋白量、<sup>3</sup>H-ロイシン取り込み、DNAあたりの蛋白量により評価した。

糖尿病ラットの血糖値、腎重量体重比は対照ラットに比し高値を示したが、インスリン投与により抑制された。ERKは遠位尿細管、集合管で発現し、対照腎と糖尿病腎で差を認めなかった。活性型ERK(P-ERK)は遠位尿細管にも認められたが主に集合管に局在し、糖尿病腎で発現が増加した。p38、活性型p38(P-p38)は対照腎には認められなかったが、糖尿病腎の全ての尿細管に発現が認められた。JNK、活性型JNK(P-JNK)は対照腎と糖尿病腎で差がなく、JNKは遠位尿細管、集合管、一部近位尿細管、P-JNKは遠位尿細管、集合管で発現した。TGF- $\beta$ は対照腎には認められなかったが、糖尿病腎の全ての尿細管に発現が認められた。インスリン投与によりP-ERK、p38、P-p38、TGF- $\beta$ 発現は対照腎と同レベルに抑制された。

高糖環境下でLLC-PK<sub>1</sub>細胞を培養したところ、P-ERK、P-p38の発現が培養24から72時間にかけて増加した。高糖と等浸透圧のマニトール下培養ではこれらの変化は認められず、P-ERK、P-p38の発現増加が、高浸透圧ではなく高糖環境に特異的なものであることが示された。高糖環境下培養では、細胞あたりの蛋白量、<sup>3</sup>H-ロイシン取り込みが増加したが、p38阻害剤SB203580(SB)、ERK活性化酵素MEK阻害剤PD98059(PD)により対照と同レベルに抑制された。DNAあたりの蛋白量も高糖環境下培養で増加し、SB、PDにより部分的に抑制され、両者併用により更に対照と同レベルに抑制された。高糖環境下培養によりTGF- $\beta$ 発現は増加し、SB、PD、または両者併用により対照と同レベルに抑制された。

糖尿病性腎症では尿細管においてERK、p38の活性化が起こり、TGF- $\beta$ 発現が誘導され、腎尿細管細胞肥大が生じる可能性が示された。

## 論文審査の要旨

糖尿病性腎症の初期には腎腫大が認められる。一方、糖尿病性腎症ではTGF- $\beta$ 発現が亢進している。TGF- $\beta$ は糸球体肥大、尿細管肥大を誘導すると共に糸球体硬化、尿細管間質線維化を媒介する。本研究では、尿細管に着目し、高糖環境下での尿細管細胞肥大、TGF- $\beta$ 発現におけるERKおよびp38の役割について検討した。ラットでは、ERKは遠位尿細管、集合管で発現し、対照腎と糖尿病腎で差を認めなかった。活性型ERK(P-ERK)は遠位尿細管にも認められたが、主に集合管に局在し、糖尿病腎で発現が増加した。p38、活性型p38(P-p38)、TGF- $\beta$ は対照腎では認められず、糖尿病腎で全ての尿細管に発現が認められた。LLC-PK<sub>1</sub>細胞では、高糖環境下培養でP-ERK、P-p38の発現が増加した。高糖環境による細胞肥大(DNAあたりの蛋白量)は、ERK阻害、p38阻害により相対的に抑制された。高糖環境によるTGF- $\beta$ 発現誘導は、ERK阻害、p38阻害により対照と同レベルまで抑制された。糖尿病性腎症尿細管においてERK、p38の活性化が起こり、TGF- $\beta$ 発現が誘導され、腎尿細管細胞肥大が生じる可能性が示された。

審査ではまず、糖尿病惹起後わずか3週で評価を行った根拠について質問され、組織学的には近位尿細管肥大を確認していないが、糖尿病惹起後10日で近位尿細管細胞に肥大が生じるとの報告に基づいたと回答された。糖尿病性腎症における尿細管肥大の臨床的意義について質問され、過去に報告はなく、本研究でも回答は得られなかった、と回答された。今後検討すべき重要な課題であると助言された。糖尿病腎近位尿細管細胞ではP-ERKが発現していなかったにもかかわらず、*in vitro*実験で近位尿細管細胞(LLC-PK<sub>1</sub>)を用いた根拠について質問され、近位尿細管は腎容積のうち大きな割合を占め腎肥大における関与が大きいこと、高糖環境下培養では遠位尿細管の細胞肥大は認められないとの報告があること、免疫組織染色で検出されない程度のP-ERK発現の可能性があること、などが根拠であると回答された。高糖環境におけるERK/p38活性化の機序について質問され、メサンギウム細胞に関する実験データから推測すると、protein kinase Cや活性酸素の関与が考えられると回答された。それらの可能性について、さらに解析を進めるように助言がなされた。また、培養液中のTGF- $\beta$ 濃度を測定し、同等濃度のTGF- $\beta$ をLLC-PK<sub>1</sub>細胞に曝露させた場合の影響、抗TGF- $\beta$ 抗体の効果などについて今後も検討を進めるようにとの助言がなされた。

以上、本研究はさらなる検討が必要な点もあるが、糖尿病ラットを用いた*in vivo*実験とLLC-PK<sub>1</sub>細胞を用いた*in vitro*実験により、高糖環境によるERK、p38の活性化を示したこと、近位尿細管細胞肥大の機序の一部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 小児科学 高橋 孝雄  
内科 伊藤 裕 産婦人科学 吉村 泰典  
泌尿器科学 村井 勝  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 伊藤 裕

試問日: 平成19年1月18日

# Tetraspanin CD151 Is Expressed in Osteoarthritic Cartilage and Is Involved in Pericellular Activation of Pro-Matrix Metalloproteinase 7 in Osteoarthritic Chondrocytes

(4回膜貫通蛋白質CD151は変形性関節症軟骨に発現し、軟骨細胞における潜在型MMP-7の細胞膜上での活性化に関与している)

藤田 貴也

## 内容の要旨

分泌型Matrix metalloproteinase (MMP) は、潜在型で産生され細胞外で活性化されることによって、様々な細胞外マトリックスなどを分解することが知られている。潜在型MMP-7 (proMMP-7) が変形性関節症 (OA) 軟骨に過剰に発現しているが、その活性化の機構については不明な点が多い。

本研究は、4回膜貫通蛋白質CD151のOA軟骨における発現と、さらにproMMP-7の活性化への関与を調べることを目的に以下の実験を行った。

関節軟骨におけるCD151の発現は、RT-PCR、real-time PCR、免疫染色、*in situ* hybridizationとimmunoblottingによって調べた。培養軟骨細胞はCD151とproMMP-7の相互作用と共発現さらにproMMP-7の活性化の証明するために用いられた。

RT-PCRによってCD151のmRNAは、すべてのOA軟骨サンプルに認められたが、正常軟骨では30%のサンプルでしか発現していなかった。CD151がOA関節軟骨の浅層・中間層の軟骨細胞に発現することが、免疫染色と*in situ* hybridizationによって明らかになった。さらに、CD151とproMMP-7の免疫染色をミラー切片に行うことにより、CD151とproMMP-7がOA軟骨における同一の軟骨細胞に共発現していることが明らかになった。CD151陽性細胞の割合はOA進行の指標であるMankin scoreさらに軟骨細胞クローニングの程度と強い正の相関が認められた。CD151とproMMP-7の相互作用は、IL-1・TNF $\alpha$ による刺激培養軟骨細胞のcell lysateをCD151の特異抗体によって免疫沈降しproMMP-7の特異抗体で検出することで証明した。さらに培養軟骨細胞膜上での両分子のcolocalizationを共焦点顕微鏡を用いた二重蛍光免疫染色によって証明した。proMMP-7の活性化をMMP-7の基質であるCCmTfフィルムを用いた*in situ* zymographyによって検出し、MMPインヒビターやMMP-7の特異抗体やCD151の特異抗体によって基質分解が阻害されることから、CD151がproMMP-7の活性化に関与していることが証明された。

以上の結果より、CD151は、OA関節軟骨に過剰に発現し、軟骨細胞膜上でのproMMP-7の活性化に関与し、その結果、軟骨マトリックスの破壊や軟骨細胞クローニングをもたらすことが示唆された。

## 論文審査の要旨

分泌型Matrix metalloproteinase (MMP) は、潜在型で産生され細胞外で活性化されることが知られている。潜在型MMP-7 (proMMP-7) が変形性関節症 (OA) 軟骨に過剰に発現しているが、その活性化の機構については不明な点が多い。そこで本研究は、4回膜貫通蛋白質CD151のOA軟骨における発現とproMMP-7の活性化への関与を調べた。RT-PCRによりCD151 mRNAの発現率は、OAで100%、正常軟骨で30%であり、相対的発現量もOAで有意に亢進していた。CD151はOA関節軟骨の浅層・中間層の軟骨細胞に局在しMankin scoreと軟骨細胞クローニングの程度と強い正の相関が認められた。さらに、CD151とproMMP-7はOA軟骨における同一の軟骨細胞に共発現しており、CD151とproMMP-7の相互作用は、IL-1・TNF $\alpha$ による刺激培養軟骨細胞のcell lysateをCD151抗体で免疫沈降しproMMP-7の特異抗体で検出することで証明した。さらに培養軟骨細胞膜上での両分子のco-localizationを蛍光二重免疫染色によって証明した。proMMP-7の活性化をMMP-7の基質であるCCmTfフィルムを用いた*in situ* zymographyによって検出し、MMPインヒビターやMMP-7の特異抗体やCD151の特異抗体によって基質分解が阻害されることから、CD151がproMMP-7の活性化に関与していることを証明した。

審査では、まず潜在型MMP-7には基質分解活性がないのかとの質問がなされた。潜在型MMPは活性中心のZnイオンがプロペプチドドメインのシステイン残基のSH基と共有結合することで非活性に保たれていると回答された。また、CD151とインテグリンとの結合に関する質問がなされた。CD151と $\alpha 3 \beta 1$ や $\alpha 5 \beta 1$ といったインテグリンとの複合体形成が報告されており、インテグリンの作用を調節していると回答された。次に、CD151のシグナル伝達についての質問がなされた。CD151のC末端細胞内ドメインが欠損すると接着が低下することが報告されているが本研究ではシグナルについて検討していないと回答された。さらに、OA軟骨と正常軟骨におけるCD151発現率がmRNAレベルと蛋白質レベルでの違いについての質問がなされた。正常軟骨として使用しているサンプルが高齢者の大腿骨頭であることが一つの原因であると回答された。また、MMP-7がIL-1 $\alpha$ ・TNF- $\alpha$ でup-regulateされているがCD151のup-regulatorについての質問がなされた。IL-1 $\alpha$ ・TNF- $\alpha$ ・TGF- $\beta$ ・VEGF刺激してもCD151 mRNAレベルに変化がなかったと回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、CD151はOA関節軟骨に過剰に発現し、軟骨細胞膜上でのproMMP-7の活性化に関与し、その結果、軟骨マトリックスの破壊や軟骨細胞クローニングをもたらすこと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

病理学 坂元 亨宇 リハビリテーション医学 里宇 明元

発生・分化生物学 須田 年生

学術確認担当者:

審査委員長: 坂元 亨宇

試問日: 平成18年12月27日

# A novel apoptosis -inducing monoclonal antibody (anti-LHK) against a cell surface antigen on colon cancer cells

(大腸癌細胞表面抗原に対する新しいアポトーシス誘導抗体 (抗LHK抗体) )

松川 英彦

## 内容の要旨

大腸癌細胞はFasの発現低下や、周囲に浸潤する細胞障害性T細胞に対するFasシステムを介した攻撃からアポトーシスに抵抗性である。加えて抗Fas抗体の全身投与による致命的副作用からFasシステムは大腸癌治療には適さないと考えられているが、アポトーシスを介した大腸癌治療の臨床応用は魅力的である。我々はFas抵抗性の大腸癌細胞株colo205に対し細胞障害活性を有する抗LHK抗体を作製しその解析を行った。

colo205で免疫したBALB/cマウスの脾細胞とマウス骨髓腫細胞株Sp2/0からハイブリドーマを作製、colo205に対し細胞障害活性を有するクローンを選択、BALB/cマウスに腹腔内注射し得られた腹水より抗体を精製し抗LHK抗体と命名した。抗LHK抗体のアイソタイプはIgMであった。 [<sup>35</sup>S]-メチオニンで標識したcolo205から細胞抽出液を作製し、免疫沈降法によりLHK抗原の分子量は70kDaであった。位相差顕微鏡による形態学的観察では、抗LHK抗体がcolo205に細胞死を誘導する過程でbuddingを認めた。Hoechst33258染色で、核の断片化・濃縮を認め、抗LHK抗体添加後のcolo205より抽出したDNAにおいて、DNAラダー形成を認めた。アネキシンV/PI二重染色では、細胞死が誘導される前にアネキシンVの染色性を認めた。以上よりこの細胞死はアポトーシスと考えられた。colo205および白血病細胞株Jurkatに対する細胞障害活性は抗LHK抗体、抗Fas抗体、TNF-αと異なるパターンを示した。colo205における各抗原のIFN-γに対する反応、各種細胞株での各抗原の発現も異なっていたこと、さらに分子量が70kDaであることよりLHK抗原は、Fas、TNF-R、TRAIL-Rとは異なる分子であると考えられた。LHK抗原はヒト大腸癌組織のみならず大腸をはじめとする正常組織でも発現していることが、免疫組織染色およびフローサイトメトリーで示された。LHK抗原の発現頻度は、大腸癌組織の分化度が低下するに従い低下した。これにより大腸癌細胞がLHK抗原を介したアポトーシスから逃れている可能性が示唆された。抗LHK抗体はマウス腹腔播種モデルで著明な抗腫瘍効果を示し、明らかな致命的副作用を認めず、その臨床応用が期待される。

以上の事から消化管上皮細胞や皮膚に特異的に発現するLHK抗原は、ヒト大腸癌細胞の増殖・浸潤などに関与した新しい細胞死受容体である可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

大腸癌のFas抵抗性という特性および抗Fas抗体投与の致命的副作用から、Fasを介したアポトーシス機序を大腸癌治療に応用することは困難と考えられている。本研究ではFas抵抗性の大腸癌細胞株 Colo205に対し細胞障害活性を有する新規抗体、抗LHK抗体を作製し、その活性機序がアポトーシスであること、さらに、LHK抗原はFas、TNF-R、TRAIL-Rとは異なる新しいデスレセプターである可能性を提示した。また、LHK抗原発現と大腸癌の分化度との関連性から本抗原の腫瘍マーカーとしての可能性、さらに、マウス腹腔播種モデルでの抗LHK抗体による治療効果から本抗原の治療応用としての可能性が示唆された。

審査ではまず、抗LHK抗体作製の免疫源としてColo205細胞を選じた理由が質問され、浮遊細胞であるColo205の接着因子に関する研究の中で抗体作製を行ったところ、細胞死を誘導する抗体が得られたことから本研究がスタートしたと回答された。次にLHK抗原は他の細胞株や正常大腸上皮にも発現を認めることから、抗LHK抗体がそれらに対してもアポトーシスを誘導するかどうかという質問がなされた。それに対しては、現在までに解析を終了した10種の細胞株(大腸癌4種を含む)においてはアポトーシス誘導は見られなかったと回答された。浮遊細胞数値を含めた更なる検討の余地が残されていること、抗LHK抗体抵抗性細胞株におけるシグナルの解析から新たなアポトーシス抑制機構が見出される可能性があることは、今後の研究課題として期待された。また、正常大腸上皮についてはそのプライマーカルチャーが困難であるため、単離細胞を用いた系での追求を行っていることが述べられた。LHK抗原の同定手段に関する質疑がなされ、今回行われた免疫沈降法に加えて、今後二次元電気泳動を検討しているとの回答がなされた。この点に関して、DNAクローニングも検討すべきであるとの助言がなされた。次にマウス腹腔播種モデルでの検討に関して、治療効果と考えるべきか、予防効果と考えるべきかとの質問がなされた。癌細胞の腹腔内注射と抗LHK抗体の腹腔内注射の時間間隔を考慮すると後者と考えるべきであるが、抗LHK抗体の治療応用のためにマウスモデルでの投与間隔の再検討および上述の正常大腸上皮におけるアポトーシス誘導の追及を行っているかと回答された。腫瘍マーカーとしての臨床応用の可能性に関して、大腸癌の分化度とLHK抗原の発現レベルとの相関に関する質問がなされた。LHK抗原は低分化型腺癌に多く発現している傾向があるものの、更なる検討が必要であると回答された。さらに肝転移症例での追求を深めることにより腫瘍マーカーとしての有用性を見出せるのではないかと助言がなされた。

以上のように、本研究は今後検討すべき課題が残されているものの、LHK抗原はFas抵抗性の大腸癌細胞株にアポトーシスを誘導する新しい分子である可能性が示唆され、腫瘍マーカーとして、また大腸癌治療への臨床応用が期待される点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 日比 紀文  
外科学 北島 政樹 先端医科学 河上 裕  
病理学 坂元 亨宇  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成18年12月19日

# Adenoviral gene transfer of BDNF and GDNF synergistically prevent motoneuron loss in the nucleus ambiguus

(アデノウイルスベクターを用いたBDNFとGDNF遺伝子導入による相乗的な疑核運動ニューロン脱落防止効果の検討)

茂 呂 和 久

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

喉頭麻痺は、悪性腫瘍に対する頭頸部手術の際に、迷走神経あるいは反回神経の損傷の結果生じる。このような術後に、筋萎縮、神経終板および神経線維の変性・再生不良、疑核における運動神経細胞の脱落といった問題が生じ、片側反回神経麻痺患者は、声門閉鎖不全に起因する誤嚥や嚥下障害や嘔声などの症状に悩まされる。片側反回神経麻痺に対する外科的治療では、再神経支配を目的とした術式を除き、声帯注入術・甲状軟骨形成術・披裂軟骨内転術など、どれも声帯を静的に内転させる術式であり、神経学的に声帯運動の回復を目的とはしていない。再神経支配を目的とした術式では、神経損傷後の筋萎縮や疑核運動神経細胞の脱落、神経吻合後における声門閉鎖筋と開大筋の過誤支配、あるいは吻合後のモーターユニット減少など様々な問題があり、思わしい結果に至っておらず、未だ喉頭の動きを回復させる安定した術式としては認められていない。

我々は既に反回神経麻痺における大きな問題点である疑核運動神経細胞脱落に対する遺伝子治療に関して、成体ラット迷走神経除去モデルを用いGDNF遺伝子導入による疑核運動神経細胞脱落防止効果を証明した。本研究では同モデルを用いBDNF遺伝子導入もしくはBDNF及びGDNF遺伝子の同時導入による疑核運動神経細胞脱落防止効果について検討した。

BDNF及びGDNF遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターは成体ラット迷走神経除去モデルにおいて、処置側のみ免疫組織染色にて発現が確認された。また、処置側の疑核を含んだ脳幹において導入遺伝子由来mRNAの発現を確認した。コントロール群と比較し、BDNFもしくはGDNF遺伝子を導入した群では明らかな疑核運動神経細胞脱落防止効果を認めた。両者ではGDNF遺伝子を導入した群よりBDNF遺伝子を導入した群の方がより強い疑核運動神経細胞脱落防止効果を認めた。さらに、BDNF及びGDNF遺伝子を同時導入した群で相乗的な効果が認められ、BDNF及びGDNF遺伝子どちらか一方を導入した群と比較して、強力な疑核運動神経細胞脱落防止効果を認めた。

また、損傷された迷走神経運動神経細胞に対する神経栄養因子の遺伝子導入の効果を検証するために、nitric oxide synthase (NOS) 活性の変化についても検討した。NOS活性は傷害された神経細胞において誘導される。BDNFもしくはGDNF遺伝子を導入した群においては、コントロール群に比較しNOS活性が抑制された。このようなアデノウイルスベクターを用いたBDNFとGDNF遺伝子導入は、迷走神経あるいは反回神経の損傷に際して、臨床的に運動神経細胞脱落防止効果を期待した応用が可能であることが示された。

損傷神経の再生を目的とした反回神経に対する試みとして、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入により運動神経細胞の脱落防止効果を検討した。反回神経損傷により、声門閉鎖不全をきたす患者は誤嚥や嚥下障害、嘔声などの症状に悩まされ続ける。近年、再神経支配を目的とした術式の報告があるが、神経損傷後の筋萎縮や疑核運動神経細胞の脱落、神経吻合後における声門閉鎖筋と開大筋の過誤支配、あるいは吻合後のモーターユニット減少などの様々な問題があり、喉頭運動を回復させる安定した術式としては認められていない。本研究では、成体ラット迷走神経除去モデルを用いBDNF遺伝子導入もしくはGDNF遺伝子導入による疑核運動神経細胞脱落防止効果を認め、さらにBDNF及びGDNF遺伝子の同時導入による相乗的な疑核運動神経細胞脱落防止効果を認め、損傷神経に対する遺伝子治療による再生医療の可能性が示唆された。

審査では、成体ラット迷走神経除去モデルの妥当性について指摘があった。全例を手術用顕微鏡下に頸静脈孔付近での神経除去を施行しており、他の併走する神経および神経節に対する損傷を避けているため、適切なモデルであると回答した。また、アデノウイルスベクターを用いずに直接蛋白を投与する場合とどのような違いがあるかとの質問があった。BDNF及びGDNFを直接神経損傷部位に投与した研究も既に報告されており、その効果も認められている。しかし持続的にポンプを用いるなどして投与しなければならず、臨床応用には非現実的であるため、1回投与にて4週間から8週間の発現が持続可能であるアデノウイルスベクターを用いたと回答した。遺伝子導入されたBDNFとGDNFが同一細胞に発現しているか、また各々の受容体が同一細胞に発現しているかについてさらに検討を加えるべきであると指摘があった。また使用した非増殖型アデノウイルスベクターの臨床応用の現状とその問題点について質問があった。臨床試験では非増殖型アデノウイルスベクターは既に国内外で以前より用いられており、その安全性や効率には問題が無い。また神経細胞のような細胞分裂をしない細胞にもほぼ100%感染が成立する利点がある。しかし、変性疾患対象とし複数回投与する場合には、免疫を獲得し徐々に感染しにくくなる欠点があると回答した。BDNFとGDNFが受容体を介して作用する場合の作用機序について質問があった。BDNFはTrkB、GDNFはGFRα1とRetに特異的に結合し、その下流における複数のシグナル伝達経路の相互作用により神経細胞の脱落が防止されることがわかっていると回答した。さらに効果が相乗的としたのは適切な表現であったかとの指摘があった。BDNFとGDNFは各々特定の受容体と結合し、その下流で複数のシグナル伝達経路により相互に神経細胞脱落防止効果を増強しており、その効果は相乗的であると回答した。

以上、本研究は今後さらに検討を加えるべき点が多く残されているものの、治療遺伝子の同時導入による疑核運動神経の相乗的な神経細胞脱落防止効果を確認し、今後の損傷神経に対する再生医療において有用な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 耳鼻咽喉科学 小川 郁  
解剖学 仲嶋 一範 内科学 鈴木 則宏  
生理学 岡野 栄之  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成18年12月14日

# Anti-tumor effect in an *in vivo* model by human-derived pancreatic RNase with basic FGF insertional fusion protein through anti-angiogenic properties

(FGF挿入型ヒト組み替えRNase-bFGFの血管新生阻害作用を介した*in vivo*モデルにおける抗腫瘍効果)

八 木 洋

## 内容の要旨

悪性腫瘍の増殖が血管新生に依存しており、高密度の血管新生は予後不良に関連していることが最近の研究で明らかになってきている。このため悪性新生物の治療に最も効果的な方法の一つが血管新生を阻害することであると考えられている。

Fibroblast growth factor (FGF) は腫瘍特異的な血管新生に重要な役割を果たす増殖因子の一つであることが知られており、我々は正常な細胞に対して毒性をもたずに腫瘍血管新生を阻害する新たな分子標的薬剤を開発するため、ヒトbasic FGF (bFGF) を、ヒト酵母リボヌクレアーゼ (RNaseI) のリボヌクレアーゼ阻害蛋白 (RI) 結合部位に挿入した蛋白を遺伝子工学的に作製した。作製された新たな癒合蛋白 (CL-RFN89) は、三次元的にRIの結合を阻害することが可能となったため、bFGFとRNaseI双方の性質を合わせ持ち、FGF受容体を発現する血管内皮細胞などに特異的に結合した後、RNaseIが細胞内へ取り込まれるとRIの抑制を受けずに高い殺細胞効果を示した。

本実験では、この新しい癒合蛋白であるCL-RFN89を用いて、血管新生阻害作用を介した*in vivo*マウスモデルでの抗腫瘍効果を検討した。マウスの右背部皮内にFGF受容体を発現しないヒト扁平上皮癌細胞 (A431) を植え込んだ後、翌日CL-RFN89を腹腔内投与し、対照群としてbFGF、PBSをそれぞれ投与した。投与後それぞれの薬剤を同量浸透圧ポンプに封入し、マウス左背部皮下に埋め込み、この浸透圧ポンプから薬剤が7日間持続皮下投与された。腫瘍の最大径と最小径から推定腫瘍重量を連日測定し、持続皮下投与終了後腫瘍を摘出して最終腫瘍重量を計測した。さらに持続皮下投与終了後に腫瘍を摘出し凍結切片を作製して、ラット抗マウスCD31抗体を用いて免疫染色を行った。コンピューター画像解析を用いて微小血管密度 (MVD) の測定を行い、腫瘍血管の占領面積率を求めた。

その結果CL-RFN89によるsystemicな投与で、*in vivo*における腫瘍増殖は有意差をもって抑制された ( $p=0.0003$ )。また最終腫瘍重量比はコントロール群と比較し、CL-RFN89投与群で58.2%抑制された ( $P<0.0001$ )。免疫染色ではコントロール群とbFGF単独投与群で、腫瘍内のviableな細胞の間に大口径で口径不均一な血管の高度な増生を認めたが、対照的にCL-RFN89投与群では、小口径で均一な血管の増生を認めるのみであった。CD31陽性血管を画像解析した結果、CL-RFN89の血管新生阻害作用により、腫瘍内での血管占領面積率がコントロール群・bFGF単独投与群と比較し有意差をもって低値を示した ( $p<0.0001$ )。

これらの結果は、CL-RFN89が血管新生阻害作用を介した新しいsystemicな抗腫瘍薬剤として期待できることを示している。

## 論文審査の要旨

悪性腫瘍の増殖は血管新生に依存していることが明らかになってきており、bFGFはこの過程に重要な役割を担うと考えられている。我々はヒトbFGFをヒトRNaseIのRI結合部位に挿入した蛋白を遺伝子工学的に作製した。この新たな癒合蛋白 (CL-RFN89) はbFGFとRNaseI双方の性質を合わせ持ち、FGF受容体を発現する血管内皮細胞などに特異的に結合した後、細胞内へ取り込まれ、三次元的にRIの結合を阻害して高い殺細胞効果を示した。本研究では*in vivo*マウスモデルを用いて、CL-RFN89の血管新生阻害作用を介した抗腫瘍効果が実験的に示された。

審査では、実験に用いたA431細胞の選択理由について質問がなされた。増殖の安定性と血管新生阻害のみを検討するためにFGF受容体が発現していない細胞を選択したと回答されたが、癌細胞が血管新生のみでなく細胞間質内のfibroblastなどに強い影響を受けることが指摘され、間質誘導の強い消化器癌細胞を用いた実験系での検討や、間質内の細胞壊死など詳細な病理学的検討の必要性が指摘された。またbFGFがfibroblastに与える影響について質問がなされ、促進的な効果を否定するために増殖因子活性が低いbFGFの変異株を用いた追加実験が検討されていることが示された。さらに*in vivo*における本癒合蛋白の細胞内への取り込みの証明、或いは血管新生阻害がRNaseIの直接作用の結果であることの肉眼的検討の有無について質問があったが、対象細胞の抑制や半減期の短さにより*in vivo*での局在証明が困難である点から本実験では施行していない旨が回答された。続いて投与方法についての再確認と臨床での投与の困難性についての指摘がなされた。様々な投与方法の検討から腫瘍植え込み直後の腹腔内投与とそれに続く持続皮下投与のみに効果を認めたことが示され、臨床応用時の至適投与方法について腫瘍切除後の予防的投与の提案がなされた。また腫瘍が産生するFGFとの競合について指摘がなされ、投与量や投与時期などの関連が示唆されたが理論的裏付けの必要性が示された。本癒合蛋白の利点としてヒト由来による低免疫原性と、高分子化合物であるための固形腫瘍への高い選択性が示された。これに対し一部の構造変化がもたらす新たな免疫原性の獲得とそれによる臨床応用の困難性に加え、すでに臨床応用されているVEGF阻害剤との比較や併用効果についての指摘がなされたが、今後高分子化合物の腫瘍周囲の薬物動態についての確認と、他の薬剤との比較検討の必要性が課題として残された。最後に今後の展望と副作用についての質問がなされた。FGF受容体高発現細胞である悪性黒色種、乳癌、神経膠腫に対する抗腫瘍効果やリウマチモデルでの抗炎症効果について、また副作用として脳や創傷治癒遅延などの可能性について今後の検討課題として提示された。

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、*in vivo*でのsystemicな投与により腫瘍増殖抑制効果を示したことは、この挿入型組み替え蛋白がFGF受容体を分子標的とした新しい抗腫瘍薬剤の開発へ発展する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 外科学 北島 政樹  
先端医科学 河上 裕 病理学 坂元 亨宇  
内科学 日比 紀文  
学術確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 河上 裕

試問日: 平成18年12月20日

# Efficacy and Immunologic Responses to Influenza Vaccine in HIV-1-Infected Patients

(HIV-1感染者におけるインフルエンザワクチンの有効性と免疫応答)

山 中 ひ か る

## 内容の要旨

HIV-1感染者に対するインフルエンザワクチンについては、接種が勧められている一方でその有効性についてのエビデンスは少ない。我々は、大規模な前方視的調査により、HIV-1感染者におけるインフルエンザワクチンの臨床効果と免疫応答について検討した。

対象は、2002年11月と12月に国立国際医療センターに受診したHIV-1感染者328名（うちインフルエンザワクチン接種262名、非接種66名）、同時期にインフルエンザワクチンを接種した健康人（病院職員）27名である。HIVウイルス（HIV-RNA）量、CD4陽性T細胞数、インフルエンザ抗体価、hemagglutinin（HA）抗原特異的CD4陽性Tリンパ球数を、インフルエンザワクチンを接種した者についてはワクチン接種前・接種後8週・16週の3点で、非接種者についても初回検査時から8週毎に行った。単離した末梢血単核球をワクチンと同じHA抗原加えて培養し、CD4陽性T細胞のうちγインターフェロンを産生した細胞の数をHA抗原特異的CD4陽性T細胞数とした。インフルエンザ罹患の診断は、臨床症状に迅速診断キット・ウイルス分離、抗体価上昇などのウイルス学的診断を組み合わせで行なった。

臨床試験期間中のHIV-1感染者におけるインフルエンザ罹患率は、ワクチン接種群で6.1%（16名）であり、非接種群の21.2%（14名）に比して有意に低値（相対危険度0.29）であった。すなわち、HIV-1感染者におけるインフルエンザワクチンの臨床的有効性が確認された。ワクチン接種前の抗体がH1・H3抗体ともに陰性（10U未満）であったHIV-1感染者群では、ワクチン接種後の抗体価上昇は、CD4陽性Tリンパ球数が200/μl未満の群で200/μl以上の群よりも有意に低かった。これに対して、接種前の抗体が要請であったHIV-1感染者群では、CD4陽性Tリンパ球数に関係なく健康人とほぼ同等の抗体価上昇を認めた。従ってHIV-1感染者においては、抗体価を一定基準以上に維持するために、インフルエンザワクチンを毎年接種することが重要であると考えられた。HA抗原特異的CD4陽性T細胞数は、HIV-RNA量と逆相関し、特に抗HIV療法によりHIV-RNA量が減少したHIV-1感染者群では、無治療群に比較して有意に高値であった。すなわち、抗HIV療法がインフルエンザワクチンに対する免疫応答を改善させることが示された。一方、HIV-RNA量とインフルエンザ罹患率の間には相関が認められなかった。

HIV-1感染者において、インフルエンザワクチンが臨床的に予防効果を発揮すること、インフルエンザワクチンを毎年接種することにより更に良好な抗体獲得が期待されること、抗HIV療法によってワクチンに対する細胞性免疫応答の改善が期待されること、が示された。

## 論文審査の要旨

HIV-1感染者に対するインフルエンザワクチンについては、その有効性を示すエビデンスは少なく、接種後の免疫応答が抗HIV療法により改善するかも立証されていない。本研究では、HIV-1感染者におけるインフルエンザワクチンの臨床効果と免疫応答に影響を与える要因を検討する目的で、大規模な前方視的調査を行った。

対象は2002年11月と12月に受診したHIV感染者（ワクチン接種者262名、ワクチン非接種者66名）と健康対照27名である。HIVウイルス（HIV-RNA）量、CD4陽性T細胞数、インフルエンザ抗体価、hemagglutinin（HA）抗原特異的CD4陽性Tリンパ球数を、インフルエンザワクチンを接種した者についてはワクチン接種前、接種後8週、16週の3点で、非接種者については8週間隔で行った。インフルエンザ罹患の診断は、臨床症状と迅速診断キット、ウイルス分離、抗体価上昇などのウイルス学的診断を組み合わせで行なった。HIV感染者においてインフルエンザワクチンが臨床的に予防効果を発揮すること、毎年接種するにより更に良好な抗体獲得が期待されること、抗HIV療法によりワクチン接種後の細胞性免疫応答の改善が期待されること、が示された。

審査では、HA抗原特異的CD4陽性Tリンパ球数にばらつきが大きい理由について質問され、健康対照でも平均0.2-0.3%と低値であり、HIV感染症による高度の免疫抑制状態ではさらに低反応であったためと考えられる、と回答された。ワクチン非接種者数を増やすことができれば、特にCD4陽性T細胞数200/μl以下の患者におけるインフルエンザ罹患率について十分な解析を行うことができたはずであり、今後、改めて患者から同意を得ることにより再解析を行えば、重要なデータが得られるとの助言がなされた。臨床症状を認めなかったにも関わらずワクチン接種後に抗体価が上昇したHIV感染者を解析対象から除外した理由について質問され、抗体価の変動について正確に評価するために、厳しい条件により対象を絞り込むことが有用と考えたため、と回答された。毎年接種の重要性を示すためには、接種後16週よりも更に長期にわたり抗体価が維持されることを立証する必要がある点について、ワクチン接種1年後においても高い抗体価が維持されることが追加データとして提示された。抗体価とCD4陽性Tリンパ球数のいずれが罹患予防効果と関連するか、という点について、今後さらに広い視野で解析を行うべきである、との助言があった。

以上のように、本研究には更に検討されるべき課題を残しているものの、HIV感染者におけるインフルエンザワクチンの効果を大規模な前方視的研究により初めて明らかにした点が評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 幸雄

衛生学公衆衛生学 武林 亨 微生物学・免疫学 小安 重夫  
内科学 池田 康夫

学力確認担当者：池田 康夫

審査委員長：武林 亨

試問日：平成19年1月11日

# Deinstitutionalization of long-stay patients with schizophrenia: the 2-year social and clinical outcome of a comprehensive intervention program in Japan

(長期入院統合失調症の脱施設化：日本における包括的介入プログラム2年後の社会的・臨床的成果)

龍 庸 之 助

## 内容の要旨

わが国の精神科医療においては、地域中心の医療体制へ移行する脱施設化の機運は高まりを見せているものの、その方法論などの臨床的検討はほとんどなされていない。一方欧米諸国では1950年代より脱施設化が進められ、地域における治療や支援に関する新たな方法論の開発が進められている。

現在我々は福島県郡山市の精神科病院の閉鎖に伴い退院し、共同住居に入居した精神障害者を対象として、Optimal Treatment Project (OTP) (統合型地域精神科治療プログラム) と呼ばれる包括的な地域ケアサービスによりケアを提供しながらコホート研究を実施している。本研究では2年間の経過における対象の社会活動面と精神症状の変化について検討した。

対象はICD-10にて統合失調症と診断された78名(男性51名・女性27名)。方法は、退院時と退院2年後でPANSSにより精神症状を、GAFで生活機能の全般的水準を、SAIで病識を、またREHABとSFSで社会機能、DAIで服薬感、MMSEで認知機能をそれぞれ評価した。さらに生活の維持に関連があるとされる抗精神病薬の総服用量(CP換算)とBMIを検討した。本研究では上記の9種の評価項目に関し、退院時と退院2年後での評価をT検定、Wilcoxonの順位つき符号検定と比較、検討した。さらに多項回帰分析を用いて性別、退院時年齢、通算入院年数等の臨床疫学的状況と、評価項目の2年間での変化量との相関を検討した。

結果は退院後2年間にわたり退院生活を維持し得たものは60名(平均入院年数:26.1年)、維持し得なかったものは18名であった。上記60名中、2年間で保護的就労に8名が参加、2名が共同住居より福祉ホームとアパートに移った。上記60名に対し実施した検討結果ではPANSSの各項目、GAF、REHABの社会的活動性、言葉の技能、言葉のわかりやすさ、セルフケア、全般的行動、SFSの社会的引きこもり、個別の能力、個別の実行状況、雇用の各項目で有意な改善を認めた。SAIとBMIでは有意な悪化を認めた。また、多項回帰分析の結果では、退院時の年齢が若いほど、通算入院年数が短いほど、GAFの改善が認められ、教育期間が長いほど、また、退院時の認知機能が高いほど、抗精神病薬服用量は増加した。

本研究から、脱施設化に際しOTPに基づいた適切な治療・支援を提供することによって、長期間入院していた統合失調症でも、就労や単身生活など目標を持った社会活動を送れる可能性があり、少なくとも精神症状は改善傾向を示すことが確認された。このことは、生活の場を移すことや、病院での作業などを実施するだけでなく、日常生活も含めた社会生活全般への多職種チームによる支援を提供することが、生活を維持する上で重要であることを示唆している。

## 論文審査の要旨

本研究は精神科病院から共同住宅への施設転換により退院し共同住居に入居した統合失調症を対象として、統合型地域精神科治療プログラム(OTP)と呼ばれる包括的な地域ケアサービスを提供し、退院後2年間の対象の社会的・臨床的变化を評価、検討したものである。2年間での生存群(退院継続群:60例)は77%で、地域での精神科治療への移行は順調であった。脱落群は23%(18例)で、脱落理由は、精神症状悪化が5%、身体疾患が15%で、身体面の配慮が重要と考えられた。生存群には退院時と退院2年後で各評価の統計学的検討を行い、精神症状、全般的機能、社会機能の評価の一部で有意な改善を認めた。病識とBMIは悪化していた。生存群ではさらに性別、教育期間などの背景項目と個々の評価項目の2年間での変化量を重回帰分析にて検討し、直前の入院期間が長い程、共同住宅での社会機能のよいことが確認された。以上より、適切な治療・支援の提供により長期入院の統合失調症においても社会生活は可能であり、また社会生活の継続には身体面の配慮が重要であると結論された。

審査ではまず対象に関し質問がなされた。統合失調症の病型による差異が問われ、差異はないと回答された。次に急性期症状のある場合にも地域移行が可能かとの間があり、そのような場合は困難であること、また対象からの除外例については、入院していた統合失調症の全例が対象となったと回答された。病院閉鎖と共同住居の設置に関し、過去の同様の試みについての質問がなされ、本邦で初めての試みであり、また欧米では行政主導で住居確保などの環境整備がなされており同様の試みはないと回答された。大都市でも実施可能であるかについては、OTPに基づく地域支援は地域特殊性は少なく全国どこでも実施可能であるが、医療経済的な問題に関しては、脱施設化に伴う経済的な裏づけは我が国では未だなく、今後の検討が望まれるとの回答がなされた。病院から共同住居へ施設転換した結果、最も変化した点につき質問があり、社会心理的環境の変化により当事者に責任ある能動的な行動が求められるようになったことであると回答された。病識と服薬観の悪化に関しては、評価スケール自体の問題があるとの回答があった。また統計学的手法に関する文献記載につき示唆がなされた。

以上のように、本研究には今後検討されるべき課題を残しているが、本邦初の長期入院統合失調症の脱施設化に関する追跡研究であり、今後の脱施設化の可能性を肯定する資料がえられた点、臨床的、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 精神神経科学 鹿島 晴雄  
衛生学公衆衛生学 大前 和幸 内科学 鈴木 則宏  
医療政策・管理学 池上 直己  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 大前 和幸

試問日:平成19年1月17日

# Induction of Indefinite Survival of Fully Mismatched Cardiac Allografts and Generation of Regulatory Cells by Sarpogrelate Hydrochloride

(組織適合抗原完全不一致マウス心移植モデルにおいて塩酸サルボグレラートは移植心の無期限生着と免疫制御細胞を誘導する)

秋 好 沢 林

## 内容の要旨

臓器不全に対する最終的治療法である臓器移植の成績は、免疫抑制剤の進歩により目覚しく進歩したが、拒絶反応の抑止は完全ではなく、また薬剤による副作用（腎毒性・耐糖能異常）や非特異的な免疫抑制による副作用（発癌や感染症のリスクの増加）が解決されない問題点として存在する。これらの副作用を防止し治療成績を向上させるための究極目標は、ドナー特異的な免疫寛容を誘導することである。その機序としては、拒絶に関与する細胞の消去（deletion）および機能的応答（anergy）、免疫制御細胞の誘導（regulation）などが考えられているが、骨髄から常時新しいドナー反応性細胞が供給される状況では、免疫制御細胞の誘導がより効果的と思われる。移植後の急性拒絶反応を防いだ後の維持期において、免疫制御細胞を誘導する薬剤を用いれば、永続的な免疫抑制剤の投与を避けることができる。今回はすでに慢性動脈閉塞症で臨床使用されている塩酸サルボグレラート（以下SH）の免疫制御細胞誘導効果を中心に調べた。

CBAマウスの腹部にC57BL/10マウスの心臓グラフトを移植する異所性心移植モデルを用いた。SHを投与しグラフト生着期間に与える影響を検討した。細胞移入実験（adoptive transfer study）により免疫制御細胞の誘導の有無を確認した。接着分子ICAM-1に対する免疫染色、組織学的検討、白血球混合培養（MLC）、酵素免疫測定法（ELISA）を行った。

SH非投与群のCBAマウスにおいてはC57BL/10マウスの心臓グラフトのMST（median survival time）は8日であった。これに対して10mg/kgのSHを投与されたCBAマウス全例で心臓グラフトは100日間以上生着した。C57BL/10マウスの心臓グラフトを移植されたSH投与群のCBAマウス（第一レシピエント）から脾細胞を取り出し、これを静注移入したCBAマウス（第二レシピエント）においてもC57BL/10マウスの心臓グラフトはMSTが100日間を越えた。第一レシピエントからCD4陽性細胞のみを分離し、これを静注移入したCBAマウスでもC57BL/10マウスの心臓グラフトはMSTが100日間を越えた。SH投与によって心臓グラフト内の血管内皮細胞におけるICAM-1の発現増加は抑制されていた。拒絶反応の低下はMLCにおいても確認された。SH投与群由来のリンパ球においては非投与群と比較してIL-4とIL-10の放出量が増加していた。

SH投与によって心移植片の永久生着を誘導し、かつMHC完全一致心臓グラフトの拒絶を抑制するCD4陽性免疫制御細胞が誘導できた。また、SH投与によって心臓グラフトにおけるICAM-1の発現が抑制されること、IL-4とIL-10の放出量が増加することがわかった。

## 論文審査の要旨

臓器移植の成績は免疫抑制剤の進歩によって向上したが、免疫抑制剤には副作用も存在する。免疫抑制剤の副作用を防止し治療成績を向上させるための究極目標は、ドナー特異的な免疫寛容を誘導することである。その機序としては免疫制御細胞の誘導がより効果的と思われる。本研究では5-HT<sub>2</sub>受容体の選択的アンタゴニストである塩酸サルボグレラート（SH）投与によってマウス異所性心移植モデルにおいて心移植片の永久生着を誘導し、かつMHC完全不一致心臓グラフトの拒絶を抑制するCD4陽性免疫制御細胞を誘導し得た。また、SH投与によって心臓グラフトにおけるICAM-1の発現が抑制されること、IL-4とIL-10の放出量が増加することを解明した。

審査では、SHによって誘導された免疫制御細胞の分画についての質問がなされたが、Foxp3等について更なる検討の必要性が指摘された。皮膚実験で示されたSHの免疫抑制効果とそのドナー特異性に関しての質問がなされたが、皮膚移植モデルでは心臓移植モデルと比べて拒絶のハードルが高いために10mg/kgのSHでは皮膚グラフトの無期限生着が誘導されないと思われること、厳密にドナー特異性を検討するためにはドナーとレシピエントの組み合わせを入れ替える必要があること、心移植モデルでドナー特異性を検討するために再移植を行うことは技術的に非常に困難であるために皮膚移植を用いて検討したと回答された。SHの副作用についての質問がなされ、日常臨床において閉塞性動脈硬化症に対して用いられている300mg/dayという臨床用量では副作用は少ないと回答された。臨床応用のための大動物実験の必要性についてどう考えるかという問いには、まずマウス心移植モデルにおいて他の同種異系間の組み合わせにおいてSHの免疫抑制効果を検討し、その上で大動物実験を行うべきであると回答された。塩酸サルボグレラートの心筋に対する虚血再灌流障害の抑制効果と心筋保護効果について質問がなされたが、更なる検討が必要であるとされた。SHが心臓グラフトにおける吻合部での内臓肥厚に及ぼす影響についての質問がなされたが、大動脈移植実験においては吻合部での内臓肥厚は個体差が大きかったこと、大動脈グラフトの真ん中では非投与群と比べて投与群では有意に内臓肥厚が抑制されていたことが回答された。移植医療における他の抗血小板薬との比較試験に関して問われたが、同様の心移植モデルにおいてアスピリンには免疫抑制効果がないことが過去に示されていること、SHは本邦における開発薬剤であるため海外では知名度が低いことが述べられた。

以上のように本研究は更なる検討課題を残しているものの、塩酸サルボグレラートの免疫制御細胞誘導効果を示し、ドナー特異的な免疫寛容の誘導に寄与する可能性を示した有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
外科学 四津 良平 内科学 小川 聡  
微生物学・免疫学 小安 重夫  
学術確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：四津 良平

試問日：平成19年2月14日



# Knot-tying Force during Suturing and Wound Healing in the Gastrointestinal Tract

## (消化管における至適結紮力と創傷治癒の解析)

小 熊 潤 也

### 内容の要旨

【緒言】教室において手術支援ロボットを用い内視鏡下手術を施行した経験から、鉗子に力覚のフィードバック機構が欠如しているために繊細な手術操作が困難である問題点が明らかになった。ロボット手術において組織に対し術者が適切な縫合結紮操作を行うためには、縫合糸の結紮力に関する客観的データが必要となる。本研究の目的は、動物モデルを用いて消化管の切開創における結紮力を実際に測定し、糸の結紮力と創傷治癒との関係を検討し、至適結紮力を推定することである。本研究では組織に対する至適結紮力を評価する際の創傷治癒のパラメータとして、縫合結紮部の血管新生および増殖因子発現の経時的変化に着目した。さらに、結紮部の局所血流をリアルタイムに計測し、組織が虚血となる結紮力を判定した。

【材料・方法】ビーグル犬を用い、胃および空腸の漿膜面に全層切開を加え、各切開創を縫合し、段階的にあらかじめ設定した結紮力で結紮操作を行った。その後一旦閉腹し、第4, 7, 11, 14病日にそれぞれ再開腹して胃および空腸を摘出した。HE染色および免疫組織化学的染色 (FactorⅧ、bFGF) を行い、各結紮力における組織像の評価および微細血管密度、bFGF陽性細胞密度の測定を行った。胃および空腸の漿膜面に全層縫合を行い、レーザードップラー血流計を用いて、あらかじめ設定した結紮力における局所血流をリアルタイムに測定した。

【結果】局所血流については胃、空腸とも1.5Nまでは結紮力と負の相関を示すが、2.0N以上の結紮力では血流は不変となり低値を示した。胃では第7病日、空腸では第7, 第11病日における結紮力1.5Nでの切開再縫合部の粘膜下層の微小血管密度が他の結紮力に比べ高かった。bFGFの発現について、胃では第4, 第7病日、空腸では第11病日において、結紮力1.5Nでの切開再縫合部の粘膜固有層のbFGF陽性細胞密度が他の結紮力に比べ高かった。

【考察】本研究では、創傷治癒の組織学的パラメーターとして、血管新生および増殖因子の観点から至適結紮力を検討し、1.5Nが消化管の創傷治癒における至適結紮力であるという客観的評価ができた。また結紮力と局所血流との関係の検討から、胃および空腸のいずれにおいても、1.5Nより強い結紮力では組織が虚血に陥り、その後の創傷治癒に障害をきたす可能性が示唆された。教室で鉗子の力覚情報をディスプレイや警告音で術者へ伝えるシステムを開発しており、本研究の結果からこのシステムを用いて至適な結紮力での結紮操作が可能となると考える。また、現在鉗子先端の力覚情報を術者の手に伝えるシステムを開発中で、さまざまな触覚情報をデータベース化してシステムに組み込む際に、本結果が生体側のデータとして生かされ、今後の触覚付加鉗子の開発に貢献するものと考えられる。

### 論文審査の要旨

近年、内視鏡下手術は低侵襲性治療として多施設に普及してきているが、従来の開胸・開腹手術と比較すると手術操作において難易度が高いといわざるを得ない。教室において手術支援ロボットであるda Vinciの使用経験から、難易度の高い操作を安全かつ容易に施行できるという利点を有しているが、鉗子に力覚や触覚のフィードバック機構が欠如しているために繊細な手術操作が困難である問題点が明らかとなった。ロボット手術において、術者が組織に対し適切な縫合・結紮を行うためには、縫合糸の結紮力に関する客観的データが必要である。本研究では実験動物としてビーグル犬を用い、糸の結紮力と創傷治癒との関係を検討することにより至適結紮力を検討した。結紮力と局所血流の関係および創傷治癒過程における血管新生やbFGF発現の観点から、1.5Nの結紮力が犬の消化管の創傷治癒における最も至適な結紮力であることが示唆された。

審査ではまず、免疫組織学的検討で用いられた抗体の由来および交叉感受性について質問がなされ、由来はヒトであり、犬との交叉感受性はあるけれど、この件に関して確認実験は行っていないと回答された。続いて各結紮力での縫合部の肉眼的、組織学的特徴につき比較検討は行ったかという質問がなされた。各特徴についての概要は実験的に把握していたが、経時的な検討は施行していないと回答され、創傷治癒を評価する場合にはまず形態的な特徴、経時的変化を評価した上で、各パラメーターによる客観的評価をすべきとの助言がなされた。また胃と空腸で血管新生とbFGF発現のタイミングに差がある理由についての質問がなされた。今までにこのような検討がなされた報告はなく、本結果から臓器によりbFGFの創傷治癒における役割の違いがあるのではないかと回答された。この点については各臓器の機能的役割による相違とも関係がある可能性もある興味深い結果であり、今後さらに検討するべきであると助言された。本研究で創傷治癒のパラメーターとして評価した微小血管とはどの程度のレベルの血管かとの質問もなされ、過去の微小血管密度を評価した報告の方法に従い、直径50μm以下の血管を微小血管としたと回答された。本研究はbFGF発現に関しては免疫組織学的な検討のみであり、さらに分子生物学的手法による検討がなされればさらに正確な評価が可能であったのではないかと指摘があった。

以上のように、本研究では今後さらに検討すべき課題を残しているが、今までなされなかった組織に対する結紮力と創傷治癒との関係を客観的に評価し、消化管に対する至適結紮力を明らかにした点で、今後のロボット手術の発展に貢献し得る意義ある研究と評価された。

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  
外科学 小林 紘一  
学術確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成19年1月31日

# Predictors of Vessel Remodeling Following Directional Coronary Atherectomy

(冠動脈方向性アテローム切除術後の血管リモデリングの予測因子)

河村 朗夫

## 内容の要旨

冠動脈ステント留置術は狭心症の治療に広く用いられ、冠動脈再狭窄率の減少に貢献してきた。一方で方向性アテローム切除術 (Directional Coronary Atherectomy: DCA) は冠動脈内アテロームを切除することが可能な唯一の治療法である。血管内超音波法によるアテローム部位の適確な診断とDCAを併用することでステント留置術よりも優れた結果が得られる可能性が示されている。

これまでの研究によれば、DCA後の再狭窄の主たる要因は治療後から慢性期にかけて血管が縮小する現象、すなわち負のリモデリングであることが指摘されている。アテロームが増加しても血管径が増大 (正のリモデリング) すれば血管内腔は保たれ再狭窄を免れるが、負のリモデリングを生じるとアテロームが増えなくても再狭窄を生じる。これまで、DCA施行後に冠動脈が正のリモデリングを生じるのか、あるいは負のリモデリングを生じるのかを予測することは困難であった。本研究では血管内超音波法を用いてDCA施行後の冠動脈リモデリングに関与する因子を明らかにすることを目的とした。

安定狭心症に対しDCAを施行した43病変を対象とした。術前、術後、遠隔期の三点において血管内超音波法を行い、冠動脈病変部の全血管断面積、血管内腔断面積、アテローム断面積を計測した。さらにアテローム量の指標として面積狭窄率 (アテローム断面積/全血管断面積×100) を算出した。正のリモデリング群 (遠隔期全血管断面積>術後全血管断面積) と負のリモデリング群 (遠隔期全血管断面積<術後全血管断面積) との2群に分け、患者背景因子、手技背景因子、冠動脈造影所見、血管内超音波所見、再狭窄率などを比較検討した。

DCA施行後43例中21例 (49%) が遠隔期にかけて正のリモデリングを生じ、22例 (51%) が負のリモデリングを生じた。単変量解析において正のリモデリングを生じた群は術前の全血管断面積、および内腔断面積が小であり、術直後の全血管断面積と面積狭窄率が小であった。多変量解析の結果、術直後の面積狭窄率<40%が冠動脈の正のリモデリングを予測する唯一の独立した因子であった (オッズ比6.7,  $p=0.004$ )。正のリモデリングを生じた群では負のリモデリングを生じた群に比して再狭窄率が低い傾向がみられた (18.2% vs. 9.5%,  $p=0.4$ )。

本研究においてDCA施行後の残存アテローム量が術後の冠動脈リモデリングに影響をおよぼすことが明らかとなった。DCA施行後の残存アテローム量が少ないほど冠動脈は遠隔期にかけて拡張し内腔が保持され、再狭窄過程を抑制する可能性が考えられた。

DCA施行後の残存アテローム量は冠動脈リモデリングを規定した。残存アテローム量の指標である面積狭窄率が40%未満であることが、遠隔期の正の冠動脈リモデリングを予測する唯一の独立した因子であった。

## 論文審査の要旨

冠動脈ステント留置術は冠動脈疾患の治療に広く用いられているが、異物であるステントに対する血管内皮の反応が過剰な場合は、内膜の増生により再狭窄をきたす。一方で方向性アテローム切除術 (Directional Coronary Atherectomy: DCA) は冠動脈内アテロームを直接切除し除去することが可能な唯一の治療法である。DCA後の再狭窄の機序においては内膜の増生の関与は少なく、むしろ血管径の縮小 (負のリモデリング) が主因と考えられている。本研究では血管内超音波法を用いて DCA施行後の冠動脈リモデリングに関与する因子を明らかにすることを目的とした。その結果、DCA施行直後の残存アテローム量の指標である面積狭窄率が40%未満であることが冠動脈の正のリモデリングを予測する唯一の独立した因子であった。さらに臨床的なエンドポイントである再狭窄率は正のリモデリングを生じた群で低率である傾向を認めた。DCA施行後の再狭窄を抑制するためには正のリモデリングが有利であり、術後の面積狭窄率が40%未満となるまでアテロームの切除を行うべきであると示唆された。

審査では、まずDCAによるアテローム切除の深達度、切除された検体の組織学的評価がなされているかどうかについて質問がされた。冠動脈壁構造の評価に関する血管内超音波法は精度が高く、深達度に関しては十分な評価がなされていると回答された。一方、本研究ではアテロームの組織学的、生化学的検討はなされておらず、この点が本研究の限界であると回答された。また今後の血管内超音波法の臨床応用について質問がなされた。冠動脈疾患の診療においては、心筋梗塞の発生母地となる可能性のある不安定なアテロームを検出することが今後の重要な課題であり、血管内超音波法により得られた所見を病理組織所見や冠動脈CT所見と対比することにより、不安定なアテロームを早期発見し薬物治療などにより安定化を図ることが期待されると回答された。次にDCAの使用頻度、冠動脈ステントとの使い分けに関して質問がなされた。薬剤溶出性ステントの登場によりDCAの使用頻度は減少したが、現在でも約5%の症例に用いられており、とくに分岐部病変においてステントを留置する前にアテロームを減少させるための処置として有用性が高いと回答された。最後にDCA施行後6ヶ月以降の、さらに長期的な血管リモデリングの状態や予後について検討がなされているかどうかにつき質問がなされた。それに対して冠動脈造影、血管内超音波法は侵襲的な検査であり、頻回に行うことは現実的ではなく本試験では6ヶ月以降の追跡がなされていないと回答された。この点に関して低侵襲な冠動脈CT検査を用いて追跡することが可能ではないかと助言を受けた。

以上のように、本研究には更なる検討課題を残しているものの、冠動脈方向性アテローム切除術後の血管リモデリングの原因として残存アテローム量の関与を明らかにした有意義な臨床研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 再生医学 福田 恵一  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成19年2月5日

# Intravesical Ultrasonography for Tumor Staging in an Orthotopically Implanted Rat Model of Bladder Cancer

(ラット正所性膀胱腫瘍モデルにおける病期診断のための膀胱内超音波検査)

佐藤 裕之

## 内容の要旨

動物モデルを用いた膀胱腫瘍の研究において腫瘍の成長や進展を経時的かつ非侵襲的に確認できることが有用である。しかし、現在までこの様な方法は確立されていない。今回申請者は、ラット正所性膀胱腫瘍モデルに対して血管内超音波診断装置を用い膀胱内超音波検査を施行し膀胱癌の腫瘍径および深達度を評価し、その有効性を検討した。

ラット由来膀胱癌株AY-27細胞を用い、雌のフィッシャーラットF344に膀胱癌を作成した。多種の病期の癌モデルを必要とするため2つのモデルを作成した。表在型/筋層浸潤型多発腫瘍モデルとして、膀胱粘膜を0.1N塩酸溶液で傷害しAY-27細胞 $4 \times 10^6$ 個の細胞溶液を膀胱に注入、1時間接触させ表在型多発性の腫瘍を13匹に作成した。単発性浸潤型腫瘍モデルとして、ラットを開腹の上、直接膀胱前壁にAY-27細胞を27ゲージ針で膀胱壁内に注入し単発の粘膜下腫瘍を7匹に作成した。腫瘍細胞投与後7日から10日後、麻酔下背臥位でラットに0.75mm径の細径内視鏡を経尿道的に挿入し、腫瘍の確認を行った。その後、経尿道的に2.5Frの血管内超音波装置(10MHz)に挿入、膀胱に0.8mlの生理食塩水を注入し膀胱を進展させ、膀胱を横断面で超音波検査を施行した。膀胱の壁構造、膀胱腫瘍の形態と局在、腫瘍径と深達度について超音波診断を行った。内視鏡および超音波施行後にラットより膀胱を摘出し、腫瘍を病理組織学的に評価した。

膀胱内超音波検査では、正常ラット膀胱は膀胱粘膜・粘膜下層、筋層、膀胱外周囲組織の3層の構造が確認できた。観察は5分程度であり、繰り返し行うことでの重篤な合併症も認めなかった。腫瘍モデルではすべてのラットに腫瘍の作成を確認でき、膀胱内超音波検査において腫瘍はその局在と腫瘍径が確認でき、0.5mm以上の腫瘍はすべて評価可能であった。また腫瘍の筋層浸潤や膀胱外進展も診断可能であり、腫瘍径や深達度を測定でき、病期診断が可能であった。表在性/筋層浸潤型多発腫瘍モデルでは、腫瘍は粘膜および粘膜下層に軽度高エコーの隆起性病変として観察された。34個の腫瘍のうち27個は表在癌であり、病理組織学的にも証明された。また、単発性浸潤癌モデルでは腫瘍な軽度高エコーの均一な結節状病変として観察され、腫瘍の大きさは組織学的にも一致した。膀胱内超音波検査による病期診断は病理組織学的病期診断と比較し85%が一致した。

ラット正所性膀胱癌モデルにおいて血管内超音波システムを用いた膀胱内超音波診断法は有効かつ非侵襲的であり、膀胱腫瘍の大きさや深達度の評価が可能であり、今後の膀胱腫瘍モデルを使用した研究において有効な手段であると考えられる。

## 論文審査の要旨

動物モデルを用いた膀胱腫瘍の研究において腫瘍の成長や進展を経時的かつ非侵襲的に確認できることが有用である。しかし、現在までこの様な方法は確立されていない。今回申請者は、ラット由来膀胱癌細胞株AY-27細胞を用いたラット正所性膀胱腫瘍モデルに対して血管内超音波診断装置を用い膀胱内超音波を施行し膀胱癌の腫瘍径および深達度を評価し、その有効性を検討した。その結果、血管内超音波システムを用いた膀胱内超音波診断では膀胱の横断面が観察でき、膀胱の壁構造も充分評価できた。腫瘍はその局在と腫瘍径が確認でき、0.5mm以上の腫瘍は評価可能であった。また腫瘍の筋層浸潤や膀胱外進展も診断可能であり、腫瘍径や深達度を測定できた。膀胱内超音波法による病期診断は病理組織学的病期と比較して85%が一致し、繰り返し行うことでの重篤な合併症も認めず、有用な測定方法であることが示された。

審査では、まず、AY-27細胞による癌の浸潤度と分化度につき質疑された。この細胞は乳頭状の腫瘍を形成する高分化型の移行上皮癌であり、やや広基性に腫瘍が作成され、浸潤性はそれほど高くないと報告されていたが、実際に超音波を施行し、内視鏡での評価ではわからなかった筋層浸潤を認めることが確認できたことを回答された。次に、膀胱内超音波法による膀胱の層構造の評価と腫瘍の浸潤度の評価がどこまで可能かについて質問がなされた。本研究では膀胱粘膜と粘膜下層、筋層、膀胱外組織の評価が可能であったが、粘膜層と粘膜下層の判別まで明らかにはできなかったと回答がなされ、膀胱の壁構造の違い、画像評価の方法の問題の可能性があることの助言をいただいた。また、浸潤度に関して筋層への浸潤は、粘膜・粘膜下層と筋層が判別できるため、十分に評価でき、正診率が85%であったことを回答された。次に、膀胱内超音波法での病期診断が組織診断と異なった原因につき質問がなされた。原因は、評価限界の径の腫瘍を超音波検査のみで評価する技術的な問題と、筋層構造の不整を伴う場合を筋層浸潤ありと判断する診断上の問題があることが示唆されると回答された。次に超音波検査以外の評価方法としてのMRIの可能性について質問がなされた。MRIは従来のものでラットに用いると壁構造が正確に描出できず、高磁場のMRIの使用で解決がなされることが報告されていることが回答され、この装置が大学関連施設に存在し使用可能であることの助言がなされた。

以上のように、本研究は超音波による膀胱および腫瘍の評価方法にさらなる検討が必要であるものの、ラット膀胱腫瘍の非侵襲的な評価方法を確立し、細径内視鏡と併せた膀胱腫瘍診断が今後のラット正所性膀胱腫瘍モデルの治療評価に有用であり、さらに今後臨床応用可能な膀胱癌治療に関する研究に有用である可能性が示された点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
放射線医学 栗林 幸夫 病理学 坂元 亨字  
内科学 伊藤 裕  
学力確認担当者: 池田 康夫  
審査委員長: 栗林 幸夫

試問日: 平成19年2月20日

# Effects of Immunosuppressants on Induction of Regulatory Cells After Intratracheal Delivery of Alloantigen

(拒絶反応を抑制する免疫制御細胞の誘導に対する非特異的免疫抑制剤の影響)

渋谷 慎太郎

## 内容の要旨

【背景】臓器不全に対する最終的治療法である臓器移植の成績は、免疫抑制剤の進歩により目覚ましく進歩したが、拒絶反応の抑止は完全ではなく、また薬剤による副作用（腎毒性・耐糖能異常）や非特異的な免疫抑制による副作用（発癌や感染症のリスクの増加）が解決されない問題点として存在する。これらの副作用を防止し、治療成績を向上させるための究極的な目標は、ドナー特異的な免疫寛容を誘導することである。その機序としては、拒絶に関与する細胞の消去（Deletion）および機能的な不応答（Anergy）、免疫制御細胞の誘導（Regulation）などが考えられているが、骨髄から常時新しい細胞が供給される状況では、免疫制御細胞の誘導がより効果的と思われる。また、現在臨床において使用されている非特異的免疫抑制剤も比較的有効な結果を示しているため、現状の薬剤を使用しながら移植片に対する拒絶を阻害する免疫制御細胞を誘導することが重要であると考えられる。しかしながら、それらの非特異的免疫抑制剤が免疫制御細胞の誘導や働きにどのような影響を与えているかについての報告はみられない。我々が開発したマウスの気管内投与モデルでは、ドナー抗原の術前気管内投与のみにより、7日後にマウスの移植心の拒絶を抑制する免疫制御細胞の誘導が可能である。そこで、その7日間に非特異的免疫抑制剤（FK506, cyclosporine (CsA), azathioprin (AZA), mycophenolate mofetil (MMF), rapamycin (RAPA)) を投与し、免疫制御細胞の誘導における影響を検討した。

【方法】8～12週雄性マウスを使用した。移植モデルとしてレシピエントの腹部にドナーの心臓を移植する異所性心移植モデルを用いた。CBAマウス（第一レシピエント）にC57BL/6の脾細胞（抗原）を気管内投与した7日後に、第一レシピエントの脾細胞を取り出し、無処置CBAレシピエント（第二レシピエント）に静注移入した。同日C57BL/6ドナー心移植を施行した。また、免疫抑制剤が免疫制御細胞の誘導に与える影響を調べるため、各濃度の各種免疫抑制剤をドナー脾細胞気管内投与の前処置後から脾細胞を取り出し細胞移入するまでの7日間連日腹腔内投与し、同様の細胞移入実験を行った。

【結果】C57BL/6の脾細胞を気管内投与したCBAマウスの脾細胞を取り出し移入したCBAマウスでは、C57BL/6移植心の著明な生存延長効果が認められた（Median Survival Time: MST=50日）。一方、BALB/cの脾細胞を気管内投与したCBAマウスの脾細胞移入がされた群では移植心は早期に拒絶された（MST=9日）。よって、ドナー特異的な免疫制御細胞が誘導されたことが示された。0.1mg/kgのFK506、0.2mg/kgのRAPAを投与した群では、同様の生存延長効果が認められた（MST=55, 50日）。20, 40mg/kgのMMF、0.4mg/kgのRAPAを投与した群では、生存延長効果が著明に増強された（MST > 100日）。0.3, 0.5, 1.0mg/kgのFK506、5, 10, 25mg/kgのCsA、1.0, 2.0mg/kgのAZAを投与された群では、移植心は早期に拒絶された（MST 7-14日）。

【結論】気管内投与モデルにおける免疫制御細胞の誘導は、MMF・高濃度RAPAでは促進される。よって、臨床における免疫抑制剤の使用は、免疫制御細胞の誘導の観点からMMFあるいは高濃度RAPAが有利であることが示唆された。

## 論文審査の要旨

本実験では、マウス異所性心移植モデルを用いて、ドナー脾細胞の経気管内投与のみの前処置により、わずか1週間でドナー特異的な免疫制御細胞の誘導が可能であることが示された。さらに、この免疫制御細胞の分画にはCD4+CD25+陽性細胞や樹状細胞など種々の細胞群が存在することが判明している。また、現在臨床で最も用いられている免疫抑制剤の免疫制御細胞の誘導における影響について検討した結果では、MMFとRAPA、低濃度FK506が有用である結果が得られた。

審査ではまず、今回の結果を臨床導入するに当たり、気管内投与モデルの位置付けと結果の一般化についてどう考えるか質問がなされた。気管内投与モデルで誘導される免疫制御細胞と臓器移植を行ったときに誘導される免疫制御細胞の同一性を検証しなければならないが、現時点では、臓器移植において発現する免疫制御細胞の分画は種々報告されており明らかにはなっていない。CD4+25+陽性細胞に関するFoxp3の発現は検出中であると回答された。また、臨床導入を前に、他の実験系で検証してみる必要はあるが、われわれの気管内投与モデル以外で免疫制御細胞を誘導するためには、臓器移植を行ってtoleranceを誘導しなければならず、今回の実験を全て再現することは困難であると説明された。さらに、臨床への展望として、現在のkey drugであるFK506やCsAは急性拒絶には除外するわけにはいかない薬剤であるが、今回の結果を踏まえ、使用の是非について質問された。確かに初期の急性拒絶を抑制することは重要であり、現在の免疫抑制剤ではFK506やCsAの使用は除外できないと考えられる。今回の結果は、あくまでも免疫制御細胞誘導の観点からの結論であり、他のメカニズムも多様に絡んでいるであろうことを考慮すると、必ずしも初期から高濃度FK506やCsAを使用すべきではないという結論ではないと回答された。次に、メカニズムとしてそれぞれの薬剤がregulatory cellsのどの部分をターゲットに作用しているのかについて質問された。前述のように、移植における免疫制御細胞自体が様々なpopulationを持つことが推測されている段階であり、薬剤がどこに作用するのか論ずるのは難しく報告もないと思うと回答された。一方で、本論文中に検討されているメカニズムの考察に対して、薬剤によって実験背景が異なっており、今後さらなる検討の余地があると助言された。

以上のように、本研究はそのメカニズムについてさらに検討されるべき点を残しているものの、これまで報告されなかった非特異的免疫抑制剤の免疫制御細胞の誘導における影響を解明した点において有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
微生物学・免疫学 小安 重夫 先端医学 河上 裕  
薬剤学 谷川原祐介

学力確認担当者：池田 康夫

審査委員長：小安 重夫

試問日：平成19年2月27日

# Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways

(レスベラトロールによるヒトB細胞性悪性腫瘍に対するカスパーゼ-3とp38 MAPキナーゼ経路の活性化を介したアポトーシス誘導)

清水 隆之

## 内容の要旨

赤ワインのポリフェノール成分であり、多くの植物に含まれるレスベラトロールは、抗酸化、抗炎症、血小板凝集抑制、血管拡張などの様々な生理活性作用を示すことが報告されている。加えて、近年では、様々な悪性腫瘍細胞に対し、増殖抑制効果を示すことが報告されている。しかし、難治性造血器腫瘍のひとつである多発性骨髄腫に対する抗腫瘍効果についての報告はない。多発性骨髄腫は、既存の抗癌剤による化学療法では、完治は不可能である。造血幹細胞移植を併用した大量化学療法で、生存率の延長は期待できるものの、高齢での発症の多い多発性骨髄腫では、その副作用が治療上、大きな問題となっており、生体に対する侵襲の少ない、より腫瘍特異的な新規治療薬の開発が急務である。今回、我々は、多発性骨髄腫細胞株IM9とパーキットリンパ腫細胞株HS-sultanに対してレスベラトロールを作用させ、その抗腫瘍効果について検討した。

レスベラトロール投与群では、濃度と時間依存性に細胞増殖が抑制された。なお、以降の実験では、多発性骨髄腫細胞株IM9を使用した。細胞周期の解析では、S期での細胞周期の停止と次いで、sub-G1分画の増加を認め、S期停止によるアポトーシス誘導が示された。レスベラトロールを投与した細胞株のサイトスピン標本のギムザ染色では、アポトーシス小体の出現が観察された。さらに、アネキシンVとヨウ化プロピジウムIIの二重染色では、時間依存性にアネキシンV陽性分画すなわちアポトーシス分画の増加を認めた。アポトーシスの経路の解析のため、カスパーゼ-3の活性化を検討したところ、レスベラトロール投与群で、活性化カスパーゼ-3の増加を認めた。全カスパーゼ阻害剤とカスパーゼ-3阻害剤をそれぞれ前投与し、レスベラトロールを投与したところ、アポトーシスが阻害された。ミトコンドリア膜電位の解析では、レスベラトロール投与群で、膜電位の低下を認めた。

細胞周期関連蛋白の解析では、ATM、Chk1、Chk2のリン酸化を認めた。さらに、CDK2のリン酸化、サイクリンAとEの蛋白発現量の増加を認めた。アポトーシス関連蛋白の解析では、Baxの蛋白発現量の増加とMcl-1の低下を認めたが、Bcl-2は不変であった。

p38 MAPキナーゼ経路の解析では、p38 MAPキナーゼ阻害剤の前投与でアポトーシスが阻害された。また、レスベラトロール投与後に、p38 MAPキナーゼのリン酸化を認めた。

以上より、レスベラトロールによる多発性骨髄腫を含むヒトB細胞性悪性腫瘍に対するカスパーゼ-3とp38 MAPキナーゼ経路の活性化を介したアポトーシス誘導が示された。天然生理活性物質であるレスベラトロールが多発性骨髄腫等に対する新規治療薬になり得る可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

レスベラトロール (RES) は、赤ワインに含まれるポリフェノール成分の一種であり、抗酸化、抗炎症、血小板凝集抑制作用などを示すことが知られている。近年、種々の悪性腫瘍細胞に対し、抗腫瘍効果を示すことが報告され、注目されている。今回、難治性造血器腫瘍である多発性骨髄腫細胞株IM9とパーキットリンパ腫細胞株HS-Sultanに対し、RESを投与し、アポトーシス誘導による増殖抑制効果を認めた。アポトーシス誘導機構の解析では、ミトコンドリア膜電位の低下とカスパーゼ3の活性化、ATMチェックポイントを経た細胞周期のS期停止、p38 MAPKの活性化を認めた。

審査では、まずRESの正常細胞への影響についての質問がなされた。本実験で使用した濃度では、文献上、正常末梢血単核球や造血幹細胞に対する増殖抑制効果はないと報告されているが、正常細胞におけるカスパーゼ経路や細胞周期、MAPK経路への影響を解析した報告はないと返答された。これに対して、増殖刺激因子を加えた状態での正常リンパ球に対する影響を検討する必要があるとの助言があった。次いで、ヒトでも有効血中濃度への到達は可能かとの質問がなされた。数mgを経口摂取すれば理論上可能であると返答されたが、より薬理学的効果の高い誘導体の作成について検討すべきであるとの助言があった。また、他の細胞株への効果についての質問がなされたが、骨髄腫細胞株であるRPMI8226とU266に投与し、同様の結果が得られていること、文献上、白血病細胞株でも抗腫瘍効果の報告があることが説明された。アポトーシス誘導機構に関し、本実験で示された経路は、骨髄腫に特異的なものであるかとの質問に対して、他の悪性腫瘍株ではミトコンドリア経路の報告はあるが、S期停止の報告は、他に卵巣癌細胞株のみで、p38 MAPK経路の報告は、本実験のみであると返答されたが、JNKやERK、p53経路についても検討すべきであるとの助言があった。本実験におけるカスパーゼ経路、細胞周期、p38 MAPK経路の関連性についての質問がなされたが、カスパーゼ3阻害時のp38 MAPKやp38 MAPK阻害時のカスパーゼ3の活性化の状態、ATM経路の阻害剤投与などを検討中であるとの説明がなされた。ROSの関与についての質問もなされ、カタラーゼ投与によるアポトーシス阻害は認めないものの、今後の検討課題であると返答された。最後に、今後の臨床応用への可能性についての質問がなされたが、患者検体や骨髄腫モデルマウスへの投与実験を検討中であるとの説明がなされた。

以上のように本研究は、今後さらに検討すべき点はあるものの、レスベラトロールによる多発性骨髄腫に対するアポトーシス誘導経路を明らかにし、新規治療薬としての可能性を示した点で、臨床上、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫  
発生・分化生物学 須田 年生 先端医科学 河上 裕  
微生物学・免疫学 小安 重夫  
学力確認担当者：池田 康夫  
審査委員長：須田 年生

試問日：平成19年2月8日

# Co-expression of aFGF and FGFR-1 is predictive of a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma

(aFGFとFGFR-1の共発現は食道扁平上皮癌の予後増悪因子である)

杉 浦 功 一

## 内容の要旨

早期食道癌に対し根治手術が行われても再発死する症例が時々見られるなど、食道癌の予後の予測にはTNM分類では不十分であることが示唆され、予後増悪因子を探求する必要があると考えられる。多くの研究で腫瘍の血管新生と腫瘍の増大との関係が実証され、新しい癌治療戦略として抗血管新生治療が試みられている。その一環として、様々な癌におけるaFGF, bFGF, FGFR-1の強発現が報告され、固形腫瘍の予後増悪因子である可能性があることが示唆されてきた。そこでわれわれはそれらの強発現が食道癌の予後規定因子であると仮定し、食道扁平上皮癌切除標本におけるそれらの発現と臨床病理学的背景との関係調べた。対象は慶應義塾大学病院で1990年1月～1993年12月に切除された、治療歴のない食道扁平上皮癌79例である。ホルマリン固定パラフィン包埋された食道癌のブロックを用いて免疫組織化学染色を行い、aFGF, bFGF, FGFR-1の発現と微小血管密度 (MVD) を調べた。それぞれの発現と臨床病理学的背景の比較、予後との関係を統計学的処理によって分析した。47症例 (59%) はaFGF陽性、43症例 (54%) はbFGF陽性、47症例 (59%) はFGFR-1陽性と判定された。35症例 (44%) はaFGFとFGFR-1がともに陽性、22症例 (28%) はaFGFとFGFR-1がともに陰性であった。26症例 (33%) はbFGFとFGFR-1がともに陰性、18症例 (23%) はbFGFとFGFR-1がともに陽性であった。それぞれについて臨床的背景の比較を行ったが差はなかった。aFGF陽性群は陰性群よりも腫瘍面積が大きかった ( $p=0.009$ )。aFGFとFGFR-1がともに陽性群はともに陰性群よりも腫瘍面積が大きく ( $p=0.01$ )、生存期間が短かった ( $p=0.04$ )。aFGFとFGFR-1, bFGFとFGFR-1の発現には正の相関があった (順に $p<0.0001$ ,  $p=0.04$ )。またaFGFとFGFR-1の発現はともに $\geq 80\%$ かともに $< 30\%$ に偏在していることが判明した ( $p<0.0001$ )。単変量解析の結果、aFGF, bFGF, FGFR-1それぞれの発現は予後増悪には寄与しないが、aFGFとFGFR-1の共発現は予後増悪因子であることが、多変量解析ではaFGFとFGFR-1の共発現がリンパ節転移に次いで2番目の予後増悪因子であることが明らかになった。また、aFGFとFGFR-1の発現には強い相関があり、aFGFとFGFR-1の共発現はautocrine機構により細胞増生に関与している可能性があると考えられた。

## 論文審査の要旨

本研究では、食道扁平上皮癌においてaFGFとFGFR-1の発現には強い相関があり、aFGFとFGFR-1の共発現はリンパ節転移に次いで2番目の予後規定因子であることが明らかにされた。

審査ではまずaFGF, bFGFおよびFGFR-1の発現を調べた理由を、そしてFGFR-2を調べなかった理由を質問された。これに対し、様々な固形癌において高発現や腫瘍学的意義が証明されているリガンドとレセプターを対象としたと回答された。bFGFとaffinityがFGFR-1より強いFGFR-2との組み合わせならば予後と関連があったのではないかと、との指摘があった。

次に対象とする症例の古さを指摘された。これに対し、当教室で食道扁平上皮癌におけるVEGFの発現についての報告があり、比較できるように同年代の症例を選択したこと、長期予後が明らかになっていることが回答された。

免疫組織化学染色で染色の判定基準が明記されていないことを指摘された。これに対し、線維芽細胞などの間質の細胞の染色率より染色の強い細胞を染色陽性としたと回答された。染色陽性のcut off値を症例数を揃えるように各々決定したことは根拠に乏しく、症例数に偏りが出ては統一すべきと指摘された。

腫瘍面積の大きさは予後と関連しないかと質問された。これに対し、差は出なかったこと、水平方向の広がりには静脈やリンパ管侵襲と関連しないからであろうと回答された。

当教室でVEGFの発現とmicrovascular density (MVD) の正の相関および高MVD群では予後が悪いとの報告があるが、本研究ではFGFsの発現とMVDとの相関がなかったことについてどう考えるか、他の癌腫での報告でFGFsの発現とMVDは相関があるか、またMVDと予後との相関がないという矛盾についてはどう考えるかとの質問があった。これに対し、FGFsによる血管内皮細胞増殖作用よりも癌細胞そのものの増殖作用の方が強いと考えられること、他の癌腫におけるFGFsの発現とMVDとの相関を詳細に検討したものがないこと、対象が同年代とはいえ、ブロックの摩耗などで当教室の以前の報告とは対象症例が完全には一致しないことが回答されたが、この矛盾についてもっと慎重に結論を出すべきではとの指摘があった。

最後に、本研究の臨床応用について質問された。これに対し、aFGFおよびFGFR-1陽性症例に対し、他の癌腫で報告があるようにaFGFやFGFR-1の阻害薬を開発できれば腫瘍増殖の速度を抑えられる可能性があるかと回答された。なお、具体的には生検の検体でそれぞれの発現を調べれば阻害薬の効果を事前に判定できるのではないかと、との指摘がなされた。

以上、本研究では今後検討されるべき課題を残しているものの、aFGFおよびFGFR-1の阻害薬が開発されれば食道扁平上皮癌の進行を抑え、予後改善に結びつく可能性があるという点で、臨床的意義があると評価された。

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 坂元 亨宇

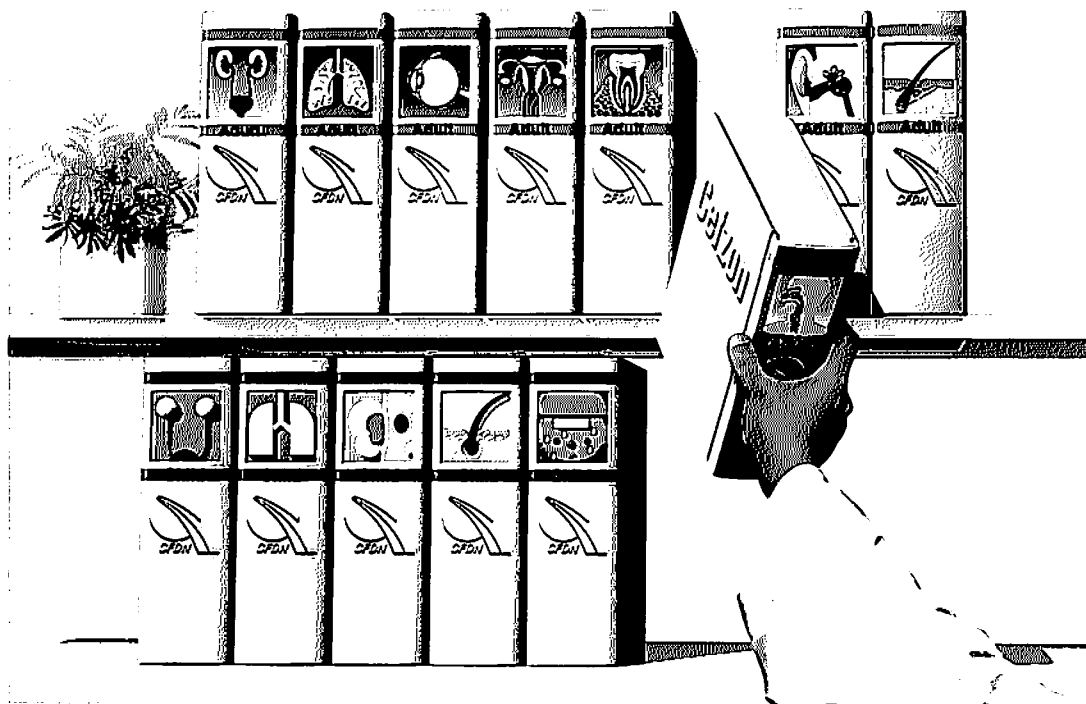
先端医科学 河上 裕

学力確認担当者：池田 康夫

審査委員長：日比 紀文

試問日：平成19年2月8日

 astellas



経口用セフェム系製剤

薬価基準収載

日本薬局方 セフジニルカプセル、セフジニル細粒



**セフゾン<sup>®</sup>** 細粒小児用10%  
カプセル 50mg  
100mg

指定医薬品、処方せん医薬品(注一医師等の処方せんにより使用すること)

**Cefzon<sup>®</sup>**

■「効能・効果」「用法・用量」「禁忌・原則禁忌を含む使用上の注意」等につきましては、製品添付文書をご参照ください。

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