

第81卷第1号
平成16年
3月

慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

| | |
|---------------------------------------|---------------------|
| 綜 説 | |
| ●角膜の再生医療 | 坪田 一男(1) |
| ●アルツハイマー病における神経細胞死機序と細胞死抑制因子 Humanin | 新倉 貴子・西本征央(9) |
| 講 座 | |
| ●足アーチ構造の機能 | 橋本 健史(17) |
| ●慢性閉塞性肺疾患 (COPD) と喫煙感受性規定遺伝子 | 山口佳寿博(23) |
| 原 著 | |
| ●統合失調症における視覚表象の形成と経過に関する精神病理学的研究 | 森本 陽子(31) |
| ●コラーゲンゲルサンドイッチ法が初代培養肝細胞の機能・分化機構に及ぼす影響 | 井口 清香(49) |
| 話 題 | |
| ●蘭学と漢方医学 | 秋葉 哲生(61) |
| ●思考力を持つ医師 | 木山 秀哉(62) |
| ●多段階発がん過程における DNA メチル化の変化 | 金井 弥栄(63) |
| ●乳癌診療における病理診断の役割 | 津田 均(64) |
| ●エクソ/エンドサイトーシスによる生体機能調節 | 山口 和彦(64) |
| ●プロトン伝達物質になり得る | 金子 章道(66) |
| ●ヘモグロビンの遺伝子改変 -呼吸不全の治療法- | 本間 生夫(67) |
| ●地域医療支援病院 | 大蔵 幹彦(68) |
| 学 位 論 文 | |
| ●体腔内凝血の凝固線溶系に及ぼす影響と再出血発現機序に関する検討 | 山本 裕(T1) |
| ●1型糖尿病の発症予知に関する研究：動物モデルを用いた基礎的検討 | 山田 悟(T11) |
| ●内側膝蓋大腿靭帯の機能解剖学および臨床的研究 | 野村 栄貴(T27) |
| 号 外 | |
| ●博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第171号) |(別頁) |

Vol 81 No 1
March 25, 2004

慶應醫學會

綜 説

角膜の再生医療

東京歯科大学眼科

つは な か ら お
坪 田 一 男

ABSTRACT

Regeneration of the Cornea

Kazuo Tsubota

Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital

The discovery of human embryonic stem (ES) cell lines led to the development of the concept of transplanting stem cells with the potential to differentiate into blood cells, nerve cells and muscle cells. Not only the current standards for transplantation medicine, but the quality of medical services will definitely improve once human ES cells become available. If successful extracorporeal generation of tissues or organs by means of tissue culture is accomplished, it will facilitate regeneration medicine, by which not only transplantation of cells, but also replacement of whole diseased organs or tissues may become a viable objective. Stem cell transplantations in the form of bone marrow transplantation have been extensively applied clinically. Significant advancements in research related to human skin and intestinal mucosal stem cells have already been attained. Following the recent identification of the presence of corneal stem cells, transplantation of the corneal epithelial stem cells has been initiated. The manufacture of corneal epithelial sheets by *in vitro* incubation of stem cells and their clinical application to transplantation was reported in 2000. Another ongoing project attempts to produce each of the three layers comprising the structure of the cornea separately, and to combine these to produce an artificial cornea. Further research in this area will enable corneal transplantations to use regenerated ES cells or autogenous stem cells while eliminating any reliance on eye bank stem cells.

Key words : regenerated cornea, stem cell, eye bank, corneal transplantation

はじめに

ヒト ES 細胞株が樹立され、血液細胞、神経細胞、筋細胞へ分化させた幹細胞を移植するアイデアが現実化しようとしている¹⁾。ヒト ES 細胞からの幹細胞が供給できるようになれば、移植医療ばかりでなく医療そのものの質も変わってくると期待されている。細胞レベルの移植ばかりでなく、培養によって組織または器官までも体外で作れるようになることが現実化しつつある。再生医学の走りとも言うべき幹細胞移植は、血液幹細胞移植（骨髄移植）として広く臨床に應用されて

いる。体細胞では皮膚の幹細胞、腸粘膜の幹細胞など上皮細胞の幹細胞の研究が進んでいるが、目の角膜上皮細胞においても最近になって存在位置が確認され²⁾、角膜上皮の幹細胞を移植することによる治療が始まっている^{3,4)}。さらに 2000 年になって幹細胞を *in vitro* で培養して上皮シートを作りこれを移植に使う臨床応用が報告され⁵⁾、我々も培養上皮移植システムを確立した⁶⁾。また角膜の 3 層構造を別々に作りこれをあわせて人工の角膜自体を作るというプロジェクトも進んでいる⁷⁾。

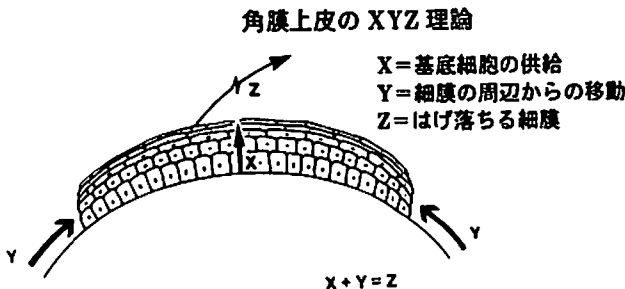
本稿では角膜上皮の幹細胞研究の現状とその技術をもとにした透明組織の再建について述べたい。この領

域は現在急速に臨床応用が進んでいる分野である。近い将来はアイバンクからの幹細胞の供給に頼ることなく、ES細胞や自己の幹細胞を用いて再生角膜による治療も可能となると思われる。

角膜上皮の幹細胞

角膜上皮は5~7層の扁平上皮細胞であり、皮膚と違って角化をしない。従来より基底細胞が分裂を行うことが知られていたが、これは現在 transient amplifying cells と呼ばれ、寿命のある細胞群と考えられている。血液細胞で言えば末梢血細胞にあたる。ちょうど血液細胞にとって骨髄細胞にあたるものが、角膜上皮の幹細胞である。角膜上皮の幹細胞は slow cycling cell であることが確認されている。幹細胞から非常にゆっくりとした細胞分裂によって transient amplifying cell が供給され、この細胞が盛んな細胞分裂をくりかえすことによって細胞層を維持する。Richard Thoft 教授の XYZ 理論によると、はげ落ちる細胞数 Z は基底細胞の供給 X と周辺からの移動の Y の和によって保たれるわけだが、この X が transient amplifying cell の分裂にあたる⁹⁾。そして Y にあたるものが、幹細胞からのゆっくりとした供給である (第1図)。

今まで幹細胞の存在自体、およびその場所についてはさまざまな論議があったが、近年幹細胞は角膜輪部に存在することがわかってきた^{2,9,10)}。この概念は今まで理解できなかったさまざまな現象を説明することができる。たとえばアルカリ外傷で角膜上皮に血管が高度に侵入してしまうのは、角膜上皮細胞の幹細胞が消失したため、周辺より結膜上皮細胞が角膜実質上に侵入

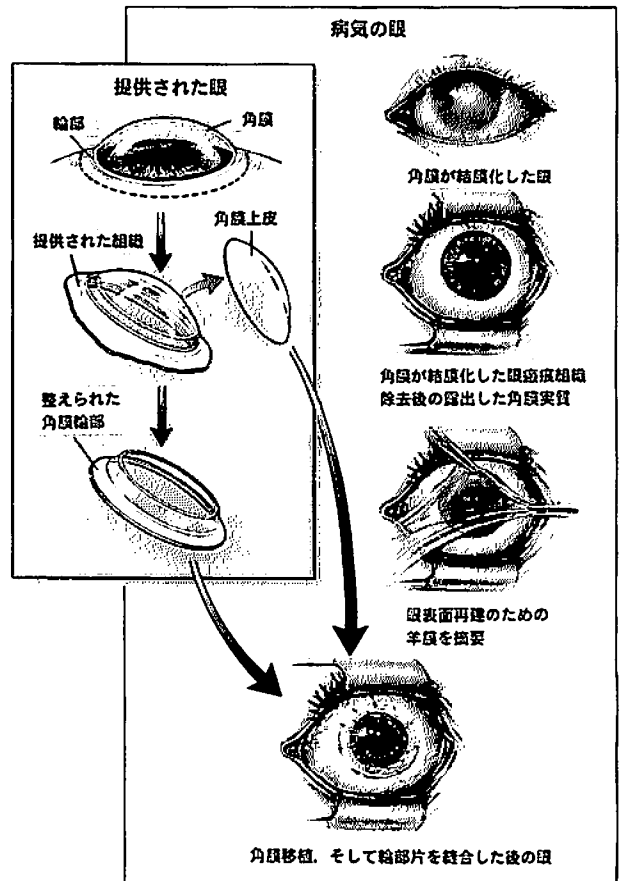


第1図 角膜輪部に角膜上皮の幹細胞が存在し、これが角膜中央部に動いて上皮基底細胞になる。これが transient amplifying cell と呼ばれる寿命のある細胞である。(Thoft R, et al : The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest Ophthalmol Vis Sci 24 : 1442-1443, 1983 より転載許可を得て掲載)

していると解釈されている¹¹⁾。視力が障害されるのはこのためである。

角膜上皮の幹細胞移植

スティーブンス・ジョンソン症候群や化学傷・熱傷などの重症疾患は、角膜幹細胞を含む輪部も広範囲に障害される。輪部機能不全を伴う疾患の眼表面を再構築するには、角膜上皮の幹細胞を移植する必要がある。すでに臨床応用されている術式として、障害されていない健眼から組織を採取して移植する自家移植の方法が普及している¹²⁾。角膜上皮を供給するためには輪部全周は必要なく、健眼から一部を移植するだけで角膜上皮の構築ができることが証明された¹²⁾。自家移植であるから拒絶反応は認められず、熱傷や、化学傷の症例で片眼が健



第2図 角膜上皮の幹細胞移植概念図 (Tsubota K, et al : Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelium stem-cell transplantation. N Engl J Med 340 : 1697-1703, 1999 より転載許可を得て掲載)



第3図 角膜上皮のステムセル移植の術前・術後
(Tsubota K, et al: Treatment of severe dry eye.
Lancet 348: 123, 1996 より転載許可を得て掲載)

常な症例が適応となる。

しかし、両眼が傷害された症例に角膜上皮のステムセルを移植するには、ドナー組織が必要である。ドナー角膜輪部移植は中央の透明な角膜を移植する従来角膜移植とは異なり、周辺の組織のみを移植する(第2図)。ドナー輪部に含まれるステムセルが後に transient amplifying cell (TAC) 細胞に移行しつつ、レシピエント角膜を再生すると考えられている。移植したステムセルが永続的に機能しているかは常に議論されている点であるが、我々はドナーとレシピエントの性別が異なる症例において、輪部移植後一年以上経過してもドナー由来の細胞が中央角膜に存在することを証明した¹³⁾。角膜輪部移植は諸外国でも普及しつつあり、適応を慎重に選ぶことによって本来の角膜移植では救済できなかった症例も治療の対象となった(第3図)¹⁴⁾。ところが、ここで問

題となるのはドナー不足である。アメリカなどの一部先進国以外ではドナー角膜数が慢性的に不足しており、この問題を解消するために最近では患者自身の組織を利用する方法や数少ないドナー組織を有効利用する試みが始まった。将来的には、ドナー組織を必要としない方法としてステムセルから必要な細胞を分化誘導する技術が可能になると予想される。

羊膜移植

胎盤組織の羊膜を角膜上皮基底膜の代替組織として用いる方法がアメリカのグループによって報告された¹⁵⁾。羊膜には厚い基底膜があり、上皮細胞の接着、遊走を促すIV型、V型コラーゲンとラミニンを豊富に含んでいる。角膜上皮がなかなか修復しない遷延性上皮欠損に対して、羊膜移植によって上皮化を促進させることが可能である。羊膜には多くの生理機能があると考えられており、新生血管抑制、抗炎症効果、上皮細胞の接着亢進、増殖組織の瘢痕化抑制が挙げられている。また、羊膜そのものは免疫原性が低く、拒絶反応が少ないことも利点と言える。羊膜を代理基底膜として用いることで、ケラチンなどの角膜上皮固有の遺伝子が正常に分化することも証明されている¹⁶⁾。上皮化組織の重度な瘢痕化を来す翼状片や、眼類天疱瘡の手術ではすでに羊膜は必需品となっている(第4図)。

羊膜は基底膜移植以外にも、炎症を抑えることを目的に一次的な被覆(パッチ)として眼球表面に被せる場合もある。細胞浸潤や充血を抑制し、炎症を抑えることによって、基底膜としての効果との相乗効果があると考えられている¹⁷⁾。また、羊膜中に含まれる様々な成長因子



第4図 羊膜移植(再生医療 Vol. 2, No. 3より転載許可を得て掲載)

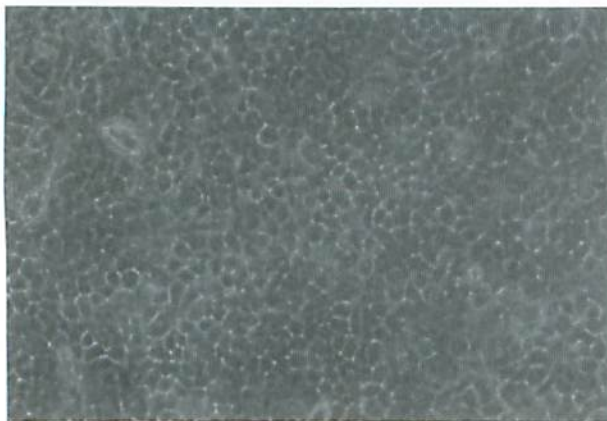
やサイトカインも創傷治癒過程に貢献しているという報告もあり、角膜輪部移植と羊膜移植を組み合わせることにより、今まで治療が不可能であった症例にも治療の望みがでてきた。

培養角膜上皮移植

ステムセル不全を来した片眼性症例では、健常眼の角膜より輪部組織を採取することが可能であるとすでに述べた。病変が広範囲におよぶ症例では、まず基質として羊膜を移植して、その上に上皮を進展させる方法がとられてきた。しかし、創傷治癒が遅くなる症例では炎症が悪化し、それによってさらに上皮化が得られないと言う悪循環に陥る場合がある。最悪な場合は、貴重な自己組織が無駄になることもあり得る。そこで限られた組織で広い範囲を被覆するために、tissue engineeringの技術によって、あらかじめ羊膜上に上皮を培養した移植片を用いる方法が開発された。培養シャーレ内に羊膜を一層敷き、ドナー角膜、あるいは患者より採取した少量の細胞を培養する。とくにエアーフットと呼ばれる方法で、培養細胞面を空気と接することにより重層化した上皮が2~3週間で得られる(第5図)⁶⁾。

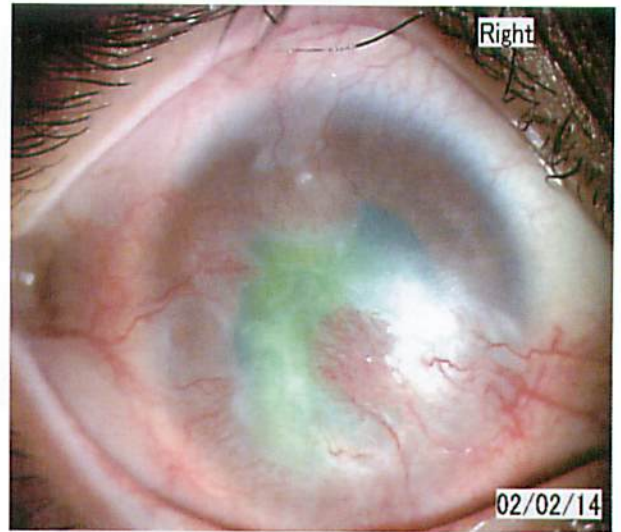
培養上皮移植は、羊膜単独の移植に比べて早期より創傷治癒が得られるメリットがあり、炎症を抑える効果がある。また、増殖した細胞の中には未分化な細胞も含まれていることが示唆されており、少量のステムセルから角膜上皮を再生できる可能性を秘めている。我々の施設でも倫理委員会の承認を得てすでに20例以上の症例に対して本術式を行っており治療成績も向上している(第6図)。

培養上皮移植は少量の細胞で大きな移植片が作成でき

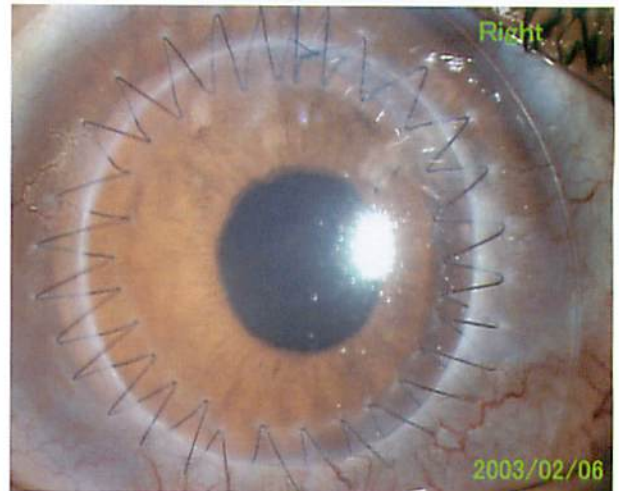


第5図 羊膜上に培養された角膜上皮の位相差写真

術前



術後



第6図 角膜上皮のステムセルの自己培養移植を行った症例(アルカリ外傷)の術前、術後。術前の写真で、透明な角膜上皮が一部存在することがわかる。この部分を培養して移植した。角膜実質も混濁していたので、培養移植後に通常の角膜移植を併用した。

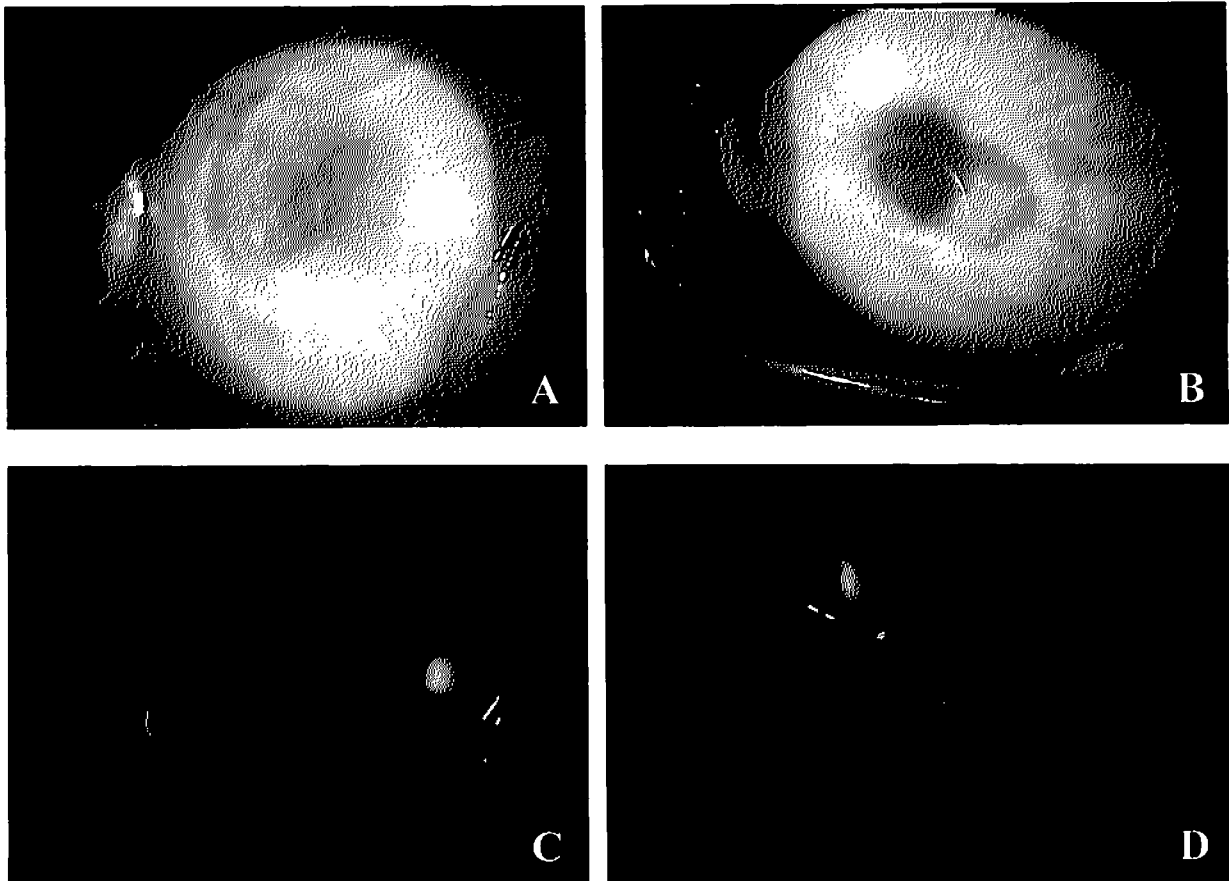
る利点がある一方で、改善しなければならない問題もある。培養液は血清を添加する必要があるものの、ウシ血清ではプリオンによる汚染が絶対ないという保障はなく、臨床サンプルに使用すべきでないという意見もある。我々はレシピエントとなる患者からのヒト血清を培地に添加するようにしている。2mm角の小さな組織でも、2か

ら3週間で35 mmの培養皿一面ほどの細胞が得られる。羊膜上に培養された角膜上皮細胞シートは、細胞-細胞間のタイトジャンクションや、デスモゾームの構築が認められ、ヘミデスモゾームや接着点を介して基底膜に接着している。

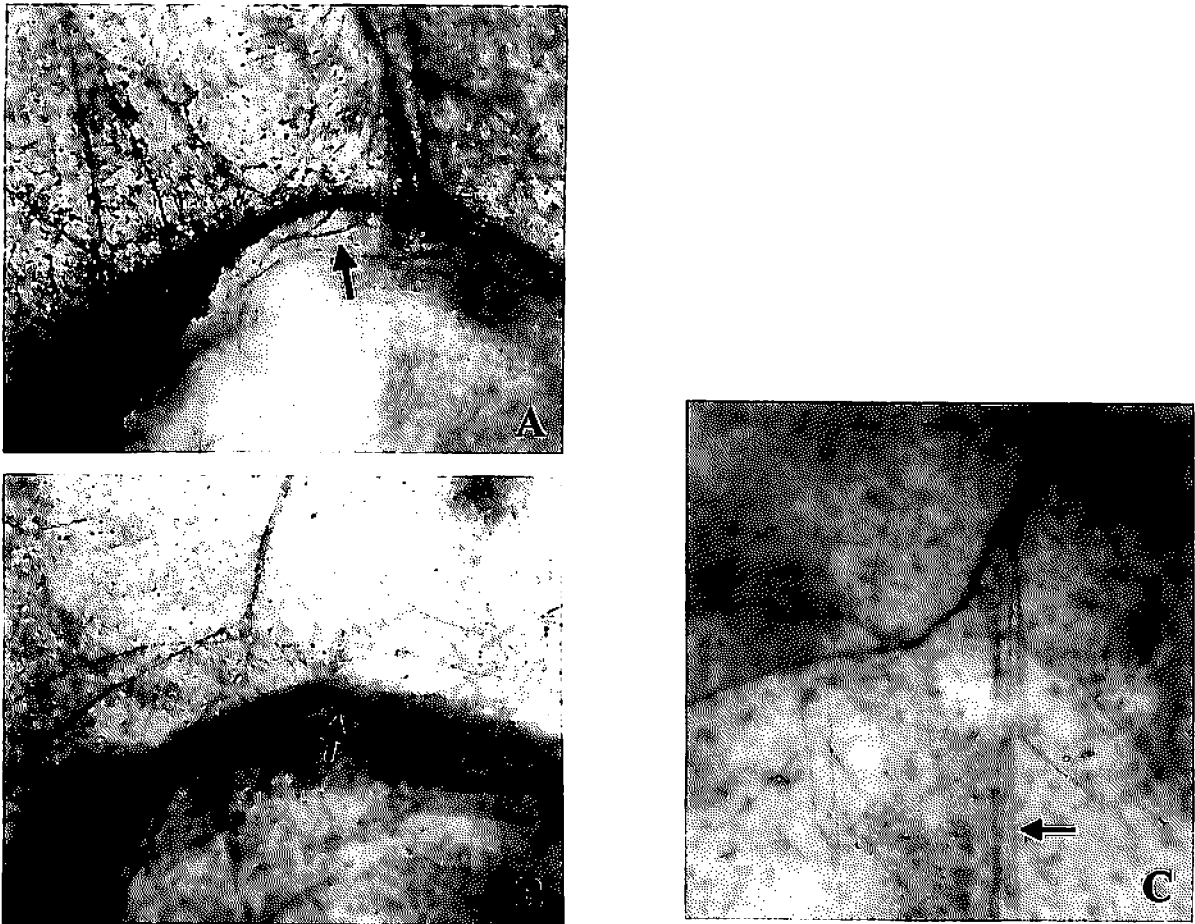
人工角膜

組織工学を用いない合成ポリマーを基材とした人工角膜の開発にも長い歴史がある。現在では polymethyl methacrylate (PMMA) や polytetrafluoroethylene (ePTFE) などのプラスチック系素材を用いた人工角膜が患者へ移植されている。これらの人工角膜では生体適合性が最大の問題であり、感染や人工角膜の脱落が問題となる。我々は、合成ポリマーや天然ポリマーを組み合わせる方法で何種類かの人工角膜の開発中である(第7図)¹⁸⁾。合成ポリマーと天然ポリマーを配合することに

より、生体内での安定性が改善することを見いだした。炎症細胞の浸潤などの所見はみられず、神経線維が再生する所見も得られた(第8図)¹⁹⁾。しかし、周辺の実質細胞の活性化は依然として見られ、角膜の透明性を確保する上では障害となりうる。また、長期での安定性は未だ不明であり、今後更なる素材の改善が必要と考えられた。耐久性の問題点を克服するために、生体適合性の高い素材を開発しなければならない。人工角膜を作成する際にポリマーを必要とするのは、角膜実質の代替となるものが現状ではドナー角膜組織しかないからである。実質に含まれるコラーゲンやグリコサミノグリカンを再構築すれば、角膜実質細胞にとって適切な環境を作成することもできるかもしれない。



第7図 家兎角膜の実質ポケット内に移植した凍結保存ヒト羊膜 (A, C) とコラーゲン系ポリマー (B, D) (Shimmura S, et al : Collagen-poly (N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. Cornea 22 : S81-S88, 2003 より転載許可を得て掲載)



第8図 再生神経 (Shimmura S, et al : Collagen-poly (N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. *Cornea* 22 : S81-S88, 2003 より転載許可を得て掲載)

おわりに

羊膜と角膜上皮ステムセルを用いた培養上皮移植は、角膜再生医療の第一歩であることは間違いない。しかし、角膜の構造は実質と内皮を含む三層構造であり、最終的に角膜を再生するには各層の再構築も必要となる。現在は実質を作成するための素材開発や、実質細胞の colonization についての研究が盛んに行われている。今後は各細胞層のステムセルを分離同定する作業と、embryonic stem cell (ES細胞) から分化誘導する研究は同時に進行するであろう。そして遺伝子導入技術で免疫回避などによって組織適合性が向上すれば、近い将来に角膜再生が実現すると思われる。

文 献

1) Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, Jones J : Embryonic stem

cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147, 1998

- 2) Cotsarelis G, Cheng S, Dong G, Sun T, Lavker R : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57 : 201-209, 1989
- 3) Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J : Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelium stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 340 : 1697-1703, 1999
- 4) Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J : Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 102 : 1486-1496, 1995
- 5) Tsai R, Li L, Chen J : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 343 : 86-93, 2000
- 6) Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S,

- Tsubota K : Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 109 : 1285-1290, 2002
- 7) Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon C, Laycock N, Hakim M, Song Y, Watsky M : Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286 : 2169-2172, 1999
 - 8) Thoft R, J Friend : The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 1442-1443, 1983
 - 9) Schermer A, Galvin S, Sun T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103 : 49-62, 1986
 - 10) Wei G, Cotsarelis G, Sun T, Lavker M : Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium : implications on conjunctival epithelial homeostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 236-246, 1995
 - 11) Puangsricharern V, Tseng S : Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 102 : 1476-1485, 1995
 - 12) Kenyon K, Tseng S : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96 : 709-722, 1989
 - 13) Shimazaki J, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Munkhbat B, Hagihara M, Tsuji K, Tsubota K : Evidence of long-term survival of donor-derived cells after limbal allograft transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1664-1668, 1999
 - 14) Tsubota K, Satake Y, Shimazaki J : Treatment of severe dry eye. *Lancet* 348 : 123, 1996
 - 15) Kim J, Tseng S : Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14 : 472-484, 1995
 - 16) Koizumi N, Cooper L, Fullwood N, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S : An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2114-2121, 2002
 - 17) Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K : Anti-inflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 20 : 408-413, 2001
 - 18) Shimmura S, Doillon CJ, Griffith M, Nakamura M, Gagnon E, Usui A, Shinozaki N, Tsubota K : Collagen-poly (N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. *Cornea* 22 : S81-S88, 2003
-

綜 説

アルツハイマー病における神経細胞死機序と細胞死抑制因子 Humanin

慶應義塾大学医学部薬理学教室

新 倉 貴 子・西 本 征 央

Key words : Alzheimer's disease, neurodegeneration, neuronal cell death, neuroprotective factor, Humanin

はじめに

アルツハイマー病 (AD) は記憶障害, 認知障害を主徴とする進行性の神経変性疾患である。患者数は全世界で 1000 万人以上といわれ, 老人性痴呆の原因として最も頻度が高い。罹患率が加齢と共に増加するため, 高齢化が進む現代においては, AD の早期診断, 予防, 治療法の確立は必須である。しかしながら, 現在のところ早期診断および予防法は確立していない。治療薬については, AD で最も障害を受けるとされているコリン作動性神経の活動を高めるためのアセチルコリン分解酵素阻害剤が用いられているが, あくまで対症療法であり根治性はない。そのため, AD の病態機序を基盤とした治療薬開発のための研究が数多く為されている。

Alois Alzheimer による 1907 年の最初の報告で, 大脳における神経細胞の脱落, アミロイド斑 (または老人斑) および神経原線維変化が観察され, 以後これらが AD の病理学的三大主徴とされている。AD の病因は老人斑の主成分であるベータアミロイド ($A\beta$) であり, その異常な凝集によって神経細胞死が誘導されるという仮説に基づいて, $A\beta$ の産生抑制や分解促進によって AD を治療しようとする方針での治療法開発が進行している。しかし, $A\beta$ の過剰発現により多数の老人斑の形成を促したトランスジェニックマウスにおいて神経細胞死が全く認められないことなどから, $A\beta$ が AD 病態発生の主因であるという説に異を唱える研究者も多く未だ結論は出ていない。一方, AD による痴呆などの臨床症状や顕著な脳の萎縮は, 神経細胞の脱落に起因するものであることから, 神経細胞死の阻止により AD の根治が期待できる。この神経細胞死を標的とした治療法確立のためには, AD における神経細胞死機序を解明することが必要不可欠である。そこで, 著者らのグループでは,

単一の遺伝子の変異により AD が引き起こされる家族性 AD (FAD) の原因遺伝子変異体を用いて, 神経細胞死機序の解析を実施した。さらに, この神経細胞死を抑制する因子の探索を実施し, 新規の細胞死抑制因子 Humanin (HN) を同定した。

FAD 遺伝子変異体による神経細胞死

FAD 原因遺伝子としては現在までに, $A\beta$ の前駆体であるアミロイド前駆体蛋白質 (APP), プレセニリン 1 (PS1) およびプレセニリン 2 (PS2) が同定されている¹⁻³⁾。FAD 変異体により神経細胞死が誘導されることは, ロンドン型 APP 変異体 V642I-APP で初めて報告された⁴⁾。その後, PS2 の変異体⁵⁾, PS1 の変異体⁶⁾, そしてスウェーデン型 APP 変異体 (K595N/M596L-APP; NL-APP)⁷⁾ が *in vitro* で神経細胞死を誘導することが報告され, 全ての FAD 遺伝子の変異体が神経細胞死を惹起することが確認された。

FAD 遺伝子変異体による神経細胞死は, FAD 変異体蛋白質を過剰に発現させることで誘導される。その機序を解析する際に, 過剰発現ではなく内在性の発現量と同程度の FAD 変異体蛋白質でも神経細胞死を誘導するのだろうか, という疑問が起こった。そこで, 昆虫ホルモンであるエクジソンによる誘導発現系を用いて, 1 細胞あたりの FAD 変異体蛋白質の発現量を安定的に自在に調節できる系を確立した。つまり, エクジソンの量に比例して目的蛋白質の発現量を変化させることが可能な系である。この系を用いて FAD 変異体の誘導する神経細胞死について検討した (第 1 図)⁸⁾。

まず, ロンドン型 APP 変異体 V642I-APP は, 内在性蛋白質と同程度の低発現量でも細胞死を誘導することが分かった⁷⁾。そこで, 1 細胞あたりの変異体蛋白質の量が内在性と同程度の低発現と過剰発現と同程度の高発

| 変異 | APP変異体 | | PS2変異体 | | PS1変異体 | |
|----------|----------------|----------------------|--------|---------------------------|--------|---|
| | V642I L698P | K595N/M596L A617G | N141I | M146L A246E H163R etc. | 低 | 高 |
| カスベース阻害剤 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 抗酸化剤 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

NADPH酸化酵素阻害剤感受性 (V642I, K595N/M596L, A617G)
 NO合成酵素阻害剤感受性 (N141I)
 キサンチン酸化酵素阻害剤感受性 (M146L A246E, H163R etc.)

第1図 FAD原因遺伝子変異体による神経細胞死機序
APP, PS1 および PS2 のそれぞれの変異体を、培養神経細胞に内在性と同程度の低発現(低)と過剰発現と同程度の高発現(高)した際に惹起される神経細胞死の、カスベース阻害剤と抗酸化剤に対する感受性を示した。○:感受性あり、X:感受性なし。抗酸化剤が抑制する活性酸素種産生因子は細胞死機序により異なる。詳細は本文参照。

現での FAD 変異体蛋白質が誘導する神経細胞死機序を明らかにするため、細胞死誘導に関与する因子の阻害剤を用いてその効果を検討した。その結果、V642I 変異による神経細胞死は、低発現量でも高発現量でも、カスベース阻害剤 DEVD と抗酸化剤 GEE (glutathione ethyl-ester) によって抑制されるアポトーシス型細胞死であった。さらに、GEE により抑制される活性酸素種産生に関与する分子のうち、V642I 変異が活性化させるのは NADPH 酸化酵素であることが、特異的阻害剤アポシニンを用いて確認できた。この細胞死にはまた、百日咳毒素 PTX で抑制される三量体 G 蛋白質 Go が関与することが明らかとなった。一方、スウェーデン型 APP 変異体 NL-APP も、低発現量で神経細胞死を誘導し、この細胞死機序は V642I-APP と同様であることが分かった。しかし、V642I 変異とは異なり、高発現量では DEVD, GEE どちらの阻害剤でも抑制されない細胞死を誘導し、非アポトーシス型細胞死機序を活性化させると考えられた。また、野生型 APP は低発現量では細胞死を誘導しないが、高発現では弱い細胞毒性を示し、この細胞死は DEVD 及び GEE で抑制されない非アポトーシスであった。NL-APP の高発現時には、この野生型 APP の非アポトーシス型細胞死と同じ経路が活性化されることが推測される。V642I-APP の高発現による細胞死は、DEVD などのアポトーシス阻害剤を添加すると、野生型 APP と同等の細胞死率を示した。この結果は、V642I-APP の高発現による細胞死の一部はこの野生型 APP の高発現による細胞死を含んでおり、DEVD などの阻害剤で抑制される神経細胞死機序は

FAD 変異依存性に特異的に起こることを示唆している。また、APP の変異体のうち、Aβ の過剰産生をもたらすが AD は起こさず脳血管障害を起こすオランダ型遺伝性アミロイド症の変異体 A617G-APP は、野生型 APP と同様に、低発現量では細胞毒性を示さず高発現で低頻度の細胞死を誘導した。このことから、FAD 変異により、APP が AD の病態に関連した神経細胞死を誘導していることが推察される。

APP 同様、PS の FAD 変異体についても、その細胞死機序を検討した⁹⁾。PS2 の変異体である N141I-PS2 も、低発現量で細胞死を惹起し、その細胞死は DEVD, GEE, アポシニンで抑制されたことから、V642I-APP と同一の細胞死機序を活性化させると考えられた。しかし、高発現による神経細胞死は DEVD では抑制されず GEE で抑制されるものの、その標的は NADPH 酸化酵素ではなくキサンチン酸化酵素であることが分かった。さらに、PS1 の変異体 M146L-PS1 では、低発現、高発現ともに DEVD では抑制されない細胞死を誘導した¹⁰⁾。この細胞死機序では、活性酸素種産生分子のうち一酸化窒素合成酵素が活性化され、PTX で抑制されるが PTX 感受性三量体 G 蛋白質 Go/i 以外の分子が関与することも分かった。

これらの結果から、FAD 原因遺伝子変異体はその種類や発現量の違いによって、異なる細胞死経路を活性化させて神経細胞死を誘導することが明らかとなった。このことは、これらの FAD 変異体によって AD という同一の疾患が発症することと矛盾するようだが、AD の臨床病態の本質が神経脱落であることを鑑みると、たとえ細胞死機序が異なっても、特定の脳の部位の神経細胞が特定の時期に細胞死を起こすならば同一の症状をもたらしても不思議ではない。また、FAD 変異体はいずれも細胞毒性の高い Aβ₄₂ の産生量もしくは細胞毒性のない Aβ₄₀ に対する産生量比率を上昇させることが報告されており、Aβ が老人斑の主成分であることと合わせると、神経細胞死そのものは異なる機序で起こっても、病理所見は同様となると推考される。

神経細胞死抑制因子の探索

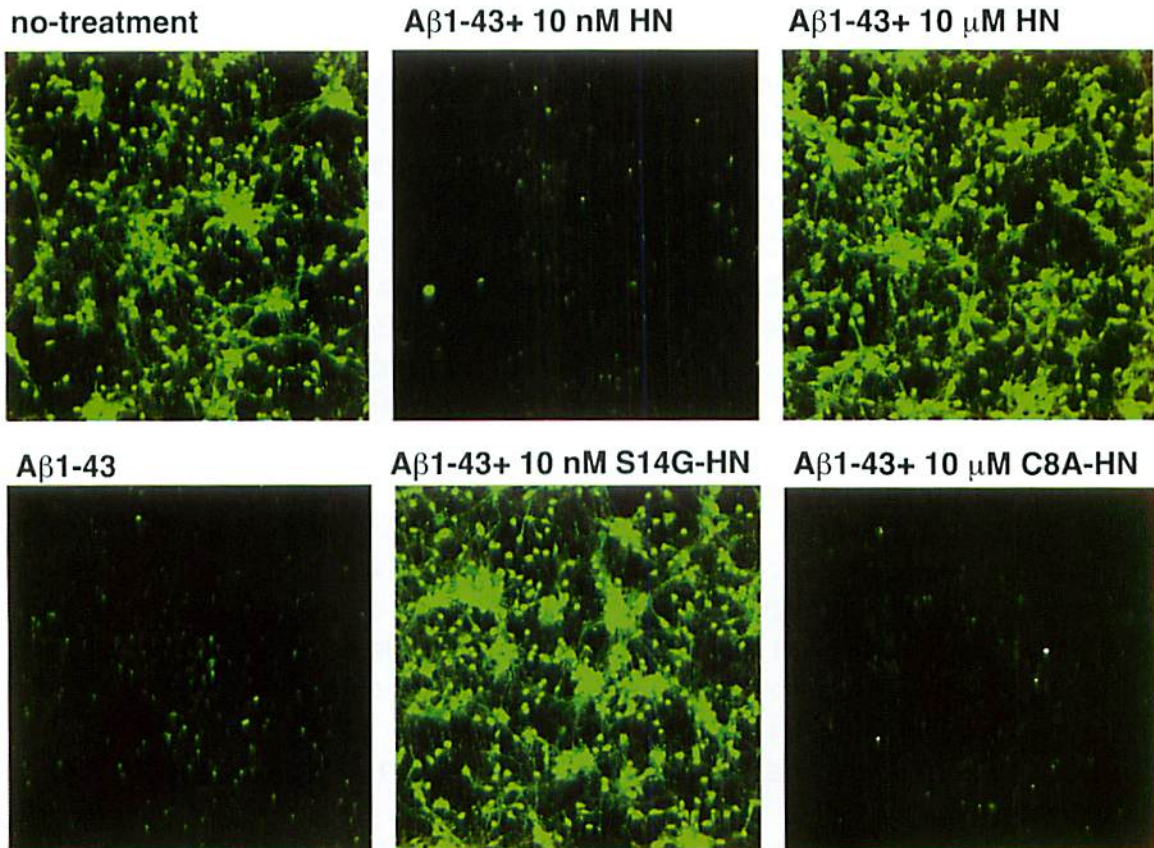
AD における神経脱落の原因がこのように多様で複雑であると、特定の経路を標的として細胞死を抑制する治療薬や治療法では、孤発性 AD はおろか FAD すらも完治することは不可能であると予想される。そこで、細胞死機序にはこだわらずに、細胞死抑制のみを評価基準として抑制因子の同定を行う機能的スクリーニングを実施

した。採用したのは、D'Adamio らが開発した Death trap 法¹¹⁾、発現 cDNA ライブラリーを株化細胞に導入し、cDNA がコードしている蛋白質を発現させた後に細胞死を誘導して、生存細胞から cDNA を単離するという方法である。生存細胞に含まれている cDNA には細胞死抑制に関する因子がコードされている確率が高いと予想される。この原法を、AD の神経細胞死に関与する細胞死抑制因子がより効率的に獲得できるように改良し、Disease-based death trap 法と名付けた。この方法では、培養細胞に神経細胞を、細胞死誘導因子として V642I-APP を用いた。Death trap 法では、全ての細胞に細胞死を誘導させる必要があるため、通常の一過性発現系ではなくエクジソンによる誘導発現によって全ての細胞に V642I-APP が高発現する細胞株を樹立した¹²⁾。さらにライブラリーは AD 脳後頭葉の cDNA ライブラリーを用いた。後頭葉は AD 患者において萎縮などの程度が低く比較的正常な状態に保たれていること

が多いことから、細胞死抑制因子がより多く発現している可能性が考えられたからである。このスクリーニングにより、V642I-APP が惹起する神経細胞死を抑制する因子として最も高頻度で単離された cDNA は、新規の短鎖ペプチドをコードしており、このペプチド因子をヒューマニン (Humanin: HN) と名付けた¹³⁾ (総説は 8 を参照)。

ヒューマニンは分泌性の細胞死抑制因子

HN は 24 残基のペプチド (MAPRGFSCLLLLTSEI DLPVKRRA) で、単離した cDNA もしくは 24 残基ペプチド部分をコードする ORF のみを挿入した発現プラスミドを細胞に導入することで V642I-APP による神経細胞死を抑制した。さらに、HN 遺伝子を導入した細胞の培養上清を V642I-APP を導入した細胞に添加することでも細胞死抑制が認められた。そこで、HN ペプチ



第 2 図 A β による神経細胞死に対する HN の効果 マウス大脳皮質神経細胞を未処理 (no-treatment) もしくは HN とその誘導体存在下で 25 μ M A β 1-43 により処理し、72 時間後に Calcein-AM で染色した。生細胞の蛍光が蛍光顕微鏡下で観察される。HN は 10 μ M で細胞死を抑制するが、10 nM では効果を示さない。S14G-HN は 10 nM でも完全な細胞死抑制効果を持つ。C8A-HN は細胞死抑制効果の喪失した変異体である。

第1表 HNの細胞死抑制スペクトル

| HNが有効な神経細胞死侵害刺激 | | |
|---------------------|-----|--|
| FAD変異体 | APP | V642I, K595N/M596L, A617G, L698P |
| | PS1 | V82L, V96P, Y115H, E120K, M139T/V/I V82L, V96P, Y115H, E120K, M139T/V/I I143T/F, M146L/V, H163R/Y, I213T, A231T A246E, L250S, A260V, C263R, P264L, P267S, R269H E280V/G, L286Y, E318G, G384A, L392V, C410Y |
| A β 抗APP抗体 | PS2 | N141I, M239V |
| | | A β 1-42, A β 1-43, A β 25-35 22C11 |
| HNが無効な神経細胞死侵害刺激 | | |
| 長鎖ポリグルタミン | | |
| SOD1変異体 | | A4T, G85R, G93A |
| プリオンペプチド | | PrP106-126 |
| 抗癌剤 | | エトポシド |

ドを合成して細胞の培地に加えたところ、合成ペプチドでも神経細胞死抑制活性があることが分かった。すなわち、HN遺伝子の導入により細胞内で合成されたHNペプチドは細胞外へ分泌されると考えられた。実際、HN遺伝子導入細胞の培養上清中にHNペプチドが含まれていることがimmunoblotにより確認された。また、HNの配列は、分泌蛋白質のシグナルペプチド予測プログラムで解析すると、シグナルペプチドとしての条件をほぼ満たしていた。GFP蛋白質のN末端にHNを付加することで、GFP蛋白質は細胞外に分泌され、HNは自己分泌だけでなく、シグナルペプチドとしても働くことが分かった¹⁴⁾。

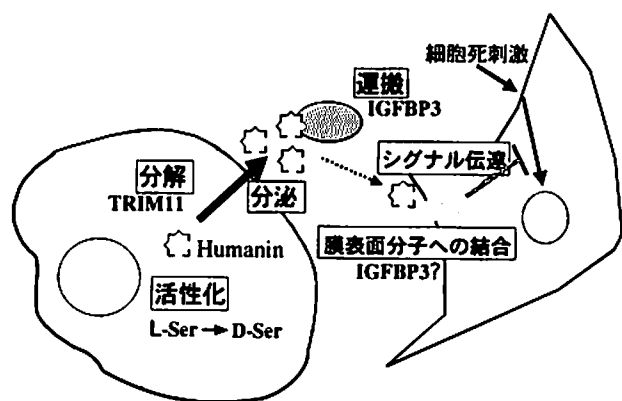
HNの細胞死抑制活性の特異性

HNは、V642I-APPを過剰発現させてもその細胞死を基礎レベル(遺伝子導入などの操作で自然に起こる細胞死)にまで抑制したことから、V642I変異特異的なアポトーシスだけでなく、野生型APPが高発現時に誘導する非アポトーシス型細胞死をも抑制すると考えられた。そこで、他のFAD変異体が誘導する神経細胞死についてもHNの効果を検討したところ、現在までに検討した全てのFAD変異体による細胞死に対して抑制効果が認められた(第1表)。これらの細胞死抑制はいずれも基礎レベルまでの完全な抑制であった。すなわち、HNはFAD変異体が惹起する複数の細胞死経路をいずれも抑制すると考えられた。さらに、ADにおける神経細胞死に関与するとされているA β についても、細胞毒

性のあるA β 1-42, A β 1-43, またはA β 25-35が初代大脳皮質神経細胞に誘導する細胞死をHNは完全に抑制した(第2図)。一方、A β による初代神経細胞の細胞死を抑制することが報告されているIGF-I, bFGF, ADNFはいずれも、FAD変異体の誘導する細胞死の全てを抑制する効果は認められなかった¹⁵⁾。これらの結果も含めて現在までに、AD関連の細胞死侵害刺激全てを抑制することが分かっているのは、HNのみである。HNはまた、A β による脳血管平滑筋細胞への細胞毒性も抑制することが最近報告された¹⁶⁾。この脳血管平滑筋のA β による細胞死は、ADにも高頻度で認められるアミロイドアンギオパチーで惹起される。一方、ハンチントン病の原因因子であるポリグルタミンや、家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であるSOD1変異体などのADに関連しない神経変性疾患原因因子が神経細胞に誘導する細胞死に対しては、HNは全く効果を示さなかった¹³⁾。つまり、HNはどんな細胞死にも有効なのではなく、ADに関連した細胞死を特異的に抑制する細胞死抑制因子であると考えられる。

HNの細胞死抑制機序

HNがFAD変異体による神経細胞死を全て抑制したので、FAD変異体に共通するA β 産生亢進、特に細胞毒性の高いA β 42/43の産生に、HNが何らかの影響を与えているのではないかと考えた。そこで、*in vitro*の系でA β 42/43と細胞毒性のないA β 40ともに産生の増加が認められているNL-APPの過剰発現系を用いて



第3図 HNの産生と細胞死抑制作用機序 HNは細胞内で合成されると分泌するが、細胞内での産生はTRIM11により分解調節される。また、細胞内で第14SerがD体化することにより活性化される可能性がある。細胞外のHNはIGFBP3に結合し運搬される。AD侵害刺激に対しては、神経細胞の表面に存在する分子(受容体)に結合して、チロシンキナーゼを主とした細胞内シグナル経路を活性化させることで神経細胞死を抑制する。詳細は本文参照。

HN存在下でのAβ量を測定した。その結果、Aβ40もAβ42/43もHNの存在の有無により有意な産生量の差は認められず、HNは細胞におけるAβ産生を変化させないことが分かった¹⁷⁾。

次に、HNにより細胞死が抑制される際、どのような細胞内シグナル因子が関与しているのかを検討した。一般に細胞死抑制や細胞生存シグナルに関与しているとされているMAPキナーゼ、チロシンキナーゼ、PI3キナーゼの阻害剤を用いたところ、HNによる細胞死抑制効果はチロシンキナーゼ阻害剤genistein存在下で消失し、他のキナーゼ阻害剤では影響されなかった¹⁸⁾。同様の検討で、IGF-Iによる細胞死抑制には、PI3キナーゼとチロシンキナーゼの両方が関与することが分かった¹⁹⁾。これらの結果は、HNの刺激により細胞内シグナル伝達経路が活性化されて細胞死抑制効果が発揮されること、そのシグナルにはチロシンキナーゼが中心的役割を果たすこと、HNによるシグナル経路はIGF-Iの細胞死抑制シグナル経路とは異なることを示唆している。また、放射性標識したHNペプチドは培養神経細胞に結合し、この結合は過剰な非標識体により阻害されたが細胞死抑制作用のないHN変異体では抑制されなかったことから、HNに特異的に結合する分子が神経細胞表面に存在することが示唆された。さらに、HNは細胞外から働くこと、低濃度でその効果を発揮すること、HNの構造活性相関が侵害刺激によらず同様であることなどの知見を考へ合

わせると、細胞表面のHN結合分子は受容体であると推測される。すなわち、HNは受容体に結合し、チロシンキナーゼを主とした細胞内シグナル伝達経路を活性化させて細胞死抑制効果を発揮すると考えられる(第3図)。

最近、HNが細胞内においてBcl-2ファミリーの細胞死促進因子Baxに結合し、そのアポトーシス誘導を阻害することが報告された¹⁹⁾。このHNの細胞死抑制は、Baxが関与するアポトーシスについて細胞の種類や侵害刺激に関係なく有効であることから、HNが広範なBax依存性アポトーシス抑制作用を持つことを示している。HNの第9LeuをArgに置換した変異体L9R-HNは、Bax結合能がないためアポトーシス抑制活性もない。しかし、L9R-HN合成ペプチドをV642I-APP遺伝子を導入した神経細胞の培地に添加すると、完全な細胞死抑制効果を発揮した。このL9R-HNは、その遺伝子をV642I-APPと共導入した神経細胞では細胞死抑制効果を示さなかったが、L9R-HNは細胞外への分泌能を欠失した変異体であり、培養上清中にはL9R-HNペプチドは検出されなかった¹⁹⁾。つまり、L9R-HN遺伝子導入により過剰に細胞内に発現されたL9R-HNはV642I-APPによるアポトーシス型細胞死を抑制することができず、これはL9R-HNが細胞外への分泌能を欠くために細胞外的作用標的(受容体)に作用できなかったためと考えられる。さらに、抗癌剤エトポシドによるアポトーシスの少なくとも一部はBaxが関与することが分かっているが、細胞外に添加したHNペプチドはエトポシドが初代神経細胞に誘導するアポトーシスを全く抑制しなかった。これらの知見を考へ合わせると、HNは独立したふたつの細胞死抑制作用を有すると考えられる。つまり、細胞外から受容体結合によりADの侵害刺激特異的に作用する神経細胞死抑制作用と、細胞内でBaxに結合することによる細胞の種類に依存しないアポトーシス抑制作用である。エトポシドの例が示すように、HNが細胞外から作用する場合は後者の細胞内での作用は機能しないと考えられる。HNがこれらふたつの機能を同時に発揮する可能性としては、細胞内で合成されたHNの一部が細胞外へ分泌され細胞外からの神経細胞死抑制活性を示し、一部は細胞内に分布してBax抑制の働きをするという推測ができる。また、HN配列を分子内にドメインとして持つHN様蛋白質が本来は後者の作用を担っていることも考えられる。

HN の 1 次構造と細胞死抑制活性

HN のアミノ酸置換や欠損変異体ペプチドを作製し、1 次構造と細胞死抑制活性の関連性について検討した^{13,14)}。HN の最大活性を示す必要最小領域は、第 3Pro から第 19Pro までの 17 残基であった。全長 HN の各アミノ酸を Ala に置換した検討で、第 3Pro、第 7Ser、第 8Cys、第 9Leu、第 11Leu、第 12Leu、第 13Thr、第 14Ser、もしくは第 19Pro の Ala 置換体は細胞死抑制活性を喪失し、これらのアミノ酸残基が重要であることが示された。これらのうち、第 7Ser を Ala に置換した S7A-HN は、その N 末端側に自己 2 量体化配列 (EFLIVIKS) を付加することで細胞死抑制活性が回復した。In vitro の pull-down assay によっても、HN は 2 量体化するが S7A-HN はしないことが分かった。これらのことから、HN が細胞に作用する際には、自己 2 量体化が必須であることが明らかとなった²⁰⁾。

第 14 番目の Ser を Gly に置換した S14G-HN は、HN の細胞死抑制活性が 1-10 μ M で発揮されるのに対し、1000 分の 1 の 1-10 nM で完全な細胞死抑制を示した。同様の活性の上昇は、第 14 Ser を通常の L 体ではなく D 体アミノ酸に置換した D-Ser14-HN でも認められた²⁰⁾。第 7Ser を D 体化しても活性に影響がないことから、アミノ酸の D 体化による活性上昇は第 14Ser に特異的なものと考えられる。この in vitro での結果から、生体内でも HN ペプチドの第 14Ser が修飾 (異性化) を受けて活性化することが示唆され、Gly 置換による活性の上昇はこの Ser 残基の翻訳後修飾を模倣した結果ではないかと考えられた。なお、リン酸化 Ser を含むペプチドについても検討したが、第 14Ser をリン酸化しても有効濃度は 1-10 μ M と、HN と変わりなかった。さらに、蛋白質分解酵素の認識部位となりうる第 4Arg と第 6Phe の両方を Ala に置換し、第 14Ser を Gly に置換した HN の置換体 AGA-HNG (配列: MAP AGASCLLLLTGEIDLPVKRRA, 下線部は置換したアミノ酸) は、S14G-HN よりさらに低濃度の 100-300 pM で完全に神経細胞死を抑制した。このように、HN の 1 次構造を変化させることで、より活性が高く安定な置換体を得られると考えられる。

HN の生体内での発現と結合分子による調節

抗 HN 抗体を用いた免疫組織染色により、HN 抗体陽性の神経細胞が AD 脳後頭葉に認められた。この結果

は、HN cDNA が AD 脳後頭葉の cDNA ライブラリーから単離された事実と良く符合している。一方、同年代の正常脳においては陽性神経細胞は認められなかった。抗体陽性のグリア細胞も、AD 脳においては数多く認められたが、正常脳ではわずかであった²¹⁾。これらの結果から、HN の脳での発現は AD の病態依存的に何らかの発現調節が為されることが推察された。また、正常マウス組織の immunoblot による解析では、抗 HN 抗体陽性のバンドは脳では検出されなかった。陽性バンドが認められたのは精巣で、加えて 3 週齢では大腸で発現が認められたが 12 週齢では検出されなかった。これらのことから、正常組織では HN は主に脳以外で発現し、消化管での発現は年齢依存的に調節される可能性が考えられた。

HN 産生調節については、転写および翻訳レベルでの機構は未だ明らかとなっていないが、HN が翻訳後に産生調節を受けることが分かっている。HN の結合分子を yeast two-hybrid 法で探索したところ、tripartite motif protein (TRIM) family 分子のひとつ TRIM11 が HN に特異的に結合する分子として同定された²²⁾。TRIM11 は TRIM family 共通の RING finger, B-box, coiled-coil の 3 つのドメインと B30.2 と呼ばれる独自のドメインを持ち、HN への結合には coiled-coil と B30.2 の両方のドメインが必要であった。RING finger ドメインはユビキチン E3 リガーゼとして働くことが示唆されており、実際、過剰発現した TRIM11 存在下では HN の発現が消失するが、RING finger ドメインの一部を欠損させるかもしくはプロテアソーム阻害剤を用いると HN の発現は回復した。TRIM11 の mRNA の発現は脳だけでなく多くの組織に認められることから、TRIM11 の結合による HN の分解促進による発現調節は、全ての組織において共通であると考えられる。

また、血中に多く存在し IGF-I/II の運搬を担っていることで知られる IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3) が HN に結合することが明らかとなった²³⁾。前述したように、HN は細胞外へ分泌されることから、脳以外の組織で産生された HN が IGFBP3 に結合することで、全身に運ばれる可能性が考えられる。さらに、S14G-HN は IGFBP3 存在下で非存在下の 10 分の 1 の濃度で細胞死抑制効果を示したことから、生体内においても IGFBP3 の HN への結合が HN の作用の亢進を促すと推測される。

おわりに

神経細胞死はADの中心病態でありながら、その機序の解明は必ずしも進んでいるとはいえない。私達は、FAD原因遺伝子変異体が誘導する神経細胞死を詳細に解析することで、FADにおける神経細胞死が遺伝子の種類や変異体の種類などの条件依存的に、複数の細胞死経路の単独または同時活性化により誘導されることを明らかにした。この結果は、特定の細胞死経路を阻害することでADの神経細胞死を抑制することを目的とした方法では全てのADに有効な治療薬は得られないという結論を導き、細胞死を標的としたAD治療薬開発の困難さを示すこととなった。一方、細胞死経路にこだわらない探索方法で神経細胞死抑制因子HNを同定した。HNは、全てのFAD変異体に加え $A\beta$ の細胞死も細胞死機序に関わらず抑制するが、AD以外の神経変性疾患関連因子による神経細胞死には効果がないという特長を持ち、HNがAD治療薬として優れていることを示唆している。同時に、HNが細胞表面の分子（おそらくは受容体）を介した細胞内シグナル経路の活性化という唯一の細胞死抑制機序によって、AD関連の全ての侵害因子による神経細胞死を抑制することから、やはりADの侵害因子による細胞死には何らかの共通点があると推測される。その完全な理解には更なる解析が必要であるが、その共通点が明らかになれば、ADの99%以上を占める原因の不明な孤発性ADの病態解明にも役立つと期待できる。HNは24残基という短鎖ペプチドであり、そのアミノ酸置換により低濃度で有効な置換体が作出できることから、HNそのものが治療薬として有望である。加えて、HNの生体内産生調節に関与する分子を制御するというAD治療法も可能であろう。HNの作用標的は細胞死であり、現在世界の多くのグループが開発中の $A\beta$ を標的とした治療法とは異なることから、HNをリードとした治療法と $A\beta$ 療法を併用することでより有効な治療が可能となり、ADの根治が実現することを期待している。

文 献

- 1) Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Nweton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J : Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349 : 704-706, 1991

- 2) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J-F, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH : Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375 : 754-760, 1995
- 3) Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH : Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376 : 775-778, 1995
- 4) Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, Fukumoto H, Iwatsubo T, Suzuki N, Asami Okada A, Ireland S, Kinane TB, Nishimoto I : G-protein-mediated neuronal DNA fragmentation by familial Alzheimer's disease-associated V642 mutants of APP. *Science* 272 : 1349-1352, 1996
- 5) Woloizin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B, Kusiak JW, Wasco W, D'Adamio L : Participation of presenilin 2 in apoptosis : Enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274 : 1710-1713, 1996
- 6) Wehl CC, Ghadge GD, Kennedy SG, Hay N, Miller RJ, Roos RP : Mutant presenilin-1 induces apoptosis and downregulates Akt/PKB. *J Neurosci* 19 : 5360-5369, 1999
- 7) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Nishimoto I : Multiple mechanisms underlie neurotoxicity by different types of Alzheimer's disease mutations of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 275 : 34541-34551, 2000
- 8) Niikura T, Hashimoto Y, Tajima H, Nishimoto I : Death and survival of neuronal cells exposed to Alzheimer's insults. *J Neurosci Res* 70 : 380-391, 2002
- 9) Hashimoto Y, Ito Y, Arakawa E, Kita Y, Terashita K, Niikura T, Nishimoto I : Neurotoxic mechanisms triggered by Alzheimer's disease-linked mutant M146L presenilin 1 : involvement of NO synthase via a novel pertussis toxin target. *J Neurochem* 80 : 426-437, 2002
- 10) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Kita Y, Terashita K, Nishimoto I : Neurotoxic mechanisms by Alzheimer's disease-linked N141I mutant of presenilin2. *J Pharmacol Exp Ther* 300 : 736-745, 2002
- 11) Vito P, Lacana E, D'Adamio L : Interfering with apoptosis : Ca(2+)-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* 271 : 521-525, 1996

- 12) Niikura T, Murayama N, Hashimoto Y, Ito Y, Yamagishi Y, Matsuoka M, Takeuchi Y, Aiso S, Nishimoto I : V642I APP-inducible neuronal cells : a model system for investigating Alzheimer's disorders. *Biochem Biophys Res Commun* 274 : 445-454, 2000
- 13) Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M, Sobue G, Koide T, Tsuji S, Lang J, Kurokawa K, Nishimoto I : A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A β eta. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6336-6341, 2001 Correction in : *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 12854, 2001
- 14) Yamagishi Y, Hashimoto Y, Niikura T, Nishimoto I : Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease relevant insults. *Peptides* 24 : 585-595, 2003
- 15) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, Abe Y, Kita Y, Nishimoto I : Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor Humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci* 21 : 9235-9245, 2001
- 16) Jung SS, & Van Nostrand WE : Humanin rescues human cerebrovascular smooth muscle cells from Abeta-induced toxicity. *J Neurochem* 84 : 266-72, 2003
- 17) Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, Shao Z, Hata M, Oyama F, Nishimoto I : Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor Humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 283 : 460-468, 2001
- 18) Niikura T, Hashimoto Y, Okamoto T, Abe Y, Yasukawa T, Kawasumi M, Hiraki T, Kita Y, Terashita K, Kouyama K, Nishimoto I : Insulin-like growth factor I (IGF-I) protects cells from apoptosis by Alzheimer's V642I mutant amyloid precursor protein through IGF-I receptor in an IGF-binding protein-sensitive manner. *J Neurosci* 21 : 1902-1910, 2001
- 19) Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, Reed JC : Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature*. 423 : 456-61, 2003
- 20) Terashita K, Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kawasumi M, Chiba T, Kanekura K, Yamada M, Nawa M, Kita Y, Aiso S, Nishimoto I : Two serine residues distinctly regulate the rescue function of Humanin, an inhibiting factor of Alzheimer's disease-related neurotoxicity : functional potentiation by isomerization and dimerization. *J Neurochem* 85 : 1521-1538, 2003
- 21) Tajima H, Niikura T, Hashimoto Y, Ito Y, Kita Y, Terashita K, Yamazaki K, Koto A, Aiso S, Nishimoto I : Evidence for *in vivo* production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. *Neurosci Lett* 324 : 227-231, 2002
- 22) Niikura T, Hashimoto Y, Tajima H, Ishizaka M, Yamagishi Y, Kawasumi M, Nawa M, Terashita K, Aiso S, Nishimoto I : A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults. *Eur J Neurosci* 17 : 1150-1158, 2003
- 23) Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, Ma L, Lee K-W, Niikura T, Nishimoto I, Cohen P : Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 13042-13047, 2003

足アーチ構造の機能

慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンター整形外科

橋本 健史

Key words : foot, arch, flatfoot, biomechanics

はじめに

最近、遺伝子研究が進み、ヒトとサルの違いは、遺伝子としてはごくわずかであり、ヒトとチンパンジーではその約99%までは同一であるという報告があった¹⁾。ヒトとサルを分けるものは何か？ それはやはり直立二足歩行を常時、日常的に行うかどうかにあるのではないか。サルは一時的には二足歩行を行うが、あくまでも短時間である。ヒトのように常時二足歩行することはできない。それはなぜか、様々な原因をあげることができるが、私は足の構造とくにアーチ構造の違いを強調したい。

サルの足部は扁平で、足アーチ構造は存在しない。それではいつ頃、ヒトは足部アーチ構造を持つに至ったのか、タンザニアのラエトリで約350万年前の猿人の足跡がみつかり、その足跡にはすでに土踏まず一足アーチ構造が存在した²⁾。人類史を約500万年としてそのかなり初期の段階である猿人の足跡にすでに足アーチ構造が存在した事実は、足アーチ構造が直立二足歩行にかなり重要な要素であることをうかがわせる。

実際、足部アーチ構造は、全体重を支え、また力を効率的に地面に伝え、歩行のためのエネルギーを非常に小さくしていることがわかってきた。また最近、扁平足障害が注目を浴び、それについての診断、治療が進歩してきている。われわれは、これら足アーチの構成要素の中で足底の靭帯と筋の働きに注目してバイオメカニク的手法を用いて研究をおこなってきた。本稿では、足アーチ構造についての最近の知見とそのアーチが消失する新しい病気が最近注目を浴びてきているのでその最新の診断、

治療について報告する。

足アーチの機能

足アーチは、足部の距骨以下中足骨までの12個あまりの骨、それらをつなぐ靭帯、力源となる筋、腱および全体を制御する神経系より構成されている(第1表)。矢状面でのアーチである踵骨、距骨、舟状骨、楔状骨、中足骨からなる内側縦アーチと、冠状面でのアーチである楔状骨、立方骨、中足骨からなる横アーチが存在する。ヒトの二足歩行を支える足の機能として求められていることは、重い体重を支えること、移動に際して力を地面にうまく伝達することおよび接地時の衝撃を和らげることである。体重を支えるためには頑丈であればよいが、力の伝達という面では不利になる。矛盾するこの問題を解決したのが足アーチであった。

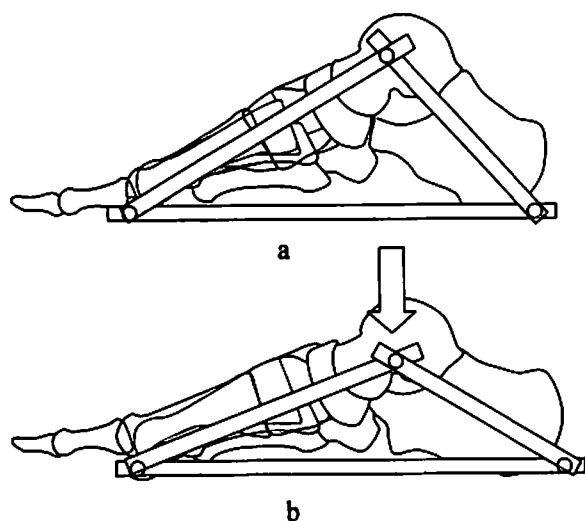
足アーチは Truss mechanism, Windlass mechanism という2つの機能を持っている。Truss mechanism というのは、足アーチが示す三角構造の働きのことである。足アーチは三角形とみなすことができ、上辺の2辺は、足根骨とそれらを結ぶ関節と強力な靭帯から作られる。底辺は、足底腱膜である。足アーチの2つの上辺が骨性構造で伸縮できない構造であるのに対して底辺が腱あるいは腱膜といった伸縮性に富む軟部組織であるため、三角形がつぶれることによって体重を支持し、かつ足接地時の衝撃を吸収する機能のことを Truss mechanism いう(第1図)。

Windlass mechanism とは、踵骨を起始として足趾基節骨に停止する足底腱膜が踵離地時に足趾背屈とともに巻き上げられることにより足アーチが高くなり、rigidな足となって踵離地から趾離地での蹴り出しの力をスムーズに地面に伝えることができるようになる機能である(第2図)³⁾。しかもこれらの mechanism は、

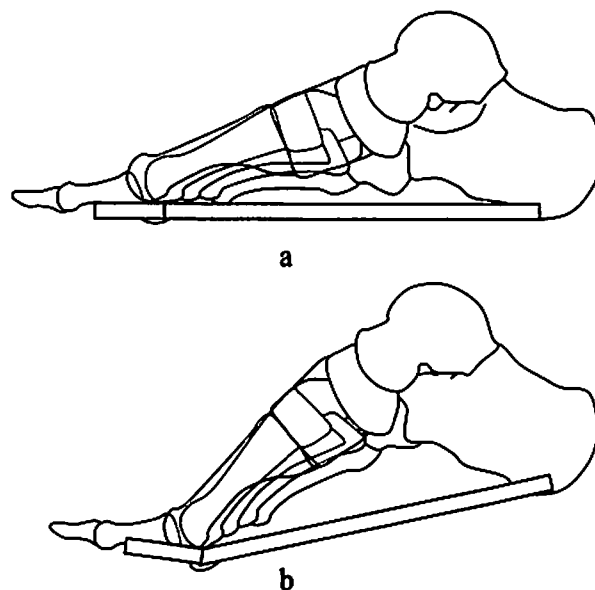
The function of the arch of the foot
Takeshi H ashimoto, MD
Department of Orthopaedic surgery, Keio university
Tsukigase Rehabilitation Center

第1表 足アーチ構造を形成する組織

| | Medial longitudinal arch | Transverse arch |
|----------|--|--|
| Bone | Talus Calcaneus Navicula bone Cuneiform bones Metatarsal bones | Cuneiform bones Cuboid bone Metatarsal bones |
| Ligament | Plantar aponeurosis Spring lig. Plantar cuneonavicular lig. Plantar tarsometatarsal lig. | Plantar aponeurosis Spring lig. Plantar intercuneiform lig. Plantar cuneocuboid lig. Plantar metatarsal lig. |
| Muscle | Tibialis posterior muscle Peroneus longus muscle Peroneus brevis muscle Flexor hallucis longus m. | Tibialis posterior muscle Peroneus longus muscle Peroneus brevis muscle |
| Nerve | Control nerve system | Control nerve system |



第1図 Truss mechanism. 足部は三角形のトラス構造とみなすことができる。a: 非荷重時. b: 荷重時. 荷重時には, トラス構造が沈み込み, 力の分散と吸収を行う。



第2図 Windlass mechanism. a: 歩行相における立脚中期. b: 歩行相における踵離地時. 線は足底腱膜を示す. 踵離地時には母趾が背屈して足底腱膜が巻き上げられ, 足アーチは高まる。

制御神経系によって歩行時の各期において適切にその働きを変化させていくことができるためにヒトは, おどろくほど少ないエネルギーで直立二足歩行を続けることができるのである。

筋, 腱のはたらき

足部には, アキレス腱など何本かの筋, 腱が走行しているが, 足アーチ機能に対する筋, 腱の重要性は最近まであまり指摘されることはなかった. 近年, 後脛骨筋腱

が非常に重要な働きをしていることが報告され、注目を浴びてきている⁴⁾。足部は歩行時に rigid な状態と flexible な状態をくりかえして、荷重の分散と力の伝達を巧妙に行っている。まず踵接地の直前に rigid な状態となり踵接地時の衝撃を吸収しやすくする。踵接地後しばらくして flexible な状態となり Truss mechanism によって体重を足底全体に分散する。その後再び rigid な状態となってけりだしの動力をうまく前足部に伝えるのである。足部の底屈、回外の働きをしていると考えられてきた後脛骨筋腱は、このとき重要な役割を演じていることがわかってきた⁵⁶⁾。

足部が rigid であるか、flexible であるかは、中足部の距舟関節、踵立方関節（ショパール関節）が大きな役割を持っている。すなわち、この2つの並んだ鞍状関節は運動軸が直交するとショパール関節はロックされて動きにくい rigid な足となり、逆に運動軸が平行になるとショパール関節はロックが解除されて動きやすい flexible な足となる。後脛骨筋腱は前足部を回内することによって運動軸を直交させ、ショパール関節をロックして rigid な足を作っていることがわかってきた。最近、この後脛骨筋腱が機能不全におちいって有痛性の後天性扁平足を作ることがあることが報告され、注目を集めている。これについては後述する。

われわれは、足アーチ構造の働きに関与している腱は後脛骨筋腱だけではないと考え、この後脛骨筋腱と対称の位置にある長腓骨筋腱に注目してバイオメカニクスの実験を行った。その結果、長腓骨筋腱も重要な働きをしていることがわかってきた。後脛骨筋腱は、脛骨および下脛骨間膜後面に起始して舟状骨、内側、中間、外側楔状骨、立方骨、第2、3、4中足骨底面などほとんどすべての足根骨底部に停止する。これに対して、長腓骨筋腱は、脛骨、腓骨の上方2/3に起始して内側楔状骨、第1中足骨底部に停止し、足底では、後脛骨筋腱と交叉する腱である。とくに興味深いことは、その走行であり、立方骨底面には深い長腓骨筋腱溝があり、それまで遠位方向に伸びていた腱がこの部で、急激に内側へ方向を変えられて、内側楔状骨、第1中足骨基部にいたる。したがってこの腱が牽引する力の分力は、かなり矢状面よりも冠状面に大きいといえる。

われわれは、Cadaver を用いて後脛骨筋腱と長腓骨筋腱の足アーチに対するはたらきを調べる研究を行った。皮膚と皮下組織を取り除いた Cadaver を固定し、各足根骨に3個ずつのマーカーを埋め込み、3次元座標計測器（Microscribe, Immersion co.）を用いて足根骨の動きを計測した。後脛骨筋腱と長腓骨筋腱を牽引して足アー

チの変化を調べた結果、長腓骨筋腱の牽引時に横アーチが高まることがわかった。そしてさらにその作用は後脛骨筋腱の牽引が伴うと強まることがわかった。長腓骨筋は歩行時に踵接地時に強く収縮することが筋電図上分かっている。踵接地時に長腓骨筋の働きによって横アーチが増強され、Truss mechanism がより有効に機能するのではないかと考えている

後脛骨筋腱機能不全について

最近、この後脛骨筋腱の機能障害によって生じる成人の後天性扁平足が注目を集めている。これについて述べたい。

病態：後脛骨筋腱は、内果の約1cm遠位で、約15mmにわたって血管分布の少ない領域があり、この部位が何らかの原因で血行不良に陥り、腱が壊死、断裂をおこすにいたる⁷⁾。すると後脛骨筋腱が機能しなくなり、ショパール関節がロックされない状態すなわち足が flexible な状態で踵荷重をしてしまうため、体重の負荷が骨関節部分ではなくスプリング靭帯などの靭帯部分により多くかかってしまう。そのため、靭帯がその負荷に耐え切れず破断したりして後天性の扁平足を作る。足部は扁平、外反変形をおこして足部内側の舟状骨部に疼痛を訴える。また外側で腓骨外果と踵骨が impingement をおこして疼痛を生じ、さらに距骨頭部が内方へ脱臼して距骨下脱臼となる場合もある。

診断：視診で扁平足を確認することが重要で、とくに患者を立たせて後方から観察した時に通常は下腿に隠されているはずの足趾が、扁平外反変形があるために外側へはみだしてみえる too many toes sign を認める。ま

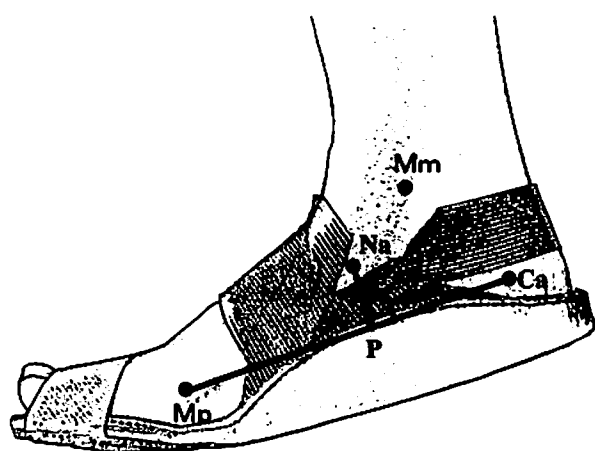


第3図 後脛骨筋腱機能不全症例の立位単純X線側面像。67歳、女性。著明な扁平足を示している。距舟関節は脱臼している。

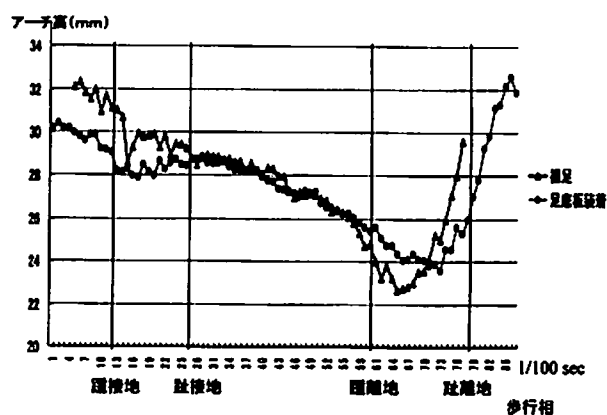
た、後脛骨筋腱が機能せず足をロックできないために片足での爪先立ちができない (single heel rise test 陽性)。単純 X 線写真では、外反扁平足を認め、ときに距骨下脱臼を認めることもある。特に距舟関節での亜脱臼が特徴的である (第3図)。MRI では、初期の段階から冠状断で後脛骨筋腱周囲に炎症性の滲出液貯留像と考えられる high signal density の像を認める。病期が進むと膨化した腱に断裂が生じ腱の low signal density 中の high signal density 像を形作る。さらに病期が進むと完全に断裂したり、消失したりする。

治療：治療は病期によって異なる。病期分類は Johnson のものが一般的である^{8,9)}。Johnson 分類では、病期を3期に分ける。Stage 1 は、扁平足が認められないか、あっても軽度で、主に後脛骨筋腱周囲に腫脹、疼痛を認め、爪先立ちが可能なものをいう。この場合は、保存的治療が中心となり、鎮痛消炎剤の内服、局所塗布、アーチサポートをつけた足底板の装着などである⁹⁾。

この足底板の作用機序についてはあまり詳細な報告は今までなかったが、われわれは、その動的機能について調べた。ボランティアの裸足内側の第1中足骨内側部、舟状骨内側部、踵骨内側部に赤外線反射マーカを貼り付けて、裸足の場合と足底板を装着した場合とで歩行させた。このマーカを3次元座標を3次元動態解析装置 (Elite, Milan, Italy) を用いて計測した。第1中足骨内側部と踵骨内側部のマーカ間の距離を足アーチ長とし、この線分への舟状骨内側部からの距離を足アーチ高とした (第4図)。裸足歩行の場合には踵接地時と踵



第4図 足底板を装着した足部内側。Mp：第1中足趾節間関節内側部。Ca：踵骨内側部。Na：舟状骨内側結節部。P：Naから直線 Mp-Ca に下ろした垂線の足。Mm：内果。足アーチ長：線分 Mp-Ca。足アーチ高：線分 Na-P。



第5図 足底板の足アーチに対する効果。横軸が時間軸であり歩行相を示す。歩行相における踵接地直後、裸足歩行では急激な足アーチ高の低下が起こったのに対して、足底板装着歩行では観察されなかった。また、踵離地直後、裸足歩行では急な足アーチ高の低下が起こったのに対して、足底板装着歩行では観察されなかった。

離地時に足アーチ高の急な減少と足アーチ長の増大が観察された。これに対して足底板装着時はこの急な変化が緩和された (第5図)。後脛骨筋腱機能不全の症例では、後脛骨筋による前足部のロック機構が消失してしまうため、踵接地時の足アーチへの衝撃が強まる。足底板はこの衝撃を緩和する働きがあることが解明された。

Stage 2 は、明らかな外反扁平足が認められるが徒手によって矯正可能で、爪先立ちが不可能な場合である。この場合、足底板を中心とした保存的治療に抵抗するときは、観血的治療をおこなうがその方法についてはいまだコンセンサスは得られていない。いくつかの方法が報告されているが、大きく、腱の再建、靭帯の再建、骨切り術とに分けられる。腱の再建では後脛骨筋腱を長趾屈筋腱、長母趾屈筋腱で再建する方法、また前脛骨筋腱を腱移行する方法が報告されている。靭帯再建では spring 靭帯を再建する方法が報告されている。骨切りは踵骨を踵骨体部で骨切りして内方移動を行って踵骨外反を矯正する方法が報告されている。これらは、いくつかを組み合わせる場合も多い。われわれは、stage 2 には、長趾屈筋腱を遊離、反転して、舟状骨に開けた骨トンネルを通して後脛骨筋腱を再建する腱移行法と踵骨を踵骨体部で骨切りして遠位骨片を約 1 cm 内方移動して外反を矯正する踵骨骨切り術とを併用して好成績を得ている。足趾の底屈に関しては長趾屈筋腱は長母趾屈筋腱と交通枝を持つので、問題は少ない。

Stage 3 は著明な外反扁平足を呈して後足部は、rigid で徒手でも矯正不可能な場合である。距骨頭部が内方へ

脱臼することもある。治療は関節固定術が基本となる。距踵関節、踵立方関節、距舟関節が対象となる¹⁰⁾。

文 献

今後の課題

足アーチの機能は2つの分野で未解明な部分が多い。1つ目は、アーチの動的機能の運動学的解明である。歩行時に筋、腱がどのようなタイミングで機能し、骨、関節にどのように働いて足アーチを保っているのかは詳しくは解明されていない。われわれは、長腓骨筋について横アーチに対する効果を解明してきたが、今後さらに短腓骨筋、腓腹筋などその他の筋についても検討していきたい。

2つ目は、足アーチの制御神経系についてである。この点に関しては、ほとんど報告がない。足アーチに動的な機能があるからには、それを制御する神経系があるはずで、足底圧、靭帯の張力、関節内圧を総合して足に加えられた力、足の位置を即座に情報収集して足アーチをどう変えていくかの指令が出されているはずである。足根部には、距骨と踵骨の間に足根洞という自由神経終末の集まった箇所があり、ここが情報集積センターではないかといわれているが、いまだ解明されていない。われわれはこの問題にも電気生理学的手法を用いてアプローチを行う計画を立てている。

これらの問題が解明されると後脛骨筋腱機能不全の治療法に画期的な改善がなされるばかりでなく、将来 tissue engineering によって作られた足の組織に真の機能を付帯させることができると考えられるのである。それは、歩くことも走ることもでき、取り替える必要のない真の義足の完成を意味するのである。

- 1) Navarro A, Barton NH : Chromosomal speciation and molecular divergence-accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science* 300 : 321-324, 2003
- 2) Cappechi V : Reflections on the footprints of the hominids found at Laetoli. *Anthropol Anz* 42 : 81-86, 1984
- 3) Kappel-Bargas A, et al : The windlass mechanism during normal walking and passive first metatarsalphalangeal joint extension. *Clinical Biomechanics* 13 : 190-194, 1998
- 4) Johnson KA, Strom DE : Tibialis posterior tendon dysfunction. *Clin Orthop* 239 : 196-206, 1989
- 5) Kitaoka HB, Luo ZP, An KN : Effect of the posterior tibial tendon on the arch of the foot during simulated weightbearing : biomechanical analysis. *Foot Ankle Int.* 18 : 43-46, 1997
- 6) Sharkey NA : Biomechanical consequence of plantar fascial release or rupture during gait : part 1-disruption in longitudinal arch conformation. *Foot Ankle Int.* 19 : 812-820, 1998
- 7) Frey C, Shereff M, Greenidge N : Vascularity of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg.* 72-A : 884-88, 1990
- 8) Chao W, Wapner KL, Lee TH, Adams J, Hecht PJ : Nonoperative management of posterior tibial tendon dysfunction. *Foot Ankle Int* 17 : 736-741, 1996
- 9) Myerson MS : Adult acquired flatfoot deformity-treatment of dysfunction of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg* 78-A : 780-792, 1996
- 10) O'Malley MJ, Deland JT, Lee KT : Selective hindfoot arthrodesis for the treatment of adult acquired flat-foot deformity : An *in vitro* study. *Foot Ankle Int* 16 : 411-417, 1995

講 座

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) と喫煙感受性規定遺伝子

慶應義塾大学医学部内科学教室

山 口 佳 寿 博

Key words : COPD, smoking sensitivity, gene polymorphism, cathepsin S, MMP-9, CYP2A6

緒 論

本邦における慢性閉塞性肺疾患 (COPD: chronic obstructive pulmonary disease) の有病率は総人口の 8.5%, 喫煙者の 15% であり, 現時点で約 530 万人の COPD 患者が本邦に存在すると推定されている¹⁾. この患者数は成人気管支喘息よりも多い. この傾向は世界各国で同様であり, COPD の有病率は世界総人口の 4~9%, 喫煙者の 10~15% と推定される^{2,3)}. 本邦における COPD の死亡率は人口 10 万に対して 10.4 人 (男性 15.7 人, 女性 5.3 人) であり明らかに男性の方が高い⁴⁾. 世界的にみても COPD の死亡率は現在第 6 位であり, 2020 年には虚血性心疾患, 脳血管障害に次いで第 3 位にランクされるものと予測されている⁵⁾. 以上のように COPD は全疾患の中で今後益々重要な位置を占めるようになるものと推察され, COPD の病態解明, それに対する早期診断法ならびに確実な治療法の確立を急がなければならない. 本論文では COPD の分子病態, 特に遺伝子レベルの病態について筆者らの解析結果を中心に紹介すると共に, それらを応用した COPD に対する新たな早期診断法の可能性について述べる.

COPD の疾患概念と定義

COPD は “十分なる可逆性を有さず進行性の気流制限を特徴とし, 有害粒子あるいは有害ガス状物質の吸入に対する肺全体の異常炎症反応に起因する病態” と定義さ

れる⁶⁾. 不可逆性が強い気流制限は短時間作用型気管支拡張剤を吸入させた後に測定された 1 秒率 (FEV₁% = 1 秒量/努力肺活量) が 70% 未満の場合をもって診断される⁶⁾. 吸入原因物質 (環境因子) として最も重要なものは喫煙であるが職業性粉塵/化学物質, 大気汚染 (室内, 室外), 感染微生物なども COPD の原因物質となる.

従来, COPD は慢性気管支炎, 細気管支炎, 肺気腫に分類されてきたが, 実際には肺組織全体に及ぶ病態であり, 気道 (中枢, 末梢), 気腔 (肺胞) に加え肺微小循環も傷害される. その意味で, COPD の臨床的表現型は気道病変優位型 (中枢気道病変, 末梢気道病変), 肺実質優位型 (気腫性病変), 肺微小血管優位型に分類されなければならない. 従来慢性気管支炎, 細気管支炎, 肺気腫と言う表現は妥当ではない.

喫煙関連 COPD の分子発症機序

COPD 発症にかかわる最も重要な環境因子は喫煙である. それ故, 喫煙の長期曝露に起因する COPD を取り上げ, その分子発症機序について考えていくものとする. 気道, 気腔, 微小循環の傷害部位に共通して認められる炎症細胞は肺胞マクロファージと CD8⁺-T リンパ球であり, COPD 発症においてこれらの炎症細胞が重要な役割を果たすことが示唆されている (第 1 表)⁶⁾. 肺胞マクロファージは種々なる原因物質によって活性化される. その結果, matrix metalloproteinase (MMP-1, 2, 9, 12), cysteine protease (cathepsin L, K, S) などの蛋白分解酵素が肺局所に過剰分泌される⁷⁾. これらの酵素によって傷害された組織片を抗原として CD8⁺-T リンパ球, 特に cytotoxic T cell-1 (Tc1) が局所的に免疫/傷害反応ならびにアポトーシスを惹起し, 局所損傷をさらに進行させる (第 1 図). COPD 発症に対して肺胞マクロファージならびに CD8⁺-T リンパ球

COPD and Possible Genes Regulating Smoking Sensitivity
Kazuhiro Yamaguchi, MD.
Department of Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan

第1表 COPD 肺の気道, 気腔, 微小血管に集積する炎症細胞

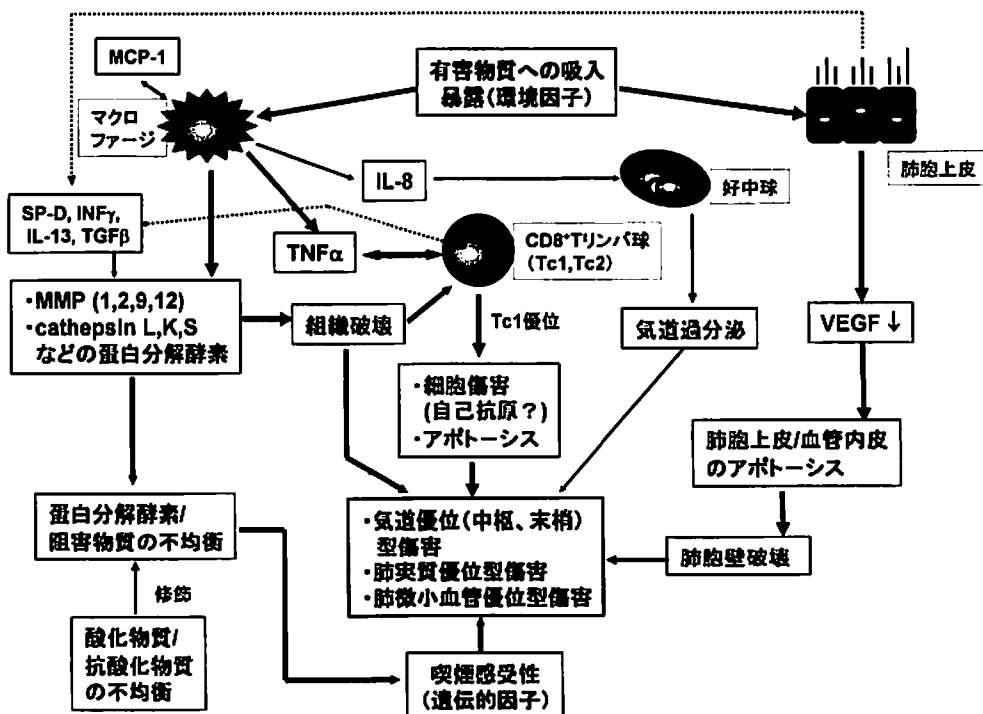
| 部位 | 炎症細胞の種類 |
|-------|---|
| 中枢気道 | <ul style="list-style-type: none"> 肺胞マクロファージ CD8⁺Tリンパ球 好中球 (重症例) 好酸球 |
| 末梢気道 | <ul style="list-style-type: none"> 肺胞マクロファージ CD8⁺Tリンパ球 好酸球 |
| 肺泡領域 | <ul style="list-style-type: none"> 肺胞マクロファージ CD8⁺Tリンパ球 好中球 (重症例) |
| 肺微小循環 | <ul style="list-style-type: none"> CD8⁺Tリンパ球 好中球 |

が如何なる関与をしているかを分子レベルで明らかにすることは COPD の治療を考える時重要である。これらの炎症細胞はステロイド抵抗性であり^{8,9)}, 両細胞が COPD に存在する炎症の中心的役割を果たしているならばステロイドは COPD の病態を形成する肺組織傷害を

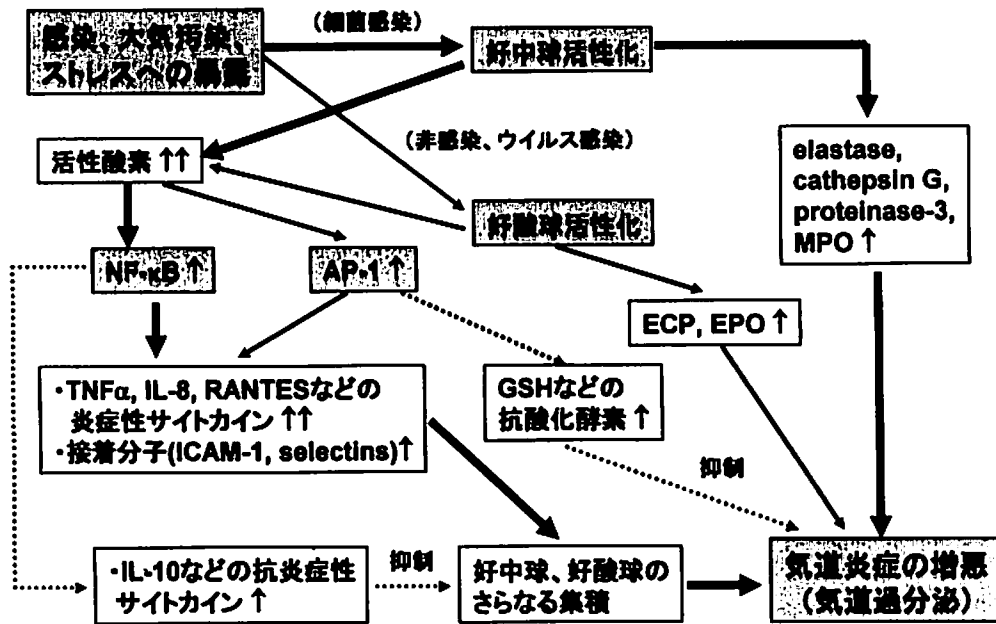
抑制しないことになる。1990 年代におこなわれた COPD に対する高容量ステロイド吸入の大規模研究の結果は全て陰性であり、マクロファージと CD8⁺T リンパ球を COPD 発症の中心的炎症細胞とする考えと矛盾しない結果となっている¹⁰⁻¹³⁾。

もう一つの重要な経路は気道/肺胞上皮を介するものであり喫煙への慢性曝露によって上皮傷害が発生し血管内皮成長因子 (VEGF) の産生が低下する。その結果、肺胞上皮、肺毛細血管内皮がアポトーシスに陥り肺泡壁破壊が進展する¹⁰⁾ (第1図)。以上の諸物質に加え、COPD の安定期病態形成には活性酸素、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-11、IL-13、surfactant protein D、TIMP-3、TGF- β の関与が報告されている¹⁵⁻²²⁾。

好中球、好酸球などの多核白血球も気道/気腔に集積する (第1表)。これらの多核白血球が COPD 慢性安定期における傷害の進展に対してどの程度関与しているかは明らかではない。現在までに集積された知見から判断すると、好中球/好酸球は COPD の慢性安定期において肺組織の破壊よりも気道分泌細胞の過形成に関与し主として気道過分泌 (慢性気管支炎症状) を惹起しているものと考えられる²³⁾。好中球/好酸球が重要な一次的役割を果たすのは COPD の急性増悪時である。急性増悪は主



第1図 安定期 COPD の分子生物学的発症機序。環境因子 (喫煙など) に対する炎症細胞 (肺胞マクロファージ、CD8⁺T リンパ球など) の反応のみならずそれらの反応を規定する内的/遺伝子レベルの影響が複雑に絡み合っ COPD の安定期病態が形成される。詳細は本文参照。



第2 COPD急性増悪の分子機序。詳細は本文参照。COPDの急性増悪は好中球、好酸球の浸潤/集積によってもたらされる気道炎症の増悪であり他の急性炎症の場合と同様にNF-κB、AP-1などの炎症性サイトカイン関連転写因子のDNA結合活性の亢進が重要な役割を果たす。

として感染（細菌性、ウイルス性、異型性）によって惹起される気道炎症の増悪であり気道過分泌を重要な臨床所見とする^{7,24}。活性化された好中球/好酸球からは多量の活性酸素が産生され（酸化ストレスの亢進）、転写因子NF-κBならびにAP-1とDNAとの結合活性を増加させる（第2図）。その結果、種々の炎症性サイトカイン（IL-8、TNF-α、接着分子（ICAM-1、E-selectin）ならびに組織障害性酵素/蛋白（NE、MPO、EPO、ECP）が過剰産生され気道炎症はさらに増悪する。この場合、炎症性物質と共に抗炎症性物質（IL-10、GSHなど）も過剰に産生され、両者のバランスによって急性増悪の程度が決定される。

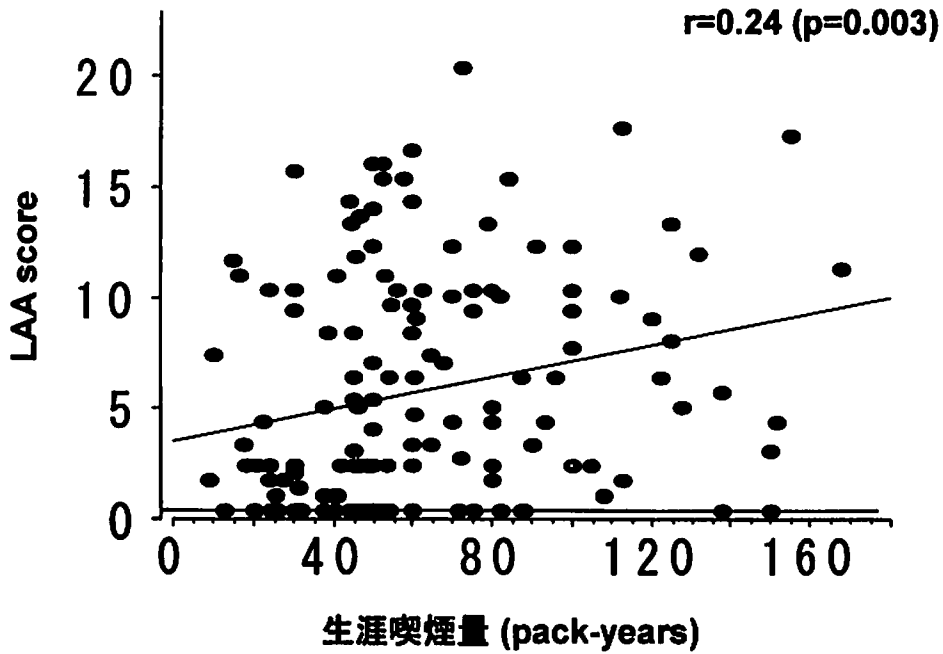
COPD発症と喫煙感受性規定遺伝子

喫煙関連COPDにおける疫学調査の結果で最も注目されるものは習慣的重喫煙者の10~20%にしか臨床的に問題となるCOPDが発症しないことである¹⁻³。この疫学的事実はCOPDが環境因子のみによって発症するのではなく各個体の内的因子がCOPD発症を規定する重要な要因として作用することを意味する。喫煙関連COPDにおいて内的因子は喫煙感受性と定義され、遺伝子レベルで規定される問題と考えられている²⁵。現在、

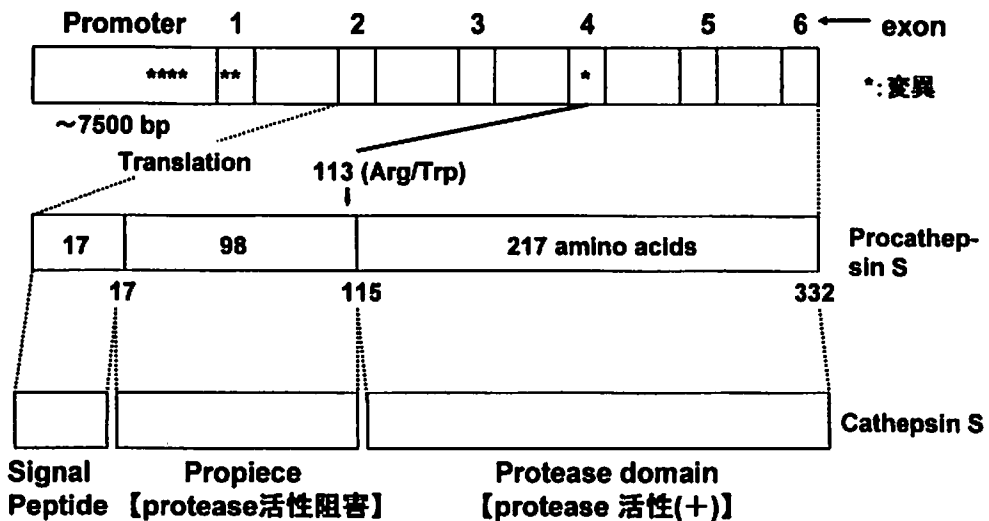
筆者らを含め世界で多数のグループが喫煙感受性規定遺伝子の同定を巡ってしのぎを削っている。

5,000人を対象としたFramingham studyで肺機能には家族集積性が認められることが報告された²⁶。さらに、若年性COPD患者の家系調査からも肺機能の家族集積性が証明された²⁷。また、一卵性双生児では喫煙に起因する肺機能の低下が同程度であるにもかかわらず二卵性双生児ではこのような傾向が認められないことが明らかにされた²⁸。これらの疫学調査の結果はCOPD発症にかかわる喫煙感受性には遺伝的素因を基礎とする個体差が重要な要因として関与することを示唆する。日本人は人種差が少ない民族であるので遺伝的素因の解析には比較的適したコホートである。東京近傍に在住する人々を対象とした筆者らの横断的調査結果を第3図に示す。生涯喫煙量（環境因子）とCT画像によって定量化された気腫病変の程度には正の相関を認めるものの著明なバラツキが存在することが判明した。この結果は日本人においても喫煙関連COPDの発症を環境因子のみでは説明できず内的要因が説明因子として必要であることを示唆する。

COPD発症の分子機序を規定する諸物質の産生遺伝子の異常（変異/多型）は如何なるものでも喫煙感受性を規定する可能性がある。その意味で喫煙感受性を規定



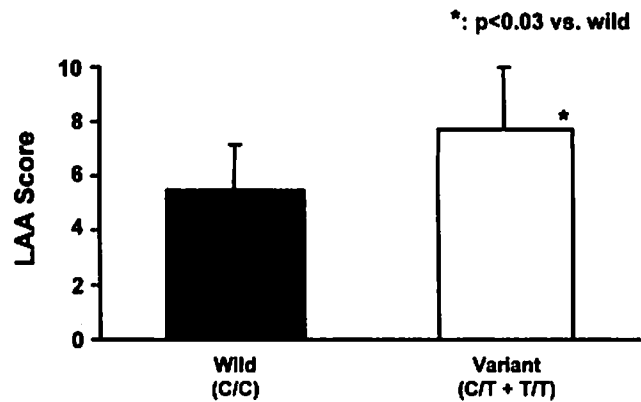
第3図 生涯喫煙量と肺野気腫病変の相関。生涯喫煙量 (pack-years)：一日喫煙量 (箱) x 喫煙年数 (年)。LAA：CT画像における低吸収領域。LAA score：全肺野におけるLAAの占める割合 (24点で全肺野が気腫化しているものと仮定)。



第4図 Cathepsin S 遺伝子の構造と筆者らが見出した変異/多型の部位。変異/多型は主として promoter 領域あるいはその近傍に存在する。

する候補遺伝子は多種多様に及ぶ。筆者らは COPD 発症関連物質の中で肺泡マクロファージによって産生される蛋白分解酵素に注目し、これらの酵素発現に関連する遺伝子異常を内的喫煙感受性規定因子と仮定した（第 1 図）。多種多様の遺伝子変異と COPD、特に肺野気腫病変との関連を解析してきたが、その中で cathepsin S（染色体 1q21）と MMP-9（染色体 20q12-13）の遺伝子変異が CT 画像上の気腫病変の程度と有意に相関することを見出した^{29,30}。Cathepsin S 遺伝子は 7,500 bp の promoter と 6 つの exon からなり、promoter 領域には A/G 変異、CA 反復変異、TCCC 欠損変異、exon 1 には T/C 変異、A/G 変異、exon 4 には C/T 変異が存在することを見出した（第 4 図）。Promoter 領域ならびに exon 1 に存在する変異は AP-1, GATA, GAS, C/EBP, delta-E などの転写因子との結合部位の変異であり転写活性を修飾することが予想される。Exon 4 の変異は procathepsin の切断部位の近傍に存在し、蛋白分解能を有する cathepsin の産生効率を修飾する。Mono Mac 6 細胞を用いた検討から promoter 領域の変異は転写活性を減少させることを証明できた。臨床的表現型との関連検討から、これらの変異を有する喫煙者では肺野気腫病変の程度が弱いことが判明した。以上の結果から、cathepsin S 遺伝子の promoter 領域を中心とした種々の変異は喫煙に伴う肺実質傷害を抑制する内的因子として作用するものと結論した。Cathepsin S 遺伝子に全く変異を認めない野生型 genotype を示す人の割合は非喫煙者と喫煙者で有意差を認めなかった。Cathepsin S に関して野生型 genotype を有する人は転写活性が維持されており、ある刺激によって cathepsin S の発現量は変異型の人に比べて高くなる。即ち、cathepsin S 遺伝子に関する野生型は肺実質病変の進展因子として作用する。Cathepsin S 遺伝子に関して野生型 genotype を示す人の割合は 17% であり、疫学調査によって示された喫煙関連 COPD の発症率（喫煙者の 10~20%）とよく一致する。

MMP-9 は動脈硬化ならびに大動脈瘤形成を促進する因子として作用することが報告されている³¹。さらに、種々の MMP は癌浸潤因子としても重要な役割を果たす³²。MMP-9 遺伝子の promoter 領域に存在する変異（-1562C/T）は転写活性を促進することが示されている³¹。筆者らのグループでは非喫煙者ならびに習慣的喫煙者を対象として MMP-9 遺伝子の -1562C/T 変異と肺野気腫病変の関連を解析し、以下の結果を得た²⁹。1) -1562T アレル頻度は非喫煙者（16%）と喫煙者（17%）で有意な差が存在しなかった。2) 喫煙者を



第 5 図 MMP-9 の promoter 領域における -1562C/T 変異と肺野気腫病変（LAA score）との関係。C/C：野生型（wild）、C/T + T/T：変異型（variant）。肺野気腫病変は変異型の人で有意に強い。

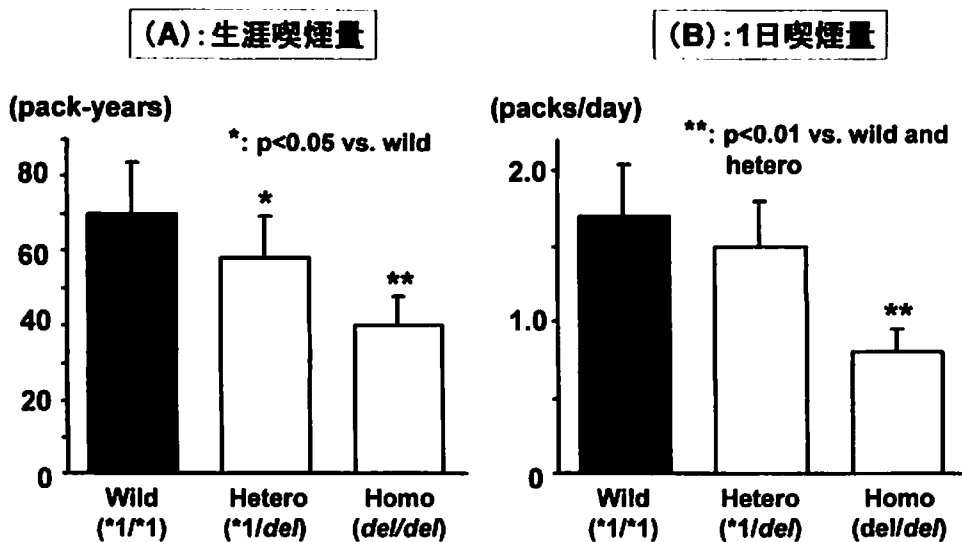
C/T 変異によって野生型（C/C）と変異型（C/T or T/T）に分類すると両群間で年齢、生涯喫煙量に有意な差を認めないにもかかわらず一酸化炭素肺拡散能力（DLco）ならびに肺野気腫病変を指標とした COPD の重症度は変異群で有意に進展していた（第 5 図）。以上の結果より、MMP-9 遺伝子の promoter 領域の変異は cathepsin S 遺伝子の場合と異なり COPD 促進因子として作用するものと考えられた。Cathepsin S ならびに MMP-9 の遺伝子変異に関する解析結果は示唆に富むものであり、筆者らはこれらの遺伝子に関する変異検査を COPD の早期診断法として臨床応用が可能ではないかと考えている。現在、COPD の早期診断は高分解能 CT（HRCT）を用いておこなわれている。肺機能検査は確立した COPD の診断には有用であるが初期診断には適さない。何れの方法においても気腫を中心とした病変が少なからず存在しない限り COPD の診断ができない。即ち、従来の HRCT、肺機能を用いた診断は喫煙などの環境因子に曝露された結果、出来つつある COPD に対する診断法であり、出来る前からの COPD を予測するものではない。一方、cathepsin S、MMP-9 などの遺伝子変異検査はある個体の内的喫煙感受性を検出するものであり、その個体が喫煙を開始したとすると臨床的に問題となる COPD にまで進展するか否かを予測できる。即ち、遺伝子変異検査は喫煙開始前から COPD の発症を予測する“ゼロ”からの COPD 診断法と位置づけることができる。現時点では cathepsin S と MMP-9 に関する遺伝子変異解析を終了したばかりであり、喫煙感受性規定遺伝子はこれら以外に多数存在するものと予想される。今後さらに標的遺伝子の幅を広げ喫

煙感受性規定遺伝子の全貌を明らかにしたいと考えている。

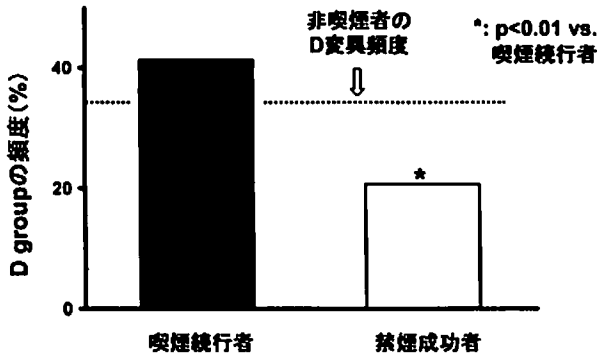
喫煙量規定遺伝子

COPDの発症を考える時、喫煙感受性規定遺伝子と共に喫煙量規定遺伝子に対する取り組みも重要である。筆者らのグループではニコチン代謝酵素であるcytochrome P₄₅₀所属のCYP2A6に注目し、その遺伝子変異と喫煙量との関係を解析した³⁹。CYP2A6の遺伝子変異にはexon 3におけるT/A変異(CYP2A6*2)、CYP2A6とCYP2A7がexon 3, 6, 8の間で変換された変異(CYP2A6*3)、さらにはCYP2A6遺伝子の全欠損変異(CYP2A6del)が存在する^{34,35}。これらの遺伝子変異によってCYP2A6のニコチン代謝活性が抑制される³⁶。CYP2A6に関する遺伝子変異の頻度は人種によって異なる。筆者らの解析から、日本人におけるCYP2A6*2アレル頻度はゼロ、CYP2A6*3のアレル頻度は0.3%、CYP2A6delのアレル頻度は18%であることが判明した。一方、白人ではCYP2A6*3の変異頻度が高いと報告されている³⁹。以上の基礎的解析をもとにCYP2A6del変異に焦点を絞って生涯喫煙量を中心とした喫煙習慣との関係を解析した³⁹。如何なる変異も有さない場合を野生型(W group: CYP2A6*1)と定義した。欠損型変異(D group: *1/del + del/del)を示した人

の割合は非喫煙者で36%、喫煙者で30%であり両者間で有意差を認めなかった。生涯喫煙量あるいは一日喫煙量は野生型 genotype (W group) を有する喫煙者で有意に多く欠損型 genotype (D group) を示す喫煙者で少なかった(第6図)。CYP2A6del変異によってニコチン代謝が阻害され喫煙後の血中ニコチン濃度は比較的高く維持される。その結果、D groupに所属する喫煙者では生体が次の喫煙を要求するまでの時間が長くなり、喫煙量が相対的に少なくなるものと考えられる。しかしながら、CYP2A6del変異に起因するニコチン代謝異常は喫煙阻害因子にはならない。反対にCYP2A6del変異を有する人の禁煙率は低く禁煙阻害因子として作用することが判明した(第7図)。以上の結果より、CYP2A6del変異は喫煙量の増加を抑制する反面禁煙を困難化する作用を有するのでD groupに属する人が喫煙を開始すると喫煙量は比較的少ないものの中々禁煙できないものと考えられる。即ち、CYP2A6del変異を有する喫煙者の禁煙にはニコチン置換療法あるいは抗うつ剤投与など積極的な禁煙指導が必要となる。喫煙は肺癌、COPDなどの肺疾患のみならず全身の悪性腫瘍、心臓/脳血管病変、糖尿病など多疾患の危険因子として作用する。その意味で禁煙運動を積極的に推し進めることはこれらの疾患に対する予防策として重要である。CYP2A6del遺伝子変異検査は各個体に合ったきめ細かい禁煙指導を計画する上で新たな基礎的知見を与えるものと考えている。



第6図 CYP2A6 遺伝子の欠損変異 (del) と喫煙量との関係。(A): 生涯喫煙量 (pack-years)。(B): 一日喫煙量 (packs/day)。*1/*1: 野生型 (wild), *1/del: 一本の DNA のみに欠損変異が存在 (hetero), del/del: 二本の DNA に欠損変異が存在 (homo)。CYP2A6 欠損変異を有する人の方が喫煙量は少ない。



第7図 CYP2A6 遺伝子の欠損変異 (*del*) と禁煙との関係。D group : *1/*del* + *del/del* の人で少なくとも一本のDNAにCYP2A6欠損変異を有する (hetero+homo)。禁煙成功者においてD groupに所属する人の割合は有意に低い。

文 献

- 1) Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M : Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Japan : Results from the Nippon COPD epidemiology (NICE) study. *Eur Respir J* 18(suppl 33) : 275S, 2001
- 2) National Center for Health Statistics. Current estimates from the National Health Interview Survey, United States, 1995. Washington DC : Department of Health and Human Services, Public Health Service, Vital and Health Statistics : 1995. Publication No. 96-1527
- 3) Rennard S, Decramer M, Calverley PMA : Impact of COPD in North America and Europe in 2000 : subjects' perspective of confronting COPD international survey. *Eur Respir J* 20 : 799-805, 2002
- 4) 国民衛生の動向 (厚生指標, 臨時増刊号). 財団法人厚生統計協会出版
- 5) National Heart, Lung, and Blood Institute. Morbidity & mortality : chartbook on cardiovascular, lung, and blood diseases. Bethesda MD : US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1998
- 6) Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Updated 2003. National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes for Health, MHLBL/WHO Workshop Report. 2003 : p.1-100
- 7) 山口佳寿博 : COPDにおける易傷害性とは何か? -表現型を規定する易傷害性の差-. *呼吸器科*, 3 : 424-432, 2003
- 8) Meagher LC, Cousin JM, Sekl JR : Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 156 : 4422-4428, 1996
- 9) Barnes P : Novel approaches and targets for treat-

ment of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160 : 572-579, 1999

- 10) Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K : Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease : a randomised controlled trial. *Lancet* 353 : 1819-1823, 1999
- 11) Pauwels RA, Lofdahl C, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS, Pride NB, Ohlson SV : Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking. *New Engl J Med* 340 : 1948-1953, 1999
- 12) Burge PS, Calverley PMA, Jones PW : Randomised, double-blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease : the ISOLDE trial. *BMJ* 2000 ; 320 : 1297-1303
- 13) The Lung Health Study Research Group : Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* 343 : 1902-1909, 2000
- 14) Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, LeCras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF : Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 106 : 1311-1319, 2000
- 15) MacNee W : Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 117 : 303S-317S, 2000
- 16) Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA, Shapiro SD, Elias JA : Interferon γ induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 192 : 1587-1599, 2000
- 17) Fujita M, Shannon JM, Irvin CG : Overexpression of tumor necrosis factor- α produces an increase in lung volumes and pulmonary hypertension. *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol)* 280 : L39-L49, 2001
- 18) Kuhn C, Homer RJ, Zhu Z, Ward N, Flavell RA, Geba GP, Elias JA : Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice - Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22 : 289-295, 2000
- 19) Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ, Chapman HA, Shapiro SD, Elias JA : Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 106 : 1081-1013, 2000
- 20) Wert SE, Yoshida M, LeViine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA : Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 5972-5977, 2000
- 21) Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KLM, Poole AR, Wakeham A, Mak TW, Khokha R : Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice

- lacking tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 108 : 817-829, 2001
- 22) Morris DG, Huang X, Kaminski N, Wang Y, Shapiro SD, Dolganov G, Glick A, Sheppard D : Loss of integrin $\alpha v \beta 6$ -mediated TGF- β activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 422 : 168-173, 2003
- 23) Nadel JA : Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies. *Chest* 117 : 386S-389S, 2000
- 24) Croxton TL, Weinmann GG, Senior RM : Future research direction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 165 : 834-844, 2002
- 25) 山口佳寿博 : 慢性閉塞性肺疾患の新しい診断的アプローチ : 遺伝子多型からみたハイリスクグループの特定. *現代医療*, 34 : 2205-2213, 2002
- 26) Givelber RJ, Courpmittree NN, Gottlieb DJ, Evans JC, Levy D, Myers RH, O'Cunior GT : Segregation analysis of pulmonary function among families in the Framingham study. *Am J Respir Crit Care Med* 157 : 1445-1451, 1998
- 27) Silverman EK, Chapman HA, Drazen JM, Weiss ST, Rosner B, Campbell EJ, O'Donnell WJ, Reilly JJ, Ginns L, Mentzer M, Wain J, Speizer FE : Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157 : 1770-1778, 1998
- 28) Redline S, Tishler PV, Rosner B, Lewitter FI, Vandenberg M, Weiss ST, Speizer FE : Genotypic and phenotypic similarities in pulmonary function among family members of adult monozygotic and dizygotic twins. *Am J Epidemiol* 129 : 827-836, 1989
- 29) Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, Yamaguchi K : Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 289 : 116-119, 2001
- 30) 山口佳寿博 : たばこと COPD. *内科*, 2004, in press
- 31) Zhang B, Ye S, Hermann S, Eriksson P, DeMaat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM : Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99 : 1788-1794, 1999
- 32) Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, Terakawa N, Nakamura Y : Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Res* 59 : 4225-4227, 1999
- 33) Minematsu N, Nakamura H, Iwata M, Tateno H, Nakajima T, Takahashi S, Fujishima S, Yamaguchi K : Association of CYP2A6 deletion polymorphism with smoking habit and development of pulmonary emphysema. *Thorax* 58 : 623-628, 2003
- 34) London SJ, Idle JR, Daly AK, Coetzee GA : Genetic variation of CYP2A6, smoking, and risk of cancer. *Lancet* 353 : 898-899, 1999
- 35) Chen G, Tang Y, Green B, Lin D, Guengerich FP, Daly AK, Caporaso NE, Kadlubar FE : Low frequency of CYP2A6 gene polymorphism as revealed by a one-step polymerase chain reaction method. *Pharmacogenetics* 9 : 327-332, 1999
- 36) Kitagawa K, Kunugita N, Katoh T, Yang M, Kawamoto T : The significance of the homozygous CYP2A6 deletion on nicotine metabolism : A new genotyping method of CYP2A6 using a single PCR-RFLP. *Biochem Biophys Res Commun* 262 : 146-151, 1999

原 著

統合失調症における視覚表象の形成と
経過に関する精神病理学的研究

慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室

(指導: 鹿島晴雄教授)

もり もと よう こ
森 本 陽 子

(平成 15 年 9 月 11 日受付)

ABSTRACT

Psychopathological Study of Visual Representation in Schizophrenia

Yoko Morimoto

Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Keio University

Visual representations in 35 schizophrenic patients are discussed. The subjects were 21 men and 14 women, 18-79 years of age (mean 35.0 ± 13.6), who met the ICD-10 diagnostic criteria for schizophrenia. Their 70 episodes of visual representations had various durations and 16 subjects (45.7%) experienced the onset of visual representations before the diagnosis of schizophrenia was made. The episodes were divided into 3 stages: autochthonous experience, obsession, and fantasy. Four subjects (11.4%) experienced only the first stage, 7 (20.0%) experienced the second, 1 (2.9%) experienced the third, and 23 (65.7%) had plural stages during the course of schizophrenia. The shift patterns among stages showed a tendency from the first to the second, and to the third such as changes in verbal hallucinations, in accordance with the process of ego disorder. Visual representations in schizophrenia are regarded as pseudo-hallucination and might be one of the symptoms contributing to the earlier diagnosis of schizophrenia.

Key Word: visual representation, visual hallucination, pseudo-hallucination, ego disorder, schizophrenia

頭の中に映像が浮かぶこと、すなわち視覚表象が、統合失調症（あるいは精神分裂病）の経過中に見られることは従来から知られている。しかし、WHOのICD-10¹⁾やアメリカ精神医学会のDSM-IV²⁾による統合失調症の診断基準にも採用されておらず、報告も少ないため、その臨床的意義は十分明らかにされていない。本研究は、統合失調症の視覚表象を臨床的に調査し、形成と経過、他の症状との関連を精神病理学的な立場から検討することにより、その症候学的な意義を明らかにするとともに、統合失調症の診断と治療に寄与することを目的に行われたものである。

対象と方法

研究の対象は、経過中に視覚表象を示し、脳器質疾患や視覚器異常がなく、薬物精神病、症状精神病、てんかんも否定され、平成15年4月あるいは著者の経過追跡中断時にICD-10の統合失調症の診断基準を満たしていた35症例（男性21例、女性14例）である。これらは、平成9年5月から平成15年4月までの6年間に慶應義塾大学病院精神・神経科およびその関連病院の精神科において、外来診療では6ヶ月以上、入院診療では1ヶ月以上、著者が主治医として直接診療し、平成15年4

第1表 各症例の性別, 年齢, 診断, 統合失調症発症年齢, および主な症状

| 症例 番号 | 性別 | 年齢 (中断時年齢) | 診断 (統合失調症) | 統合失調症 発症年齢 | 主な症状 |
|----------|----|---------------|---------------|---------------|---|
| 1 | F | 18 (16) | 妄想型 | 14 | 自生思考, 言語幻聴, 独語, 体感幻覚, 離人, 自我二重化, 自傷, 直観像 |
| 2 | F | 21 (21) | 妄想型 | 14 | 自生思考, 考想化声, 独語, 被害妄想, 音楽幻聴, 自我二重化, 強迫思考・行為, させられ体験, 自閉 |
| 3 | M | 23 | 妄想型 | 21 | 自生思考, 空想癖, 精神運動幻覚, 独語, 関係妄想, 被害妄想, 強迫思考・行為 |
| 4 | F | 23 (22) | 妄想型 | 21 | 自生思考, 空想癖, 考想化声, 言語幻聴, 音楽幻聴, 自我二重化 |
| 5 | M | 23 | 妄想型 | 21 | 自生思考, 空想癖, 考想吹入, 言語幻聴, 被害妄想, 誇大妄想, 音楽幻聴, 自我二重化, 強迫思考・行為 |
| 6 | M | 24 (24) | 妄想型 | 19 | 自生思考, 空想癖, 関係念慮, 醜形妄想, 衝動行為 |
| 7 | M | 24 (24) | 妄想型 | 19 | 自生思考, 被害妄想, 体感幻覚, 離人, 自我二重化 |
| 8 | M | 24 (24) | 鑑別不能型 | 21 | 自生思考, 空想癖, 考想化声, 考想伝播, 関係念慮, 音楽幻聴, 離人, 自我二重化 |
| 9 | F | 25 | 妄想型 | 18 | 自生思考, 空想癖, 考想化声, 言語幻聴, 誇大妄想, 音楽幻聴, 離人, 自我二重化, 自傷 |
| 10 | M | 26 | 妄想型 | 18 | 自生思考, 言語幻聴, 被害妄想, 誇大妄想, 要素幻聴, 体感幻覚, 躁状態 |
| 11 | M | 26 | 妄想型 | 25 | 自生思考, 考想伝播, 言語幻聴, 空笑, 関係妄想, 自他境界混乱 |
| 12 | M | 27 | 妄想型 | 22 | 言語幻聴, 考想化声, 考想伝播, 独語, 被害妄想, 音楽幻聴 |
| 13 | F | 28 | 妄想型 | 21 | 自生思考, 言語幻聴, 音楽幻聴 |
| 14 | F | 28 | 残遺型 | 24 | 自生思考, 空想癖, 考想化声, 考想伝播, 言語幻聴, 関係妄想, 被害妄想, 音楽幻聴, 自他境界混乱, 無為, 自閉, 緊張病性興奮 |
| 15 | F | 29 | 妄想型 | 29 | 自生思考, 考想化声, 言語幻聴, 精神運動幻覚, 自己臭恐怖, 関係妄想, 音楽幻聴, 離人, 自他境界混乱, 自我二重化, 両価性 |
| 16 | M | 29 | 鑑別不能型 | 14 | 自生思考, 言語幻聴, 独語, 空笑, 被害妄想, 要素幻聴 |
| 17 | M | 30 | 妄想型 | 26 | 自生思考, 考想化声, 言語幻聴, 被害妄想, 感情鈍麻, 自閉 |
| 18 | M | 30 | 残遺型 | 16 | 自生思考, 関係妄想, 被害妄想, 自閉 |
| 19 | M | 34 | 残遺型 | 24 | 自生思考, 考想化声, 独語, 被害妄想, 音楽幻聴, 自閉 |
| 20 | M | 34 | 妄想型 | 25 | 自生思考, 関係妄想, 被害妄想, 音楽幻聴, 体感幻覚, 感情鈍麻, 自閉 |
| 21 | F | 35 | 残遺型 | 30 | 自生思考, 空想癖, 言語幻聴, 被害妄想, 誇大妄想, 無為, 自閉, 興奮, 自殺企図 |
| 22 | F | 35 | 妄想型 | 22 | 自生思考, 言語幻聴, 精神運動幻覚, 独語, 空笑, 被害妄想, 体感幻覚, 自我二重化, させられ体験 |
| 23 | M | 36 | 妄想型 | 23 | 関係妄想, 被害妄想, 体感幻覚, 自他境界混乱 |
| 24 | M | 36 (33) | 鑑別不能型 | 15 | 自生思考, 独語, 音楽幻聴, 感情鈍麻, 自閉 |
| 25 | M | 36 | 妄想型 | 21 | 自生思考, 考想化声, 考想伝播, 言語幻聴, 関係妄想, 音楽幻聴, 自閉 |
| 26 | M | 37 (35) | 妄想型 | 23 | 自生思考, 空想癖, 言語幻聴, 精神運動幻覚, 関係妄想, 音楽幻聴, 離人, 自我二重化, させられ体験 |
| 27 | M | 40 | 妄想型 | 27 | 自生思考, 言語幻聴, 被害妄想, 自閉 |
| 28 | M | 42 | 残遺型 | 24 | 自生思考, 言語幻聴, 誇大妄想, 音楽幻聴, 感情鈍麻, 緊張病性興奮 |
| 29 | F | 44 | 妄想型 | 17 | 自生思考, 関係妄想, 被害妄想, 感情鈍麻, 自閉 |
| 30 | M | 46 | 残遺型 | 27 | 自生思考, 被害妄想, 体感幻覚 |
| 31 | F | 50 | 妄想型 | 18 | 自生思考, 考想伝播, 言語幻聴, 精神運動幻覚, 関係妄想, 被害妄想, 体感幻覚, させられ体験, 自閉 |
| 32 | M | 55 | 残遺型 | 37 | 言語幻聴, 独語, 空笑, 関係妄想, 被害妄想 |
| 33 | F | 61 | 残遺型 | 16 | 自生思考, 言語幻聴, 関係妄想, 被害妄想, 自他境界混乱, 無為, 自閉 |
| 34 | F | 66 | 残遺型 | 31 | 言語幻聴, 空笑, 被害妄想, 自閉 |
| 35 | F | 79 | 妄想型 | 28 | 自生思考, 考想化声, 言語幻聴, 独語, 関係妄想, 被害妄想, 感情鈍麻, 自閉 |

月あるいは著者の経過追跡中断時に ICD-10 の統合失調症の診断基準を満たしていた患者で、さらに入院診療例については 1 年以内に退院し、病院内ではなく家庭、社会に生活の主たる基盤がある 108 症例（男性 61 例、女性 47 例）のうちの 35 症例である。

詳細な面接を繰り返し、患者の内面に生じた現象を体験、感情移入することで了解しようとする Jaspers の記述現象学的方法論³⁾を用いて症状を抽出し、視覚表象を示す 35 症例を抽出した。過去の症状については患者の記憶が不確かな部分もあり、精神病理学的方法論上の限界もあるが、家族の陳述や診療録の記載から十分な情報が得られた症例のみを対象に含めた。この 35 症例について、平成 15 年 4 月末現在（あるいは著者の経過追跡中断時）の性別、年齢、ICD-10 による診断、統合失調症の発症年齢、視覚表象以外の現在までの主な症状を第 1 表に示す。対象の年齢は 18 歳から 79 歳にわたり、平均年齢は 35.0 ± 13.6 歳である。平成 15 年 4 月あるいは著者の経過追跡中断時の ICD-10 による診断は、統合失調症の妄想型 (F20.0) 23 例、残遺型 (F20.5) 9 例、鑑別不能型 (F20.3) 3 例である。統合失調症の発症年齢については、著者自身の観察により ICD-10 の統合失調症の診断基準を満たした年齢とした。過去の発症例については、症状を ICD-10 の基準に置き換えて判断した。統合失調症と診断された年齢は 14 歳から 37 歳にわたり、平均 22.0 ± 5.3 歳である。現在までの主な症状については、各症例の病像を呈示するために、Bleuler の記載した統合失調症の基本症状（連合弛緩、感情障害、自閉、両価性）⁴⁾と ICD-10 の統合失調症の診断基準に含まれる症状から、各症例に認められたものを抽出した。なお、音楽幻聴、直観像などの本論の考察に関連する症状をこれに加えた。

結 果

35 症例、同一症例に生じた複数の視覚表象エピソードを含む 70 エピソードについて、視覚表象の出現時年齢、持続期間、主な内容および病型分類を第 2 表に示す。視覚表象の初回出現時の年齢は 4 歳から 62 歳にわたり、平均 21.7 ± 11.3 歳であった。最も早く出現した症例 1、14 は自ら「記憶をさかのぼれる一番幼いとき、4 歳」と述べたので、これを採用した。統合失調症の診断基準を満たす前に視覚表象が出現していたものが 16 例あった。そのときの 16 例の ICD-10 による診断の内訳は、他の非器質性精神病性障害 (F28) 6 例、分裂病型障害 (F21) 4 例、離人・現実感喪失症候群 (F48.1)

3 例、強迫性障害 (F42) 1 例、社会恐怖 (F40.1) 1 例、強迫性人格障害 (F60.5) 1 例であった。視覚表象の持続期間は 1 日で消滅したものから内容が移り変わりながら 33 年間ほぼ連日持続しているものまで多様であった。病型分類は、考察で検討した視覚表象の分類で、詳細は後に触れる。

症例呈示

まずさまざまな様相の視覚表象が出現し、その症状変遷を十分に捉えることのできた症例を 2 例呈示する。次に視覚表象の成立やほかの症状との関連に示唆を与える症例を 5 例呈示する。すなわち自生思考との関連が見られるもの 1 例、強迫との関連が見られるもの 1 例、空想的な発展をとげたもの 2 例、および治療状況により症状が動揺するもの 1 例である。いずれも患者のプライバシーに配慮して、論旨に影響のない範囲で病歴等を若干変更してある。

1. 症状変遷を十分に捉えることのできた例

《症例 21》35 歳、女性

物心ついたときから空想で物語を作って頭で遊ぶ子供で、暇だと感じたことがないという。短期大学卒業後会社員をしていた。26 歳時に、抑うつ気分、過食、拒食を訴えて精神科を受診したが、数回で自己中断し、以後特に変調なく勤務を続けていた。

30 歳時に、「自宅の雰囲気がおかしい、家族が皆殺しにあった」「自分に命令してくる精神世界の声が聞こえ、その通りに行動すると良いことが起きる」と言い出し、不眠、過活動になり、自分はとても異性にもてるので良く知らない男性とも恋愛関係にある、襲われるなどと主張し、精神運動興奮状態を呈して精神科を受診し、統合失調症と診断され、約 1 ヶ月間入院した。入院中から haloperidol, chlorpromazine 等による薬物療法を受け、退院後も現在まで外来通院しながら、risperidone 一日 2 mg 内服中心の薬物療法を継続して受けている。

この入院中から、何かに集中していない時にとりどめなく考えが浮かび、それに頭の中でひとりでの映像がつくようになった。次第に映像の浮かんでくる時間が増加し、知らず知らずとらわれてしまい、思うように集中することができなくなった。退院後は職場復帰せず退職した。

31 歳頃からは、考えたくないにもかかわらず過去に経験した場面が浮かび、映像になるようになった。過去の場面は、自分が失敗した場面や人から誤解された場面

第2表 視覚表象の出現時年齢, 持続期間, 主な内容および病型分類

| 症例 番号 | 視覚表象の 出現時年齢 | 視覚表象の 持続期間 | 視覚表象の主な内容 | 病型 分類 |
|----------|----------------|---------------|---|----------|
| 1 | 4 | 12年* | 目にした周囲の事物, 過去の楽しかった場面 | I |
| | 14 | 2年(並存)* | 過去の不快な場面, 事件事故に巻き込まれる場面, 自分が他人に危害を加える場面 | II |
| 2 | 15 | 6年* | 見たテレビ番組, 過去の不快な場面(叱られたなど), 将来起きて欲しくない場面(親の死など) | II |
| 3 | 19 | 3年 | 過去の楽しかった場面, 友人が今ここにいたらいかにも示しそうな架空の言動(励ましなど) | III |
| | 同上 | 同上(並存・動揺) | (特に疲労時)過去の不快な場面(誤解されたなど) | II+ |
| | 23 | 7ヶ月+ | 友人との楽しい場面(冗談を言い合う, 励まされるなど) | III |
| 4 | 17 | 5年 | 過去のとりとめない場面 | I |
| | 22 | 1ヶ月* | 将来のうまく行かない場面(仕事場で自分が失敗している, 怒られているなど) | II |
| 5 | 15 | 6年 | テレビでみた事件の映像, 事件事故に巻き込まれる場面, 自分が両親を殺す場面 | II |
| | 21 | 1年 | 神である自分 | III |
| 6 | 13 | 11年* | 過去の不快な場面, (過去に別の選択をしていれば得られたはずの)理想的生活 | II |
| 7 | 19 | 5年* | 過去の楽しかった場面, あてつけるかのような友人の顔 | II |
| 8 | 16 | 8年* | 過去の(主に不快な)場面(テレビのスポーツ映像, 職場で叱責されたなど) | II |
| | 21 | 3年(並存)* | 将来の活躍している自分(職場の光景など), 理想的生活(立派な家や車など) | III |
| 9 | 14 | 11年+ | とりとめない考えごと, 色 | I |
| | 24 | 1ヶ月(並存) | 幻聴の主の想像上の姿かたち | II |
| | 25 | 1ヶ月(並存) | (暴力的な映画を鑑賞して暫くの期間)映画の登場人物のように行動する自分 | II |
| 10 | 18 | 5年 | 過去のとりとめない場面, (時に)過去の自分が気弱だった場面(誤解されたなど) | I |
| | 23 | 3年+ | 破壊的な行動をとる自分, 自分が両親を殺す場面, 事件事故に巻き込まれる場面 | II |
| 11 | 16 | 9年 | 過去のとりとめない場面 | I |
| | 25 | 3ヶ月 | これから先のいかにも規定されているような行動をしている自分 | II |
| | 26 | 10ヶ月+ | 過去のとりとめない場面 | I |
| 12 | 24 | 6ヶ月 | とりとめない過去の場面や考えごと | I |
| | 26 | 1年+ | 実際の会話や幻聴から連想して不快な過去の場面, 将来のうまく行かない自分 | II |
| 13 | 21 | 1ヶ月 | 女性の裸の下半身 | II |
| | 27 | 1年+ | 恋愛中ならばいかにもありそうな生活の場面 | III |
| 14 | 4 | 23年 | とりとめない考えごと, 過去のとりとめない場面 | I |
| | 20 | 7年(並存) | 過去の不快な場面(人から誤解された, 自分が人に親切にしてあげられなかったなど) | II+ |
| | 27 | 1年+ | 将来の楽しい生活(必要とされて働いている, 人と仲良く話しているなど) | III |
| 15 | 27 | 1年 | 過去の不快な場面(習いごとの厳しい訓練など) | II |
| | 28 | 1年 | とりとめない過去の場面や考えごと | I |
| | 29 | 10ヶ月+ | (疲労時)事件事故に巻き込まれる場面, 将来の孤独な自分 | II |
| | 同上 | 同上(並存・動揺) | (落ち着くと)とりとめない考えごと | I |
| 16 | 14 | 15年+ | 過去の不快な場面(いじめられたなど), 将来起きて欲しくない事態(母が死ぬ, 災害にあうなど) | II+ |
| 17 | 15 | 14年 | 過去のとりとめない場面, 比較的友人とうまくいっていた場面 | I |
| | 29 | 1年+ | 過去の不快な場面(いじめられたなど), 幻聴から連想していかにもありそうな不快な場面 | II |
| 18 | 23 | 7年+ | 過去の不快な場面(仕事場で無理に雰囲気をあわせていたなど) | II |
| 19 | 15 | 16年 | 過去のとりとめない場面 | I |
| | 31 | 3年+ | 過去の不快な場面(誤解されたなど), 将来のうまく行かない場面(就職の面接など) | II+ |

(35ページにつづく)

| 症例 番号 | 視覚表象の 出現時年齢 | 視覚表象の 持続期間 | 視覚表象の主な内容 | 病型 分類 |
|----------|----------------|---------------|--|----------|
| 20 | 16 | 16年 | とりとめない考えごと | I |
| | 30 | 2年(並存) | 過去の不快な場面(けんか、職場での叱責など) | II+ |
| | 32 | 5ヶ月 | 理想の仕事についている自分 | III |
| | 33 | 1年+ | 過去の、またはいかにもありそうな不快な場面(批判される、仕事で失敗するなど) | II |
| 21 | 30 | 1年 | とりとめない考えごと | I |
| | 31 | 2年 | 過去の、またはいかにもありそうな不快な場面(誤解された、批判されるなど) | II+ |
| | 33 | 2年+ | 将来の成功する自分、理想的な人間関係 | III |
| 22 | 22 | 1日 | 自分の交際相手が友人の女性と結婚する場面 | II |
| | 26 | 2年* | 刃物 | II |
| | 33 | 2年+ | 友人の女性と夫が夫婦になっている生活場面、自分が刃物で殺される場面 | II |
| 23 | 18 | 18年+ | 過去のとりとめない場面、時に過去の不快な場面(職場での叱責など) | I |
| 24 | 15 | 18年* | 過去の不快な場面(親に叱られたなど) | II |
| 25 | 20 | 2年 | 過去のとりとめない場面 | I |
| | 22 | 14年+ | 過去の不快な場面(誤解された、関係妄想かどうか自分でわからなくなる場面など) | II |
| 26 | 30 | 3年 | とりとめない考えごと | I |
| | 33 | 2年* | 過去の不快な場面(職場での叱責など)、将来も今のように不適応を起こしている自分 | II |
| 27 | 27 | 13年+ | とりとめない過去の場面や考えごと | I |
| 28 | 17 | 20年 | 過去のとりとめない場面 | I |
| | 37 | 5年+ | とりとめないが楽しそうな場面(旅先らしき景色、親切な何気ないやりとりなど) | III |
| 29 | 17 | 27年+ | とりとめない過去の場面や考えごと | I |
| 30 | 27 | 16年 | 過去の不快な場面(親に強制されたことをしている場面など) | II |
| | 43 | 3年+ | 将来の成功を収めている自分 | III |
| 31 | 41 | 9年+ | (宇宙人が特別に見せてくれる)将来幸せな生活をしている自分 | III |
| 32 | 49 | 5年 | 過去のとりとめない場面、特に仕事場の自分 | I |
| | 54 | 1年+ | 将来の理想的な生活(足の悪い自分が不自由なく暮らせる家や車、支えてくれる人など) | III |
| 33 | 28 | 12年 | 過去の不快な場面(中傷された、秘密を暴露されたなど) | II |
| | 40 | 21年+ | 自分でつくった物語(金持ちになる、人助けをするなど) | III |
| 34 | 31 | 2ヶ月 | 見た映画の場面、自分が映画に出ている場面 | I |
| 35 | 62 | 6ヶ月 | 自分の生活史の物語 | II |
| | 74 | 6ヶ月 | 少しでも接点のある人を自分の生活場面に出演させる物語 | III |
| | 78 | 1年+ | 少しでも現在接点のある人の生活史の物語 | III |

(注) 視覚表象の持続期間の+は現在も視覚表象が持続していることを示す。

(注) 視覚表象の持続期間の*は追跡が中断していることを示す。

(注) 病型分類の+は、視覚表象の内容が時に一部空想的、主体の願望充足的に加工されることがあり、第III型のようなエピソードが含まれることを示す。

などの不快なものも多く、当時味わった感情が再体験される。会社員として立派に働いていた頃の場面が浮かんでも、そのころもう少し健康に気を付けておけばこんな病気になるなかったのではないかと後悔してしまい気分が晴れない。次第に登場人物は過去の実際の知人であるが、現在の自分がいかにも言われそうな「早くしなさい」

といった空想的な内容を言われる場面が浮かぶようになり、落ち込んでしまい、頭の中で相手に謝るようになった。

32歳時、映像が勝手に頭の中に浮かんでしまい止められず、内容も不快、苦痛で仕方がないが、頭に何も浮かばなくなる「無」よりははまだと考えるようになった。

病気になって仕事を辞めてからの生活は何かをしようとしても映像で自分の思考が妨げられており、何も記憶がないように感じる。このまま頭が空になってしまうのではないかという恐怖感があり、そのため映像を自分で浮かべているのかもしれないとも考える。頭が自分の思い通りにならない苦痛で、ビル7階から飛び降り自殺を図ったが、擦過傷のみで救命された。

救命後の33歳頃からは、過去の不快な場面から発展して、その登場人物と自分との関係を新たに自分の都合の良いように創作したり、自分が事業を興して出世する、芸能人とジェットコースターに乗っているなどの、将来の空想的な映像も混在するようになった。内容は自分の話題であるが他人事のように、自分で観客のようになっていると感じている。

〈症例14〉28歳、女性

物心ついた4歳時からとりとめなく考えが頭に浮かんで映像になる体験があり、小学校の中学年からは空想癖がある。

短期大学在学中の19歳時に、人と思うように話が出来ない感じがして、自らカウンセリングを受けたことがある。卒業後は専門学校で語学を学び、22歳から事務員として主に端末処理の仕事をしていた。

19歳頃から、色々思い浮かんで映像になるという、以前からある体験が増えた。同じ頃から音楽幻聴も始まり、現在に至るまで持続している。20歳頃から、集中の途切れた時に、過去に自分が実際にしでかした失敗などの不快な場面がひとりでの映像で頭に浮かび、当時の悔しさや恥ずかしさといった感情が再体験されるようにもなった。同じ過去のいきさつでも、楽しかったこと、嬉しかったことは自分で意識しないと浮かばない。

24歳時に、周囲の人の悩み事を自分の悩みのように受け止め過ぎてしまい距離が保てない、とりとめなく頭に浮かんで来る考えごと全てに意味を付けたり理由を考えたりしなくては行かないと訴え、緊張病性興奮状態を呈して精神科を初診し、統合失調症と診断され1ヶ月半入院した。入院中haloperidol 静注等の薬物療法を行ない、人の話を聞き過ぎてその内容が自分に入って来ってしまうという訴えと、とりとめなく考えが頭の中で映像になったり、過去の不快な場面の映像が浮かんでしまうという訴えを残し退院した。退院後職場に復帰し、risperidone 一日2mg 内服、退院1年半後には同一日1mg 内服程度の薬物療法を受けていた。

26歳頃から、自分が過去に経験した場面が浮かんでくると、それに手を加えて小説を作るように展開させる。最初に浮かんでくる内容は自分では選べないが、当時で

きなかつた弁解をして相手が誤解を解いてくれるように展開させることで失敗などの不快な過去の映像は減り、当時の不快な感情が再体験されることも減る。映像が浮かび始めると自分で消すことは困難で、周囲から話し掛けられるなどの刺激で我に戻る。

27歳時、3ヶ月休業した後、「静かにしろ」「ルールがわかっていない」という近所の人の男女複数声が聞こえ、彼らに自分の考えを言われてしまう、買おうと思った物がスーパーで安売りになるなど、考えが筒抜けで身動きが取れないと訴え、退職した。Sulpiride 一日600mg 内服の薬物療法で声が聞こえることや考えが筒抜けになる体験は2ヶ月でなくなり、その後は同一日200mg 内服程度で困る症状はないという。専ら閉居し、家事手伝いの生活で、とりとめなく考えとその映像もあるが、殆どの時間は、将来の自分の楽しい生活の空想など、良い内容の映像が映画のように頭の中に浮かんでいる。

2. 自生思考との関連が見られる例

〈症例27〉40歳、男性

中学校卒業後、大工職人として働いていたが、27歳時に「電波がかかって体が震える」「人の声が体に入り込んでくる」と自覚して仕事をやめ、家にこもるようになった。自ら精神科を受診して、統合失調症と診断され、薬物療法を中心とした治療を受けていたが、症状は変わらず、「薬を飲むと腹が出る」と言い出して32歳時に一旦治療を受けることをやめた。34歳のころ工員として約1年働けた時期もあったが、それ以外の期間は家にこもり、電波がかかることを防ぐためとして、ごみを自室に並べたり、頭髪を半分だけそり落とすといった行動が続き、36歳時に家族に説得されて精神科治療を再開した。以後5ヶ月間の入院を含め、nemonapride 一日20mg およびrisperidone 一日4mg 内服を中心とする治療を受けているが、耳の中に人の声を入れられるという幻聴、それは近所の自動車工場の関係者が実験目的で行っていることであるという被害妄想の訴えが持続している。

27歳の退職時から、考えごとがとりとめなくひとりでの浮かびあがる自生思考を生じ、これは何か作業をしているときには出てこないが、いつのまにか考えごとをしているのだという。次第にこの考えごとに、関連する風景や人の顔などの映像がつくようになり、逆に昔行った場所の光景や仕事場でのやりとりなどの映像が浮かんで来て、そこから考えごとをすることもあると訴える。ともに思い出そうと思って思い出すのではなく、暇になるとひとりでの浮かんでくる。外の物音で我にかえり、

今映像が浮かんでいたのだと自覚することがあるが、生活するうえで邪魔にはならないと述べている。

3. 強迫との関連が見られる例

《症例 16》29 歳，男性

中学校時代いじめられて悩み、カウンセリングを受けていたが、中学 2 年頃から独語、空笑、「ばか」などの言語幻聴、SF 映画の効果音のような要素幻聴などが出現した。同じ頃から、昔のいじめられた場面やからかわれた場面が見たくもないのに強迫観念のように頭に映像で浮かぶようになり、そのたびに苛立ち、自分の頭を自分で叩いたり、空中をまるで相手がいるかのように殴るなどの行為が出るようになった。私立高校を欠席がちになんとか卒業し、専門学校に進学したが、講義についてゆけず 20 歳で中退した。次第に昔のことが映像で浮かんでくるのは興奮することがひどくなったため、20 歳時に精神科を初診しノイローゼと言われ、投薬されていたというが、詳細は不明である。

26 歳時に別の病院の精神科を受診し、統合失調症と診断されて risperidone, haloperidol, carbamazepine, perphenazine 等による薬物療法を受け、現在は fluphenazine 一日 1.5 mg および sulpiride 一日 1200 mg 内服中心の薬物療法を受けている。

当初より昔のいじめられた場面や、母が死ぬ、地震にあうなど心配事の場面が、映像で浮かび苛々してしまうと訴え、止め方がわからないと述べていた。27 歳頃からは頭や空中を叩く以外に、他人に起きた出来事だったことにすりかえる、楽しかった映像にすりかえる、「〇〇先生助けてください」と呪文を唱えて打ち消すなど、不快な映像が浮かんできたときの対処が増えたといい、その分苛々と興奮してしまうことは減ったと述べるが、浮かんだ映像を、映像だとわかっていても無視できずとりあってしまうところは加療によっても不変である。29 歳からはいじめられた場面が浮かんだときに打ち消すのではなく、頭で当時できなかった反論をすると、たまに相手が謝ってくれるような映像が出ることもあるという。

4. 空想的な発展をとげた例

《症例 35》79 歳，女性

大学時代に「知人の女性に純潔を汚された」「恩を裏切られた」と言い出し、その女性を追い回した時期がある。27 歳まで種々の高等教育を受け、その後教員や事務員、親族の工場手伝いなど職を転々としていた。28 歳時に勤務先を飛び出し、「上司が色々悪いように手を

回して邪魔をするので参ってしまった」「英気を養いたい」と申し出て精神科を初診し入院した。大学時代の知人の女性の裏切りの真意を確かめたいと述べていたが、新たな職を見つけたと言って 1 週間で自己退院した。また 32 歳時に自分のアイデアが文芸雑誌に剽窃されたと訴えて回り、その後頭重感を訴えて再び精神科を受診し、1 ヶ月入院したこともある。

62 歳時に、教員として赴任していた学校で、周囲の人の刺激やアイデアが声になって聞こえる、自分の考えが頭の中で声になるという体験が続いた。同じころ、頭の中に物語性を持った映像が浮かびその内容を大声で解説する状態となり、退職し、医療にはかからず半年ほどで回復した。物語は自分の生活史、学歴に関するものであったように記憶しているが、細かくは覚えていないと述べる。自分は赴任地の同僚よりも生まれも良く学歴も高いのに、どうしてこんなところに来たんだろうなどと怒鳴っていたと後から周囲に言われたという。

67 歳で老人ホームに入居した。74 歳時に、また 62 歳の時のような状態になったと自ら精神科を受診した。出会った人、接点が少しでもある人のことが物語になり、その内容が声になって聞こえ、その物語が映像になる。例えば、ホームに福祉関係の実習生が来ていろいろ質問され、プライバシーを侵害されたような気がする、彼らがホームの事務所に忍び込み、書類を見ている映像が浮かぶ。それについて「こんなことをして何の意味があるのか」などと思うと、それが頭の中で声になる。統合失調症と診断されたが、薬を飲むほど困っていないと投薬は拒否し、数回の受診のみで中断した。半年ほどで気にならなくなったのだという。

78 歳、再び同様の状態だと訴えて精神科を受診したが、今回も投薬は望まずただ話をしに来ている。老人ホーム内で自分の若い頃の学業成績や男女関係について噂される、これは盗聴されるか、ホーム職員が自分の個人情報や漏洩していない限り知られるはずがないことなので調べて欲しい、などの妄想と思われる内容を、警察や自治体に訴え出ることもある。そういった自分の噂を広める入居者やホームの職員たちの生活史などが物語になって映像で浮かぶといい、きつとこういう学校を出たのだろう、こんな家族がいるのだろう、だから自分の若い頃の情報を知ることでもでき、噂を流すのだからと述べる。自分の声で物語を語っているようでもあり、登場人物に台詞があるような感じもするが、はっきり聞こえるわけではないという。

過去のどこでこの人が自分のプライバシーを知ったのだろうと考えて、自分との接点がいかにあるような空

想の物語が広がり映像になるが、この物語には証拠がない、とふと思うと、その物語は崩れ、映像も消えて現実に戻る。現実を織り込んで次々に物語になる。それで、何が本当か虚構かわからなくなる。登場人物がいかにも言いそうなことを実際に入居者が言っていると、やはりあの内容は自分の空想ではなく、ちゃんと裏付けがあると思う。ごくたまに自分の過去のとりとめない思い出のようなものも映像になる。昔暮らしていた家の情景、空襲警報で逃げたこと、自分ではこのような考えごとは止められず、テレビを見るなど他のことが出来ない、止まるのを待つしかないが、別に急いですることも特にないので映像ばかりで過ごしているのだと訴えている。痴呆は認められない。

【症例 33】61 歳、女性

14 歳で実母が死亡してから不眠になり精神変調をきたし、方々の内科を受診した後に 16 歳で統合失調症と診断され精神病院に 1 ヶ月入院し電気ショック療法を受けた。以後内容は不詳であるが服薬による治療を受けながら、家事手伝いや売店の販売員などの仕事をしてきた。17 歳で将来を悲観して過量服薬の自殺企図がある。28 歳時、幻聴、被害妄想で 4 ヶ月精神科に入院し、haloperidol 一日 3 mg 内服を中心とする薬物療法を受け、現在まで服薬を続けている。痴呆は見られない。

28 歳時の入院の頃から過去の不快な思い出が映像でよみがえり、頭の中でそれに言い訳をしたり文句を言ったりするようになったといい、34 歳以降は就労せず、周りの雰囲気や呑まれていたたまれないと訴えて外出もほとんどせずに家にこもって生活している。

40 歳頃から、自分で物語を作ってその映像にひたってすごしていると述べる。物語を信じてしまうわけではないが、妄想になりそうだと訴える。過去の悔しかった場面の映像が浮かび不機嫌になってしまうときは、神様をお願いして嫌なものは打ち払うのだという。50 歳頃から、物語が長くなってきて、金持ちと結婚して家を建てて皆に来てもらう、犠牲になって人助けをするなど自分がなりたい姿や、自分ではない女の子の成長記など、一日中空想を見ていると述べる。自分で作ったものであるのに、勝手に始まってとらわれてしまい止められないので、時間ももったいないとも思うが、空想がないとどう生活するのかとても思い描けないと訴えている。

5. 治療状況により症状が動揺する例

【症例 15】29 歳、女性

16 歳頃からとりとめなく頭に考えごとが浮かぶことがあった。この頃から何を経験しても実感がなく、現在

に至るまで記憶があいまいだと訴える。18 歳から自分の体臭で周囲が不快に思っているのではないか心配になり入浴を繰返し、臭いの強い食品は自分に臭いが移る気がして食べられなくなった。世間のニュースも自分に関係があるように思い、殺人事件があると自分も被害を受けそうで怖くなる。人の影響を受けやすく、周りの言動を深読みして、何事も自分のせいではないか心配になる。自分の中に、嘘えて言うとも悪魔のような自分があり、兄弟に幸せになって欲しいと思いつつ同時に不幸になれと願ってしまうという。

27 歳から、考えごとの内容がとりとめないものから過去の不快な思い出ばかりになり、泣いたり怒ったりするようになった。徐々に映像が伴うようになり、いかにも当時言われたような内容や厳しい訓練を受けていたピアノの曲もついてきたり、自分で想像してつけたりしているうちに、頭から振り払えなくなった。情緒不安定、もう 1 人の自分があると訴えて精神科を初診した。精神病性障害と診断され、haloperidol による薬物療法を開始後、副作用などの理由から変更を加え、quetiapine 一日 25 mg から 75 mg および risperidone 一日 0.5 mg から 1 mg 内服による薬物療法で現在まで外来通院を続けている。治療開始後、過去の嫌な思い出の映像は減り、ただの記憶やとりとめない考えごとになることが増えた。

29 歳時、調子も落ち着きアルバイトを始めたが、事故や事件に巻き込まれないか心配になり、被害にあう場面を空想したところ、それが映像で浮かんでしまうようになった。映像から、本当にそのような事故が起きる気がして恐ろしくて外出できなくなった。同じ頃から「壊してしまえ」「やらないと駄目になる」などの言葉を思いつき、それが自分や男の声で聞こえ、それに対して頭の中で「そんなこと考えちゃ駄目だよ」と自分で答えるのだが、せめぎあってうるさくて仕方がない。その答えが抑えきれずに口をついて独り言になったり、口が動いてしまったりすると訴えるようになり、統合失調症と診断された。

暫く閉居したり、あるいは服薬量を増やすと、事故や事件が心配になっても、自分で映像まで出して余計に怖くならぬように、頭に力を入れて映像を止めたり、「出てきたわね、でも大丈夫」と言い聞かせるなどの打ち消し方を工夫する余裕が出るという。次第に事件や事故の映像は出なくなり、とりとめない考えごとやそれに伴う映像が浮かぶようになる。これらはあまり気にせず過ごせるといい、再びアルバイトに挑戦するが、対人接触を持続すると徐々に疲労し、事故にあう映像が出て外出が

困難になったり、将来自分が結婚もせず孤独に生活しているといった楽しくない空想的映像が出たりして、落ち着くまでまた閉居や服薬量の調整を要すことを繰り返している。

考 察

1. 従来の報告からの検討

1) 本研究の視覚表象の症候学的位置付けについて

ここに取り上げた全症例に共通し、さまざまな様相を呈している「頭の中に浮かぶ映像」は、幻覚に似ているが、主体外部の客観空間にではなく、主体内部の主観空間に現れることから、幻視ではなく視覚表象 visual representation である。

視覚表象に類似の精神症状は、従来からいくつか報告されている。Chaslin のマンチスム mentisme は、まとまりのない観念や表象が止まることなくすみやかに次々と現れるもので、不安時や入眠時に起きるとされる⁹⁾。Kretschmer の記載した映画フィルム思考 Bildstreifen-denken は、心的体験が頭の中に絵巻物のように展開するもので、夢や催眠時に見られるという⁶⁾。これらは意志によって制御されない精神活動という点で、本研究の視覚表象と共通する面もあるが、出現状況は異なる。

直観像 Eidetik は、一度見た対象を後に再びありありと見ることができる現象である。Jaensch はこれを、生理学的残像と記憶表象との中間の位置を占める現象で、感覚と表象双方の性状を具えるとしている⁷⁾。特別な素質をもつ児童にみられるが成人には稀で、本研究の症例のように空想的な発展をとげることはない。

白日夢 day dream は、覚醒時に夢をみるように空想にふけるもので健常者にも見られ、一般にその内容は願望充足的で、任意に展開できる⁸⁾。本研究の症例の経過中にこれに近い状態を示すものがあるが(症例 3, 14)、初期の不快な内容や自ら振り払えない侵入性を、白日夢から説明することはできない。

フラッシュバック flashback は、マリファナなどの薬物中断時や外傷後ストレス障害 (PTSD) などにおいて、薬物使用時や外傷を受けた当時の体験が生々しくよみがえる現象である。不快な映像が繰り返し意識に侵入するという点で、本研究の症例の一部に類似をみるが、本研究の症例には薬物の使用はなく、外傷体験をめぐる主題に限定されない点が異なる。

感覚性、実体性、客観性、外部空間への定位など、幻覚の要件の一部を欠く病的な表象は仮性幻覚 pseudo-hallucination とも呼ばれる。仮性幻覚の概念は、国に

より捉えかたが異なる⁹⁾。英語圏では仮性幻覚への関心が乏しく、一般に視覚表象と幻視の区別はされず、広く幻覚の中にまとめられる。

ドイツ語圏では、Kandinsky が主観空間に現れる鮮明で活発なイメージを病的表象として、仮性幻覚と呼んでいる¹⁰⁾。Jaspers はそれを「長いこと幻覚と取り違えてきたが良くみると実物的な知覚ではなく、一種特有の表象であるごときもの」と取り上げ、画像性をもって主体内部の主観空間に現れる仮性幻覚は表象に移行するが、実体性をもって主体外部の客観空間に現れる真性幻覚との間に移行はないと述べている⁹⁾。一方 Goldstein は、実体性と画像性は対立するものではないとして知覚と表象の区別は重視せず、仮性幻覚の根拠を实在判断の有無において¹¹⁾。以来 Jaspers と Goldstein の見方の違いをめぐる議論が生じたが、近年のドイツには両者の折衷的な立場も現れている¹²⁾。

フランスの Baillarger は、幻覚の成立に記憶と想像の不随意的活動、外的印象の遮断、および感覚器官の内的興奮という3つの条件を考えた。はじめの2つによる不完全な幻覚を精神幻覚 hallucination psychique と呼び、これに感覚性が加わることで本来の幻覚すなわち精神感覚幻覚 hallucination psychosensorielle が生じるとしている¹³⁾。精神幻覚は思考と幻覚との中間に位置付けられ、フランスにおける仮性幻覚の考え方の基礎となった。この仮性幻覚は、思考や表象がひとりでに生じる自生体験、すなわち自我の統制が緩み、本来そのもとにあった精神活動がひとり歩きしはじめる自動症 automatisme を症状の中核とみており、仮性幻覚から幻覚への移行を想定したものである。

同じくフランスの Séglas は、仮性幻覚を言語性のものと、人や物を対象にするものとに大別し、後者として Kandinsky の仮性幻覚を挙げている¹⁴⁾。言語性のは、主体を支配・束縛し運動性の強い言語性運動幻覚と、聴覚、視覚、運動性の心的表象が不随意に生じ、外在化しない言語仮性幻覚とに分けられている。

わが国では従来、ドイツでいう薬物中毒における仮性幻覚のみが一般に知られていたが、1990年代以降はフランスでいう統合失調症における仮性幻覚が紹介されて知られるようになった¹⁵⁾。

本症例の視覚表象は、全例が主体内部の主観空間に現れ、ありありとした実体性を欠き、おおむね实在判断も保たれることから、形式上ドイツでいう仮性幻覚の要件を部分的に満たしている。しかし、不随意に浮かんでくる自動症、止めたくても止められないという主体への束縛を有する点は、むしろフランスの伝統的な精神医学で

いう仮性幻覚によく一致する。しかもその内容には多くの例において物語性があり、見えている人の会話もつくことがあるという点から、Séglasのいう言語仮性幻覚に近い。すなわち単純な感覚症状ではなく、より複雑な思考や意志の障害を伴う視覚領域の仮性幻覚であると考えられる。そこで著者は、フランス精神医学の仮性幻覚概念に基づいて、以下の考察を進めたい。

2) 統合失調症の幻視および視覚表象をめぐる歴史的展望

統合失調症では幻聴に比べて幻視が少ないことは、従来から指摘されている。MueserらはDSM-III-R¹⁶⁾の診断基準を満たす統合失調症89例において、幻聴は71%、幻視は14%に見られたと報告し、従来の報告における幻視の頻度のばらつきに触れて、治療不応性例あるいは治療導入の遅れた例など症状の重い例については、頻度がより高くなるかもしれないとも述べている¹⁷⁾。先に触れたように主体内部の主観空間に生じる仮性幻覚の取り扱いや、文化要因の関与によって幻視の頻度には幅があり、わが国では工藤が視覚領域の幻覚、仮性幻覚を合わせて15.5%と報告している¹⁸⁾。

Kraepelinは、教科書第8版に、今日の統合失調症に通ずる概念である早発性痴呆の症状として、幻視、錯視、視覚変容を羅列的に記載している¹⁹⁾。その転帰について述べる中で「時には他に考えたことと関係を持ちつつ、あるいは関係なしにいろいろの人物の姿が浮かび上がってくる」という視覚表象を疑わせる記載も見られるが、視覚表象として独立に述べられてはいない。

Bleulerは、統合失調症の副次的症状として感覚錯誤を論じるなかで、幻視や錯視の例を挙げている⁴⁾。「幻覚の四つの主要な特徴、強度、明瞭性、外界への投射、現実価は、分裂病(統合失調症)の場合には相互に全く無関係である。それゆえ、そのおのおのは互いに影響を及ぼし合うことなく、限界ぎりぎりまで変化することができる」とした上で、「たかまった視覚的聴覚的空想の中では、周知のように表象ははなはだ生ま生ましくなり、感覚的知覚とほとんどひとしくなる。分裂病(統合失調症)において、現実と空想の区別はかき消されてくるので、こうしたことはますます容易に生起するようになる」と、幻視、錯視、視覚表象を区別せずに論じている。

わが国では、三好らが5症例を挙げて、統合失調症の幻視は多様で時には急性期、慢性期を通じて全病像の主症状となりうることを、空間定位および知覚的明瞭性からみれば真性幻覚的なものと仮性幻覚的なものの両者があること、患者に圧倒的な支配性を有しており、その支

配性に幻聴との共通点があるとして、一般的な意識障害時の幻視とは異なることを指摘している²⁰⁾。ここでは幻視と視覚表象とは区別して述べられているわけではない。

視覚表象について論じたものとして、村木らは「頭の中」という主体内部の主観空間に定位する視覚像を主症状とする統合失調症1症例を報告した²¹⁾。彼らはこれを「幻視」とした上で患者の精神内界に対する支配性に言及するとともに、統合失調症の幻視はこれまで主体外部の客観空間に出現するものに限定して論じられる傾向があったが、これは内部空間に出現する幻視の存在が少なく、存在したとしても多くは不明瞭で一過性のものであったためと思われる、と述べている。ここでは視覚表象という用語は使われていない。また内部空間に出現する幻視の多くは不明瞭で一過性であるという点については、著者の結果からは必ずしもそうとは限らないように思う。

視覚表象を統合失調症の発症初期の症状として重視する立場があり、井上らは「残酷なイメージ」の視覚表象を主症状とする統合失調症の1症例を挙げ、その初期症状としての意義を強調した²²⁾。中安は自生体験に含めた自生視覚表象を、初期分裂病症状として重視し、その診断根拠の1つに置いている²³⁾。同じく自生体験に含められている自生記憶想起および白昼夢(後に自生空想表象とされている)も「頭の中に見える」体験とされ、初期分裂病の診断根拠に挙げられている。

中安らによれば、初期分裂病102例について日常臨床で訴えられる症状を検討したところ、自生視覚表象は21.6%、自生記憶想起は77.5%、自生空想表象は42.2%に認められたという²⁴⁾。本研究においては、対象と方法の項で述べたような背景の統合失調症患者108例中の35例すなわち32.4%に視覚表象が認められた。また参考までに述べると、平成15年4月現在、研究実施病院精神科に5年以上入院して生活の主たる基盤が病院内にあり、ICD-10の統合失調症の診断基準を満たす患者のうち、痴呆、重篤な身体合併症のために会話不能なものを除く277例(男性148例、女性129例)について、著者が患者に面接し、かつ診療録を調査して症状を抽出したところ、視覚表象を認めるものが49例(男性33例、女性16例)すなわち17.7%あった。ここに挙げた108例、277例という母集団には、たとえば著者が診療しているものに限られていることなどさまざまな偏りがあり、さらに症例数も少ないため慎重に判断しなくてはならないが、主に外来に通院している患者と、入院の長い患者との間で、視覚表象を認める頻度に差がみられた。入院の長い患者との面接において、たとえば話が通じないなどの理由で視覚表象の抽出が困難であっ

た例が90例（男性34例，女性56例）すなわち32.5%あったことなどからは，この頻度の差には，対人場面における言語表現能力も影響していると思われる。

一方，武井らは視覚表象が20年以上の長期にわたり継続した統合失調症2症例を報告し，断片的なものから次第に体系化すること，空想的で願望充足的な内容に変化することを指摘した²⁵⁾。

このように視覚表象は，統合失調症において存在するらしいこと，幻視と混同されやすいこと，経過のいずれにも出現し，しかも病初期から慢性期にかけて形式や内容が変化するらしいことについては過去に述べられたことからわかるが，幻聴や妄想などほかの症状との関連や，統合失調症に占める症候学的な意義などについては，これまで十分に検討されてこなかったことがわかる。

2. 視覚表象の病型分類について

統合失調症の視覚表象は多彩であるが，長期に観察できた自験例をみると，症例呈示や第2表に示したように，その形式や内容が経過とともに変化している。そこで視覚表象を以下のように大きく3つの病型に区別し，得られた知見に従来の報告を加えて考察を進めたい。

1) 第I型

自生的な視覚表象である。何かに集中していない時，注意が弛緩している時に「とりとめなく，ひとりで浮かんでくる」（症例21）と訴えられ，主体にとって意識に侵入される感じが少なく，苦痛には感じられない。内容は，おおむね他愛ないもので，主体に感情変化をもたらすことはなく，記憶から断片的によみがえるものが多いので，記憶表象とも言う。症例21では30歳頃から，症例14では4歳頃からあるが特に19歳頃から，症例27の27歳頃から見られるものがこれに当たり，中安の言う自生視覚表象，自生記憶想起の一部²⁹⁾に相当する。第I型の視覚表象のみにとどまるものは4例，経過中いずれかの時期に第I型の出現をみるものは20例である。第I型の初回出現は，統合失調症の診断が確定する前にみられる傾向があり，その統合失調症の診断確定に先立つ期間は平均3.5±7.0年（n=20）である。

2) 第II型

意識への侵入性が強く，主体を束縛する視覚表象である。内容は，自分の過去の失敗や他人から受けた誤解，屈辱など不快なものが多く，主体を動揺させ不安にする。症例21では31歳頃から，症例14の20歳頃から，症例16の14歳頃から，症例15の27歳頃からのもので，

過去の現実の場面に限らず，空想的な内容となることもあるが，いずれも「事件事故（災害）に巻き込まれる」（症例1，5，10，15，16）「将来の自分の失敗や不適応」（症例2，4，12，15，16，19，26）など，主体にとってこうあってほしくない自我異質性の強い内容になりやすい。主体が内容に反応して，何らかの対処を行うこともある。三好ら²⁰⁾，村木ら²¹⁾の報告した支配性をもつ視覚像がこれに近い。第II型の視覚表象のみが出現するものは7例，経過中いずれかの時期に第II型の出現をみるものは28例，統合失調症の診断基準を満たしてからその症例における第II型の初回出現までは，平均2.6±7.6年（n=28）である。

3) 第III型

空想的な視覚表象である。意識へ侵入される自覚が弱いので，出現形式は第I型に似ているが，自らのめりこんで「一日中見ている」（症例33）という点からは，主体が体験の中に取り込まれてしまい，より強く支配・束縛されているとも言う。内容は現実を織り込んで物語に発展し（症例21，35），願望充足的（症例14，21，33），さらに荒唐無稽（症例21，33）になることもある。症例21の救命後，症例14の27歳以後，症例35の79歳以後，症例33の40歳以後のものであり，武井らの報告例²⁵⁾がこれに相当する。第III型の視覚表象のみが出現するものは1例で，経過中いずれかの時期に第III型の出現するものは13例，統合失調症の診断基

第3表 視覚表象の病型と症例数

| 出現した病型 | 症例数 (35症例に占める割合) |
|--------------------------|---------------------|
| 症状変遷がみられなかったもの | |
| Iのみ | 4 (11.4%) |
| IIのみ | 7 (20.0%) |
| IIIのみ | 1 (2.9%) |
| 症状変遷がみられたもの | |
| I ⇒ II ⇒ III | 2 (5.7%) |
| I ⇒ II | 9 (25.7%) |
| II ⇒ III | 6 (17.1%) |
| I ⇒ III | 2 (5.7%) |
| I ⇒ II ⇒ III ⇒ II | 1 (2.9%) |
| I ⇒ II ⇒ I | 1 (2.9%) |
| II ⇒ I ⇒ II (動揺) | 1 (2.9%) |
| II } ⇒ III III } (動揺) | 1 (2.9%) |

(注) ⇒ は病型の推移を示す

準を満たしてからその症例における第III型の初回出現までは、平均12.0±13.4年(n=13)である。

4) 病型の推移について

第3表に示すように、35例中23例(65.7%)において、出現する視覚表象の症状変遷、すなわち上述の病型の推移を認める。3つの病型すべてが出現する症例14、20、21をみると、いずれも第I型にはじまり、第II型を経て第III型に至っている。2つの病型を示す症例では、第I型から第II型へ移行、あるいはこの順で出現したものが9例、第II型から第III型へは6例、第I型から第III型へは2例である。視覚表象の出現や、第I型から第II型、第II型から第III型への推移は、服薬内容など治療との関連は乏しいようにみえる。また上述したように、各症例における3つの病型の初回出現時期について、統合失調症の診断基準を満たした時期をもとにみると、第I型は統合失調症の診断確定の平均3.5±7.0年前、第II型は平均2.6±7.6年後、第III型は平均12.0±13.4年後であり、時間的關係に差がみられる。

逆の進展を含むものは少なく、しかも第II型から第I型へ移行したもの(症例11、15)、第III型から第II型へ移行したもの(症例20)をみると、いずれも治療が開始された時期あるいは治療環境が変化した時期と一致する。第II型ではじまった症例15は、薬物治療開始後から症状が回復して第I型へ移行し、ストレス状況が強まると症状が増悪して再び第II型になるという経過を繰り返している。

症例数が少ないため、また視覚表象の持続期間が短い例もあるために性急な断定はさし控えたいが、3つの病型はおおむね第I型、第II型、第III型の順に、視覚表象のおよその進展経過を示すように思われる。

3. 他の統合失調症症状との関連

1) 第I型の視覚表象と自生思考との関連について

第I型の視覚表象は、「とりとめなく考えが浮かび、それにひとりで映像がつく」(症例21)、「考えごとに関連して風景や人の顔の映像がつく」(症例27)などと表現されるように、自分の考える内容が映像になるもので自生思考と関連が深い。第I型の視覚表象を呈する20例のうち16例(80%)は自生思考を伴っている。自生思考とは思考領域の自動症、自生体験のことで、統合失調症の初期段階における軽微な自我障害を示すものとされている。

自生体験が記憶領域に及ぶと、過去の思い出がとりと

めなく浮かんでくる記憶表象になる。その特殊型が音楽幻聴^{26, 27)}であり、聞きなれたメロディがよみがえる音楽幻聴は、本研究の15例に見られており、症例14は自生的な視覚表象の強まりと音楽幻聴が同時期に生じている。いずれも非言語性の仮性幻覚という点で共通性があり、両者の関連については今後の検討課題としたい。

こうした自動症ないし自生体験は、多彩な統合失調症症状の基礎をなすもので、Baillargerが幻覚形成の第一段階と見ていることは先に記した。Gatian de Clérambautは、統合失調症につながる精神自動症 automatisme mental の概念を提唱し、病初期にみられる微細な現象として、思考が言語化されない形で解き放たれる抽象解放、観念性・表象性・感情性諸要素によって構成される記憶のたぐりよせ、視覚自動症などを記載している²⁸⁾。

自生思考や音楽幻聴は、疲労時などには健常者にも認められる現象である。しかし統合失調症に生じる病的な場合には、自分の意志では止められない、主体への軽い束縛を伴うものである。第I型の視覚表象にも「集中できない」「知らず知らずとらわれている」(症例21)、「外の物音で我に返る」(症例27)など、能動性の低下を疑わせる束縛性が見られている。

第I型の視覚表象の大半は、自生思考が感覚性を帯びた自生体験の可能性が高く、幻覚などの統合失調症症状に発展する可能性をもつ初期段階の軽い自我障害であると考えられる。少数例では先行すると思われる自生思考が確認できなかったが、その理由として一方では患者の記憶に頼らざるを得ない精神病理学上の問題があり、また他方では経過が早い場合に症状の推移が患者の主観的体験として残らなかった可能性も否定できない。

2) 第II型の視覚表象と強迫との関連について

強迫は意識に侵入する観念 obsession と、それを緩和しようとする行為 compulsion からなる病的現象である。脳器質疾患、人格障害、神経症、内因精神病に広く認められるが、BermanらによるとDSM-III-Rの診断基準を満たす統合失調症に25%の頻度で見られるという²⁹⁾。

第II型の視覚表象は、意識への侵入性が強く、「見たくもないのに浮かぶ」「止めたくても止め方がわからない」(症例16)と訴えられるように強迫観念に類似しており、強迫表象と呼ぶこともできる。主体は圧倒されて苦痛が強く、症例16は自分の頭や空中を殴り、症例21は自殺を図っている。Séglasは、このような視覚表象を強迫性幻覚 hallucination obsédante の名で一種の

仮性幻覚とみている³⁰⁾。

Schneider は強迫を、思考領域に生じる二重化体験であり、一種の自我障害とみている³¹⁾が、濱田らは、統合失調症の自我障害が進行し二重自我を生じる段階において、自生思考は自己と無縁となり、自我異質性を獲得して強迫観念へ移行すると考えている³²⁾。馬場らも、音楽幻聴が自生的な記憶表象から侵入性の強い強迫表象へ転じる基礎に、同じく自我障害を置いている^{26), 27)}。本研究では9例に二重自我を認め、その全例が第II型の視覚表象に至っている。

一方、力を入れて映像を止めたり(症例15)、別の考えや映像を思い浮かべて侵入する視覚表象を打ち消そうとする(症例2, 6, 16, 30, 33)、打ち消す呪文を唱えるように視覚表象に反論する(症例1, 4, 8, 13, 17, 24, 25, 26)行為を、対抗強迫 *Gegenzwang* に近い強迫行為とみなすことも可能である。

このように第II型の視覚表象は、主体の視覚表象への反応も含めて見ると、観念と行為を併せもつ強迫症状に近いと考えられる。

3) 第III型の視覚表象と妄想との関連について

本研究の30例に妄想が認められるが、妄想は、主として自分に関する誤った確信であり、統合失調症においてはしばしば次項に述べる幻聴をはじめとする幻覚と合併し、主体が自己を再建、再統合する試みともみなされている³³⁾。幻覚や妄想の内容が、時に経過とともに被害的なものから誇大的なものへ変化することも知られている。すなわち主体を責める幻聴、患者を迫害し脅かす妄想は、次第に支持的、願望充足的なものに姿を変え、さらには荒唐無稽な内容になり、患者はその中に取り込まれて安住する例がみられる。保崎はこれを、力を失った主体がより低い段階で自他を区別する方法、一種の自助努力の表現とみている³⁴⁾。

第III型の視覚表象は、妄想に当てはめるとこの段階を示すもので、映像を伴う空想妄想とみることもできるように思われる。症例35の第III型の視覚表象は、被害妄想と一体化して患者の生活全般に及んでいる。症例33は「空想がないとどう生活するのか思い描くことができない」と述べているが、この段階の患者は慢性に経過した多くの妄想患者がそうであるように、空想世界そのものを生きているように見える。

4) 病型の推移と幻聴との関連について

統合失調症において幻聴とくに言語幻聴が多く見られることはよく知られている。Schneider は統合失調症の

一級症状として、考想化声、行為批評、問いかけと応答の3形式の言語幻聴を記載した³⁵⁾が、これらはICD-10の統合失調症診断基準にも取り上げられている。本研究でも26例にこれらの幻聴がみられる。幻聴と視覚表象の出現は、同時が9例、幻聴が先行するもの2例、視覚表象が先行するもの15例であり、同時あるいは視覚表象の先行が多いが、この意義は現在のところ判然としない。

考想化声は、自分の考えが感覚性を獲得し音声化する現象で、主体内部の主観空間に反復する自生思考で始まり、次いで考えが自分の声になる考想聴取 *Gedanken-hören* になり、それが次第に主体外部の客観空間に移行し、やがて他者性を帯びて自分の考えることを誰かが喋るので周囲に広まっているという形に進展する³⁵⁾。やはり単純な感覚症状ではなく、思考や意志の障害を伴い、仮性幻覚から幻覚へと発展する。本研究の視覚表象の第I型は、自生思考が感覚性を獲得するという点が考想化声と共通していると言える。

言語性幻聴に代表される統合失調症の幻覚に関しては、聴覚領域という感覚性に重点を置くのではなく、むしろ主体の体験が希薄になり、自己所属性を失って自己と異質化、無縁化する流れのほうを重視する立場も少なくない³⁶⁾。考想化声と強迫の関連は従来から指摘されており、Cramer は考想化声を強迫に近い発声器官の筋感幻覚とみている³⁶⁾が、本研究にも考えがつい口から出てしまう言語性精神運動幻覚が5例に認められる。Schröder は、考想化声を自生思考、させられ体験、強迫などに移行する現象として、思考や内言語が主体を離れる無縁性の中でとらえている³⁷⁾。Petit は、主体を外から支配・束縛する自動性の思考や表象を統覚性自動表象 *autorepresentation aperceptive* と名づけ、感覚性を帯びると考想化声になり、他者性が強まるとさせられ体験に移行すると考えた³⁸⁾。Ceillier が提唱した被影響症候群 *syndrome d'influence* も統合失調症に近縁の妄想症候群であるが、幻聴よりも運動性仮性幻覚や空想性視覚表象などの自動症と、主体に異質な干渉現象の方が強調されている³⁹⁾。

考想化声が他者性を帯びると、幻聴は他人の声で絶えず主体の意識に侵入する。声は主体の行為をいちいち批評して支配・束縛し、過去の失敗や屈辱をあげつらい苦痛を与えるようになる。意志に反して侵入し、不快な場面を否応なく見させられる第II型の視覚表象は、ここに位置付けることが可能であろう。幻聴をもつ患者はさらに声の主の思考や言語を通じて働きかけることで、問いかけと応答が成立してゆくが、視覚表象においても同

じ傾向が見られ、症例 21 は映像の相手に謝り、症例 14 は当時できなかった弁解をして、映像の相手が誤解を解くという応答を得ている。

本研究の視覚表象は、言葉や音声を介したものではないが、思考が感覚性を帯び、次第に主体を束縛し干渉している形式や、不快で苦痛を与える内容などは、考想化声にはじまり行為批評、問いかけと応答へと進展する統合失調症の言語幻聴に類似するように思われる。幻聴をもつ患者がすべて、考想化声の初期段階を自覚し、語るとは限らない。むしろいきなり他人の声が聞こえたと述べ、治療により声の感覚性が失われると、とりとめない自生思考の訴えに戻ったり、治療にもかかわらず症状が進行する例においては、先述したように次第にその内容が支持的、願望充足的なものに変容してゆく場合が多い。第 II 型から始まる視覚表象(症例 5, 8, 13, 15, 30, 33, 35)は、おそらくこうした例であり、治療により第 I 型と第 II 型の視覚表象を往復する症例 15 は臨床場面ではしばしば遭遇する幻聴をもつ患者に似ている。

4. 視覚表象の出現と統合失調症の診断

統合失調症の経過における視覚表象の出現時期について見ると、本研究の 35 例中 16 例(45.7%)で、統合失調症の診断基準が満足される前に何らかの視覚表象が現れていることがわかる。具体的には第 4 表に示すように、統合失調症の診断基準を満たす前に第 I 型の視覚表象が出ていたもの 11 例、第 II 型の視覚表象が出てい

たもの 5 例(うち 1 例は第 III 型が并存)、第 III 型の視覚表象が出ていたもの 1 例(ただし第 II 型と并存)で、視覚表象の出現が統合失調症の診断確定に先立つ期間は順に、平均 8.1±5.0 年(n=11)、4.2±2.0 年(n=5)、2 年(n=1)である。すなわち、統合失調症の診断確定より前に出現した視覚表象には第 I 型のものが多く、またより早くから出現する傾向がみられる。

視覚表象が統合失調症に出現することが臨床的にあまり注目されてこなかったことや、特に第 I 型の視覚表象は主体にとって感情的負荷が軽く、問わない限り自ら訴え出ることが少ないと考えられることなどにより、これまでの知識の蓄積は非常に少ない。また、本研究は前向き研究ではないため、視覚表象の出現した例のうち、どの程度が統合失調症を発症するのかについては述べることができない。しかし、視覚表象が出現している例については、その時点で ICD-10 などの操作的診断基準による統合失調症の診断がつかなくとも、その発症の可能性を念頭において、慎重に経過を観察してゆくべきであろうと著者は考える。視覚表象、とりわけ第 I 型の視覚表象には、統合失調症を早期に診断し、治療的介入につなげることに寄与する可能性があると考えられ、今後多数例における調査・検討が必要と思われる。

5. 統合失調症における視覚表象の形成機序と意義について

これまでに得られた知見をまとめながら、統合失調症

第 4 表 統合失調症と診断される以前に視覚表象が出現した症例における統合失調症と診断された年齢および視覚表象初回出現時の年齢と病型

| 症例番号 | 統合失調症と診断された年齢 | 視覚表象の初回出現時年齢 | 視覚表象の初回出現時病型 | 視覚表象の初回出現が統合失調症の診断に先行する期間(年) |
|------|---------------|--------------|--------------|------------------------------|
| 1 | 14 | 4 | I | 10 |
| 3 | 21 | 19 | III, II | 2 |
| 4 | 21 | 17 | I | 4 |
| 5 | 21 | 15 | II | 6 |
| 6 | 19 | 13 | II | 6 |
| 8 | 21 | 16 | II | 5 |
| 9 | 18 | 14 | I | 4 |
| 11 | 25 | 16 | I | 9 |
| 14 | 24 | 4 | I | 20 |
| 15 | 29 | 27 | II | 2 |
| 17 | 26 | 15 | I | 11 |
| 19 | 24 | 15 | I | 9 |
| 20 | 25 | 16 | I | 9 |
| 23 | 23 | 18 | I | 5 |
| 25 | 21 | 20 | I | 1 |
| 28 | 24 | 17 | I | 7 |

における視覚表象の可能な形成機序を考察するとともに、その症候学に占める意義を明らかにしたい。

統合失調症の多彩な症状の基礎をなすもの、すなわち精神病理学的な基本障害には諸説があるが、自我ないし自我意識の障害を想定するものが少なくない。Jaspersは自我意識に、精神活動が主体自身に属し自らが行っているという能動性意識、この瞬間の自分は一人である単一性意識、過去から現在までの自分は一人である同一性意識、自他を区別する外界に対立する自我意識の4つを区別した³⁾。こうした自我意識が障害されると、離人症、自生体験、二重自我、させられ体験などを生じるが、本研究のほぼ全例にこれらの症状が何かしら認められる。自生体験としての第I型から二重自我にかかわる第II型をへて、主体を取り込んで支配・束縛する第III型に至る視覚表象は、全体としてながめると、自我意識が障害されて体験が自己と異質化・無縁化する流れを反映するようにみえる。

Bleulerは、統合失調症の疾患過程から直接生じる一次症状として連合障害を挙げ、幻覚、妄想、強迫、自閉など、それ以外のほとんどの症状を主体の心理反応から生じた二次症状とみている⁴⁾。Eyは器質力動説の立場から、精神障害ではまず器質的な原因を直接表現する陰性症状が生じ、少し時間をおいてから主体の健全な部分が反応し、これを再統合しようとする力動的な陽性症状が現れるとしている⁵⁾。

第II型と第III型の視覚表象の形成には、病気の進行にとどまらず、主体からの反応ないし力動的な働きかけが加わるように見える。濱田は内省を繰り返し、それを頭の中で自ら声にして確認するうちに幻聴に発展した統合失調症例を検討し、考想化声の初期には患者が自ら思考を音声へ、強迫行為に近い変換作業を行うと考えた³⁵⁾。松本は統合失調症の強迫行為に、確かさを求める試みを指摘している³⁶⁾が、自らの体験の実感が希薄化する離人症の患者が、それを確かにするために音にして耳から入れる、目で見る、手で触れてみるなど、複数の感覚を動員する確認強迫を行うことが知られている³⁷⁾。小野江らは、自分の考えが文字になって見える考想可視を検討し、これが視覚領域に生じる言語仮性幻覚であり、とりわけ能動性意識が低下する統合失調症においては、自ら文字に書いて確認せずにいられない強迫行為から発展するとしている^{42,43)}。

著者は、自我意識が障害され、能動性意識すなわち体験の自己所属性・実行意識が希薄になっている主体においては、離人症や強迫の患者が複数の感覚を動員して確かめようとするように、自らの考えや行為を映像に直し

て思い浮かべることで、確かなものにしようと働きかけているのではないかと考えている。たとえば症例15では心配になって自ら場面を空想すると実際その映像が出てきており、症例21も自分で映像を思い浮かべると述べていることなどがその理由である。症例21が、「たとえ不快な映像でも頭に何も浮かばない無よりまし」と訴えるのは、体験の実感の希薄化が主体にとっていかに苦痛で、存在の根底をゆるがす深刻なものであるかを示すように思われる。

強迫の患者はやがて自ら作り出した確認行為に儀式のように束縛され、幻聴をもつ患者は確認のために自ら直した声を他人の声として絶えまなく聞かされるようになる。自我障害が進展すると、主体が自ら思い浮かべたはずの映像は主体を離れ、自己に無縁で自我異質的な映像として意識に侵入してくる。第II型の視覚表象は、このようにして形成されてゆくように思われる。

こうした症状が続くと、主体は視覚表象の内容を無害なもの、自我親和的なものに加工し、体験に抵抗するのではなくむしろその中に浸りきることで、苦痛から逃れようとするようにみえる。出てくる映像を小説のように展開させる症例14、不快な場面の登場人物と自分との関係を頭で自分の都合の良いように新たに創作する症例21に、そうした働きかけをみることができ、このような空想加工をほどこされた第III型の視覚表象を、より低い人格水準において再統合を試みる、妄想に近い陽性症状と捉えることもできるだろう。

換言すれば周囲から自己を閉ざす自閉の進行であり、空想の中に終日暮らしている症例14、21、33、35などの終末状態を、現実への関与を放棄して安易な内的世界へ引きこもる自閉とみなすことも可能である。視覚表象が他人事のように(症例21)主体を離れ、内容が荒唐無稽(症例21、33)になってゆくのも、主体自身の能動性が失われつつあることを示しているようにみえる。

自生から強迫を経て空想に移行すると考えられる統合失調症の視覚表象は、先述のようにその形成機序と進展が言語幻聴によく似ている。すなわち、ことばを用いて聴覚領域に表現されるわけではないが、同じく自我ないし自我意識の障害を基盤とする思考や意志の症状であり、統合失調症に特有な仮性幻覚の一種とみなすことができるだろう。やはり仮性幻覚である音楽幻聴が第III型に相当する段階に達することが少ない^{26,27)}のは、メロディを映像のように空想的あるいは願望充足的に加工することが難しいためではないかと考えられる。

小野江は考想化声と考想可視を比較して、言語表現の場合には音で聞くより文字でみるほうが瞬間的にわかり

有効であるらしいと述べている⁴³⁾が、本研究では、幻聴と視覚表象が同時にあるいは視覚表象が先行して出現する症例が少なくないことは観察されたが、主体が自生思考を音声に託し着想化声にするのか、それとも映像に託し視覚表象とするのかについての機序は判然としなかった。それでも Séglas⁴⁴⁾、武井ら²⁵⁾が指摘するように、また症例 14, 21 のように、病前から自分で物語を作っていた人、幼少時から空想癖のあった人が散見されるので、こうした傾向をもつ場合には視覚表象を生じやすいのかもしれない。

統合失調症の視覚表象は、これまであまり注目されてこなかったが、自生体験、幻聴、強迫、妄想などの広い範囲にまたがる症候で、精神病理学の立場から統合失調症の症状形成を考える手がかりになるように思われる。なお本研究ではふれなかったが、統合失調症とその類縁疾患には、急性錯乱や夢幻様体験型の視覚表象も知られており、今後の研究課題としたい。

総 括

1. 頭の中に映像が浮かぶ視覚表象を示す統合失調症 35 例を調査・考察し、その精神病理学的な意義を明らかにした。

2. 視覚表象は自生的な第 I 型、強迫表象に近い第 II 型、空想的な第 III 型の 3 つの型に分けることができ、自我ないし自我意識の障害の進展に応じておおむねこの順に経過すると考えた。

3. 視覚表象の一部は統合失調症の診断基準が満足される以前に出現しており、視覚表象には統合失調症の早期診断に寄与する可能性があることを指摘した。

4. 視覚表象は自生思考、言語幻聴、強迫、妄想などに関連する視覚領域の仮性幻覚である。

5. 著者は視覚表象の形成の一部に、主体が自らの体験を確認し、自己を再統合しようとする一種の自助努力が含まれていると考えた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただきました慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室鹿島晴雄教授に深甚なる謝意を捧げます。研究の機会を与えてくださった浅井昌弘客員教授に深謝いたします。終始直接御指導いただきました濱田秀伯助教授に心より感謝申し上げます。

さらに種々の御協力をいただきました当教室精神病理研究グループ、慈雲堂内科病院、桜町病院の皆様、西園マーハ文先生に感謝申し上げます。

本論文の一部は日本精神病理学会第 24 回大会 (2001 年

10 月)、同第 25 回大会 (2002 年 10 月) で発表した。

文 献

- 1) WHO : The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. Diagnostic Criteria for Research. The World Health Organization, Geneva, 1993
- 2) American Psychiatric Association : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth Edition. American Psychiatric Association, Washington DC, 1994 (DSM-IV 精神疾患の診断・統計マニュアル. 高橋三郎, 大野裕, 染矢俊幸訳, 医学書院, 1996)
- 3) Jaspers K : Allgemeine Psychopathologie. Verlag von Julius Springer, Berlin, 1913 (精神病理学原論. 西丸四方訳, みすず書房, 1971)
- 4) Bleuler E : Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. Franz Deuticke, Leipzig und Wien, 1911 (早発性痴呆または精神分裂病群. 飯田真, 下坂幸三, 保崎秀夫, 安永浩訳, 医学書院, 1974)
- 5) Postel J Ed. : Dictionnaire de psychiatrie et de psychopathologie clinique. Larousse, Paris, p.326, 1993
- 6) Kretschmer E : Medizinische Psychologie. Zehnte, verbesserte und vermehrte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1950 (医学的心理学. 西丸四方, 高橋義夫訳, みすず書房, 1985)
- 7) 大脇義一 : 直観像の心理. 培風館, 1950
- 8) 新版精神医学事典 (加藤正明代表編集). 弘文堂, p.641, 1993
- 9) Berrios GE : The history of mental symptoms. Cambridge University Press, Cambridge, 1996
- 10) Kandinsky V : Kritische und klinische Betrachtungen im Gebiete der Sinnestäuschungen. Verlag von Friedländer und Sohn, Berlin, 1885
- 11) Goldstein K : Zur Theorie der Halluzinationen. Arch Psychiatr Nervenkr 44 : 584-655, 1036-1106, 1908
- 12) Schulte W, Tölle R : Psychiatrie. Fünfte, überarbeitete und ergänzte Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979
- 13) Baillarger J : Des hallucinations, des causes qui les produisent, et des maladies qui les caractérisent. Mémoires de l'Académie royale de médecine 12 : 273-475, 1846
- 14) Séglas J : Sur les phénomènes dits hallucinations psychiques. Arch de Neurol 59 : 1-6, 1900
- 15) 濱田秀伯 : 分裂病の仮性幻覚. 臨床精神病理, 15 : 155-161, 1994
- 16) American Psychiatric Association : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Third Edition-Revised. American Psychiatric Association, Washington DC, 1987
- 17) Mueser KT, Bellack AS, Brady EU : Hallucinations in schizophrenia. Acta Psychiatr Scand 82 : 26-29, 1990

- 18) 工藤行夫：分裂病性幻視に関する臨床精神病理学的研究。慶應医学, 67 : 783-799, 1990
- 19) Kraepelin E : Psychiatrie : Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Achten Auflage. Verlag von Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1913, 1915 (エーミール・クレペリン精神分裂病, 西丸四方, 西丸雨夫訳, みすず書房, 1986)
- 20) 三好直基, 大宮司信：精神分裂病の幻視症状——臨床所見とくに幻聴との類似について。臨床精神医学, 13 : 1339-1345, 1984
- 21) 村木彰, 三好直基, 笠原敏彦：精神分裂病の1症例にみられた幻視について。精神医学, 29 : 1067-1071, 1987
- 22) 井上由美子, 碓氷章, 神庭重信：「鮮明で残酷なイメージが頭に見える」との視覚表象を発症初期の主症状とした精神分裂病の1症例：仮性幻覚の精神病理学的考察。臨床精神医学, 30 : 1375-1383, 2001
- 23) 中安信夫：初期分裂病。星和書店, 1990
- 24) 中安信夫, 針間博彦, 関由賀子：初期症状。臨床精神医学講座(松下正明総編集)。中山書店, p. 313-348, 1999
- 25) 武井茂樹, 濱田秀伯：空想的な視覚表象が長期にわたり継続した2症例。精神医学, 37 : 79-85, 1995
- 26) 馬場存, 濱田秀伯, 古茶大樹, 田辺英, 浅井昌弘：分裂病の音楽幻聴。精神医学, 39 : 15-21, 1997
- 27) 馬場存：精神分裂病の音楽幻聴に関する精神病理学的研究。慶應医学, 75 : 285-299, 1998
- 28) Clérambaut G de : Œuvre Psychiatrique. P. U. F., Paris, 1942 (クレランボー精神自動症, 針間博彦訳, 星和書店, 1998)
- 29) Berman I, Kalinowski A, Berman SM, Lengua J, Green AI : Obsessive and compulsive symptoms in chronic schizophrenia. Compr Psychiatry 36 : 6-10, 1995
- 30) 濱田秀伯：精神症候学。弘文堂, 1994
- 31) Schneider K : Klinische Psychopathologie. Sechste verbesserte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1962 (臨床精神病理学改訂増補第6版, 平井静也, 鹿子木敏範共訳, 文光堂, 1957)
- 32) 濱田秀伯, 村松太郎, 山下千代, 水島広子, 末岡瑠美子：自責・加害的な強迫症状——分裂病性強迫への1寄与。精神医学, 42 : 29-35, 2000
- 33) 濱田秀伯：精神病理学臨床講義。弘文堂, 2002
- 34) 保崎秀夫：分裂病における被害妄想について——特に誇大妄想との関係において。精神神経誌, 62 : 326-338, 1960
- 35) 濱田秀伯：一級症状(Schneider,K.)の幻聴に関する1考察。精神医学, 40 : 381-387, 1998
- 36) Cramer A : Die Halluzinationen im Muskelsinn bei Geisteskranken und ihre klinische Bedeutung. Akademische Verlagbuchhandlung von JCB Mohr, Freiburg, 1889
- 37) Schröder P : Das Halluzinieren. Z Gesamte Neurol Psychiatr 101 : 599-614, 1926
- 38) Petit G : Essai sur une variété de pseudo-hallucinations. Les autoreprésentations aperceptives. Thèse, Bordeaux, 1913
- 39) Ceillier A : Les influencés : syndromes et psychoses d'influence. Encéphale 19 : 152-162, 225-234, 294-301, 370-381, 1924
- 40) Ey H : Des Idées de Jackson à un modèle organodynamique en psychiatrie. Edouard Privat, Editeur, Toulouse, 1975 (ジャクソンと精神医学, 大橋博司, 三好暁光, 浜中淑彦, 大東祥孝共訳, みすず書房, 1979)
- 41) 松本雅彦：こころのありか。日本評論社, 1998
- 42) 小野江正頼, 濱田秀伯, 千葉裕美, 神山園子：分裂病の考想可視——6症例による症候学的検討。精神医学, 42 : 913-919, 2000
- 43) 小野江正頼：考想可視の形成機序と経過に関する精神病理学的研究。慶應医学, 79 : 145-156, 2002
- 44) Ségla J : Leçons cliniques sur les maladies mentales et nerveuses. Asselin et Houzeau, Paris, p.1-28, 1895 (田中寛郷, 濱田秀伯訳・解説：幻覚。精神医学, 36 : 991-996, 1103-1110, 1994)

原 著

コラーゲンゲルサンドイッチ法が初代培養肝細胞の機能・
分化機構に及ぼす影響

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

井 口 清 香

(平成 15 年 12 月 4 日受付)

ABSTRACT

Effects of collagen gel sandwich on functions and differentiation
mechanisms in primary cultured hepatocytes

Sayaka Inokuchi

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

Bioartificial liver is one of the promising approaches to expedite recovery of liver failure. In an effort to reconstruct the hepatocyte function and cellular polarity normally found in the liver, adult rat hepatocytes were sandwiched between two layers of hydrated collagen matrix. Functionally, sandwiched hepatocytes maintained the secretion of albumin, the expression of liver specific proteins and the distribution of actin filaments, whereas the cells cultured on single layer of collagen gel decreased the albumin secretion, the liver specific proteins and showed abnormal formation of actin stress fibers and cell spreading. Overlaying a second layer of collagen gels on the hepatocytes that had been cultured on a single gel reversed the cell spreading, reduced actin stress fibers and recovered the liver specific protein expressions. Bone marrow cells could differentiate into hepatocytes when they co-cultured with primary cultured hepatocytes in collagen gel sandwich indicating that hepatocytes cultured in collagen gel sandwich was functionally good enough to induce differentiation of bone marrow cell into hepatocytes. This evidence clearly suggests that supplying bone marrow cells into biohybrid artificial liver will be able to extend the lifespan of this device.

Key Word : collagen gel sandwich configuration, primary cultured hepatocyte, biohybrid artificial liver, hepatic differentiation.

現在わが国において肝硬変患者は約 30 万人いると推定される。また慢性 C 型肝炎患者が約 200 万人存在し、将来的な肝不全予備軍とみなされる。肝硬変はひとたび肝不全に陥ると機能の回復は非常に難しく、根本的な治療法がないのが現状である。現在、末期肝硬変患者の唯一の救命手段は肝移植であるが、C 型肝炎患者は、現在のわが国の深刻なドナー不足の状況から見て、そのほとんどが移植を受けられないと考えられる。そしてこの

ドナー不足は、今後解消される見込みが極めて低いと言わざるをえない。したがって、多くの C 型肝炎患者は有効な根本的治療を受けることなく、生活の質 (quality of life) の低下に苦しんでいる。

肝臓は、肝硬変に陥ると、肝再生がおこらず非可逆的に徐々に肝不全に向かう。再生医学の開発はこの現状を打開する革新的治療法の可能性を持つものとして注目されている。我々は、肝臓を標的とした肝再生医療の実現

と人工肝臓の開発をリンクし、肝不全治療への応用を目指す新たな試みを行った。

一般に人工肝臓と言えば、バイオハイブリッド型人工肝臓 (biohybrid artificial liver: BAL) を指し、肝細胞の機能を持つ何らかの細胞を利用するものを言う。この開発において重要な点は、①どのような組織・細胞を肝細胞の機能を代用するものとして用いるか? (細胞ソース) ②治療に用いられるだけに持続的に長期間機能を維持させられるか? (機能維持) である¹⁾。細胞ソースとしては、すでに肝細胞としての機能を有している細胞を用いる方法が実用化に向けて先行している²⁾。Demetriou A.A らは、ブタ肝細胞を用いた BAL を 171 名の患者に対し用い、良好な結果を得ている³⁾。その他に、ヒト肝芽腫由来 C3A 株を使用したもの⁴⁾、不死化肝細胞を用いたもの⁵⁾、ヒト胎児肝細胞を利用したもの⁶⁾などが検討されている。ブタ肝細胞を用いる方法は、すでに成熟した機能を持つ肝細胞を用いる点、多くの細胞を一度に大量に供給することが可能な点で優れている。しかし、人畜共通感染に関しては大きな問題であることが一般に認知され⁷⁾、今後この問題を解決することが重要になってくると思われる。

肝臓の組織特異的幹細胞は、肝細胞に分化する増殖能の高い細胞である。肝小葉門脈周囲の肝細胞索と小葉間胆管との組織学的な境界である Herring 管やその周辺領域に、卵円形の核を持つという形態学的な特徴から oval cell と名づけられた細胞が存在する⁸⁾。Oval cell は、重篤な肝障害を加えたときに門脈周囲に出現し、可塑性をもつことから注目され、すでに肝細胞^{9,10)}、胆管細胞¹¹⁾、小腸細胞¹²⁾、膵臓細胞^{13,14)}、神経細胞¹⁵⁾に分化することが報告されている。また Mitaka らは、初代培養肝細胞の培養中に、通常の成熟肝細胞とは増殖能力の異なる細胞群の存在を見出し、これを小型肝細胞と名づけた¹⁶⁾。この細胞は増殖能が高く、超微構造的にも機能的にも成熟肝細胞に非常によく似ている。しかし、これら oval cell と小型肝細胞を効率よく大量に採取し、BAL や細胞移植に応用するためには、なんらかのマーカーが必要となるが、今のところ効率よく分離する方法はない。

未分化な細胞を大量に増殖させ、これを肝細胞に分化させて利用する方法がある。これはヒト由来の細胞を利用できる可能性が広がる点で優れている。もともと ES 細胞は、受精卵が分裂して胚盤胞となった際に形成される内部細胞集塊に由来し、この分化全能性を保ったまま樹立された細胞株である¹⁷⁾。この細胞は、マウスでは LIF (leukemia inhibitory factor) の存在下で、未分

化な状態のまま半永久的に増殖し¹⁸⁾、移植により三胚葉性の分化能が維持されていることを確認できる。現在までに、様々な臓器・組織に特異的に分化誘導する試みが報告されてきた^{19),20)}。すでにヒト ES 細胞株 (human embryonic stem cell) が樹立され²¹⁾応用が始まっており、DMSO (dimethylsulfoxide)²²⁾ や HGF (hepatocyte growth factor)²³⁾、beta-NGF (beta-nerve growth factor)²⁴⁾ を培養液に添加することにより、肝細胞へ分化誘導させることができることも報告された。ES 細胞を用いた場合の利点としては ① ES 細胞の操作方法が確立されており多くの研究室で比較的簡単に扱えること ② 遺伝子操作を行う技術がマウスで確立されていること ③ 遺伝子操作により肝細胞への分化を誘導する遺伝子の検索が可能であることなどが挙げられる。しかしこのように、ES 細胞には高い可能性があるものの、倫理的問題点は本邦のみならず世界的に大きな問題となっている。さらに、①テラトーマの発生 ②ヒト ES 細胞にはマウス ES 細胞と異なる技術が必要となる可能性があり、安定した培養法の開発が今後の課題とみなされている。一方、ES 細胞の倫理的問題点を避けるため、骨髄細胞が細胞ソースとして注目されている。最近まで、組織特異的幹細胞が唯一その組織に分化することが出来ると考えられていたが、骨髄細胞が他の臓器の細胞に分化する可能性が発表された²⁵⁻²⁸⁾。骨髄間葉系細胞由来の多能性成体前駆細胞 (MAPC; multi-potent adult progenitor cells) は 80 回程度分裂増殖することが可能であり、採取した後増殖させることにより十分量を得ることが可能で、生体内に移植すると血液細胞、肝臓、肺、腸管上皮細胞に分化することが報告されている²⁹⁾。FGF-4 (fibroblast growth factor) と HGF (hepatocyte growth factor) の存在下で培養することにより、肝細胞へ分化させることが可能であることも示された³⁰⁾。ただし、ES 細胞、骨髄細胞とも、特に *in vitro* では、未分化細胞から肝細胞への分化誘導は可能ではあるが 100%ではない。したがって肝細胞にならなかった細胞をどのように処理するか検討する必要がある。

このような観点から、我々は肝臓組織内に近い環境を *in vitro* で作り、肝細胞の機能を長期的に維持させること、未分化細胞を肝細胞へ分化誘導することを考えた。このことは、BAL 開発において重要な点である。肝細胞の機能維持には細胞外マトリックスを利用することが重要である³¹⁾。現在、スフェロイド形成³²⁾や、マイクロマニピュレーション法による混合培養法^{33,34)}などが開発されているがいずれも高度の技術が必要であり、一般の研究室での応用は困難である。しかも、これらの方法を

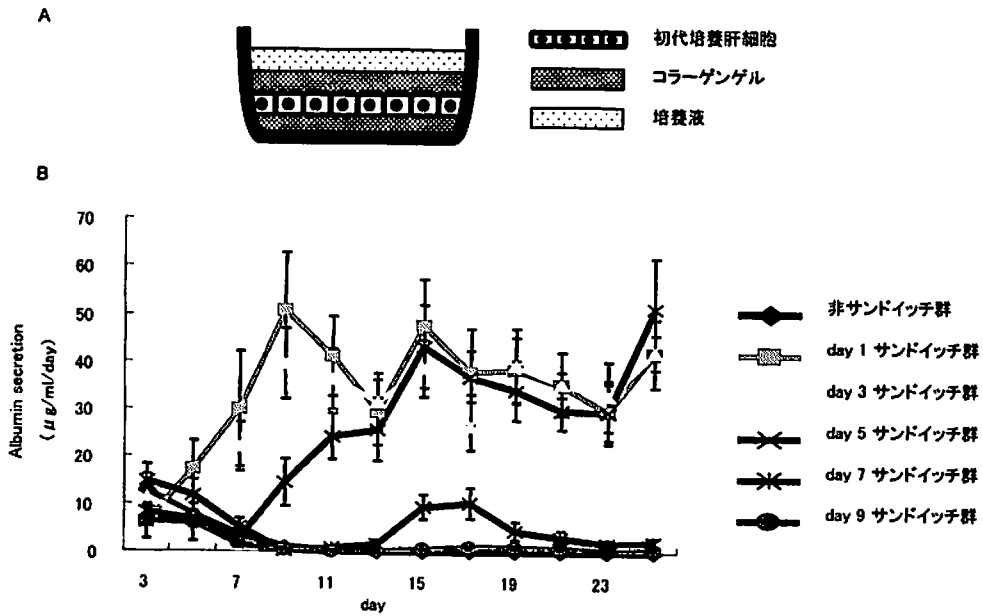
用いても、初代培養肝細胞を維持することが可能なのは1.5ヶ月ほどである。そこで我々は、コラーゲンゲルによるサンドイッチ法を応用した。この方法はYarmushらにより1989年に報告された³⁴⁾。コラーゲンは低温状況下、アルカリ性に保つと液体として保存可能であるが、これを初代培養肝細胞培養環境である、37°Cの中性にするるとゲル化する。この性質を応用することにより、簡便に初代培養肝細胞を1ヶ月間機能保持したまま培養を継続できる。この方法は非常に簡単であり、かつ細胞を通常型顕微鏡で経時的に観察できる利点がある。また、骨髄細胞を、傷害した肝臓に移植した場合、ほぼ2週間肝細胞にtransdifferentiateしていることから、1ヶ月間肝細胞としての機能を維持して培養出来ることは重要な利点である。初代培養肝細胞が通常の培養環境では機能を継続的に喪失していくことは報告されているが、そのメカニズムについての検討は未だない。肝細胞の機能維持においては、細胞の3次元的構造の理解が重要である^{35,36)}。肝細胞間の接着にはE-カドヘリンやラディキシンなどの蛋白質が正常に分布し、毛細胆管やその周囲を取り巻く収縮蛋白(アクチン線維)などの構造が保たれることが重要である³⁷⁾。そのためには、細胞と基質の接着を担うインテグリンが細胞の上下に正しく分布する必要がある。しかし一般の細胞培養では細胞と基質の接着が下面のみに限局されてしまうため、インテグリンが下面のみに集中してしまい、その結果として細胞全体が平坦化してしまう³⁸⁾。そのため肝細胞間接着分子であるE-カドヘリンやラディキシンなどの蛋白質が正常に分布することができず、毛細胆管やその周囲を取り巻く収縮蛋白(アクチン線維)などの構造が形成されなくなり、細胞機能が失われていくと考えられる。この時細胞の上にコラーゲンゲルを重層するとインテグリンの分布が細胞の上面にも分布するため、細胞の立体構造が回復していく可能性が考えられる。

はたして機能を失った肝細胞はコラーゲンを重層することにより再び機能を回復することが出来るのか。また骨髄細胞を肝細胞へ分化誘導する環境を形成することが出来るのか。このことは肝臓としての機能を代用するBALが、肝臓にいかにか機能上近づくことが出来るかを測る指標として重要であると考えられる。本研究ではこれらのことを念頭に、コラーゲンゲルサンドイッチ法を用い、肝細胞の分化機構における細胞外マトリックスと肝細胞分化機構との関係を解明し、さらには骨髄細胞から肝細胞への*in vitro*でのtransdifferentiationが可能かを明らかにする。

材料と方法

1. 初代培養肝細胞の作成と培養

体重100~120gのWistar系雌性ラットから、two-step perfusion method(二段階コラゲナーゼ灌流法³⁹⁾)を改変した方法で分離した後、Percollを用いた低速遠心法⁴⁰⁾で精製した。すなわち麻酔下にラット門脈に18Gサーフロー針を挿入・留置し、0.2mM EGTA(ethylene glycol bis(β-aminoethylether 9-N,N,N',N'-tetraacetic acid)(Sigma, St. Louis, USA)を含むHank's balanced salt solution(HBSS)(Sigma, St. Louis, USA)で5ml/minで4分間灌流し脱血した。次に、酸素化した0.05%コラゲナーゼ(Type I)(Sigma, St. Louis, USA)を含む後灌流液を5ml/minで20分間灌流した。肝臓を摘出し、HBSS中でハサミとピンセットを用いて細切し、肝細胞を分散した。滅菌したガーゼを4重に重ね濾過後、50gで3分間遠心した。ペレットをHBSSに分散して24mlとし、Percoll原液(Amersham Biosciences, Piscataway, USA)21.6ml、10倍濃度のHBSS2.4mlを加えてよく混和し、50gで15分間遠心した。得たペレットをHBSSで1回洗浄した。トリパンプルー排斥試験にて生存率を確認後、肝細胞培養液(Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(Sigma, St. Louis, USA)+10% fetal bovine serum(Invitrogen, Carlsbad, USA)+7ng/ml Glucagon G Novo(Novo Nordisk, Bagsvard, Denmark)+0.5U/ml Novolin R 100(Novo Nordisk, Bagsvard, Denmark)+20ng/ml Natural murine EGF(epidermal growth factor)(Invitrogen, Carlsbad, USA)+7.5μg/ml hydrocortisone(Banyu Pharmaceutical, Tokyo, Japan)+10mM HEPES(Sigma, St. Louis, USA)+1% penicillin-streptomycin(Invitrogen, Carlsbad, USA))に懸濁した。培養には、コラーゲンゲル混合液(Cellmatrix Type I-A(Nitta gelatin, Osaka, Japan), 7.5% sodium bicarbonate solution(Invitrogen, Carlsbad, USA), 10倍濃度のDMEMを8:1:1の割合で混合)を60mm培養皿に500μlずつ分注し、37°Cで20分間インキュベートして作成したコラーゲンゲルディッシュを用いた。分離・精製した細胞を3×10⁵個ずつ撒いて、37°Cの5%CO₂気相下にて培養した。培養開始1, 3, 5, 7, 9日後に、培養細胞の上に上記と同様にして作成したコラーゲンゲルを重層した(第1-A図)。培養液は培養皿あたり2mlとし、毎日交換した。



第1図 A: コラーゲンゲルサンドイッチ法, 60 mm コラーゲンゲルディッシュに, ラット肝臓から分離・精製した肝細胞を撒いた。しかるべき期間培養後, コラーゲンゲルを重層した。培養液は培養皿あたり 2 ml 用い, 毎日交換した。B: コラーゲンゲルサンドイッチ法で培養した初代培養肝細胞のアルブミン産生能。培養液中のアルブミン濃度を ELISA 法で測定した。培養開始 5 日目までにコラーゲンゲルを重層した場合, 重層するまでは減少していたアルブミン濃度が, 重層後 1 週間で培養開始 1 日目に重層した場合と同程度に達し, その後も維持された。重層しなかった場合は, 減少し続け, 検出感度以下となった。

2. アルブミン測定

隔日に培養上清を採取し, 上清中のアルブミン濃度を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法 (Nephra II (Exocell, Philadelphia, USA)) を用いて測定した。ELISA プレートに, 細胞培養上清 100 μ l を加え, 続いて HRP (horse radish peroxidase) 標識抗ラットアルブミン抗体 100 μ l を加えよく混和し, 室温で 30 分間反応させた。洗浄バッファーあるいは水道水でプレートを 6 回洗浄後, 0.2 mg/ml tetramethyl benzidine (TMB) 溶液を 100 μ l 加えて 5 分間室温で反応させ, 反応停止液 (1 M 硫酸) 100 μ l を加え, ただちに 450 nm の吸光度を測定した。

3. mRNA 測定

培養液を吸引後, 0.5% コラゲナーゼ (Type I) 1 ml をディッシュに加え, 10 分間 37°C で加温しゲルを溶解後, 細胞を 50 g で 5 分遠心して, 上清を捨て細胞沈渣に Isogen (Nippon gene, Tokyo, Japan) 1 ml を加え RNA 抽出液を得た。Isogen RNA 抽出キット (Nippon gene, Tokyo, Japan) のプロトコルに従い, 全 RNA

を得た。First-strand cDNA の合成には random hexamers, multiscribe reverse transcriptase (Perkin-Elmer, Wellesley, USA) を用いて 25°C 10 分プライマーと親和させ, 次に 48°C 30 分逆転写反応をさせ, 95°C 5 分処理することにより multiscribe reverse transcriptase を不活性化した。TaqMan PCR 法は TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて, 5' 端に 6-carboxy fluorescein (FAM) ならびに 3' 端に 6-carboxy-tetramethyl rhodamine (TAMRA) を標識した TaqMan Probe (250 nM), さらにプライマーペア (900 nM) とともに, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) で増幅し測定した。プライマーシーケンスは第 1 表にまとめて示した。測定値の定量化には rat 18S ribosomal RNA (Applied Biosystems, Foster City, USA) を内部コントロールとして用い (comparative CT method) ABI PRISM 7700 Sequence Detection System の添付文書に基づき TaqMan software (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて各々

第1表 リアルタイム PCR に用いた TaqMan プローブとプライマーペア

| | TaqMan Probe | Forward primer | PCR product (bp) |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------|
| | | Reverse primer | |
| Albumin | TTCCAAAACGCCGTTCTGGTTCGATA | AAGGCACCCCGATTACTCCG | 648 |
| | | TGCGAAGTCACCCATCACCG | |
| Bsep | TGGCCCAGCCAGGCATACTTATTATT | TGCTTATGGGAGGCGTAT | 564 |
| | | GGGCTGACAGCAAGAATC | |
| TAT | TGCCTCTCCCACCCATTTCTCTCG | TACTCAGTTCTGCTGGAGCC | 511 |
| | | GCAAAGTCTCTAGAGAGGCC | |
| CYP2E1 | TGTTACACTGCACCTTGGCTCAAGG | AAGCGCTTCGGGCCA | 60 |
| | | CATGCAGGACCACGATGC | |
| HNF-4 | CAATGACTACATCGTCCCTCGGCACTG | AGGTCCATGGTGTTC AAGGATG | 106 |
| | | TCGAGGATGCGAATGGACA | |
| Activin A | CCCAAGGCGGCGCTTCTCAAC | CCCGATGTCACCCAGCC | 67 |
| | | TTACCCACATGAAGCTTTCTGATC | |
| β -actin | CTGTGCTGCTCACCGAGGCC | TGGCCCCTGAGGAGCA | 69 |
| | | ATCTTTTACGGTTGGCCTTAG | |
| Integrin α 1 | ATCCTCCTGAGCGCCTTCGCG | CAGAGTCCCGCTGTGGGT | 73 |
| | | GAGCCAATATAAGGAGCATTAGCAG | |

の反応における Ct 値を得、18S ribosomal RNA を用いた内部コントロールの Ct 値をサブトラクト (Ct target-Ct 18S ribosomal RNA = Ct.) することにより結果を解析した。

4. ストレスファイバー (Stress fiber : SF) の観察

培養液を吸引した後、氷冷した phosphate buffered saline (PBS) で1回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (Sigma, St. Louis, USA) を加え、5分間固定した。PBS で3回洗浄後、1 μ g/ml の FITC 標識 phalloidin (Sigma, St. Louis, USA) 溶液を加え、室温で1時間反応後、PBS で3回洗浄し、90% グリセロール/PBS を重層したものを倒立型蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE 300) (Nikon, Tokyo, Japan) で観察した。

5. 骨髄細胞の共培養

雌性 EGFP (enhanced green fluorescent protein) トランスジェニックラット (Nippon SLC, Hamamatsu, Japan) の大腿骨・脛骨の両端を切断し、18 G の針を差し込み HBSS で押し出した細胞液を 40 μ m のセルストレイナー (40 μ m Nylon) (BD

Biosciences, San Jose, USA) で濾過し、等量の Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) に重層し、18°C 360 g で20分間遠心した。中間層を採取し、HBSS で2回洗浄した。コラーゲンゲル上に初代培養肝細胞を1日間培養した 60 mm ディッシュに、 1×10^5 個ずつ撒き、コラーゲンゲルを重層した。培養液は、肝細胞培養液に 20 ng/ml recombinant human FGF-4 (fibroblast growth factor-4) (R&D Systems, Minneapolis, USA) と 50 ng/ml recombinant human HGF (hepatocyte growth factor) (R&D Systems, Minneapolis, USA) を加えたものを用い、毎日交換した。

6. 免疫染色

初代培養肝細胞をディッシュで培養後、冷 PBS で3回洗浄し、冷 4% パラホルムアルデヒド (Sigma, St. Louis, USA) で20分間固定した。0.2% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, USA)/PBS に10分間浸漬後、3% ウシアルブミン (Sigma, St. Louis, USA)/PBS で室温 30分間ブロッキングした。100倍希釈した一次抗体 (ウサギ抗ラットアルブミン抗体 (ICN biomedical, Irvine, USA)、ニワトリ抗 GFP (green fluorescent

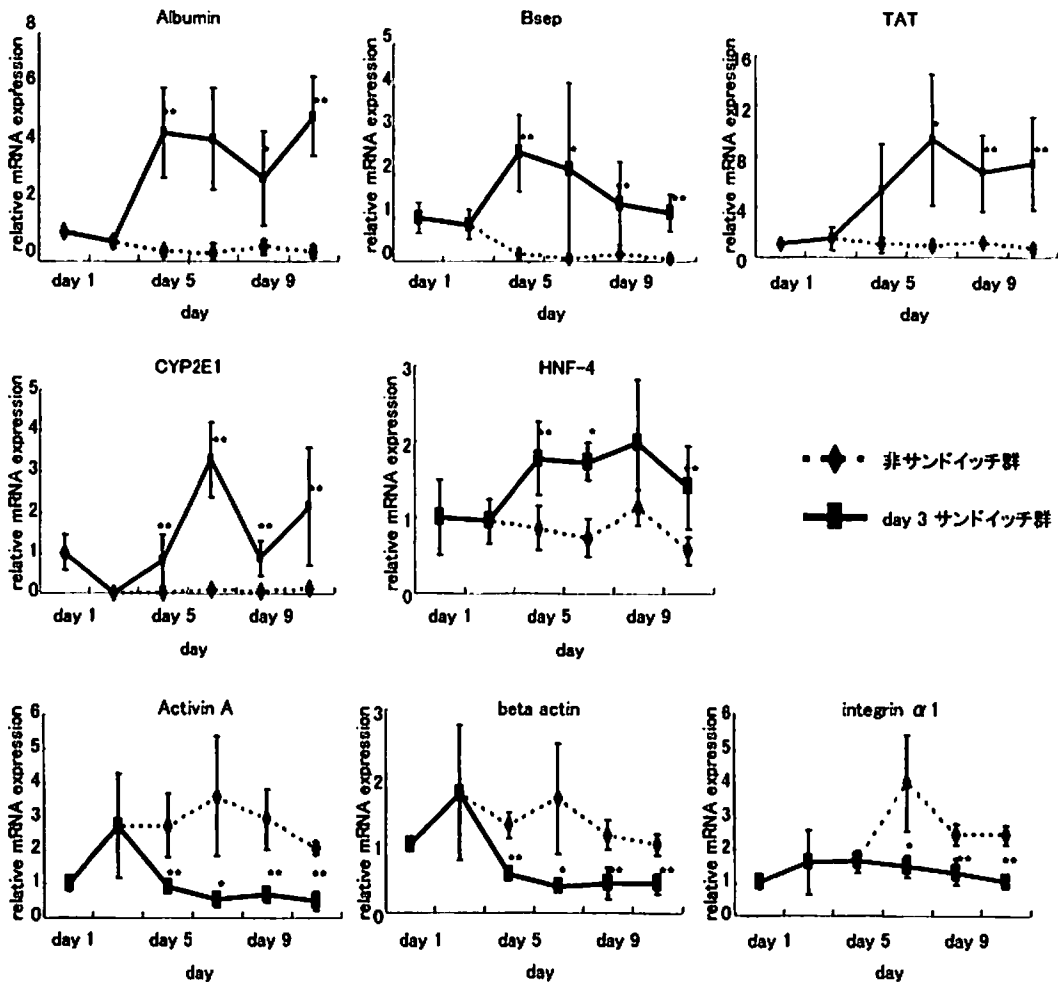
protein) 抗体 (Chemicon International, Temecula, USA)) で室温 1 時間反応させ、PBS で 10 分間 3 回洗浄した。100 倍希釈した二次抗体 (Cy3 標識ヒッジ抗ウサギ IgG 抗体 (Sigma, St. Louis, USA), FITC 標識ラビット抗ニワトリ IgG 抗体 (Sigma, St. Louis, USA)) で室温 1 時間反応させ、PBS で 10 分間 3 回洗浄し、90%グリセロール/PBS を重層したものを倒立型蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE 300) (Nikon, Tokyo, Japan) および共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 Ver. 2.02) (Carl

Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察した

結 果

1. コラーゲンゲルサンドイッチ法

培養条件はこれまでコラーゲンゲルサンドイッチ法による初代培養肝細胞の報告と同じ条件を用いた。肝細胞に特異的な機能解析は、分泌蛋白として、アルブミンの培養上清への分泌量を培養開始後 25 日間まで測定し、

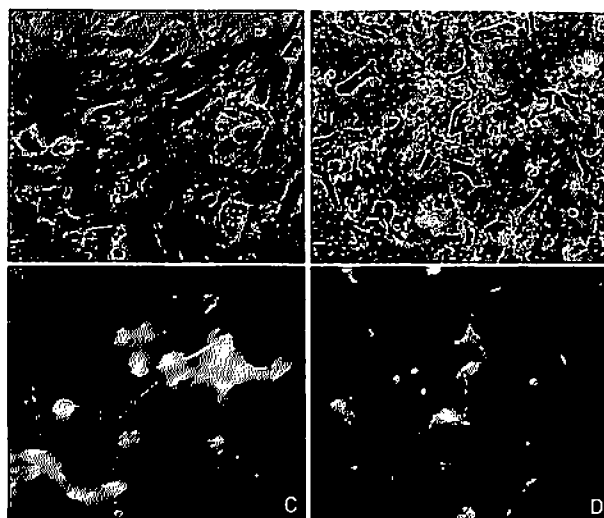


第2図 コラーゲンゲルサンドイッチ法で培養した初代培養肝細胞の肝特異的マーカー等の mRNA 量の比較。培養細胞の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で測定した。各 mRNA 量は、内部コントロールにラット 18S ribosomal RNA を用いて補正し、培養開始 1 日目の各マーカーの mRNA 量に対する比で表した。コラーゲンゲルサンドイッチ群として培養開始 3 日目にコラーゲンゲルを重層した検体を用い、非コラーゲンサンドイッチ群と比較した。アルブミン、Bile salt export pump (Bsep)、TAT (tyrosine aminotransferase)、CYP2E1 (cytochrome P450IIE1)、HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4) の mRNA は、コラーゲンゲルサンドイッチ群で発現量が増加、非サンドイッチ群で減少し、明らかな差を認めた。Activin A、 β -actin の mRNA 発現量は、非サンドイッチ群で増加、あるいは不変であったのに対し、サンドイッチ群ではどちらも減少した。Integrin $\alpha 1$ はサンドイッチ群で減少傾向であったが、非サンドイッチ群では増加した。* <0.05 , ** <0.01 vs. 非サンドイッチ群 (Wilcoxon 順位検定)

その他の重要な肝特異的タンパク質の発現については mRNA 量を RT-PCR 法を用いて測定した。

アルブミンの分泌量は、初代培養肝細胞を単層のコラーゲングル上で培養し、コラーゲングルを培養開始後 3, 5, 7, 9 日目に重層した群、重層しない群に分けて、24 時間で培養液中に分泌されるアルブミン量を、ELISA で測定した培養液中のアルブミン濃度で比較した。単層のコラーゲングル上に培養し続けた群では持続的にアルブミン分泌は低下した。培養開始 5 日目までにコラーゲングルを重層した群では、重層するまでは持続的に減少していたアルブミン分泌がコラーゲングルを重層した直後から急速に上昇した。コラーゲングルを重層した肝細胞からのアルブミン分泌は、重層後 4 日目から有意差をもって、単層のコラーゲングル上に培養し続けた群より高くなった。コラーゲングルを培養開始 5 日までに重層した場合、重層後 7 日目に最大分泌量に達しその後も維持され、最大量は培養開始 1 日目に重層した群と同程度となり維持された。培養開始後 7 日目に重層した群では、重層後数日して検出レベル以下まで低下していたアルブミン濃度が上昇してくるものの、その最高分泌量は、1 日目に重層した場合の 1/4 程度に留まり再び減少しはじめた。9 日目以降に重層した場合、アルブミン産生は回復しなかった (第 1-B 図)。

アルブミンは肝特異的タンパク質として重要な指標であるが、人工肝臓を目指す上でその他の肝臓機能が保たれているかの検討も重要である。そこでリアルタイム RT-PCR の手法を用い、コラーゲングルを培養開始 3 日目に重層した場合と、重層しなかった場合で、肝特異的マーカーを始めとしたいくつかの mRNA 発現量を比較した。内部コントロールとしてラット 18S mRNA 量を測定して、これとの比として各 mRNA 量を比較検討した。アルブミンは、重層しなかった検体では、アルブミンの mRNA 量は持続的に減少した。一方、3 日目に重層した検体では、重層した直後から mRNA 発現量の著しい増加が認められ、コラーゲングルを重層しなかった肝細胞に比し 14.5 倍以上の発現量となった。肝細胞分化における後期マーカーと言われる tyrosine aminotransferase (TAT) は、コラーゲングルを重層した肝細胞ではコラーゲングル重層後 4 日目には培養開始時の 9.3 倍の発現量となり、そのレベルが維持された。同様に肝特異的転写調節因子 HNF-4 (hepatocyte nuclear factor-4) は 1.7 倍、代謝機能マーカーとして CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) は 3.3 倍、胆汁分泌機構胆汁酸輸送分子である bile salt export pump (Bsep) は 2.1 倍であった。一方肝細胞の増殖を抑制し



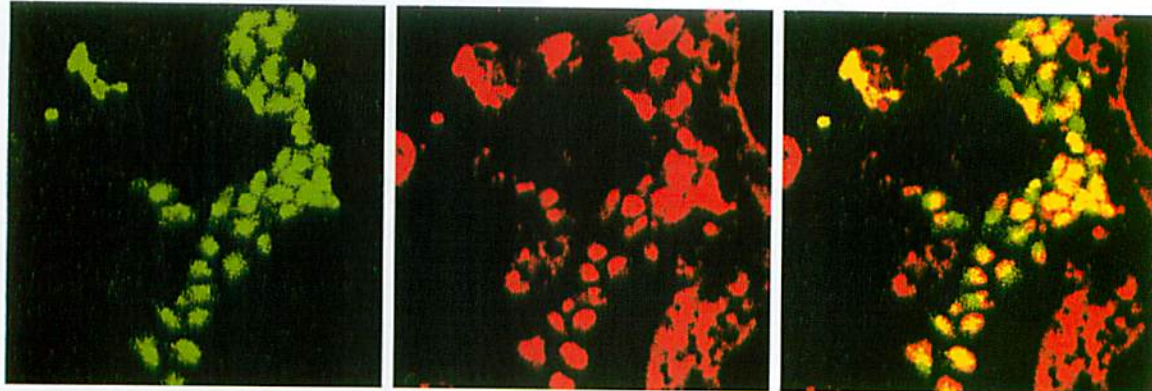
第 3 図 コラーゲングルサンドイッチ法で培養した初代培養肝細胞のアクチン線維分布の比較。培養開始 6 日目の位相差顕微鏡像 (A, B) と FITC-Phalloidin 染色後の蛍光顕微鏡像 (C, D)。培養開始 3 日目にコラーゲングルサンドイッチした場合 (B, D) は、アクチン線維で裏打ちされた毛細胆管 (BC) が観察されたが、サンドイッチしなかった場合 (A, C) は、細胞は線維芽細胞様になり、細胞内に充満したアクチン線維 (ストレスファイバー: SF) が観察された。対物レンズ 40 倍。

肝線維化を促進する作用が確認されている activin A は逆にコラーゲングル重層後その発現が減少し重層後 4 日目には 0.5 倍に減少した。同様に肝細胞内の β -actin の発現量も重層後速やかに減少に転じ 4 日目には 0.4 倍となった。activin A および β -actin はいずれも培養開始後いずれもコラーゲングル重層するまでの間その発現が増加した。 β -actin 線維が接着する細胞接着装置において重要な役割を持つ integrin $\alpha 1$ ではコラーゲングルを重層することにより、発現がやや減少するのに対し、重層しない肝細胞では発現が持続的に増加する (第 2 図)。形態学的にも初代培養肝細胞は、コラーゲングルを重層せずに長期培養すると、線維芽細胞様になり、いわゆるストレスファイバー (stress fiber: SF) とよばれるアクチン線維が細胞内に充満するようになったが、コラーゲングルで重層することにより、この形態的变化が抑制された (第 3 図)。

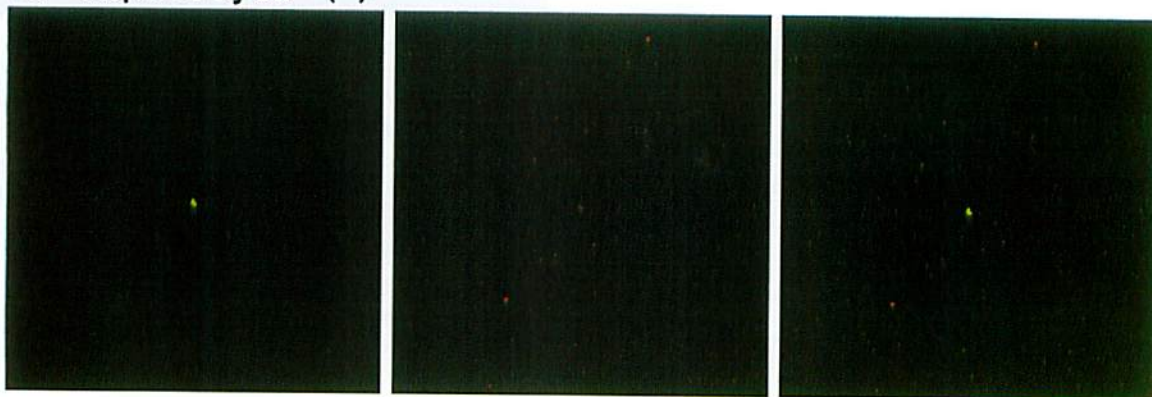
2. 初代培養肝細胞と骨髄細胞の共培養

未分化な細胞は生体肝臓内に移植することで肝細胞へ分化誘導されるので、コラーゲングルサンドイッチ法で培養した初代培養肝細胞が、未分化な細胞を肝細胞へ分化誘導できるか否かを検討した。骨髄細胞に含まれる多

A. Hepatocyte (+)



B. Hepatocyte (-)



EGFP

Albumin

Merge

第4図 コラーゲンゲルサンドイッチ法を用いた初代培養肝細胞と骨髄細胞の共培養。ラット初代培養肝細胞と、EGFP ラット骨髄細胞をコラーゲンゲルサンドイッチ法を用いて2週間培養し、アルブミン染色を行った。GFP 陽性細胞のコロニーが多数観察された。骨髄細胞由来のEGFP 陽性細胞にアルブミン陽性細胞が観察された (A)、骨髄細胞単独でコラーゲンゲルサンドイッチ法を用いて培養すると、骨髄細胞はほとんど死滅し、残存した細胞にアルブミン発現は認められなかった (B)。対物レンズ40倍。緑：GFP 陽性細胞、赤：アルブミン陽性細胞、黄：EGFP・アルブミン陽性細胞。

能性幹細胞から肝細胞へ、*in vitro* で分化を誘導する方法として、HGF を添加する方法、肝細胞と共培養する方法が用いられているが、いずれも肝細胞への分化の確認は RT-PCR 法を用いており、その陽性率は比較的低いことが推測される。我々はコラーゲンゲルサンドイッチ法を用いて培養した初代培養肝細胞と骨髄細胞を共培養することにより、どの程度の細胞が肝特異蛋白質であるアルブミンを発現するようになるのかを検討した。

コラーゲンゲルでサンドイッチした初代培養肝細胞とEGFP を発現するトランスジェニックラットから採取した骨髄細胞を共培養すると、2週間 GFP 陽性の細胞の中に、増殖しコロニーを形成する集団が現れた。また、2週間経過したあとでアルブミンに対する免疫組織化学

法を施行したところ、コラーゲンゲルサンドイッチ内で初代培養肝細胞と共培養した骨髄細胞では48.3%が陽性となった。一方、初代培養肝細胞を入れなかったコラーゲンゲルでサンドイッチした骨髄細胞は次第に死滅していき、ほぼ2週間でいくつかの孤立した GFP 陽性細胞を認めるのみとなった。このいずれもアルブミン染色で陰性であった。したがって、骨髄細胞は初代培養肝細胞と2週間、共培養することで、肝細胞特異的蛋白質アルブミンを産生するように分化した。また、コラーゲンゲルサンドイッチ法による初代培養肝細胞は骨髄細胞を肝細胞様に分化させる機能を備えていることが確認された (第4図)。

考 案

肝臓は、薬物などの代謝、ビリルビンなどの胆汁中への輸送・排泄、タンパク質の合成といった生命活動にとり、きわめて重要な機能を担っている。そのため肝不全となると、生命活動が維持できず致死的となることが多い。この状態から救うために、血漿交換や生体肝移植が行われているが、高コスト、感染、ドナー不足をはじめとする多くの問題があり、今後これらの方法に頼ることが難しい状況にある。肝臓は旺盛な再生能力を有するという優れた特徴があるが、一度生体外に取り出すと肝細胞としての機能・特徴を急速に失い再生能力も喪失する。この点が成熟肝細胞を再生医療に用いる場合に障害となっている。そこで肝前駆細胞を再生医療に用いる可能性が検討された。現在まで、肝臓内における再生能力の検討から肝臓内には小型肝細胞、oval cell などの増殖性の高い肝前駆細胞が報告された。しかしこれらの単離方法は未確立である。胎児肝から肝前駆細胞を単離する方法が検討され、single cell から肝細胞と胆管上皮細胞の2方向へ分化できることが確認されている⁴¹⁾。しかし胎児肝の利用は倫理的問題があり実用化は難しいと考えられる。

臨床応用可能な肝臓を生体外で再構成させるためには、肝細胞の増殖と機能維持をいかに長期間可能とするかが最も重要な課題である⁴²⁾。この課題の解決に向けた第一歩は、肝細胞やその前駆細胞の培養条件の検討である⁴³⁾。肝細胞は生体外に取り出すと比較的早期から線維芽細胞様に形態が変化し機能上も肝細胞としての特徴を失う。この変化を防ぐため様々な検討がなされてきた。液性因子の検討から、dexamethazone⁴⁴⁾、EGF (epidermal growth factor)⁴⁵⁾、insulin³⁶⁾などが肝細胞の機能維持に重要であることがわかった。また、コラーゲンなどの細胞外マトリックスも細胞の接着性の向上のみならず機能維持の点からも重要であることが確認された³⁸⁾。さらに細胞の足場としての構造をより生体に近い環境にする検討がなされた。多くの水を含み柔軟な材質、かつ細胞外マトリックスとしての機能の点からコラーゲンゲルが比較的早くから検討されてきた。コラーゲンゲルを培養基質として再生医療に応用した例もある。線維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養するとゲル自体が収縮する。この過程は真皮のモデルとしてバイオ人工皮膚に応用されている⁴⁶⁾。肝細胞培養においてはコラーゲンゲルの硬度を調節することにより機能の維持が変化することが示された。すなわち、ゲルが硬いと細胞はゲル上に張り付

き培養皿上での培養と同じに機能が失われるが、柔らかいゲルに細胞を撒くと細胞はゲル内に埋没し肝細胞の機能を維持すると報告された⁴⁷⁾。この過程において、細胞内のアクチン線維の束であるストレスファイバーが硬いゲル上では発達し細胞が扁平化するが、柔らかいゲル内では細胞は凝集し伸展しない。さらには細胞が基質と接着する足場の構造である接着斑が硬い基質では多く見られるようになる。このことは細胞内のシグナル伝達系にも、大きな影響があると考えられる。一方コラーゲンゲル内に埋没した場合この接着斑は大きく変化しない。我々の検討でもインテグリンはコラーゲンゲル上に肝細胞を培養した場合には増加するが、コラーゲンゲルを重層することにより逆に減少することが確認された。

我々は肝臓を生体外に取り出すことにより肝細胞が失った機能が、適当な環境下で培養することにより再び取り戻すことが出来るのか否かという問題について検討した。バイオ人工肝臓：BALの開発において、Demetriou³⁾やSussman⁴⁸⁾の装置が開発されているが、いずれも薬物代謝能が低く、胆汁酸の排泄機能がなく、長期間の培養により機能が低下していくことが問題であった。また、肝細胞は培養の過程で形態が線維芽細胞化していく。線維芽細胞は一般に間葉系細胞でやや未分化な細胞と考えられている。従って適当な条件における肝細胞に分化する可能性がある。もし分化することが出来るならば、それは肝細胞の分化機構の検討にも有用となると考えられる。本研究では、単層のコラーゲンゲル上で肝細胞を培養して肝細胞の機能を失わせてからコラーゲンゲルで重層し機能の変化を観察した。その結果、培養開始から5日目までは肝細胞として機能を回復するがその時期を過ぎたものはコラーゲンゲルの重層のみでは肝細胞の機能を回復することができなかった。また、代謝、蛋白質合成、胆汁酸排泄といった肝細胞の非常に重要な機能はいずれもコラーゲンゲルの単層培養では速やかに失われ、重層することでこれも速やかに回復した。その逆に、細胞骨格特にアクチン線維とこれに結合する接着装置はいずれもコラーゲンゲル単層上での培養では増加し、重層することにより減少した。この事実は細胞外マトリックスとそれを足場にするインテグリンからの情報伝達機構が細胞の形態と機能をリンクさせてコントロールしていることを示唆した。肝細胞骨格と肝細胞機能の関係は肝細胞の特徴的な形態である、毛細胆管の収縮機構の検討において報告されている。M. J. Philipsらは毛細胆管周囲のアクチン線維の束を見いだした⁴⁹⁾。これが肝細胞の胆汁分泌機構において重要な役割を果たすこと、このアクチン線維の傷害が胆汁分泌機構のみならず細胞全体の

傷害を引き起こすこと、細胞が障害されること自体が毛細血管周囲のアクチン線維の傷害を引き起こすことを示した。このことは細胞の機能と細胞骨格が密接につながっていることを示す。以上のことから以下の3点が示唆された。①肝細胞機能は細胞外マトリックスによる情報が非常に重要な役割を果たしている。②肝細胞の形態において細胞内アクチン線維の分布とそれにつながる細胞接着斑の分布が重要でこれが細胞外マトリックスにより調節されている。③肝細胞は細胞外マトリックスが適当でないと脱分化し、しかも非可逆的な変化を来す可能性がある。以上の点から、培養開始5日目以降におこる非可逆的な変化において重要な因子の同定ができれば肝細胞の機能維持に重要な因子が解明される可能性があると考えられる。

再生医療に应用する場合、分化した肝細胞を利用することと併行して未分化細胞を利用する方法がある。未分化細胞を移植細胞として応用する検討はすでに心筋の再生においては積極的に行われている⁵⁰⁾。しかし未分化細胞を一定の方向に分化させる人工的に統合された方法はないのが現状である。いわゆる局所的レベルでの分化誘導は成功例の報告が見られるが、未分化細胞を分化誘導する手法の主流は幹細胞、あるいは前駆細胞を直接標的臓器に注入して周囲の環境にさらすことにより自然に分化誘導する方法である。肝臓の再生においてもES細胞、骨髄細胞などが応用されて肝細胞への分化が確認されている。しかし臓器への移植することによる分化誘導は未知の力にゆだねる手法で、その機序の解明は難しい。そこで*in vitro*で分化させる方法の確立が求められる。我々は未知の力を*in vitro*で利用することで未分化細胞を分化誘導する方策として、長期の初代培養系を利用した。初代培養系の問題点は長期永続的に培養を続けることが困難である点である。本研究ではコラーゲンゲルで長期に初代培養肝細胞を維持することにより、これと共培養した未分化細胞が肝細胞へ分化することを示した。この事実は、この初代培養系が少なくとも生体内の肝臓に近い機能を有し、未分化細胞を分化誘導する未知の力を持っていることを示している。また、この系が有効に利用されれば、未分化細胞を一定の間隔で補充することにより、永久的に利用できるバイオ人工肝臓が可能になると考えられる。以上の点は人工肝臓構築を目指す上で画期的である。今後、初代培養肝細胞を共培養した未分化細胞がどの程度の肝機能を有しどの程度の期間培養が可能でどの程度増殖する能力を有するかについての検討が必要と思われる。

総 括

コラーゲンゲルサンドイッチ法を用いた初代培養肝細胞の機能、分化誘導能についての検討を行い以下の結果を得た。

1. 単層のコラーゲンゲル上で肝細胞を培養すると、肝細胞は肝特異的機能を失った。
2. 培養開始後一定期間単層コラーゲンゲルで培養した後、コラーゲンゲルで重層し機能の変化を観察すると、培養開始から5日目までは肝細胞として再び機能を回復したが、その時期を過ぎたものはコラーゲンゲルの重層のみでは肝細胞の機能は回復しなかった。
3. 代謝、蛋白質合成、胆汁酸排泄といった肝細胞の非常に重要な機能はいずれもコラーゲンゲルの単層培養では速やかに失われ、重層することでこれも速やかに回復した。逆に、細胞骨格特にアクチン線維とこれに結びつく接着装置はいずれもコラーゲンゲル単層上での培養では増加し、重層することにより減少した。
4. コラーゲンゲルサンドイッチ法を応用した肝細胞初代培養系が、少なくとも生体内の肝臓に近い機能を有し、骨髄内未分化細胞を、肝細胞様機能を有した細胞に分化誘導する能力を持っていた。
5. バイオ人工肝臓：BALに未分化細胞を応用する可能性が示唆された。

以上の結果は肝不全治療法の開発において重要な発見であり、今後も臨床応用において有用である。

本稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深く感謝いたします。また、本研究に際し、直接ご指導いただいた慶應義塾大学医学部内科学教室東俊文講師、ご協力いただいた研究室員各位に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Strain AJ, Neuberger JM : A bioartificial liver--state of the art. *Science* 295 : 1005-1009, 2002
- 2) Allen JW, Hassanein T, Bhatia SN : Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* 34 : 447-455, 2001
- 3) Hui T, Rozga J, Demetriou AA : Bioartificial liver support. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8 : 1-15, 2001
- 4) Krasteva N, Harms U, Albrecht W, Seifert B, Hopp M, Altankov G, et al. : Membranes for biohybrid liver

- support systems--investigations on hepatocyte attachment, morphology and growth. *Biomaterials* 23 : 2467-2478, 2002
- 5) Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, Inoue Y, Sakaguchi M, Uemura T, et al. : Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. *Transplantation* 69 : 202-207, 2000
 - 6) Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC, Eaves CJ : Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP) phenotype. *J Clin Invest* 108 : 1071-1077, 2001
 - 7) Weiss RA : The Leeuwenhoek Lecture 2001. Animal origins of human infectious disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356 : 957-977, 2001
 - 8) Farber E : Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 16 : 142-148, 1956
 - 9) Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS : *In vivo* differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* 49 : 1541-1547, 1989
 - 10) Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS : A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 8 : 1737-1740, 1987
 - 11) Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK : Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 27 : 433-445, 1998
 - 12) Tatematsu M, Kaku T, Medline A, Farber E : Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene. *Lab Invest* 52 : 354-362, 1985
 - 13) Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, et al. : *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 8078-8083, 2002
 - 14) Rao MS, Reddy JK : Hepatic transdifferentiation in the pancreas. *Semin Cell Biol* 6 : 151-156, 1995
 - 15) Deng J, Steindler DA, Laywell ED, Petersen BE : Neural trans-differentiation potential of hepatic oval cells in the neonatal mouse brain. *Exp Neurol* 182 : 373-382, 2003
 - 16) Mitaka T, Kojima T, Mizuguchi T, Mochizuki Y : Growth and maturation of small hepatocytes isolated from adult rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 214 : 310-317, 1995
 - 17) Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 : 154-156, 1981
 - 18) Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. : Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336 : 688-690, 1988
 - 19) Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R : The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines : formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87 : 27-45, 1985
 - 20) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147, 1998
 - 21) Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. : Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 13726-13731, 1998
 - 22) Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW : Surface antigens of human embryonic stem cells : changes upon differentiation in culture. *J Anat* 200 : 249-258, 2002
 - 23) Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, et al. : Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS Lett* 497 : 15-19, 2001
 - 24) Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD : Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 9 : 1094-1099, 2003
 - 25) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001
 - 26) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM : From marrow to brain : expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290 : 1775-1779, 2000
 - 27) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 : 1168-1170, 1999
 - 28) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105 : 369-377, 2001
 - 29) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 : 41-49, 2002
 - 30) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109 : 1291-1302, 2002
 - 31) Nagaki M, Shidoji Y, Yamada Y, Sugiyama A, Tanaka M, Akaike T, et al. : Regulation of hepatic genes and liver transcription factors in rat hepatocytes by extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 210 : 38-43, 1995

- 32) Bhatia SN, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML : Selective adhesion of hepatocytes on patterned surfaces. *Ann N Y Acad Sci* 745 : 187-209, 1994
- 33) Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M : Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype : cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *Faseb J* 13 : 1883-1900, 1999
- 34) Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG : Hepatocyte function and extracellular matrix geometry : long-term culture in a sandwich configuration. *Faseb J* 3 : 174-177, 1989
- 35) Arterburn LM, Zurlo J, Yager JD, Overton RM, Heifetz AH : A morphological study of differentiated hepatocytes *in vitro*. *Hepatology* 22 : 175-187, 1995
- 36) Knop E, Bader A, Boker K, Pichlmayr R, Sewing KF : Ultrastructural and functional differentiation of hepatocytes under long-term culture conditions. *Anat Rec* 242 : 337-349, 1995
- 37) Tsukita S : Isolation of cell-to-cell adherens junctions from rat liver. *J Cell Biol* 108 : 31-41, 1989
- 38) Spence JT, Haars L, Edwards A, Bosch A, Pitot HC : Regulation of gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes on collagen gels. *Ann N Y Acad Sci* 349 : 99-110, 1980
- 39) Seglen PO : Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13 : 29-83, 1976
- 40) Kreamer BL, Staecker JL, Sawada N, Sattler GL, Hsia MT, Pitot HC : Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. *In Vitro Cell Dev Biol* 22 : 201-211, 1986
- 41) Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, et al. : Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32 : 1230-1239, 2000
- 42) Allen JW, Bhatia SN : Improving the next generation of bioartificial liver devices. *Semin Cell Dev Biol* 13 : 447-454, 2002
- 43) Flendrig LM, Sommeijer D, Ladiges NC, Te Velde AA, Maas MA, Jorning GG, et al. : Commercially available media for flushing extracorporeal bioartificial liver systems prior to connection to the patient's circulation : an *in vitro* comparative study in two and three dimensional porcine hepatocyte cultures. *Int J Artif Organs* 21 : 467-472, 1998
- 44) Schulz WA, Gebhardt R, Mecke D : Dexamethasone restores hormonal inducibility of ornithine decarboxylase in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 146 : 549-553, 1985
- 45) Fausto N, Webber EM : Control of liver growth. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3 : 117-135, 1993
- 46) Nanchahal J, Otto WR, Dover R, Dhital SK : Cultured composite skin grafts : biological skin equivalents permitting massive expansion. *Lancet* 2 : 191-193, 1989
- 47) Semler EJ, Ranucci CS, Moghe PV : Mechanochemical manipulation of hepatocyte aggregation can selectively induce or repress liver-specific function. *Biotechnol Bioeng* 69 : 359-369, 2000
- 48) Sussman NL, Gislason GT, Kelly JH : Extracorporeal liver support. Application to fulminant hepatic failure. *J Clin Gastroenterol* 18 : 320-324, 1994
- 49) Oshio C, Phillips MJ : Contractility of bile canaliculi : implications for liver function. *Science* 212 : 1041-1042, 1981
- 50) Leinwand LA : Hope for a broken heart? *Cell* 114 : 658-659, 2003

蘭学と漢方医学

出島に置かれたオランダ商館を通じてわが国に流入した西欧の学術は蘭学と総称された。そのなかの医学は、薬物を意味する方を付して蘭方と呼ばれた。

1774年に杉田玄白等の『解体新書』が世に出たことに象徴されるように、西洋医学である蘭方は江戸時代のわが国において次第に公然の存在となった。蘭学に関心を持つものも次第に増加し、幕末には何らかの意味で蘭学を習得して蘭方の知識を持った漢方医は、京都周辺では医師全体の29%（『洛医人名録』）に及んだといわれている。

また、明治8年（1875）の内務省衛生局第一次年報によれば、医師の総数23,248人中、西洋医5,097人（22%）、漢方洋方折衷医2,524人（11%）、漢方医14,807人（64%）、その他831人（4%）であった。時代が進むにつれて漢方医のしめる割合が低下するのは、西洋医学による医制を發布した明治政府の意図したところであった。

明治以前の19世紀のわが国では、蘭方の教育はもっぱら蘭学の私塾でおこなわれていた。有名なものには、江戸の伊東玄朴の象先堂（1833年開設）や大阪の緒方洪庵の適々齋塾（1838年開設）があって幾多の人材が輩出した。

『福翁自伝』には、福沢先生が適塾に学ばれた当時のことが書かれていて、『ただ、当の敵は漢方医で医者が増ければ儒者までも憎くなって、…、ことに漢医書生は之を笑ふばかりでなく之を罵詈して少しも許さず…』（150-151頁、第十四版、時事新報社、昭和11年刊）とあり、当時の蘭学塾は漢方医を排撃する急先鋒であったようである。先生は封建的なものを蛇蝎のごとく嫌われたから、漢方医とみると封建時代の守旧派の象徴とみなされたのであろう。

しかしこれはわが国に西洋医学が扶植される以前のことであり、西洋医学が隅々まで行き渡ると今度は別な意味での弊害が生じてきた。いまでは西洋医学一辺倒でなく、漢方の治療医学としての優れた側面を活かして満足度のたかい臨床医学を構築する方向性へと大きく政策的な舵がきられている。

いまでは誰も省みなくなっているが、明治政府の方針に対して当時の漢方医の団体がどのような主張をして漢方医学の存続をはかったかについても触れてみたい。

第一は疾病構造が人種により相違するので、外国の医

術のみでは治療に齟齬をきたすおそれがあること、第二に漢方医学はあまり物財を要しない簡素な治療体系であるので医療費が低廉であること、第三に（明治になってから）養成された西洋医は僻地や地方に行きたがらないので、漢方医は地方住民のために必要であること、などである。

第一の主張は当時の有り様からみれば臨床医の経験からする言葉と思われるが、今日にも通用するものである。いま相補代替医療の必要性が叫ばれる理由の一端はここにある。

第二の漢方治療は経済的な医療であるという点は、現在日本東洋医学会などで筆者等が盛んに主張していることである。医療費の高騰が問題視される今日こそそのような長所を臨床研究で明らかにしたいものである。

明治22年の帝国議会に出された請願書には、漢方医学と「漢」の字が使われていることに対して、「漢」という文字を用いているが実際はわが国で千有余年の歴史があり、わが国の英傑輩が「千辛万苦」して発明する所にして現在の中国大陸の医学とは雲泥の差のある本邦固有の医学であると力説している。弁明めいたこの文章には、清国とのつばぜり合いが始まっていた当時の世論に配慮した一面があるようにもみうけられる。このあと明治22年に日本は清国に宣戦を布告した。

福沢先生が適塾に学ばれる約50年前の1803年ごろ、大阪の伏屋琴坂（1747～1811）という医師が『和蘭医話』という書物を刊行した。彼は漢方医であったが、杉田玄白（1733～1817）らの『解体新書』に触発されて蘭学をまなび、ついに人体の解剖まで行うようになった。

『和蘭医話』で注目されるのは、解剖時に腎臓につながる血管に管をさしこんで墨汁を吹き入れて後、管を抜き取って手で腎臓を握りしめれば清澄な水が「ベッケン」に出てきて、それは七、八寸の「管紐」を通り膀胱にいたり、最期に尿道を経て排出されることを記録したことである。この研究は『ボーマン、ルードウィッヒ、ハイデンハインなどの腎機能の生理学的研究の先駆をなすもの』（内山孝：医学古典集 伏屋琴坂著 和蘭医話 日本医史学会編、医歯薬出版株式会社、1973年）である。

われわれ漢方研究者にとってうれしいのは、彼が無間な西洋崇拝者でなく、随所に漢方医学の長所と西洋医学の長所を並列して論じていることで、最期まで冷静に実務家の目を以て東西両医学をながめていることである。これが西洋医学唯一崇拜の風潮がまだ支配的な医学界で伏屋琴坂がいまひとつ高い評価を下されない一つの理

由であるといつては言いすぎであろうか。それは全身麻酔薬を考案した華岡青洲などの業績についてもいえることであるが。

秋葉哲生(あきば病院)

思考力を持つ医師

“Hours of boredom, minutes of terror”¹⁾ --- 「麻酔」の本質を表現した言葉である。患者の状態に大きな変動も無く、「退屈」と感じられるほどの手術経過の中に、時折麻酔科医自身の心臓が止まるかと思うほどの、事態急変の可能性が潜んでいる。患者の生命維持に直結する行為を「退屈」と表現するとは、何と不謹慎と思われる読者も多いかと思うが、筆者はあえて「退屈」と言い切ることこそ、麻酔の安全を支える精神があることを論じてみたい。

全身麻酔は導入(患者の意識消失まで)、維持(手術開始から終了までとはほぼ同義)、覚醒の3つの時期に分けられる。これはしばしば航空機の離陸上昇、水平巡航飛行、降下着陸と比較される。航空機事故の大半は離陸時の3分間、着陸時の8分間に集中しており、「魔の11分」と言われている。麻酔においても、導入と覚醒は、患者の意識、自発呼吸、循環がきわめて短時間に大きく変動する時期であり、換気困難、低酸素症、血圧低下などの危険な事態も起こりやすい。しかし、本来これらの変化は、麻酔薬の薬理作用から、ある程度予測できる現象であり、しかもこの時期に薬物投与、マスク換気、気道確保などの「手を使う行為」を連続的に行う麻酔科医の注意力はかなり高い状態にある。パイロットは離陸滑走を始める時に、万一途中でエンジンが故障した場合離陸を中止するか、あるいは離陸して上空で燃料を放出した後、緊急着陸するかを常に考えており、その決断を下すための臨界速度も計算している。今まさに快適な空の旅に出発という時に、全エンジン停止という最悪の状況を考慮するわけである。この「最悪のシナリオを想定する」ということは、麻酔に限らずあらゆる医療行為の安全のために、医療提供者が身につけるべき基本的な姿勢であると筆者は考える。卑近な例では、気管挿管が困難な場合、第2、第3の方策がとれるよう、常日頃から習練を重ねることや、血圧低下に対処するための昇圧薬の準備といったことになる。執刀医には失礼かもしれないが、申告された手術予定時間や予想出血量を麻酔科医が信用しないのも、「最悪のシナリオを想定する」ためである。

反面、安定した水平巡航中の事故は少ないとされているが、わずかひとつの航法モードスイッチの切替間違いによる航路逸脱や、自動操縦装置と手動操縦のコンフリ

クトによる墜落の例もある。機体、天候、管制とのコミュニケーション等を含めた現状認識(situation awareness)の誤りによる事故である²⁾。「みずからの置かれた状況を正しく認識する」ことは重要である。たとえば切断指再接着術の麻酔中は、一旦安定すれば、手術野からの出血は無視できるほど少なく、患者のバイタルサインもほとんど変動しない。顕微鏡下の繊細な操作のために鎮痛と不動化を提供するのみである。これを「退屈」と感じる麻酔科医が多いことはあえて否定しない。つい居眠りをしてもまったく不思議ではないが、このような時期にも気管チューブと呼吸回路のはずれ、麻酔薬の残量確認忘れなど、事故の陥穽は確実に存在する。これらを防ぐには、「退屈」な時期であるからこそ、事故につながる危険があることを明確に意識する以外にはない。

「現状認識」能力の欠如が一因となったと考えられる医療事故が後を絶たない。内視鏡下の前立腺手術による死亡事故が広く報道されたが、止血操作に難渋した上に、開腹に切り替える判断の遅れが、致命的になったようである。予想を越える出血に直面して、「頭に血がのぼる」状態になって冷静な判断を妨げた可能性は否定できない。事故を受けて関連諸学会は内視鏡手術を行う医師の技能向上対策の検討を始めた。技術の修練を積むことは当然であるが、どんなに熟達しても、不慮の事態は起こりうる。そのような事態に遭遇したときに、自分ならどのような思考、行動をとるかを平時に考え、必要であれば自らの性格や行動様式を修正するような研鑽が、重要であると考ええる。

単なる行為を羅列したマニュアルを作って事足りれりせず、その基盤となる思考、判断力の養成が今後の医療事故防止の主眼となるべきであろう。手術の成否を決めるのは切開(incision)ではなく、判断(decision)である³⁾。現役機長が著した書物に寄せて、柳田邦男氏は「思考力を持つ機長」像を提言している。医療過誤報道が日常茶飯事のように感じられるようになってしまった昨今、初心にかえって自らの行動を律すべく、医療界もまさに他山の石とすべきである⁴⁾。

文 献

- 1) Crisis management in anesthesiology. Gaba DM, Fish KJ, Howard SK Churchill Livingstone 1994.
- 2) Human factors in air traffic control. Hopkin VD. Taylor & Francis 1995.
- 3) Near misses in cardiac surgery. Lee ME. Butterworth Heinemann 1992.
- 4) 機長の危機管理. 桑野信紀, 前田荘六, 塚原利夫. 講談社 1997.

木山秀哉(北里研究所病院 麻酔科)

多段階発がん過程における DNA メチル化の変化

臨床的観察ならびに疫学的解析から、ヒトのがんの多くが長い時間と複数の段階を経て発生するという事実が広く認識されるようになってきている。多段階発がん過程に対応して、がん遺伝子の増幅やがん抑制遺伝子の変異ならびに染色体の欠失が蓄積することが報告されてきた。しかし、従来行われてきたジェネティックな異常の解析のみでは多段階発がん過程の全体像をいまだ十分に説明できないことから、発がんにおけるエピジェネティック機構、すなわち DNA の塩基配列の変化を伴わない生物情報の変化が近年大いに注目されている。DNA メチル化の変化は、発がんにおける主要なエピジェネティック機構のひとつである。

がん細胞においては、5-メチルシトシンの総量は正常細胞に比して減少しているが、正常細胞でメチル化を受けていない CpG 配列がメチル化され、すなわち DNA メチル化が局所的に亢進することが知られている。DNA メチル化の変化がヒトのがんの発生に寄与するいくつかの機構が想定されている。第一に、5メチルシトシンが脱アミノ反応によってチミンに変化することから、遺伝子変異を蓄積させる。第二に、DNA メチル化の変化は染色体構造に影響を与え、染色体不安定性に結びつくと考えられている。第三に、プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化は、がん抑制遺伝子などの発現を変化させる。

筆者等は従来、ヒトのがんにおける E-カドヘリン細胞接着系不活化機構の解明に取り組んでいた。特に浸潤性増殖傾向の著明な諸臓器の低分化がんにおいて高頻度に E-カドヘリンの発現低下を認めたことから、E-カドヘリン発現調節機構の解明を試み、1995年に E-カドヘリン遺伝子がヒトのがんにおいて DNA メチル化によって不活化される可能性を初めて提唱した。当時は DNA メチル化によって不活化されるがん抑制遺伝子として Rb・VHL のみが知られているに過ぎず、発がんにおけるエピジェネティック機構が未だ多大な注目を集めていなかった。筆者等の成果は、今日の DNA メチル化研究の隆盛に多少なりとも先鞭たり得たと考えている。

筆者は国立がんセンター研究所の研究職であるが、外科病理診断の実践に基づいて研究課題を設定し臨床に資する研究成果を挙げることを pathologist の本分と考え、同センター中央病院で多数のがん症例の生検・手術検体の病理診断にも従事している。以後、日常的な病理診断の現場で遭遇する諸臓器における前がん状態・前がん病変ならびに種々の臨床病理学的特性を示すがんにおいて、

DNA メチル化の変化の検討を積み重ねてきた。DNA メチル化の局所的な亢進は、肝細胞がんに対する前がん状態と考えられる慢性肝炎・肝硬変症の段階をはじめとする諸臓器における前がん状態において、ヘテロ接合性喪失やマイクロサテライト不安定性に先行して既に認められる一方、がん関連遺伝子の発現低下やがんの組織学的悪性度と有意に相関した。DNA メチル化の変化はヒトがんの多段階発生に早期から寄与し、DNA メチル化の変化を伴う症例は速やかに進行して悪性度の高いがんになる可能性があると考えられた。前がん段階における DNA メチル化の変化がほとんど報告されていなかった頃には、「肝硬変症すなわちがんでない状態で亢進する DNA メチル化は、発がんとは関係のない事象に違いない」との査読意見を頂き、これを撃破すべく奮起したことを思い起こす。喫煙や肝炎ウイルス・Epstein-Barr ウイルス感染などの発がんの外因と、DNA メチル化の変化の関係を示してきた。DNA メチル化により不活化されるがん関連遺伝子の新たな同定を試みた。

DNA メチル化のパターンの変化の背景にある要因として、DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の遺伝子変異をヒトのがんにおいて初めて証明した。DNMT1 の mRNA 発現は、正常肝組織に比し慢性肝炎ないし肝硬変症の段階ですでに有意に亢進することがわかった。DNMT1 の蛋白発現亢進と肝細胞がんの分化度や門脈侵襲の有無とのあいだに有意な相関を認め、DNMT1 の発現亢進を示す肝細胞がん症例において術後の無再発生存率が有意に低かった。DNMT1 の発現亢進と消化管がんの CpG アイランドメチル化形質との有意な相関を証明した。膀胱移行上皮がんの多段階発生において、DNMT1 発現は細胞増殖活性の亢進に先行して前がん段階から亢進し、特に悪性度の高い結節状浸潤がんの前駆病変と考えられている広汎進展上皮内がんの発生に寄与する可能性を示した。

DNMT3b の発現も非がん肝組織に比し肝細胞がんにおいて亢進していたが、DNMT3b は胚性幹細胞において傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化に必須であることが報告されている。慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織と肝細胞がんの双方で同領域の DNA メチル化減弱を検出したが、同領域における DNA メチル化減弱はクロマチン脱凝縮や染色体組み換えを促進すると考えられている。DNA メチルトランスフェラーゼモチーフの一部を欠く DNMT3b のスプライズバリエーションである DNMT3b4 の発現量や、正常肝組織に発現する主たるスプライズバリエーションである DNMT3b3 の発現量に対する DNMT3b4 発現量の比が、DNA メチル化減弱の程度と有意に相関することが

わかった。ヒト腎上皮由来 293 細胞に DNMT3b4 を強制発現したところ、発現量に依存してサテライト 2 における DNA 脱メチル化が誘導された。DNMT3b4 が傍セントロメアサテライト領域において DNMT3b3 と競合し、同領域の DNA メチル化が減弱して染色体不安定性に帰結する可能性があると考えられた。

現在、発がんにおける DNA メチル化に関する基礎研究の成果を、がんの臨床に結びつけるに適した機を迎えていると考えられる。今後、血清検体などにおけるメチル化 DNA 検出法の確立が、発がんリスクの評価やがんの早期診断・病態診断に寄与し、DNA メチル化の補正ががんの予防・治療に結びつく可能性が期待される。

金井弥栄 (国立がんセンター研究所 病理部)

乳癌診療における病理診断の役割

乳房に生じた腫瘍がどんな性質のものなのかを知るには腫瘍のヘマトキシリンエオジン (HE) 染色標本の鏡検による病理組織診断が不可欠である。また、腫瘍が悪性とわかり、手術が行われた場合には、乳房温存手術の切除範囲決定、所属リンパ節転移の有無などが HE で診断され、臨床側に伝えられてその後の治療方針決定に役立てられる。

治療方針決定や治療効果判定の際には、HE 診断が従来以上に重視される場面も出てきている。乳癌手術例の 60~70% は腋窩リンパ節転移陰性であるが、この内 10~15% で再発が見られる。そのような高リスク群を、原発巣の HE 標本にて癌細胞の顔つき (病理学的悪性度) と浸潤径から選び、術後補助療法を施行して予後を改善せしめることが標準的治療戦略となってきた。また、近年広く行われている術前補助療法の際にも、HE 標本で組織学的に癌が完全消失した場合 (pCR) は予後良好である事が明らかになり、病理学的治療効果判定の臨床的重要性が増してきている。

一方で、HE 診断だけでなく、免疫組織化学 (IHC) などの手法を用いて癌細胞における分子レベルの知見の報告を求められることも多くなった。乳癌診療の分野では、癌遺伝子 HER-2 (c-erbB-2) 過剰発現や遺伝子増幅、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR) 発現などの情報が含まれる。HER-2 を標的としたヒト化単クローナル抗体である抗癌剤トラスツズマブ (ハーセプチン) は、単剤ないしタキサン系薬剤との併用により、HER-2 過剰発現のある転移性乳癌に対して効果を表すことが示されている。また今後、術前・術後の補助療法に適応拡大すべく臨床試験が行われている。

トラスツズマブ治療適応の決定に際しては、乳癌組織

の切除標本 (10%ホルマリンで 24~48 時間固定し、パラフィン包埋された組織切片) に対する HER-2 の検査が必要となる。HER-2 検査法には蛋白過剰発現を見る IHC 法と遺伝子増幅を見る FISH 法がある。IHC 検査の結果は、癌細胞の膜染色状態と強度、面積により 4 スコアに分け、3+ を適応あり、2+ は適応可能性あり、0,1+ を適応なしとする。スコア 2+ の乳癌は全体の約 10% を占めるが、3+ と異なり診断者間の判定再現性やトラスツズマブ奏効率が低い。従ってスコア 2+ の場合は FISH 法による再検査を行い、遺伝子増幅陽性 (2 倍以上) 例のみを治療適応とすることが推奨される。ホルモン療法についても、その適応は ER または PgR 陽性乳癌であり、現在 IHC 法で ER, PgR の発現が検査されている。

HE レベルにしても分子の変化を見るにしても新たな検討を始めると、標本作製や検査自体、結果判定などの面で留意しなければならないことや、種々の業務上の問題点が出てくる。病理学的な悪性度や治療効果判定には、複数の基準が世に存在し、どの基準を採用すべきかという議論もあれば、適用上未解決の問題がある。HER-2 スコア 2+ については上記の様に FISH による再検査が必要となる。FISH は過固定だと検査の成功率が低い。ER, PgR については IHC 法にて何%以上の癌細胞が陽性だとホルモン療法の対象とすべきかについて確固たる基準はまだない。

cDNA マイクロアレイやプロテオミックス技術の進歩により短時間で何百もの特異的蛋白の異常がわかり癌の個性診断が可能となると同時に、ごく少量の血液から癌診断が出来そうな勢いである。近い将来これらの成果は臨床応用され、医療のオーダーメイド化が実現することであろう。それでも現時点では HE 診断に求められる情報はむしろ増加しているようで、HE と分子変化の双方の情報提供を必要とされる病理側の二面对応の時代は当面続きそうだ。乳房以外の臓器の腫瘍や非腫瘍性病変の診断も同様の流れにあると思われる。

津田 均 (防衛医科大学校 第二病理)

エクソ/エンドサイトーシスによる生体機能調節

2003 年度ノーベル化学賞

本年度のノーベル化学賞はマキノ博士 (アメリカ) とアグレ博士 (アメリカ) に贈られた。受賞理由は「細胞膜に存在する、イオンや水のチャネル (通路) に関わる先駆的な発見」ということであった。マキノ博士は K イオン選択的チャネルがどのようにして K イオンと

Na イオンを見分けることができるのか、という問題を X 線結晶学によって原子レベルで初めて明らかにした。イオンチャネルは神経、筋、感覚器等で興奮性を担う分子として知られているが、その蛋白質の構造と機能の関係が詳細に明らかになったことは、心筋細胞や脳神経細胞の疾患の理解や新薬の開発等に大きく貢献するだろう。アグレ博士は、細胞膜に存在すると想定されていた水のみを通す通路（水チャネル）、アクアポリン AQP を実際に発見し、構造解析によって水のみが透過される仕組みを明らかにした。腎集合管における水の再吸収は AQP2 を通して行われている。AQP2 の機能の調節機構がまた興味深い。下垂体後葉より分泌される抗利尿ホルモン ADH により、集合管主細胞内の小胞膜上に貯蔵されていた AQP2 は細胞膜の管腔側表面に挿入され、結果的に水の通り道が増加し、浸透圧勾配に従って水が原尿より再吸収され、尿量が減少する。この細胞膜に AQP2 を乗せた小胞が融合し、AQP2 が細胞膜に付け加わる過程はエクソサイトーシスと呼ばれる。一方、血中 ADH 濃度が低下すると表面に発現していた AQP2 は周囲の脂質膜ごと細胞内に陥入し、小胞として内在化する。この過程をエンドサイトーシスと呼ぶ。このエクソサイトーシスとエンドサイトーシスによる膜蛋白質の表面発現調節は他にも、インシュリンによるグルコーストランスポーター GLUT-4 の表面発現調節、記憶学習の基礎となる海馬や小脳でのシナプス可塑性におけるグルタミン酸受容体 GluR の表面発現調節、などにおいても報告され、生体調節の基本メカニズムとして大変重要であるとの認識が深まりつつある。しかし、どちらの過程も多くの蛋白質分子が関与する複雑な過程であり、分子機構はなかなか解明されなかったが、近年、大きな進展が見られた。そして、このエクソ/エンドサイトーシスによる膜蛋白質のトラフィックは、医学生物学の中で重要であると考えられ、近い将来、この分野からノーベル賞受賞者が出るだろうとの評判が高い。

シナプス小胞のエクソサイトーシス：SNARE 蛋白質と低分子量 G 蛋白質

エクソサイトーシスは分泌細胞、神経細胞等で顆粒（小胞）内の物質を分泌（放出）するメカニズムとして、研究が進められてきた。分泌・放出には SNARE（スネア）蛋白質と呼ばれる一群の蛋白質が必須である。特に細胞膜に存在するシンタキシン、SNAP-25 と小胞膜に存在する VAMP の 3 者は、coiled-coil 構造によってコア複合体を形成し、脂質膜同士の融合を実現させている。ボツリヌス毒素のサブタイプは VAMP, SNAP-25, シンタキシンを特異的に消化し、エクソサイトーシスを阻

害する。神経細胞からの神経伝達物質放出では、神経情報を伝えるインパルス（秒速 0.3~100 m）がシナプス前終末に到着し Ca チャネルが開き、Ca イオンが流入しエクソサイトーシスがトリガーされ、神経伝達物質が放出され、数 10 nm のシナプス間隙を拡散し、シナプス後膜の受容体に結合し、受容体イオンチャネルをオープンさせシナプス電位を発生させて信号を伝達する。Ca イオンの流入から受容体イオンチャネルのオープンまで 0.2 ミリ秒と報告されている。速い放出を実現する機構として、シナプス小胞を Ca チャネル近傍にシンタキシンが繋ぎとめていること、RIM, Munc13 等の働きにより小胞が放出準備状態になること（プライミング）等が挙げられる。

SNARE 蛋白質以外に低分子量 G 蛋白質、Rab3A がエクソサイトーシスに関与している。Rab3A の遺伝子をノックアウト（Rab3A-KO）してもシナプス伝達は生じることから、エクソサイトーシスに必須ではない。しかし、Rab3A-KO 動物では前シナプス性可塑性が阻害されることから、シナプス伝達の修飾因子と考えられる。Rab3A はシナプス小胞の貯蔵プールから放出可能プールへの移送を促進するが、かえって放出確率は低下させる。他の低分子量 G 蛋白質による代償も考えられるので、Rab3A 以外の低分子量 G 蛋白質をも活性化する蛋白質 Rab3GEP の遺伝子ノックアウト（Rab3GEP-KO）動物で、SNARE による機能との相互関係を調べた。胎児より摘出した海馬神経細胞を培養し、シナプス機能を調べたところ、シナプス前終末からのエクソサイトーシスは抑圧されていた。高頻度刺激により、放出可能プールサイズを調べると差はなかったが、放出確率は低下していた。海馬シナプスでは Rab3GEP はドッキングの後、Ca 依存性膜融合より前のステップに関与していると考えられた。SNARE 蛋白質によるドッキング-膜融合の途中の過程を Rab3GEP によって活性化された分子が促進させている修飾作用が明らかになった（文献 1）。

記憶・学習の仕組み：エクソ/エンドサイトーシスによる受容体表面発現の制御

意識にのぼり、言語で陳述できる記憶、および空間的記憶は海馬により短期記憶から長期記憶に書き込まれる。海馬の障害では新たに長期記憶を獲得することが困難になる（前向き記憶障害）。長期記憶が書き込まれる場所は海馬傍回等の大脳皮質と考えられるが、記憶形成の基礎機構として、海馬におけるシナプス伝達長期増強 LTP が注目されてきた。近年、この LTP のメカニズムとして、グルタミン酸受容体のシナプス下膜へのエクソサイトーシ

スによる挿入が提案されている。これにより、シナプスの伝達効率が増強する。即ち、繰り返しシナプス入力を受けている神経細胞では、NMDA型グルタミン酸受容体のMgイオンによる阻害がはずれ、この受容体イオンチャンネルを通してCaイオンが流入する。Ca/Calmodulin依存性蛋白質キナーゼIIの活性化により、AMPA型グルタミン酸受容体1 (GluR1) がエクソサイトーシスによりシナプス膜に挿入される、と考えられている。低分子量G蛋白質の関与も報告されている。

一方、意識に上らない手続き記憶、例えば自転車に乗れるようになる、テニスのサーブがうまく入るようになる、といった運動学習では小脳が中心的な役割を果たしている。小脳の出力細胞、プルキニエ細胞には2つの入力線維がシナプスを形成している。一つのプルキニエ細胞あたり数万本といわれる平行線維シナプスは体全体の筋紡錘や関節器官からの感覚情報、および大脳の運動指令のコピーを伝え、たった1本しかない登上線維シナプスは運動の目標からのズレを伝える、と考えられている。そして登上線維が強く応答している場合、この発火と同時にシナプス入力を受けた平行線維シナプスのAMPA型グルタミン酸受容体 (GluR2) は活性を長期に抑圧される。これをシナプス伝達の長期抑圧 (LTD) と呼び、小脳運動学習の基礎過程と考えられている。近年、この平行線維シナプスの長期抑圧の分子機構として、GluR2のエンドサイトーシスによる内在化が提案されている。筆者等は、常時、GluR2のエンドサイトーシスによる内在化が生じており、常時生じているエクソサイトーシスによる外在化と平衡していること、LTDにおいては表面発現しているGluR2の中で、内在化可能なプールが増加することを見出した。

記憶形成は陳述記憶の場合も手続き記憶の場合も、グルタミン酸受容体表面発現のエクソ/エンドサイトーシスによる制御、として統一的に理解できる。エクソ/エンドサイトーシスは血糖値調節、尿量調節の他に受精時においても本質的な働きをしている。分子機構の理解の上に、エクソ/エンドサイトーシスに関する新たな臨床応用の展望が開けてくるだろう。

文 献

- 1) Yamaguchi K, Tanaka M, Mizoguchi A, Hirata Y, Ishizaki H, Kaneko K, Miyoshi J, and Takai Y. A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small G protein family up-regulates a postdocking step of synaptic exocytosis in central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14536-14541 (2002).

山口 和彦 (理研・脳センター・記憶学習)

プロトンは伝達物質になり得る

感覚神経系において受容野周辺からの側抑制は受けた刺激の輪郭を際立たせ、像や物体の形の認識の上で極めて重要なメカニズムである。視覚系ニューロンは網膜視細胞から外側膝状体のニューロンに至るまで円形で同心円状の受容野を持っている。側抑制によって受容野中心部と周辺部は拮抗した性質を持つ。網膜における側抑制はすでに視細胞レベルで観察されており、水平細胞が錐体視細胞の周辺受容野形成に関与しているという考え方は1970年代から多くの研究者が認めるところであった。

水平細胞は、暗時、視細胞から持続的に放出されるグルタミン酸によって脱分極している。光照射によって視細胞が過分極しグルタミン酸の放出量が減少すると水平細胞は過分極する。水平細胞はギャップ結合によって近隣の水平細胞同士が電気的につながりを持ちシンチチウムを形成している。その受容野はきわめて広い。

水平細胞から視細胞へのフィードバックのメカニズムとして、これまで広く信じられてきたのはGABAを伝達物質とするフィードバック機構である。水平細胞はGABA作動性であるし、脱分極によるGABAの放出、視細胞のシナプス終末に局在するGABA受容体などGABA仮説を支持するデータが数多く提出されている。しかし、錐体視細胞の周辺応答はpicROTOXINを投与してGABAの効果を除去しても見られることから、GABA仮説を批判した報告もあった。GABA仮説に代わる仮説の中で数年前から提唱されたオランダのKammermansらの電界効果仮説は奇抜である。彼らは水平細胞の樹状突起が錐体視細胞のシナプス終末に陥入型のシナプスを形成していることから、周辺部照射によって水平細胞が過分極し、その時、水平細胞の樹状突起先端に流入する電流によって陥入型のシナプスのシナプス間隙の電位は他の細胞外部の電位よりも低く(マイナス)になるであろうと考えた。その結果、錐体視細胞のシナプス終末部の膜電位は相対的に脱分極し、終末部にあるL型カルシウムチャンネルが活性化されてグルタミン酸の放出が増えるというものである。

この研究に強い興味を抱き、イモリ網膜スライス標本を用いて電界効果仮説を追試しようとしたわれわれは、かえってこれを否定することになった。たしかに、錐体視細胞のカルシウム電流は水平細胞を過分極させると増大し、脱分極させると減少するが、この効果は標本を灌流している溶液の緩衝力を高めると消失した。そのため、われわれは錐体視細胞のカルシウム電流は、電界効果ではなく、水平細胞の膜電位によってもたらされたpHの変化によって修飾されていると結論した。周辺部光照射

が水平細胞の膜電位を過分極させ、その結果、陥入型シナプスにおけるシナプス間隙の pH が上がり、錐体視細胞の終末部にある L 型カルシウムチャネルが活性化されてグルタミン酸の放出が増えたものと考えられる。この結果を報告したわれわれの論文は 2003 年 12 月の *Journal of General Physiology* に掲載され、同じ号の巻頭にわれわれの仕事を高く評価した Commentary も掲載された。

振り返ってみると、1960 年代の中頃に、水平細胞はグリアではないかという仮説が提唱された。当時、この仮説は突拍子もないものとして却下されたが、その後の研究により、水平細胞は GABA を合成、貯蔵しているにもかかわらずシナプス小胞としては保有していないこと、GABA の放出は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇とは無関係で、開口分泌ではなく担体によって行われることなど、典型的なニューロンとは非常に異なった振る舞いをする細胞であることが明らかになった。しかも水平細胞は、グリア細胞にも共通する各種のイオンや伝達物質に対する担体を数多く備えている。だからこそ、水平細胞は pH 変化というこれまでわれわれが知らなかった機構を用いて錐体視細胞への信号伝達を行っているのではなかろうか。しかし、シナプス間隙の pH 変化がどのようなメカニズムで水平細胞の膜電位と関係しているのかは不明である。予備的な実験で、水平細胞を網膜から単離し、パッチクランプ法によって膜電位を変えると、表面に接しておいた微小 pH 電極で僅かではあるが pH 変化がキャッチ出来た。このメカニズムを明らかにすべく、研究を続けている。

pH の変化が伝達物質の放出を修飾するという報告はあるが、プロトンが伝達物質として神経の統合機構に関与するというわれわれの発想は、神経伝達を考える上で重要な新しい考え方になるのではないかと期待している。

金子章道

(屋城大学リハビリテーション学部・慶應義塾名誉教授)

ヘモグロビンの遺伝子改変 —呼吸不全の治療法—

厚生省（現 厚労省）特定疾患の呼吸器系疾患調査研究班の中に班長こそ代わっていたが長く呼吸不全調査研究班が存在していた。平成 8 年から 13 年までの 6 年間は初めて評価委員会が導入され、千葉大医学部の栗山教授を班長として組織された。この平成 8 年からの研究では呼吸不全に分子生物学的治療法を導入する研究が立ち上がった。現在呼吸不全研究班は存在していないが、そこでスタートした研究は今軌道に乗り始めている。こ

こではその研究を紹介する。

動脈血酸素分圧が 60 torr 以下に下がり、この状態が 1 ヶ月以上続く場合に慢性呼吸不全と定義されている。慢性呼吸不全では呼吸器の種々の異常により、換気不全が生じ、酸素供給が不十分で、全身の臓器が慢性の低酸素状態におかれている。特に組織低酸素下では細胞内代謝過程の抑制がおり、組織障害がおこってくる。慢性呼吸不全に対しては現在長期在宅酸素療法が最も一般的に行われている。予後改善効果は明らかであり、低酸素血症の改善と組織低酸素症から回避される。しかし常に酸素ポンペを側に用意しておかなければならず、患者の QOL から見るとあまり好ましいものではない。慢性呼吸不全患者の治療の根本は、組織低酸素を防ぐことであり、呼吸器系の異常により酸素取り込みが不十分であっても組織に十分酸素を供給できれば重篤化を防ぐことができる。組織へ酸素を運搬している主体はヘモグロビンであり、研究班の中で東京都老人研の白澤らはアロステリック効果のあがるヘモグロビンを導入した。

ヘモグロビン分子は赤血球中で $\alpha 2 \beta 2$ の 4 量体を形成し、アロステリック効果を持つヘモグロビンは種々の分子進化をとげている。ワニなどは重炭酸に対するアロステリック効果が末梢組織での効率よい酸素供給に貢献し、水中に長く留まることを可能にしている。

ヒトには遺伝子変異により多くの異型ヘモグロビンが存在している。その中には酸素親和性の違いにより酸素解離曲線が左方移動するものと右方移動するものがある。左方移動を示す疾患では多血症が、右方移動する疾患では貧血を伴うことが多い。右方移動する異常ヘモグロビン症の 1 つに Presbyterian 型ヘモグロビン症がある。これは β -グロビン遺伝子に変異が起こっており 4 量体中心部に配向する $\beta 108$ Asn が Lys に変異したことにより中心窩へ Cl^- が囲われ、脱酸素状態で安定化し酸素親和性が低下している。このヘモグロビンを組織への酸素供給が劣っている呼吸不全患者に応用するために、Presbyterian 型変異をマウス β -グロビン遺伝子へ導入したノックインマウスを作成した。このマウスは老人研の白澤らにより作成され、Presbyterian 型マウスと呼ばれる (Suzuki et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 : 869-876, 2002)。

その後いくつかの施設により Presbyterian 型マウスの生理特性がしらべられ、興味深いデータが得られ始めている。最初のデータは Shirasawa et al. (*J. Biol. Chem.* 278 : 5035-5043, 2003) に掲載された。Heterozygous 型の Presbyterian 型マウスの赤血球では酸素解離曲線が wild 型由来の赤血球にくらべ右方変異していた。P50 は 43.5 mmHg から 47.0 mmHg へと

変化しており、確かに β -グロビン遺伝子の変異型導入の効果がでていた。我々のところではこのマウスでは末梢組織への酸素供給が勝っているかどうかをまず調べた。Presbyterian型マウスでは吸入酸素濃度15%の軽度の低酸素下では骨格筋における組織酸素分圧がwild typeに比べ有意に上昇していた。また、酸素消費量も有意に高く、Presbyterian型マウスでの組織への酸素供給の優位性が示され、酸素供給が不十分な患者への応用が期待される結果が得られた。京都大学の石原らはPresbyterian型マウスでの骨格筋の筋線維タイプを調べた。そのマウスでは酸化系酵素の豊富なIIAタイプ線維が増加しており、酸化系酵素活性の指標となるSDH活性もあがっていた。Presbyterian型マウスはwild型に比べ、遅筋線維が増加し、有酸素運動に優れていることが推測された。実際、これらの動物は普段の運動量もwild型に比べるとはるかに多い。

これらの研究データは組織だったプロジェクト研究として前述したJBC(2003)に掲載された。その後、呼吸機能の面から見た論文をAm. J. Physiol. (The affinity of hemoglobin for oxygen affects ventilatory responses in mutant mice with Presbyterian hemoglobinopathy. Izumizaki et al., Am. J. Physiol. 285: 747-753, 2003)に掲載した。この論文は呼吸調節に関して、Presbyterian型マウスを調べたものであるが、呼吸生理学的に興味深いもので、Journalのeditorial focusのコーナーで紹介された。呼吸を専門にしていなくても、呼吸調節が動脈血中のガス分圧を化学受容器が感知して行われていることに疑いはもたれないと思う。確かに、動脈血ガス分圧の変化と呼吸運動は相関しており、動脈血ガス分圧と換気量の関係を示した論文は数限りなくある。しかし、組織酸素レベルが呼吸調節にかかわることはまったく知られていないし、低酸素血症により引き起こされる呼吸刺激が組織酸素の変化によるかどうかも確かではない。組織酸素量はHbの酸素親和性に大きく左右される。この点から、Presbyterian型マウスのように酸素親和性の低下するHbを有するマウスは動脈血酸素分圧を変えずに組織酸素量を変えることができるため、組織酸素の呼吸調節に及ぼす効果を調べるモデル動物になりえる。前述したAJPの論文では低酸素負荷に対する換気応答がPresbyterian型マウスでは減弱していることを示した。普通、低酸素にさらされると、最初は換気亢進、その後抑制という2相性の変化を示す。その最初の換気亢進は頸動脈小体を中心とした末梢化学受容器からの求心性活動の興奮が呼吸運動中枢の活動を高めることにより起こる。15%の低酸素を吸入させた場合、PaO₂に違いがないのに、

Presbyterian型マウスでは低酸素換気応答が低いのである。長期間組織酸素供給が高まっていたことによる環境順応の結果と思われるが、これまでは長期間の低酸素負荷により起こる換気の新環境順応(ventilatory acclimatization to hypoxia: VAH)はよく知られているが、動脈血酸素分圧が変わることなく、組織酸素供給が変わるモデルはこのPresbyterian型マウスがはじめてである。VAHでは低酸素に対する換気応答が高まるが、それは組織の低酸素状態を補うためと考えられている。この換気亢進は頸動脈小体の酸素感受性の変化によるといわれている。Presbyterian型マウスでは頸動脈小体の酸素感受性を調べる、いわゆるDejour's testはwild型マウスと違いがない。Presbyterian型マウスの低酸素換気応答の低下は中枢レベルで生じている可能性が高い。最近、NOやCOなどのガス分子が神経系での化学的メッセンジャーとして注目されている。呼吸調節に関しても中枢で化学受容を末梢から受けるニューロンへ直接働きかけていることが示されている。HemeがHeme-oxygenaseにより酸素を取り入れBiliverdinに変化するときCOが生まれ、このCOも低酸素換気応答に関与している、といわれている。Heterozygous型のPresbyterian型マウスでは認められないが、Homozygous型マウスでは溶血性貧血を伴う。Hemolysisがより多くのCOを産生する可能性もある。

Presbyterian型マウスでは高炭酸ガス換気応答も低い。長期に組織酸素供給が高まったときの中枢の変化は基礎的にさらに研究していく必要がある。将来の臨床への応用としては15%程度の吸入酸素濃度下では換気応答が低いにもかかわらず、酸素消費量は高い。より多くの酸素を使うことが可能であり、COPD患者あるいは虚血性疾患の患者での有効な治療法になることが期待される。

本間生夫(昭和大学医学部 第二生理学教室)

地域医療支援病院

小泉内閣による「聖域なき構造改革」「骨太の構造改革」の一環として、医療分野においても「医療も聖域にあらざ」「医療経済も国家経済に連動する」という基本認識のもとに、国策として「医療制度改革」推進の方向性が打ち出された。

厚生労働省は「医療制度改革の課題と視点」の中で、①国家経済の低迷に加えて少子高齢化社会を迎えての、将来的な国民負担の抑制を視野に入れた医療費の抑制政策、②皆保険制度維持のための各種健康保険制度の財政政策、③同時に医療の質の向上、効率的医療提供体制を

含めた総合的医療政策を示している。本年4月に同省が提示した「医療提供体制の改革のビジョン案」においては、①患者の視点の尊重、②質が高く効率的な医療の提供、③医療の基盤整備を3本柱とし、病床区分と機能分化、地域医療連携による医療機関の機能分化・重点化・効率化を謳っている。またグローバルスタンダードに比した我が国の過剰な対人口比急性期病床数、長すぎる平均在院日数の是正も目標とされている。

一方、平成9年の第3次医療法改正において「地域医療支援病院」制度が制定され、同時に従来の「総合病院」制度が廃止された。これによって医療法における病院規格は、特定機能病院、地域医療支援病院、一般病院の3種類に集約されることとなった。「地域医療支援病院」は、従来の病院完結型医療から地域完結型医療への転換の政策的誘導の象徴であり、地域の中核病院として医療法上認知された病院と位置づけられるのと同時に、診療報酬上の特典も付与されている。

「地域医療支援病院」の趣旨は「医療施設機能の体系化の一環として、紹介患者に対する医療提供、医療機器等の共同利用の実施等を通じてかかりつけ医、かかりつけ歯科医等を支援する」病院とされ、地域医療計画による二次医療圏に1施設の設置が原則とされた。

「地域医療支援病院」の主な承認要件としては、原則として病床数200床以上であること、紹介率が60%以上で2年以内に80%とすること、登録制度に基づき医療機器・病床の共同利用を行うこと、救急医療の提供、地域の医療従事者に対する研修を行うこと、承認後は院外委員による諮問委員会による審議を継続することなどが挙げられている。

地域の中核的役割を担ってきた病院はどこでも、地域の医師会との研究会や紹介の推進を病診連携の名のもとに実践してきたところである。また、診療報酬上の施設基準による急性期加算、地域医療支援病院加算、急性期特定加算の病院経営に与える利点も認識している。しかし、施設基準に必要な平均在院日数、紹介率、外来患者数を規定域に達成させることは、各病院のそれぞれの事情により困難であるとの認識が実情であった。

冒頭に述べたように医療を取り巻く諸環境は大きく変化しようとしており、病院経営基盤の確立のためには、良質な医療を提供することに専念してきた従来の認識を改め、これらの要因に対しても積極的に取り組むことが迫られる時代を迎えている。

そこで、相模原協同病院における「地域医療支援病院」承認に向けた経緯を紹介したい。

相模原協同病院は昭和20年に開設され、伊勢原協同病院とともにJA組織である神奈川県厚生連を経営母体

とする公的病院で、東京都の町田市や八王子市と接する神奈川県北部の相模原市に位置する21診療科、職員数779人（医師74名）を擁する506床の病院である。神奈川県地域医療計画では県北二次医療圏に属し、医療圏内の人口は70万人、医療圏内には北里大学があるが500床以上の病院は当院のほかに1病院しかない。

平成12年4月、地域の診療所との紹介・逆紹介の窓口として「病診連携室」を開設した。平成13年10月、医師会との合同開催による「地域医療連携フォーラム」を発足させた。同年12月、一般病院紹介率の3ヶ月連続30%を達成し「急性期加算」を取得した。と同時に「地域医療支援病院」を現実的な目標とする気運が院内に醸成され、平成14年6月に「病診連携室」を拡大改組して「地域医療連携室」とし、「地域医療支援病院プロジェクト」をスタートさせた。承認要件の確認、既承認病院への問い合わせや調査を踏まえ、当初の承認目標を平成16年4月に設定した。地域の医師会との協議・承認を得て登録制度を開始し、地域医療機関従事者に対する研修会を充実させる中で、地域医療支援病院紹介率が目標より早期に60%に達成する見込みとなったため、承認目標を平成15年9月に繰上げ、平成14年12月から相模原市保健所との事前協議を開始した。保健所からは、紹介率計算式の各項目の詳細な定義の確認、地元医師会との協議内容や承認後2年以内の紹介率80%達成計画の内容チェック、病院施設の視察などを通じてきめ細かい指示が示され事前協議が続いた。保健所から指示された地域歯科医師会との協議と研修会を開催し、平成14年度の年間平均紹介率が辛うじて60.7%に達したため、平成15年7月に承認申請書を提出した。

その結果、同年9月に開催された神奈川県医療審議会において承認され、10月24日に正式承認証が交付された。神奈川県では藤沢市民病院に次いで2番目（当院と同時に済生会横浜市南部病院と平塚共済病院が承認された）、全国では50数番目（うち28病院は医師会病院）の「地域医療支援病院」である。

平成15年4月から9月までの紹介率は71.9%とほぼ計画通りに推移しているが、今後2年間に80%を達成させねばならない。そのためにも、地域の医療機関との共生による連携医療を徹底させることが肝要である。医療機関相互の密な情報交換、地域医療連携室の充実、図書室や研修室の地域への開放とともに、地域の求めに応じた診療科のあり方、救急医療にどれだけ力を傾注できるかが課題であると認識している。その先においては、次の目標である急性期特定加算に向かわなければならないと考えている。

来年度予算編成に向けて財務省は、毎年1兆円ずつ

増加し年間31兆円に達した国民医療費に対する抑制として、平成14年の史上初のマイナス診療報酬改定(2.7%)に引き続き、平成16年は4~5%の引き下げ要求を明らかにしている。医療環境はますます厳しくなる一方であるが、職員の待遇を確保するためにも、医師に

あっても従来から脱却した認識をもって病院経営に積極的に参画する姿勢が問われている。

大蔵幹彦 (相模原協同病院)

雜 報

慶應医学会例会第 1338 回

日時 平成 15 年 12 月 12 日(金) 午後 5 時 30 分
場所 新教育研究棟 講堂 1
演題 BAFF and peripheral B cell tolerance
演者 David Nemazee, PhD
Professor, Department of Immunology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
担当 微生物学・免疫学教室

慶應医学会例会第 1339 回

日時 平成 15 年 12 月 22 日(月) 午後 6 時 30 分
場所 別館 3 階 第 2 会議室
演題 Clinical application of recombinant human BMPs : early experience and future development
演者 Thomas A Einhorn, MD
Professor and Chairman, Department of Orthopaedic Surgery, Boston University School of Medicine, Chief, Orthopaedic Surgery Boston Medical Center, Boston, MA, USA
担当 整形外科学教室

慶應医学会例会第 1340 回

日時 平成 16 年 1 月 6 日(火) 午後 6 時
場所 新棟 11 階中会議室
演題 幹細胞生物学と組織工学の融合による心筋再生の展開
演者 福田 恵一先生
慶應義塾大学医学部サントリー寄附講座, 心臓病先進治療学講師
担当 内科学教室

慶應医学会例会第 1341 回

日時 平成 16 年 1 月 7 日(水) 午後 6 時
場所 新棟 11 階中会議室
演題 細胞分裂制御の分子機構とその異常によってもたらされる形質変化
演者 佐谷 秀行先生
熊本大学医学部, 腫瘍医学教授
担当 内科学教室

慶應医学会例会第 1342 回

日時 平成 16 年 2 月 3 日(火) 午後 12 時 00 分
場所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ
演題 New approaches to pediatric brain tumors : development of a target therapy against the Shh pathway in a mouse model of medulloblastoma
演者 Tom Curran, PhD
Member and Chairman, Developmental Neurobiology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA
担当 生理学教室

慶應医学会例会第 1343 回

日時 平成 16 年 1 月 28 日(水) 午後 5 時 30 分
場所 第一会議室(北里記念医学図書館 2 階)
演題 Billroth, Mikulicz and surgery in Wroclaw Medical University
演者 Professor Wojciech Kielan
2nd Department of General and Oncological Surgery, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland
担当 外科学教室

慶應医学会例会第 1344 回

日時 平成 16 年 2 月 10 日(火) 午後 5 時
場所 総合医科学研究棟 1 F ラウンジ
演題 The power of marine genomics
演者 Werner E G Muller, PhD
Professor, Institute of Physiological Chemistry University of Mainz, Mainz, Germany
担当 分子生物学教室

慶應医学会例会第 1345 回

日時 平成 16 年 2 月 10 日(火) 午後 6 時 30 分
場所 新教育研究棟 2 階
演題 Plasticity of the brain in health and disease
演者 Barbro B Johansson, MD, PhD
Professor, Division for Experimental Neurology, Wallenberg Neuroscience Center, University Hospital, Lund, Sweden
担当 内科学教室

慶應医学会例会第 1346 回

日 時 平成 16 年 2 月 11 日(水) 午後 1 時
場 所 新棟大会議室
演 題 Preliminary results of de-novo-bone formation
by peptidomimetic receptor engineering and
genetic screening
演 者 Dr. Dr. Andreas H. Valentin
Visiting professor, Nippon Dental University,
Dental Implant Research Center, Niigata, Japan
担 当 歯科・口腔外科学教室

『慶應医学』投稿規定

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

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

論文の受付

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

原稿はオリジナルとコピーを一部ずつ下記あてに届けて下さい。

〒160-0016

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

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9：00～午後 5：00

(土曜日は受付をしません)

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

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

論文原稿の作成上の注意

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

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

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT） 英語での表示とする。

1) 読者が一読して論文の主旨が明確にわかるもの。

2) 150 語ないし 200 語以内にまとめる。

3) ダブルスペースで A4 判の用紙にタイプする。

4) 題名にすでに表記されているものを最初の文章で繰り返さないこと。

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

6) 数字が文頭にある場合はスペルアウトし、文中ではアラビア数字を用いる。

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

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

略語は各分野を通じて周知のもの以外は使わない。

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

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

9. 見出しの振り方（参照例）

研究成績

1. 臨床的事項

1) 頻度

- a)
 (1).....
 (i).....

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

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

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

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

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

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

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

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

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

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

20. その他 詳細に関しては事務局に問い合わせ下さい。(2003年1月)

「学位申請論文」投稿の手引き

「学位申請論文」について

「学位申請論文」は、「慶應医学」に掲載された Thesis である。学位を取得する目的で Thesis を提出することは国内外を問わず広く行われている。「慶應医学」では、従来の「原著」論文に Thesis 的要素を入れた論文を「学位申請論文」として掲載することにより、学位取得のための論文に関し、申請者の便宜をはかった。「学位申請論文」の設置に伴い、「原著」論文は学位取得をかならずしも目的とせず、むしろ一般的な原著論文として取り扱われる。「学位申請論文」は日本語を原則とするが英語での投稿も受付ける（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、かつ版權に関する許可を出版社より得たものに限る。出版社に転載許可を求める書式は編集部へ申請されたい。これらの場合（印刷中、印刷済み）には、当該論文の一部あるいは全部が、学位申請者の学位申請論文として使用されることにつき、共著者の承認が必要である。この書式も編集部へ申請されたい。ただし、学位申請者がファーストオーサーでない場合には、学位申請者がその論文の主たる貢献者であることを証明する共著者の署名も必要である。これらの書類への記入はできる限り手書きを避けること。

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

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

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

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

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

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

なお、ご不明の点については事務局に問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

編集後記

こういふことは、「慶應医学」のそもそもの成り立ち、
発刊当時の理念を調べてから論ずるべきこととは思ふが、
今回はとりあへずの感想を述べさせていただきます。

「慶應医学」は、読みやすくなったと思う。

背景には、学位審査制度の改革があることは明らかである。その結果として、「特定の読者のみを想定した論文」が減り、「一般読者を想定した論文」が増えた。

これまでの「慶應医学」は、発行部数は多くても、いわゆる「読まれ率」は低かったと思う。内容の変革に伴い、「読まれ率」の向上を、一編者として期待したい。

(村松太郎)

編集委員 (◎副会長, ○理事)

◎相磯貞和 ○池田康夫 ○小口芳久 ○石川博通
饗庭了 上田政和 梅澤明弘 鹿島晴雄
斎藤英胤 林松彦 村田満 村松太郎

平成16年3月19日 印刷

平成16年3月25日 発行

編集者 北島政樹

発行者

印刷所 学術図書出版株式会社

電話 (3948) 7516 番

印刷者 富田進

発行所 慶應医学会

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

慶應義塾大学医学部企画室

電話(3353)1211(大代)内線62766

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写したい方は、(社)日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の従業員以外は、図書館も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。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。

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル 学術著作権協会

TEL: 03-3475-5618 FAX: 03-3475-5619 E-mail: naka-atsu@muj.biglobe.ne.jp

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

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 copyright 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81巻第1号別頁
平成 16 年 3 月 25 日

学位論文

慶 應 医 学 会

学位論文

体腔内凝血の凝固線溶系に及ぼす影響と
再出血発現機序に関する検討

慶應義塾大学医学部外科学教室
(指導：北島政樹教授)

やまもと ひたか
山本 裕

(平成14年2月1日受付)

Key Word: body cavity coagula, re-bleeding, fibrinolytic activity

外傷による臓器損傷症例や、外科手術症例の患者管理に際しては、再出血は治療成績ならびに予後を左右する重要な病態の一つである。鈍的外傷による臓器損傷の初療において、近年、画像検査の進歩に伴い損傷程度がよりの確に把握されるようになり¹⁻⁷⁾、手術を施行せず臓器を温存し、保存的に経過を観察する症例が増えてきている⁸⁻¹²⁾。特に、保存療法の適応と診断された症例において再出血を来した場合には、それが高度であれば生命の危機に瀕することもある¹³⁻¹⁷⁾。

著者は、外傷や術後に再出血を来した自験例を検討した結果、再出血時、凝固能が正常に維持されているにもかかわらず、線溶系に異常を示す症例があり、それらの症例に共通した臨床像として再出血前より体腔内に多量の凝血が貯留していたことを見出した¹⁸⁾。これらの臨床所見から、再出血発現機序の解明を目的として、体腔内凝血の存在と凝固・線溶系の変動に関する臨床的検討とそれを裏付けるために実験的検討を行った。

対象および方法

1. 臨床的検討

慶應義塾大学病院において入院加療しインフォームドコンセントを得た鈍的外傷患者を対象として、凝固線溶系の変動を検討した。さらに、臓器損傷の有無、体腔内凝血の存在の有無と凝固線溶系の変動の差異、ならびに再出血との関連についても検討した。対象症例にDIC (disseminated intravascular coagulopathy) の診断

基準をみたまものではなく、抗凝固剤や抗線溶剤の投与例はなかった。

1) 鈍的外傷例は25例で、年齢7歳から72歳 (Mean±SD=30.8±17.8)、男性18例、女性7例であり、体腔内に出血を認めた16例(A群)と出血を認めなかった9例(B群)の2群とに分類した。外傷重症度は、症例ごとに来院時における外傷の程度を身体6区域についてAbbreviated Injury Score (AIS)¹⁹⁾で点数化し、Injury Severity Score (ISS)²⁰⁾を算出して評価した。A群の損傷臓器は、肝5、脾4、腎3、膀胱1、肝+脾2、肝+腎1、血胸3例でISSは11±4であった。B群は多発骨折5、全身打撲4例でISSは12±8であった(第1表)。

A、B両群において、来院直後より経時的(1~7、14、21病日)に静脈血を採取し、以下に記述する項目を測定した。胸腹部単純X線写真(以下XPと略す)、computed tomography(以下CTと略す)、ultrasonography(以下USと略す)、magnetic resonance imaging(以下MRIと略す)、angiography(以下Angioと略す)などの画像診断法を用い、損傷臓器の変化と体腔内凝血の推移を観察した。

臨床研究における検査項目と測定方法は以下の通りである。

白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、血色素量(Hb)、ヘマトクリット(Ht)、血小板数(Plt)、プロトロンビン時間(PT: Quick一段法)、活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)、アンチトロンビンIII

本論文は、Yamamoto Y, Wakabayashi G, Ando N, Aikawa N, Kitajima M: Increased fibrinolytic activity and body cavity coagula. Surg Today 30: 778-784, 2000の一部を含む。

第1表 鈍的外傷患者25例の特性。体腔内に出血を認めた16例の損傷臓器は肝、脾、腎、膀胱で、ISSは11±4、出血を認めなかった9例のISSは12±8であった。ISS：injury severity score

| 氏名 | 年齢 | 性 | 損傷臓器 | 合併損傷 | 体腔内出血 | ISS |
|--------|----|---|------|-------------------|-------|-----|
| 1 N.M | 38 | ♂ | 肝・脾 | | + | 13 |
| 2 N.T | 34 | ♀ | 脾 | 肋骨骨折 | + | 10 |
| 3 S.K | 25 | ♂ | 肝・脾 | 血気胸, 肋骨骨折, 左膝関節脱臼 | + | 23 |
| 4 N.T | 17 | ♂ | 右腎破裂 | 左橈骨骨折 | + | 13 |
| 5 Y.H | 7 | ♂ | 肝 | | + | 4 |
| 6 M.K | 7 | ♂ | 脾 | | + | 4 |
| 7 H.C | 52 | ♀ | 肝 | 気胸, 肋骨骨折 | + | 13 |
| 8 N.I | 16 | ♀ | 右腎 | クモ膜下出血 | + | 13 |
| 9 O.K | 36 | ♂ | 肝 | | + | 9 |
| 10 N.N | 19 | ♂ | 肝 | 胆汁性嚢胞 | + | 9 |
| 11 T.H | 46 | ♂ | 肝 | 肋骨骨折 | + | 18 |
| 12 S.K | 17 | ♀ | 脾 | | + | 9 |
| 13 S.T | 19 | ♂ | 右腎 | | + | 9 |
| 14 W.K | 15 | ♂ | 脾 | 肋骨骨折 | + | 13 |
| 15 A.M | 23 | ♀ | 膀胱 | | + | 9 |
| 16 K.A | 19 | ♂ | 右腎・肝 | | + | 13 |
| 1 N.K | 22 | ♂ | 多発骨折 | 腹部打撲, 左耳介損傷 | - | 10 |
| 2 H.M | 17 | ♀ | 全身打撲 | 意識消失>24時間 | - | 29 |
| 3 H.Y | 49 | ♂ | 多発骨折 | 頭蓋骨骨折 | - | 20 |
| 4 H.S | 60 | ♂ | 多発骨折 | 尿道損傷 | - | 8 |
| 5 T.K | 72 | ♀ | 多発骨折 | | - | 9 |
| 6 M.K | 44 | ♂ | 全身打撲 | 頭蓋骨骨折 | - | 17 |
| 7 S.K | 25 | ♂ | 全身打撲 | | - | 5 |
| 8 S.H | 25 | ♂ | 全身打撲 | | - | 5 |
| 9 I.K | 56 | ♂ | 多発骨折 | | - | 9 |

(AT III：比色定量法)、フィブリノーゲン (Fbg：トロロンビン法)、fibrinopeptide A (FPA：ELISA法)^{21,22)}、thrombin antithrombin III complex (TAT：EIA法)、fibrin and fibrinogen degradation products (FDP：latex凝集法)、FDP-E分画 (latex凝集法)、FDPdimer (ELISA法)、プラスミノーゲン (Plg：発色性合成基質法)、alpha 2 plasmin inhibitor (α2PI：発色性合成基質法)、alpha 2 plasmin inhibitor・plasmin complex (PIC：EIA法)、fibrinopeptide Bβ15-42 (FPBβ15-42：RIA.PEG法)^{23,24)}。

Plg, α2PI, PIC²⁵⁾、TAT^{26,27)}の測定には3.8%クエン酸0.2ml入りの容器に全血1.8mlを採取、FPA、FPBβ15-42、FDPDdimerの測定には、ヘパリン500 I.U./ml、アプロチニン10,000 K.I.U./ml、計0.4ml入りの容器に全血1.6mlを採取、FDP, FDP (E)^{28,29)}はトロロンビン20 unit、トラジロール1000 unit入りの容器に全血2mlを採取した。antidiuretic hormone (ADH)の測定には、EDTA2 Na10.5 mg入りの容器に全血7 mlを入れ、直ちに転倒混和を頻回に繰り返した。FPA、

FPBβ15-42、FDP (E)の専用容器は採血前後に氷冷保存し、0℃、3000回転で15分間遠沈後、分離された血清を-20℃で凍結保存した。

採血部位は原則として肘静脈とし、駆血後速やかにtwo syringe methodで検体を処理した。採血より遠沈開始までの操作は2分間以内に終了した。

2. 実験的検討

本実験は慶應義塾大学医学部実験動物委員会ガイドラインに準拠し、施行した。

1) 腹腔内凝血が雑種成犬の凝固・線溶系および再出血におよぼす影響

雑種成犬 (体重15±3 kg) 6頭を用い、pentobarbital (20 mg/kg) 静注麻酔下に大腿静脈より200 ml採血後、a) 腹腔内に自家血または同量の生理食塩水を注入し、両群の凝固線溶系の変動を観察した。b) 肝または脾の末梢実質を円刃で約5 cm切開し、圧迫による止血後、腹腔内に自家血を注入し、凝固線溶系の指標を経時的に測定するとともに再出血の有無を観察した。血液

学的検査項目は、血小板数 (Pit)、プロトロンビン時間 (PT: Quick 一段法)、活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、アンチトロンビン III (ATIII: 比色定量法)、フィブリノーゲン (Fbg: トロンビン法)、fibrin and fibrinogen degradation products (FDP: Latex 凝集法)、プラスミノゲン (Plg: 発色性合成基質法)、alpha 2 plasmin inhibitor (α 2PI: 発色性合成基質法) とした。

全例に術中乳酸加リンゲル液の輸液を施行し、cefalothin sodium 1 g を点滴静注した。

2) ラット腹腔内凝血が再出血および生存率におよぼす影響

体重 200 g~250 g の雄性 Wistar 系ラット (日本クレア, 東京) を用い、エーテル麻酔下で以下の検討を行った。腹腔内に他家血 20 ml を注入しこれを I 群 (n=10) とした。他家血は、開腹後下大静脈に 25 G 針を穿刺し、デイスボザブルシリンジで 20 ml 採取し、直後に実験対象ラットに注入した。同量の生理食塩水を注入した II 群 (n=10) とで、走行の異なる尾静脈を各々 3 カ所尖刃刀で切開し、圧迫止血後、同部からの再出血の有無を観察した。同時に生存率を検討した。

3) 腹腔内凝血がラットの大網、肺、脳、肝、脾、腎の線溶活性におよぼす影響の検討

標準フィブリン平板上にラットから採取した大網を置き、線溶活性の有無を観察した。次に、上記と同様に作製した I, II 群で、生食または血液注入後 4 日目に、10 mg の大網を採取しその線溶活性を標準フィブリン平板法³⁰⁻³²⁾で測定し、溶解窓で表された線溶活性を比較検討した (n=12)。大網は胃・横行結腸附着部の前下方、最遠位端より採取した。

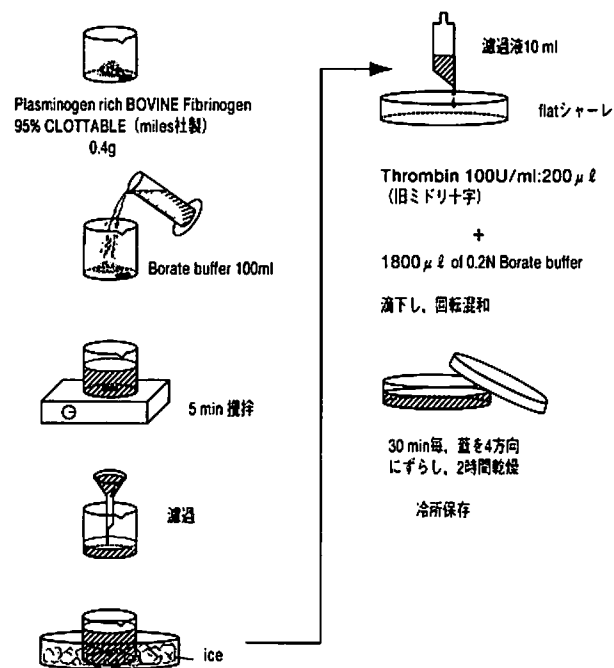
また同様に作製した I, II 群で、生食または血液注入後 2 時間毎に 26 時間まで屠殺し、10 mg の肝、脾、腎、脳、肺を採取しその線溶活性を標準フィブリン平板法で測定した (n=28)。

著者のフィブリン平板作製法を第 1 図に示す。検体を置いたシャーレを 37 °C の恒温槽中に 18 時間静置後、形成されたフィブリン平板の円形溶解窓の長・短径をイムノビューアで測定し、その積を溶解面積とし、線溶活性の指標とした。

3. 統計処理

各測定値はすべて平均値±標準偏差で示した。

臨床的検討における統計上の有意差検定には、群と経過時間を要因とする分散分析 (Repeated ANOVA) を用いた。各測定時点による有意差の有無を検定し、有意



第 1 図 フィブリン平板作製法: plasminogen rich Fibrinogen (Miles 社; Kankakee, IL, USA) 0.4 g に borate buffer 100 ml を加え攪拌し、濾過後氷冷。濾過液をシャーレに移し、Thrombin (旧ミドリ十字) 100 u/ml 200 u に 0.2 規定の Borate buffer 1800 u を滴下し、十分に混和した後静置。24 時間乾燥した後、使用直前まで冷所保存した。Borate buffer は(1)液 {0.05 M Na₂B₄O₇·10H₂O (19.1 g/1000 ml of H₂O)} と (2)液 {0.2 M H₃BO₃+0.5M NaCl (H₃BO₃12.4 g+NaCl 2.92 g/1000 ml of H₂O)} を 2:8 で混和し、pH メーターで pH7.8 に調整して作製した。

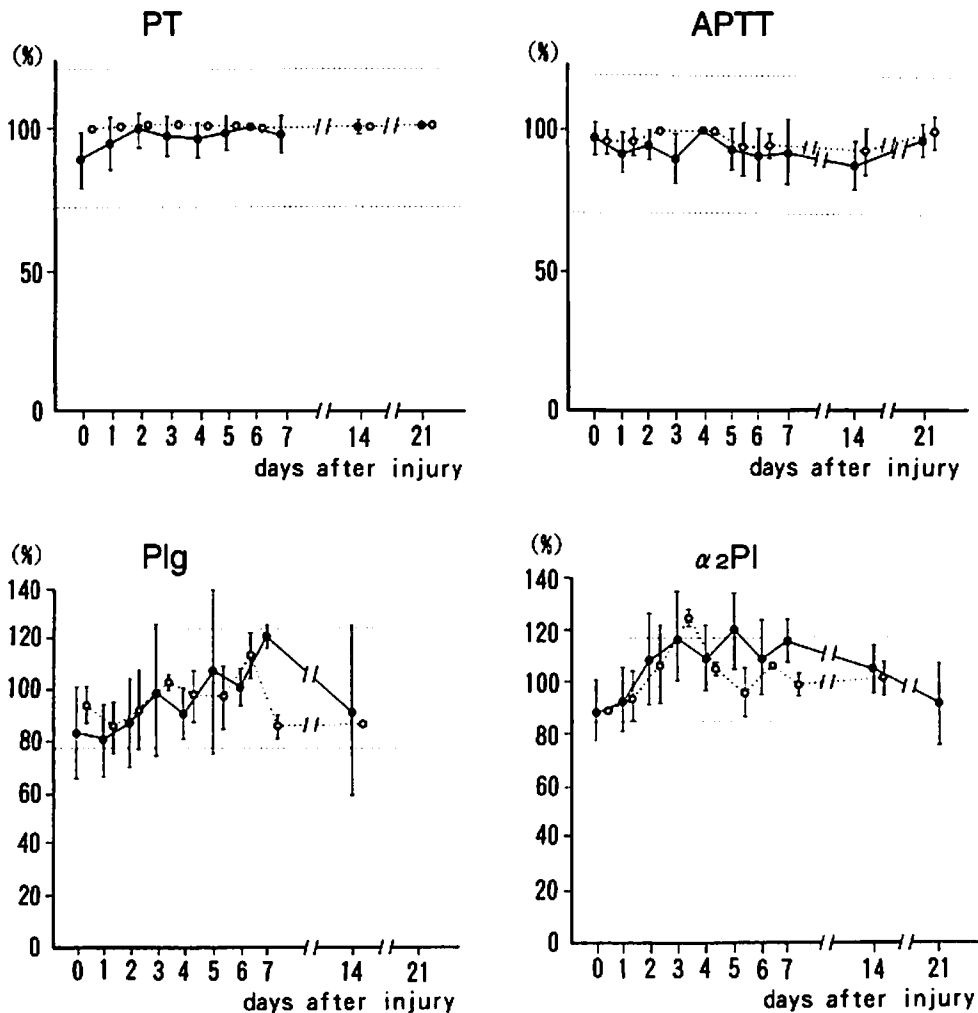
な場合に測定時点における群間の差を多重比較 (Dannett 法) で行った。p<0.05 をもって統計学的有意差ありとした。

実験的検討における統計上の有意差検定は、各時点における群間比較を t-test で行った。p<0.05 をもって統計学的有意差ありとした。

結 果

1. 臨床的検討

鈍的外傷における体腔内出血の有無による血小板数は、AB 両群ともに受傷後 3 日間、正常域下限まで減少したが、5 日目までに前値に復し以後漸増した。PT, APTT, AT III は正常域内の変動で両群間に差は認めなかった。Plg は両群ともに正常域内の変動であったが、A 群は 7 日目に B 群より有意 (p<0.05) に高値であった。 α 2PI

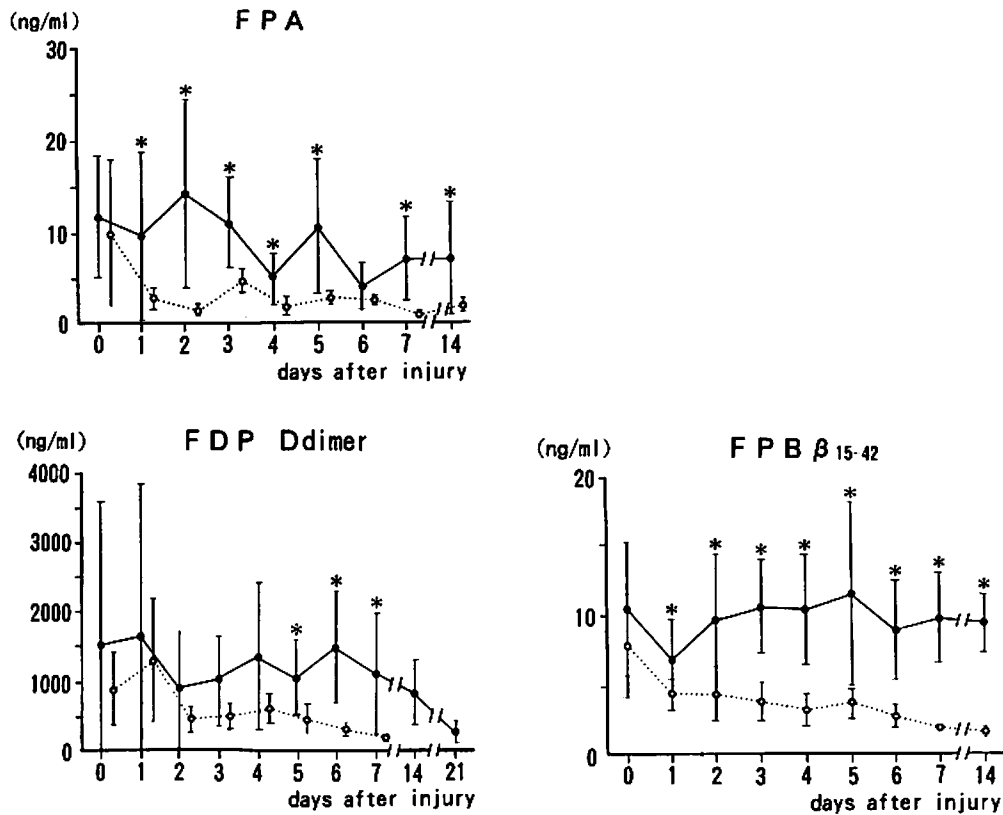


第2図 純的外傷後のPT, APTT, Plg, α_2 PIの経時的変化。—●— (A群), 体腔内凝血(+); -○- (B群), 体腔内凝血(-). Bar, Mean \pm SD. * p <0.05. 図中の波線は正常範囲を示す。PT, APTTは正常域内の変動で両群に差は認めなかった。Plgは7日目に、 α_2 PIは5日目と7日目にA群がB群に比較して有意(p <0.05)に高値を示した。

は、両群とも受傷2日後より漸増し、B群で3日目より、A群で5日目より減少した。5日目と7日目にA群はB群より有意(p <0.05)に高値であったが、ともに正常域内の変動であった(第2図)。FPAは受傷直後、A群 11.9 ± 6.3 ng/ml, B群 9.7 ± 1.1 ng/mlと両群共に高値を示した。B群は受傷1日後に正常域(2.0 ng/ml以下)に復したが、A群は5日後までB群に比し有意(p <0.05)に高値が持続した。A群は21病日に正常域に復した。FPB β_{15-42} は、受傷直後は両群ともに高値を示したが、B群は1日目までに正常域(0.7~4.8 ng/ml)まで減少し、A群では14日以降まで受傷直後(10.4 ± 4.8 ng/ml)と同程度の、B群に比し

有意(p <0.05)に高い値が続いた。FDPDdimerは、A群で受傷直後の高値が14日後まで持続しB群は3日目までに正常域(150 ng/ml以下)に減少した。5日後から7日後までの高値はB群に比較して有意(p <0.05)であった(第3図)。

なお、対象症例の肝機能検査値は、肝損傷例を含めて GOT 56.0 ± 20.8 IU/L, GPT 35.5 ± 21.2 IU/L, T.Bil 0.3 ± 0.2 mg/dl, PT $96.3 \pm 8.9\%$ であった。動脈血液ガスのPH, PCO₂, PO₂, 酸塩基平衡は高度の血気胸1症例を除き正常範囲内であった。またADHの測定値に両群間で有意差は認めなかった。

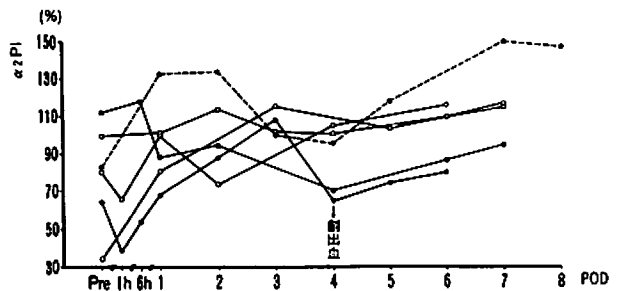


第3図 純的外傷後のFPA, FPBβ15-42, FDPDdimerの経時的変化。-●- (A群), 体腔内凝血(+); -○- (B群), 体腔内凝血(-)。Bar, Mean±SD. *p<0.05. 図中の波線は正常範囲を示す。FPAは受傷直後、両群共に高値を示した。A群は5日後までB群に比し有意(p<0.05)に高値が持続し、受傷21日後に正常値に復した。FPBβ15-42は、受傷直後B群は高値だったが、1日目に正常域(0.7~4.8 ng/ml)まで減少した。A群では14日目以降まで、B群に比し有意(p<0.05)な高値が続いた。FDPDdimerは、A群で受傷直後の高値が14日まで持続し、B群は2日目に正常域に減少した。(Yamamoto Y et al : Surg Today 30 : 776-784, 2000 の Fig. 1 より許可を得て転載)

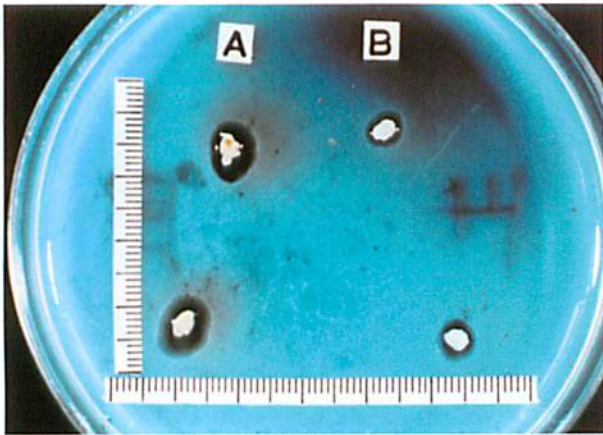
2. 実験的検討

1) 雑種成犬における再出血

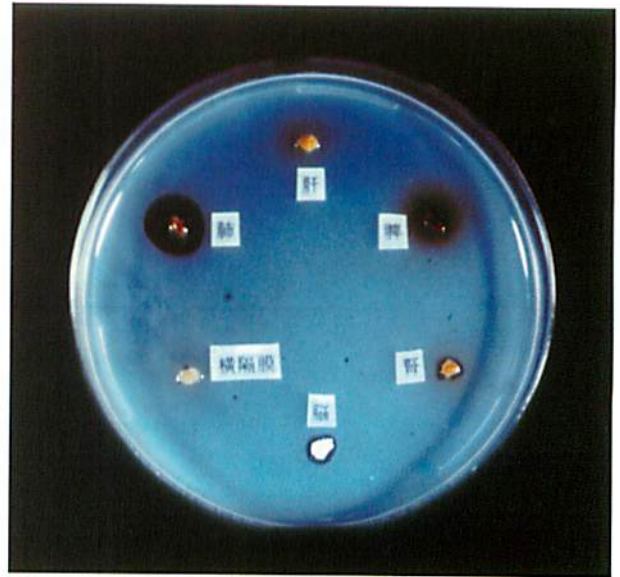
脱血後、自家血を腹腔内に注入した1頭において、術後4日目に腹部正中創より出血を認め、7日目に死亡した。この雑種成犬におけるα2PIは、前値63%から1時間後には、37%に減少し、以後漸増したが、出血の認められた4日目には、108%から65%に低下した(第4図)。血小板数, PT, APTT, AT IIIなどの凝固系の検査値はすべて正常域内にあった。死亡した雑種成犬の病理解剖では、肝, 脾などに鬱血所見が認められたが、ほかに特記すべき所見は認めなかった。なお実験に先立ち、雑種成犬にSwan-Ganzカテーテルを挿入し、循環血液量の20%の脱血が呼吸・循環動態におよぼす影響を検討したが、線溶能に影響する低酸素血症やショッ



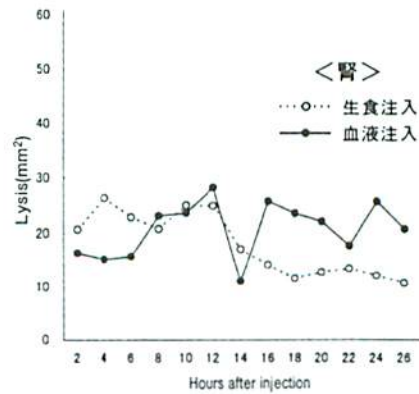
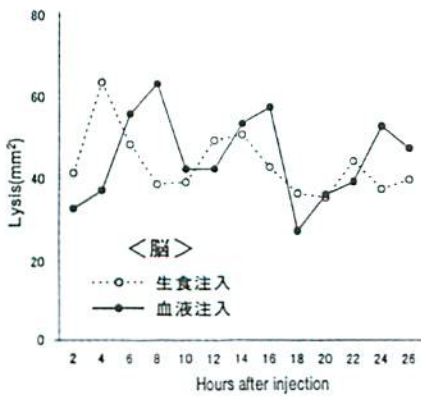
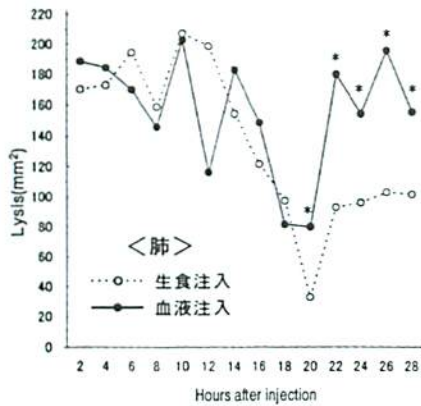
第4図 雑種成犬におけるα2PIの変動と再出血。脱血後、腹腔内に自家血を注入した1頭で、4日目に腹部正中創より出血を認めた。術後漸増したα2PIは、出血時108%から65%に低下した。●-●-:脱血+血液注入(出血), ○-○-:脱血+血液注入, ■-■-:脱血+血液注入+肝切, □-□-:脱血+血液注入+脾切, ●-●-:コントロール, POD: post operative day



第5図 ラット大網のフィブリン平板の溶解窓。I群(図中Aで示す)8.0mm², II群(図中Bで示す)4.1mm²であり, 腹腔内凝血の存在により, 線溶活性がより強く亢進した。n=12。(Yamamoto Y et al: Surg Today 30: 778-784, 2000 のFig. 3より許可を得て転載)



第6図 ラットの肺, 肝, 脾, 腎, 脳, 横隔膜の線溶活性を検討。肺, 腎, 脳組織はフィブリン平板を溶解したが, 肝, 脾, 横隔膜には線溶活性を認めなかった。



第7図 腹腔内凝血および生食注入後の肺, 脳, 腎組織における線溶活性の経時的变化。線溶活性は, 図中縦軸にフィブリン平板の溶解窓の面積で表した。腹腔内凝血注入群の肺組織の線溶活性は, 生食注入群に比し, 20~28時間後に有意に高かった。脳, 腎組織では両群に差はみられなかった。n=28. *p<0.05.

クは認めなかった。

2) ラット尾静脈からの再出血と生存率

両群ともに、予め切開後止血した尾静脈からの再出血は認めず、実験後2週間でII群で10匹中9匹(90%)、I群で10匹中10匹(100%)生存しており両群間に生存率の差は認めなかった。

I群ラットで、血液注入4日目に開腹したが、腹腔内には淡黄色透明液が貯留しているのみであった。

3) ラットの大網および肺、脳、肝、脾、腎の線溶活性の変動

両群ラットで4日目に採取した10mgの大網の、フィブリン平板の溶解窓の長径と短径の積は、I群で $13.2 \pm 5.4 \text{ mm}^2$ 、II群で $6.5 \pm 2.0 \text{ mm}^2$ であり、I群の溶解窓は有意($p < 0.05$)に大きかった。(第5図に1部を示す)。II群ラットの肝、脾、横隔膜はいずれもフィブリン平板を溶解せず、明確な線溶能は見られなかった(第6図)。線溶活性を有する肺・脳・腎組織の、経時的な線溶活性の変化は、20~28時間後の肺組織で、I群がII群に比し有意に強く亢進していたが、脳・腎組織では両群間に有意差を認めなかった(第7図)。

考 察

著者は再出血発現機序の解明を目的として、外傷や手術後に再出血を生じた症例の検討を重ねた。墜落による腹部鈍的外傷に起因した臍体部断裂症例では、保存的治療中、受傷後4日目に貧血が急速に進行しCT検査上低吸収域が増大したため、再出血と診断し緊急手術を施行したが、Plg、 $\alpha 2\text{PI}$ の減少、FDP、Fbgの増加を伴っていた^{18, 33)}。

臍体部のlacerationを認めたが、主臍管は損傷されておらず、臍液の漏出や臍組織の醗化は認めなかった。したがって、臍液漏による血管の破綻に起因する再出血ではないと判断した。また、食道癌術後4日目に胸腔ドレーンから大量の出血を認め再開胸を行った症例においてもPlg、 $\alpha 2\text{PI}$ が減少しており、開胸所見でも胸腔内に多量の凝血とともに線溶性と考えられる毛細管性出血を認めた¹⁰⁾。また再出血時に著明な貧血は認めず、Plg、 $\alpha 2\text{PI}$ の低下は純粋な線溶系の変化であり、大量出血による希釈ではないと考えた。胃・脾・直腸の同時性三重複癌術後に生じた再出血症例は、末梢血(全身)での二次線溶の著明な亢進を示すとともに、腹腔内貯留血液(局所)もDdimer 3000 ng/ml 、Plg 27%、 $\alpha 2\text{PI}$ 25%以下、FPB $\beta 15-42$ 44.1 ng/ml と著明な線溶活性の亢進を認めた。凝固系検査値はいずれも正常域内にあっ

たことから、これら三症例では体腔内に貯留した凝血を溶解するために二次線溶システムが活性化され、その結果、凝固と線溶のhemostatic balanceに破綻をきたし、線溶の異常亢進による再出血が生じたものと考えられた³⁴⁻³⁷⁾。線溶亢進による出血症状は一般に重篤であり、その特徴は後出血(late hemorrhage)とよばれる外傷後一度止血した後、再び出血する症状で、フィブリン形成後にこれが過剰に分解されるためと考えられている³⁸⁾。

以上の検討から、体腔内凝血存在時の凝固線溶系の変動と再出血発現機序を明確にすることを目的として、今回の臨床的および実験的検討を行った。

臨床研究においては主として凝固線溶系の分子マーカーを測定した。FPA、FPB $\beta 15-42$ を測定する目的は、Thr、Fbgに対するPlm作用を直接知ることであり、TAT、PICはそれぞれ直接測定することが不可能であるThr、Plmの生成量を最もよく反映するマーカーとして用いた。Ddimerは安定化したフィブリンがPlmにより分解されて生じる物質であり線溶系のなかでも二次線溶をとらえる代表的分子マーカーである。これらの分子マーカーは通常血中にはほとんど存在しないため、その増加は凝固線溶系の亢進状態を鋭敏に反映するものと考えられる。

臨床例では、凝固線溶系は鈍的外傷例において、体腔内の凝血の有無にかかわらず亢進していた。しかし、plmのレベルと二次線溶の程度を示す指標であるDdimer、PICとFPB $\beta 15-42$ は凝血存在群で亢進が遷延し、21病日まで持続した。凝血の存在しない群ではこれらの指標は3日目までに正常域に復した。凝血塊を溶解、除去する機構としての線溶系が動員され結合型より遊離型activatorへの転換がおり、血腫周辺での線溶活性の亢進が、自然止血機構により止血した血管損傷部位のフィブリンを再度溶解し、再出血を起こすものと考えられる。再出血機序には、損傷血管および周囲の血腫周辺での局所的な線溶亢進が重要な役割を持つが、さらに各臓器や内皮細胞の全身的な線溶亢進を招来するものとする^{39, 40)}。

以上の臨床例での検討を裏付けるために、臨床例により近い実験モデルを構築し実験を行った。雑種成犬の腹腔内に脱血した自家血を注入し、作製した体腔内凝血存在モデルによる検討を行ったが、術後4日目に腹部正中創から著明な毛細管性出血を認めた。この時、静脈血の $\alpha 2\text{PI}$ は108%から65%に減少しており、血小板数や凝固系検査値は正常であったことから、二次線溶の亢進が再出血に関与しているものと想定された。ラットによる実験研究において、大網はフィブリン平板を明瞭に

溶解し、強い線溶活性を有することが判明し重要な一知見と考えられた。Plgを含むフィブリン平板に検体を置き一定時間内にできるフィブリン溶解窓の面積はplm活性に比例するので、plm活性として線溶能を判定することが可能である。凝血を注入したラットの大網の線溶活性は、凝血を注入しないラットの大網よりもより強く線溶能が亢進した。今回のフィブリン平板法による検討で、大網が線溶活性を有すると新たな知見が得られ、さらに腹腔内に血腫が存在する際には線溶活性が強く亢進していることが判明した。このことから大網の tissue plasminogen activator (以下 t-PA と略す) は局所の二次線溶をより活性化させ、t-PA の濃度が非常に高いときに全身の線溶活性が亢進し、凝固・線溶のバランスが崩壊する。さらに感染や低酸素血症などを合併する場合は線溶がより強く活性化する結果^{39,41,42)}、再出血の危険性は高くなると考えられた。

PAには血管内皮細胞や肺、腎など諸臓器に存在する t-PA が存在する。今回の研究では、ラットの肺組織に t-PA が存在することが確認され、さらに肺の線溶活性は腹腔内の血腫の形成によっても活性化された。このことから、鈍的外傷などにより、体腔内に血腫が存在している際には、直接凝血に接していない、肺挫傷部位等の遠隔臓器から再出血を生じる可能性も考えられ、臨床上できわめて重要な病態と思われる。

以上の成績を集約してみると凝血に起因する再出血の機序として体腔内にできた凝血塊周辺にある、物理的に損傷を受けた血管は、血管内血栓などの止血機構により止血されているが、thrombin による fibrin clot 形成に対する二次線溶が亢進する。体腔内に凝血(血管外血腫)が存在すると、凝血周辺に t-PA が産生される。さらに凝血周辺の大網や胸・腹膜などの線溶能を有する組織^{43,44)}の線溶活性が増強し、生理的防御機構として凝血を溶解する線溶のプロセスが活性化(血管外二次線溶)^{34,35)}。血腫内容液中には線溶活性の駆動源となる t-PA が含まれており、t-PA を含む凝血は吸収され、全身循環に入り、t-PA は内皮細胞を刺激して、active substance を遊離し、一次および二次線溶が活性化される。t-PA は凝血のフィブリン分子に接すると活性化され、活性化されたプラスミノーゲンはプラスミンに変換され線溶が始まる。このメカニズムは主としてフィブリン内で起こる。しかし、もしプラスミン活性が高いとフィブリンノーゲンを分解し凝固を阻害することになる³⁹⁾。これと反対に、血漿中の $\alpha 2PI$ は活性化されたプラスミノーゲンをプラスミンに変換するのを阻害する。それゆえ全身の線溶活性が亢進している症例では、凝血が形成され

たり多量のフィブリンが存在する部位では線溶活性はより強いと想定される。

腹腔内に貯留した血液は一般に凝固し難い性質を有すると言われている⁴⁵⁾。腹腔貯留血液の凝固・線溶系に関する検討⁴⁶⁾によると、貯留血での Fg 消失、AT III の著しい低下、TAT の異常高値は、凝固した血液を示していると考えられ、Plg 低下、 $\alpha 2PI$ の著しい減少、PIC の異常高値などは非常に強い線溶活性を示すもので、凝固の溶解した結果を示唆するものと考えられる。本研究ではその詳細なメカニズムを解明することはできなかったが、腹腔出血の処置を行う臨床医が勘案しなければならない問題として血液成分でもっとも大量に含まれるヘモグロビンの局所線溶系への生物作用が挙げられる。すなわち、腹腔に逸脱した赤血球が大網などに広範に分布する肥満細胞に接触すると、これらの細胞で構成的に生成されている一酸化窒素(NO)が消去され肥満細胞の脱顆粒が活性化する⁴⁷⁾。肥満細胞は脱顆粒して histamine や platelet-activating factor (PAF) を放出し、一方で大量出血に伴う交感神経系の過剰刺激状態も加わるため、微小循環の血管内皮細胞における t-PA 活性化は異常に亢進すると考えられる⁴⁸⁾。肥満細胞は脱顆粒に際し抗トロンビン作用を有する heparin も放出する。一方凝血塊の赤血球にあるヘモグロビンは急速に酸化変性し腹腔内マクロファージで貪食、処理されると考えられるが、この際マクロファージに豊富に発現する heme oxygenase はヘムを分解して大量の一酸化炭素(CO)を生成することが知られている⁴⁹⁾。一方 CO はマクロファージの cGMP を増加させて plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) を阻害することが最近明らかにされてきた⁵⁰⁾。血腫は二次線溶により再出血を繰り返さなければ、やがて吸収され resolving hematoma の経過をたどると考えられるが、その過程で腹腔内の線溶活性は上記の複合要因で異常亢進し、流動化が惹起されるものと考察できる。今後の残された課題としてこのような可能性を検証するための実験的研究をさらに展開することにより、臨床例における出血、血腫に対する新しい治療法が明確になるとと思われる。

総括

体腔内出血に対して保存的治療を行った場合の再出血の臨床的重要性に着目し、その機序の解析を行った。鈍的外傷患者を対象とした臨床研究、および雑種成犬とラットを用いた腹腔内凝血注入モデルで、凝固線溶系の変動と再出血との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. 鈍的外傷後の再出血例で、再出血前より体腔内に凝血が存在している症例があった。

2. 鈍的外傷後、体腔内に凝血が存在している症例では、局所および全身血の二次線溶が亢進し、FPB β 15-42, Ddimer の高値が持続した。

3. 腹腔内に凝血を注入した雑種成犬で、腹部正中創からの再出血を認めた。

4. ラットによる動物実験では、大網が線溶活性を有することが確認された。腹腔内に凝血を注入した群で、大網と、遠隔臓器である肺の線溶活性が亢進した。

以上の結果より、体腔内凝血存在時の生体の反応としての線溶発現について興味ある事実が判明した。体腔内に凝血が存在する症例では、凝血に起因する線溶活性の亢進から再出血の危険性があると考えられ、保存的治療にあたっては凝固線溶能のモニターとしてFPB β 15-42, Ddimer が重要である。

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北島政樹教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、直接ご指導を賜りました慶應義塾大学医学部救急部相川直樹教授、多大なるご協力、ご指導を賜りました東京歯科大学外科安藤暢敏教授、慶應義塾大学医学部外科学教室若林剛講師に深謝致します。本論文作成に際し、多大なご助言、ご指導を賜りました本塾医学部医科学教室末松誠教授に心から篤く御礼申し上げます。

本研究の一部は、第86・91回日本外科学会総会、第13・14・18回日本救急医学会総会、第16回日本腹部救急医学会総会等において発表した。

文 献

- 1) Christian R, James EB, Try OW, Chan-Kook R, Kevin M : Isolated free fluid on computed tomographic scan in blunt abdominal trauma : A systemic review of incidence and management. *J Trauma* 53 : 79-85, 2002
- 2) Michael LN, Soroosh M, Maj W, Frank P, Perry WS : Pattern of abdominal free fluid following isolated blunt spleen or liver injury in the pediatric patient. *J Trauma* 52 : 85-87, 2002
- 3) Matthew OD, Mark GM, Raymond PC, Kimberly LM, Stephan MC : 2,576 Ultrasounds for Blunt Trauma. *J Trauma* 50 : 108-112, 2001
- 4) Gregor V, Michael A, Matthias M, Stefan A, Christian 脱W, Udo O, Dieter N : Efficiency of chest computed tomography in critically ill patients with multiple traumas. *Crit Care Med* 28 : 1033-1039, 2000
- 5) Davis KA, Brody JM, Gioffi WG : Computed

- tomography in blunt hepatic trauma. *Arch Surg* 131 : 255-260, 1996
- 6) Jones TK, Walsh JW, Maull KI : Diagnostic imaging in blunt trauma of the abdomen. *Surg Gynecol Obstet* 157 : 389-398, 1983
- 7) Federle MP, Crass RA, Jeffrey RB, Trunkey DD : Hemoperitoneum studied by computer tomography. *Radiology* 148 : 187-192, 1983
- 8) George CV, Demetrios D, Konstantinos GT, Grant S, Linda SC, Kathleen AR, James AM, Ali S, Juan A, Howard B, Namir K, Thomas VB : Selective nonoperative management in 1,856 patient with abdominal gunshot wounds : should routine laparotomy still be the standard of care? *Ann Surg* 234 : 395-403, 2001
- 9) Sclafani SJ, Shaftan GW, Scalea TM, Patterson LA, Kohl L, Kantor A, Herskowitz MM, Hoffer EK, Henry S, Dresner LS, Wetzel W : Nonoperative salvage of computed tomography diagnosed splenic injuries : Utilization of angiography for triage and embolization for hemostasis. *J Trauma* 39 : 818-827, 1995
- 10) Rappaport W, Mcintyre KE, Carmona R : The management of splenic trauma in the adult patient with blunt multiple injuries. *Surg Gynecol Obstet* 170 : 204-208, 1990
- 11) Schurr MJ, Fabian TC, Gavant M, Croce MA, Kudsk KA, Minard G, Woodman G, Pritchard FE : Management of blunt splenic trauma : Computed tomographic contrast blush predicts failure of nonoperative management. *J Trauma* 39 : 507-513, 1995
- 12) Freedman LD, Anderson DS, Greaney RB, Kilcheski TS, Mcadam SA : Nonoperative management of delayed splenic rupture in an adult. *Digest Dis Sci* 27 : 171-174, 1982
- 13) Preston RM, Martin AC, Tiffany KVB, Ajai KM, Timothy CF : Associated injury in blunt solid organ trauma : Implications for missed injury in nonoperative management. *J Trauma* 53 : 238-244, 2002
- 14) Heller JA, Drugas G, Colombani P : Non operative management of solid organ injuries in children. Is it safe? *Ann Surg* 219 : 625-631, 1994
- 15) Velanovich V : Blunt splenic injury in adult : A decision analysis comparing options for treatment. *Eur J Surg* 161 : 463-470, 1995
- 16) Gates JD : Delayed hemorrhage with free rupture complicating the nonsurgical management of blunt hepatic trauma. *J Trauma* 4 : 572-575, 1994
- 17) Flik K, Callahan R : Delayed splenic rupture in an amateur hockey player : *Clin J Sport Med* 8 : 309-310, 1998
- 18) Yamamoto Y, Wakabayashi G, Ando N, Aikawa N, Kitajima M : Increased fibrinolytic activity and body cavity coagula. *Surg Today* 30 : 778-784, 2000

- 19) Lorne G, Barry AM, Helen G : Abbreviated injury scale and injury severity score : Ascoring chart. *J Trauma* 25 : 60-64, 1985
- 20) Stoner HB, Barton RN, Little RA : Measuring the severity of injury. *Br Med J* 2 : 1247-1249, 1977
- 21) Kockum C : Radioimmunoassay of fibrinopeptide A - Clinical applications. *Thromb Res* 8 : 225-236, 1976
- 22) Nosselh L : Measurement of fibrinopeptide A in human blood. *J Clin Invest* 54 : 43-53, 1974
- 23) 大野安男 : フィブリノペプチド A および B β 15-42 の測定に関する検討. *SRL 宝函*, 7 : 20-23, 1983
- 24) Kudryk B, Robinson D, Netre C, Hessel B, Blomback M, Blomback B : Measurement in human blood fibrinogen/fibrin fragments containing the B β 15-42 sequence. *Thromb Res* 25 : 277-291, 1982
- 25) 青木延雄, 武永強, 長谷川淳, 小熊豊 : EIA 法による α 2PI (TD-80) および α 2PI プラスミン複合体 (TD80-C) 測定キットの基礎的検討. *臨床病理*, 11 : 1275-1281, 1990
- 26) Peter H : Determination of human thrombin antithrombin complex in plasma with an enzyme-linked immunoassay. *Thromb Haemost* 59 : 101-106, 1988
- 27) 豊川真弘, 末久悦治, 西村賢二, 末朋真由美, 甲田一馬, 網野信行, 宮井潔 : トロンビン・アンチトロンビン複合体 (TAT) の基礎的検討と臨床応用. *医学と薬学*, 23 : 959-966, 1990
- 28) Elms MJ, Bunce IH, Bundesen PG, Rylatt DB, Webber AJ, Masci PP, Whitaker AN : Measurement of cross linked fibrin degradation products - an immunoassay using monoclonal antibodies. *Thromb Haemost* 2 : 59-64, 1983
- 29) 庭野明子, 山田輝雄, 黒澤佑子, 水野映二, 清瀬 関 : ラテックス近赤外比濁法(LPIA SYSTEM) による FDP-E, AT の測定. *日本臨床検査自動化学会誌*, 9 : 15-20, 1984
- 30) Astrup T, Permin PM : Fibrinolysis in the animal organism. *Nature* 159 : 681-682, 1947
- 31) Astrup T, Mullertz S : The fibrin plate method for estimating fibrinol activity. *Arch Biochem Biophys* 40 : 346-351, 1952
- 32) Bishop R, Ekert H, Gilchrist GS : The preparation and evaluation of a standardised fibrin plate for the assesment of fibrinolytic activity. *Thromb Diath Haemorrh* 23 : 202-210, 1970
- 33) 山本裕, 相川直樹, 大森泰, 宮島伸宜, 安藤錫敏, 阿部令彦 : 腹腔出血の病態 - 腹腔内出血後の線溶系の変動と再出血の危険性. *腹部救急診療の進歩*, 6 : 221-225, 1986
- 34) Kapsch DN, Metzler M, Harrington M, Mitchell FL, Silver D : Fibrinolytic response to trauma. *Surgery* 95 : 473-478, 1984
- 35) Enderson BL, Chen JP, Robinson R, Maull KI : Fibrinolysis in multisystem trauma patients. *J Trauma* 31 : 1240-1246, 1991
- 36) Hawkey CM : General summary and conclusion to the hemostatic mechanism in man and other animals. *Symposia of the zoological society of london*, No27. Academic Press London 8 : 217-229, 1970
- 37) Chesterman CN : The fibrinolytic system and haemostasis. *Thromb Diath Haemorrh* 34 : 368-376, 1975
- 38) 池田康夫, 押味和夫 : 標準血液学. 医学書院, p. 249-250, 2000
- 39) 美原恒 : 侵襲と線溶. *救急医学*, 11 : 185-192, 1987
- 40) 岡島研二 : 病態線溶 ; プラスミンによる血管内皮細胞障害. *臨床病理*, 96 : 110-121, 1993
- 41) 佐藤元通, 酒井堅, 小野仁志, 佐川庸, 渡部祐司, 木村茂 : 術後腹腔内感染症と凝固・線溶系の変動. *日消外会誌*, 19 : 2246-2252, 1986
- 42) Van Goor H, de Graaf JS, Kooi K, Sluiter WJ, Bom VJ, Van der Meer J, Bleichrodt RP : Effect of recombinant tissue plasminogen activator on intra abdominal abscess formation in rats with generalized peritonitis. *J Am Coll. Surg* 179 : 407-411, 1994
- 43) Vipond MN, Whawel SA, Thonpson JN : Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions. *The Lancet* 112 : 1120-1122, 1990
- 44) Victor WN, Teake KM, Sceffer JH, Groos NP : Characterization and fibrinolytic of human omental tissue mesothelial cells. comparison with endothelial cells. *Blood* 7 : 1490-1497, 1990
- 45) Beller FK, Maki M, Epstein MD : Incoagulability of intraperitoneal blood. *Am J Obst & Gynec* 8 : 1121-1127, 1968
- 46) 萩原哲夫, 藤脇伸一郎, 熱田洋, 会沢芳樹, 松井弘文, 海老原肇, 萩庭一元, 竹内久清, 雨宮章 : 腹腔内貯留血液の性状について. *Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol* 2 : 66-67, 1992
- 47) Kubes P, Faseb J : Nitric oxide synthesis inhibition leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J* 7 : 1293-1299, 1993
- 48) Kurose I, Suematsu M, Miura S, Suzuki M, Nagata H, Morishita T, Sekizuka E, Tsuchiya M : Involvement of superoxide anion and platelet-activating factor in increased tissue-type plasminogen activator during rat gastric microvascular damages. *Thromb Res* 62 : 241-248, 1991
- 49) Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M : Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver : topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 101 : 604-612, 1998
- 50) Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ : Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon driven by derepression of fibrinolysis. *Nature Medicine* 7 : 598-604, 2001

学位論文

1型糖尿病の発症予知に関する研究：動物モデルを用いた基礎的検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

山田 悟

(平成 15 年 9 月 25 日受付)

Key words : macrophage, prediction, type 1 diabetes

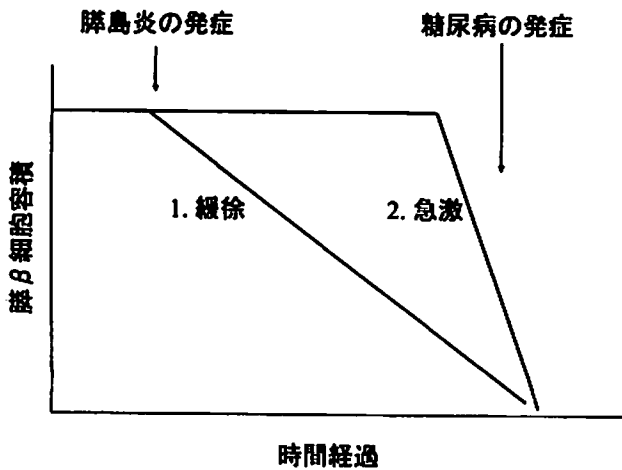
1型糖尿病は、「膵β細胞の破壊的病変でインスリンの欠乏が生じることによって起こる糖尿病」と定義されている¹⁾。多くの1型糖尿病では、自己免疫学的な機序により膵β細胞周囲にリンパ球を中心とする炎症性細胞浸潤がまず生じ、その後膵β細胞が破壊されて糖尿病を発症する。最終的にインスリン依存状態に陥ることが多く、かつてはインスリン依存型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus : IDDM) と呼ばれ、実際、1920年代のインスリンの発見まで1型糖尿病を発症した小児の多くは数週間で死に至っていた。1922年のインスリンの臨床応用開始後、生命予後は一般健常児なみになることが期待されたが、1965年から1979年に診断された各国の1型糖尿病患児の20年間の累積死亡率を調べた長期予後の報告によれば、欧米でも1型糖尿病患児の死亡率は一般人口と比較して2~7倍も高く、日本においては14倍も死亡率が高かった²⁾。このような日本における予後の悪さは、医療体制の改善とともに急性合併症や腎症による死亡が減少したことでほぼ欧米なみ(5倍程度)にまで改善されてはいるが³⁾、それでも今なお生命予後は悪い。また、30歳以上の1型糖尿病患者においては、心血管疾患による死亡が増加し、死亡リスクは一般人口の10倍以上になるとされている⁴⁾。加えて、最近では生命予後の改善に伴って慢性的な高血糖による多くの合併症が問題になりつつある。よって、今後、1型糖尿病の予防は、きわめて重要な課題であると考えられる。

適切かつ効率的に発症を予防するためには、発症を正

確に予知する必要がある。これまで、発症予知マーカーとしては、遺伝子(ヒト白血球抗原、インスリン)⁵⁾や膵β細胞を標的とした自己抗体(膵島関連自己抗体)⁶⁾が提唱されている。しかし、1型糖尿病は患者の一卵性双生児でも10~60%程度しか発症せず^{7,8)}、遺伝因子のみによる発症予知は不可能である。また、1型糖尿病患者の近親者(遺伝子がある程度限定された集団)の中で、膵島関連自己抗体が陽性の集団を対象にすれば1型糖尿病発症予知は可能であることが示されつつある^{9,10)}が、1型糖尿病患者のほとんどが家族歴をもたないことを考えると、一般集団を対象に1型糖尿病発症予知・予防を考えるには、別途の予知マーカーが必要であることが示唆される。

新たな予知マーカーを検索し、有効な予防法を確立するためには、1型糖尿病における膵β細胞破壊の進行過程の理解が不可欠と考えられる。1型糖尿病は、膵β細胞容積が本来の65~90%程度を失ってから発症するとされてきたが^{11,12)}、現在まで糖尿病発症前の1型糖尿病における膵β細胞の変化については2つの仮説が提唱されており、未だ結論が出ていない。1つは、かなり早期に成立する膵ランゲルハンス氏島(ラ氏島)へのリンパ球浸潤(膵島炎)の出現直後から徐々にβ細胞の数は減少し、90%程度が消失したところで糖尿病が発症するという説¹³⁾であり、もう1つは膵島炎の成立後もβ細胞は保持され、ある時点で(おそらくは)T helper 1 (Th1)/T helper 2 (Th2) バランスの変化を伴う免疫状態の変化に伴って急激にβ細胞が減少し、その直

本論文は、Yamada S, Irie J, Shimada A, Kodama K, Morimoto J, Suzuki R, Oikawa Y, Saruta T : Assessment of beta cell mass and oxidative peritoneal exudate cells in murine type 1 diabetes using adoptive transfer system. Autoimmunity 36 : 63-70, 2003 の一部を含む。



第1図 1型糖尿病発症過程における膵β細胞容積に関する2つの仮説。1. 膵島炎の発症直後より徐々に減少し、65~90%の容積が失われると糖尿病が発症する。2. 膵島炎の発症後も容積はしばらく保持されるが、Th1/Th2バランスの変化を契機に急激に容積が減少し、糖尿病に至る。NODマウスにおいては、4週齢頃に膵島炎が成立し、12週齢以降に糖尿病が発症しはじめ、雌性では30週齢頃までに70%程度の発症率を示す。

後に糖尿病が発症するという説¹⁴⁾である(第1図)。もし、前者が正しいのならば、発症予防は可能な限り早期から開始する必要がある。場合によってはβ細胞の再生を伴わせなければならない。逆に後者が正しいのであれば、糖尿病発症の直前に1型糖尿病の発症過程にブレーキをかければ、糖尿病を予防することができるはずである。

そこで、今回著者は、将来の1型糖尿病の予知マーカーや有効な予防法の確立につなげることを目的として、1型糖尿病における膵β細胞破壊の進展過程の検討とその過程の中で変動する因子の検索を行った。

1. 1型糖尿病モデルマウスにおける膵β細胞容積の減少過程の検討

1型糖尿病の病因解明のためのモデル動物の一つとして、non-obese diabetic (NOD) マウスが繁用されている。NODマウスは、ヒト1型糖尿病に類似した性質を数多くもつ優れたモデル動物であり、生後4週齢頃より膵島炎(膵ランゲルハンス島(膵島)へのリンパ球浸潤)を認め、生後12週齢以降に顕性糖尿病を発症する。累積発症率は雌性では30週齢ころまでで約70%である。本研究では、遺伝的には均一でありながら、どの個体が糖尿病を発症するのか予知することができない、このNODマウスをモデル動物として用いることとした。

また、免疫担当細胞の*in vivo*における役割を検討する方法として「細胞移入」の系があり、NODマウスにおいても数多くの移入実験の報告がある¹⁵⁻¹⁷⁾。今回、著者は細胞移入の系を用いることとし、1型糖尿病モデルであるNODマウスをドナーとし、遺伝的な背景はNODマウスと同様でありながら有効なリンパ球を欠如するNOD-scid (severe combined immunodeficiency) マウスをレシピエントとして、NODマウスの膵β細胞容積を検討しつつ、その脾細胞(リンパ球)をNOD-scidマウスに移入することで糖尿病の発症しやすさを調べ、両者の関係を検討した。

2. 1型糖尿病モデルマウスを用いた膵β細胞破壊とともに変動する因子についての検討

上記の細胞移入の系を利用し、ドナーのNODマウスの免疫担当細胞の機能や細胞表面マーカーなどを検討し、レシピエントのNOD-scidマウスの発症までの週数に示される発症のしやすさとの関係を調べることによって、膵β細胞の破壊過程とともに変動する因子を明らかにすることとした。こうした因子の変動が膵β細胞の破壊に対して原因として働いていないとしても、ともに変動する因子が明らかとなれば、予知マーカーや予防法の確立の糸口になるものと期待される。

対象と方法

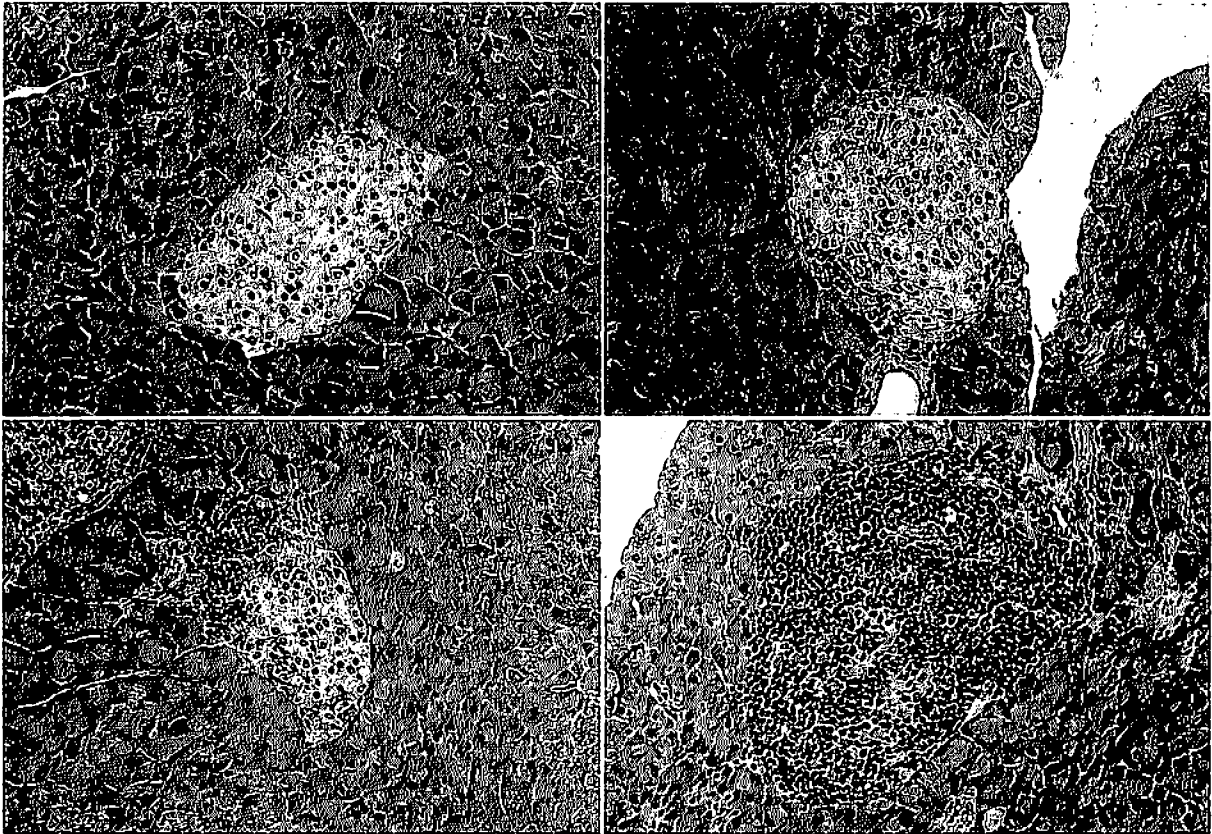
1. NODマウスからNOD-scidマウスへの脾細胞移入実験を用いた1型糖尿病発症前の膵β細胞容積の変化の推測

1) 動物

雌性NODマウスと雌性NOD-scidマウスを日本クレア(東京)より購入し、慶應義塾大学医学部動物実験センター内で特定病原体非感染(specific pathogen-free; SPF)環境下にて飼育した。飼育及び実験処置にあたっては、慶應義塾大学実験動物取扱マニュアルに準拠した。また、本実験は倫理委員会の承認を得た(承認番号021017(2002年))。

2) 脾細胞の準備

糖尿病未発症の16~18週齢のNODマウスもしくは発症直後の18週齢のNODマウスを頸椎脱臼により無痛的に屠殺した後、脾臓を取り出し、2%の仔牛胎児血清(fetal calf serum; FCS)(JRH Bioscience, アメリカ)を含んだRPMI-1640液(Gibco BRL, アメリカ)(以下2%FCS-RPMI)に入れ、75μmフィルター(Corning, アメリカ)を使用して単細胞浮遊液を作成した。エチレンジアミンテトラ酢酸ナトリウム



| | |
|---|---|
| a | b |
| c | d |

第2図 膵島炎の評価。a) grade 0；膵島周囲に炎症性細胞の浸潤がない。b) grade 1；膵島周囲に炎症性細胞の浸潤はあるが膵島内には認めない。c) grade2；膵島内に炎症性細胞の浸潤はあるが、膵島内の面積の1/2は越えない範囲に留まっている。d) grade3；膵島内の面積の1/2を越える面積に炎症性細胞の浸潤を認める。すべての膵島に対して膵島炎の評価を行い、その平均値をその個体の膵島炎の評価とした。

(2Na-EDTA) 0.045 g, 塩化アンモニウム (NH₄Cl) 8.34 g, 重炭酸ナトリウム (NaHCO₃) 1.0 g を 1000 ml の水に溶解して作成した液を用いて赤血球を溶血させた後、3回2%FCS-RPMIで洗浄し、細胞移入実験などの次の段階まで数分から数時間水上にて静置した。

3) 細胞移入

単離した脾細胞を2%FCS-RPMI からリン酸緩衝液 (PBS) に移し、 1×10^7 個/mlの濃度に調整し、1匹のNODマウスあたり3匹ずつの5週齢雌性NOD-scidマウスに0.2 ml (2×10^6 個/匹) ずつ腹腔内投与した。

4) 糖尿病発症のモニタリング

脾細胞の移入を受けたNOD-scidマウスに対して、週2回テストテープ (Eli Lilly, アメリカ) を用いて尿糖をチェックした。尿糖が陽性であったマウスに対しては尾静脈より採血し、グルテストエース (Arkray, 日本)

を用いて血糖を調べた。2回続けて血糖が250 mg/dl以上であったマウスは糖尿病と診断した。レシピエントであるNOD-scidマウスの個体差による影響を排除するために3匹のレシピエントのうち1匹でも発症した場合、ドナーのNODマウスは糖尿病発症性をもって判断し、3匹のレシピエントのうち最も早く発症した個体の週数をもって、ドナーのNODマウスの糖尿病発症性の強さとした。一方、3匹のレシピエントが移入後14週までに1匹も発症しなかった場合、ドナーのNODマウスには糖尿病発症性がないと判断した。14週までに発症しなかったNOD-scidマウスは解剖に賦し、胸腺腫がないかどうかを検討した。NOD-scidマウスは胸腺腫を発症しやすいことが知られており、40週齢までの累積発症率は雌性で約80%、雄性で約30%に及ぶことが知られている¹⁸⁾。NOD-scidマウスにおける胸腺腫は

ほとんどが20週齢以降に発症するが、まれに20週齢以前にも胸腺腫が発症し、胸腺腫がある場合、リンパ球移入の系が成立しなくなる。このため、移入後14週(19週齢)で糖尿病を発症しなかったNOD-scidマウスのうち、胸腺腫を認めたものは、本研究のその後の検討に利用しないこととした。

5) 膵臓の組織学的検討

NODマウスから膵臓を摘出する際に、同時に膵臓も摘出した。摘出された膵臓を半分に分割し、うち半分を10%ホルムアルデヒドにて固定した。この固定された膵臓を後にパラフィンに包埋し、50µmの距離を開けて、少なくとも3切片以上のプレパラートを作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施した。膵島炎の評価においては、下記のような分類を行った。grade 0;膵島周囲に炎症性細胞の浸潤がない。grade 1;膵島周囲に炎症性細胞の浸潤はあるが膵島内には認めない。grade 2;膵島内に炎症性細胞の浸潤はあるが、膵島内の面積の1/2を越えない範囲に留まっている。grade 3;膵島内の面積の1/2を越える面積に炎症性細胞の浸潤を認める(第2図)。3枚以上のプレパラートの全ての膵島に対して膵島炎の評価を行い、その平均値をその個体の膵島炎の評価とした。

膵臓の残る半分はインスリン含有量の計測に供した。

6) 膵臓インスリンの抽出

ホルムアルデヒドで固定しなかった膵臓の半分を、重量の測定後に酸エタノール液(6規定塩酸:水:純エタノールを容積比1.8:23.2:75.0で混和した液)中ですり潰した。その後4℃下で48時間攪拌を続け、インスリンを抽出した。

7) マウスインスリンの測定

上記の膵臓よりの抽出に用いた酸エタノール液のpHを調節した後、RIA法にてインスリンを測定した。すなわち、コントロール検体とサンプル検体に¹²⁵Iで標識したインスリン(Linco Research, アメリカ)を加え、そこにモルモット由来の抗インスリン抗体(Linco Research)を加え、4℃下で24時間静置する。翌日、ヤギ由来の抗モルモット免疫グロブリン抗体(Linco Research)を加え、4℃下で20分静置し、2,000~3,000gにて遠心して免疫複合体を回収し、その放射活性を測定した。コントロール検体から得られる検量線からサンプル濃度を得た。

2. NODマウスからNOD-scidマウスへの脾細胞移入実験を用いた膵β細胞破壊の進展とともに変動する因子の検討

1) 動物及び脾細胞の移入

本研究でも1)の実験と同様、未発症の16~18週齢の雌性NODマウスもしくは発症直後の18週齢の雌性NODマウスから脾細胞を取り出し、5週齢の雌性NOD-scidマウスに 2×10^6 個/匹ずつ腹腔内投与した。

2) 脾細胞に対する抗原非特異的な刺激と抗原特異的な刺激によるサイトカインの分泌及びその回収

レシピエントに移入しなかった脾細胞浮遊液の一部に磁性マイクロビーズの付着した抗CD4抗体を加え、MiniMACS system (Miltenyi Biotech, ドイツ)を用いてCD4陽性細胞を分離した。CD4陽性細胞を除いた脾細胞浮遊液に3000radの放射線を照射して、リンパ球の増殖を抑制して抗原提示活性のみを残した。さきに分離したCD4陽性細胞 3×10^6 個と放射線照射細胞 6×10^6 個とを10%FCS-RPMIの中で混じ、さらに抗CD3抗体10µg/ml(clone 145-2C11, PharMingen, アメリカ)を加えて最終液量250µlとし、96穴丸底細胞培養プレート(Corning, アメリカ)にて48時間(37℃, 5%CO₂)培養した。培養後、上清を回収し、サイトカイン計測まで数日間-20℃で冷凍保存した。

また、これと同様の実験を、抗CD3抗体に替えて、ヒトGAD(RSR, イギリス)、ヒトインスリン(Novo, デンマーク)、または卵白アルブミン(Sigma, アメリカ)を刺激として施行した。抗CD3抗体と同様、各々の刺激物を10µg/ml加えて最終液量を250µlとし、96穴丸底細胞培養プレート上で48時間(37℃, 5%CO₂)培養した。培養後、上清を回収し、サイトカイン計測まで数日間-20℃で冷凍保存した。

3) サイトカインの計測

上清中のサイトカインの計測にはenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いた。すなわち平底の96穴プレートに各種抗体(抗インターフェロン(interferon; IFN)-γ(clone R4-6A2)、抗インターロイキン(interleukin; IL)-2(JES6-1A12)、抗IL-4(BVD4-1D11)、もしくは抗IL-10(JES5-2A5)抗体(全てPharMingen)をPBSに溶かして4℃で一晩静置し、翌日、採取された上清もしくは各サイトカインのスタンダード検体を加えて2時間室温で静置した。0.1% Tween 20(BioRad, アメリカ)を加えたPBSで洗浄した後、ビオチン化した各種抗体(抗IFN-γ(XMG 1.2)、抗IL-2(JES6-5H4)、抗IL-4(BVD 6-24G)、もしくは抗IL-10(SXC1.2)抗体(全てPharMingen)を加えさらに1時間室温で静置した。その後AB溶液(Vectastain, アメリカ)を加えて30分静置した後、2,2'-azobis-3-ethylbenz-thiazolinesulfonic acid (ABTS)

(Sigma) を加えて 405nm での発色を ELISA reader (Titertek Multiskan, アメリカ) にて調べた。本研究では検体をすべて二重に計測し、スタンダード検体より得られたスタンダードカーブより各種サイトカインの濃度を求めた。

4) RNA の抽出と cDNA の合成

NOD マウスから得られた脾臓の一部を RNA later RNA stabilization reagent (Qiagen, アメリカ) 中でホモジナイズし、得られた検体にエタノールを添加した後に、シリカゲル膜のついたスピニングカラムに移し、遠心にて RNA を膜に結合させた後、膜に水を通して、濃縮された RNA を得た。

RNA を抽出後、70°C 10 分間の処置をし、RNA の高次構造を破壊した。その後、アデニン (A) の配列が続くポリ A の構造をもつ mRNA の性質を利用し、オリゴ dT プライマーを用いて 42°C の環境下で逆転写反応を生じさせ、ファーストストランド cDNA を作成した。

5) PCR によるサイトカインの発現解析

脾細胞から得られたファーストストランド cDNA を鋳型にして、 β -アクチン、IFN- γ 、IL-4、IL-10 について PCR を施行した。各々の 5'プライマー及び 3'プライマーの配列は β -アクチン AGAGGGAAATCGTGCGTGAC 及び CAATAGTGATGACCTGGCCvGT、IFN- γ TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA 及び AGGCTCTG CAGGATTTTCATG、IL-4 ACAGGAGAAGGGACGCCAT 及び GAAGCCCTACAGACGAGCTCA、IL-10 GGTTGCCAAGCCTTATCGGA 及び ACCTGCTCCACTGCCTTGCT であった。各々の反応は脱重合 (ディネイチャー) に 94°C 40 秒、プライマーの重合 (アニー

リング) に 61°C 40 秒、伸長反応 (エクステンション) に 72°C 40 秒の条件を用い、35 サイクルの反応を行った。各々の PCR 産物を 3% アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイド液 (コンチネンタルラボラトリープロダクツ, 米国) に浸した後、トランスイルミネーター (UVP, 米国) 上で紫外線を照射して各種遺伝子の発現の有無を検討した。

6) 定量的 PCR によるサイトカイン・ケモカイン受容体の発現解析

Perkin Elmer 7700 PCR quantification system (Perkin Elmer Corp./Applied Biosystems, アメリカ) を用いて、脾細胞から得られたファーストストランド cDNA を β -アクチン、IFN- γ 、IL-10、CXC ケモカイン受容体 3 (CXC chemokine receptor 3; CXCR3) について定量的 PCR に供した。5) において実施した予備実験で発現を確認できなかった IL-4 については検討しなかった。まず、5'プライマー、3'プライマー、及びその間に 2 つの蛍光色素を持ったオリゴヌクレオチドプローブ (TaqMan プローブ) を重合させる。この 2 つの色素は TaqMan プローブに結合している間は発光しない。しかし、その後 DNA ポリメラーゼ活性と 5'-3' エキソヌクレアーゼ活性をあわせもつ Taq ポリメラーゼによってプライマーからの伸長反応が生じ TaqMan プローブが分解されると、TaqMan プローブに結合していた蛍光色素は強い発光を生じるようになる。Perkin Elmer 7700 PCR quantification system では、この発光を検出することによって目的遺伝子の増幅の程度をリアルタイムに定量できるのである。各々の 5'プライマー、3'プライマー、TaqMan プローブは第 1 表に示した。各々の反応は脱重合 (ディネイチャー) に

第 1 表 各種遺伝子の polymerase chain reaction のための primer の配列、制限酵素の種類、TaqMan probe の配列

| 遺伝子名 | 5' プライマー | 3' プライマー | TaqMan プローブ |
|---------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| β -アクチン | 5'- CAACGTCACACT TCATGATGGA-3' | 5'- TCCAGCCTTCCT TCTTGGGTA-3' | 5'- TGTAGTTTCATGGAT GCCACAGGATTCC-3' |
| IFN- γ | 5'- CAATGAACGCTA CACACTGCAT-3' | 5'- TGGCAGTAACAG CCAGAAACA-3' | 5'- TTGGCTTTGCAGCTC TTCCTCATGG-3' |
| IL-10 | 5'- CACAAAGCAGCC TTGCAGA-3' | 5'- GTAAGAGCAGGC AGCATAGCA-3' | 5'- AAGAGAGCTCCATCA TGCTGGCTCA-3' |
| CXCR3 | 5'- ATCAGCGCTTCA ATGCCAC-3' | 5'- TGGCTTTCTCGA CCACAGTT-3' | 5'- ATGCCATATCCTAG CTGTCTGCTGGTC-3' |

95°C 30 秒、プライマーの重合 (アニーリング) と伸長反応 (エクステンション) に 59°C 60 秒の条件を用い二重に施行された。

7) フローサイトメーターを用いた T 細胞受容体 (T cell receptor ; TCR) α/β 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性細胞の発現の解析

レシピエントに移入しなかった脾細胞浮遊液の残りの一部はフローサイトメーターによる解析に供した。脾細胞を 2%FCS-RPMI から 2%の FCS を混じた PBS (以下 2% FCS-PBS) に移し、Cy-Chrome-conjugated 抗 CD4 抗体 (clone H129.19), Cy-Chrome-conjugated 抗 CD8 抗体 (53-6.7) (PharMingen), FITC-conjugated 抗 TCR α/β 抗体 (H57-597) (Immunotech, フランス) により染色した。各々の染色は 4°C20 分間の静置によって行い、2% FCS-PBS により洗浄後、 10^4 - 10^5 個の細胞をフローサイトメーター (EPICS XL (Beckman Coulter, アメリカ)) により解析した。

8) フローサイトメーターを用いた腹腔浸出細胞 (peritoneal exudate cells (PEC)) のグルタチオンレベルの検討

屠殺直後の 20 匹の NOD マウスに対して、脾臓や膵臓の摘出に先んじて、5 ml の PBS で腹腔内を無菌的に洗浄し、それを回収した。この洗浄液中に含まれる細胞

のすべてを腹腔浸出細胞 (peritoneal exudate cells (PEC)) とした。

40 mmol/l の濃度で monochlorobimane (MBCl) (Clontech, アメリカ) を純エタノール (和光純薬, 大阪) に溶かし、PBS で 500 倍に希釈した。希釈された MBCl 溶液 5 ml を PEC を含む 5 ml の PBS と混じて (最終濃度 40 μ mol/l) 室温下、5 分間静置した。その後直ちに EPICS ALTRA system (Beckman Coulter) を用いて、20 mW の紫外線を照射下でのグルタチオン-MBCl による蛍光を抽出した。この系においては、グルタチオンレベルの高い細胞集団を還元型 PEC、グルタチオンレベルの低い細胞集団を酸化型 PEC と定義した (第 3 図)。

9) 統計学的解析

マウスの群間の比較については、Student t test を用いてパラメトリックに、あるいは Mann-Whitney's U test を用いてノンパラメトリックに解析した。また、指標間の相関については、Spearman rank correlation coefficient を用いてノンパラメトリックに検討した。

結 果

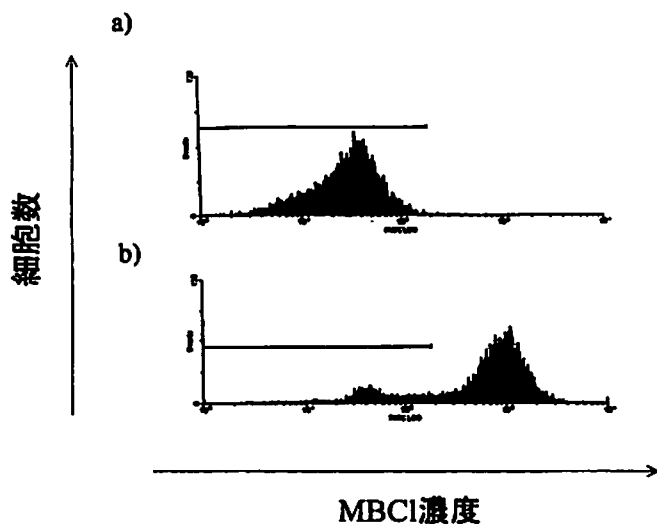
1. NOD マウスから NOD-scid マウスへの脾細胞移入実験を用いた 1 型糖尿病発症前の膵 β 細胞容積の変化の推測

1) 細胞移入の結果

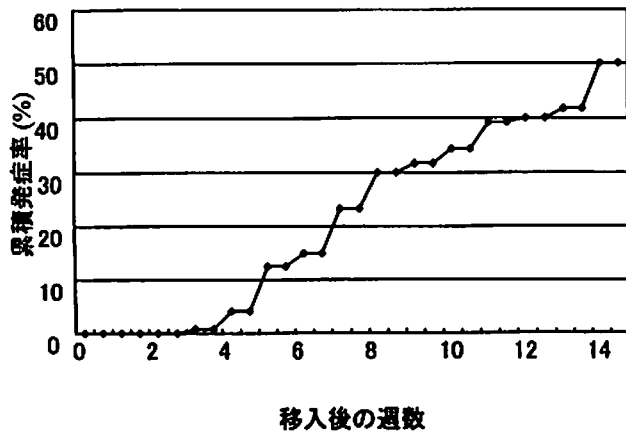
本研究では合計で 16~18 週齢の雌性 NOD マウス (n=41) の脾細胞 2×10^6 個を 5 週齢の雌性 NOD-scid マウス (n=123) に腹腔内投与した。41 匹のドナーのうち、4 匹は細胞移入の直前に糖尿病を発症していた。この糖尿病発症済みドナーの脾細胞を移入された NOD-scid レシピエントはすべて移入後 3~6 週に発症した。胸腺腫のレシピエント 3 匹を除くと、120 匹のレシピエントのうち 60 匹 (50%) が糖尿病を発症し、これらのレシピエントに対するドナーは 29 匹であった。すなわち、発症済み NOD マウス 4 匹と未発症 NOD マウス 25 匹が糖尿病発症性をもっており、残る 12 匹の未発症 NOD マウスは糖尿病発症性をもっていなかった (第 4 図)。

2) ドナーの膵臓とレシピエントが糖尿病を発症するまでの期間の関係

細胞移入の系において、若週齢の NOD マウスから脾細胞を移入された NOD-scid レシピエントは移入後、糖尿病発症までに時間がかかり、発症直前の時期の NOD マウスから脾細胞を移入された NOD-scid レシピエント



第 3 図 腹腔浸潤細胞の monochlorobimane 濃度についての代表的フローサイトメーターのデータ。a) 染色前、b) 染色後：b) における下線部をグルタチオンレベルが低いと判断し、酸化型と定義した。(Yamada S et al : Autoimmunity 36 : 63-70, 2003 の Fig 1 を許可を得て転載)



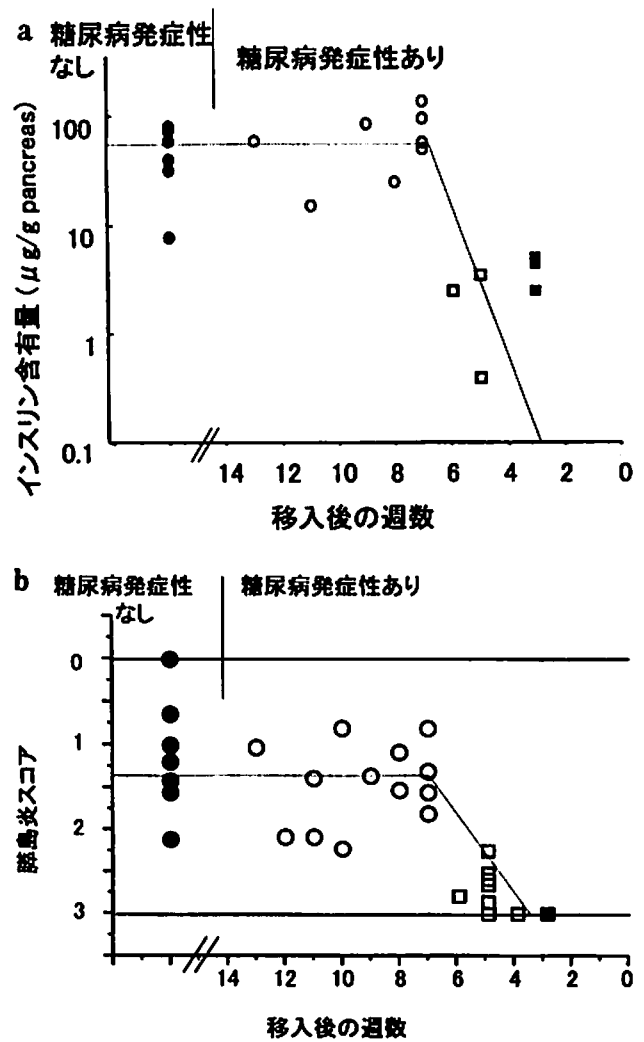
第4図 NOD マウスの脾細胞を移入された NOD-scid マウスの糖尿病累積発症率。(Yamada Set al: Autoimmunity 36: 63-70, 2003 の Fig 2 を許可を得て転載)

は移入後、すみやかに糖尿病を発症する¹⁹⁾ことより、NOD マウスの糖尿病発症性は、その脾細胞を移入されたレシピエントが移入後に糖尿病を発症するまでの期間で評価できると考えられている。

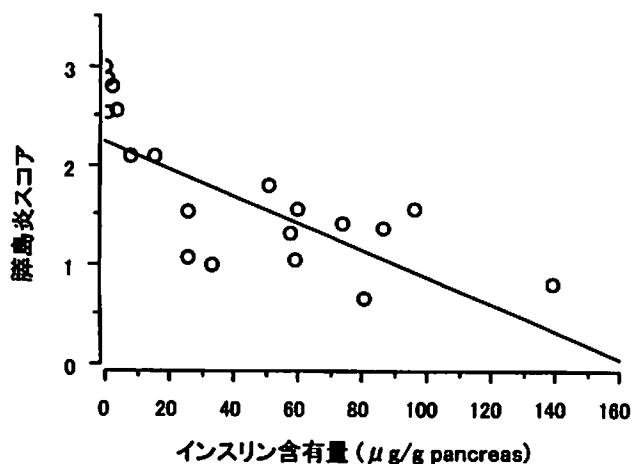
もし、膵β細胞が膵島炎を発症後、徐々にβ細胞数を減らすのであれば、ドナーの膵臓のインスリン含有量あるいは膵島炎スコアとレシピエントの移入後発症までの週数は直線相関するはずである。そのような観点にたち、相関関係を調べたが、ドナーの膵インスリン含有量、膵島炎スコアともレシピエントの発症までの週数とは相関がなかった。

逆に膵β細胞容積は発症直前まではある程度保たれ、発症直前に激減するという観点にたつて観察したところ、レシピエントが発症するのに7週かかったドナーの膵インスリン含有量は、一匹のレシピエントも発症させなかったドナーの膵インスリン含有量と同等であり、また、レシピエントが6週以下しかかかずに糖尿病を発症したドナーの膵インスリン含有量は、糖尿病を発症済みのドナーの膵インスリン含有量と同等であった(第5a図)。

膵インスリン含有量と膵島炎スコアの間を調べると、有意な負の相関関係が存在した($r = -0.66$, $p < 0.0001$) (第6図)。そこで、膵島炎スコアとレシピエントが発症するまでの週数との関係を求めた。すると、レシピエントの発症に7週以上かかったドナーの膵島炎は、レシピエントを発症させなかったドナーの膵島炎と同等であり、レシピエントの発症に6週以下しかかからなかったドナーの膵島炎は発症済みのドナーの膵島炎と同等であった(第5b図)。



第5図 NOD マウスにおける膵β細胞容積の時間経過に伴う変化。a)膵β細胞容積を膵臓インスリン含有量で検討した図 (n=20), b)膵β細胞容積を膵島炎スコアで評価した図 (n=32): a)においては、糖尿病発症済みのNOD マウスのインスリン含有量はすべて $10 \mu\text{g/g pancreas}$ 未満であり、その脾細胞のレシピエントは移入後3~6週には糖尿病を発症した (closed square)。レシピエントが6週以内に発症した糖尿病未発症 NOD マウスのインスリン含有量も $10 \mu\text{g/g pancreas}$ 未満であり (open square)、糖尿病発症済みの NOD マウスと同等であった。これに対してレシピエントが発症に7週以上要した糖尿病未発症マウスのインスリン含有量は $10 \mu\text{g/g pancreas}$ 以上であり (open circle)、これは1匹のレシピエントも発症させることができなかったドナー (closed circle) と同等であった。b)は膵島炎スコアを示す。膵β細胞容積の大きいものをY軸の上にとるべく、この図のみ膵島炎スコアの低いもの(膵島炎の軽いもの)を上方に示した。膵島炎スコアにても膵臓インスリン含有量と同様の結果を示した。(a)については Yamada Set al: Autoimmunity 36: 63-70, 2003 の Fig 3 を許可を得て転載)



第6図 膵島炎スコアと膵臓インスリン含有量の相関。膵島炎と膵臓インスリン含有量は強く相関していた ($r = -0.66, p < 0.0001$)。

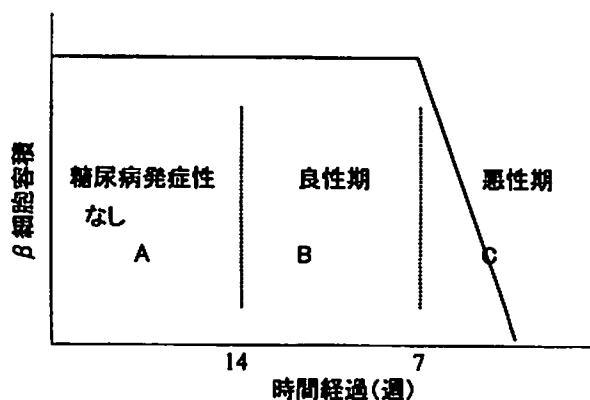
このことは、レシピエントの発症にわずか1~2週の差しかないドナーの間で膵インスリン含有量(膵β細胞容積)、膵島への細胞浸潤の程度については大きな差が存在することを示唆している。

2. NOD マウスから NOD-scid マウスへの脾細胞移入実験を用いた膵β細胞破壊の進展とともに変動する因子の検討

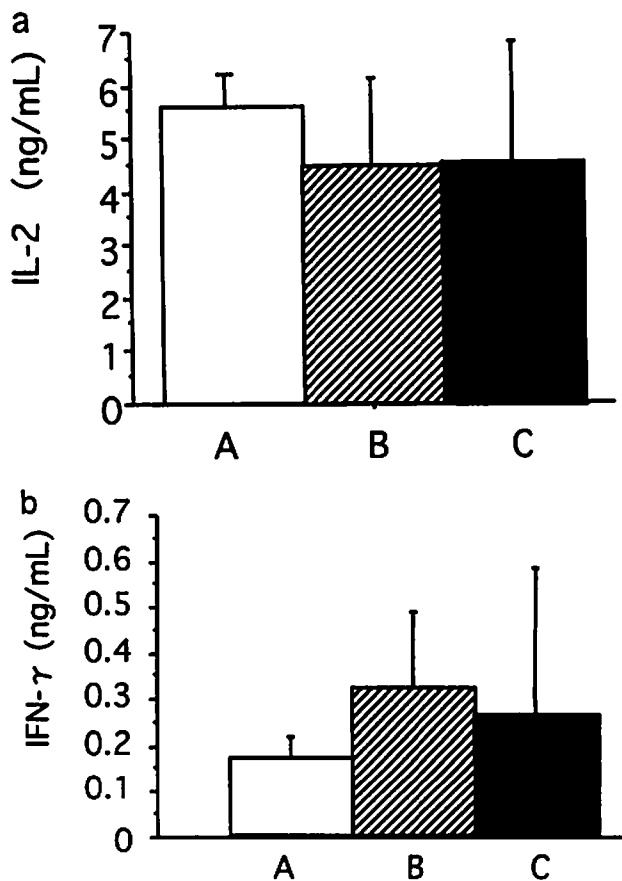
上記の実験結果に鑑み、膵β細胞破壊の進展とともに変動する因子の検討においては、ドナーのNODマウスを以下の3群に分類した。A群;レシピエントが発症しない、B群;レシピエントが発症するが、発症までに移入後7週以上かかる、C群;レシピエントが移入後6週以内に発症する(第7図)。そして、以下の検討項目について群間での比較を行った。検討項目が発症直前であるC群において他群より有意に高値(もしくは低値)であれば、その項目は破壊過程の進展とともに変動していると判断することとした。

1) CD4陽性脾細胞の抗原非特異的な刺激に対するサイトカイン反応

NODマウスのCD4陽性脾細胞に対して抗CD3抗体による刺激を加えて48時間培養し、上清を回収して上清中のサイトカイン濃度を計測した。その結果、IL-2、IFN-γについてはA、B、C群の群間で差異を認めなかった(第8図)。IL-10、IL-4についてはいずれのマウスにおいても検出できなかった。



第7図 レシピエントの発症性に基づくドナーの分類。A群;レシピエントに糖尿病を発症させないNODマウス、B群;レシピエントに糖尿病を発症させるが7週以上要するNODマウス、C群;6週以内にレシピエントに糖尿病を発症させるNODマウスに分類することとした。



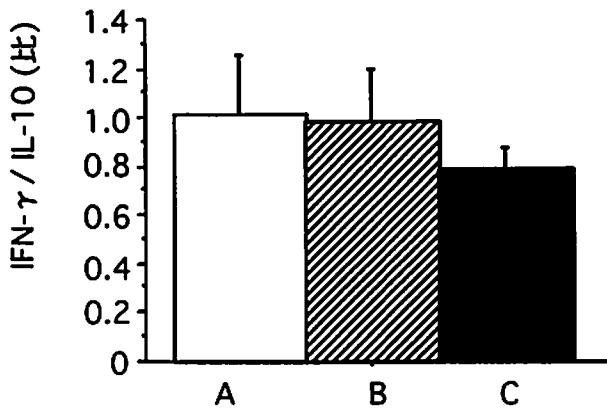
第8図 CD4T細胞と抗原提示細胞を抗CD3抗体刺激下で48時間共培養した後の上清中のサイトカイン。a) IL-2、b) IFN-γを示す。3群間での有意差は認められなかった。(A群n=5、B群n=9、C群n=6)

2) 脾細胞の膵島抗原特異的な刺激に対するサイトカイン反応

NOD マウスの脾細胞に対してヒト GAD あるいはヒトインスリンによる刺激を加えて 48 時間培養し、上清を回収して上清中のサイトカイン濃度の計測を試みた。また、それらと比較するため卵白アルブミンにても同様の培養上清を回収し、サイトカイン濃度の計測を試みた。しかし、IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 のいずれも、ほとんど検出できず、この点では A, B, C 群の群間で差異を認めなかった。

3) 脾細胞の mRNA 定量によるサイトカインの検出

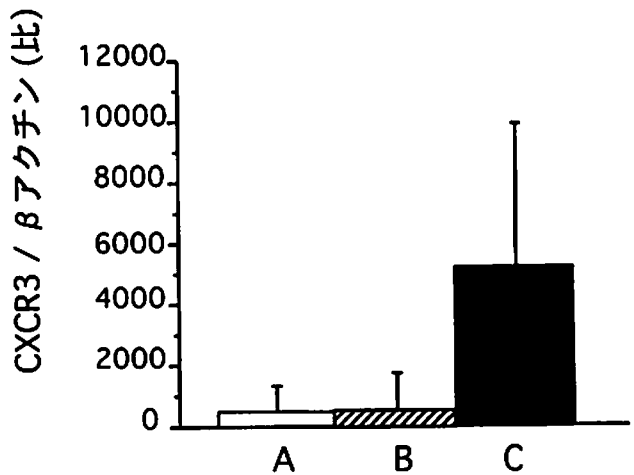
蛋白レベルではサイトカインの発現に差異をみる事ができなかったため、NOD マウスの脾臓から RNA を抽出し、cDNA を作成して定量的 PCR によりその発現量を検討した。エチジウムブロマイドを用いた予備実験において IL-4 の検出が困難であったため、検討するサイトカインとして IFN- γ と IL-10 を選び、両者の比を検討した。IFN- γ と IL-10 を用いた mRNA の検討の有用性は Kolb らより確認されている (The 4th Immunology of Diabetes Society Congress, イタリア, 1999 年) が、今回の著者の検討では A, B, C 群の群間で差異を認めなかった (第 9 図)。



第 9 図 脾臓の mRNA の定量的 RT-PCR における IFN- γ /IL-10 比. b) 3 群間での有意差は認められなかった. (A 群 n=5, B 群 n=9, C 群 n=6)

4) 脾細胞の mRNA 定量による CXCR3 の検討

次に Th1 細胞の比率をサイトカインの検出以外の方法で検討することを考え、Th1 細胞表面に発現するとされている^{20,21)} CXCR3 の発現の程度を mRNA の定量的 PCR にて検討し、 β -アクトチンとの比を調べた。その

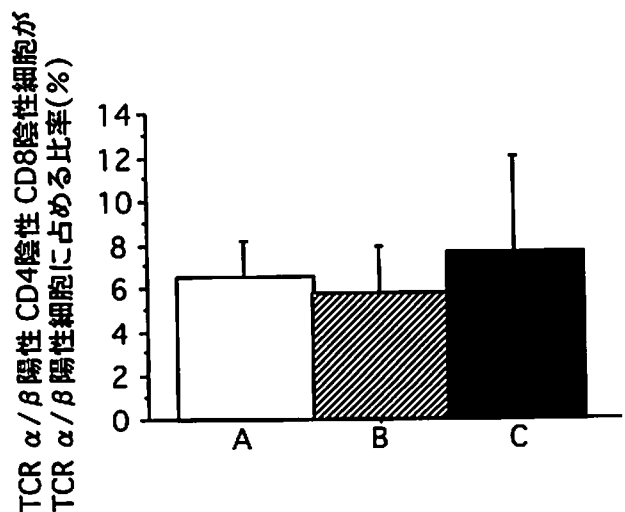


第 10 図 脾臓の mRNA の定量的 RT-PCR における CXCR3 発現. 有意差はなかったが、C 群が高値である傾向を認めた (B-C 群間 p=0.06). (A 群 n=5, B 群 n=9, C 群 n=3)

結果、C 群において A, B 群よりも CXCR3 の mRNA の発現が高い傾向があったが、統計学的に有意ではなかった (B~C 群間差 p=0.06, Mann-Whitney's U test) (第 10 図)。

5) 脾細胞における TCR α/β 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性細胞の比率

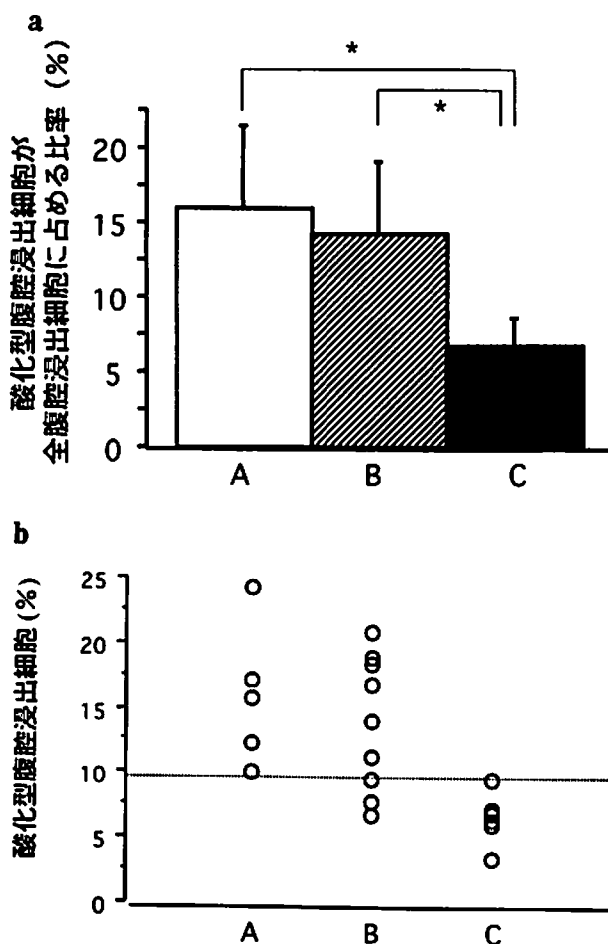
Th1/Th2 バランスをサイトカイン以外のものでさらに検討するための方法として、著者はさらに NKT 細胞



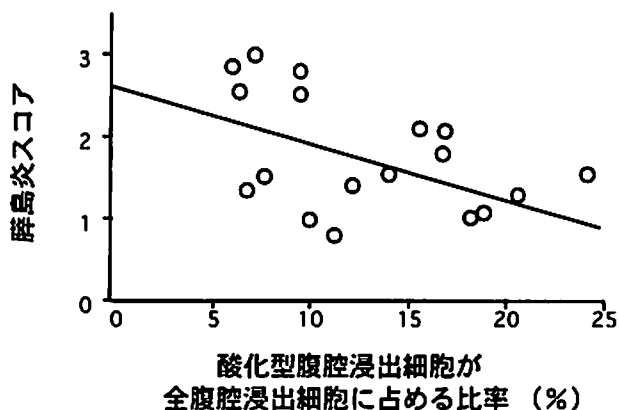
第 11 図 脾臓の TCR α/β 陽性細胞に占める TCR α/β 陽性 CD4 陰性 CD8 陰性細胞の比率. 3 群間に有意差はなかった. (A 群 n=5, B 群 n=9, C 群 n=6)

の検討を試みた。T細胞, B細胞, NK細胞につぐ第4のリンパ球集団として知られるNKT細胞は、免疫系の調節を司っていることが知られ、1型糖尿病においてもその関与が報告されている²²⁻²⁴。実際、NKT細胞の性質がTh1/Th2バランスを決定し、その後の1型糖尿病の発症を左右するという説が提唱されており²³、NKT細胞の検討によりTh1/Th2バランスの把握や発症予知につながる可能性がある。

NK1.1分子が欠如しているNODマウス²⁵においてはNKT細胞を定義することが困難であるが、著者は本研究においてはTCR α / β 陽性CD4陰性CD8陰性細胞をもってNKT細胞様細胞と考え²⁶、TCR α / β 陽性細胞に対する比率を検討した。しかし、A, B, C群の群間で差



第12図 全腹腔浸出細胞中に占める酸化型腹腔浸出細胞の比率。a) 棒グラフで示したもの、b) 分布図にて示したもの；A群では全ての、B群ではほとんどのドナーの酸化型腹腔浸出細胞は10%以上であり、C群では全てのドナーの酸化型腹腔浸出細胞が10%未満であった。
* $p < 0.05$ (a) については Yamada S et al : Autoimmunity 36 : 63-70, 2003 の Fig 5 を許可を得て転載)



第13図 膵島炎スコアと酸化型腹腔浸出細胞の比率との関係。膵島炎スコアと酸化型腹腔浸出細胞の比率は相関していた ($\rho = -0.50, p < 0.05$)。 (Yamada S et al : Autoimmunity 36 : 63-70, 2003 の Fig 4 を許可を得て転載)

異を認めなかった (第11図)。

6) 酸化型腹腔浸出細胞 (PEC) の比率

最近、抗原提示細胞、特にマクロファージにおけるグルタチオンのレベルがTh1/Th2バランスと関係があると報告がなされている²⁷。そこで個体におけるマクロファージのグルタチオンレベルを検討するべく、腹腔浸出細胞 (PEC) をMBCIにて染色した。MBCIの染色レベルの低い細胞を酸化型PECと定義してその比率を検討したところ、A, B群に比してC群では明らかにその比率が低かった (第12a図)。実際、すべてのA群 (糖尿病発症性をもたないNODマウス) の酸化型PECは10%を超え、すべてのC群 (レシビエントを6週以内に発症させるNODマウス) の酸化型PECは10%を下回っていた (第12b図)。

さらに、酸化型PECが本当に病勢を反映する指標かどうかを検討するために、酸化型PECと膵インスリン含有量あるいは膵島炎スコアとの相関を検討した。その結果、膵島炎スコアと有意な負の相関を認めた ($\rho = -0.50, p < 0.05$) (第13図)。

これらのデータに基づき、酸化型PEC 10%未満を糖尿病発症の予知マーカーとしたところ、相対危険度は1.714 (95%信頼区間 1.062-2.765, 感度 50%, 特異度 100%) であった²⁸。

考 察

現在、生活習慣の変化に伴い2型糖尿病患者の数が爆発的に増加している。これに比し、軽度ではあるが1

型糖尿病患者も世界的に増加しつつある²⁹⁾。1型糖尿病も2型糖尿病も、遺伝因子と環境因子が発症に関与するが、環境因子のほとんどを食習慣と運動習慣がしめている2型糖尿病と異なり、1型糖尿病ではどんな環境因子が発症に関与しているかが不明である。このため、食習慣や運動習慣の改善などにより予防が可能であることが証明された2型糖尿病³⁰⁻³²⁾と異なり、1型糖尿病では予防法が確立できていない^{33,34)}。Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes (DPT-1)³⁵⁾ではインスリン投与により、European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT)³⁶⁾ではニコチナミドにより、1型糖尿病発症の予防を図ったが、いずれも有効ではなかった。そこで、本研究では、新たな予防対象の選定法や予防法を見いだすべく、1型糖尿病の進展過程を検討し、それとともに変動する因子の探索を行った。

1型糖尿病患者の遺伝因子として、すでにヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen ; HLA)³⁵⁾とインスリン遺伝子上流の繰り返し配列の繰り返し数 (variable number of tandem repeat ; VNTR)³⁶⁾が確立されているが、日本人に限るとインスリンVNTRについては関与を否定する報告が多く³⁷⁻³⁹⁾、関与するにしても微弱な関係にすぎない⁴⁰⁾ものと思われる。よって、確実に関与することが判明しているのはHLAのみである。HLAの中で一番強く日本人1型糖尿病と関与するのはDR遺伝子であり、DR4及びDR9が糖尿病発症に関与するとされている^{41,42)}。その中でもより強く発症に関与するのがDR4であるが、DR4は、健常者の3割程度に認められる⁴²⁾ため、単独では発症率1.5~2.5人/10万人/年とされる1型糖尿病の予防対象の選定にはほど遠い。DPT-1では、1型糖尿病患者の近親者の中で、膵島関連自己抗体が陽性の集団を対象にし、経静脈的ぶどう糖負荷試験におけるインスリン分泌反応をみれば、発症高リスク集団 (5年間で60%が発症) や中等度リスク集団 (5年間で35%が発症) を見出せる、すなわち発症予知が可能であることを明らかにした³⁵⁾。しかし、1型糖尿病患者のほとんどが家族歴をもたないことを考えると、一般的には1型糖尿病発症予知・予防は依然不可能である。一般人口を対象にした発症予防を考えると、1型糖尿病の進展を十分に理解し、膵β細胞破壊の過程を反映するような予知マーカーを用いなければ、不必要な症例にも予防介入をしまったり、逆に必要な症例に予防介入をしなかったりする可能性があるだろう。そこで、著者は、NODマウスからNOD-scidマウスへの細胞移入の実験を施行し、1型糖尿病の進展過程を明らかにし、発症予知マーカーの発見につながるような因子の検討を

試みることにした。

本来、こうした検討においては、NODマウスに侵襲を与えずに膵臓やそれ以外の因子を評価することが望ましいが、現実的にはそれは不可能である。そこで、本研究で採用したのが細胞移入の系である。細胞移入の系によりドナーの糖尿病発症性がレシピエントに再現されることは、Rohaneらにより報告されている¹⁹⁾。本研究では、NODマウスの膵臓や脾細胞その他の状態を評価しつつ、その糖尿病発症性をNOD-scidマウスへの脾細胞の移入によって再現することを試みたのである。NODマウスは4週齢頃より膵島炎と呼ばれる膵島への炎症細胞浸潤を認めるが、すべての個体が発症するわけではなく、12週齢頃から30週齢までの間に雌性で70-80%、雄性で20~30%程度の個体しか糖尿病を発症しない。そして、どの個体が発症するかを予知することは現在まで不可能である。ヒト1型糖尿病の予知のためには、まず、本モデルマウスにおいて発症予知が可能となる必要があると思われる。また、本研究ではドナーのNODマウスを16~18週齢とした。これは、Watanabeらにより、18週齢前後のNODマウスの胸腺は他の週齢に比して、germinal centerが大きく、また、個体差も大きいことが報告されていて⁴³⁾、18週齢前後のNODマウスでは、今後糖尿病を発症する個体と糖尿病を発症しないマウスとが混在すると考えられたからである。

また、レシピエントは有効なT、Bリンパ球は存在しないものの他の免疫担当細胞は存在するNOD-scidマウスであり、その個体差を最小化するために本研究ではドナー1匹あたりのレシピエントを3匹とし、3匹のレシピエントのうち1匹でも糖尿病を発症すればドナーを“糖尿病発症性あり”と判断した。また、NOD-scidマウスには胸腺腫を発症する個体があり¹⁸⁾、胸腺腫例ではその存在のために細胞移入にても糖尿病を発症しないため、こうした個体は検討から除外した。

まず、本研究ではβ細胞容積減少の過程を明らかにすることを試みた。これまで、1型糖尿病発症前のβ細胞容積減少の過程については2つの仮説が提唱されていて結論を見ていない。1つは、β細胞容積は膵島炎の成立後、徐々に (直線的に) 減少していくという考え方であり^{13,44)}、もう1つは、β細胞容積は膵島炎成立後もしばらくはそのままだに保持され、発症の直前に激減するという考え方である^{14,45)}。ヒト1型糖尿病患者の三つ子の非罹患同胞が糖尿病を発症するまでの経静脈的ブドウ糖負荷試験のデータからEisenbarthがまず前者を提唱し¹³⁾、Sreenanらは各週齢のNODマウスのβ細胞容積を直接測定することでこの説を支持した⁴⁴⁾。しかし、

Eisenbarth のデータは例数が乏しいという欠点があり、Sreenan らのデータでは12週齢で発症率が30%、18週齢で80%という特殊なNOD家系で、かつ8ないし9週齢以後のデータしか提示されていないため、発症直前(3週前程度)から膵β細胞容積が減少しているとすれば後者の説でも、Sreenan らのデータは説明が可能であり、結論を導くことができないのである。

これに対し、Shimada らはNODマウスのCD4陽性CD45RB^{hi}細胞のサイトカイン反応が発症の時期を境にIL-4優位からIFN-γ優位になることを示し⁴⁶⁾、1型糖尿病がMosmann らの提唱したTh1/Th2バランス理論⁴⁷⁾に合致することを証明するとともに、β細胞の破壊が自己免疫過程の後期の現象であることを提唱した⁴⁴⁾。さらに、Gazda らはNODマウスにNOD-scidマウス由来の膵島を移植する系を通じて、1型糖尿病の発症に至るまでの病勢には、自己免疫反応は存在しても膵β細胞の破壊はほとんど生じていない「良性期」と、膵β細胞の破壊が生じている「悪性期」があり、悪性期になってはじめて膵β細胞が減少しはじめ、その約3週後に糖尿病が発症するということを報告した⁴⁵⁾。しかし、Shimada らの報告では直接膵β細胞容積の観察はしておらず、Gazda らの報告では膵島移植や全身麻酔による侵襲が糖尿病発症に影響を与えた可能性を否定できなかった。

こうした論議に結論をだすべく、本研究ではドナーのNODマウスの膵β細胞容積を直接観察した上で、その糖尿病発症性をレシピエントのNOD-scidマウスに再現して、レシピエントにおける脾細胞移入後の発症までの期間とドナーにおける膵β細胞容積との関係を検討することとした。

著者による検討の結果として、ドナーの膵インスリン含有量や膵島炎スコアとレシピエントの発症までの時間の関係には直線相関は認められなかった。このことはNODマウスの膵β細胞容積が徐々に(直線的に)減少するというEisenbarth¹³⁾やSreenan⁴⁴⁾の説とは一致しないものであった。逆に、本研究の結果では、レシピエントの発症に7週かかったドナーの膵インスリン含有量や膵島炎スコアは、レシピエントをまったく発症させなかったドナーの膵インスリン含有量や膵島炎スコアと同等であり、レシピエントの発症に6週以下しかかからなかったドナーの膵インスリン含有量や膵島炎スコアは、すでに糖尿病を発症しているNODマウスの膵インスリン含有量や膵島炎スコアと同等であった。このことは、わずかに1-2週の違いでも膵β細胞容積に大きな差異が存在する可能性を示しており、糖尿病発症の直前に

膵β細胞容積が激減するとするShimada⁴⁴⁾らやGazda⁴⁵⁾らの説と一致するものであった(第5図)。最近、Ryu らは、すでに糖尿病を発症してしまったNODマウスでも自己免疫機序を抑制させることで内因性のβ細胞機能が復活することを示した⁴⁸⁾。こうしたことから、Palmer は1型糖尿病の過程において糖尿病発症直後ですらある程度の膵β細胞容積が保持されている可能性があることを提唱している⁴⁹⁾。本研究を含む、こうした報告を合わせて考えると、1型糖尿病における膵β細胞容積保持のための介入は糖尿病発症の直前(あるいは直後)でも可能であることが示唆される。

次に、著者は、新たな発症予知マーカーの発見につなげるべく、β細胞破壊の進展とともに変動する因子の検索を試みた。これまで、発症予知の方法として、遺伝子や膵島関連自己抗体を用いる方法が提唱されている⁶⁾。しかし、最近ではNODマウスにおける発症予知マーカーの候補であるインスリン自己抗体(IAA)が⁵⁰⁾、糖尿病を発症しないNORマウス⁵¹⁾やインスリンB鎖B9-23ペプチドで免疫づけされたBalb/cマウス⁵²⁾にも認められ、その発症予知マーカーとしての有用性が否定されつつある。自己抗体の存在が発症予知マーカーになりにくいことは、GAD抗体の存在が必ずしもその時点での膵β細胞の欠乏を意味しない緩徐進行型1型糖尿病の存在⁵³⁾からも明らかである。こうしたことをふまえ、本研究では、脾細胞のTh1/Th2バランス、NKT細胞様細胞の比率、酸化型PECの比率などの状態がどのように糖尿病発症に関与するかを検討した。実際には、先の実験において膵β細胞容積が発症直前に激減することが明らかになったことを踏まえ、これらの因子がレシピエントが糖尿病を発症するのに7週以上かかったNODドナー(B群)と6週以下であったNODドナー(C群)との間で有意差をもつかを検討した。

まず、著者は脾細胞のサイトカイン反応を検討した。Shimada らによれば、抗CD3抗体による抗原非特異的な刺激に対して、若週齢のNODマウスのCD4陽性CD45RB^{hi}脾細胞はIL-4優位に、糖尿病発症後のNODマウスのCD4陽性CD45RB^{hi}脾細胞はIFN-γ優位に反応する⁴⁶⁾。これはMosmann らの概念⁴⁵⁾のTh2からTh1へのシフトを意味する。発症に先んじてこのTh2からTh1への変化が生じているのであれば、これを発症の予知に用いられるはずである。しかし、今回の検討では、抗CD3抗体刺激に対してCD4陽性脾細胞からIL-4を検出できた個体はなく、IL-4とならぶTh2サイトカインであるIL-10やTh1サイトカインであるIFN-γでの検討においても、発症予知への応用は困難で

あった(第8図)。

そこで、抗原非特異的な反応ではなく、膵島抗原特異的な反応を検討するべく、GADあるいはインスリンの刺激下でのサイトカイン反応を検討した。しかし、この検討でもIL-4はどの個体からも検出できず、IL-10とIFN- γ についても、特異的反応の検出は困難であった。

そこで、*in vitro*で刺激を加えることが、生体内での現象に修飾を与えてしまう可能性を考慮し、無処置のまま脾臓からmRNAを抽出して*in vivo*におけるサイトカイン発現を類推することを試みた。しかし、この検討でもIFN- γ 、IL-10の両者とも特徴的な所見を示さなかった(第9図)。

MosmannらがTh1/Th2の概念を提唱したのは、同じヘルパーT細胞の中にも機能的に異なる2つの亜群がある、ということからであった⁴⁷⁾。よって、本来、Th1/Th2の分類は産生されるサイトカイン反応のみで正当である。しかし、本研究では、産生されるサイトカインでは特徴的な結果が得られなかったため、Th1/Th2に関与すると考えられている細胞表面マーカーに着目することにした。ここでは、特にケモカイン受容体であるCXCR3に注目した。最近の報告では、Th1細胞はその表面にCXCR3やCCケモカイン受容体5(CCR5)を発現し、Th2はCCR4などを発現すると考えられている^{20,21)}。また、Shimadaらによれば、日本人1型糖尿病患者の血清中においてCXCケモカインリガンド(CXCL)10が高値である⁵⁴⁾。CXCR3はCXCL10の受容体であり、Th1細胞の表面マーカーとされている⁵⁵⁾ため、発症予知に使用できる可能性が考えられた。著者らの検討では、発症後時間の経過した日本人1型糖尿病患者の末梢血におけるCXCR3陽性細胞は増加していたのだが(unpublished observation)、Lohmannらによるとドイツ人1型糖尿病患者の末梢血におけるCXCR3陽性細胞の比率は、発症直後においてのみ有意に低下し、発症後時間の経過した症例ではコントロール群と有意差を認めなかった⁵⁶⁾。このため、本研究においても発症後時間の経過したマウスを除き、C群として未発症のNODマウスに限定して検討することとした。その結果、統計学的な有意差はないものの、C群において高値の傾向が認められた(第10図)。

サイトカイン反応では差が認められないものの、Th1細胞の表面マーカーでは差異の傾向が見られたことから、Th1/Th2バランスのより上流の反応を調べることの有用性が考えられた。Th1/Th2バランスの上流には、NKT細胞やマクロファージの存在が提唱されている。

1型糖尿病患者のV α 24J α Q T細胞は、数が少なく、

またサイトカイン反応ではIFN- γ 産生に偏っていることが報告されている²³⁾。しかし、日本人1型糖尿病においては逆にV α 24V β 11T細胞の数が多く²⁴⁾、1型糖尿病発症におけるNKT細胞の役割は未だ不明である。NODマウスにおいては、NK1.1の発現がなく、NKT細胞を定義することが難しい²⁵⁾。そこで、今回、著者はT細胞受容体(T cell receptor; TCR) α/β 陽性CD4陰性CD8陰性細胞をNKT細胞様細胞と定義し²⁶⁾、そのTCR α/β 陽性細胞に対する比率を検討した。その結果、NKT細胞様細胞は群間では差異を認めなかった(第11図)。

そこで、著者はマクロファージに着目した。MillsらはTh1優位のC57BL/6マウスとTh2優位のBalb/cマウスとでそのマクロファージの機能が異なることを示し、Th1を誘導するマクロファージをM-1、Th2を誘導するマクロファージをM-2と呼ぶことを提唱したが³⁷⁾、それ以前よりPetersonらは抗原提示細胞中のグルタチオンレベルがTh1/Th2バランスに影響を与えることを報告していた²⁷⁾。このため、マクロファージのTh1/Th2バランスに対する影響の指標として、別の言い方をすれば、M-1/M-2状態の指標として、そのグルタチオンレベルの検討が有用ということが提唱されつつある^{58,59)}。グルタチオンはレドックス制御による細胞周期や遺伝子発現のコントロールにおいて重要な役割を果たす小分子であり、酸化ストレスに反応してグルタチオンジスルフィドを形成する。こうしたことから本研究では、グルタチオンに乏しくグルタチオンジスルフィドの多い酸化型PECが総PECに占める比率が全身におけるM-2あるいはTh2への指向性を表現するという仮説を立て、これを検証した。その結果、酸化型PECによってC群をA群(糖尿病発症性のないNODドナー)やB群から区別することができた²⁸⁾。すなわち、すべてのC群のマウスは酸化型PECが10%未満(平均6.6%)であり、すべてのA群のマウスとB群のマウスのほとんどが10%以上であった(平均15.9%、14.7%)(第12図)。これらのデータは膵 β 細胞容積の減少に同期して酸化型PECが減少することを示唆しており、その評価によって糖尿病発症を予知できる可能性を示している。

さらに酸化型PECと膵島炎スコアとの関係を検討したところ、両者は逆相関し、酸化型PECが膵島局所の病態を反映している可能性が考えられた(第13図)。

今後、この知見を臨床に生かす場合、現実的には、ヒトの腹腔浸出細胞を検査することは困難であり、腹腔浸出細胞に替わって評価可能な末梢血中マーカーをさらに検索していく必要があると思われた。

総 括

1型糖尿病のモデル動物である non-obesediabetic (NOD) マウスの脾細胞を、遺伝的な背景は NOD マウスと同様ながら有効なリンパ球を欠如する NOD-scid (severe combined immuno-deficiency) マウスに移入して、レシピエントが糖尿病を発症するまでの週数を検討することによって、ドナーの NOD マウスの糖尿病発症までの期間を類推した。また、その際にドナーの膵β細胞容積やその他の因子を調べ、糖尿病発症までの期間との関係を検討することにより、以下の結果および結論を得た。

1. 1型糖尿病発症の直前まで膵β細胞容積は保持されていることを見出した。

2. その膵β細胞容積の減少に同期して酸化型腹腔浸出細胞(酸化型 PEC)が減少することを明らかにした。

3. 膵β細胞容積の減少に同期して、脾細胞のサイトカイン反応、NKT細胞数、CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) 陽性細胞数が変化することは確認できなかった。

以上のことから1型糖尿病モデルマウスにおいて酸化型 PEC の評価によって糖尿病発症を予測できる可能性が見出された。今後、ヒト1型糖尿病予防法の確立のために、酸化型 PEC にかわってヒトにおいて検討可能な予知マーカーをさらに検索するべきであると考えられた。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。本研究に際し、直接ご指導、ご校閲をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室島田朗先生に深謝いたします。また、本研究に終始ご指導、ご協力いただいた埼玉社会保険病院内科丸山太郎先生に感謝いたします。また、マウス CXCR3 用のプライマーをご提供くださった東京大学大学院医学研究科分子予防医学教室成見正作先生に深謝いたします。

なお、本研究のうち、NKT細胞の検討については慶應義塾大学医学部内科学教室及川洋一先生が、酸化型 PEC の検討については慶應義塾大学医学部内科学教室入江潤一郎先生が著者と同等の貢献者である。

文 献

1) 葛谷 健, 中川 昌一, 佐藤 譲, 金澤 康徳, 岩本

安彦, 小林 正, 南峰 輝志男, 佐々木 陽, 清野 裕, 伊藤 千賀子, 島 健二, 野中 共平, 門脇 孝: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. 糖尿病, 42: 385-404, 1999

- 2) The Diabetes Epidemiology Research International (DERI) Study Group: International analysis of insulin-dependent diabetes mellitus mortality: a preventable mortality perspective. *Am J Epidemiol* 142: 612-618, 1995
- 3) Nishimura R, Matsushima M, Tajima N, Agata T, Shimizu H, LaPorte RE: A major improvement in the prognosis of individuals with IDDM in the past 30 years in Japan. *Diabetes Care* 19: 758-760, 1996
- 4) Dorman JS, LaPorte RE, Kuller LH, Cruickshanks KJ, Orchard TJ, Wagener DK, Becker DJ, Cavender DE, Drash AL: The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. *Diabetes* 33: 271-276, 1984
- 5) Lin-Su K, Kukreja A, Maclaren NK: Diabetes vaccines: a future to be realized. *Diabetes Technol Ther* 3: 451-461, 2001
- 6) Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Chase HP, Eisenbarth GS: Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type 1 diabetes. *J Autoimmun* 9: 379-383, 1996
- 7) Ikegami H, Ogihara T: Genetics of insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr J.* 43: 605-613, 1996
- 8) Matsuda A, Kuzuya T: Diabetic twins in Japan. *Diabetes Res Clin Pract* 24: S63, 1994
- 9) Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo GF, Gale EA: Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 43: 1304-1310, 1994
- 10) Verge CF, Gianni R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS: Prediction of type 1 diabetes in first degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45: 926-933, 1996
- 11) 米村 豊: ラット膵部分切除後のラ島再生. *医学のあゆみ*, 114: 354-356, 1980
- 12) 米村 豊, 宮崎 逸夫, 三輪 兎一, 荻野 茂, 松木 伸夫, 高島 茂樹: 膵大量切除後の残存膵内分泌機能. *日外会誌*, 82: 671-680, 1981
- 13) Eisenbarth GS: Type 1 diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314: 1360-1368, 1986
- 14) Shimada A, Charlton B, Taylor-Edwards C, Fathmann CG: Beta cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 45: 1063-1067, 1996
- 15) Hanafusa T, Sugihara S, Fujino-Kurihara H, Miyagawa J, Miyazaki A, Yoshida T, Yamada K,

- Nakajima H, Asakawa H, Kono N, Fujiwara H, Hamaoka T, Tarui S : Induction of insulinitis by adoptive transfer with L3T4+Lyt2- T-lymphocytes in T-lymphocyte-depleted NOD mice. *Diabetes* 37 : 204-208, 1988
- 16) 島田 朗 : インスリン依存型糖尿病発症に関する免疫学的研究—NOD マウスにおける腹腔内マクロファージの移入—. *慶應医学*, 70 : 81-91, 1993
- 17) Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y : Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35 : 855-860, 1986
- 18) Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH : The nonobese diabetic scid mouse : Model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 3290-3294, 1992
- 19) Rohane PW, Shimada A, Kim DT, Edwards CT, Charlton B, Shultz LD, Fathman CG : Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. *Diabetes* 44 : 550-554, 1995
- 20) Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW : CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 6873-6878, 1999
- 21) Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, Butcher EC : Rules of chemokine receptor association with T cell polarization *in vivo*. *J Clin Invest* 108 : 1331-1339, 2001
- 22) Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Esley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N : Multiple immuno-regulatory defects in type 1 diabetes. *J Clin Invest* 109 : 131-140, 2002
- 23) Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA : Extreme Th1 bias of invariant V alpha24 J alphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391 : 177-181, 1998
- 24) Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, Motohashi Y, Nakagawa Y, Irie J, Maruyama T, Saruta T : High frequency of V alpha24(+) V beta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25 : 1818-1823, 2002
- 25) Gombert JM, Herbelin A, Tancrede-Bohin E, Dy M, Carnaud C, Bach JF : Early quantitative and functional deficiency of NK1+/-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26 : 2989-2998, 1996
- 26) Hammond KJL, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG : α/β -T cell receptor (TCR) CD4⁻CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187 : 1047-1056, 1998
- 27) Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C : Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 3071-3076, 1998
- 28) Yamada S, Irie J, Shimada A, Kodama K, Morimoto J, Suzuki R, Oikawa Y, Saruta T : Assessment of beta cell mass and oxidative peritoneal exudate cells in murine type 1 diabetes using adoptive transfer system. *Autoimmunity* 36 : 63-70, 2003
- 29) Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J : Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes—the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 42 : 1395-1403, 1999
- 30) Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukkaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M : Finnish Diabetes Prevention Study Group : Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344 : 1343-1350, 2001
- 31) Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM : Diabetes Prevention Program Research Group : Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346 : 393-403, 2002
- 32) Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M : STOP-NIDDM Trial Research Group : Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus : the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet* 359 : 2072-2077, 2002
- 33) Diabetes Prevention Trial Type 1 Diabetes Study Group : Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346 : 1685-1691, 2002
- 34) Schatz DA, Bingley PJ : Update on major trials for the prevention of type 1 diabetes mellitus : the American Diabetes Prevention Trial (DPT-1) and the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *J Pediatr Endocrinol Metab* 14 : suppl 1619-622, 2001
- 35) She JX : Susceptibility to type 1 diabetes : HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* 17 : 323-329, 1996
- 36) Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F, Nerup J, Bouzekri N, Cambon-Thomsen A, Roenningen KS, Barnett AH, Bain SC, Todd JA : Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 9 : 284-292, 1995
- 37) Awata T, Shibasaki Y, Hirai H, Okabe T, Kanazawa Y, Takaku F : Restriction fragment length polymorphism of the insulin gene region in Japanese diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 28 : 911-913,

1985

- 38) Takeda J, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Otsuka A, Ikeda M, Kuno S, Yawata M, Moridera K, Morita T, Tsuda K, Imura H : The polymorphism linked to the human insulin gene : its lack of association with either IDDM or NIDDM in Japanese. *Acta Endocrinol* 113 : 268-271, 1986
- 39) Matsumoto C, Awata T, Iwamoto Y, Kuzuya T, Saito T, Kanazawa Y : Lack of association of the insulin gene region with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia* 37 : 210-213, 1994
- 40) Kawaguchi Y, Ikegami H, Shen GQ, Nakagawa Y, Fujisawa T, Hamada Y, Ueda H, Fu J, Uchigata Y, Kitagawa Y, Omori Y, Shima K, Ogihara T : Insulin gene region contributes to genetic susceptibility to, but may not to low incidence of, insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 233 : 283-287, 1997
- 41) Matsuda A, Kuzuya T, Iwamoto Y, Yoshioka N, Awata T, Kumakura S, Ohwada N : HLA DR antigens in adult-onset and juvenile-onset Japanese insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 13 : 107-112, 1988
- 42) Sakurami T, Ueno Y, Nagaoka K, Kuno S, Iwaki Y, Park MS, Terasaki PI : HLA-DR specifications in Japanese with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 31 : 105-106, 1982
- 43) Watanabe K, Tanaka R, Nishimura T, Kumagai Y, Miyazaki J, Yamamura K, Habu S : I-E-restricted monoclonal expansion of B lymphocytes in the thymus of NOD mouse. *Int Immunol* 3 : 839-842, 1991
- 44) Sreenen S, Pick AJ, Levisetti M, Baldwin AC, Pugh W, Polonsky KS : Increased beta-cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes* 48 : 989-996, 1999
- 45) Gazda LS, Charlton B, Lafferty KJ : Diabetes results from a late change in the autoimmune response of NOD mice. *J Autoimmun* 10 : 261-270, 1997
- 46) Shimada A, Rohane P, Fathman CG, Charlton B : Pathogenic and protective roles of CD45R^{low} CD4⁺ cells correlate with cytokine profiles in the spontaneously autoimmune diabetic mouse. *Diabetes* 45 : 71-78, 1996
- 47) Mosmann TR, Coffman RL : Th1 and Th2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7 : 145-173, 1989
- 48) Ryu S, Kodama S, Ryu K, Schoenfeld DA, Faustman DL : Reversal of established autoimmune diabetes by restoration of endogeneous beta cell function. *J Clin Invest* 108 : 63-72, 2001
- 49) Palmer JP : Immunomodulatory therapy of human type 1 diabetes : lessons from the mouse. *J Clin Invest* 108 : 31-33, 2001
- 50) Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS : Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse : evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 1701-1706, 2000
- 51) Abiru N, Yu L, Miao D, Maniatis AK, Liu E, Moriyama H, Eisenbarth GS : Transient insulin autoantibody expression independent of development of diabetes : comparison of NOD and NOR strains. *J Autoimmun* 17 : 1-6, 2001
- 52) Abiru N, Maniatis AK, Yu L, Miao D, Moriyama H, Wegmann D, Eisenbarth GS : Peptide and major histocompatibility complex-specific breaking of humoral tolerance to native insulin with the B9-23 peptide in diabetes-prone and normal mice. *Diabetes* 50 : 1274-1281, 2001
- 53) Kobayashi T : Subtype of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in Japan : slowly progressive IDDM-the clinical characteristics and pathogenesis of the syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 24 : S95-99, 1994
- 54) Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T, Narumi S : Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24 : 510-515, 2001
- 55) 松島 綱治, 米山 博之 : ケモカイン. *Minophagen medical review* 47 : 57-67, 2002
- 56) Lohman T, Laue S, Nietzschmann U, Kapellen TM, Lehmann I, Schroeder S, Paschke R, Kiess W : Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes* 51 : 2474-2480, 2002
- 57) Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM : M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164 : 6166-6173, 2000
- 58) Dobashi K, Aihara M, Araki T, Shimizu Y, Utsugi M, Iizuka K, Murata Y, Hamuro J, Nakazawa T, Mori M : Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN-gamma and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 124 : 290-296, 2001
- 59) Murata Y, Shimamura T, Hamuro J : The polarization of Th1/Th2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 14 : 201-212, 2002

学位論文

内側膝蓋大腿靭帯の機能解剖学のおよび臨床的研究

慶應義塾大学整形外科学教室

(指導：戸山芳昭教授)

の 野 村 栄 貴

(平成 15 年 9 月 26 日受付)

Key words : medial patellofemoral ligament, functional anatomy, reconstruction, patella, dislocation

反復性膝蓋骨脱臼・亜脱臼は若年女性に多く見られる疾患である。その発生に関与する数多くの先天的解剖学的因子、膝蓋骨不安定障害およびそれに伴う anterior knee pain (膝蓋骨前部痛) を治すために、現在まで 100 種類以上もの手術方法が報告されてきた¹⁻⁶⁾。反復性膝蓋骨脱臼の手術法は、外側解離術、内側縫縮術、近位リアライメント、遠位リアライメント、近位および遠位リアライメントの組み合わせ、などに大別されてきた⁶⁾。これら手術法の結果は概ね良好であり、しかも術後の再脱臼は稀であると報告されてきた一方で、膝蓋骨脱臼の再発、再脱臼はないものの不安定感の残存、膝蓋大腿関節症の進行、膝屈曲制限、膝蓋骨内側亜脱臼などの合併症が決して少なくないことも判明している^{1,4-10)}。反復性膝蓋骨脱臼の手術法は 1938 年に遠位リアライメントを代表する Hauser 法¹¹⁾が報告されて以後、大きな進展をみていない。Hughston ら⁹⁾は、過去に Roux (1888) と Krogus (1904) が述べた本疾患の治療法に関する考え方は今日用いられる治療法とほとんど共通している、とまで述べている。

一方、急性膝蓋骨脱臼によって起こる新たな損傷は、当然反復性膝蓋骨脱臼に移行する大きな危険因子にもかかわらず、1990 年頃までは看過され、初回脱臼発生以前から既に存在していた先天的解剖学的因子のみに注意が向けられてきた^{1,3-6)}。急性膝蓋骨脱臼の治療は主に関節内血腫を除去しギプス固定や副木固定が行われてきたが¹²⁻¹⁵⁾、『どの損傷を治すために固定が必要なのか』な

どの最も基本的な疑問点にさえ明確な答えはないままに、経験則で治療が続けられてきた。またギプス固定や副木固定などの治療で十分であるとした従来の保存的治療法は平均 13 年もの長期追跡調査の研究結果から、実に 67 % の患者で成績不良であることが判明した¹⁵⁾。このように、膝蓋骨脱臼の治療法に関しては医療側に多くの疑問点、問題点が存在していたことも事実である。

この 10 年の間に内側膝蓋大腿靭帯 (medial patellofemoral ligament ; MPFL) の機能解剖学的研究が進み、MPFL は膝蓋骨外方制動に関わる最も重要な因子とされ、膝蓋骨外方脱臼の病態や治療法に大きな転換を迫る可能性が出てきた^{2,3,16-40)}。1957 年の Kaplan⁴¹⁾の膝関節解剖の論文の中に、横走支帯靭帯 (transverse retinacular ligament) という記載があり、これが後に MPFL として呼ばれるようになった。1990 年以前にはわずかに Reider らや Warren ら^{42,43)}が、MPFL について彼らの論文の中で一部簡単に記載してあるのみで、一般に膝関節の研究者でさえその靭帯の存在を知るものは少なかった。しかし、1990 年以後 MPFL に関する臨床的・基礎的研究が少しずつ報告され始めた。筆者も本邦で 1991 年に内側膝蓋大腿靭帯損傷の 3 例²⁷⁾を、1992 年に内側膝蓋大腿靭帯の解剖所見²⁸⁾、人工靭帯を用いた内側膝蓋大腿靭帯再建術²⁹⁾、1993 年に内側膝蓋大腿靭帯の機能解剖³⁰⁾について報告した。海外での報告も同時期に始まり、1992 年に Avikainenn ら¹⁷⁾が大内転筋腱を用いた内側膝蓋大腿靭

本論文は、Nomura E : Classification for the lesions of the medial patellofemoral ligament in patellar dislocation. Int Orthop 23 : 260-263, 1999 の一部、Nomura E, Horiuchi Y, Kihara M : A mid-term follow-up of the medial patellofemoral ligament reconstruction using an artificial ligament for recurrent patellar dislocation. Knee 7 : 211-215, 2000 の一部、Nomura E, Horiuchi Y, Kihara M : Medial patellofemoral ligament restraint in lateral patellar translation and reconstruction. Knee 7 : 121-127, 2000 の一部を含む。

帯再建術, 1993年に Ellera Gomes²²が人工靭帯を用いた内側膝蓋大腿靭帯再建術, Conlanら¹⁹がMPFLの切離実験, Fellerら²⁰がMPFLの解剖所見について報告している. 特に最近5年間にMPFLに関して多くの報告がなされ, MPFLの膝蓋骨外方制動における第1制御機構としての重要性は世界的にもコンセンサスが得られつつある^{2,15}. しかし, MPFLの詳細な機能, 臨床例でのMPFL損傷形式や遺残靭帯などの所見, MPFL再建方法や手術成績の中長期成績の検討など, いまだ不明な点も多い.

本研究の目的は, 1) 膝関節の広範な可動域内でのMPFLの制動機能を検討し, 新たなMPFL再建法を確立すること, 2) 急性及び反復性膝蓋骨脱臼例でのMPFL所見を詳細に検討すること, 3) 基礎的実験で証明された反復性膝蓋骨脱臼例に対するMPFL再建法を用いた臨床的研究を行い, その成績を詳細に分析して本手術法の妥当性を検証する, ことである.

材料および方法

1. 内側膝蓋骨支持機構の切離実験およびMPFL再建効果

MPFLの機能およびMPFLの再建術の効果を調べるために, 新鮮凍結切断肢10膝関節を用いた. 標本は実験24時間前より約20°の室温にて解凍した. 切断時の患者の年齢は平均55±7歳(男7膝, 女3膝)で実験前に全標本でX線検査を行い, 関節症変化のないことを確認した. なお, 切断肢の使用に当っては, 患者本人ならびに家族に本実験の主旨を十分に説明し, 許可を得て行った.

以下の実験群を設定した.

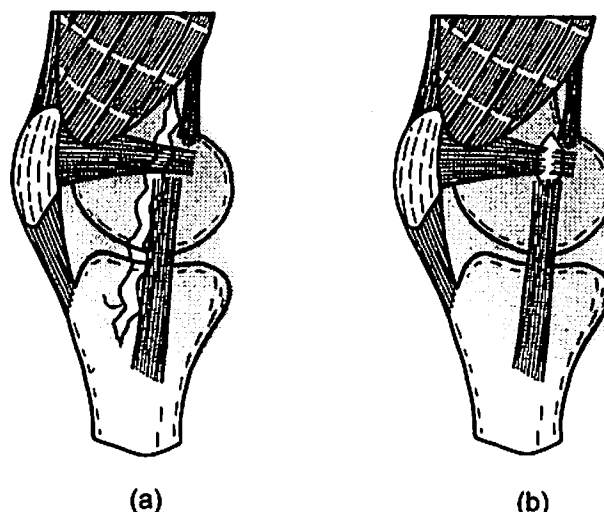
A群(無切離, 負荷無し); 内側膝蓋骨支持機構は全く無傷で, 膝蓋骨に負荷を全くかけない.

B群(無切離, 1kgf負荷); 内側膝蓋骨支持機構は全く無傷で, 膝蓋骨に1kgfの負荷をかける.

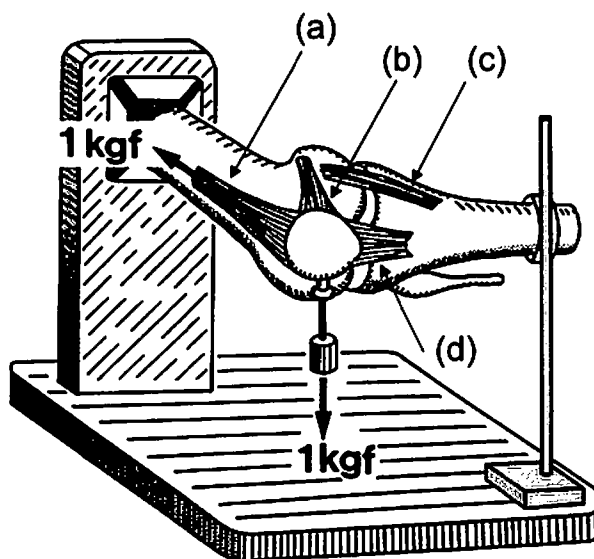
C群(内側膝蓋支帯単独切離, 1kgf負荷); 内側膝蓋支帯を内側側副靭帯のすぐ前方で内側広筋から鷲足まで切離し, 膝蓋骨に1kgfの負荷をかける(第1図a).

D群(MPFL単独切離, 1kgf負荷); 内側膝蓋大腿靭帯を切離し, 膝蓋骨に1kgfの負荷をかける. 大腿骨内側上顆近くで, 内側膝蓋支帯を2~3cm切離しMPFLを同定する. MPFLのみを切離したのち, 上の内側膝蓋支帯を2-0ナイロン糸にて縫合する(第1図b).

E群(内側膝蓋支帯およびMPFL切離, 1kgf負荷);



第1図 実験方法のシェーマ (Nomura E et al: Knee 7: 121-127, 2000のFigure 1を許可を得て転載). (a) 内側膝蓋支帯切離: 内側膝蓋支帯を内側側副靭帯のすぐ前方で内側広筋から鷲足まで切離する. (b) 内側膝蓋大腿靭帯切離: 大腿骨内側上顆近くで内側膝蓋支帯を2~3cm切離し下のMPFLのみを切離したのち, 内側膝蓋支帯を2-0ナイロンにて縫合する. 点部分: 内側膝蓋支帯



第2図 実験装置 (Nomura E et al: Knee 7: 121-127, 2000のFigure 3を許可を得て転載). 標本の大腿骨近位部を実験台のマウントに固定する. 大腿骨外側上顆および内側上顆を結ぶ線が垂直で大腿骨外側上顆が下になるようにする. 膝の屈曲角度の設定は脛骨前面を棒で固定することで行う. a: 大腿四等筋腱, b: 内側側副靭帯, c: 膝蓋腱, d: 内側膝蓋大腿靭帯

内側膝蓋支帯およびMPFLを切離し、膝蓋骨に1kgfの負荷をかける。

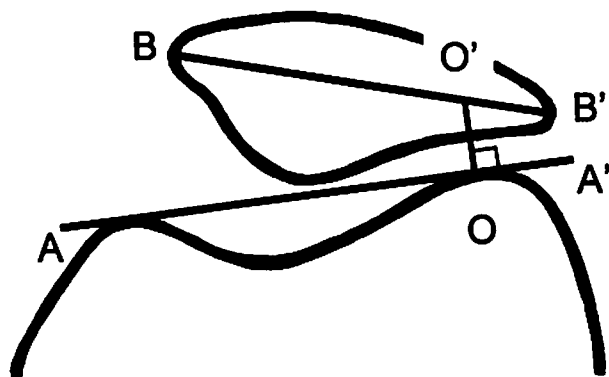
F群(MPFL再建, 負荷無し)：内側膝蓋支帯およびMPFLを切離したのち、MPFLのみを人工靱帯で再建し、膝蓋骨に負荷かけない。

G群(MPFL再建, 1kgf負荷)：内側膝蓋支帯およびMPFLを切離したのち、MPFLのみを人工靱帯で再建し、膝蓋骨に1kgfの負荷をかける。

皮膚および皮下組織を切除したのち、大腿骨を実験台のマウントに固定する。大腿骨外側上顆および内側上顆を結ぶ線が垂直で、大腿骨外側上顆が下になるようにする。実験の間、0.9%生理食塩水を頻りに標本にかけて湿润状態を保つようにする。大腿四頭筋腱に1号サージョン糸をかけて、これに1kgの重りをかける。膝蓋骨にかける負荷は、膝蓋骨外側縁中央から30mmの蝶子を入れ、この蝶子に1kgの重錘をかけた。膝蓋骨の回旋、傾きは制限されなかった。膝の屈曲角度は脛骨前面の棒で設定した(第2図)。MPFL再建方法は、まず膝蓋骨内側縁上1/3から膝蓋骨前面にくの字型の骨トンネルを3.5mmドリルで開ける。10mm幅Leeds-Keio人工靱帯をトンネル内に通し、2本の束ねた靱帯を60°屈曲位で、内転筋結節のすぐ遠位部にダブルステイプリング法で固定する。

切離順序はイおよびロの2つに分け、それぞれ5例ずつ行った。

切離順序イは、A群→B群→C群→E群→F群→G群の順序で切離した。切離順序ロは、A群→B群→D群→E群→F群→G群の順序で切離した。各切離群において、



第3図：膝蓋骨外側移動度 (lateral shift ratio)。AA'線は大腿骨内外側顆部の頂点を結ぶ線である。BB'線は膝蓋骨の内側端と外側端を結ぶ線である。OO'線はAA'線に直角をなす。膝蓋骨外側移動度はO'B'/BB'で表される。(Nomura E et al : Knee 7 : 121-127, 2000 の Figure 4 を許可を得て転載)

膝屈曲20、30、45、60、90、120度で膝蓋骨軸射X線写真を撮影し、膝蓋骨外側移動度 (lateral shift ratio)⁴⁴⁾を計測した(第3図)。実験群A、B、F、Gではcongruence angle⁴⁵⁾も測定した。軸射X線撮影はX線管から膝蓋骨中央までの距離が1m、膝蓋骨中央からフィルムまでの距離が10cmの条件で行った。各実験条件で、切離後2分以上経ってからX線撮影を行った。

2. 急性および陳旧性膝蓋骨脱臼例でのMPFL所見

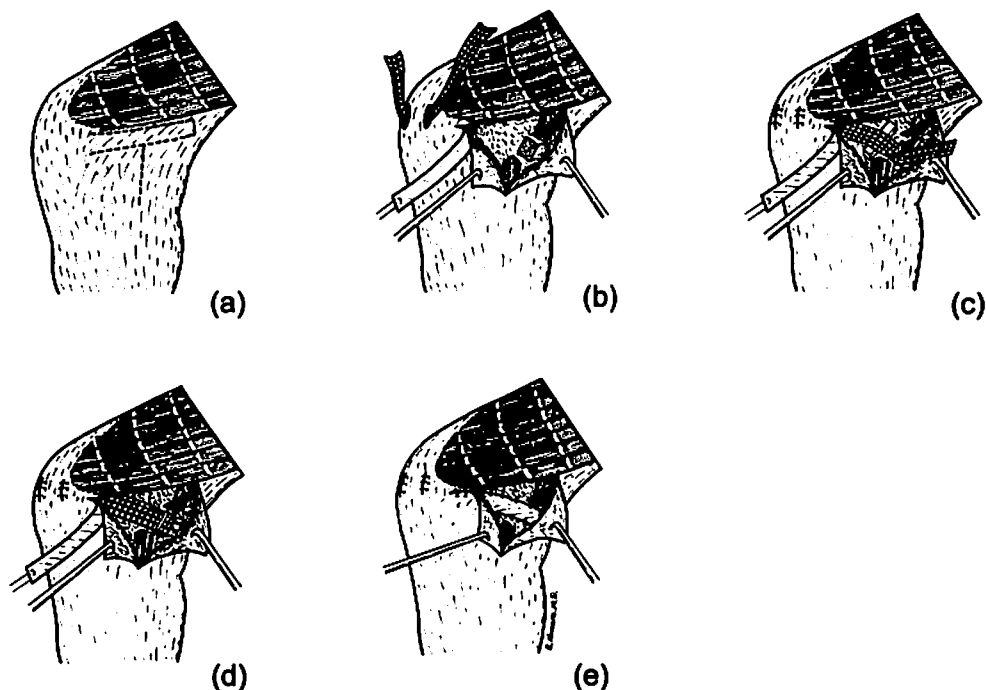
膝蓋骨内側支持機構においてMPFLが膝蓋骨外側方向への第1制御機構であることが確実なものとなるためには、臨床面からも証明される必要がある。そのためには急性および陳旧性膝蓋骨脱臼例でMPFL不全、すなわちMPFLに異常所見を認めることが重要である。そこで筆者は、急性膝蓋骨脱臼18例18膝、陳旧性膝蓋骨脱臼45例49膝のMPFL所見を術中肉眼的に観察した。急性膝蓋骨脱臼は、18例18膝で男性5膝、女性13膝であった。また左側罹患6膝、右側罹患12膝で、受傷時年齢は平均19±6歳であった。陳旧性膝蓋骨脱臼は、45例49膝で、男性11例、女性34例であった。4例が両側罹患で全て女性であった。調査時年齢は平均22±9歳、初回脱臼時年齢は平均15±3歳であった。初回脱臼から手術までの期間は1年以内が11膝、1～5年が17膝、5年以上が21膝であった。

3. 反復性膝蓋骨脱臼に対するMPFL再建術の臨床的研究

生体力学および臨床的研究から、膝蓋骨外側脱臼におけるMPFLの重要性が証明され、筆者が考案したMPFL再建法の有効性も実験的に確かめられた。そこで筆者は自家考案のMPFL再建術の臨床的有効性を検証するために、1991年から1995年にかけて反復性膝蓋骨脱臼24例27膝関節に対してLeeds-Keio人工靱帯と内側膝蓋支帯片被覆を組み合わせたMPFL再建術を行った。

対象症例は24例27膝、男性5例、女性19例で両側罹患は3例であった。手術時年齢は平均21±7歳であった。右側罹患は14膝、左側罹患は13膝であった。術後追跡調査期間は平均5.9±1.4年である。Crosby⁴⁶⁾はX線写真による膝蓋大腿関節の変形性変化を、none to mild, moderate, severeの3段階に分類しているが、本症例はnone to mildに当てはまる例のみに限定した。外側解離術は膝蓋骨外側支持機構の緊張の強い例を適応とし、27膝中10膝(37%)に行った。

臨床所見として膝関節可動域、膝蓋骨異常可動性、膝



第4図 内側膝蓋大腿靭帯再建術の手順 (Nomura E et al: Knee 7: 211-215, 2000 の Figure 1 を許可を得て転載). 膝蓋骨内側縁から10~15mmの所から内側広筋に沿って、幅10mm長さ6~8cmの内側膝蓋支帯片を作成する(a). 15mm幅人工靭帯を膝蓋骨の骨トンネルに通し、2本の靭帯を内側膝蓋支帯の下を通して内側に引き出す。内転筋結節すぐ遠位部の解剖学的大腿骨付着部の骨膜を幅1cm長さ2cmの大きさに剥離し、反転する(b). 膝60度屈曲位に保持し人工靭帯と大腿骨の間にテンションスペーサーを挟む。膝蓋骨を徒手的に大腿骨膝蓋溝の中央に位置させたことを確認したのち、人工靭帯に最小限の張力をかけ仮ステープルにて固定する(c). テンションスペーサーを除き、膝を全可動域動かして、靭帯の緊張が良好なことを確認したのち、仮ステープルを取りダブルステープリング固定する(d). ステープルの上を先ほど反転した骨膜で被覆縫合し、さらに人工靭帯全体を先ほど作成した内側膝蓋支帯片で被覆縫合する(e).

蓋骨不安徴候 (apprehension sign), 大腿四頭筋角 (Quadriceps angle) を調査した。膝蓋骨異常可動性については正常, 軽度, 高度に分類した。軽度はやや緩いが脱臼位までいかないもの, 高度は明らかに脱臼位まで行くものと定義した。次に膝屈曲30度軸射X線写真を用いて sulcus angle と congruence angle を測定した。また膝側面X線写真から Insall 法⁶⁾を用いて膝蓋骨の高さも測定した。手術結果の総合的評価は Crosby と Insall 法⁷⁾を用いて優・良・可・不可の4つに分類し検討した。なお筆者が手術および評価をすべて行った。

手術手技: 膝内側部中央に4~6cmの縦皮切をおく。膝蓋骨内側縁から10~15mmの所から内側広筋に沿って、幅10mm長さ6~8cmの内側膝蓋支帯片を作成する(第4図a-f)。膝蓋骨骨トンネルは3.5mm drillを用いて膝蓋骨内縁上1/3から膝蓋骨前面中央部にくの字状に開孔する。15mm幅人工靭帯をその骨トンネルに通し、2本の靭帯を内側膝蓋支帯の下を通し、内側

に引き出す。内転筋結節すぐ遠位部の解剖学的大腿骨付着部の骨膜を幅1cm長さ2cmの大きさに剥離し、反転する。膝60度屈曲位に保持し、人工靭帯と骨の間にテンションスペーサーを挟む。膝蓋骨を徒手的に大腿骨膝蓋溝の中央に位置させたことを確認したのち、人工靭帯をダブルステープルにて固定する。テンションスペーサーを除き、膝を全可動域動かして、靭帯の緊張が良好なことを確認する。ステープルの上を先ほど反転した骨膜で被覆縫合する。内側広筋と内側膝蓋支帯をマットレス縫合する。この時点で、膝を0~90度動かして縫合部が破れないことを確認する。皮下に吸引ドレーンを留置し、皮下、皮膚を追層縫合する。

後療法: 術後簡易膝伸展装置で固定する。術後1日目より下肢挙上訓練を開始する。2~3日目よりCPM装置を用いて膝屈曲0~40度の範囲で膝屈伸運動を開始する。術後5日目より膝蓋骨装具を装着し松葉杖を用いて部分荷重を許可する。10日目より全荷重を許可

する。8週間目よりジョギングと軽いスポーツ活動を許可し、12週間目よりフルスポーツを許可する。

4. 統計学的検討

本文中の数値は平均±標準偏差で示した。方法1の内側膝蓋骨支持機構の切離実験およびMPFL再建効果を調べる実験で、各実験群の2群間の比較検定には、Wilcoxon signed rank 検定を用いた。危険率5%未満の場合を統計学的に有意差ありとした。切離実験の中で、内側膝蓋支帯単独切離（B群とC群の差）と内側膝蓋大腿靭帯単独切離（B群とD群の差）による膝蓋骨外側移動度に関する2群間の比較検定はMann Whitney U 検定を用い、同様に危険率5%未満の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1. 内側膝蓋骨支持機構の切離実験およびMPFL再建効果

第1表および第2表は切離順序イおよびロのlateral shift ratio (LS)の結果を示す。内側膝蓋支帯単独切離群（C群）は無切離1kgf負荷群（B群）に比し、測

定した全膝屈曲角度でLSはわずかしか増加しなかった（第1表）。MPFL単独切離群（D群）は無切離1kgf負荷群（B群）と比し、膝20~90度の角度でLSは大きく増加した（第2表）。MPFL単独切離によるLS増加度（D群とB群の差）は、内側膝蓋支帯単独切離によるLS増加度（C群とB群の差）と膝20~90度の角度で明らかな有意差があった（第5図）。内側膝蓋支帯とMPFLの両切離群（E群）ではLSはさらに大きく増加した。MPFLを再建して負荷無し群（F群）は膝蓋骨内側支持機構無切離で負荷無し群（A群）とはほぼ同じLSであった。MPFLを再建して1kgf負荷群（G群）は膝蓋骨内側支持機構無切離で1kgf負荷群（B群）よりやや小さいLS値であった。

第3表に示すように膝蓋骨内側支持機構無切離で負荷無し群（A群）とMPFLを再建して負荷無し群（F群）のcongruence angleは膝全屈曲角度（20~120度）で有意差はなかった。

2. 急性および陳旧性膝蓋骨脱臼例でのMPFL所見

1) 急性膝蓋骨脱臼例のMPFL所見

急性例のMPFL損傷所見は付着部剥離損傷と実質部断裂損傷に分類できた。付着部剥離損傷はMPFL靭帯

第1表 切離順序イの各群の膝蓋骨外側移動度

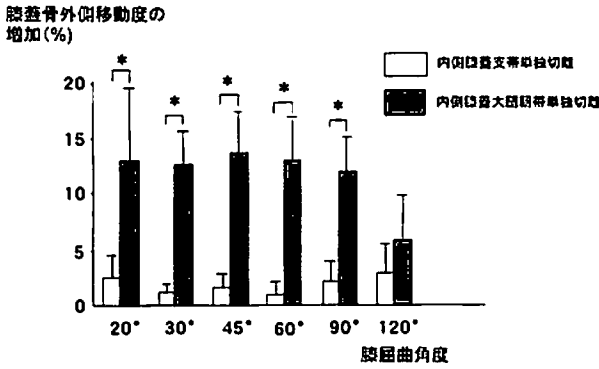
| | No | 20° | 30° | 45° | 60° | 90° | 120° |
|------------------------|----|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| A群（無切離；負荷無し） | 5 | 7.9±6.9% | 10.6±6.2% | 11.5±6.6% | 11.5±5.7% | 10.4±3.1% | 6.5±2.5% |
| B群（無切離；1kgf負荷） | 5 | 18.8±9.1 | 22.1±8.6 | 23.1±8.1 | 23.0±6.7 | 21.0±4.8 | 13.1±4.0 |
| C群（MR単独切離；1kgf負荷） | 5 | 20.9±8.2 | 23.0±8.4 | 24.5±8.7 | 24.1±7.7 | 23.0±4.9 | 15.8±5.2 |
| E群（MRおよびMPFL切離；1kgf負荷） | 5 | 36.2±8.2 | 39.4±8.3 | 40.0±8.9 | 37.6±9.0 | 32.3±7.1 | 19.3±5.7 |
| F群（MPFL再建；負荷無し） | 5 | 8.0±6.0 | 9.6±5.4 | 11.1±5.9 | 11.0±4.7 | 10.1±3.3 | 4.5±2.1 |
| G群（MPFL再建；1kgf負荷） | 5 | 16.4±4.9 | 18.2±5.3 | 18.9±5.8 | 17.9±6.3 | 15.6±5.9 | 7.5±3.7 |

*Wilcoxon signed rank 検定による有意差あり（ $p<0.05$ ）。無切離；膝蓋骨内側支持機構無切離，MPFL；内側膝蓋大腿靭帯
MR；内側膝蓋支帯
(Nomura E et al : Knee 7 : 121-127, 2000 の Table 1 を許可を得て転載)。

第2表 切離順序ロの各群の膝蓋骨外側移動度

| | No | 20° | 30° | 45° | 60° | 90° | 120° |
|------------------------|----|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| A群（無切離；負荷無し） | 5 | 7.1±1.8% | 9.4±2.2% | 11.5±1.9% | 11.6±2.1% | 10.3±2.5% | 6.2±3.2% |
| B群（無切離；1kgf負荷） | 5 | 16.7±5.8 | 19.5±3.9 | 22.2±3.9 | 21.6±2.5 | 18.7±2.0 | 11.4±2.7 |
| D群（MPFL単独切離；1kgf負荷） | 5 | 29.2±6.0 | 32.6±6.1 | 36.1±6.8 | 34.7±5.3 | 27.9±1.9 | 17.0±1.0 |
| E群（MRおよびMPFL切離；1kgf負荷） | 5 | 36.5±4.9 | 40.6±5.9 | 42.5±6.5 | 43.0±8.6 | 34.5±5.3 | 21.0±4.2 |
| F群（MPFL再建；負荷無し） | 5 | 7.1±1.8 | 9.8±1.6 | 10.5±1.9 | 12.0±2.9 | 9.5±3.9 | 5.8±3.9 |
| G群（MPFL再建；1kgf負荷） | 5 | 16.3±4.0 | 18.1±4.4 | 19.2±5.1 | 18.6±4.1 | 15.3±5.0 | 9.1±4.6 |

*Wilcoxon signed rank 検定による有意差あり（ $p<0.05$ ）。無切離；膝蓋骨内側支持機構無切離，MPFL；内側膝蓋大腿靭帯
MR；内側膝蓋支帯
(Nomura E et al : Knee 7 : 121-127, 2000 の Table 2 を許可を得て転載)。



第5図 内側膝蓋大腿靭帯単独切離と内側膝蓋支帯単独切離による膝蓋骨外側移動度の増加の比較
 内側膝蓋支帯単独切離 (B群とC群の差) と内側膝蓋大腿靭帯単独切離 (B群とD群の差) による膝蓋骨外側移動度の増加を示す。Iは標準偏差を示す。*Mann-Whitney U検定による有意差あり (p<0.05) (Nomura E et al: Knee 7: 121-127, 2000のFigure 6を許可を得て転載)

の大腿骨付着部の裏面のみ剥離する損傷で、実質部断裂損傷は靭帯実質部で起こる損傷である。急性膝蓋骨脱臼18膝中、17膝にMPFL損傷があり、付着部剥離損傷が7膝、実質部断裂損傷が10膝であった(第6図A-F)。残りの1膝では損傷はなく弛緩のみであった。

2) 陳旧性膝蓋骨脱臼例のMPFL所見

陳旧性例でのMPFL遺残靭帯所見はタイプ1(大腿骨付着部弛緩型)、タイプ2(2a; 癭痕形成型, 2b; 異常癭痕枝形成型)、タイプ3(欠損型)の3つに分類できた(第7図)。タイプ1(大腿骨付着部弛緩型)は靭帯の連続性は正常であるが、大腿骨付着部が骨にルーズに付着するため全体として靭帯が弛緩しているタイプである。タイプ2a(癭痕形成型)はMPFL靭帯大腿骨付着部近傍で癭痕形成が見られるもので、タイプ2b(異常癭痕枝形成型)は正常な大腿骨付着がなく、近位の大内転筋腱および遠位の内側側副靭帯に異常な癭痕枝が形

成されているタイプである。そしてタイプ3(欠損型)は完全に靭帯成分のないもの、および所々に靭帯成分は見られても全体として連続性が見られないタイプである。陳旧性膝蓋骨脱臼49膝中、正常なMPFLは1例もなく、全例MPFL機能不全(MPFL insufficiency)であった。タイプ1(大腿骨付着部弛緩型)は9膝(18%)、タイプ2(癭痕形成型または異常癭痕枝形成型)は29膝(59%)、タイプ3(欠損型)は11膝(23%)であった。

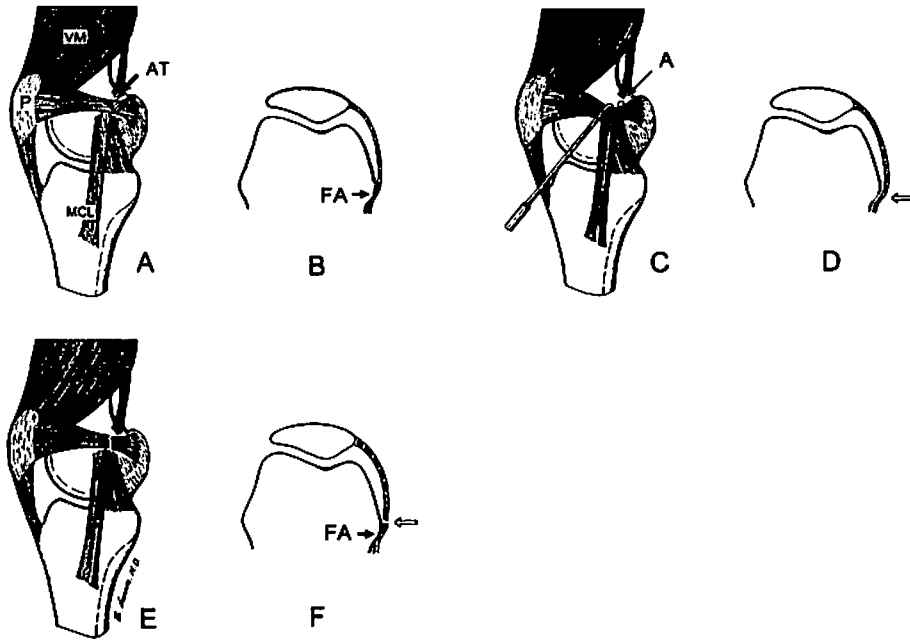
3. 反復性膝蓋骨脱臼に対するMPFL再建術の臨床的研究

臨床所見は、1) 膝関節可動域は、調査時25膝が最大屈曲可能で、2膝は10度の屈曲制限が見られた。2) 膝蓋骨異常可動性は術前全例高度であったが、調査時は22膝が正常、4膝は軽度、1膝は高度であった。3) 膝蓋骨不安徴候は術前全例陽性であったが、調査時は2膝(7%)のみ陽性で、25膝は陰性であった。4) 大腿四頭筋角(Quadriceps angle)は術前20±5度であった。ステーブル固定部の圧痛は11膝に見られた。Sulcus angleは術前149.6±8.7度であった。Congruence angleは術前14.3±16.2度が、調査時-9.6±6.3度と正常な値に回復した。膝蓋骨の高さは術前1.14±0.15が、調査時1.11±0.15とほぼ同じ値であった。Crosby and Insall法による手術成績の評価は、優が15膝、良が11膝、可が1膝で、不可はなかった。再脱臼は1膝で見られた。良の結果の主な理由は、膝蓋骨安定にも関わらず、ステーブル部痛、内側の突っ張り感や痛み、膝蓋大腿関節痛などであった。術後合併症は皮下血腫1膝、皮下感染1膝で、25膝は合併症はなかった。

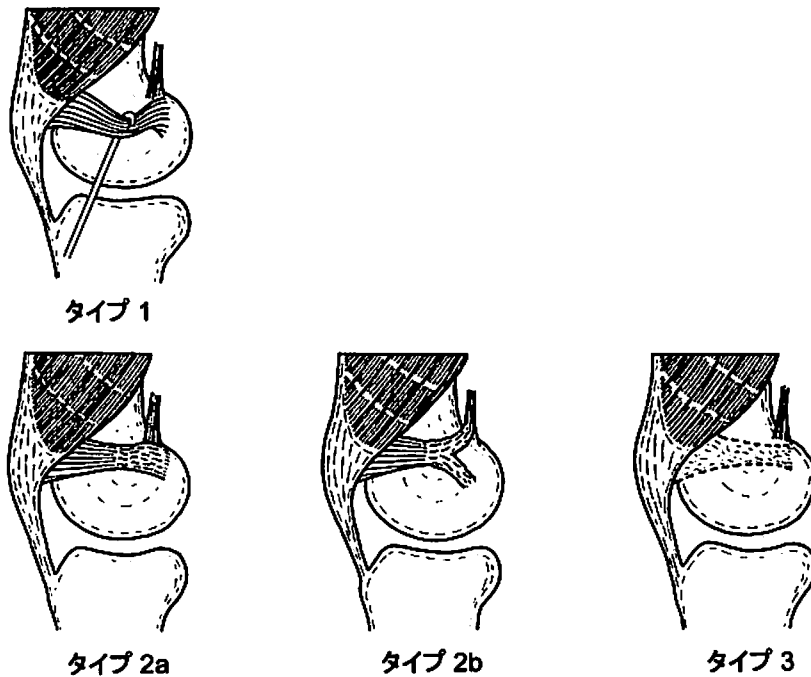
第3表 実験A群とF群のcongruence angle

| | 20° | 30° | 45° | 60° | 90° | 120° |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| A群(無切離; 負荷無し) | -5.8±1.8 | -5.9±3.2 | -4.4±1.5 | -5.1±2.8 | -6.0±2.0 | -5.9±5.8 |
| F群(MPFL再建; 負荷無し) | -5.3±3.2 | -4.6±3.4 | -3.5±2.9 | -3.6±1.7 | -6.2±2.4 | -4.7±3.9 |

全ての膝関節屈曲角度で、二つのグループ間にWilcoxon signed rank検定による有意差はなかった(p>0.05)。無切離; 膝蓋骨内側支持機構無切離, MPFL: 内側膝蓋大腿靭帯 (Nomura E et al: Knee 7: 121-127, 2000のTable 3を許可を得て転載)。



第6図 急性膝蓋骨脱臼における内側膝蓋大腿靭帯損傷の分類。(Nomura E: Int Orthop 23: 260-263, 1999のFigure1を許可を得て転載)。図A, B: 正常な内側膝蓋大腿靭帯。FAまたは卵門の斜線部; 大腿骨付着部 VM; 内側広筋 AT; 内転筋結節 P; 膝蓋骨 MCL; 内側側副靭帯。図C, D: 剥離損傷 (Avulsion-tear type)。矢印A または白矢印; 大腿骨付着部の剥離部。図E, F: 実質部損傷 (Substantial-tear type) (白矢印; 損傷部)



第7図 陳旧性膝蓋骨脱臼における内側膝蓋大腿靭帯の遺残靭帯所見 (Nomura E: Int Orthop 23: 260-263, 1999のFigure3を許可を得て転載)。タイプ1: 大腿骨付着部弛緩型。タイプ2: 癒痕形成型または異常癒痕枝形成型。タイプ2a: 癒痕形成型。内側膝蓋大腿靭帯の大腿骨付着部近傍は癒痕が形成されている。タイプ2b: 異常癒痕枝形成型。大内転筋腱や内側側副靭帯の方向に異常癒痕枝の形成が見られる。タイプ3: 欠損型

考 察

反復性膝蓋骨脱臼の手術法として、遠位リアライメントおよび近位リアライメントが主に行われてきた。どちらも膝蓋骨伸展機構を全体として直線的に矯正する手術である。遠位リアライメントは膝蓋骨の遠位部の脛骨粗面を骨ごと内側に移行する手術で、近位リアライメントは膝蓋骨の近位部の内側広筋を遠位外側に移行縫縮する手術である。膝蓋骨を中心として大腿四頭筋の中心軸と膝蓋腱の中心軸のなす角度(Q角)は正常で外側に15度向いており、したがって大腿四頭筋が作用すれば、正常でも膝蓋骨に外側への牽引力が作用する。リアライメント手術はこのQ角を0度近くにするにより、外側への牽引力を消失させ、しいては膝蓋骨の外側への偏位を防ぐダイナミックな手術である。幾つかの関節でみられる関節脱臼や亜脱臼、および関節不安定症で、過去に数多くの筋腱移行術が提唱されてきたが、膝蓋骨脱臼に対するリアライメント手術はこれらの手術法と同様な考え方によっていた。しかし、不安定な関節において正常な機能を回復させるためには、過剰な動きを制御する靭帯性構造の修復あるいは再建が必要であることが、近年多くの関節手術で証明されている。例えば、肩関節脱臼に対するBankart法、足関節における前距腓靭帯再建術、肘関節における内側側副靭帯再建術、膝関節の前十字靭帯再建術などである。反復性膝蓋骨脱臼でも靭帯性構造の修復あるいは再建は、理にかなった方法であることは論をまたない。したがって、膝蓋骨の重要な靭帯性構成体であるMPFLの再建術は、従来の手術にとってかわる大きな可能性をもつ方法であると考えられる。以下に、MPFLの本研究結果について考察する。

1. MPFLの解剖所見と機能解剖所見

MPFLの解剖所見については、Warrenら⁴³⁾が1979年に膝関節内側支持機構の解剖学的研究の中で、MPFLは膝蓋骨内側縁から大腿骨内側上顆に走行し、厚い例や薄い例があったと記載している。Reiderら⁴²⁾は1981年に20膝中7膝にMPFLが存在し、大腿骨付着部は大腿骨内側上顆で形態は様々であったと述べた。MPFLの大腿骨付着部は、過去に大腿骨内側上顆または内転筋結節と報告されてきた^{4,19,23,24,40,43)}。しかしながら、筆者は、解剖学的研究^{28,39)}からMPFLの大腿骨付着部はそのいずれでもなく、大腿骨内側上顆の後上方で且つ内転筋結節のすぐ遠位部を主張した。

近年のいくつかの生体力学的研究から、MPFLは膝

蓋骨内側支持機構の中で第1制御機構であることが証明された。Conlanら¹⁹⁾はMPFLは膝蓋骨内側支持機構の53%の制動機能を担うと報告した。Hautamaaら²⁵⁾およびDesioら²⁰⁾はMPFLの制動機能はそれぞれ50%、60%と述べている。我々もすでにMPFLは膝蓋骨内側支持機構の第1制御因子であることを報告している³⁰⁾。しかしながら、過去の研究者は、Conlanは膝関節屈曲30度、Hautamaaは20度、Desioは0度で実験を行っており、いずれも一つの膝屈曲角度での検討であった。信頼できるMPFL再建方法を確立するには、膝関節の広範囲な可動域でのMPFLの機能や再建術の効果を知る必要がある。そのため今回の実験で膝屈曲20~120度の広い屈曲範囲で膝蓋骨内側支持機構の機能を測定したことが過去の実験と異なっている。MPFL単独切離は膝屈曲20~90度の範囲でlateral shiftが大きく増加した。膝蓋骨内側支持機構が無傷で膝蓋骨に1kgの外側負荷では膝屈曲20~90度の範囲でlateral shiftが約10%増加した。これは膝蓋骨内側支持機構の初期laxityを示すと考えられる。膝屈曲90度以上では、MPFLの制動機能は低かったが、これは膝蓋骨は膝屈曲90度以上では大腿骨膝蓋溝に深くはまり込むため、膝蓋骨外側の移動に対して骨性のパットレス効果により制動されていることを意味する。本研究結果から、MPFLは膝屈曲20~90度の範囲で膝蓋骨の外側移動を制動しているといえる。一方、本研究は大腿四頭筋にわずか1kgfの負荷を加えた静的状態での測定に過ぎない。人の実際の活動時には大腿四頭筋にはきわめて大きな力がかかっていることから、静的状態だけでなく、より生理的に近い動的状態の検討も今後必要であると考えられる。

MPFL再建術ではないが、MPFLの切離後に切離部の1次縫合により膝蓋骨の制動機能が正常範囲に回復されることをDesioら²⁰⁾が報告している。我々の実験では内側膝蓋支帯およびMPFLを切離したのち、MPFLを人工靭帯で再建すると十分な膝蓋骨外側制動が得られ、膝関節屈曲20~120度屈曲位の範囲で正常なトラッキングが再獲得できることが判明し、この再建方法は十分に臨床応用可能なことが立証された。

2. 膝蓋骨脱臼例でのMPFL所見

一方、MPFLが機能解剖学的に膝蓋骨内側支持機構の第1制御機構と証明されても、臨床的な裏付けが極めて重要である。急性膝蓋骨脱臼時に生じる損傷は1990年代前半まで、膝関節部の損傷、内側膝蓋支帯の損傷、内側広筋の損傷などがあげられてきた^{12,14,45,47)}。

解剖学的にほとんどその存在が知られていなかった MPFL についてその検討がなされなかったのは無理からぬところでもある。1990 年以後、急性膝蓋骨脱臼で MPFL が大腿骨付着部近傍で損傷を高率に合併する報告がなされるようになり^{16, 17, 21, 27, 31, 33, 37, 38, 40)}、生体力学的研究結果とともに MPFL の重要性がクローズアップされてきた。しかしながら、MPFL 損傷の形式についての報告は今まで皆無であった。正常な MPFL は膝蓋骨内側縁から起始し、内転筋結節すぐ遠位部の大腿骨に付着しているが、MPFL の表層は後方関節包にまで伸びているため、一見すると MPFL は内転筋結節のすぐ遠位部の大腿骨に付着せず、後方関節包まで連続しているように見える。しかし、大腿骨付着部は深層線維で内転筋結節のすぐ遠位部に大腿骨としっかりアンカーされている。筆者はこの解剖学的構造を single-point fixation と名付けた³⁵⁾。

今回の検討から、実質部断裂損傷の発生はほとんど大腿骨付着部近傍であった。MPFL は膝蓋骨から大腿骨付着部に向かって靭帯の幅および厚さが次第に細く、薄くなる特徴を有している²⁸⁾。従って、MPFL に損傷が起これば、強度的に弱い大腿骨付着部近くで実質部断裂損傷が起こることは容易に推測できた。しかしながら、付着部剥離損傷は予想しておらず、その発見は驚くべきものであった^{31, 33)}。付着部剥離損傷は MPFL 大腿骨付着部深層線維の骨付着のみが剥離する損傷である。これは MPFL の大腿骨付着部は深層線維のみ付着し、表層線維は後方の関節包に連続する特殊な構造をとることによる。MPFL 大腿骨付着部はきわめて小さいものであるが、その特殊な付着部構造は形態学的、解剖学的弱点であるのとは逆に、付着部でのわずかな動きを許す特殊な構造も有しているのではないかと考えられた。

陳旧性膝蓋骨脱臼例での MPFL 遺残靭帯は、タイプ 1 (大腿骨付着部弛緩型)、タイプ 2 (2a; 癥痕形成型、2; 異常癥痕枝形成型)、タイプ 3 (欠損型) の 3 つに分類でき、正常な靭帯は 1 例もなかった。急性膝蓋骨脱臼例では MPFL が消失している例は無かったが、陳旧性脱臼例では 11 膝 (23%) がタイプ 3 (欠損型) であった。このタイプ 3 (欠損型) は陳旧性膝前十字靭帯損傷でしばしばみられる靭帯の欠損あるいは消失に類似している。陳旧例での MPFL 遺残靭帯所見は、急性脱臼時の損傷修復部が再脱臼により何度も再損傷をきたすため、より複雑になるとともに、急性損傷の特徴は徐々に失われていくと考えられる。タイプ 2b (異常癥痕枝形成型) は、損傷 MPFL が大腿骨付着部近くで近位または遠位へ癥痕を形成して修復しようとする生体の防御反応であ

ると考えられた。反復性膝蓋骨脱臼にかかわる数多くの軟部組織や骨性の先天的解剖学的因子が過去に報告されてきた^{1, 4, 6, 8)}が、今回の MPFL 靭帯所見の研究結果から、全例に MPFL 機能不全が存在することが判明し、種々の先天的解剖学的因子に加えて、MPFL 治癒不全が重要な再脱臼要因であると結論した。

3. MPFL 再建術

急性および反復性膝蓋骨脱臼例での MPFL 損傷や MPFL 機能不全の証明は、膝蓋骨の外側方向への制動に第 1 制御機構としての MPFL の機能を臨床面からも支持する結果であった。従って、生体力学的にも臨床的にも MPFL は最も重要な膝蓋骨内側支持機構であり、この靭帯の修復や再建は反復性膝蓋骨脱臼に対する有用な治療法として選択するに十分な根拠になると考えられた。筆者は自身の研究結果をもとに MPFL 再建術を考案し、その臨床応用を 1988 年に開始した。その第 1 報として 1992 年に人工靭帯を用いた MPFL 再建術を本邦で報告した²⁹⁾。海外では、ほぼ同時期に Avikainen ら (1992 年)¹⁷⁾と ElleraGomes (1993 年)²²⁾が MPFL 再建術を報告している。再建材料として Avikainen らは大内転筋腱、ElleraGomes は人工靭帯を用いた。その後、再建術の報告は散見されるが未だ多くない。そのため反復性膝蓋骨脱臼に対する MPFL 再建術の評価は確定したものではないが、急性膝蓋骨脱臼に対する MPFL 修復術の報告は近年きわめて多くなり、膝蓋骨内側支持機構の第 1 制御機構としての重要性が認識され始めた証拠でもある。

再建術では、再建靭帯固定時の膝屈曲角度、固定部位、靭帯の緊張度などが極めて重要となるが、過去の報告では、靭帯再建時の条件についての記載はほとんどされていない。靭帯固定時の膝屈曲角度については、ElleraGomes²²⁾は膝 90 度屈曲位と述べたが、Avikainen ら¹⁷⁾、宗田ら²⁶⁾は述べていない。筆者は MPFL の靭帯付着部距離についても検討してきた³⁰⁾が、MPFL の付着部 2 点間距離を膝屈曲 0~135 度の範囲で測定したところ、2 点間距離は 0 度と 60 度で最大との結果を得ている。膝屈曲 0 度では膝蓋骨は大腿骨膝蓋溝に入っていないため膝蓋骨の正しい位置を決めることはきわめて難しいが、膝屈曲 60 度では大腿骨膝蓋溝は深く、膝蓋骨の適正な位置を容易に見出すことができる。このことから筆者は、MPFL を固定する膝屈曲角度を 60 度に決定した。再建靭帯の固定部位であるが、筆者は大腿骨付着部は大腿骨内側上顆の後上方で且つ内転筋結節のすぐ遠位部であると上述した。この大腿骨付着部はわずかに距離

がずれても、例えば5mmほどずれても、2点間距離は大きく変化することがわかっている³⁰⁾。わずかな解剖学的なずれは再建術の結果に大きく影響する可能性がある。正確な大腿骨付着部の確認は極めて重要となる。再建靭帯固定時の靭帯の緊張度であるが、過去の報告ではなんら記載されていない。筆者は解剖学的研究から靭帯は常にピンと強く張っているわけではなく、ある程度の『遊び』、すなわち初期 laxity があることを見出した。靭帯固定時の膝屈曲角度を60度と決め、その際の『遊び』の程度を tension spacer という新しい概念を導入し使用した。靭帯再建術にとって靭帯の骨への固定方法もきわめて重要である。靭帯の確実な骨への固定を得るためには、強固な初期固定力だけでなく、経時的な固定力の劣化を防ぎ、より早期に骨への確実な固定が得られることが必要である。再建靭帯の骨へ固定方法は、糸による縫合固定^{17,21)}、骨ワッシャーと螺子²²⁾、single-stapling 法²⁶⁾などが報告されている。自家考案の固定手技は double-stapling 法で初期固定力にすぐれ、さらに骨膜被覆や内側膝蓋支帯片被覆などを加えたことが確実な骨への固定につながったのでないかと考える。このような種々の詳細な条件や手技を用いたことにより、手術方法がより安全で確実なものになったと思われる。

反復性膝蓋骨脱臼に対する人工靭帯に内側膝蓋支帯片を組み合わせた自家考案による再建術の中長期成績は、優および良が96%であった。この臨床研究から、本手術法の有効性が確認できた。

今回筆者が新たに開発した MPFL 再建術の有用性を述べると、

- 1) 解剖学的に存在する靭帯の再建術である。
- 2) 個々の症例で膝蓋骨不安定性の程度が異なるにも関わらず、一定した手術手技でできる。
- 3) 膝蓋骨伸展機構に対する最小限の手術侵襲である。

MPFL の基礎的・臨床的研究結果から、MPFL は膝蓋骨の制動やトラッキングにおいて膝蓋骨内側支持機構の中で最も重要な支持機構であり、膝蓋骨脱臼の治療において MPFL 損傷組織の修復や再建が最も効果的な方法であることが判明した。

結 論

1. 反復性膝蓋骨脱臼の発生に関与する内側膝蓋大腿靭帯の形態とその支持機能を新鮮凍結切断膝ならびに臨床例を用いて検討した。
2. まず、新鮮凍結切断肢 10 膝関節を用いて膝蓋骨内側支持機構の切離実験を行った。膝蓋骨内側支持機構の

うち MPFL 単独切離で、膝屈曲 20-90 度の範囲で膝蓋骨は大きく外方に移動し、内側膝蓋支帯切離では切離の影響は少なかった。MPFL と内側膝蓋支帯を切離したのち MPFL 単独の再建術により膝蓋骨の外方制動は膝屈曲 20~120 度の範囲で正常範囲内に回復したことから、MPFL は膝蓋骨内側支持機構の中で最も重要な制動因子であることが判明した。

3. 臨床的研究として、急性膝蓋骨脱臼 18 膝の MPFL 損傷および陳旧性膝蓋骨脱臼 49 膝の MPFL 遺残靭帯所見を検討した。急性膝蓋骨脱臼例では 1 膝を除き MPFL に損傷があり、損傷は剥離損傷と実質部損傷の 2 つに分類できた。陳旧性膝蓋骨脱臼例では遺残靭帯は 3 つに分類できたが、すべての症例に MPFL 機能不全が存在し、膝蓋骨脱臼における MPFL の重要性が臨床面からも裏付けられた。

4. 切離実験でその有効性が立証された MPFL 再建方法を 24 例 27 膝に臨床応用した。再建材料として Leeds-Keio 人工靭帯と内側膝蓋支帯弁状片を用いた。手術後平均 5.9 年の結果は優および良が 96% で、反復性膝蓋骨脱臼に対する MPFL 再建術はきわめて有用な治療法であることが判明した。

5. 膝蓋骨外側脱臼における内側膝蓋大腿靭帯の重要性が生体力学的にも臨床的にも証明され、内側膝蓋大腿靭帯再建術の手術成績はきわめて良好であった。

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整形外科学教室戸山芳昭教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨は第 4 回日本整形外科学会基礎学術集会 (1991 年, 神戸)、第 32 回西アメリカ整形外科学会 (1998 年, アスペン)、第 29 回東アメリカ整形外科学会 (1998 年, プエルトリコ) および第 21 回国際整形災害外科学会 (1999 年, シドニー) にて報告した。

文 献

- 1) Aichroth PM, Al-Duri Z : Dislocation and subluxation of the . patella : an overview. *Knee Surgery*. (Ed) Aichroth PM, Al-Duri Z, Martin Dunitz Ltd, Deutscher Arzte-Verlag Koln, p. 354-379, 1992
- 2) Arendt EA, Fithian DC, Cohen E : Current concepts of lateral patella dislocation. *Clin Sports Med* 21(3) : 499-519, 2002
- 3) Fithian DC, Nomura E, Arendt E : Anatomy of patellar dislocation. *Oper Tech Sports Med* 9 : 102-111, 2001
- 4) Fulkerson JP, Hungerford DS : Patellar dislocation. *Disorders of the Patellofemoral Joint*. (Ed) Fulkerson

- JP, Hungerford DS, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 149-175, 1990
- 5) Hughston JC, Walsh WM, Puddu G : Treatment. Patellar subluxation and dislocation. (Ed) Hughston JC, Walsh WM, Puddu G, WB Saunders Company, Philadelphia, p.84-130, 1984
 - 6) Insall JN : Disorder of the patella. Surgery of the knee. (Ed) Insall JN, Churchill Livingstone, New York, p.191-260, 1984
 - 7) Crosby EB, Insall J : Recurrent dislocation of the patella, relation of treatment to osteoarthritis. J Bone Joint Surg Am 58 : 9-13, 1976
 - 8) Dandy DJ : Chronic patellar instability. J Bone Joint Surg Br 78 : 328-35, 1996
 - 9) Hughston JC, Deese M : Medial subluxation of the patella as a complication of lateral retinacular release. Am J Sports Med 16 : 383-388, 1988
 - 10) Shellock FG, Mink JH, Deutsch A, Fox JM, Ferkel RD : Evaluation of the patients with persistent symptoms after lateral retinacular release by kinematic magnetic resonance imaging of the patellofemoral joint. Arthroscopy 6 : 226-234, 1990
 - 11) Hauser EDW : Total tendon transplant for slipping patella. Surg Gynecol Obstet 66 : 199-214, 1938
 - 12) Cofield RH, Bryan RS : Acute dislocation of the patella : results of conservative treatment. J Trauma 17 : 526-531, 1977
 - 13) Hawkins RJ, Bell RH, Anisette G : Acute patellar dislocations. The natural history. Am J Sports Med 14 : 117-120, 1986
 - 14) Kirsh MD, Fitzgerald SW, Friedman H, Rogers LF : Transient lateral patellar dislocation : Diagnosis with MR imaging. AJR 161 : 109-113, 1993
 - 15) Maenpaa H, Huhtala H, Lehto MU : Recurrence after patellar dislocation. Redislocation in 37/75 patients followed for 6-24 years. Acta Orthop Scand 68 : 424-426, 1997
 - 16) Ahmad CS, Shubin Stein BE, Matuz D, Henry JH : Immediate surgical repair of the medial patellar stabilizers for acute patellar dislocation. A review of eight cases. Am J Sports Med 28 : 804-810, 2000
 - 17) Avikainen VJ, Nikku RK, Seppanen-Lehmonen TK : Adductor magnus tenodesis for patellar dislocation : technique and preliminary results. Clin Orthop 297 : 12-16, 1993
 - 18) Burks RT, Desio SM, Bachus KN, Tyson L, Springer K : Biomechanical evaluation of lateral patellar dislocations. Am J Knee Surg 11 : 24-31, 1998
 - 19) Conlan T, Garth WP, Lemons JE : Evaluation of the medial soft-tissue restraints of the extensor mechanism of the knee. J Bone Joint Surg Am 75 : 682-693, 1993
 - 20) Desio DS, Burk RT, Bachus KN : Soft tissue restraint to lateral patellar translation in the human knee. Am J Sports Med 26 : 59-65, 1998
 - 21) Drez D, Edwards TB, Williams CS : Results of medial patellofemoral ligament reconstruction in the treatment of patellar dislocation. Arthroscopy 17 : 298-306, 2001
 - 22) Ellera Gomes JL : Medial patellofemoral ligament reconstruction for recurrent dislocation of the patella : a preliminary report. Arthroscopy 8 : 335-340, 1992
 - 23) Feller JA, Feagin JA, Garrett WE : The medial patellofemoral ligament revisited : an anatomical study. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 1 : 184-186, 1993
 - 24) Garth WP Jr, DiChristina DG, Holt G : Delayed proximal repair and distal realignment after patellar dislocation. Clin Orthop 377 : 132-144, 2000
 - 25) Hautamaa PV, Fithian DC, Kaufmann KR, Daniel DM, Pohlmeier AM : Medial soft tissue restraints in lateral patellar instability and repair. Clin Orthop 349 : 174-182, 1998
 - 26) Muneta T, Sekiya I, Tsuchiya M, Shinomiya K : A technique for reconstruction of the medial patellofemoral ligament. Clin Orthop 359 : 151-155, 1999
 - 27) 野村栄貴, 富士川恭輔, 竹田毅, 松本秀男 : 新鮮膝蓋骨脱臼に伴う内側膝蓋大腿靱帯の手術所見. 日本膝関節研究会誌, 17 : 102-106, 1991
 - 28) 野村栄貴, 富士川恭輔, 竹田毅, 松本秀男 : 内側膝蓋大腿靱帯の解剖学的研究. 別冊整形外科, 22 : 2-5, 1992.
 - 29) 野村栄貴, 富士川恭輔, 竹田毅, 松本秀男 : 陳旧性膝蓋骨脱臼に対する Leeds-Keio 人工靱帯を用いた内側膝蓋大腿靱帯再建術の術後成績. 中部整災誌, 35 : 1581-1582, 1992
 - 30) 野村栄貴, 富士川恭輔, 竹田毅, 松本秀男 : 内側膝蓋大腿靱帯の機能解剖学的研究. 臨整外, 28 : 5-10, 1993
 - 31) 野村栄貴, 富士川恭輔, 竹田毅, 松本秀男 : 新鮮膝蓋骨脱臼に対する内側膝蓋大腿靱帯の一次修復術. 整形外科, 46 : 294-298, 1995
 - 32) 野村栄貴, 富士川恭輔, 竹田毅, 松本秀男 : 急性膝蓋骨脱臼における膝蓋骨内側支持機構損傷. 整形外科, 49 : 1075-1079, 1998
 - 33) Nomura E : Classification for the lesions of the medial patellofemoral ligament in patellar dislocation. Int Orthop 23 : 260-263, 1999
 - 34) Nomura E, Horiuchi Y, Kihara M : A mid-term follow-up of the medial patellofemoral ligament reconstruction using an artificial ligament for recurrent patellar dislocation. Knee 7 : 211-215, 2000
 - 35) Nomura E, Horiuchi Y, Kihara M : Medial patellofemoral ligament restraint in lateral patellar translation and reconstruction. Knee 7 : 121-127, 2000
 - 36) Nomura E, Inoue M : Surgical technique and rationale for medial patellofemoral ligament reconstruction for recurrent patellar dislocation. Arthroscopy 19 : 47E, 2003 (Online)
 - 37) Sallay PI, Poggi J, Speer KP, Garrett WE : Acute dislocation of the patella : a correlative pathoanatomical study. Am J Sports Med 24 : 52-60,

1996

- 38) Sanders TG, Morrison WB, Singleton BA, Miller MD, Cornum KG : Medial patellofemoral ligament injury following acute transient dislocation of the patella. MR findings with surgical correction in 14 patients. *J Comput Assist Tomogr* 25 : 957-962, 2001
- 39) Sandmeier RH, Burks RT, Bachus KN, Billings A : The effect of reconstruction of the medial patellofemoral ligament on patellar tracking. *Am J Sports Med* 28 : 345-349, 2000
- 40) Spritzer CE, Courneya DL, Burk DL Jr, Garrett WE, Strong JA : Medial retinacular complex injury in acute patellar dislocation : MR findings and surgical implications. *AJR* 168 : 117-122, 1997
- 41) Kaplan EB : Factors responsible for the stability of the knee joint. *Bull Hosp Joint Dis* 18 : 51-59, 1957
- 42) Reider B, Marshall, JL, Koslin B, Ring B, Girgis FG : The anterior aspect of the knee joint : an anatomical study. *J Bone Joint Surg Am* 63 : 351-356, 1981
- 43) Warren L, Marshall J : The supporting structures and layers on the medial side of the knee : an anatomical analysis. *J. Bone Joint Surg Am* 61 : 56-62, 1979
- 44) 福林徹, 黒澤尚, 土肥徳秀, 陳永振, 中島寛之, 近藤稔 : いわゆる習慣性膝蓋骨亜脱臼について—X線所見と症状との関連—. *日本膝関節研究会誌*, 3 : 37-45, 1977
- 45) Merchant AC, Mercer RL, Jacobsen RH, Cool CR : Roentgenographic analysis of patellofemoral congruence. *J Bone Joint Surg Am* 56 : 1391-1396, 1974
- 46) Sargent JR, Teipner WA : Medial patellar retinacular repair for acute and recurrent dislocation of the patella—a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 53 : 386, 1971
- 47) Vainionpaa S, Laasonen E, Silvennoinen T, Vasenius J, Rokainen P : Acute dislocation of the patella. Clinical, radiographic and operative findings in 64 consecutive cases. *Acta Orthop Scand* 57 : 331-333, 1986

慶應医学 第81巻第1号号外
平成 16 年 3 月 25 日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第171号

慶 應 義 塾 大 学

論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科博士課程修了の次の者に対し、博士（医学）の学位を授与したので学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

| 学位授与年月日 学位記号 | 氏名 | 生年月日 |
|---------------------------|------|------------|
| 平成16年1月19日 慶大博士甲第2187号 | 江崎俊彦 | 昭和43年4月15日 |
| 同 第2188号 | 栗原勲 | 昭和47年5月10日 |
| 同 第2190号 | 山岸洋一 | 昭和40年9月3日 |
| 平成16年2月9日 慶大博士甲第2201号 | 梶原幹生 | 昭和46年1月23日 |
| 同 第2203号 | 所正治 | 昭和39年5月2日 |
| 同 第2205号 | 矢澤真樹 | 昭和47年1月16日 |

論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科の行う論文博士の審査および試験に合格した次の者に対し、博士（医学）の学位を授与したので学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

| 学位授与年月日 学位記号 | 氏名 | 生年月日 |
|---------------------------|------|-------------|
| 平成15年12月8日 慶大博士乙第3746号 | 佐藤智行 | 昭和41年8月5日 |
| 同 第3747号 | 佐藤暢一 | 昭和43年11月4日 |
| 同 第3748号 | 野田航介 | 昭和45年7月28日 |
| 同 第3749号 | 野村栄貴 | 昭和32年8月11日 |
| 同 第3750号 | 山田悟 | 昭和45年1月1日 |
| 平成16年1月19日 慶大博士乙第3754号 | 浮山越史 | 昭和35年10月6日 |
| 同 第3755号 | 江川智久 | 昭和45年10月11日 |

| 学位授与年月日号 学位記号 | 氏名 | 生年月日 |
|---------------------------|-------|-------------|
| 平成16年1月19日 慶大博士乙第3756号 | 福永篤志 | 昭和41年9月4日 |
| 平成16年2月9日 慶大博士乙第3763号 | 今林英明 | 昭和46年3月10日 |
| 同同 第3764号 | 岩丸有史 | 昭和45年5月8日 |
| 同同 第3765号 | 岡沢啓 | 昭和45年1月15日 |
| 同同 第3766号 | 加藤悠太郎 | 昭和41年11月12日 |
| 同同 第3767号 | 菊地淑人 | 昭和40年8月7日 |
| 同同 第3768号 | 木村至 | 昭和43年8月11日 |
| 同同 第3769号 | 鈴木貴士 | 昭和42年9月28日 |
| 同同 第3770号 | 橋本学爾 | 昭和44年9月21日 |
| 同同 第3771号 | 松田洋人 | 昭和39年12月16日 |

目 次

| | |
|-------|---|
| 江崎 俊彦 | <p>A Specific Genetic Alteration on Chromosome 6 in Ulcerative Colitis-associated Colorectal Cancers. (潰瘍性大腸炎を発生母地とした大腸癌に特異的なヒト染色体6番の異常) …………… 5</p> |
| 栗原 勲 | <p>Expression and regulation of nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action. (グルココルチコイド作用における核内受容体コアクチベーターの発現と調節) …… 6</p> |
| 山岸 洋一 | <p>Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults. (アルツハイマー病関連侵害刺激による神経細胞死を抑制するHumaninにおける必須なアミノ酸の同定) …………… 7</p> |
| 梶原 幹生 | <p>A Role of Autoantibody-Mediated Platelet Destruction in Thrombocytopenia in Patients With Cirrhosis. (肝硬変症患者の血小板減少症における自己抗体による血小板破壊の役割) …………… 8</p> |
| 所 正治 | <p>Identification and Characterization of Two Isoenzymes of Methionine γ-Lyase from <i>Entamoeba histolytica</i> A KEY ENZYME OF SULFUR-AMINO ACID DEGRADATION IN AN ANAEROBIC PARASITIC PROTIST THAT LACKS FORWARD AND REVERSE TRANS-SULFURATION PATHWAYS (病原性赤痢アメーバのメチオニンガンマリアーゼアイソザイムの同定と解析：硫黄転移経路を持たない嫌気性寄生原虫における含硫アミノ酸分解酵素の重要性) …… 9</p> |
| 矢澤 真樹 | <p>Basic Studies on the Clinical Applications of Platelet-Rich Plasma. (多血小板血漿の臨床応用に関する基礎的研究) …………… 10</p> |
| 佐藤 智行 | <p>Olprinone, a Phosphodiesterase III Inhibitor, Reduces Gut Mucosal Injury and Portal Endotoxin Level during Acute Hypoxia in Rabbits. (ホスホジエステラーゼIII阻害薬オルプリノンは、ウサギにおいて、急性低酸素侵襲下、腸管粘膜傷害を減少させ、門脈血エンドトキシン濃度を減少させる) …… 11</p> |
| 佐藤 暢一 | <p>The Vasodilatory Effects of Hydralazine, Nicardipine, Nitroglycerin, and Fenoldopam in the Human Umbilical Artery. (ヒト臍動脈におけるヒドララジン、ニカルジピン、ニトログリセリン、フェノルドパムの血管拡張作用) …………… 12</p> |
| 野田 航介 | <p>Production and Activation of Matrix Metalloproteinase-2 in Proliferative Diabetic Retinopathy. (増殖糖尿病網膜症におけるマトリックスメタロプロテアーゼ2の産生および活性化) …………… 13</p> |
| 野村 栄貴 | <p>内側膝蓋大腿靭帯の機能解剖学および臨床的研究 …………… 14</p> |
| 山田 悟 | <p>1型糖尿病の発症予知に関する研究 動物モデルを用いた基礎的検討 …………… 15</p> |
| 浮山 越史 | <p>SRY and Architectural Gene Regulation : The Kinetic Stability of a Bent Protein-DNA Complex Can Regulate Its Transcriptional Potency. (SRYと構造的遺伝子制御：屈曲蛋白-DNA複合体の動的安定性による転写活性制御) …………… 16</p> |
| 江川 智久 | <p>Docetaxel enhances the cytotoxicity of anthracyclines by increasing intracellular drug accumulation (ドセタキセルは腫瘍内アントラサイクリン系抗癌剤濃度を増強することにより抗腫瘍効果を増強させる) …………… 17</p> |
| 福永 篤志 | <p>未破裂脳動脈瘤患者における開頭術前後の高次脳機能および脳血流の変化 …………… 18</p> |

| | |
|-------|---|
| 今林 英明 | <p>Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. (軟骨球体培養法におけるヒト脱分化軟骨細胞の軟骨再分化およびヒト骨髄間質細胞のlarge-scale cDNA解析)19</p> |
| 岩丸 有史 | <p>Analysis of angiogenic profiles by estimation of tumor blood flow with colored dye extraction microspheres after antiangiogenic therapy. (カラードダイエクストラクションマイクロスフェアを用いた腫瘍血流量測定による、抗血管新生治療後の血管新生プロファイルの解析)20</p> |
| 岡沢 啓 | <p>Th1-Mediated Intestinal Inflammation in Crohn's Disease May Be Induced by Activation of Lamina Propria Lymphocytes Through Synergistic Stimulation of Interleukin-12 and Interleukin-18 Without T Cell Receptor Engagement. (クローン病におけるTh1を介する腸管炎症はT細胞受容体の会合を要せずに Interleukin-12と Interleukin-18の協調的な刺激による粘膜固有層リンパ球の活性化によって誘導される)21</p> |
| 加藤悠太郎 | <p>Bilirubin Rinse : A Simple Protectant Against the Rat Liver Graft Injury Mimicking Heme Oxygenase-1 Preconditioning. (ビリルビンリンス法の開発：ヘムオキシゲナーゼ-1によるプレコンディショニングに匹敵する移植肝保護効果の検討)22</p> |
| 菊地 淑人 | <p>MR Imaging in the Diagnosis of Denervated and Reinnervated Skeletal Muscles : Experimental Study in Rats (脱神経筋および再神経支配筋の診断におけるMRIに関する実験的研究)23</p> |
| 木村 至 | <p>傍黄斑部網膜毛細血管血流の定量的評価法の確立と黄斑部疾患への応用.....24</p> |
| 鈴木 貴士 | <p>ヒト <i>Notch4</i> およびヒト <i>Notch1</i> 遺伝子の子宮内膜癌における発現異常25</p> |
| 橋本 学爾 | <p>Matrix Metalloproteinases Cleave Connective Tissue Growth Factor and Reactivate Angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor 165. (マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は結合組織成長因子 (CTGF) を分解することにより血管内皮成長因子 (VEGF₁₆₅) の血管新生活性を再活性化する)26</p> |
| 松田 洋人 | <p>生体内CCDカメラを用いた腎輸入・輸出細動脈の反応性の層差に関する研究27</p> |

A Specific Genetic Alteration on Chromosome 6 in Ulcerative Colitis-associated Colorectal Cancers.

(潰瘍性大腸炎を発生母地とした大腸癌に特異的なヒト染色体6番の異常)

江崎 俊彦

内容の要旨

潰瘍性大腸炎は大腸粘膜に慢性炎症を反復する難治性疾患であるが、その長期経過例において大腸癌の発生頻度が高くなることが知られている。散発性大腸癌の発癌メカニズムとしては、adenoma-carcinoma sequenceやDNA mismatch repair systemの異常が知られているが、潰瘍性大腸炎における慢性炎症を発生母地とする大腸癌においては、発癌の分子生物学的メカニズムは明らかとなっておらず、未知の癌抑制遺伝子の関与も示唆されている。

本研究では、潰瘍性大腸炎経過中に発生したdysplasiaと大腸癌計12例に対して、ヒト染色体の1～22番およびX染色体に局在する計35個のmicrosatellite markerを用いてallelotype studyを行った。その結果、染色体6番(D6S468)において、8症例中5症例(62.5%)と高頻度のloss of heterozygosity (LOH)が検出されたため、染色体6番に局在するmicrosatellite marker計5個(D6S1606, D6S1543, D6S468, D6S283, D6S1580)を用いてさらにLOHを検索した。そして、共通欠失領域はD6S1543からD6S1580の間と決定された。LOHが検出された5症例中、4症例が大腸癌で、大腸癌4症例のうち、高分化型腺癌が1例、中分化型および低分化型腺癌は3例であった。また興味深いことに、1例のdysplasia症例においても染色体6番の欠失が認められた。以上のことから、染色体6番の欠失は病理組織型に関係なく潰瘍性大腸炎を発生母地とした腫瘍に認められることが示唆された。

次に本研究では、染色体6番の欠失が潰瘍性大腸炎を発生母地とした大腸癌に特異的な異常であるか否かを検討するために、散発性大腸癌20例(高分化型腺癌17例、中分化型および低分化型腺癌3例)において同部位のLOHを検索した。しかし、LOHは全く検出されなかった。さらに、染色体6番の欠失が潰瘍性大腸炎の経過中にも認められるか否かを検討するために、dysplasiaおよび大腸癌を併発していない潰瘍性大腸炎20例(全結腸型12例、左側型8例)に対して、染色体6番の欠失の有無を検討した。罹病期間5年以内が6例、5年から10年が8例、10年以上が6例であったが、いずれの症例においてもLOHは全く検出されなかった。

以上の結果から、染色体6番の欠失は、散発性大腸癌、dysplasiaおよび大腸癌を併発していない潰瘍性大腸炎には認められず、潰瘍性大腸炎を発生母地とした大腸癌にのみ認められる特異的な変化であることが示唆された。そして、その領域に慢性炎症を発生母地とする大腸癌の発生に関与する新規癌抑制遺伝子が存在することが示唆された。

論文審査の要旨

潰瘍性大腸炎は大腸粘膜に慢性の炎症をきたす疾患であるが、その長期経過例において大腸癌の発生頻度が高くなることが知られている。潰瘍性大腸炎における慢性炎症を発生母地とする大腸癌の発症の分子生物学的メカニズムを明らかにするため、本研究では、潰瘍性大腸炎経過中に発生したdysplasiaと大腸癌計12例に対して、ヒト染色体の1～22番およびX染色体に局在する計35個のmicrosatellite markerを用いてAllelotype Studyを行い、染色体6番に共通欠失領域を見出した。そして、染色体6番の欠失が、散発性大腸癌、dysplasiaおよび大腸癌を併発していない潰瘍性大腸炎には認められず、潰瘍性大腸炎を発生母地とした大腸癌にのみ認められる特異的な変化であることを示した。

審査では、論文投稿後にも最新genome dataの見直しはされているかとの質問がされた。投稿時はSanger Instituteの染色体6番の解析が終了していなかったため、マーカーの順位はNCBIのphysical mapをもとに決められたこと、そのため今後マーカーの順位が逆転する可能性があることを考え、Sanger Instituteの染色体6番の解析終了後に再度データを確認し、D6S468とD6S1543の位置関係が入れかわっていることを確認していると回答された。DiscussionでGRIK2とAngiopoietinについて論議されているが、GRIK2は最新データでは共通欠失領域からずれているのではないかと、Angiopoietinは染色体8番にマップされているが、この点に関しては現時点ではどのように考えているかとの質問がされた。投稿時、共通欠失領域は5Mbと考えられており、GRIK2は確かに欠失領域に含まれていたこと、Angiopoietin like factorが欠失領域に含まれていたことからAngiopoietinと同様の機能をもつ遺伝子が存在するとして議論したと回答された。最新データでは共通欠失領域は約1.5Mbであること、遺伝子の情報は刻一刻と変わるので注意を要することが指摘された。また、double functionをもつ遺伝子も存在するので、現在報告されている機能が、癌抑制遺伝子としてふさわしくなくともそれらの遺伝子を除外しきれないとの意見も出された。LOHの症例についての臨床像について質問がされたが、カルテ上、臨床経過、治療経過等で有意な共通性は見出せなかったと回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、染色体6番の異常が潰瘍性大腸炎の癌化に特異的な変化であることを明らかにした点で消化器病学上有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正
外科学 北島 政樹 病理学 岡田 保典
分子生物学 清水 信義
学力確認担当者:
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成15年11月25日

Expression and regulation of nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action.

(グルココルチコイド作用における核内受容体コアクチベーターの発現と調節)

栗原 勲

内容の要旨

【目的】 転写共役因子はDNAに結合せずに核内受容体などの転写因子と相互作用して転写調節する因子であり、受容体作用を増強するコアクチベーターと、減弱するコリプレッサーが知られている。Steroid Receptor Coactivator-1 (SRC-1) は、グルココルチコイド受容体 (GR) を含む多くのステロイドホルモン受容体とホルモン依存性に相互作用して、その作用を増強する代表的なコアクチベーターである。細胞内での発現量が限られていること、ホルモンによる受容体作用を数十倍までに増強しうることから、SRC-1の細胞内での発現量の変化はホルモン作用に極めて大きな影響を与える。そこで、本研究ではグルココルチコイドによるSRC-1自身の発現調節に及ぼす影響につき検討した。

【方法】 *in vivo*のモデルではSprague-Dawley (SD) ラットを用い、*in vitro*のモデルでは2種類の細胞、ラットメサンギウム初代培養細胞 (RMC細胞) 及びマウス近位尿細管由来細胞株 (MCT細胞) を用いた。SDラットでは、心・胃・腎・肝・脳の5臓器を検討した。グルココルチコイドとしてはデキサメサゾン (DEX) を用い、日単位 (長時間) および時間単位 (短時間) の時間経過でDEX投与後のSRC-1の発現量を、mRNAおよび蛋白レベルで検討した。mRNAレベルはNorthern blot法またはRT-PCR法で検討し、蛋白レベルはWestern blot法で検討した。

【結果と考察】 *in vivo*のモデルにおいて、いずれの臓器においてもDEX投与によりSRC-1 mRNAの発現低下が観察され、3日目では投与前の40-60%まで発現の低下を認めた。短時間の経過では、SRC-1 mRNAレベルは、DEX投与4-8時間後にかけて、蛋白レベルは8-12時間後にかけて発現低下を認めた。次に*in vitro*のモデルでは、RMC細胞およびMCT細胞いずれにおいても、SRC-1 mRNAレベルは2-4時間にかけて、蛋白レベルでは6-8時間にかけて、一過性の発現低下を認めた。GRアンタゴニストによりSRC-1の発現低下が消失したことから、本現象はGRを介するSRC-1遺伝子転写レベルでの発現低下と考えられた。*in vivo*および*in vitro*いずれにおいても、検討したその他のコアクチベーターは有意な発現量の変化を認めなかった。本結果の意義については、DEX投与によりGR作用を増強するコアクチベーターSRC-1の発現が低下して、GR作用が緩和されると考えられることから、グルココルチコイドの作用過剰に対する生体防御機構の一つであると考えられた。標的組織におけるSRC-1発現レベルが、ホルモンにより調節されることは、グルココルチコイド作用調節における新しいメカニズムの一つと考えられた。

論文審査の要旨

転写共役因子の1つであるSteroid Receptor Coactivator-1 (SRC-1) は、糖質コルチコイド受容体 (GR) を含むステロイド受容体とリガンド依存性に相互作用して、ホルモン作用を増強する。このSRC-1の発現調節機構とその臨床的意義は未だ明らかでない。本研究では、糖質コルチコイドのSRC-1の発現調節への影響を主としてラットを用い、*in vivo*および*in vitro*の両面から検討した。

*In vivo*での研究では、糖質コルチコイドとしてデキサメサゾン (DEX) を投与し、心、胃、腎、肝、脳の5臓器におけるSRC-1の発現量をmRNAレベルと蛋白レベルとで検討した。各臓器でDEX投与によりSRC-1 mRNAの発現低下が見られ、3日目には投与前値の40-60%まで低下し、8日目に前値に復した。次に投与12時間までの短時間の観察では、SRC-1 mRNAレベルは4時間後から低下し、8時間後に最低値となり、12時間後に元のレベルに復したが、蛋白レベルは8時間後に最低値となり、12時間後もなお低値であった。

*In vitro*での研究は、ラットメサンギウム初代培養細胞とマウス近位尿細管由来細胞株とを用いてDEXのSRC-1の発現への影響を検討した。両細胞で、SRC-1 mRNAレベルは2-4時間後、蛋白レベルでは6-8時間後に一過性の発現低下を認めた。この発現低下は、GR拮抗薬で消失したことから、GRを介したSRC-1の遺伝子転写レベルでの発現低下とされた。

このような研究に対して、まずSRC-1の発現調節の検討で、心、胃、腎、肝、脳の5臓器を選んだ理由、さらにSRC-1の発現に各臓器で大差ないとされたが、注意深くみると各臓器で差があるように見えるとの指摘があった。著者は臓器の選択に関して特別の理由はなく、得られやすい代表的臓器として、これらの5臓器を選択したとされた。各臓器におけるSRC-1の発現には大差がなく、SRC-1のような転写共役因子はDNA上に直接結合しないので、大差がなかったのは妥当とされた。

次に*In vitro*の研究では、メサンギウム細胞と尿細管細胞とを用いた理由が問題とされたが、この点に関しても特別な理由はなく、腎臓の代表的な細胞であり、糖質コルチコイド作用が注目される細胞であるからとされた。このほかDEX投与実験で、SRC-1の発現低下状態がmRNAレベルと蛋白レベルで異なる点が注目された。mRNAレベルに比し蛋白レベルでは抑制されている時間が長く、その原因が蛋白代謝の障害によるのか、詳細を解明する必要があるとされた。またこのようなSRC-1の発現の変化が、臨床所見とどう関係してくるのか、将来の検討課題とされた。

以上のように、本研究には今後の検討課題がいくつか残されたが、代表的な核内受容体の転写共役因子であるSRC-1の発現調節機構を解明した点で、この領域で価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
医化学 末松 誠 泌尿器科学 村井 勝
内科学 池田 康夫

学術確認担当者:

審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成15年12月3日

Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults.

(アルツハイマー病関連侵害刺激による神経細胞死を抑制するHumaninにおける必須なアミノ酸の同定)

山 岸 洋 一

内容の要旨

Humanin (HN) は24アミノ酸残基からなる分泌ペプチドで、全種類の家族性アルツハイマー病原因遺伝子、抗アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 抗体および細胞障害性 $\text{A}\beta$ ペプチドによる神経細胞死を抑制する。私達はこれまでにLeu9をArgに置換すると細胞外へ分泌されなくなることを明らかにした。今回、私達はHNの分泌および神経細胞死抑制活性における構造上の必要条件を完全長のHNを用いて調べた。N末にHNを融合したEGFP (HN-EGFP) を細胞内に発現させるとEGFPあるいはHNの一部が欠如したHN-EGFPとして細胞外に分泌された。一方、EGFPおよび (L9R) HN-EGFPは分泌されなかった。したがって、HNは一次構造依存的にC末に融合させたEGFPを分泌させることがわかった。これらのことは、C端側に結合したEGFP程度に大きな分子に対し、N端側のHN配列はシグナルペプチドとして機能することを示し、他方、C端側に結合した分子がFLAG程度に小さい場合は、HN配列をN端側に持つ分子の全長が切断されずに分泌されるということを示している。すなわち、HNは、C端側に結合する分子によって、シグナルペプチドとして機能したり、HN自身を分泌させる機能を発揮したりする。後者の場合が起こるのは、C端側に結合する分子がないか、FLAG程度に小さい場合と考えられる。

次に、このようにして明らかとなったHN自身の分泌に及ぼす各アミノ酸残基の役割を明らかにするために、HNの各残基を置換した変異体の分泌能を調査した。HNの各アミノ酸をAlaに置換してもHN自身の分泌には影響をおよぼさなかった。Arg置換したHN変異体のうち、L9R、L10R、L11R、P19RおよびV20R変異体は分泌されなかった。これらの結果から、2つのドメイン、すなわちLeu9-Leu11およびPro19-Val20がHN自身の分泌において重要であることがわかった。さらに、これらのアミノ酸のうち、Leu9およびLeu11をAspに置換したHN変異体は分泌されたが、Leu10をAspに置換したHN変異体は分泌されなかった。したがって、Leu10はHN自身の分泌において中心的な役割を担っていると考えられた。次に、Ala-scanningしたHNを利用して、完全長HNの神経細胞死抑制活性における構造活性相関を調べた。その結果、P3A、S7A、C8A、L9A、L12A、T13A、S14AおよびP19A変異体はV642I APPIによって誘導される細胞死を抑制できなかった。したがって、Pro3、Ser7、Cys8、Leu9、Leu12、Thr13、Ser14およびPro19はHNの神経細胞死抑制活性に重要であることが明らかとなった。さらに、S7A、および、L9A変異体は2量体化できなかったことから、Ser7、および、Leu9はHNの2量体化に重要であることが明らかとなった。また、細胞死抑制活性はあるが2量体化できない変異体は存在しなかった。

以上のことから、HNはシグナルペプチド様の活性があり、この活性にはドメインLeu9-Leu11が重要で、特にLeu10が中心的な役割を担っていることが示された。さらに、HNの2量体化はHNが神経細胞死抑制活性を発現する上で必須な過程であることが示唆された。また、Leu9は分泌、2量体化および神経細胞死抑制活性に重要であることが明らかとなった。

論文審査の要旨

Humanin (HN) は24アミノ酸残基からなる分泌性のポリペプチドで、その遺伝子を細胞に導入すると細胞から分泌され細胞外から作用し、 $\text{A}\beta$ をはじめとするアルツハイマー病に関連する全ての因子が誘導する細胞死に特異的に拮抗する事が知られている。本研究では、HNの特徴を明らかにするために、分泌および神経細胞死抑制活性における構造上の必要条件を完全長のHNを用いて調べた。その結果、1) HNにはシグナルペプチド様の活性があり、この活性にはドメインLeu9-Leu11とドメインPro19、Val20の2つのドメインが重要であり、特にLeu10が中心的役割を担っていること、2) HNの神経細胞死抑制活性には2量体化が必須であること、3) Leu9は分泌、2量体化および細胞死抑制活性に重要であることが明らかにされた。

審査では、まずHNに関する研究における本研究の位置づけについて質問がなされた。アルツハイマー病の根治療法を確立することを目的に、HNの作用機序の解明とともに早期の臨床応用を実現すべく、より安定で活性の高いHN誘導体の探索を行っており、その一環として本研究が行われ、また、臨床で応用されるためには様々な薬理試験、安全性試験など検討すべき点は多い、HNの生体内での生理的な存在意義についても検討する必要があるとその為の基礎的な研究としての意義があるとの回答がなされた。次に、神経細胞死抑制活性について、細胞に導入された神経細胞死誘導因子の発現は細胞集団としては確認しているが、その細胞と生存している細胞が同一の細胞であることを確認すべきであったとの指摘がなされた。さらに、HNの2量体形成の様式について、Ser7-Leu12における各アミノ酸の役割の推察とその解析方法についての助言があった。また、生体におけるHNの遺伝子発現の調節機構について質問があり、今後の検討課題であると回答された。最後に、分泌に関する結果で、複数のバンドが観察された理由を質問され、HN-EGFPにおけるEGFPの検出は使用した抗体の特性によるものである、また、HN-FLAGにおけるFLAGの検出はHNの凝集しやすいという物性を反映している可能性が考えられるが、詳細は不明であるとの回答された。

以上のように、本研究には今後の課題が残されてはいるものの、HNの様々な機能におけるアミノ酸の必要条件が明らかにされたことは、HNの活性や代謝の機構を明らかとすることにつながるものであるのみならず、臨床において最も有効なHN誘導体を開発するための重要な知見となり得るものであると考えられた点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 解剖学 相磯 貞和
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之
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15年12月1日

A Role of Autoantibody-Mediated Platelet Destruction in Thrombocytopenia in Patients With Cirrhosis.

(肝硬変症患者の血小板減少症における自己抗体による血小板破壊の役割)

梶原 幹生

内容の要旨

論文審査の要旨

血小板減少症は、肝硬変症 (LC) 患者に高頻度に見られる重要な血液所見の一つである。歴史的には、LC患者に伴う脾腫により脾臓における血小板貯留が増多し、これが血小板減少の原因であるとされてきた。また、LC患者ではトロンボポエチンの産生障害により血小板合成が低下する可能性や、血小板関連IgGが高値を示すことから自己免疫機序が関与する可能性も示唆されているが、LC患者の血小板減少症の発症機序の解明は未だ十分ではない。本研究では、自己免疫性疾患である特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者に認められることで知られる、血小板に特異的な糖蛋白 (GP) の一つであるGP II b-III aに対する抗体に着目し、LC患者の血小板減少症の発症における自己免疫機序の関与について検討を行った。LC患者72人 (B型肝炎15人、C型肝炎37人及びアルコール性肝障害20人)、ITP患者62人及び健常者52人につき、抗GP II b-III a抗体産生性B細胞をenzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法にて検出し、その末梢血中の頻度を検討した。また、末梢血単核球 (PBMCs) をGP II b-III a抗原刺激下にて培養し、*in vitro*での抗GP II b-III a抗体産生の評価を行った。抗GP II b-III a抗体産生性B細胞の末梢血中頻度はLC患者において健常人に比し有意に高値であり (10.9 ± 6.2 v $0.4 \pm 0.3/10^3$ PBMCs; $P < 0.0001$)、この値は同頻度が高いことが知られているITP患者 (8.2 ± 5.2) よりも高値であった ($P < 0.007$)。LC患者における末梢血中の抗GP II b-III a抗体産生性B細胞の頻度と血小板数には有意な負の相関を認め ($r = -0.40$; $P = 0.0004$)、同自己抗体の血小板減少への関与が示唆された。LC患者及びITP患者に認められた抗GP II b-III a抗体は、血漿中ではなく、むしろ血小板表面に高濃度に存在しており、同抗体が患者体内において抗血小板活性を持つことが示唆された。さらに、LC患者とITP患者から採取したPBMCsはGP II b-III a抗原提示下の培養で*in vitro*で抗GP II b-III a抗体を産生し、産生された抗体が正常血小板に対する結合能を有することが確認され、同抗体が血小板特異的な抗体活性を有する可能性が示唆された。本研究の結果、LC患者とITP患者は、類似した抗GP II b-III a抗体反応の特徴を有し、LC患者の血小板減少症発症の少なくとも一部に、自己抗体に調節された血小板破壊が関与することが示唆された。

血小板減少症は、肝硬変症 (LC) 患者に認める血液所見の一つであるが、その発症機序の解明は十分ではない。本研究では、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者に認められることで知られる血小板特異的な糖蛋白 (GP) の一つGP II b-III aに対する抗体に着目し、LC患者の血小板減少症における自己免疫機序の関与につき検討した。Enzyme-linked immunospot法にて検出された抗GP II b-III a抗体産生性B細胞の末梢血中頻度はITP患者と同様、LC患者において健常人に比し高値であり、かつこの値はLC患者の血小板数と負の相関を認めた。また、LC患者とITP患者から採取した末梢血単核球 (PBMCs) はGP II b-III a抗原提示下の培養で*in vitro*で抗GP II b-III a抗体を産生し、産生された抗体が正常血小板に対する結合能を有することも確認された。本研究の結果、LC患者とITP患者は類似した抗GP II b-III a抗体反応の特徴を有し、LC患者の血小板減少症発症機序の少なくとも一部に、自己抗体により調節された血小板破壊が関与する可能性が示唆された。

審査ではまず、LC患者において抗GP II b-III a抗体が産生されるにいたる原因についての質問がなされた。これに対し、LC患者においては門脈圧亢進、脾腫により脾臓での血小板貯留が増えるため、網内系での抗原提示が過剰になる可能性があると同答されたが、脾摘出術施行例などにおいて網内系の病理学的検討を行うべきとの指摘がなされた。次いで、LC患者とITP患者の間における相違につき質問された。LCおよびITP患者は類似した抗血小板抗体反応を有することが本研究で示されたが、臨床的にはLCにともなう血小板減少はITPに比し一般的に軽度である。この原因としてLCにおいては網内系機能が低下しており自己抗体に認識された血小板が十分に貪食されない可能性や、LCとITP患者では産生されるIgG抗体のsubclassが異なるため、opsonin効果に差が生ずる可能性について説明がなされ、今後の検討課題とされた。また、抗GP II b-III a抗体の産生による凝集能ほか血小板機能の変化や、血小板由来成長因子など各種cytokinesへの影響についても検討すべきであると指摘された。さらには、将来的な臨床応用についても質問がなされ、機序のさらなる解明がLC患者のみならずITP患者についても出血の危険性や輸血の必要性も軽減しうるため、さらなる検討を続けるべきであるという助言がなされた。

以上、本研究は今後検討されるべき課題を残してはいるものの、日常診療上で高頻度に遭遇し、出血傾向などの点できわめて重要な病態であるLC患者における血小板減少症の発症に、自己免疫機序が関与する可能性を明らかにした点で、消化器病学上非常に有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正
医化学 末松 誠 外科学 北島 政樹
病理学 岡田 保典
学力確認担当者:
審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成16年1月20日

Identification and Characterization of Two Isoenzymes of Methionine γ -Lyase from *Entamoeba histolytica* A KEY ENZYME OF SULFUR-AMINO ACID DEGRADATION IN AN ANAEROBIC PARASITIC PROTIST THAT LACKS FORWARD AND REVERSE TRANS-SULFURATION PATHWAYS

(病原性赤痢アメーバのメチオニンガンマリアーゼアイソザイムの同定と解析：
硫黄転移経路を持たない嫌気性寄生原虫における含硫アミノ酸分解酵素の重要性)

所 正 治

内容の要旨

(目的) 病原性腸管内寄生原虫である赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* においては、グルタチオン代謝経路が存在しないことから、システイン、メチオニンなどの含硫アミノ酸とその代謝経路が細胞内チオール濃度の調整により抗酸化機能を補完していると考えられてきた。そこで、本研究では、含硫アミノ酸代謝において中心的な役割を果たしているピリドキサルリン酸依存酵素の同定と解析により、これまで未解明であった赤痢アメーバの特異な含硫アミノ酸代謝経路の解明と、この経路をターゲットとした薬剤開発の可能性を評価することを旨とした。

(方法) 赤痢アメーバのゲノムデータベース検索により決定されたピリドキサルリン酸依存酵素の遺伝子配列を用い、PCRによりcDNA libraryからクローニング、組換えタンパク質を作成し酵素学的解析を行った。また、培養赤痢アメーバを材料とした本酵素の粗製性を行い、その詳細な解析を行うとともに、本酵素を標的とした阻害剤およびプロドラッグの赤痢アメーバ培養系への影響を評価した。

(結果と考察) 赤痢アメーバでは、2つのピリドキサルリン酸依存酵素遺伝子が得られたが、組換えタンパク質の酵素学的解析より、これらの遺伝子はメチオニンガンマリアーゼの2つのアイソタイプと考えられた。したがって、赤痢アメーバは、他種の生物とは異なり、メチオニンとシステインを転換する硫黄転移経路を欠損すると同時に、広範な含硫アミノ酸を分解するメチオニンガンマリアーゼによる細胞内チオール濃度の調整系を持つものと考えられた。また、ピリドキサルリン酸依存酵素阻害剤であるプロバジルグリシンの培地への添加により、赤痢アメーバの粗抽出液中におけるメチオニンガンマリアーゼ活性は完全に阻害されるにもかかわらず、栄養体の増殖抑制は軽度であり、培養条件下では本酵素はその生存に必須ではないものと考えられた。しかしながら、メチオニンアナログであるトリフルオロメチオニンを用いた場合の殺原虫作用は、メトロニダゾールの約2倍のIC₅₀を示し、また、この効果は、プロバジルグリシンの存在下では抑制され、本酵素を必須とするプロドラッグであることが示唆された。

論文審査の要旨

含硫アミノ酸代謝は微生物でも種によって多様性に富んでいる。ヒトとは異なるユニークな進化を遂げている原虫である赤痢アメーバにおいても、薬剤の新しい標的としての特異な代謝経路が見出されることが予想される。本研究は、生理的に重要な含硫アミノ酸であるメチオニンとシステインの相互変換経路のkeyとなる酵素であるピリドキサルリン酸依存酵素の解析を試み、赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸代謝経路の全体像を示すと同時に、ほ乳類には認められない特異な含硫アミノ酸分解酵素(メチオニンガンマリアーゼ)を見出し、その同定と解析、更に本酵素を標的とした薬剤開発の可能性の評価を行い、メチオニンアナログの殺アメーバ効果を明らかにしたものである。審査では、メチオニンガンマリアーゼの組換えタンパク質を用いたプロバジルグリシンによる阻害反応における阻害剤のslow bindingについて、解析方法の詳細が問われ、本酵素におけるslow bindingの解析は、プロバジルグリシンの酵素蛋白へのbindingを直接測定したのではなく、一定時間阻害剤とのインキュベーション後の見かけ上の阻害反応解析を酵素活性測定によりおこなった旨が回答された。また、赤痢アメーバにおけるメチオニンガンマリアーゼの高級構造がホモテトラマーであることについて、近縁の原虫であるトリコモナスとの比較の上での特徴について問われ、トリコモナスにおいてはヘテロテトラマーの構造を取る1種類のメチオニンガンマリアーゼが発現しているものと考えられているのに対して、赤痢アメーバにおいては、それぞれがホモテトラマーの構造を取る2種類のアイソザイムがともに細胞質中に発現しているものと回答された。また、メチオニンガンマリアーゼ遺伝子による系統樹解析において、近縁の原虫とは異なり、むしろ古細菌と同じクラスターに赤痢アメーバの遺伝子が含まれると云う解析結果について、このような遺伝子のホリゾンタルトランスファーを示唆する所見の赤痢アメーバにおける意義が問われ、赤痢アメーバにおいては多くの代謝経路でモザイク状と形容される他種由来もしくは他種との共通祖先を示唆する遺伝子群が存在すると云う系統樹解析の結果が示されており、本研究のデータはこれらに矛盾するものではないとの回答がなされた。また、メチオニンガンマリアーゼによって含硫アミノ酸から産生される分解産物の生理的機能に関連し、DNAのメチル化の制御、レドックス制御等においていかなる機能を担っているのかは興味深い課題であり、今後検討すべきであるとの指摘がなされた。以上、本研究は、今後更に検討を継続する余地を残しているものの、赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸代謝経路における分解系の重要な酵素の解析を行い、かつこれらを標的とした抗原虫薬開発の可能性を示したものであり、有意義な貢献であると評価された。

論文審査担当者 主査 熱帯医学・寄生虫学 竹内 勲
微生物学 小安 重夫 医化学 末松 誠
微生物学 石川 博通

学力確認担当者：
審査委員長：小安 重夫

試問日：平成16年1月7日

Basic Studies on the Clinical Applications of Platelet-Rich Plasma.

(多血小板血漿の臨床応用に関する基礎的研究)

矢澤 真樹

内容の要旨

1. 緒言

血小板には止血作用だけでなくPDGF, TGF- β 1, IGF-1など血管や組織の修復機転に関与する様々な成長因子の存在が確認されている。これら天然型の成長因子は患者自身の血液より収集し使用することができるので抗原性がなく、感染症などの危険が少ないという利点から、多血小板血漿 (PRP) として創傷治癒、骨形成を促進させる試みが注目されている。本研究は、PRPに含まれる成長因子の濃度を測定して、より高濃度の成長因子を含むPRPの作成法を開発し、PRPの担体としてフィブリン糊を用いた場合のDDS (Drug Delivery System) としての評価を行ない、その臨床効果および臨床応用への可能性を検討した。

2. 材料・方法

実験1 PRP, 血小板沈殿物再浮遊液の作成と含有成長因子濃度の検討

まずヒトの全血を80G、15分間遠心分離して血球成分を除いた血漿成分 (PRP) を作成した。次にこのPRPを1000G、7分間遠心分離して得られた血小板沈殿物をその上清 (PPP: Platelet Poor Plasma) 1mlで再浮遊し、血小板沈殿物再浮遊液としてPDGF, TGF- β 1濃度を測定した。

実験2 血小板沈殿物再浮遊液のDDSの検討

ウサギの全血から作成した血小板沈殿物をフィブリン糊で再浮遊し、フィブリン糊シートを作成した。これを同じ兎の耳介皮下に埋入し、埋入前、埋入後、1, 3, 5, 7日目の検体をH.E.染色および抗PDGF抗体で免疫染色した。

3. 結果

実験1: PDGF濃度、TGF- β 1濃度は全血に比べPRPでは3.5~4倍、血小板沈殿物再浮遊液では12~19倍に濃縮されていた。

実験2: H.E.染色では埋入直後より7日に渡って次第にフィブリンシートが薄く、内部が粗になる様子が観察された。免疫染色では埋入後7日まで、残存するシート内に抗PDGF抗体による顆粒状の染色像が観察された。

4. 考察

血小板沈殿物の再浮遊を利用した多血小板血漿作成法は、通常の方法より高濃度の成長因子を含めることができるだけでなく、収集した成長因子に無駄が少なく、再浮遊に各種担体を付加すれば効果的なDDSの期待ができる。

本研究の結果で得られた成長因子濃度は、過去の知見で各種成長因子を単独投与した場合に必要な濃度には達していないが、複数の成長因子を複合投与した場合、成長因子同志のネットワークにより、単独投与を上回る創傷治癒効果が確認できるとされている。様々な成長因子がある程度自然な比率を保ちながら存在するPRPは、単独の成長因子投与による創傷治癒促進効果より低濃度で良好な効果を発揮することが推察される。PRPの担体としては、フィブリン糊が理想的な代謝吸収動態を示し、経時的なPDGFの含有が確認されたことに加え、血小板沈殿物からの再浮遊にも適当であることから、今後PRPの臨床応用に適当な担体の一つと考えられた。

論文審査の要旨

PDGF, TGF- β などの成長因子が多く存在する血小板は遠心分離により高濃度で採取され、PRP (Platelet Rich Plasma) として創傷治癒、骨形成の場で臨床利用されている。本論文では、PRPに含まれる成長因子の濃度を測定しながら従来の作成法に工夫を加え、より高濃度の成長因子を含むPRPの作成方法を明らかにした。さらに、このPRPの適応方法について、PRPを含有するフィブリン糊シートをウサギの耳介に埋入後経時的に採取、免疫染色 (抗PDGF抗体) することで、PRPのDDS (Drug Delivery System) としてのフィブリン糊を評価した。その結果、PRPはフィブリン糊を担体とした場合1週間程度の徐放性を得られる可能性が推測され、PRPの効果的な臨床応用の可能性を示唆した。

審査では、測定されたPRP中の成長因子濃度について、各成長因子が単独投与された場合に効果を認めるとされる濃度に達していないことについて解釈を求められたが、我々の行っているPRP作成法では血小板pellet再浮遊に用いる液量によって成長因子濃度のコントロールは自在であるとした上で、PRP中には各種成長因子が生理的なバランスの配合で含まれているため、これらの相互・相乗作用が期待できることや、その後の研究のによりPRP作成時にPGEIなどの抗血小板剤の併用が成長因子回収効率を高めることを明らかにしているとされた。PRPでは成長因子が高濃度に濃縮できていることは分かるが、同一検体のPRPでPDGFとTGF- β 1の濃縮倍率に差が生じていることについて指摘されたが、測定に用いるELISAの選択に検討の余地を残すものの、検体中での血小板の脱顆粒が不十分な恐れについては、現在では血小板を完全に壊してから測定する方法を採用していると回答された。PRPをフィブリン糊と混ぜて使用することでDDSとしての可能性を示しているようだが、フィブリン糊内に存在する血小板あるいは成長因子の活性はどうかという問いに対し、電子顕微鏡写真によりフィブリン糊内では成長因子のほとんどが血小板から脱顆粒により放出されていることを確認しているが、抗PDGF抗体による免疫染色での確認ではフィブリン糊内の成長因子に活性があるかどうかの判断はできないので、今後の詳細な検討が必要とされた。

論文中の検討方法に若干改良の余地が残されているものの、発想と着眼点、およびこの研究から発展し継続している一連の研究 (成長因子の濃度測定方法・抗血小板剤の回収効率への寄与、PRPとヒト由来のトロンビン、フィブリンの併用によるboneless bone graftの可能性、創傷治癒促進効果への応用) は、再生医学研究の中でもきわめて安全と思われる手法を用いており、臨床へのフィードバックが容易な研究として有意義と評価された。

論文審査担当者 主査 形成外科学 中島 龍夫

内科学 池田 康夫 臨床検査医学 渡辺 清明

外科学 河瀬 斌

学力確認担当者:

審査委員長: 池田 康夫

試問日: 平成15年12月24日

Olprinone, a Phosphodiesterase III Inhibitor, Reduces Gut Mucosal Injury and Portal Endotoxin Level during Acute Hypoxia in Rabbits.

(ホスホジエステラーゼⅢ阻害薬オルプリノンは、ウサギにおいて、急性低酸素侵襲下、腸管粘膜傷害を減少させ、門脈血エンドトキシン濃度を減少させる)

佐藤 智行

内容の要旨

背景

重症患者において、腸管の統合性を維持してバクテリアルトランスロケーションを回避することは、治療戦略上の重要課題である。ホスホジエステラーゼⅢ阻害薬であるオルプリノンは、急性低酸素侵襲下において、腸管粘膜の機能的・構造的な統合性を維持するのに有効であるかどうか、ウサギを対象に検討した。その結果、オルプリノンは、低酸素侵襲下における腸管粘膜アシドーシスとバクテリアルトランスロケーションの進行を、微細構造の恒常性を維持しながら抑制することが明らかになった。このようなオルプリノンの特性は侵襲下の患者の保護に貢献する可能性があることが示唆された。

方法

準備実験後、32羽のウサギをコントロール群 (生理食塩水; n=12)、低濃度群 (オルプリノン $0.2\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; n=10)、高濃度群 (オルプリノン $0.6\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; n=10) の3群に無作為に割り付けた。上行大動脈血流量、門脈血流量、腸管粘膜内pH、門脈血エンドトキシン濃度を測定した。吸入酸素濃度は段階的に落としていき、21%、17%、13%、10%で測定を行った。

結果

高濃度群の上行大動脈血流量は、吸入酸素濃度21%で、コントロール群・低濃度群より20%程度高かった。コントロール群、低濃度群の間には有意差はなかった。コントロール群では、酸素濃度が低下するにつれ、上行大動脈血流量、門脈血流量は減少した。一方、オルプリノン投与によりその変化は緩和され、内臓領域への血流量は量依存性に増加した。対照的に、腸管粘膜内pHの低下と門脈血エンドトキシン濃度の上昇は、コントロール群に比して、低濃度群・高濃度群において著明に減少し、両群間に有意差はなかった。コントロール群でみられた腸管粘膜の病理組織学的変化は、オルプリノン投与により、低濃度群・高濃度群において同程度に抑制され、ウサギの生存率改善も同様であった。

結論

オルプリノンは、低酸素侵襲下における腸管粘膜アシドーシスとバクテリアルトランスロケーションの進行を、微細構造の恒常性を維持しながら、投与量依存性の機構および投与量独立性の機構により抑制する。このようなオルプリノンの特性は侵襲下の患者の保護に貢献する可能性がある。

論文審査の要旨

重症患者において、腸管の統合性を維持してバクテリアルトランスロケーションを回避することは、治療戦略上の重要課題である。本研究では、ホスホジエステラーゼⅢ阻害薬オルプリノンは、急性低酸素侵襲下において、腸管粘膜の機能的・構造的な統合性を維持するのに有効であるかどうか、ウサギを対象に検討した。その結果、オルプリノンは、低酸素侵襲下における腸管粘膜アシドーシスとバクテリアルトランスロケーションの進行を、微細構造の恒常性を維持しながら抑制することが明らかになった。このようなオルプリノンの特性は侵襲下の患者の保護に貢献する可能性があることが示唆された。

審査ではまず、検討項目が多い充実したスタディであることが評価された。次に、乳酸値の由来と、乳酸値が重度低酸素状態において、有意差はないものの、低濃度群で高濃度群より低かった理由を尋ねられた。これについて、嫌気性代謝により筋や肝より産生されるが、重度低酸素状態において、低濃度群で乳酸値が低かった理由については不明だと回答された。これに対して、審査員より、赤血球が関与している可能性が指摘された。また、腸管は虚血再灌流傷害を受けやすいので、低酸素段階の途中からオルプリノンを流したら別の結果が得られるのではないかとこの質問がなされた。これに対して、キサンチンオキシダーゼの活性はウサギでは高いので、その可能性は高いと回答された。また、cAMPおよびオルプリノンの血中濃度について測定していないことを指摘された。これに対して $0.6\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ で投与開始45分後に心拍出量が20%程度増加していること、および $0.05\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ の投与量でも有効血中濃度20ng/mlに達するというデータから、高濃度群では十分に血中濃度は上昇していると推測されること、および、今回のスタディでは臨床上で使用量の指標となる心拍出量を指標にしたと回答された。また、今回のスタディモデルが臨床とどう関連性があるかという質問がなされた。これに対して肺機能が低下して十分な酸素供給量を維持できない状況を想定したと回答された。また、最終段階において急激に貧血が進行しているのではないかとこの質問があった。これに対し、統計上有意ではないが、中程度低酸素と高度低酸素の間に閾値のようなものがあり、そこで、詳細はわからないが、何か作用した可能性はあると回答がなされた。これに対して、脾臓の関与も考慮するように指摘された。このほか、要旨に動物種の記載がないこと、乾湿重量比の意義についてはpermeabilityの亢進を考慮するようにとの指摘があった。

以上のように、本研究は、いくつかの検討すべき課題を残しているが、オルプリノンの消化管に対する保護作用を明らかにした点で価値のある有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 臨床麻酔学 武田 純三

内科学 石井 裕正 外科学 北島 政樹

医化学 末松 誠

学力確認担当者: 北島 政樹、石井 裕正

審査委員長: 石井 裕正

試問日: 平成15年11月4日

The Vasodilatory Effects of Hydralazine, Nicardipine, Nitroglycerin, and Fenoldopam in the Human Umbilical Artery.

(ヒト臍動脈におけるヒドララジン、ニカルジピン、ニトログリセリン、フェノルドパムの血管拡張作用)

佐藤 暢 一

内容の要旨

論文審査の要旨

背景

妊娠に伴う高血圧症は一般的な合併症であり、胎児、母体の重要な死亡原因である。妊娠中は胎盤および臍帯血中のプロスタサイクリン (PGI₂) およびトロンボキササンA₂ (TxA₂) が上昇し、これらの濃度変化が妊娠高血圧症の病態に関与すると考えられている。治療には、ヒドララジン、ニカルジピン、ニトログリセリン等の血管拡張薬が利用されている。また、腎機能の悪化に対して腎血流維持のためドパミンが利用されているが、この作用はドパミンレセプター (D1) を介すると考えられ、腎血流だけでなく胎盤血流も増加させると考えられている。フェノルドパムはドパミンよりもさらに特異的なD1アゴニストであるが、妊婦および胎児に対する影響については未だ研究されておらず、ごく少数の子癩前症患者への治療報告しかない。そこでTxA₂アナログ (U46619) で収縮させた臍動脈に対する血管拡張薬の効果の比較と、ドパミンとフェノルドパムの臍動脈に対する直接作用について検討した。

方法

IRBによる承認のもとに、19人の妊婦 (正常血圧群15人、高血圧群4人) より出産時に臍帯を採取し、リング状にカットした臍動脈を用いて実験を行った。サンプルをKrebs-Henseleitバッファーを満たしたオルガンバスに留置し、U46619で収縮させた後、フェノルドパム、ヒドララジン、ニカルジピン、ニトログリセリンを加え、反応曲線を得た。第二に、フェノルドパムおよびドパミンの臍動脈に対する作用を検討した。α受容体の作用を確認するために、ブラゾシン、フェノキシベンザミンで前処置を行った後、フェノルドパムを作用させる実験も行った。

結果

ニトログリセリン、ヒドララジン、ニカルジピンは濃度依存性の血管拡張を引き起こした。正常群、高血圧群ともにニトログリセリンの最大拡張量 (Emax) が最も大きかった。ニトログリセリンとヒドララジンのEmaxは正常群、高血圧群の間に差はなかった。ニカルジピンのEmaxは正常群よりも高血圧群で低い傾向があった (p=0.0654)。フェノルドパムは両群において10⁻⁹M以上の濃度で臍動脈の収縮を引き起こしたが、ドパミンは10⁻¹⁰Mでのみ収縮を起こした。フェノルドパムによる最大反応量はドパミンよりも有意に高値であった。フェノキシベンザミンによる前処置は、フェノルドパムによる収縮を完全に遮断したが、ブラゾシンによる前処置では部分的な遮断にとどまった。

結論

臍動脈に対して、ニトログリセリン、ニカルジピン、ヒドララジンが拡張作用を持つことを示した。また、フェノルドパムが治療濃度よりも高濃度で臍動脈の収縮を起こすことを示した。フェノルドパムの臍動脈に対する収縮作用は非競合型αアドレナリンアンタゴニストであるフェノキシベンザミンにより減弱することから、αアドレナリン作用であることが示唆された。

妊娠高血圧症 (PIH) の病態にはPGI₂とTxA₂の濃度バランスの変化が関与すると考えられている。本研究ではヒト臍動脈を用いてTxA₂アナログ (U46619) による収縮に対するヒドララジン、ニトログリセリン、ニカルジピン、フェノルドパムの各血管拡張薬の効果比較と、ドパミンとフェノルドパムの臍動脈に対する直接作用について検討した。ニトログリセリン、ヒドララジン、ニカルジピンはU46619による収縮に対し濃度依存性の拡張を示し、その拡張作用はニトログリセリンが最も大きく、ヒドララジン、ニカルジピンは同程度であった。フェノルドパムは拡張作用を示すことなく、高濃度においては収縮反応を呈した。以上の結果は、正常血圧患者群とPIH群の間に有意差は認められなかった。次に、フェノルドパムによる臍動脈の収縮反応は、ドパミンよりも強力であった。α遮断薬の存在下では、フェノルドパムの収縮反応は減弱し、フェノルドパムのヒト臍動脈に対する収縮反応はα受容体作動性作用であることが示唆された。

審査ではまず、PIH群の症例数が少数であり、正常血圧群との比較に問題があることが指摘された。また、妊娠中毒症の複雑な病態から、本態性高血圧合併の有無、高血圧発症時期などPIH群の患者背景に関する詳細提示の必要性が指摘された。また、フェノルドパムが臍動脈を収縮させたことから、PIHの治療に対するフェノルドパムの使用可否について質問がなされた。これに対しては、収縮反応は臨床濃度では問題とならず、異常高血圧のコントロールには安全かつ有用であると思われるが、従来の血管拡張薬や、腎血流維持を目的としたD1アゴニストとしてのドパミンと比較した時に、積極的な使用を考慮するには至らないと回答された。また、PIHの臨床上の問題点は子宮内胎児死亡および発育不全であり、臍動脈はこれらの問題を反映しないとの指摘があった。さらにヒドララジンやニカルジピンの臍動脈血流に対する研究は殆どなく、今回の拡張作用が臨床的に胎児血流への程度の影響を与えると推測されるかとの質問があった。これに対し、臨床的には胎盤関門により臍動脈での薬物濃度は低下し、拡張作用はさらに減弱すると予想されることから、母体の体血圧変動に比べて影響は少ないと予想される旨、回答がなされた。また、臍動脈の反応が全身末梢血管の反応を反映するか検討が必要との助言がなされた。

以上、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、in vitroでのヒト臍動脈に対する各種血管拡張薬の効果の相違を示し、また、従来α遮断薬であると考えられているフェノルドパムが、完全なα遮断薬ではなくα受容体部分アゴニストとして働く可能性をはじめ示唆した点で麻酔学上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 臨床麻酔学 武田 純三

薬剤学 谷川原 祐介 内科学 猿田 享男

産婦人科学 吉村 泰典

学力確認担当者: 北島 政樹、谷川原 祐介

審査委員長: 谷川原 祐介

試問日: 平成15年11月17日

Production and Activation of Matrix Metalloproteinase-2 in Proliferative Diabetic Retinopathy.

(増殖糖尿病網膜症におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-2の産生および活性化)

野田 航介

内容の要旨

【目的】 増殖糖尿病網膜症 (Proliferative diabetic retinopathy: PDR) で増加するマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinases: MMPs) の同定とその活性化についての検討。

【対象と方法】 PDR患者24例 (PDR群) から手術時に採取された硝子体液と線維性血管組織を実験試料とした。対照群として、非PDR患者13例 (非PDR群) から採取された硝子体液を用いた。まず、各群の硝子体液中におけるMMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13濃度をSandwich enzyme immunoassay (EIA) で測定し、PDRの硝子体液中で増加するMMPsの同定を試みた。次に、硝子体液中における潜在型MMP-2, 9の活性化率をGelatin zymographyで検出し、2群で比較した。PDR群から採取された線維性血管組織を用いた実験では、まず同組織における潜在型MMP-2, 9の活性化率を検討し、硝子体液のそれと比較した。そして、MMP-2, その活性化に関わる分子membrane type(MT)1-MMP、tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMP)-2の局在を免疫染色法で検討した。また、reverse transcription-polymerase chain reaction法を用いて線維性血管組織 (8例) におけるMT1-MMPのmRNA発現を調べた。

【結果】 EIAで検討した7種のMMPsの中で、PDR群におけるMMP-2, 9の硝子体中濃度は対照群に比べて有意に増加していた。しかしながら、その活性化率は2群において統計学的有意差を認めなかった。

一方、PDR群から採取された線維性血管組織における潜在型MMP-2, 9の活性化率は、同群の硝子体液中におけるそれに比べて著しく高値を示していた。MMP-2の活性化分子であるMT1-MMP、両者の結合蛋白として作用するTIMP-2は、線維性血管組織においてMMP-2と同様に血管内皮細胞とグリア細胞にその局在性が認められた。また、線維性血管組織におけるMT1-MMPのmRNA発現は、8例中7例 (87.5%) で認められた。

【結論】 PDRの硝子体内においてMMP-2, 9が増加していることが示された。その中でもMMP-2は線維性血管組織において高率に活性化を受けており、その活性化はMT1-MMPとTIMP-2との相互作用を通じて、血管内皮細胞やグリア細胞においておこなわれていると考えられた。これらの結果は、従来報告されてきたMMP-9のみならず、MMP-2とその活性化分子MT1-MMPが、線維性血管組織の形成に際して重要と考えられる網膜基底膜構造 (内境界膜) の分解に関与していることを示唆していた。

論文審査の要旨

我が国において現在年間4000人が糖尿病網膜症 (Proliferative diabetic retinopathy: PDR) で失明している。本研究はPDRのメカニズムの一部を明らかにすることを目的としておこなわれた。実験方法としてPDR患者24名から手術時に採取された硝子体液と線維性血管組織を材料とし、対照群として非PDR患者13例から採取した硝子体液を用いた。両群の硝子体液中における各種MMPの濃度を測定し、PDRで増加するMMPsの同定を試みた。次に硝子体液中における潜在型MMP-2, 9の活性化率を調べた。線維性血管組織を用いた実験では潜在型MMP-2, 9の活性化率を検討し、硝子体のそれと比較した。そしてMMP-2の活性化分子MT1-MMPのmRNA発現を線維性血管組織で調べた。結論としてPDRの硝子体においてはMMP-2, 9が増加していることが示された。その中でもMMP-2は線維性血管組織において高率に活性化を受けており、その活性化はMT1-MMPとTIMP-2との相互作用を通じて、血管内皮細胞やグリア細胞において行われていると考えられた。これらの結果は、従来報告されてきたMMP-9のみならずMMP-2とその活性化分子MT1-MMPが、線維性血管組織の形成に際して重要と考えられる網膜基底膜構造 (内境界膜) の分解に関与していることを示唆していた。

審査に当たり、PDRの新生血管の発生機転として今回の実験結果以外に硝子体内の血管新生抑制機構が破壊あるいは抑制される結果起こる可能性に関して議論がなされた。またPDRの病態とMMPsの発現に関連することを示唆する知見はあるのかという質問に対して、現在施行中の家兎網膜グリア細胞を用いた実験では、糖尿病において網膜に生じる低酸素条件がMMPの誘導に関連することがあるとの回答がなされた。つぎに、線維性血管組織における血管新生とMMPの免疫染色の結果について検討とその関連性につき質問があった。これに対しては検討は行ったが関連性はなかったと回答があった。その他、免疫染色の結果判定の基準についてのコメントがあった。また従来PDRとの関連がいわれてきたMMP-9はむしろ染色性が乏しいがこの理由につき質問があった。これに対しては元来、免疫染色自体が実験に使用する抗体の性質や発色条件に左右される定性にやや乏しい実験であるため、MMP-9の関連が乏しいという結論を導くことは無理であり、MMP-9とともにMMP-2も本疾患の病態形成に関連しているというのが、本論文の主旨であると回答があった。最後に、HbA1c以外の臨床経過とMMPの関連について、質問があった。これに対してはHbA1cの値は術前の値であり人為的修飾が加わっており、本来の病態評価に役立つ検査資料か否かは判断できないとの回答があった。本研究では糖尿病網膜症においてMMP-9のみならずMMP-2とその活性化分子MT1-MMPが線維性血管組織の形成において重要な役割を果たすことを明らかにした点、眼科学上価値のある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 小口 芳久
内科学 猿田 享男 病理学 坂元 亨宇
医化学 末松 誠
学力確認担当者: 北島 政樹、猿田 享男
審査委員長: 猿田 享男

試問日: 平成15年10月6日

内側膝蓋大腿靭帯の機能解剖学のおよび臨床的研究

野村 栄貴

内容の要旨

反復性膝蓋骨脱臼・亜脱臼は若年女性に多く見られる疾患である。その発生に関与する数多くの先天的解剖学的因子、膝蓋骨不安定障害およびそれに伴うanterior knee pain（膝蓋骨前部痛）を治すために、現在まで100種類以上もの手術方法が報告され、治療する上で医師側に多くの疑問や混乱が残っていた。しかし、1990年頃から膝蓋骨外方制動にかかわる重要な構成体として内側膝蓋大腿靭帯（MPFL）が注目され始めた。1993年ConlanらによりMPFLが膝蓋骨内側支持機構の第1制御機構であると生体力学的に証明され、その後臨床的にもMPFLの損傷が明らかにされてきた。しかし、生体力学的にも臨床的にもMPFLの研究について解明されていない点が多かった。

本研究では、急性膝蓋骨脱臼や反復性膝蓋骨脱臼例でのMPFLの所見を観察すること、膝関節の可動域中でのMPFLの機能を生体力学的に調べ、理に叶った新たな手術法を開発すること、さらに臨床的に自家考案のMPFL再建術の結果を検討することを目的とした。結果は、

1. 急性膝蓋骨脱臼18膝のMPFL損傷および陳旧性膝蓋骨脱臼149膝のMPFL遺残靭帯所見を検討した。急性膝蓋骨脱臼例では1膝を除き本靭帯に損傷があり、その損傷は剝離損傷と実質部損傷の2つに分類できた。陳旧性膝蓋骨脱臼例では残存靭帯は3つに分類され、すべての症例でMPFL機能不全が存在し、膝蓋骨脱臼におけるMPFLの関与が臨床面から明らかとなった。
2. 新鮮切断肢10膝を用いた膝蓋骨内側支持機構の切離実験で、MPFLは膝屈曲20-90度の範囲で膝蓋骨外方制動に大きく関与していた。MPFLと内側膝蓋支帯を切離したのちMPFL単独の自家考案による再建術で膝蓋骨外方制動は膝屈曲20-120度の範囲で正常範囲内に回復した。
3. 生体力学的検討で有効性が立証された新たなMPFL再建術を24例27膝に臨床応用した。再建材料としてLeeds-Keio人工靭帯と内側膝蓋支帯弁状片を用いた。手術後平均5.9年の結果は優良が96%で、反復性膝蓋骨脱臼に対するMPFL再建術は有用な治療法であることが確かめられた。

以上の結果から、膝蓋骨外側制動にかかわるMPFLは、膝関節屈曲20-90度の範囲内で特に主要な制御機構であること、急性・陳旧性膝蓋骨脱臼においてMPFL損傷や機能不全がほぼ全例に存在することが判明した。従来から数多くの先天的解剖学的因子が報告されてきたが、MPFL機能不全はもっとも重要な反復性膝蓋骨脱臼の原因因子であると結論できた。新たに開発したMPFL再建術は脱臼の程度にかかわらず一定の手法でできることが特徴であり、臨床応用した反復性膝蓋骨脱臼例に対する本手術法の成績は良好で、その有効性が確認できた。

論文審査の要旨

急性ないし反復性膝蓋骨脱臼の病態や治療法に関しては数多くの先天的解剖学的要因や百種類以上もの手術法が報告され、この疾患に対して多くの疑問と混乱があった。1980年代に膝蓋骨内側支持機構の最も重要な支持組織である内側膝蓋大腿靭帯（MPFL）の解剖所見が報告され、1990年以後研究が進んだが、広範囲な膝関節可動域内でのMPFLの機能や損傷後の残存靭帯所見については不明な点が多く、また再建術の臨床報告も少ない。そこで本疾患の病態解明と新たな治療法の開発を目的に本研究を行った。

新鮮凍結膝関節を用いた生体力学的検討から、MPFLは膝屈曲20-90度の範囲で最も重要な膝蓋骨外方制動因子であり、自家考案のMPFL再建法により膝蓋骨は膝屈曲20-120度の範囲で正常範囲内に回復でき、十分に臨床応用可能なことが立証された。膝蓋骨脱臼例でのMPFL靭帯所見の検討から、急性例ではMPFLは実質部損傷と剝離損傷の2つの損傷タイプがあることが判明した。また剝離損傷ではMPFL大腿骨付着部が深層のみ付着する特殊な構造をもつことにより起きていることも明らかとなった。陳旧例ではサブタイプを含めて4つに分類でき、すべての症例でMPFL機能不全があることが判明し、膝蓋骨脱臼におけるMPFLの重要性が臨床面からも裏付けられた。切離実験で有効性が立証された自家考案MPFL再建術を反復性膝蓋骨脱臼24例に臨床応用した。その結果、術後平均5.9年で優良96%と、自家考案のMPFL再建術はきわめて有用な治療法になり得ると考えられた。

審査では、個々の症例で解剖学的に個人差がありMPFL再建単独で治すことが可能なのかを質問された。これに対し、従来から言われてきた先天的解剖学的因子も当然考慮すべきであるものの、かなりの症例は単独の再建術で対応可能である。しかし、Q角30度以上やその他きわめて強い因子がある時は再建靭帯自体に対する過度の負荷がかかってくるため、それに対応する手術が必要になる可能性があると同答された。膝屈曲45-60度でMPFL切離による影響は最大となるが、臨床的にもやや深い屈曲角度で脱臼をきたしやすいのかを質問された。臨床的には膝屈曲15-30度で脱臼しやすいと言われている。膝蓋骨外側脱臼は膝蓋骨内側支持機構だけでなく大腿骨膝蓋溝の深さも重要な因子であり、膝屈曲が進めば膝蓋溝も深くなるため、膝蓋骨脱臼は屈曲45度よりやや浅い角度で起こることは矛盾しないと回答された。最後に、静的な状態だけでなく、dynamic CTやdynamic MRIなどの動的状態の検討も必要でないかと質問された。これに対して、動的状態での分析は重要であり、今後臨床例での検討が不可欠であると回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、膝蓋骨脱臼におけるMPFLの機能を明らかにし、新たな治療法を開発した点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科 戸山 芳昭

リハビリテーション医学 千野 直一 解剖学 相磯 貞和

形成外科学 中島 龍夫

学力確認担当者：北島 政樹、千野 直一

審査委員長：千野 直一

試問日：平成15年11月20日

1 型糖尿病の発症予知に関する研究 動物モデルを用いた基礎的検討

山 田 悟

内容の要旨

【目的】1 型糖尿病は現在まで予防が不可能である。今後、的確な予防を可能ならしめるためには、正確な発症予知が必要になるが、発症予知もままならないのが現状である。1 型糖尿病では膵β細胞が破壊され、減少することにより高血糖が発症すると考えられているが、そもそも高血糖発症前の膵β細胞の減少の仕方についても議論がある。そこで本研究は、1 型糖尿病発症前の膵β細胞容積の変化の過程を明らかにし、さらにその変化に伴って変動する指標を検索することで発症予知マーカーの同定を目指すことを目的とした。

【方法】1 型糖尿病のモデル動物であるNODマウス（雌性、16-18週齢、n=41）から脾細胞を抽出し、遺伝的背景はNODマウスと同一でありながら有効なリンパ球を欠如するNOD-scidマウス（雌性、5週齢、n=123）に抽出したNODマウスの脾細胞を移入するという細胞移入の実験を行った。この際、1) NODマウスの膵臓のインスリン含有量や病理学的所見とNOD-scidマウスが細胞を移入されてから糖尿病を発症するまでの期間の関係を検討した。2) NODマウスの脾細胞のサイトカイン反応、サイトカインmRNA、細胞表面マーカーの発現、腹腔浸出細胞の酸化還元状態を検討し、発症までの期間が短くなると変動する指標を模索した。

【結果】1) NODマウスのインスリン含有量（病理学的所見）は、NOD-scidマウスに糖尿病を発症させるのに7週以上要するNODマウスではNOD-scidマウスに糖尿病を移入できないNODマウスと同等に多く（軽く）、NOD-scidマウスに糖尿病を発症させるのに6週以下しか要さないNODマウスでは既に糖尿病を発症しているNODマウスと同等に少なかった（重かった）。2) 糖尿病を移入するのに6週以下しか要さないNODマウスの特徴を検討したところ、脾細胞のサイトカイン反応、サイトカインmRNA、細胞表面マーカーの発現は特記すべき所見を認めなかったものの、酸化型の腹腔浸出細胞が少なくなっていることが判明した。

【考察】以上の結果より、マウス1 型糖尿病発症前の膵β細胞容積は発症の数週間前（直前）に急激に減少することが示唆され、腹腔浸出細胞の検討がこの急激なβ細胞容積減少の予知もしくは診断マーカーになる可能性が明らかにされた。

論文審査の要旨

1 型糖尿病は、膵β細胞の破壊によってインスリン分泌が障害されて発症する。β細胞の破壊にはT細胞の関与が想定されているが、その詳細な機序は明らかでない。また現在のところ、その発症を正確に予知する方法も明らかにされていない。そこで、本研究では、膵β細胞の容積変化の過程を明らかにし、その変化に伴って生じる諸パラメーターの検索から、糖尿病発症予知マーカーを同定することを試みた。研究対象として1 型糖尿病のモデル動物である雌のNODマウスを用い、このマウスの脾細胞を抽出し、遺伝的背景がNODマウスと同等でありながら、有効なリンパ球を欠如する雌のNOD-scidマウスに細胞移入する実験を行った。その際NODマウスの膵臓のインスリン含量やランゲルハンス島（ラ氏島）の病理所見と細胞移入されたNOD-scidマウスの糖尿病発症までの期間との関係を検討した。その結果、移入後6週間以内に糖尿病を発症するものでは、すでに糖尿病を発症しているNODマウスのラ氏島のインスリン含量およびラ氏島へのリンパ浸潤や破壊所見と同等の変化がみられた。細胞移入6週後までに糖尿病を発症させるNODマウスの特徴に関する検討では、脾細胞のサイトカイン反応やサイトカインmRNA、細胞表面マーカー等の発現には特徴的な変化を見出せなかった。しかしglutathione-menochlorobimane (MBCI) による蛍光観察で判定した酸化型の腹腔浸出細胞に関して、糖尿病を発症しやすいNODマウスでは細胞数が少なくなっていることを見出した。このような結果から、マウス1 型糖尿病の発症前の膵β細胞容積は発症直前に急激に減少し、この急激な減少の診断マーカーとして、腹腔浸出細胞の検討が有用であると結論した。

このような研究に関してまず問題となったのが、膵ラ氏島の組織変化の判定である。ラ氏島1つ1つの変化度の程度は示されたが、観察されたラ氏島数を記載し、スコア化の判定基準を明確に示すべきであったと助言された。

次に問題とされたのがこの研究の主要ポイントである腹腔浸出細胞の酸化型の判定である。本研究では、glutathione-MBCIによる蛍光を使用したのが、その正確性および他の方法との比較等が議論された。このようなマウスの糖尿病実験では、本研究で用いた蛍光による判定が比較的妥当で、他の諸施設でもこの方法が用いられ、ある程度の評価が得られているとされた。酸化型腹腔浸出細胞数がなぜ糖尿病の発症と密接に関係するのか、その機序の詳細は明らかでなく、今後の検討課題とされた。またマウスを用いた研究であるので腹腔浸出細胞の観察を指標として使用できるが、今後ヒトでの診断にこの結果をどう応用していくかも重要な検討課題とされた。

論文中の図の書き方や統計処理、さらにその示し方等に問題箇所が指摘され、訂正が必要とされたが、研究内容は1 型糖尿病の発症予知の新しい指標を見出した点で価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
病理学 岡田 保典 医化学 末松 誠
内科学 石井 裕正
学力確認担当者：北島 政樹、岡田 保典
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成15年11月18日

SRY and Architectural Gene Regulation : The Kinetic Stability of a Bent Protein-DNA Complex Can Regulate Its Transcriptional Potency.

(SRYと構造的遺伝子制御：屈曲蛋白-DNA複合体の動的安定性による転写活性制御)

浮山 越史

内容の要旨

性の分化は性染色体がその役割を担い、男性においてはY染色体によって制御され、未分化な生殖腺から精巢が形成される。ヒトの sex reversal (XX males, XY females) の分子学的解析等により、制御遺伝子がY染色体の短腕に存在するSRYであることが判明した。SRYはDNA結合蛋白にみられるHMG boxを含んでおり、このHMG boxはDNAに結合することによりDNAを屈曲し、それによるDNAの高次構造の変化により転写活性を制御していることが考えられている。

著者はSRYの46XY female患者にみられる置換 (M9I, I13T)、チンパンジーのSRY (I13F)、DNAと隣接する部位を欠いた置換 (M9A, I13A, F12A) とヒト wild type SRYを用いて、DNA結合特性、DNA屈曲特性、遊離、結合ドメインの構造、安定性、複合体の動的安定性、転写活性を調べた。

in vitroにおいてDNA結合が10倍以上減弱していた置換 (M9A, F12A, I13A, I13T) では転写活性は検出できなかった。DNA結合が2.5倍減弱していた置換 (M9I) においては、ベクターDNAの低い濃度ではwild typeと明らかな違いはなかったが、高い濃度においては明らかに転写活性が低かった。M9IとI13Tは臨床的に性器発育異常 (XY female) にみられる突然変異であり、ヒトの表現型 (男子あるいは女子) は、SRY HMG boxの転写活性の維持と減弱が関係していた。I13F置換 (チンパンジーSRY) は転写活性をwild typeと比べて、ほぼ4倍に増強した。I13F HMG boxは、wild typeと同じ、DNAとの結合、屈曲、挿入部位におけるDNA特異性を示した。また、wild type SRY、I13Fの、双方の遊離と結合ドメインの構造も同様であった。I13FとDNAとの複合体の生存時間は、wild typeの複合体の3から4倍であり、4倍に増強した転写活性の原因と考えられ、SRY-DNA複合体の動的安定性が転写活性を制御していると考察した。このことより、以下の機構モデルを考えた。SRYの下流であるm-RNAの発現量を制御しているのは、SRY-DNA複合体の平衡濃度ではなく、活性化された開始前複合体 (PIC) からの分離比であるというものである。SRYが分離すると、その結合していたDNAの屈曲が解かれ、多様な他の蛋白-DNAや、蛋白-蛋白相互作用が弱められる。SRY-DNA複合体の動的安定性が、多様な転写の循環を通じて、開始前複合体の維持を可能にしていると考えられた。

本研究では、in vivoにおけるSRYの転写増強機構を、in vitroにおけるSRY-DNA複合体の動的安定性と結びつけ、蛋白とDNAの結合という“構造”と、転写活性という“機能”を関連づけることができた。

論文審査の要旨

男性の性決定遺伝子であるSRYはHMG boxを含んでいる。このHMG boxはDNAに結合することによりDNAを屈曲し、DNAの高次構造の変化により転写活性を制御している。本研究でSRYの46XY female患者にみられる置換 (M9I, I13T)、チンパンジーのSRY (I13F)、DNAと隣接する部位を欠いた置換 (M9A, I13A, F12A) とヒト wild type SRYを用いて、DNA結合特性、DNA屈曲特性、遊離、結合ドメインの構造、安定性、複合体の動的安定性、転写活性について検討した。M9IとI13Tは臨床的に性器発育異常 (XY female) にみられる突然変異であり、DNAとの結合、転写活性が減弱していた。I13F置換 (チンパンジーSRY) はwild typeと比べて、転写活性をほぼ4倍に増強した。I13FとDNAとの複合体の生存時間は、wild typeの複合体の3から4倍であり、4倍に増強した転写活性の原因と考えられた。SRY-DNA複合体の動的安定性が、転写活性の制御に重要であると想定された。

審査ではまず、本研究が共同研究であり、大きなプロジェクトの一部であることから、そのプロジェクトにおける本研究の位置づけ、および著者の実際に行った部分への貢献について質問があり回答された。さらに、転写活性アッセイにおいて、ラットのプロモーター領域を使用しなかった理由について質問があったが、ヒトSRYの転写活性を調べるためにヒトMISのプロモーター領域を使用した。本来ならばヒトのurogenital ridge細胞を使用したかったが、得られないためラットのurogenital ridge細胞を使用したと回答された。これに関して異種間の転写活性アッセイは成り立たない場合があることが指摘された。SRYの標的遺伝子が不明であり、ヒトMISのプロモーター部位にあるSRY結合部位を置換しても転写活性が変わらないことがすでに判明している。ヒトSRYとヒトMISのプロモーター領域をつなぐものをラットurogenital ridge細胞内の未知の物質に補われている系であることが回答された。また、I13Fを作成した理由について質問があった。チンパンジーのSRYが他の部分のHMG boxがヒトとまったく同じであること、DNAに結合する化学物質においてベンゼン環が入り込んでいること、同じマイナーグループに結合するTATA binding proteinでフェニルアラニンがDNAに入り込んでいることが回答された。さらに、XY femaleの原因、SRYの標的遺伝子、用語に関し、質疑応答がなされた。また、邦語要約の用語の使用が不適切であるとの指摘があった。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき点を残しているが、転写活性の制御に関し、ベント蛋白とDNA複合体の動的安定性が重要であるということを示唆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
分子生物学 清水 信義 産婦人科学 吉村 泰典
小児科学 高橋 孝雄
学力確認担当者：北島 政樹、清水 信義
審査委員長：清水 信義

試問日：平成15年11月18日

Docetaxel enhances the cytotoxicity of anthracyclines by increasing intracellular drug accumulation

(ドセタキセルは腫瘍内アントラサイクリン系抗腫瘍剤濃度を増強することにより抗腫瘍効果を増強させる)

江川 智久

内容の要旨

【緒言】

乳癌治療においてアントラサイクリン系抗腫瘍剤はいまだ中心的役割を占めているが、1990年代に入りタキサン系抗腫瘍剤が進行・再発乳癌に対して高い奏効率を示すことが明らかになり、併用療法の是非が臨床的に重要な問題となってきた。本研究ではタキサン系のドセタキセル (DOC) とアントラサイクリン系抗腫瘍剤 [ドキシソルピシン (DXR) とピラルピシン (THP)] の併用効果の基礎的検討を行い、併用治療における作用機序について検討した。

【材料と方法】

ヒト乳癌培養細胞株R-27とMDA-MB-231を対象とし、MTTアッセイにより抗腫瘍効果を検討した。単剤による濃度依存性抗腫瘍曲線を作成し、50%抑制濃度 (IC50) を算出し併用実験における濃度を設定した。薬剤の接触順序は前報において最も抗腫瘍効果の高かった同時併用とした。併用抗腫瘍効果の評価にはアイソボログラムを用いた。腫瘍細胞内のアントラサイクリン濃度測定は液体クロマトグラフィー法を用いて行った。すなわちDXR, THP単剤 1 µg/ml接触後、5, 10, 30, 60分後の細胞内濃度を測定し、経時変化を検討した。ついでDOCによるアントラサイクリン薬剤濃度変化を検討するために、IC50の1/30のDOCを48時間接触後PBSで洗滌し、DXR 1 µg/ml 60分あるいはTHP 1 µg/ml 15分接触させ、さらにPBSで洗滌後0, 5, 10, 45分の細胞内アントラサイクリン濃度を測定した。

【結果】

各薬剤に対する感受性IC50 (µg/ml) は、R-27においてDXR : 3.17, THP : 2.00, DOC : 68.3であり、MDA-MB-231においてDXR : 2.05, THP : 2.03, DOC : 139.1であった。R-27において、単剤のTHP接触はDXRに比して約3倍の細胞内濃度の上昇を示した。またR-27において、DOC同時併用によりTHP, DXRとの併用効果が認められ、アイソボログラムでも相乗効果であることが確認されたが、MDA-MB-231における併用効果は相加的と判定された。併用実験におけるアントラサイクリン細胞内濃度の検討では、R-27においてDOC先行接触は対照群に比してTHPで5~6倍、DXRで3~4倍の細胞内濃度の上昇を示した。一方、MDA-MB-231ではDOC先行投与による細胞内濃度の上昇は認められなかった。

【考察】

DOC前処理により、アントラサイクリンの効果の増強が認められ、DOCがアントラサイクリンのmodulatorとして働く可能性が示唆された。その作用機序の一つとして細胞内のアントラサイクリン濃度上昇が考えられた。

【結論】

DOCは低濃度でアントラサイクリンの細胞内濃度を増加させ相乗的併用効果を示したことから、両薬剤の併用においてはDOCの用量軽減による副作用の低下が期待できる。

論文審査の要旨

本研究では、乳癌治療におけるドセタキセル (DOC) とアントラサイクリン系抗腫瘍剤 [ドキシソルピシン (DXR) とピラルピシン (THP)] の併用効果の基礎的検討を行い、併用治療における作用機序について検討した。ヒト乳癌培養細胞株R-27とMDA-MB-231を対象とし、MTTアッセイにより抗腫瘍効果を検討し、併用抗腫瘍効果の評価にはアイソボログラムを用いた。腫瘍細胞内のアントラサイクリン濃度測定は液体クロマトグラフィー法を用いて行った。R-27においてはDOC同時併用によりTHP, DXRとの併用効果が認められ、アイソボログラムでも相乗効果であることが確認された。併用実験におけるアントラサイクリン細胞内濃度の検討では、R-27においてDOC先行接触は対照群に比してTHPで5~6倍、DXRで3~4倍の細胞内濃度の上昇を示した。DOC前処理によりアントラサイクリンの効果の増強が認められ、DOCがアントラサイクリンのmodulatorとして働く可能性が示唆された。

審査ではまず、タキサン系のDOCがどのように膜蛋白に影響を与えて細胞内アントラサイクリン系薬剤の濃度に影響を与えるのかについて質問され、P糖蛋白 (P-gp) や多剤耐性蛋白 (MRP) などの膜輸送蛋白の発現や機能の抑制が関与している可能性があると回答された。これに関連しては、今後はefflux pumpのみならずinflux pumpの解析、P-gpの定量、MRPと相乗効果の検討も必要であろうとの指摘がなされた。またタキサンはP-gpの基質になることから、アントラサイクリン系薬剤の細胞内蓄積が競合阻害による可能性も指摘されたが、本実験系におけるDOCの濃度はアントラサイクリン剤に比して著しく低く、この可能性は低いものと考えられる。PaclitaxelでなくDOCを選択した根拠について質問され、臨床ではpaclitaxelとアントラサイクリン系抗腫瘍剤の併用は心毒性が問題となっており、DOCとの併用が臨床の場では汎用されているためであるとの回答があった。さらに、この相乗効果はR-27のみに特異的に発現したのではないかと指摘された。これに対しては、副論文においてはin vitroの系でMCF-7、in vivoの系でMX-1において同様な併用効果が確認されているが、さらに臨床検体を用いた検討により確認する必要があると述べられた。最後に本研究の臨床応用への可能性に関する質問がなされ、両薬剤ともに臨床に汎用されており実験に用いた濃度も生体内で到達可能な濃度であることから、臨床への応用は十分可能であるとの回答がなされた。

以上、本研究は乳癌における二つのkey drugsであるアントラサイクリンとタキサン (DOC) の抗腫瘍効果を解析し、両薬剤の併用抗腫瘍効果の作用機序を明らかにした点で、臨床に即した有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主任 外科学 北島 政樹
薬剤学 谷川原 祐介 産婦人科学 野澤 志明
先端医学 河上 裕
学力確認担当者: 北島 政樹、谷川原 祐介
審査委員長: 谷川原 祐介

試問日: 平成15年12月16日

未破裂脳動脈瘤患者における開頭術前後の高次脳機能および脳血流の変化

福永 篤志

内容の要旨

【目的】近年脳ドックの普及に伴い未破裂脳動脈瘤 (UAN) が発見され、くも膜下出血を予防するために開頭クリッピング術が施行されることが多くなってきた。そこで、開頭術が正常な大脳へ及ぼす影響について、詳細に検討することは極めて重要であると考えられるが、この類の研究はほとんど行われていない。本研究では、第1段階としてUAN61例の開頭術後の高次脳機能および脳血流の変化について、第2段階として習慣性喫煙の正常脳に対する影響に注目して、それぞれ詳細に検討した。

【対象と方法】対象は、平成7年11月から平成12年1月にかけて慶應義塾大学病院に前側頭アプローチによる開頭術目的で入院したUAN患者61例である。喫煙者をSmoking index (=1日の本数×年数)の値で0=非喫煙者、0~600=中等度喫煙者、600以上=重度喫煙者に分類したところ、それぞれ45、5、11例で、中等度喫煙者は5例と少なかったため本研究(第2段階)からは除外した。UANの部位は中大脳動脈19例、前交通動脈18例、内頸動脈17例、その他7例であった。高次脳機能検査(かなひろいテスト、迷路テスト、Minimal state examination)と脳血流検査(Single photon emission computed tomography)を術前と術後1ヶ月に施行し、術後1ヶ月に異常が見られた場合には術後3ヶ月に再検査した。さらに、再検査による結果の変動(学習効果等の影響)も考慮して、reliable change indices (PCI)を計算して評価を加えた。

【結果】術後1ヶ月の高次脳機能検査では、全テストにおいて、前交通動脈瘤症例が他の部位の動脈瘤と比べて低下しやすい傾向があったが、有意差はなかった。重度喫煙者は非喫煙者と比較して術後1ヶ月に高次脳機能が低下しやすい傾向があり、迷路テストにおいて有意差を認めた。また、PCI値からも、重度喫煙者は有意に低下しやすかった。脳血流検査では、前交通動脈瘤症例や70歳以上の高齢者は、術後1ヶ月に脳血流低下例が有意に多かった。一方、重度喫煙者は非喫煙者よりも術後脳血流低下例が多かったが、ロジスティック回帰法による多因子解析では、有意な危険因子は見出せなかった。術後3ヶ月の脳血流検査では全例が術前レベルにまで回復したが、高次脳機能検査では中大脳動脈瘤の3例のみが回復しなかった。

【結語】前交通動脈瘤症例や高齢者、重度喫煙者に対しては、脳べらを間欠的に使用したり、静脈を温存したりするなどの、より慎重な手術手技が要求されるべきである。中大脳動脈瘤では細い分枝動脈の血流確保に注意を払わなければならない。また、外来では、術後の社会復帰時期を決めるためにも、高次脳機能検査や脳血流検査によるフォローアップが重要である。

論文審査の要旨

本研究は、未破裂脳動脈瘤61例の開頭術後の高次脳機能および脳血流の変化について、そして習慣性喫煙の正常脳に対する影響について検討を加えた世界的にも数少ない研究である。結果として、術後1ヶ月の高次脳機能検査では、前交通動脈瘤症例が低下しやすい傾向があったが、有意差はなかった。重度喫煙者は非喫煙者と比較して術後1ヶ月の迷路テストにおいて有意に低下しやすかった。また、再検査による結果の変動(学習効果など)も考慮してReliable change indices値を計算したところ、それでも、重度喫煙者は有意に低下しやすかった。脳血流検査では、前交通動脈瘤症例や70歳以上の高齢者は、術後1ヶ月に脳血流低下例が有意に多かった。術後3ヶ月の脳血流検査では全例が術前レベルにまで回復したが、高次脳機能検査(迷路テストのみ)では中大脳動脈瘤の3例が回復しなかった。

審査では、脳血流が回復したのに迷路テストでは回復しなかったのは何故かという質問がなされた。それに対し、これは患者の高次脳機能の回復過程をみている可能性があり、今後はそのような症例に対し長期フォローアップも必要であると回答された。また、重度喫煙者の症例が少ない割に高次脳機能検査で有意差がみられたが、どのように解釈するのかと質問された。それに対しては、重度喫煙者はsmoking indexが600以上と高いため、習慣性喫煙の影響が強く出たこと、また、2001年のCirculation Researchに、in vitroでのラット線条体動脈における長期ニコチン曝露下での動脈拡張性の低下を示す報告もあり、やはり長期に及ぶ習慣性喫煙により、動脈硬化、微小脳血流循環不全、高次脳機能低下といった順に経過するのではないかと推察されると回答された。その質問に関しては、たとえば禁煙したら高次脳機能がどの程度回復するか、禁煙者に対する開頭術の影響はどうかなど、今後の研究テーマとして興味深い意見もあった。次に、脳べらをどのように使ったらよいかという質問がなされた。それに対し、脳べらが脳に及ぼす影響は数多く報告があり、できるだけ間欠的に使用するべきであり、施設によっては脳べらをほとんど使わずに手術を行っているところがあると回答された。また、手術時間が前交通動脈瘤症例で長かったようだが、高次脳機能や脳血流への影響はなかったかと質問された。それに対し、手術時間は各動脈瘤群間で統計学的有意差はなく、ロジスティック回帰法による解析でも喫煙以外の有意な因子は検出されなかったと回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、未破裂脳動脈瘤患者を術後のどのような時期に社会復帰させたらいかがを示し、術前の患者へのインフォームドコンセントとしての指針に加える必要があると考えられ、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 河瀬 斌
精神神経科学 鹿島 晴雄 生理学 岡野 栄之
解剖学 仲嶋 一範
学力確認担当者: 北島 政樹、鹿島 晴雄
審査委員長: 鹿島 晴雄

試問日:平成15年11月17日

Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis.

(軟骨球体培養法におけるヒト脱分化軟骨細胞の軟骨再分化およびヒト骨髓間質細胞のlarge-scale cDNA解析)

今 林 英 明

内容の要旨

軟骨細胞は、単層培養下で継代培養を行うことにより軟骨としての形態を急速に消失し脱分化という状態となる。このことは現在行なわれている軟骨細胞移植治療において、軟骨細胞を継代培養することができず移植細胞数の限界となっている。その対策として、脱分化軟骨細胞の軟骨再分化を促し移植細胞として利用できるようにすること、軟骨以外の細胞として軟骨への分化能を示す骨髓間葉系幹細胞を用いること、等が考えられる。本研究は脱分化軟骨細胞の軟骨再分化法を確立することおよび軟骨へ分化する骨髓間質細胞を単離しその性状を分子学的、遺伝子学的に検索することを目的として以下の研究を行った。

軟骨分化に特異的といわれるType II collagen, aggrecanを発現し細胞外マトリックスを産生するヒト骨髓間質細胞 (H4-1細胞) を限界希釈法により単離した。その細胞は細胞表面マーカーの発現において骨髓間葉系幹細胞と異なるCD34、c-kit、CD140a^{low}を示し、軟骨への分化能を有する骨髓間質細胞の新しい細胞分画を提唱するものである。また、ヒト脱分化軟骨細胞と骨髓間質細胞の両方に使用できる軟骨分化誘導法として軟骨球体培養法を確立した。本培養法は今まで骨髓間質細胞の分化誘導法であるpellet法と比較しaggrecan遺伝子の早期発現を認め、軟骨分化をより早く促進する有用な分化誘導法である。さらに、脱分化軟骨細胞の再分化7日目におけるcDNA profiling、骨髓間質細胞 (H4-1) の単層培養増殖期のcDNA profilingについてoligocapping法を用いることにより作製した。Large-scale cDNA解析により軟骨細胞再分化においてはstructural protein遺伝子の発現が多くその大半を軟骨関連の細胞外マトリックスの遺伝子発現が占めていた。特にロイシンリッチ小型プロテオグリカン、cartilage oligomeric matrix protein、chitinase3-like 1 (cartilage glycoprotein-39) の発現を高頻度に認め、軟骨再分化初期における細胞外マトリックスの産生情報を解析することができた。骨髓間質細胞増殖期においては線維芽細胞増殖因子7、CCN family特にconnective tissue growth factorといった増殖因子関連遺伝子の発現を高頻度に認め、今後の骨髓間質細胞の解明に役立つものと思われる。これらのcDNA profilingは、骨髓間質細胞および変形性関節症の軟骨再生の解明に非常に有用な情報を与えてくれるものであると考えている。

論文審査の要旨

軟骨細胞は単層培養を繰り返し行うことにより軟骨としての性状を急速に失い脱分化といわれる状態に陥り、軟骨へ再分化しないと考えられていた。本研究は軟骨再分化を目的に、新たな軟骨再分化法を提示するとともに、再分化7日目におけるcDNA profilingをoligocapping法により作製し発現遺伝子解析を行った。また、骨髓間質細胞のなかに間葉系組織に分化する多分化能を持つ間葉系幹細胞、骨・軟骨・脂肪の前駆細胞が存在することが知られている。本研究において骨髓間質細胞の性状解析を目的に、ヒト成人骨髓より採取された軟骨分化能を有する間質細胞について単層培養増殖期におけるcDNA profilingを作製し発現遺伝子解析を行った。

Micromass培養法をもとに細胞凝集を行った後に培養皿より細胞塊を剥離し、培地に浮遊させ培養する方法として軟骨球体培養法(chondrosphere法)を考案した。7継代目のヒト脱分化軟骨細胞をこの方法を用いて再分化誘導を行うと旺盛な細胞外マトリックスを産生し、II型コラーゲン、アグリカンといった軟骨特異的といわれる遺伝子発現も認め軟骨再分化が示された。Large-scale cDNAの解析において、細胞外マトリックスとしてのsmall proteoglycanの発現を高値に認め、軟骨再分化は発生における軟骨形成に類似していることが示された。骨髓間質細胞の単層培養増殖期におけるlarge-scale cDNAの解析では新たにFGF7、CTGF、BMP antagonist 1の発現を高値に認め新しい増殖因子および関連遺伝子の発現が認められた。

審査では、cDNA解析において、二つの異なる細胞を異なる条件にて比較していることについて質問された。これに対し、large-scale cDNAの解析において一細胞一条件において3072クローンという大量のcDNAクローンを作製し解析しなければならず多条件での比較がcDNAの作製数の制限から困難であったと回答された。また、遺伝子発現頻度を何らかの方法で再確認するべきではないかと質問された。これに対し定量PCR法やノーザンプロット法による確認が必要であるが今回は一部の遺伝子のみ半定量PCR法で確認をおこなったと回答された。最後にchondrosphere法の命名について未分化幹細胞を用いておらず、本来のsphereの意味と異なるのではないかと質問された。これに対し、sphereという表現は適せずspheroidとすることを考慮していると回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、脱分化軟骨細胞の再分化法を開発し、さらに骨髓間質細胞の軟骨分化に関連する数種類の遺伝子を同定した点が今後の関節軟骨の再生に向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 整形外科学 戸山 芳昭
病理学 岡田 保典 発生・分化生物学 須田 年生
生理学 岡野 栄之
学力確認担当者: 北島 政樹、岡田 保典
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成16年1月19日

Analysis of angiogenic profiles by estimation of tumor blood flow with colored dye extraction microspheres after antiangiogenic therapy.

(カラードダイエクストラクションマイクロスフェアを用いた腫瘍血流量測定による、
抗血管新生治療後の血管新生プロファイルの解析)

岩 丸 有 史

内容の要旨

背景：血管新生抑制因子投与後の腫瘍血流量変化を測定できれば、抑制因子同士の比較選別や抗癌剤との併用療法効果をより詳細に検討可能になる。我々はマイクロスフェアを用いた新しい腫瘍血流量測定法を考案し、移植腫瘍モデルにおいて血管新生抑制因子投与後の腫瘍血流量変化を測定した。

材料・方法：腫瘍モデルとしてラット腹水肝癌LY80をドブリュラットに皮下移植し、血管新生抑制因子TNP-470を隔日皮下投与した。ラットは以下の4群に分けられた。LY80移植後1週間群 (n=5)、LY80移植後2週間群 (n=5)、LY80移植後1週間+TNP-470投与群 (n=5)、LY80移植後2週間+TNP-470投与群 (n=5)。マイクロスフェアが左心室カテーテルより注入され、腹部大動脈に留置された別カテーテルから血液サンプルが回収された。腫瘍と血液サンプルは重量測定後加水分解された。マイクロスフェアは濾過回収され染料抽出後吸光度が測定された。腫瘍血流量は [腫瘍1gあたりの吸光度] × [血液サンプルの吸引速度] / [血液サンプルの吸光度] として求められた (単位 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)。

結果：LY80腫瘍重量は移植1週目4.39±2.56gから2週目30.74±10.26gへと増加したが、TNP-470投与群では1週目0.57±0.38gから2週目5.18±2.67gと増殖は抑制された。LY80の腫瘍血流量はその重量と体積に負の相関を示した。移植1週目における腫瘍重量から腫瘍血流量を予測する回帰式が腫瘍血流量 ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) = 0.95 - 0.09 × 腫瘍重量 (g) として得られた。TNP-470投与群の移植1週目の腫瘍血流量は上記予測回帰式の左方移動として観測された。TNP-470投与群の移植2週目の腫瘍血流量は増加していた。

考察：移植1週目LY80腫瘍においてTNP-470投与群と非投与群の病理組織の違いは明らかではなかったが、マイクロスフェア法により投与群の腫瘍血流量が減少していることを確認した。また、この現象を腫瘍血流量予測回帰直線の左方移動という数学モデルとして確認できた。一方、移植2週目LY80腫瘍においてTNP-470投与群では血管新生は抑制されていたものの、単位重量あたりの腫瘍血流量はむしろ増加していた。これは、近年明らかになった血管新生抑制因子が有する腫瘍血管構築改善作用の結果と推測される。今後、抗癌剤と併用することで薬剤の効果的な運搬を行うことができると期待される。このようにマイクロスフェア法により、TNP-470は移植1週目のLY80腫瘍においては腫瘍血流量を減少させる作用を、移植2週目のLY80腫瘍においては腫瘍血流量を増加させる作用を有していることが判明した。マイクロスフェア法による腫瘍血流量の測定は血管新生抑制因子投与後の腫瘍の状態に関して様々な解析を可能にすることが示された。

論文審査の要旨

腫瘍血流の研究は重要性を増しつつあり、腫瘍血流を正確にかつ簡便に測定する方法が求められている。また現在まで血管新生抑制因子治療後に腫瘍血流量を生体内で測定した報告は少ない。そこで本研究は直径15 μm のカラードマイクロスフェアを用いた腫瘍血流測定方法を考案し、血管新生抑制因子TNP-470投与後のLY80ラット移植腫瘍血流量の検討を行った。移植1週目LY80腫瘍においてはTNP-470投与群と非投与群での病理組織の違いは明らかではなかったが、投与群の方では腫瘍血流量が実際は減少しており腫瘍重量-血流量の予測回帰直線は左方移動していた。一方TNP-470投与下の移植2週目のLY80腫瘍においては、病理組織学的に血管新生は抑制されていても単位重量あたりの腫瘍血流量は無治療群よりも増加していた。これは腫瘍の成長抑制と血管新生抑制因子治療後の血管リモデリングの結果と推測された。マイクロスフェア法による腫瘍血流の比較定量化は抗血管新生作用の解析や薬剤同士の比較、抗癌剤との併用療法など血管新生抑制因子にかかわる詳細な検討を可能にする事が示唆された。

審査ではまず方法論に関して、マイクロスフェアの腫瘍内局在を組織学的に検討したかどうかの質問があった。マイクロスフェア法は腫瘍の分解が必要なため行っていないが、予備実験として他の腫瘍モデルで腫瘍血管キャストを作製しこれによりマイクロスフェアの局在を推測したと回答された。しかしながら、異なる粒子径を幾つか設定し組織学的検討を加えれば腫瘍内分布をより詳しく検討可能であったとの指摘があった。また、他の血流測定法との比較、さらに腫瘍血管を途絶することによりマイクロスフェアの減少を確認するなどの実験を行ったかどうかについて質問があった。これに対しては、水素クリアランス法やレーザードップラーなど他の測定法を行っていないが、腫瘍を大腿に移植した後大腿動脈を途絶してマイクロスフェアを投与すれば定性的な実験に関しては検討が可能であると回答された。血管新生抑制因子治療群の移植1週目の腫瘍血流量は非治療群に比べて減少しているにもかかわらず、病理所見上差異がないとするには血管面積を測定する必要があるのではないかと指摘があった。これに対して今回の検討ではH.E.染色のみの検討であるが、今後血管面積との比較を行うことを検討していると回答された。同様に移植2週目でも血管面積と腫瘍血流の相関を調べることも興味深い課題であるとの指摘があった。

以上のように、本研究ではなお検討すべき点が残るものの、カラードダイエクストラクションマイクロスフェア法が通常の腫瘍血流測定のみならず抗血管新生抑制因子治療後の腫瘍血流測定にも有用であったことを初めて示したものであり、今後、腫瘍血管新生プロファイルの解析の基礎となりう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 外科学 小林 祐一
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 享宇
医化学 末松 誠
学力確認担当者：北島 政樹、岡田 保典
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成15年12月17日

Th1-Mediated Intestinal Inflammation in Crohn's Disease May Be Induced by Activation of Lamina Propria Lymphocytes Through Synergistic Stimulation of Interleukin-12 and Interleukin-18 Without T Cell Receptor Engagement.

(クローン病におけるTh1を介する腸管炎症はT細胞受容体の会合を要さずにInterleukin-12とInterleukin-18の協調的な刺激による粘膜固有層リンパ球の活性化によって誘導される)

岡 沢 啓

内容の要旨

クローン病において腸管局所の免疫反応はTh1優位の傾向を示し、IL-12、IL-18の関与が報告されている。IL-12とIL-18は、CD4陽性T細胞のTh1細胞への分化誘導の際に協調作用を示すことが知られているが、ヒト腸管粘膜においては詳細な報告がなく、本研究ではクローン病の病態におけるIL-12とIL-18の協調作用につき検討した。

そこで本研究ではまず、クローン病15例、健常者6例の末梢血血清におけるIL-12とIL-18の濃度をELISAにて測定したところ、クローン病において両者ともに有意に高値を示し、かつ両者の濃度は有意な相関関係を認めた。次にクローン病29例、健常者17例より採取、単離した粘膜固有層リンパ球 (LPL) と、同時にクローン病16例、健常者13例より採取、単離した末梢血リンパ球 (PBL) を用い、細胞表面の受容体の発現をフローサイトメトリーにて解析したところ、クローン病LPLでIL-12Rβ2の発現の増強を認めた。次に単離リンパ球をrIL-12 and/or rIL-18で刺激培養した上清のIFN-γ濃度をELISAにて測定した結果、いずれの刺激でもクローン病LPLで有意に産生の増強を認めた。単離リンパ球を種々の濃度のrIL-12 and/or rIL-18の共存下に培養し増殖活性を測定したところ、クローン病LPLで用量依存的に増殖活性の増強を認めた。さらにrIL-12とrIL-18両者の共存下では、その協調作用により健常者LPLでも増殖活性の増強を認め、クローン病LPLではより有意な増強を認めた。同様の系で各々の培養液に中和抗体を添加したところ、健常者LPLでは抗IL-2抗体あるいは抗IL-2Rα抗体共存下で増殖活性の部分的な抑制を認め、クローン病LPLでも同様の結果を認めた。次に単離リンパ球をrIL-12 and/or rIL-18の共存下で培養し、細胞表面の受容体の発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、クローン病LPLにおいてrIL-12刺激下でIL-18Rαの発現の増強を認めた。健常者LPLではいずれの刺激にもIL-2Rαの発現の増強を認めたが、クローン病LPLで各々のIL-2Rαの発現の増強はより著明であった。

以上、健常者LPLではIL-12とIL-18の協調作用によりT細胞受容体の刺激なしに増殖活性やIFN-γ産生の誘導を認め、クローン病LPLでそれらが有意に増強されることを示した。クローン病LPLではIL-12Rβ2の発現が増強しており、rIL-12投与によりIL-18Rαの発現が増強することがIL-12とIL-18の協調作用と関連し、さらにその協調作用にはIL-2/IL-2Rの増殖シグナルが関与していると考えられた。IL-12とIL-18はクローン病において腸管粘膜リンパ球の増殖、IFN-γの産生誘導に関し協調的に作用し、慢性炎症の形成に寄与していると考えられた。

論文審査の要旨

クローン病において腸管局所の免疫反応はTh1優位の傾向を示し、IL-12とIL-18は、CD4陽性T細胞のTh1細胞への分化誘導の際に協調作用を示すことが知られているが、ヒト腸管粘膜においては詳細な報告がない。本研究では、健常者、クローン病の粘膜固有層リンパ球 (LPL)、末梢血リンパ球 (PBL) を用いて、rIL-12、rIL-18で刺激、培養し、フローサイトメトリーにて細胞表面の受容体の発現、ELISAにて上清のIFN-γの産生、リンパ球の増殖活性を解析し、腸管粘膜におけるIL-12とIL-18の協調作用を検討した。健常者LPLではIL-12とIL-18の協調作用によりT細胞受容体を介さずに増殖活性やIFN-γ産生の誘導を認め、クローン病LPLでそれらが有意に増強された。クローン病LPLではIL-12Rβ2の発現が増強しており、rIL-12投与によりIL-18Rαの発現の増強を認めた。さらにその協調作用にはIL-2/IL-2Rの増殖シグナルの関与を認めた。IL-12とIL-18はクローン病の腸管粘膜においてリンパ球の増殖、IFN-γの産生誘導に対し協調的に作用し、局所の免疫反応をTh1優位に誘導し、慢性炎症の形成、持続に寄与していることが示唆された。

審査ではLPLとPBLの組成につき、特にNK細胞などの混入につき質問された。それに対して、LPLに関してはフローサイトメトリーにおいてCD4/CD8の比率、CD3陽性細胞中のαβ T細胞の比率を調べているが、マクロファージやNK細胞の混入はあると考えられ、特にIFN-γの産生実験の結果に関してはNK細胞により修飾されている可能性があると同答された。次にクローン病以外の炎症性腸疾患における結果につき質問された。潰瘍性大腸炎については増殖活性やIFN-γ産生能は健常者より若干高いもののクローン病に比し有意に低く、また、リンパ球の細胞表面の受容体の発現の結果に関してはクローン病に特異的であると回答された。また、同一個体における炎症部位と非炎症部位、手術検体と内視鏡biopsy検体、小腸検体と大腸検体、各々の差異につき質問された。クローン病の手術が術後再発や短腸症候群の点から狭窄形成術、小範囲切除が望ましいとされ、同一個体における炎症部位と非炎症部位の採取が困難であること、内視鏡biopsy検体は分離できるリンパ球が非常に少なく、すべての実験系で比較するのは難しいが、可能な範囲ではほぼ手術検体と同様の結果を認めたこと、小腸検体と大腸検体では特に差が認められなかったこと、以上が各々回答された。

以上、本研究はさらに検討すべき課題を残しているが、クローン病腸管粘膜におけるIL-12とIL-18の協調作用がTh1優位の慢性炎症に寄与していることを明らかにした点で消化器病学上、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 石井 裕正
外科学 北島 政樹 微生物学 石川 博通
微生物学 小安 重夫
学力確認担当者：北島 政樹
審査委員長：北島 政樹

試問日：平成15年12月27日

Bilirubin Rinse : A Simple Protectant Against the Rat Liver Graft Injury Mimicking Heme Oxygenase-1 Preconditioning.

(ビリルビンリンス法の開発：ヘムオキシゲナーゼ-1による
プレコンディショニングに匹敵する移植肝保護効果の検討)

加藤 悠太郎

内容の要旨

論文審査の要旨

肝移植においてグラフト肝冷保存再灌流障害の制御は重要な課題である。ヘム代謝の律速酵素であるheme oxygenase (HO) の誘導型アイソザイムHO-1を冷保存前にグラフト肝に誘導すること (HO-1 preconditioning) による冷保存再灌流障害抑制効果が近年報告されている。HO酵素反応の最終産物は一酸化炭素 (CO)、ビリルビンおよび2価鉄であるが、それぞれ重要な生物活性を有することが最近明らかになった。しかし上記の臓器保護効果においていずれの産物が主要な役割を担っているか詳細は不明である。

本研究では、第一に16時間冷保存ラット肝の体外再灌流モデルを用いて、HO-1 preconditioningのグラフト肝保護効果におけるHO反応産物依存性の機序について検討した。第二に16時間冷保存肝移植モデルを用いて、第一の検討で重要な関与が認められたビリルビンを移植直前にグラフト内投与し (ビリルビンリンス)、その冷保存再灌流障害抑制効果について検討した。

1. HO-1 preconditioningによるグラフト保護効果の機序の検討

ラットより採取した全肝を保存液University of Wisconsin液内に16時間、4℃で保存後、酸化Krebs-Henseleit緩衝液で門脈より体外再灌流するモデルを作成した。グラフト肝のHO-1 preconditioningは冷保存開始18時間前にHO-1誘導薬剤Heminの腹腔内投与にて行った。Hemin処置群では冷保存再灌流後、胆汁内ビリルビン・胆汁酸・リン脂質分泌量の増加を伴う有意な胆汁流量増加を認め、肝酵素逸脱量で評価される肝細胞障害も有意に軽減した。HO阻害剤投与により有意に抑制されたHemin処置の効果は、低用量ビリルビンの共灌流により濃度依存性に再現された。さらにHO-1非誘導肝においても、再灌流早期の低用量ビリルビン共灌流によりHO-1誘導に匹敵する冷保存再灌流障害抑制効果を確認した。また再灌流によってグラフト肝細胞に発生した酸化ストレスはHemin処置あるいは低用量ビリルビン共灌流により有意に抑制された。

2. 肝移植におけるビリルビンリンスの有効性に関する検討

ビリルビンリンスの有効性をラット同所性肝移植モデルで検討し、HO-1 preconditioningの効果と比較した。その結果、移植直前に低用量のビリルビンでグラフト肝リンスを施行した群ではビリルビンリンス非施行群に比して、移植後胆汁流量・血清肝酵素逸脱量・術後24時間生存率が有意に良好であった。またこのビリルビンリンスのグラフト肝保護効果はHO-1 preconditioningによる効果に匹敵した。

以上の実験では、ビリルビンは至適低濃度でのみ有効であり、高濃度での投与は逆に各パラメータを悪化させ、その毒性が示唆された。

以上の結果から、HO-1 preconditioningの冷保存再灌流障害抑制によるグラフト保護効果の機序の一つとしてビリルビンの抗酸化作用が示唆され、またビリルビンリンスの冷保存再灌流障害抑制効果はHO-1 preconditioningの効果に匹敵すると考えられた。臨床応用可能な長時間冷保存グラフト肝保護法として、ヘム代謝に影響を与えず、また単純かつ廉価であるという点で、用量を至適に保ったビリルビンによるリンスの方が薬物的HO-1誘導よりも優位性がある可能性が示唆された。

肝移植におけるグラフト肝冷保存再灌流障害の抑制方法としてHO-1 preconditioningの有効性が報告されているが、その機序については不明点が多い。本研究では、同機序において、HO反応産物であるビリルビンの抗酸化作用が主要な役割を担っていることが明らかにされ、さらにex vivoおよびin vivo両実験系において、グラフト肝に対するビリルビンリンスは、HO-1 preconditioningに匹敵する冷保存再灌流障害抑制効果を発揮した。

審査では、主にビリルビンリンスに関して質疑がなされた。投与ビリルビンの有効濃度の範囲が狭い理由が問われ、また毒性が出現するビリルビン濃度周辺の投与濃度をさらに細く設定すべきとの指摘がなされた。これに対し、in vitroでの報告では抗酸化作用を発揮するビリルビン濃度の範囲はさらに広いが、ex vivoおよびin vivoでは比較的低濃度でも細胞毒性が出現し、有効濃度の範囲が狭くなる可能性はあり、現時点では詳細は不明であると回答された。また、ビリルビンリンスの臨床応用を考える上で、上記のような微妙な濃度設定は可能かという問いに対して、ヒトにおける有効投与濃度の設定にはさらなる検討が必要であるが、可能であるとの考えが示された。また、临床上、移植肝に対するリンスの際にビリルビンが肝内に不均一に分布し、高濃度に集積した領域の肝障害が出現する可能性について質問され、リンス手技の向上により克服し得る問題であると回答された。また、ex vivoに比してin vivoで投与ビリルビン有効濃度が若干高い理由を問われたが、in vivoでは再灌流時に肝内に供給される血中のアルブミンがビリルビンをある程度捕捉し、ビリルビンの肝細胞毒性を軽減している可能性について言及された。さらに、ビリルビンリンスの有効性の機序としてビリルビンの抗酸化作用以外の作用の関与は考えられるかとの質問に対して、文献的にはその他の肝細胞保護効果の報告はなく、現時点では否定的であるとの考えが述べられた。一方、本研究におけるKupffer細胞由来の酸化ストレスの重要性を問われたが、本研究ではKupffer細胞および好中球由来の酸化ストレスの関与が僅少である冷保存時間および再灌流環境を設定したことが説明された。また、肝組織ビリルビン免疫染色写真の質が低いとの指摘があり、さらに肝組織acrolein免疫染色写真の一部で、陽性肝細胞核数が別途カウントした数に合致しない傾向があり、掲載写真の選択を考慮すべきと指摘された。

以上、本研究は、投与ビリルビンの濃度設定や組織標本写真に改善すべき点が指摘され、また、臨床応用を考える際に検討すべき点も多く残されているが、ビリルビンの抗酸化作用による冷保存肝再灌流障害抑制効果がin vivoではじめて示され、ビリルビンリンスの臨床応用の可能性も示唆された点で、今後の肝移植の成績向上に寄与し得る有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 石井 裕正 解剖学 相磯 貞和
病理学 岡田 保典
学力確認担当者：北島 政樹、石井 裕正
審査委員長：石井 裕正

試問日：平成15年12月16日

MR Imaging in the Diagnosis of Denervated and Reinnervated Skeletal Muscles : Experimental Study in Rats

(脱神経筋および再神経支配筋の診断におけるMRIに関する実験的研究)

菊地 淑人

内容の要旨

脱神経筋の診断においてはこれまで電気生理学的検査が主要な位置を占めていた。針筋電検査は侵襲的検査であり、また体深層にある筋や小範囲の筋などは的確に針を挿入することが難しく、検査者の技量に依存する。一方、近年MRIが末梢神経損傷での脱神経筋の評価に有用であるとの報告が散見されるようになった。MRIは非侵襲的で、筋の異常をその大小・部位にかかわらず描出することが可能である。MRIで脱神経筋は、T1強調画像で等輝度、T2強調画像で高輝度を呈するが、脱神経筋の再神経支配の過程をMRIで検討した報告は少ない。そこで本研究ではラット骨格筋の脱神経および再神経支配過程におけるMRIでの経時的変化を検討した。

Wistar系雄ラット100匹を用い、後脛骨神経を切断した群(神経切断群、n=48)と、同神経を切断後、直ちに縫合した群(神経修復群、n=48)を作製した。2、4、6、8週と経時的にMRI撮像を行い、輝度変化・筋横断面積について検討した。その結果、T1強調画像では、両群とも後脛骨神経支配領域の下腿三頭筋は全週にわたり等輝度であった。T2強調画像では神経切断群では全週で高輝度変化を示したが、神経修復群では2・4週群で高輝度変化を示し、6週以降輝度は正常化した。画像解析でも神経切断群では輝度対側比は経時的に増加したが、神経切断群では4週から6週で有意に減少し、画像上の輝度変化の正常化と一致した。筋横断面積は神経切断群では経時的に減少したが、神経修復群では緩徐に回復した。また同時に施行した電気生理学的検索では神経切断群では全週においてM波は導出されなかったが、神経修復群では4週時にM波の導出が可能となった。ついでラットを経時的に屠殺し、T1・T2値の計測を行ったが、T2値は神経切断後急速に増大した。神経修復群では2週では有意な増加を認め、4週以降経時的に減少した。細胞外水分量のマーカーとして³¹Sを用い、筋肉水分量の検索を行ったところ、筋肉の全水分量は両群ともほとんど変化を認めなかったのに対し、細胞外水分量は神経切断群では2週以降有意に増加した。神経修復群では2週・4週と増加したが、6週以降有意に減少した。

本研究ではMRIを用いて脱神経過程のみならず再神経支配過程での輝度変化を追跡し、再神経支配に伴い輝度変化は正常化することを示した。筋肉全水分量はほとんど変化しないにもかかわらず、神経切断群では細胞外水分量は急速に増加し、画像での高輝度変化と平行した。また神経修復群では細胞外水分量は4週まで増加した後減少し、画像上の輝度変化の正常化と一致することがわかった。以上より脱神経および再神経支配での輝度変化は細胞外水分量の変化と関係があると推測された。さらにMRIは脱神経および再神経支配過程を評価するのに有用な検査法であり、筋電図の補助検査として臨床応用が期待されることがわかった。

論文審査の要旨

近年MRIが末梢神経損傷での脱神経筋の評価に有用であるとの報告が散見されるようになった。MRIで脱神経筋は、T1強調画像で等輝度、T2強調画像で高輝度を呈するが、脱神経筋の再神経支配の過程をMRIで検討した報告は少ない。またその再神経支配の過程でのMR画像に影響を与える因子について検討した報告はない。そこで本研究ではラット骨格筋の脱神経・再神経支配過程におけるMRIでの経時的変化を検討し、またMRI上の輝度変化の原因を明らかにするために、T1値・T2値を測定、さらに筋肉内水分量を*in vitro*で計測し、その変化を併せて検討した。その結果、MRI、T1強調画像では全経過を通じ等輝度であったが、T2強調画像で脱神経筋は高輝度を呈し、再神経支配に伴い輝度変化は正常化することがわかった。また、筋肉全水分量はほとんど変化しないにもかかわらず、脱神経筋では細胞外水分量は急速に増加すること、再神経支配過程では細胞外水分量は減少し、画像での輝度の正常化と並行することも明らかとなった。以上より脱神経および再神経支配での輝度変化は細胞外水分量の変化と関係があると推測された。

審査では、まずMRIでの輝度回復に対する再神経支配の証明は電気生理学的検索だけでは間接的評価ではないかという質問がなされた。それに対して、神経の再生は組織学的に確認しているとの回答がなされた。次に、筋肉の輝度が均一でないため画像解析だけではばらつきが出るのではないかと質問がなされ、その裏付けとしてT1値、T2値を測定したとの回答がなされた。またMRIでの輝度変化の原因が水分量の変化だけなのかとの質問に対しては、血流、脂肪などの関与も否定できないとの回答がなされた。さらに、MRIは脱神経の標的器官である筋肉に対する検査法であり、神経の障害を直接評価できないのではという質問に対しては、本研究では神経の障害レベルまでは証明できないこと、完全脱神経、部分的脱神経などの神経の障害程度の同定も本モデルのみでは限界があり、神経のaxonal flowを描出できる撮像法などの応用が必要で、今後の課題であるとの回答がなされた。最後に本研究の臨床的応用の可能性についての質問がなされ、画像所見による脱神経の予後予測が最終的な目標であるが、臨床例での検討を含め今後の研究課題であるとの回答がなされた。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、脱神経での輝度変化の原因が細胞外水分量の増加によるもの、再神経支配に伴い細胞外水分量および輝度変化が回復するということを証明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 整形外科学 戸山 芳昭
放射線医学 栗林 幸夫 外科学 河瀬 斌
リハビリテーション医学 千野 直一
学力確認担当者：北島 政樹、栗林 幸夫
審査委員長：栗林 幸夫

試問日：平成16年1月21日

傍黄斑部網膜毛細血管血流の定量的評価法の確立と黄斑部疾患への応用

木村 至

内容の要旨

【目的】 正常人における網膜黄斑部近傍の組織血流量の測定・評価を目的として、Scanning laser Doppler flowmeterであるHeidelberg Retina Flowmeter (HRF)を用い、左右眼の血流量を厳密に比較する。また、黄斑部近傍の測定領域を上部と下部に分け、同一眼内における上下の血流量比較も行った。さらに、黄斑部微小循環の定量的評価法の応用として、網膜上膜 (Epi-retinal membrane : ERM) 眼の網膜組織血流について検討し、硝子体手術によるERMの除去術前後の傍黄斑部の循環動態を比較検討した。

【対象と方法】 (実験1) 男性5名、女性15名から成る20名の健常者を対象とした。HRFを用いて両眼の血流測定を行った。傍黄斑部鼻側の微小循環の指標として平均血流量 (Mean Blood Flow : MBF) を算出し、対応する右眼と左眼のMBFの比 (R/L比) および上部と下部のMBFの比 (S/I比) をとり、評価を行った。(実験2) 片眼性の特発性ERMが黄斑部にある患者で、1998年1月から2000年6月の間に硝子体切除術を受けた症例20例 (男性10名、女性10名) を対象とした。術前・術後の傍黄斑部血流測定およびMBF値の算出を行い、MBF値の、患眼の健眼に対する比を求め、a/f比とした。

【結果】 (実験1) MBF値は測定領域の上部・下部ともに左右眼の間に有意に高い相関を示した (上部は $r=0.747$ 、 $P=0.0011$ 、下部は $r=0.797$ 、 $P=0.0005$)。また、両眼とも測定領域の上部と下部のMBF値に有意差はなく (両眼とも $P>0.05$)、有意に高い相関を示した (右眼は $r=0.720$ 、 $P=0.0017$ 、左眼は $r=0.877$ 、 $P=0.0001$)。R/L比の平均値は、上部が1.00、下部が1.03であり、S/I比は上部が1.01、下部が1.04であった。各測定領域のMBF値と眼圧、年齢との相関は、有意ではなかった。変動係数については、右眼の測定領域上部が4.92%、下部が7.21%、左眼上部が7.74%、下部が7.74%と、良好な再現性を示した。(実験2) 術前の上部MBF値のa/f比は0.44~1.27で、平均は 0.73 ± 0.22 (平均±標準偏差)、下部MBF値のa/f比は0.41~1.14で、平均は 0.70 ± 0.20 (平均±標準偏差)であった。コントロール群として実験1のデータを対照とすると、傍黄斑部測定領域の上部・下部ともにa/f比は、コントロール群と比較して、ERMの患者群において有意に小さかった (上部・下部ともに $P<0.0001$)。測定領域上部と下部のa/f比には、有意に高い相関を認めた ($r=0.827$ 、 $P<0.0001$)。また、術後3、6、12ヶ月後の視力は術前視力と比較し、有意に改善した。18眼 (90%) においては最終視力が0.5以上に達し、全例において0.3以上の最終視力を得た。上部MBF値の平均a/f比は、術後1、3、6、12ヶ月の各時点において、順に0.51、0.76、0.88、1.01、下部については同様に、0.52、0.75、0.93、0.98であった。術後6ヶ月および12ヶ月のa/f比は術前と比較し、上部・下部ともに有意な改善を示した。

【結論】 健常者においては左右眼の傍黄斑部網膜血流比はほぼ1.0と、微小循環血流量は左右同等であることを実証した。比較的若年で不同視のない健常者の両眼の間には、11%~13%程度の血流量の相違が存在するという、左右眼の間の変動性の目安として用いられる数値を示した。今後の眼循環と網膜疾患との関係に関わる研究において、有用な基礎データになりうると考えられる。ERM眼は傍黄斑部の異常な網膜循環動態を呈しているが、硝子体手術によりERMが除去されると、網膜循環は改善することがわかり、視機能の改善に関与していることを示唆していた。

論文審査の要旨

今回の研究は傍黄斑部網膜毛細血管血流の定量的評価法を確立し、黄斑部疾患への臨床応用を目的としたものである。Heidelberg Retina Flowmeter (HRF)を用い、健常者の傍黄斑部網膜毛細血管血流を左右眼で比較し、また同一眼内の黄斑部近傍の上下の血流量の比較を行った。毛細血管血流の指標として平均血流量 (mean blood flow : MBF) を算出し、対応する右眼、左眼の比 (R/L比) および上部と下部のMBFの比 (S/I比) をとり評価した結果、MBF値は上部・下部ともに左右眼の間に高い正の相関を示した。また上部・下部のMBF値に左右差はなく、有意に高い正の相関を示した。片眼性の網膜上膜 (Epi-retinal membrane : ERM) でHRFを用い患眼と健眼の比 (a/f比) を求めた結果、傍黄斑部測定領域の上部・下部ともにコントロール群と比べて有意に減少していた。術後経過と共にa/f比は増加し、術後6~12か月で改善した。

審査に当たり、正常人とERMの患者群の年齢が、マッチしていないことが指摘された。これに対し年齢をマッチさせることは重要であるが、今回は血流量の絶対値を測定しているのではなく左右眼の比を比較しているため年齢の影響は少ないと考えるとの回答がなされた。またERMの症例の術前視力障害のメカニズムについて単なるERMによるフィルター効果であるのか視細胞そのものの障害であるのか議論がなされた。HRFに用いられるレーザー光の測定深度について、網膜のみではなく脈絡膜循環の影響があるのではないかと質問があった。これに対し使用している測定深度では中心窩は脈絡膜循環の影響は考えられるが他の部位については無視できるとの回答があった。またERM術後1ヶ月でa/f比が術前より低下する理由につき議論があった。術後は炎症が強いのでレーザー光の散乱があり、これが影響している可能性がある。またレーザー光による血流の変化も考慮する必要があるのではないかとコメントがあった。次に本装置は正常値が公表されているのではないかと質問に対して、新しいプログラムで行われた試験では視神経乳頭部の循環のみしか報告はなく、左右の比や上下の比を比較した論文は見られず、今回の報告が傍黄斑部網膜毛細血管血流の正常人のデータとしては最初のものであるとの回答があった。最後に網膜微小循環の言葉の定義につき注意があった。その他図の説明で単なる「相関」ではなく、「正の相関」とすべきであり、また表の1と2がデータが重複しているため一つに纏めた方がよいとの指摘があった。

本研究は傍黄斑部網膜毛細血管血流をHRFを使用し評価する指標を確立したことにより、今後網膜後極部疾患の毛細血管血流の評価に有用であることを示し、眼科臨床に価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 小口 芳久

医化学 末松 誠 解剖学 仲嶋 一範

外科学 河瀬 斌

学術確認担当者: 北島 政樹、末松 誠

審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成16年1月6日

ヒト *Notch 4* およびヒト *Notch 1* 遺伝子の子宮内膜癌における発現異常

鈴木 貴士

内容の要旨

【目的】 ショウジョウバエの *Notch* 遺伝子は、個体の発生過程において重要な役割を演じる遺伝子である。その相同遺伝子は様々な動物種から複数単離されており、*Notch* の突然変異は発生異常を示す。今回検討対象としたヒト *Notch 4* および *TAN-1* はショウジョウバエ *Notch* の相同遺伝子としてクローニングされた。両者は発生過程だけでなく *TAN-1* の発現異常による白血病に代表されるように、発癌にも関与することが報告されているが、その発現パターンや機能については不明な点が多い。そこで本研究では、正常子宮内膜および子宮内膜癌におけるヒト *Notch 4* および *TAN-1* 遺伝子の時間的空間的発現を明らかにし、ヒト *Notch 4* および *TAN-1* 遺伝子の正常子宮内膜および子宮内膜癌における機能を推察した。

【方法】 患者の同意を得た上で、婦人科良性疾患や子宮頸癌で摘出された子宮より各月経周期の正常子宮内膜サンプルを採取した。また子宮内膜癌サンプルは手術時に採取した。これらのサンプルより全 RNA を抽出し、ヒト *Notch 4* と *TAN-1* の特異的プローブを用いてノーザンブロット (NB) を行った。さらに、ポリ-(A)⁺RNA を抽出し RT-PCR にて各々の遺伝子を増幅した後、それぞれの特異的プローブを用いてドットプロット (DB) を行った。また 4% -パラホルムアルデヒドにて固定したサンプルを使って *in situ* hybridization (ISH) を行った。

【結果】 NB の結果、正常子宮内膜および子宮内膜癌においてヒト *Notch 4* と *TAN-1* の明らかなシグナルを検出できなかったが、DB によりその発現が確認された。ドットのシグナル強度を統計的に検討した結果、ヒト *Notch 4* の発現量は増殖期から分泌期になると有意に減少したが、*TAN-1* では同様の傾向を認めるものの有意な差を認めなかった。子宮内膜癌では、ヒト *Notch 4* は正常子宮内膜より発現量が有意に減少していたが、*TAN-1* では有意に増加していた。ISH の結果、正常子宮内膜ではヒト *Notch 4* および *TAN-1* 遺伝子は主に腺細胞に、子宮内膜癌では癌細胞と間質細胞に同等のレベルで発現していることが確認された。

【結論】 月経周期によってヒト *Notch 4* と *TAN-1* の発現量がほぼ同様に変化することから、両者は正常子宮内膜の増殖期から分泌期への変化に関与していることが示唆された。その局在は正常子宮内膜では主に内膜腺細胞に、子宮内膜癌では癌細胞とその間質細胞に発現していた。さらに子宮内膜癌におけるヒト *Notch 4* の発現量は正常子宮内膜と比較して減少したのに対して、*TAN-1* では増加しており、両者の発現量比の変化が正常細胞の運命決定や細胞増殖の破綻を通して子宮内膜癌の発生に関与していることが示唆された。

論文審査の要旨

ショウジョウバエ *Notch* とその相同遺伝子は個体発生に関与するだけでなく、癌化にも関与する。一方、正常子宮内膜は月経周期により増殖期から分泌期へと変化すると同時に、子宮内膜癌の母組織となる。本研究では、ショウジョウバエ *Notch* の相同遺伝子であるヒト *Notch 4* (N4) とヒト *Notch 1* (N1) の、正常子宮内膜の増殖期から分泌期への変化および子宮内膜癌の発生への関与の可能性を検討した。正常子宮内膜および子宮内膜癌サンプルを用い、ノーザンブロット (NB)、ドットプロット (DB)、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) を行った。その結果、月経周期の増殖期から分泌期への変化にあわせて N4 の発現量が有意に減少し、N1 の発現量も減少する傾向を認めた。さらに、正常子宮内膜と子宮内膜癌における N4 と N1 発現量を比較したところ、子宮内膜癌において N4 の発現量が有意に減少したが、N1 では有意に増加したことを明らかにした。また ISH により、N4 と N1 はともに正常子宮内膜の腺細胞に、子宮内膜癌の癌細胞と間質細胞にそれぞれが発現していることを明らかにした。これらのことから、N4 と N1 は正常子宮内膜の増殖期から分泌期への組織学的変化に協調的に関与している可能性や、N4 と N1 の発現量比の変化が子宮内膜の癌化に関与している可能性を示唆した。

審査ではまず、DB よりは real time PCR や PCR-サザンブロット、抗体を用いた免疫染色を行うべきであること、ISH において他の分子でのコントロールを加えることや、他の相同遺伝子やリガンドの検討など、方法論について指摘されたが、サンプル量の問題、抗体の入手やプローブの作成が困難であるため検討が不可能であったと回答された。DB による発現量の比較は、正常子宮内膜全体よりも増殖期内膜と子宮内膜癌で行うべきと助言された。DB では子宮内膜癌で N4 の発現量が減少するが、ISH では癌細胞と間質細胞に発現しているので、むしろ発現量が増加していると解釈するべきとの質問に、ISH ではシグナル検出のために発色時間を長くしたことや、N1 より N4 の方がシグナル検出により多くの時間を要したため定量性が低い、と回答された。子宮内膜癌で発現量が減少するので、N4 は腫瘍抑制遺伝子と考えられるかとの質問に対し、可能性はあるが、その証明には検討を要すると回答された。子宮内膜癌の組織型や分化度、子宮内膜増殖症での発現量の差について、N1・N4 とエストロゲンの関係の有無について質問されたが、本研究での例数が少ないことや、今までにも報告されていないことから今後の検討を要すると回答された。

以上のように本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、N4 と N1 が月経周期や子宮内膜癌で発現量が変化している点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 野澤 志朗
産婦人科学 吉村 泰典 病理学 坂元 亨字
先端医科学 河上 裕
学力確認担当者：北島 政樹、吉村 泰典
審査委員長：吉村 泰典

試問日：平成15年12月13日

Matrix Metalloproteinases Cleave Connective Tissue Growth Factor and Reactivate Angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor 165.

(マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は結合組織成長因子 (CTGF) を分解することにより血管内皮成長因子 (VEGF₁₆₅) の血管新生活性を再活性化する)

橋 本 学 爾

内容の要旨

論文審査の要旨

血管内皮成長因子 (VEGF) は強力な血管新生活性を有する成長因子である。すでに我々は VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅ が結合組織成長因子 (CTGF) と結合し、さらに VEGF/CTGF の複合体形成により前記 VEGF の血管新生活性を抑制することを明らかにしてきた (副論文)。本論文ではマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) による活性制御への影響を検討する目的で、VEGF₁₆₅/CTGF 複合体を各種 MMP で消化し、代表的な MMP 消化による活性変化を *in vitro* と *in vivo* で検討した結果を報告する。VEGF₁₆₅/CTGF 複合体を MMP-1、2、3、7、9、13、ADAMTS4、プラスミン、エラスターゼで 37℃、24 時間消化した結果、MMP-1、3、7、13 は CTGF のみを分解したが、プラスミンとエラスターゼは CTGF のみならず VEGF₁₆₅ も分解した。一方、ADAMTS4 は両成長因子とも分解しなかった。CTGF を分解した MMP のうち、MMP-13 の CTGF 活性が最も強力であった。いずれの MMP についても CTGF における切断部位は von Willebrand type C repeat ドメインと Thrombospondin ドメインの間に限局していた。VEGF₁₆₅/CTGF 複合体に対して MMP 消化させた後の CTGF 断片の挙動を検討するため、VEGF₁₆₅ をコートしたプレートに ¹²⁵I 標識した CTGF を添加して複合体を形成させた後、MMP-3 消化を行い、上清に対して CTGF の N 末端、C 末端側を認識する抗体で免疫沈降を行った。その結果、24 時間までに MMP-3 で分解された CTGF 断片は VEGF₁₆₅ からほぼ解離することを明らかにした。VEGF₁₆₅/CTGF 複合体をコラーゲンゲルで培養したウシ大動脈由来血管内皮細胞に添加して 3 日間培養した結果、著しく管腔形成が抑制されたのに対して MMP-1、3、13 で消化した複合体を添加すると管腔形成が VEGF₁₆₅ 単独による活性レベルまで回復した。さらに VEGF₁₆₅/CTGF 複合体、および MMP-3 消化した複合体を含むマトリゲルをマウス皮下に注入し、5 日後に回収して血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor (vWF) 陽性の紡錘状細胞と血管数を測定した。その結果、VEGF₁₆₅/CTGF 複合体存在下で vWF 陽性細胞数と血管数共に減少したが、予め MMP-3 消化した複合体は VEGF₁₆₅ 単独と同レベルの血管新生活性を有していた。以上の結果より、VEGF₁₆₅/CTGF 複合体形成で抑制された VEGF₁₆₅ の血管新生作用は MMP の消化により CTGF 断片が解離することで回復することが明らかとなった。MMP は CTGF の分解により胎児発生、組織の恒常性維持および関節リウマチ等の病態において重要な役割を果たしていることが示唆された。

変形性関節症 (OA) における関節軟骨中に VEGF の発現が亢進していることから同軟骨中に VEGF 抑制因子の存在が推測された。酵母 2-Hybrid 法を用いたスクリーニングにより結合組織成長因子 (CTGF) が VEGF₁₆₅ と結合し、VEGF の活性を阻害していることが既に示されている。本研究では OA の進行と共に発現誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のプロテアーゼ活性が VEGF₁₆₅/CTGF 複合体に与える影響について検討を行った。その結果、MMP-1、3、7、13 は CTGF を基質として分解し、切断された CTGF 断片は VEGF₁₆₅ から解離することが示された。さらに、血管内皮細胞の管腔形成アッセイとマトリゲルを用いたマウス皮下注入による血管新生アッセイから、MMP 消化によって VEGF₁₆₅ の血管新生活性が回復することを実証した。MMP は CTGF の分解により胎児発生、組織の恒常性維持および関節リウマチ (RA) 等の血管新生を伴う生理的および病的組織において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

審査では、まず血管内皮細胞の管腔形成アッセイでは本当に管腔が形成されているかについて質問がなされた。これに対し、過去の文献を引用し、コラーゲンゲルを重層した本アッセイでは、断面を観察すると管腔が形成されているとの回答がなされた。次いで、CTGF に対する分解活性が強かった MMP-1、3、7、13 の OA 関節軟骨での発現について質問がなされた。これに対し、程度の差はあるもののいずれの MMP も OA や RA 関節軟骨で発現亢進しているとの回答がなされた。管腔形成アッセイにウシ由来の血管内皮細胞を使っている理由を求められた。これに対し、コラーゲンゲルを重層して平面的に細胞培養を行う本方法では、HUVEC などのヒト由来細胞では伸長が起こらないとの回答がなされた。一方、CTGF と MMP による VEGF の活性制御機構の検討にはヒトの検体や動物の OA モデルを用いて検証することが重要であるとコメントされた。さらに VEGF/CTGF 複合体形成が実際に生体内で生じているのか、との質問がなされた。これに対しては、生体内でこの系が働いている証拠はまだ得られていないものの、CTGF が細胞外マトリックス分子に結合しやすいとの知見を得ており、VEGF、CTGF の両者の間にマトリックスが介在することにより複合体形成が起こりやすくなっている可能性があるとの回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討すべき点はあるものの、CTGF とプロテアーゼを介した VEGF 活性の制御機構を明らかにしたことは様々な生体機能維持、あるいは OA や RA をはじめとした疾患を理解する上で意義があり、病理学的にも価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 病理学 岡田 保典

内科学 池田 康夫 病理学 坂元 亨宇

発生・分化生物学 須田 年生

学力確認担当者: 北島 政樹、池田 康夫

審査委員長: 池田 康夫

試問日: 平成16年1月16日

生体内CCDカメラを用いた腎輸入・輸出細動脈の反応性の層差に関する研究

松田 洋人

内容の要旨

腎内に豊富に存在し血圧や腎機能を調整するレニン・アンジオテンシン系は、輸入・輸出細動脈の緊張を制御することで血液濾過の調整を行っている。しかし、アンジオテンシンⅡ（以下、AⅡと略）による腎微小循環の制御機構は、一酸化窒素（以下、NOと略）を始めとする多くの液性因子の影響を受け、さらにこれらの液性因子の濃度が腎皮質・髄質で異なるため、腎微小血管の存在する部位により異なる可能性が推測される。しかしながら、従来の研究手法では腎各層における腎微小循環の評価を同条件下で行うことは困難であった。著者は、新しく開発したニードル型生体内CCDカメラを用いて、腎表層部ならびに傍髄質部ネフロン（腎皮質・輸出細動脈）を直接観察し、AⅡとNOとの相互関連を腎各層において評価した。さらに、腎細動脈の反応と平行して、腎微小透析法による腎皮質・髄質部のNO₂/NO₃の測定を行うとともに、腎生検法による組織ブラジキニン濃度を測定し細動脈反応と比較検討した。

まず基礎状態における腎NOは腎髄質部が皮質表層部より高値であり、NO合成阻害薬のnitro-L-arginine methylester (1 mg/kg)を用いた検討と合せると、傍髄質の細動脈が皮質表層部のそれよりもNOの影響を強く受ける傾向が見られた。さらに外因性AⅡ (1-30ng/kg/min)による収縮反応に対し、腎内NOは輸入・輸出細動脈収縮を傍髄質部ネフロン優位に抑制したことより、髄質部で誘導されたNOがAⅡによる傍髄質部細動脈の収縮に拮抗的に作用するものと考えられた。次に、A受容体拮抗薬 (E4177; 30μg/kg) は、皮質表層部ならびに傍髄質部の輸入・輸出細動脈を同等に拡張させたが、この反応に腎内NOの関与は認めなかった。A変換酵素阻害薬（以下、ACE阻害薬と略）のシラザプリラート30μg/kgも同様に細動脈を拡張させたが、この拡張はブラジキニン拮抗薬で一部抑制された。さらに、ACE阻害薬による組織ブラジキニンならびにNOの検討を行ったところ、髄質ではブラジキニンの増加とともにNO活性の亢進が見られた。そこで、A受容体拮抗薬投与下でACE阻害薬の追加投与を行ったところ、傍髄質部輸入・輸出細動脈の追加拡張が見られた。一方、皮質表層部では輸出細動脈でのみ追加拡張反応を示した。これらの細動脈の追加拡張は、ブラジキニン拮抗薬で消失したより、ACE阻害薬の拡張作用の一部にブラジキニンが関与し、その程度が腎各層ならびに輸入・輸出細動脈のレベルで異なることが示された。

以上の結果より、腎各層においてブラジキニンやNOが異なる分布様式を呈しており、腎微小血管の反応性は輸入・輸出細動脈自体の反応の差異のみならず、細動脈の存在する各層の液性因子の環境によっても影響を受け、これらの因子がAⅡやACE阻害薬などのホルモンや薬剤の作用をも修飾しているものと考えられた。この腎各層における反応性の多様性は、皮質表層部や傍髄質部ネフロンの機能にも影響を与える可能性が示唆された。

論文審査の要旨

腎糸球体の輸入・輸出細動脈の収縮・拡張には腎内のアンジオテンシン (A) Ⅱ、ブラジキニン (B) および一酸化窒素 (NO) 等の諸種脈管作動物質が重要な役割を果たしている。このような脈管作動物質は、腎皮質と髄質とで産生量が異なり、その差が、皮質と髄質の輸入・輸出細動脈の収縮・拡張反応に異なる影響を与えていると考えられている。そこで本研究ではその詳細を明らかにするため、犬を対象とし、新しく開発されたニードル型生体内CCDカメラを用いて腎皮質部および傍髄質部ネフロン（腎皮質・輸出細動脈）を直接観察し、AⅡ、BおよびNOの相互作用を検討した。さらにレニン・アンジオテンシン系抑制薬であるAⅡ受容体拮抗薬とA変換酵素 (ACE) 阻害薬の効果を検討した。

まず基礎状態で、BおよびNOは傍髄質部で皮質より高値であり、その影響が傍髄質部の細動脈に影響していることを明らかにした。次に外因性AⅡによる収縮反応に対し、腎内NOは、輸入・輸出細動脈の収縮を傍髄質部で特に著明に抑制し、AⅡの収縮作用に拮抗していることを明らかにした。AⅡ受容体拮抗薬とACE阻害薬を用いた検討では、ACE阻害薬はAⅡ受容体拮抗薬と異なり、BとNOの増加をきたし、その効果がBおよびNOの産生量の多い傍髄質部で著明であったとした。このような結果から、腎臓の各層でBやNOの産生量が異なり、このようなBやNOは直接細動脈の反応性に影響するほか、AⅡの作用やACE阻害薬のような薬剤の作用もこれらの因子によって修飾されると結論した。

このような研究に対してまず問題とされたのが犬を対象としたことである。当研究者は、ニードル型CCDカメラでの観察には犬のような大きな動物が適すること、また腎内血行動態や脈管作動物質の存在がヒトと極めて近いためとされた。次に諸種脈管作動物質の血管への作用に関して、血管径の変化のみで評価した点が問題となった。血管径は多くの要因によりコントロールされており、腎内の部位や血管の太さによって反応が異なることから、血流面からの検討もなされればよかったと助言された。このほか、腎皮質と傍髄質とに分けて検討されたが、各実験ごとに部位が異なることが予想され、実験結果にばらつきが出る可能性が指摘された。しかし実際に実験してみると、皮質ネフロンと髄質ネフロンとは明らかに異なり、各実験ごとにほぼ同じ部位を標的にして実験ができたこととされた。

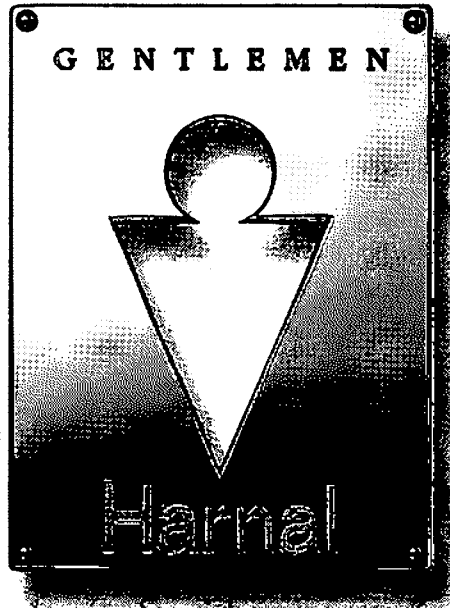
実験成績上、血圧値や心拍数の基礎値に差があるものがあつたが、この差は使用した犬の種類の差によることが判明し、論文中で明らかにされるべきであったと助言された。論文中の図表や文章にいくつかの問題点が指摘され、博士申請論文であることから訂正して提出するように指示が出された。

以上のように論文の書き方等、いくつかの問題点が指摘されたが、犬のin vivoの実験で腎細動脈と脈管作動物質の関係を明瞭にした点で、この領域で価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 亨男
泌尿器科学 村井 勝 医化学 末松 誠
内科学 小川 聡
学力確認担当者：北島 政樹、村井 勝
審査委員長：村井 勝

試問日：平成15年12月19日

その排尿障害に、ハルナール。
出づらくて時間がかかる、夜中に何度もトイレに起きる…。そんな方に、排尿障害専門のα₁ブロッカー！



- 前立腺・尿道平滑筋に選択的なα₁ブロッカーです。(in vitro)
- 処方しやすい1日1回1カプセル。
- 前立腺肥大症に伴う尿勢減弱、夜間頻尿、残尿感などに優れた改善効果があります。
- 副作用発現率は2.2% (104/4724例)で、主なものはめまい、胃不快感等です。(再審査終了時)なお重大な副作用として、失神・意識喪失、肝機能障害、黄疸が認められています。

〔禁忌(次の患者には投与しないこと)〕
本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者

〔効能・効果〕前立腺肥大症に伴う排尿障害

〔用法・用量〕通常、成人には塩酸タムスロシンとして0.2mgを1日1回食後に経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減する。

〔使用上の注意〕(抜粋)

1. 慎重投与(次の患者には慎重に投与すること) (1)起立性低血圧のある患者[症状が悪化するおそれがある。] (2)重症な肝機能障害のある患者[血漿中濃度が上昇するおそれがある。] (3)重症な腎機能障害のある患者[血漿中濃度が上昇するおそれがある。] (薬物動態)の項参照 (4)高齢者[高齢者への投与]の項参照
2. 重要な基本的注意 (1)本剤の過剰投与により血圧低下が予想されるので、投与量には注意すること。 (2)立位血圧が低下することがあるので、体位変換による血圧変化に注意すること。 (3)本剤による治療は原因療法ではなく、対症療法であることに留意し、本剤投与により期待する効果が得られない場合は、手術療法等、他の適切な処置を考慮すること。 (4)めまい等があらわれることがあるので、高所作業、自動車の運転等危険を伴う作業に従事する場合には注意させること。 (5)本剤投与開始時に降圧剤投与の有無について問診を行い、降圧剤が投与されている場合には血圧変化に注意し、血圧低下がみられたときには、減量又は中止するなど適切な処置を行うこと。
3. 相互作用 【併用注意】(併用に注意すること) 降圧剤
4. 副作用 承認時及び市販後の使用成績調査における調査症例4,724例中、本剤との関連が疑われる副作用(臨床検査値異常を含む)は104例(2.2%)に発現し、主なものはめまい、胃不快感等であった。(再審査終了時) (1)重大な副作用 1)失神・意識喪失(頻度不明):血圧低下に伴う一過性の意識喪失等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止し適切な処置を行うこと。 2)肝機能障害、黄疸(頻度不明):AST(GOT)上昇、ALT(GPT)上昇、黄疸等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。

| | 0.1~5%未満 | 0.1%未満 | 頻度不明 |
|-------------------|-----------|----------------------------|------------------|
| 精神神経系 | めまい、ふらふら感 | 立ちくらみ、頭暈、眩暈 | いらいら感 |
| 循環器 | | 血圧低下、起立性低血圧、頻脈、動悸 | 不整脈 |
| 過敏症 ¹⁾ | | 痒痒感、発疹等 | 尋麻疹 |
| 消化器 | 胃不快感 | 嘔気、嘔吐、口渇、便秘、胃重感、胃痛、食欲不振、下痢 | |
| その他 | | 鼻閉、浮腫、嚔下障害、尿失禁、咽頭灼熱感、全身倦怠感 | 味覚異常、女性化乳房、持続勃起症 |

注)投与を中止すること。

■その他の使用上の注意等については、製品添付文書をご参照ください。

前立腺肥大症の排尿障害改善剤(α₁受容体遮断剤)

指定医薬品、要指示医薬品(注意 - 医師等の処方せん・指示により使用すること)

ハルナール[®] 0.1mg
0.2mg カプセル

塩酸タムスロシン製剤

薬価収載