ISSN 0368-5179
Keio igaku

第81巻第2号
平成16年
6月

慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

綜　　説
●機能応答性蛍光プローブの開発とバイオイメージングへの応用
　—システム生物学のためのバイオイメージング技術— ……岡　浩太郎 ……(79)
●腸疾患に対する内視鏡外科の進歩 ……渡邊　昌彦 ……(85)
●心臓血管外科最近の話題 —手術症例数と施設数，本邦での問題点— ……木曽　一誠 ……(93)
●てんかんの神経病理学 ……冨永　格 ……(99)
解　　説
●疾患病態・治療薬作用のモデルシステムの開発
　……北岡　裕子・鈴木　慎悟・山田　充彦・倉智　嘉久……(105)
講　　座
●近赤外分光法による非侵襲的脳酸素代謝モニタリング ……斎藤　良一・市来寄　潔……(109)
●無力妄想について ……濱田　秀伯……(117)
●外傷性脊髄損傷に対する神経幹細胞移植を用いた新規治療法の開発に向けて
　……小川祐人・中村雅也・戸山芳昭・岡野栄之……(125)
調 査 報 告
●医療訴訟の長期化　—その原因と改善への取り組み— ……長塚　行雄・島田　直樹……(135)
話　　題
●高齢女性における EBM に基づいた骨粗鬆症治療 ……岩本　潤……(141)
●内科的側面からみた老齢者の頻尿 ……中野間　隆……(141)
●男性更年期について ……矢内原　仁……(142)
●プロとアマチュア ……岸川　剛……(144)
●生殖医療と遺伝医療
　—東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンターの診療— ……田中　葉子……(145)
●人工膝関節の新しい波 ……横井　秋夫……(146)
●何故紫外線を防御しなければいけないのか？　—皮膚科医の立場から— ……松尾　聿朗……(146)
学 会 展 望
●第 27 回慶應外科フォーラム ……(149)
慶應医学会平成15年度庶務・会計報告……(161)
学 位 論 文
●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……(T39)
● ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* 遺伝子の子宮内膜癌における発現異常 ……鈴木　貴士……(T51)
●急性広範性肺動脈血栓塞栓症 52 剖検例の法医病理学的研究 ……呂　彩子……(T63)
●マウスバゾプレッシンV1a, V1b 受容体遺伝子のクローニングと解析 ……菊池信太郎……(T73)
●子宮体癌における DNA ミスマッチ修復遺伝子異常とマイクロサテライト不安定性の解析
　……阪埜　浩司……(T87)
●関節リウマチに見出される新しい自己抗体の対応抗原分析および臨床的・病因的意義の解明
　……野島　崇樹 …(T101)
号　　外
●博士（医学）学位論文—内容および審査要旨—（第172号） ……(別頁)

Vol 81　No 2
June　25,　2004

慶應醫學會

慶應医学・81(2)：79～84，2004

綜　説

機能応答性蛍光プローブの開発とバイオイメージングへの応用
－システム生物学のためのバイオイメージング技術－

慶應義塾大学理工学部生命情報学科
慶應義塾大学先端生命科学研究所
岡（おか）　浩太郎（こうたろう）

ABSTRACT
Bio-imaging techniques for systems biological approaches in single cells.

Kotaro Oka[1,2]
[1]Department of Biosciences and Informatics, Faculty of Science and Technology,
[2]Institute for Advanced Biosciences, Keio University

For understanding the cellular signal transduction from the viewpoint of Systems Biology, it is primary important to develop both the quantitative cell models and also methods for verification of the model. Visualization of the spatial and temporal changes for the intracellular signal trasduction may be one of the feasible approaches for such model verification. Recently, several sophisticated methods have been developed for visualizing intracellular substances including ions (K, Na, Mg, Ca, Zi and so on), gaseous molecules (oxygen and nitric monoxide), and second messengers (Ca, IP3, and cAMP) with optical recording techniques (conventional fluorescent microscopes with high-intensity CCD cameras and confocal laser scanning microscopes). To verify the model, perturbation of the intracellular signal trasduction and observation of the relaxation process is important. This kind of experiment is easy in the computer simulation but not in real cells. The promising methods are phtolysis of caged compounds that include the bioreactive substances and chromophore-assisted laser inactivation (CALI). I believe that the combination of the intracellular imaging and perturbation techniques will be an effective method to verify the simulation of a single cell model.

Key Words：systems biology, imaging techniques, fluorescent probes, signal transduction, perturbation technique

細胞内での生理機能の動態を追跡することは，定量的な細胞モデルを構築する上では必須である．このような方向を目指した実験技術として種々のバイオイメージング法が考案されてきた．本解説ではそのようなバイオイメージング方法のうち，特に細胞シミュレーションに代表されるようなシステム生物学に利用できる方法について説明を行う．

細胞シミュレーションのためのイメージング技術

細胞内での代謝プロセス，情報伝達を統合的に調べる方法として，単一細胞の全代謝過程を連立微分方程式で

第83回慶應医学会総会シンポジウム（平成15年11月14日開催）において講演

書き下し，それを数値積分して濃度を逐次求めてゆく手法が最近になって開発されはじめてきている[1]．特にそのような手法で有名なものに，慶應義塾大学先端生命科学研究所で行われているE-cellとよばれる研究がある[2]．この細胞シミュレータはCD-R等により研究者に配付されていることもあって，赤血球，癌，神経等の細胞での結果が蓄積されてきている．しかしながら，これらのシミュレーション結果を実験的に検証しようとするとなかなか難しいことに気がつく．というのも我々は細胞内の代謝過程動態を網羅的に調べる方法を持っていないからである．高々細胞内の複数イオン種を追跡することさえもなかなか容易ではない．最近になって複数の中間代謝物濃度を計測することが可能なメタボローム技術を細胞レベルの研究に適用する試みも行われるようになってきている[3]．

またモデルサイドから今後解決して行かなければならないこととして，細胞の空間的な広がりを考慮したモデルつくりが必要になるものと考えられる．これは集中定数系から連続分布系，つまり偏微分方程式で記載されるようなモデルへのシミュレーション技法の拡張が必要であるということである．このような空間的に広がりを持った細胞モデルは，特に神経細胞に代表されるような機能分化が顕著な細胞のシミュレーションを行う場合には本質的に重要である．細胞膜のイオンチャネルを神経細胞の種々の部位（細胞体，樹状突起，軸索，シナプス）に対応したコンパートメントに配置し，ホジキンとハックスレーにより定式された数式モデルにより再現しようとする試みは計算論的神経科学の一分野として盛んに行われてきている[4]が，E-Cellが取り扱うことができるような細胞内代謝過程の解析への拡張はいまだ手付かずの状態である．

本解説では，今後のシステム生物学のターゲットになって行くと思われる，空間的な広がりをもつ細胞のシミュレーションを行う際に，車の両輪のように必要になるであろう，細胞内代謝過程および情報伝達過程の可視化技術について，その現状と展望について述べる．特に本解説では，

(1) 細胞内情報伝達の機能応答性蛍光プローブによる可視化技術
(2) 新規な顕微鏡技術
(3) 観察系に擾乱を与える実験方法

に焦点を絞り，システム生物学を意識したバイオイメージング技術の紹介となるように配慮した．もちろんこれらの空間的な広がりを持つシミュレーション環境を構築・検討する際にも，ここで述べるような可視化技術は重要であると考えられる．

細胞情報伝達の可視化技術

細胞内情報伝達を「いつ，どこで，どのように」という観点から明らかにする方法として種々のプローブを用いたイメージング手法がある[5]（第1図）．図中の(1)に

第1図　システム生物学のためのバイオイメージング技術の概要

ついて，まずここで取り上げたい．特定のイオン種について可視化する方法を例に取ると，例えばCa, Mg, K, Na, Cl, Znなど枚挙にいとまがない．これらの新規な蛍光プローブ関する最新の情報はMolecular probes社のホームページから入手することができる[6]．またCaイオン以外の細胞内セカンドメッセンジャーの可視化方法としては，蛍光エネルギー共鳴法（FRET）を利用する試みが行われてきている（第1図(3)，後述）．

これらの機能応答性蛍光プローブの開発には大きく2つの潮流がある．まず従来より広く行われてきているのは，特定物質に選択的に結合する比較的低分子の有機物を合成し，これを適当な色素団と結合させ，細胞内に注入することによって選択性の高いプローブとしようというものである．このような研究方法はCaイオンプローブの開発以来脈々と続けられている．同様な研究アプローチによる最近の研究として，私たちと慶應義塾大学応用化学科鈴木孝治教授の研究グループとで共同開発している細胞内Mg計測のための蛍光プローブ[7]が，その例として挙げられる．

従来，細胞内Mgイオン計測プローブとしては種々のものが開発されてきており，Molecular Probes社のホームページを調べてもMg Indo-1, Mg Greenなどいくつかの蛍光色素を見つけることができる．しかしながらこれらの蛍光プローブはMg以外にCaに関しても高い親和性を持つため，細胞へ適用した際に，実際Mgを計測しているのかCaが検出されているのかわからない．そこで我々は従来の分子骨格とは全く異なるクマリンに着目し，新規Mgプローブの開発を行い，これまでにKMG-20, KMG-104を分光学的，生物学的な検索により選びだし，細胞内Mgイメージングを行ってきた．特に最近になって開発したKMG-104はMgイオンに対する結合定数が約2 mMとほぼ細胞質中の遊離Mg濃度と一致しており，またKMG-20では難しかった488 nmでの励起が可能であるため，共焦点レーザ顕微鏡による細胞内Mg濃度の3次元再構成も可能である．これらの新規Mgプローブとfura2などのCaプローブを併用することにより，細胞内MgとCaの同時イメージングを現在進めている．またこれら一連の研究から，従来明らかにされていなかった細胞内Mgの動員メカニズムに関しても，新規な知見を得ることができた[8]．

以上述べたような低分子有機物プローブに対し，緑色蛍光タンパク質（GFP）に代表されるような蛍光タンパク質を改変することにより細胞内セカンドメッセンジャーを捕らえる研究が最近になって爆発的に進んできている．これらの研究の初期には，特に細胞内カルシウム濃度計測が注目され，最近でもG-CAMPとよばれる細胞内カルシウム濃度感受性を持つGFPを細胞内に発現させると，連続的に細胞内カルシウム濃度の計測が可能となることが報告されている[9]．またGFPを利用した細胞内情報伝達イメージングでは，細胞内でのタンパク質分子の会合と解離を利用することにより，細胞内情報伝達を可視化する試みが広く行われてきている（第1図(3)）．また特定タンパク質のサブユニット等の解離状態を，FRETを適用することにより可視化した例として，環状アデノシン一リン酸[10]およびイノシトール三リン酸[11]の細胞内濃度変化を調べた例がある．

これらの蛍光プローブを用いた技術は次の3で述べるような新規な顕微鏡技術と相性が良いために，広く用いられるようになってきているものの，未だオーダーメードで個々の情報伝達物質に関してのプローブを開発しているのが現状である．そのため今後はプローブ開発の高速化を図る必要がある．また計算機シミュレーションを行う際には，単に濃度が上がった，下がったというよりはより定量的な変化を議論する必要がある．蛍光プローブの蛍光量から，着目している物質の絶対濃度に換算するためのキャリブレーション方法についても，できれば*in vivo*で行える方法を開発する必要があろう．

新規な顕微鏡技術の開発

細胞内での情報伝達過程の追跡が簡便に行えるような環境が整ってきた一因として，蛍光像の顕微鏡観察をあげることができる．このような技術としては，微量の蛍光変化を計測することが可能なカメラの開発によるところが少なくない[12]．インテンシファイヤによる増幅により，暗い蛍光像を増感して明るいイメージを取得することが可能となってきている．またここ10年間を見てみると，共焦点レーザ顕微鏡による蛍光測定が飛躍的に進展したことも注目される[13]．共焦点レーザ顕微鏡は光学断層像を取得するための装置として用いられてきた．同様に488 nm, 514 nmで励起できる蛍光色素を用いた細胞内情報伝達過程のイメージングも容易にできることもあって，それまであまりイメージングに関係しなかった領域の研究者にも浸透していったものと思われる．特に種々のカルシウムインディケータと共焦点レーザ顕微鏡を併用した研究は非常に多くなった．

この10年間の間に，新規に研究者が利用できるようになった顕微鏡技術のうち，特にシステム生物学の観点から今後利用が可能であるような実験技術について以下

第2図　多重蛍光観察とデータの解析方法

に列挙してみる．

1.　マルチカラー顕微鏡

これは通常の蛍光顕微鏡がフィルターを利用しているのに対して，励起にモノクロメータを利用することにより，レーザ励起の顕微鏡より任意の波長での励起が可能となる顕微鏡装置である．最近ではマルチラインのレーザ光源を利用できる共焦点レーザ顕微鏡などもこの装置の延長上にあるものと思われる．また蛍光をプリズムまたはフィルターにより選別して画像取得するような共焦点レーザ顕微鏡も多く開発されてきており，励起と蛍光観察を任意の波長で行うことが可能になってきている．特に複数の蛍光像をほぼ同時に取得することができるようなものとして，蛍光像を波長分割し，CCDカメラ上に2つまたは4つのイメージをつくる装置が市販されてきている．また共焦点レーザ顕微鏡でも複数のフォトマルを用いて（最高8つ程度）イメージを取得する装置が市販されている．複数の蛍光を同時に取得する装置は，細胞内情報伝達過程を複数・同時追跡するようなシステム生物学研究には必須と考えられる．これらの顕微鏡分光装置を組み合わせた研究を行うにあたり，複数の蛍光画像から，求めたい細胞の情報（例えば特定物質の濃度など）を定量するためのプログラムを開発する必要がある．多変量解析的な考え方を導入し，個々の蛍光プローブの信号強度を推定する方法[14]なども考えられる．またニューラルネットワークを利用してシグナルを分けることも可能であろう（第2図）．

2.　全反射顕微鏡

この顕微鏡は，励起光をスライドガラス上で全反射させた時にスライドガラス表面に滲み出す厚さ　100 nm

第3図　エバネッセント場を用いた近接場照明法の概略

程度のエバネッセント場を利用することにより，そこに存在する蛍光分子を選択的に励起するものである[15]（第3図）．この顕微鏡を用いることにより，ガラス面近傍の細胞膜直下での情報伝達過程を調べることができる．またこの顕微鏡観察方法と通常の落射蛍光観察と併用することにより，近傍のみならず細胞全体でのイメージングを行うことが可能である．この方法は特に *in vitro* における1分子イメージングに多く用いられてきたが，最近ではシナプス小胞のシナプス前膜への融合過程の観察や，細胞接着因子の観察に広く用いられるようになってきている．

3. 多光子励起顕微鏡

通常の共焦点レーザ顕微鏡とは異なり，700～900 nm 近辺の近赤外光の強いレーザを利用して，焦点に存在する色素を多光子励起することにより光学断層像を取得することを可能とした顕微鏡である．近赤外光を利用することにより，通常の共焦点レーザ顕微鏡では観察が難しい深い組織の蛍光像を得ることができ，また取得される像の S/N がよいなどの長所を持つ．この顕微鏡を利用した研究としては，ラット錐体細胞にカルシウムインディケータを注入し，ヒゲに刺激を加えた際に錐体細胞のどの部位で細胞内カルシウム応答が生じるのかを調べた研究がある[16]．通常の共焦点レーザ顕微鏡では脳表から深部に伸びている錐体細胞のシグナル伝達を可視化するのは難しいため，多光子励起顕微鏡の特長をもっとも生かした研究である．またこの顕微鏡は焦点面の蛍光色素を選択励起することができるために，焦点面外での色素褪色が少なく，また光ダメージが少ないなど，長時間同一の細胞を観察するような場合にも有利である．その他に多光子観察する際に興味深い現象として，励起波長のブルーシフトという現象が知られている．これは同じ蛍光色素であっても1光子励起の場合と比較して多光子励起では励起スペクトルがブロードになる現象である．これを利用すると，1光子励起では同時に励起することができない蛍光色素の組み合わせでも，多光子励起では励起できることがあり，マルチカラーイメージングに利用できる．これらの詳細に関しては他の解説を参照されたい[17]．

観察系に擾乱を与える実験方法

これまで述べた種々の観察方法と併用するような方法として，単に細胞内での情報伝達過程を追跡するだけではなく，種々の擾乱を細胞に加えた際の応答を解析しようという試みがなされてきている．例えば細胞内にケイジド化合物とよばれる，保護基により修飾した生理活性物質（保護基により不活性化している）を導入し，適当なタイミングでこの保護基を取り除くことにより，一過的に細胞内に生理活性物質を生成する方法がある[18]（第1図(2)を参照）．このような実験には通常スポット状に絞った紫外線レーザが用いられる．ケイジド化合物としては IP_3, Ca, NO，グルタミン酸など種々の細胞内信号伝達に関わる物質が合成され，市販されている．

また，例えばタンパク質の生理活性部位以外を認識する抗体を作成し，この抗体を，マラカイトグリーンに代表されるような色素でラベルし，細胞内に注入しておく．この色素に適当なタイミングでレーザ光照射を行うと，ラジカルが発生し，この抗体に結合したタンパク質を選択的に不活性化することができる[19]（Chromophore-Assisted Laser Inactivation, CALI 法と呼ばれる，第4図）．この方法に関しても新しい手法が開発されてきており，特に効率的にタンパク質を不活化するための色素の開発，および GFP を chromophore として利用できるかどうかの検討が始められている．

ここで述べたような生理活性物質を細胞内で生成または消去する技術は，計算機シミュレーションとの相性がよく，シミュレーションにおいてある時点で特定物質の濃度を0にする場合，また生理活性物質濃度を一過的に変化させることに対応した実験技術と考えられる．ま

第4図　レーザ分子不活性化法の概要

た空間的に広がりを持つ分布定数系における拡散定数の計測（例えば細胞内での実効的なカルシウムイオンの拡散定数を計測するために，ケイジドカルシウムの光解除により細胞内で一過的にカルシウムイオン濃度を上昇させ，その時の細胞内カルシウム濃度変化を計測するなど）にも利用できる．

まとめ

本解説では分布定数系を意識した細胞の計算機シミュレーションと相補的な関係を持つウェットバイオロジーの実験方法としてバイオイメージング技術を位置付け，簡単に説明した．メタボローム解析に代表されるような，大規模かつ網羅的な中間代謝物の計測技術と本解説で説明したバイオイメージングとは，細胞内で引き起こされる代謝過程，情報伝達過程を調べる上では補完的な関係にある．つまり時間を止めて総てのパラメータを計測する方法といくつかのパラメータに限られるが経時的な変化を追跡する方法という意味である．また空間的な広がりを犠牲にしても，細胞内の代謝過程を複数の物質について追跡したいといのであれば，複数の培養細胞に異なる蛍光プローブを加え，チューニングしたマイクロプレートリーダと組み合わせることにより，イメージングサイドからメタボローム技術の方へ歩み寄ることも可能と思われる．いずれにせよメタボローム技術とイメージング技術の組み合わせが計算機シミュレーションの詳細化とシミュレーションで得られた結果の検証に用いられていくことがシステムバイオロジーの展開を考える上でますます重要になるものと思われる（第2図）．

謝　辞

本研究は文部科学省科学技術振興調整費「システム生物学者育成プログラム」，21世紀COE「システム生物学による生命現象の理解と制御」，学術フロンティア「分子・超分子・超構造体理工学」より一部援助を受けた．

文　献

1) Bhalla US, Iyengar R：Emergent properties of networks of biological signaling pathways. Science 283：381-387, 1999
2) 中山洋一，冨田勝：細胞全体のコンピュータシミュレーションに向けて．ゲノム情報生物学（高木利久，冨田勝編集）．中山書店，p. 189-205, 2000
3) Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, NaraokaH, Tomita M, Nishioka T：Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. J Proteome Res 2：488-494, 2003
4) Koch C, Segev I：Methods in Neuronal Modeling from Ions to Networks (2nd ed). MIT press, 1998
5) 岡浩太郎，小川宏人：光学測定による細胞機能の可視化．細胞機能をリアルタイムに調べる方法．画像ラボ，10：5-9, 1999
6) http://probes.com
7) Suzuki Y, Komatsu H, Ikeda T, Saito N, Araki S, Citterio D, Hisamoto D, Kitamura Y, Kubota T, Nakagawa J, Oka K, Szuki K：Design and synthesis of Mg^{2+}-selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg^{2+} measurement in a living cell. Anal Chem 74：1423-1428, 2002
8) Kubota T, Tokuno K, Nakagawa J, Kitamura Y, Ogawa H, Suzuki Y, Suzuki K, Oka K：Na^{+}/Mg^{2+} transporter acts as a Mg^{2+} buffering mechanism in PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun 303：332-336, 2003
9) Nakai J, Ohkura M, Imoto K：A high signal-to-noise ratio Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. Nat Biotechnol 19：137-141, 2001
10) Adams SR, Harootunian AT, Buechler YJ, Yalor SS, Tsien RY：Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. Nature 349：694-697, 1991
11) Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, Takeshima H, Iino M：Spatiotemporal dynamics of inositol 1, 4, 5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns. Science 284：1527-1530, 1999
12) 浜松ホトニクス社ホームページ　http://hamamatsu/com
13) Pawley JB：Handbook of Biological Confocal Microscopy (2nd ed). (Ed) Pawley JB, Plenum, 1995
14) Eckschlager K, Danzer K：分析化学と情報理論（長塚義隆，相島鐵郎共訳，二瓶好正監訳）．培風館，2003
15) 辰巳仁史：光近接場顕微鏡．生命科学を拓く新しい光技術（船津高志編集）共立出版，p. 93-106, 1999
16) Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW：*In vivo* dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. Nature 385：161-165, 1997
17) 河西春郎，根本知己，松崎政紀，早川泰之：2光子励起法による神経機能研究．生物物理，42：91-94, 2002
18) Ellis-Davies GCR：Basics of photoactivation. Imaging Neurons a Laboratory Manual. (Ed) Yuste R, Lanni F, Konnerth A, CSHL Press, New York, 24.1, 2000
19) 竹居光太郎，御子柴克彦：神経成長円錐における機能分子の解析．CALI法による局所的分子ターゲッティング．実験医学，17：2105-2113, 1999

慶應医学・81(2)：85～91，2004

綜　説

腸疾患に対する内視鏡外科の進歩

北里大学医学部外科
渡邊昌彦（わたなべ まさひこ）

Key Words：腹腔鏡下大腸切除，内視鏡外科，大腸癌，炎症性腸疾患，低侵襲手術

はじめに

胆嚢摘出術に端を発した内視鏡外科は，その低侵襲性故に急速に普及した[1]．その間種々の消化器疾患に試みられるようになったが，中でも腸疾患への普及は著しく現在は胆嚢摘出術に次いで行われている．内視鏡外科の最大の利点は小さな術創に代表される低侵襲性である．消化器疾患の手術では小さな術創は創痛の軽減と整容性の向上，早期離床，腸蠕動の早い回復による経口摂取の早期開始を可能にし，その結果として早期社会復帰がもたらされる．さらに内視鏡の拡大視効果は精緻なリンパ節郭清や神経温存に有利であり，腸蠕動の早期回復は癒着性イレウスの発生を低下させる．しかし，以下の様々な欠点も指摘されている．内視鏡外科では視野が狭小で全体像が把握しにくく，適切な視野展開が困難なこともある．また触感がないので血管の露出や臓器の剥離に高度な技術を要する．とくに炎症性の広範かつ強度な癒着や，癌の周囲臓器への浸潤に対する剥離は開腹手術に比し劣っている．また腹腔内では鉗子操作の自由度が低く縫合や結紮操作は困難であるし，内視鏡の解像度は増してはいるが二次元視野のままである．現在，このような内視鏡外科の困難性を克服しようと，自動吻合器や縫合器，止血器具の改良，新しい鉗子さらにロボットに至るまで様々な科学技術が導入されつつある．

第1図に示すように内視鏡外科学会の全国調査でも胆石症に次いで，腸疾患に内視鏡外科が多く行われている．腸疾患に対する内視鏡外科の普及は，大腸の解剖学的特殊性に促されたといえよう．すなわち大腸は血管系が単純で内視鏡下でも腹腔内で処理しやすい．また上行結腸と下行結腸は後腹膜に固定されているだけなので，剥離・授動さえすれば弾力性に富む大腸は小さな創から体外に露出できる．われわれは1992年早期癌に内視鏡外科を本邦で初めて導入して以来，進行癌や炎症性腸疾患へと段階的に適応を拡大していった．本稿では腸疾患に対する内視鏡外科の現状と展望について述べる．

癌に対する内視鏡外科

腹腔鏡下腸切除はJacobs M[2]によって右結腸切除，Fowler D[3]がS状結腸切除を報告したのが最初である．その後，腹腔鏡下腸切除は欧米ではport site recurrence（PSR）が報告されるまで積極的に進行癌に対しても試みられた[4~7]．本邦では消化器悪性疾患の中で，最も早く内視鏡外科が普及したのは早期大腸癌に対する腸切除である[8]．このように本邦では早期癌に適応を限定することで手技の向上を図るといった，欧米とは異なる特有の進歩を遂げてきた[9]．

癌治療においては内視鏡下外科の特殊性に起因する様々な問題点が存在する．第1に術中の正確な病期診断の困難性が挙げられる．すなわち触診など腹腔内の十分な検索が出来ないため，術野から離れた部位にある小さな結節やリンパ節転移，術前の画像で描出できなかった肝転移，少量の腹水などを見逃す可能性が危惧される．この問題は正確なCTや超音波診断によって，ある程度克服されるものではあるが，今後は腹腔鏡下手術における術前診断や手術診断の精度を，病理診断の結果と比較検討しなければならない．第2に炭酸ガス気腹の癌細胞の生物学的悪性度に与える影響が問題視されている．実験的に炭酸ガスが肝転移を助長するといった報告もあるが，一方で気腹の影響を受けないといった報告もみられる．さらに炭酸ガスの細胞接着に対する影響も指摘され

平成15年度北島賞受賞者

第1図　腹部外科領域の疾患別症例数の推移

ている．しかしながら，これまでの再発例の検討では，明らかに肝転移再発率が内視鏡外科で高いといった報告はみられない．第3にリンパ節郭清度の低下が危惧された．しかし，従来の開腹手術と同等の郭清を行う技術を修得すれば，この問題は解決されよう．実際，何れの報告も開腹と比較して郭清リンパ節個数に差がみられなかった．第4に最も問題視されたのはPSRに代表される創部再発であろう[10,11]．しかし創部再発そのものは決して内視鏡下外科に特有なものではなく，開腹手術でもある一定の確率（0.6～7.6%）で発生する[12~14]．PSRは1993～4年に相次いで報告されたが，その後多数例を行っている施設では殆んど認められず，現在ではその発生率は1%以下と推定されている（第1表）[15~19]．動物実験や臨床経験の報告から，創部再発は気腹された密閉空間において機械的に散布された癌細胞がport siteなどの創部に接着し増殖したと考えられている．したがって内視鏡外科においては手術器具による不用意な癌腫への接触や，癌腫の手荒な操作，腸管穿孔は常に創部再発をきたす可能性が開腹手術より高いことを知っておくべきである．また再発の予防には創の保護や洗浄も必須であり，癌の手術の基本を忠実に守ることが求められる．

大腸癌に対して内視鏡外科が安全かつ低侵襲かどうかを，従来の開腹手術と比較検討した文献から検証した．まず術後合併症と術死の確率に関しては，第2表に示すように何れの報告も有意な差は認められなかった[20~22]．しかし，直腸前方切除においては9.4%の縫合不全があり高い傾向を認めた．これは直腸壁露出の技術的困難性と自動縫合器の操作性に起因するものと考えられる[23]．一方，内視鏡外科の術後腸閉塞は3.6%と低率で開腹手術を要した症例もなく，開腹術に比し腸閉塞の発生率は低い．

内視鏡外科の創痛と運動制限の軽減を数字で表すのは困難である．通常，鎮痛剤の使用量によって差は認められているが客観的評価とはなりにくい．唯一Stageらは無作為臨床試験（Randomized Clinical Trial：RCT）でpain scoreを用い客観的に内視鏡外科の創痛の軽減

第1表　Wound Implant Recurrence after LAP for Colon Cancer

Author, year	No./total	%	Dukes stage	nterval (months)	Location
Lumley, 1996	1/103	0.9	D	NS	Port site
Franklin, 1996	0/191	0	–	–	–
Fielding, 1997	2/149	1.3	C, D	NS	Port site
Leung, 1999	1/179	0.5	D	NS	Port site
Watanabe, 2003	0/130	0	–	–	–

第2表　LAP vs. OPEN: Morbidity and Morality Rates

	LAP			OPEN		
Author, year	No. of patients	Morbidity (%)	Mortality (%)	No. of patients	Morbidity (%)	Mortality (%)
Lumley, 1996	221	7.2	1.6	280	7.9	–
Franklin, 1996	191	17.0	0.4	224	23.8	0.0
Bouvet, 1998	53	24.0	1.0	57	21.0	0.0
Leung, 1999	201	13.8	1.7	–	–	–
Lacy, 2002	111	10.8	0.9	108	28.9	2.8
Hasegawa, 2003	24	8.0	0	26	38.0	0.0

第3表　Comparison in Time to Return of Bowel Function (days) Between LAP vs. OPEN

Author, year	No. of patients (LAP/OPEN)	LAP	OPEN	Indicators
Milsom, 1998	54/53	3	4	Flatus
Khalili, 1998	80/90	3.9	4.9	Oral intake
Lacy, 2002	111/108	2.3	4.0	Oral intake
Hasegawa, 2003	24/26	1.6	3.2	Oral intake

第4表　Analysis of Length of Hospital Stay (LOS) and Costs for LAP vs. OPEN

		Length of stay (day)		Costs (in US dollars)	
Author, year	No. of patients (LAP/OPEN)	LAP	OPEN	LAP	OPEN
Franklin, 1996	191/224	5.7	9.7	–	–
Psaila, 1998	25/20	10.7	17.8	2900	3300
Milsom, 1998	55/54	6	7	–	–
Khalili, 1998	80/90	7.7	8.2	14,800	14,200
Bouvet, 1998	91/57	6	7	12,000	11,000
Lacy, 2002	111/108	5.2	7.9	–	–
Hasegawa, 2003	24/26	7.1	12.7	–	–

第5表　RCT investigating lap vs. open for colon cancer

Country	Name of study	Start date	Number	Status
USA	NIH trial	1994	1200	Closed
Great Britain	CLASSIC	1996	1000	Closed
Australia		1998	1200	On going
Germany	LAPKON	1998	1200	On going
Spain		1993	250	Completed
Netherlands	COLOR	1997	1200	On going

を証明した．ただし外科医の感覚的な評価，すなわち内視鏡外科では術後患者の立ち上がりの良さは，胆嚢摘出術で経験したものに近い．また癌の手術を受ける患者にとって整容性はさしたる問題ではないが，小創に対する術前患者の精神的な安堵感は決して外科医は無視できない．

内視鏡外科における腸蠕動の早期回復は経口摂取の早期開始をもたらす．第3表に示すように，何れの報告も経口摂取の開始は開腹手術より早かった．しかし，開腹手術でも流動食ならば症例によっては第一病日より可能であり，固形食も平均第4病日は比較的遅いため明らかな差とは言いがたい面もある．今後は腸蠕動を客観的に評価する方法を用いた多数例の検討が必要であろう．内視鏡外科の長期経過から腸閉塞発生率が低下したならば，その結果は腸蠕動の早期回復がもたらしたと考えられよう．さらに早期経口摂取は早期退院から社会復帰に繋がる．第4表に示すように，内視鏡外科のほうが開腹手術より在院日数は短縮される傾向にある．当院のクリニカルパスでも内視鏡外科の術後在院日数は6日に設定している．米国のように入院費の負担が重いと，在院日数の数日の短縮は大いに歓迎されるが本邦では現在のところ大きな問題ではない[24,25]．しかし本邦でも将来的に定額医療制度導入の有無に関わらず，医療費の抑制の意味で在院日数短縮は重要性を増すに違いない．

外科手術の低侵襲性を客観的に証明するため，前述の主観的な評価の他に術後のCRP，IL-6などのストレスマーカーや免疫能の変動を指標にした報告も少なくない[26~28]．ただし現在のところ，何れの報告も一定の傾向は認められてはいない．このように大腸癌に対する内視鏡外科の安全性は認められてはいるものの，開腹手術に比較して低侵襲性については主観的な優位性のみ証明されつつあるのが現状である．

癌治療の上で最も重要な長期予後については，現在第5表に示すように内視鏡外科と開腹手術を比較する大規模なRCTが行われている．既に米国と英国のRCTは症例集積が終了し，スペインの単一施設のRCTは2002年に長期予後が報告された．また患者背景を揃えたいわゆるmached case control studyの報告は少なくない．それらの報告から，現在のところ内視鏡外科は開腹手術と同等の長期予後を示し，また再発形式も内視鏡外科と開腹手術に相違はない[29,30]．Lacyらはstage IIIにおいて内視鏡外科（75%）の方が開腹手術（50%）より全生存率が有意に良好であることを報告している[21]．ただし開腹手術の5年生存率が本邦の大腸癌研究会のデータ（74%）に比して明らかに悪く，この結果は本邦の外科医には受け入れがたいものである．またstage IIIにおいては補助化学療法が一般的に行われており，それらを勘案した綿密かつ周到なデザインが要求される．本邦では当初，早期癌に対して内視鏡外科が導入されstage Iのうちsm癌については世界で最も多くの症例が集積されている．一方，Stage Iは化学療法のバイアスが入らないため正確な数字が得られる．厚生労働省北野班の結果やわれわれ単一施設の結果から，Stage Iにおいて内視鏡外科は予後低下を招いていないことは明白である[19]．しかし，stage IIIについてはRCTの結果を待たざるを得ない[31,32]．

炎症性腸疾患に対する内視鏡外科

癌に対する内視鏡外科は前述したように，再発形式や予後に関して解決されるべき種々の問題が残されている．一方，良性疾患において手術侵襲は低いほど良い．またクローン病や潰瘍性大腸炎の患者さんは若年者の割合が高く，早期社会復帰や整容性の向上が求められる．したがって炎症性腸疾患は内視鏡外科の良い適応と考えられた．

クローン病は全消化管を侵す原因不明の炎症性疾患であり，内科的治療が原則として行われる．しかし，高度の狭窄，瘻孔，出血，穿孔，中毒性巨大結腸症などの合併症をきたした際は手術適応となる．われわれは狭窄に対して内視鏡外科を導入し，さらに瘻孔症例に対しても積極的に本法を行ってきた[33,34]．最も多い回腸終末部の狭窄に対しては，通常臍上部にトロッカーを導入し回盲部を剥離・授動し正中創から露出して切除・吻合する．瘻孔は自動縫合器などを用い腹腔内で切離するが，小腸間の瘻孔は体外で処理する．

クローン病50例に対して内視鏡外科を施行したが，術死はなく合併症も低率であった．また，経口摂取開始第1病日，入院期間7日と本法の低侵襲性は保たれていた．クローン病の特徴は高い再発率と再手術率であるが，内視鏡外科は術後癒着が軽度で再手術に有利である．われわれの経験から開腹既往のあるクローン病患者に対しても，種々の内視鏡外科が十分安全に施行可能であった．

欧米でも一部の施設で内視鏡外科がクローン病に対して積極的に行われている．回盲部切除に限って開腹術と比較し，内視鏡外科のほうが低侵襲であることが明らかになりつつある[35~37]．とくに術後の入院期間においては，開腹とのRCTにおいても証明されている[38,39]．

以上より，内視鏡外科はクローン病に対する外科治療

の第一選択となり得ると考えられた．

内科的治療抵抗性の難治例，狭窄や癌化をともなう潰瘍性大腸炎には通常大腸全摘術が行われる．大腸は血管系が単純で腹腔内で処理しやすい．したがって血管処理と剥離・授動さえ行えれば，弾力性に富んでいるため小さな創から容易に露出できる．開腹の大腸全摘術では創は広域正中切開を要するが，内視鏡外科では下腹部に3～4 cm 足らずの創で完遂できる[40,41]．また骨盤内操作には内視鏡の拡大視効果が威力を発揮し，精緻な神経温存手術を可能にする．トロッカーを臍上部のほかに4～5 本穿刺し，まず網嚢を開放して中結腸動静脈右枝を処理する．次に回結腸動静脈を処理して上行結腸を後腹膜から剥離・授動する．さらに脾彎曲部を授動し下行結腸を剥離・授動した後，中結腸動静脈左枝と下腸間膜動静脈を処理する．骨盤内操作に移り直腸を剥離し肛門管で切離し，その断端を把持して創外に大腸を引き出して切除する．最後にＪ嚢を作成し器械吻合で回腸－肛門管吻合を行い，回腸人工肛門を作成する．

本法では原則として翌日より経口摂取，歩行可能で約1週間の入院の後退院して社会復帰して，約3ヵ月後に再入院して人工肛門の閉鎖を行う．現在では中毒性巨大結腸症などの緊急手術以外は，慶大外科では潰瘍性大腸炎には内視鏡外科が行われるようになった．

大腸憩室症やメッケル憩室の繰り返す炎症やそれに伴う狭窄，出血や穿孔は手術適応となる．それらにも近年積極的に内視鏡外科が導入されるようになった．本邦でも大腸憩室症が増加しており，外科的治療を要するものも年々増えてきた．したがって内視鏡外科の件数も増加の一途を辿っている．しかし繰り返す炎症で強度の癒着が存在する症例では，内視鏡外科を行ううえで早期癌の手術よりも難易度が高いこともある．解剖学的に正しい剥離層の理解が，炎症ではより重要である．

腹部外科領域で代表的な疾患といえば，腸閉塞と虫垂炎であろう．腸閉塞の原因は術後の癒着が一般的であるが，それらに対する癒着剥離にも内視鏡外科は有用である．内視鏡外科は腸管を蠕動させた状態で手術操作を行うので，癒着剥離術を行っても再び癒着する可能性が低い．したがって腸閉塞の癒着剥離には最適な手術といえる．急性虫垂炎においても，内視鏡外科は良視野で確実な診断と手術操作が行える．急性虫垂炎の術前の確定診断が困難なことも少なくないため，診断的治療の意味でも内視鏡外科は有用である．また創感染の確率も低く創痛が軽度なため術翌日に退院も可能である．ただし全身麻酔が必要なことから，現状では本法が行える施設は限られている．

おわりに

内視鏡外科は科学技術の進歩にあいまって，低侵襲性をキーワードに開花した新しい概念の術式である．本術式を行う上で良性疾患と異なり，癌治療においては低侵襲性のみならず根治性との両立が求められる．その意味で進行大腸癌に対する本術式の是非は，大規模な臨床試験の結果を待たなければならない．また開腹手術では想像できなかった術中副損傷や術後合併症もあり，本術式の普及には新たな教育システムの構築が求められている．低侵襲手術は患者にとって福音であるが，その安全な普及には標準的な手技の確立と正しい適応決定が急務であろう．

文　献

1) Cuschieri A, Berci G, McSherry CK：Laparoscopic cholecystectomy. Am J Surg 159：273, 1990
2) Jacobs M, Verdeja JC, Goldstein HS：Minimally invasive colon resection (laparoscopic colectomy). Surg Laparosc Endosc 1：144-150, 1991
3) Fowler DL, White SA：Laparoscopy-assisted sigmoid resection. Surg Laparosc Endosc 1：183-8, 1991
4) Nelson H, Tisminezky B：Laparoscopy in colorectal cancer management. Colorectal Cancer. (Ed) Saltz LB, Humana Press, New Jersey, 2002, p291-324
5) Hoop AG：Laparoscopic surgery for colorectal carcinoma：an overnight victory? European Journal of Cancer 38：899-903, 2002
6) Chapman AE, Levitt MD, Hewett P, Woods R, Sheiner H, Maddern GJ：Laparoscopic-assisted resection of colorectal malignancies：a systematic review. Ann Surg 234：590-606, 2001
7) Ota DM：What's new in general surgery：surgical oncology. J Am Coll Surg 196：926-932, 2003
8) 渡邊昌彦，大上正裕，寺本龍生ほか：早期大腸癌に対する低侵襲手術の適応．日消外会誌，26：2548-2551, 1993
9) 内視鏡外科手術に関するアンケート調査－第6回集計結果報告－．日内視鏡外会誌 7(5)：504-509, 2002
10) Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D；National Cancer Institute Expert Panel：Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. J Natl Cancer Inst 93：583-596, 2001
11) Dorudi S, Steele RJ, McArdle CS：Surgery for colorectal cancer. Br Med Bull 64：101-118, 2002
12) Welch JP, Donaldson GA：The clinical correlation of an autopsy study of recurrent colorectal cancer. Ann Surg 189：496-502, 1979

13) Hughes ES, McDermott FT, Polglase AL, Johnson WR : Tumor recurrence in the abdominal wall scar tissue after large-bowel cancer surgery. Dis Colon Rectum 26 : 571-572, 1983
14) Reilly WT, Nelson H, Schroeder G, Wieand HS, Bolton J, O'Connell MJ : Wound recurrence following conventional treatment of colorectal cancer. A rare but perhaps underestimated problem. Dis Colon Rectum 39 : 200-207, 1996
15) umley JW, Fielding GA, Rhodes M, Nathanson LK, Siu S, Stitz RW : Laparoscopic-assisted colorectal surgery. Lessons learned from 240 consecutive patients. Dis Colon Rectum 39 : 155-159, 1996
16) Franklin ME Jr, Rosenthal D, Abrego-Medina D, Dorman JP, Glass JL, Norem R, Diaz A : Prospective comparison of open vs. laparoscopic colon surgery for carcinoma. Five-year results. Dis Colon Rectum 39 : S35-S46, 1996
17) Fielding GA, Lumley J, Nathanson L, Hewitt P, Rhodes M, Stitz R : Laparoscopic colectomy. Surg Endosc 11 : 745-749, 1997
18) Leung KL, Meng WC, Lee JF, Thung KH, Lai PB, Lau WY : Laparoscopic-assisted resection of right-sided colonic carcinoma : a case-control study. J Surg Oncol 71 : 97-100, 1999
19) Watanabe M, Hasegawa H, Yamamoto S, Baba H, Kitajima M : Laparoscopic surgery for stage I colorectal cancer. Surg Endosc 17 : 1274-1277, 2003
20) Bouvet M, Mansfield PF, Skibber JM, Curley SA, Ellis LM, Giacco GG, Madary AR, Ota DM, Feig BW : Clinical, pathologic, and economic parameters of laparoscopic colon resection for cancer. Am J Surg 176 : 554-558, 1998
21) Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Delgado S, Castells A, Taura P, Pique JM, Visa J : Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer : a randomised trial. Lancet 359 : 2224-2229, 2002
22) Hasegawa H, Kabeshima Y, Watanabe M, Yamamoto S, Kitajima M : Randomized controlled trial of laparoscopic versus open colectomy for advanced colorectal cancer. Surg Endosc 17 : 636-640, 2003
23) Yamamoto S, Watanabe M, Hasegawa H, Kitajima M : Prospective evaluation of laparoscopic surgery for rectosigmoidal and rectal carcinoma. Dis Colon Rectum 45 : 1648-1654, 2002
24) Milsom JW, Kim SH : Laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer. World J Surg 21 : 702-705, 1997
25) Khalili TM, Fleshner PR, Hiatt JR, Sokol TP, Manookian C, Tsushima G, Phillips EH : Colorectal cancer : comparison of laparoscopic with open approaches. Dis Colon Rectum 41 : 832-838, 1998
26) Bessler M, Whelan RL, Halverson A, Treat MR, Nowygrod R : Is immune function better preserved after laparoscopic versus open colon resection? Surg Endosc 8 : 881-883, 1994
27) Bouvy ND, Marquet RL, Jeekel J, Bonjer HJ : Laparoscopic surgery is associated with less tumour growth stimulation than conventional surgery : an experimental study. Br J Surg 84 : 358-361, 1997
28) Hewitt PM, Ip SM, Kwok SP, Somers SS, Li K, Leung KL, Lau WY, Li AK : Laparoscopic-assisted vs. open surgery for colorectal cancer : comparative study of immune effects. Dis Colon Rectum 41 : 901-909, 1998
29) Lujan HJ, Plasencia G, Jacobs M, Viamonte M 3rd, Hartmann RF : Long-term survival after laparoscopic colon resection for cancer : complete five-year follow-up. Dis Colon Rectum 45 : 491-501, 2002
30) Yamamoto S, Watanabe M, Hasegawa H, Kitajima M : Oncologic outcome of laparoscopic versus open surgery for advanced colorectal cancer. Hepatogastroenterology 48 : 1248-1251, 2001
31) Hazebroek EJ ; Color Study Group : COLOR : a randomized clinical trial comparing laparoscopic and open resection for colon cancer. Surg Endosc 16 : 949-953, 2002
32) Steinert R, Lippert H, Reymond MA : Tumor cell dissemination during laparoscopy : prevention and therapeutic opportunities. Dig Surg 19 : 464-472, 2002
33) Watanabe M, Hasegawa H, Yamamoto S, Hibi T, Kitajima M : Successful application of laparoscopic surgery to the treatment of Crohn's disease with fistulas. Dis Colon Rectum 45 : 1057-1061, 2002
34) Hasegawa H, Watanabe M, Nishibori H, Okabayashi K, Hibi T, Kitajima M : Laparoscopic surgery for recurrent Crohn's disease. Br J Surg 90 : 970-973, 2003
35) Bergamaschi R, Pessaux P, Arnaud JP : Comparison of conventional and laparoscopic ileocolic resection for Crohn's disease. Dis Colon Rectum 46 : 1129-1133, 2003
36) Shore G, Gonzalez QH, Bondora A, Vickers SM : Laparoscopic vs conventional ileocolectomy for primary Crohn disease. Arch Surg 138 : 76-79, 2003
37) Benoist S, Panis Y, Beaufour A, Bouhnik Y, Matuchansky C, Valleur P : Laparoscopic ileocecal resection in Crohn's disease : a case-matched comparison with open resection. Surg Endosc. 17 : 814-818, 2003
38) Milsom JW, Hammerhofer KA, Bohm B, Marcello P, Elson P, Fazio VW : Prospective, randomized trial comparing laparoscopic vs. conventional surgery for refractory ileocolic Crohn's disease. Dis Colon Rectum 44 : 1-8, 2001
39) Msika S, Iannelli A, Deroide G, Jouet P, Soule JC, Kianmanesh R, Perez N, Flamant Y, Fingerhut A, Hay JM : Can laparoscopy reduce hospital stay in the treatment of Crohn's disease? Dis Colon Rectum 44 : 1661-1666, 2001

40) Kienle P, Weitz J, Benner A, Herfarth C, Schmidt J : Laparoscopically assisted colectomy and ileoanal pouch procedure with and without protective ileostomy. Surg Endosc 17 : 716-720, 2003

41) Hasegawa H, Watanabe M, Baba H, Nishibori H, Kitajima M : Laparoscopic restorative proctocolectomy for patients with ulcerative colitis. J Laparoendosc Adv Surg Tech A 12 : 403-406, 2002

慶應医学・81(2)：93～97，2004

綜　説

心臓血管外科最近の話題
—手術症例数と施設数，本邦での問題点—

済生会宇都宮病院心臓血管外科
木曽一誠

Key Words：OPCAB，弁形成術，肺静脈隔離術，専門医制度，施設基準

はじめに

心臓血管外科は米国で産声をあげて高々60年の歴史しかない診療科である．かつては心臓の手術は最も死亡率が高く，手術時間も極端に長く，手術室では嫌われ者の筆頭であった．しかし近年，心筋保護法の進歩，技術の進歩に伴い，待機手術の多くはきわめて安全に行われるようになり，術中死は皆無に近くなった．本講では最近行われている心臓血管外科の手術，とくに後天性の疾患を中心に解説し，その将来展望と専門医制度の問題点を提起した．

心臓血管外科手術

2001年の手術症例数の日本胸部外科学会の集計[1]では535施設中，513施設より返事があった．第1表のごとく手術総数は48,077例である．これらは先天性心疾患，後天性心疾患と，胸部動脈瘤その他を含んでいる．本邦で心臓外科の手術が始まった初期の時代には対象はほとんど先天性心疾患であった．しかし近年，小子化の影響で症例数は年々減少し，2001年の統計では先天性心疾患は9266例（うち体外循環症例は7366例）で全手術の20%を占めるにすぎない．手術適応の変遷で，初期の時代に多かった心房中隔欠損症，心室中隔欠損症などの単純な手術は減少して，最近では複雑心奇形の根治術，乳児の疾患の増加でさらに専門分化されてきた．成績向上のためにセンター化が叫ばれ専門の小児病院が次々に生まれている．後天性心疾患は，2001年は32,586例で全体の68%を占めており，そのうち約3分の1が弁膜症，3の2が冠動脈疾患（虚血性心疾患）である．その他胸部の大動脈瘤が6,218例で13%を占める．またこの年は心臓移植が7例施行されているが，その後の報告はない．

以下，本邦での手術成績も加味して主な後天性心疾患の外科治療の現状と将来構想を解説する．

第1表　本邦の心臓血管外科手術数[1]

	体外循環使用	体外循環非使用
先天性心疾患（合計 9,266例）	7,366	1,900
後天性心疾患（合計32,586例）		
弁膜症（10,505例）	10,505	
冠動脈疾患（21,146例）	14,196	6,950
その他（935例）	843	92
胸部動脈瘤（合計 6,218例）		
解離性動脈瘤（2,966例）	2,966	
真性動脈瘤（3,252例）	3,252	
心臓移植（合計7例）	7	
合計（48,077例）	39,135	8,942

1. 冠動脈疾患

冠動脈の外科的治療としての冠動脈バイパス術は1960年代に米国ではじまり，現在では心臓血管外科の手術中，欧米では80から90%，本邦でも約45%をしめる．しかし，カテーテルによる冠動脈形成術，PCI（percutaneous coronary intervention）の導入，その後のステント留置術が開発によって，現在では冠動脈疾患の治療法の第一選択は冠動脈バイパス術ではなくなった．最近開発された薬剤溶出（drag-eluting）ステントは，挿入したステントから薬物を溶出することにより，この手技の最大の弱点である挿入後の再狭窄をかなり予防できるようになった．さらに適応が拡大すれば，冠動脈バイパス術は近い将来にかなり減少することは避けられない．

本邦では現在PCIはCABG（冠動脈バイパス術）の約6〜7倍行われており，欧米の約1.5〜2倍の報告に比較すると，きわめて高率である．PCI施行は，冠動脈の解離，破裂などの致命的な合併症もありうるので，心臓血管外科医のバックアップが是非必要である．そのために全国的に心臓血管外科施設の開設が相次ぎ，全国で心臓手術を施行する施設は550カ所以上になった．それでもPCIを施行する施設は2004年1月現在，全国で約1300カ所以上といわれ，カテーテル検査中にトラブルが起きたら救急車で緊急手術可能な施設に移送する体制がとられている．本邦のPCIは極めて危険な状態で行われているといえる．

1）冠動脈バイパス手術（conventional CABGかOPCABか）

冠動脈バイパス術は前述のごとく，心臓血管外科手術の中では最も症例が多い手術である．本邦での手術成績は向上して2001年の集計では待機手術では病院死亡が全国平均1.7%で欧米の成績と比較しても良好といえる．最近ではこの手術専門の外科医も出現，「冠動脈外科医」かそれとも「心臓外科医」かという議論さえでてきた．手術法は従来からの体外循環（人工心肺）を使用して，心臓を停止させて吻合術を行う方法conventional CABGと近年急速に増加している体外循環（人工心肺）を使用しないで心拍動下に行うOPCAB（off-pump coronary artery bypass）がある．それぞれ長所，短所があるが，OPCABの利点は出血量が少ないこと，人工心肺使用による手術侵襲がないこと，またバイパス血管に動脈のみを使用する場合は動脈硬化の強い上行大動脈に触れない手術により，脳合併症も回避できること，その結果手術後の回復が早いことなどがあげられる．しかし，体外循環使用の手術に比較すると，完全無血視野が得られないため，吻合の精度は1ランク落ちることは覚悟しなくてはならない．また長期の遠隔期成績は未だでていない．昨今の医療事故の多くは未熟な技術が原因のことが多いので症例数が少ない施設での本法の導入は慎重にすべきであろう．本邦では，2002年4月の診療報酬改正でOPCABはconventional CABGのプラス30%の手術料となったこともこの手術症例数の増加を煽った．2000年の全国集計で全バイパス術の26%がOPCABとなっているが，2001年の集計では35%に増加している．2004年現在では40%以上がこの方法でバイパス術は行われていると推測される．しかし症例の90%以上にこの方法を採用している施設もある一方では，従来の方法のみで好成績をあげている施設もあり，今後の遠隔期成績を待つ必要がある．なお，欧米では本邦ほど積極的ではなく，CABGの20%〜30%前後の報告が多い．

2）バイパス血管は動脈か静脈か

冠動脈バイパスに使われる血管はかっては自己の大伏在静脈が多く使用されてきた．これは採取が簡便であることが理由であった．しかしその後，長期開存率では動脈が遙かに有利で，最も生命予後に拘わる左前下行枝に左内胸動脈，他の場所には大伏在静脈を使用する動脈＋静脈のパターンが一般的となった．その後，すべてのバイパスに動脈の使用を目指す施設が増えている．使用血管は左右の内胸動脈，橈骨動脈，胃大網動脈，その他が利用される．しかしこれらの動脈血管採取には時間を要し，手術時間が7時間から8時間におよぶ施設もあり，医療経済的にはやや問題を残している．

2. 弁膜症

1）人工弁置換術

弁膜症の外科的治療法として人工弁置換術は定着した．また手術成績も近年著しく向上しており，特に人工弁置換術では2001年の集計では全国平均は病院死亡3.3%と欧米の成績を凌駕している．人工弁にはpyrolic carbon製の機械弁と生体材料（主として動物の心膜，心臓弁）を使った生体弁がある．2種の弁には一長一短がある．機械弁の耐久性は半永久的といわれているが，抗血栓には不利で，抗凝固剤としてワーファリンの服用が生涯義務づけられる短所がある．現在多く使用されている機械弁はSt Jude Medical弁に代表される2葉弁である．植え込み後の遠隔期の問題として弁周囲からの異常組織の増殖（パンヌスの形成）による弁機能不全などが報告されているが，ほとんどの症例で遠隔期の成績も

きわめて安定しているといえる．これに反し生体弁は血栓ができにくく，植え込み後のワーファリンの服用は不要の場合が多く，それに伴う合併症（脳出血などの出血性疾患）の危惧が少ない利点がある．しかし残念ながら耐久性では問題があり，機械弁と異なり若年者では植え込み後10年以下でも弁の劣化，石灰化，などのため再手術が必要となる．従って生体弁の植え込み適応はワーファリンの服用が不利な小児，将来妊娠分娩が必要な女性，70歳以上の老人に限られていた．しかし近年最も使用されている生体弁であるCarpentier Edwards Pericardial弁の耐久性が向上している．最近の報告では[2]大動脈弁に関しては，20年の遠隔成績で弁の構造上の機能不全は10%以下，弁に関連した死亡も15%ときわめて良好な臨床報告がでた．筆者の施設では現在では患者のQOLを重視して，60歳以上では，僧帽弁，大動脈弁ともに生体弁を第一選択としている．

2）弁形成術

大動脈狭窄症，僧房弁狭窄症など主としてリューマチ性の弁膜症では外科的治療としては人工弁置換が一般的であるが，その他の原因による弁膜症では人工弁を使用しない弁形成術が急速に増加している．大動脈瘤に合併する大動脈弁閉鎖不全では形成術のみで十分な場合もある．また変性疾患である僧房弁閉鎖不全では形成術が第一選択されるようになった．人工弁置換術と比べた利点は心房細動などの不整脈を合併しない限り，面倒で副作用の多いワーファリンの投与が不要となることである．

2001年集計では弁膜症10,505例のうち弁形成術は3732例（36%）に行われている．

3）低侵襲手術（MICS）

MICS（minimally invasive cardiac surgery）は，侵襲の少ない手術を総称している．一般的には，切開創が小さいこと，胸骨切開を少なくすること，体外循環を使用しないこと，などである．心臓外科の手術も安全になった今，できれば傷が小さく目立たないものにしたいと思うのは，患者も，外科医も同じである．患者に優しい医療を目的に傷が小さいという美容的にも有利という理由で，初期に手がけられたのが心房中隔欠損症などの単純な先天性心疾患に対する手術である．これは現在では一般化し多くの施設で5～6 cmの切開創で手術が行われている．その後弁膜症手術（人工弁置換，弁形成術），冠動脈手術（OPCAB）で盛んになった．現在では主として弁膜症に対する小切開手術（minimal incision），内視鏡下手術（Port access surgery）などをMICSと呼ぶことが多い．本法は傷が小さいという利点はあるが，術後の疼痛，手術時間の延長などの短所もある．当初，術後の胸骨感染の減少，術後回復が早く早期退院が可能であることなどが強調されたが，最近では疑問視する報告もあり，小切開という理由だけでは今後一般的な手術方法にはならないであろう．

4）心房細動を対する手術

弁膜症では手術後の遠隔成績は不整脈の有無に左右される．特に心房細動はもっとも予後を左右する因子と考えられる．Coxら[3]が1991年心房細動に対するMaze手術を発表し，世界中でこの手術が行われようになった．本邦でも小坂井ら[4]は，この手術の変法（Cryoablationを併用）で80%前後の成功率を報告している．しかし心房細動の罹患期間が長い症例，左房拡大が著名な症例では成功率は必ずしも高くない．しかもこの手術は何カ所もの心筋を切開縫合する必要があり，多くの外科医は煩雑に感じており，どこでもルーチンに行われているわけではない．近年，左房の一部を切開して後はCryoablationその他Radiofrequency，Microwave，Ultrasound，Laserなどにより肺静脈の周囲（心内膜または心外膜から）をアブレーションする「肺静脈隔離術」が盛んになった．この方法はMaze手術より成功率は低いといわれるが，60%から80%の成功率が報告されている[5]．本邦では手技が簡便なため僧帽弁手術の際に同時に行われているが，欧米では弁膜症に限らず冠動脈疾患にも適応し，心拍動下に心外膜からablationする方法が盛んになっており，最近では成功率80%前後の報告[6]もある．症例を選べばかなりの成功率が期待できるので今後注目される分野である．

3．大動脈瘤治療に関して

大動脈瘤には動脈壁全体が膨らむ真性動脈瘤と中膜壊死を主体とする壁の解離により生ずる解離性動脈瘤がある．いずれの場合にも治療はほとんど人工血管置換術法が選択される．しかし近年，ステントグラフト内挿術が開発されて，治療法の選択が必要になりつつある．

1）人工血管置換術

腹部の大動脈瘤（真性動脈瘤で腎動脈の末梢がほとんど）の手術法はほぼ確立され，手術での危険率はほとんどないが，胸部から胸腹部の大動脈瘤は未だ手術成績は良好とはいえない．

真性の胸部大動脈瘤では上行大動脈および下行大動脈の瘤は単純な補助手段で施行できるが，弓部の大動脈

瘤手術では瘤より頭部の血管が起始しており，手術中の脳保護のための補助手段が必要となる．現在多くの施設で行われているのは超低体温循環停止法である．全身を20℃以下に下げて脳波は完全に flat になって全身の循環を一時停止して，無血野で人工血管を用いて弓部血管を再建する方法である．本邦の多くの施設では，全身を冷却後さらに頭部の血管に血流を流す方法を併用している．近年手術成績は向上し，2001年の報告で全国平均は非破裂例の胸部大動脈瘤は病院死亡7.3%である．残念ながら破裂例では32.2%といまだ満足できる成績ではない．

俳優石原裕次郎の手術で有名になった「解離性動脈瘤」では急性期治療が重要である．現在では「急性大動脈解離」のA型（上行大動脈に解離が及ぶもの）では早期の手術（人工血管置換）が最も救命率が高いことが判明した．手術の補助手段の発達によって手術成績も向上し，2001年の集計では病院死亡は13.1%と報告されている．慢性期での手術が可能であったものでは病院死亡9.5%とさらに良好である．最近では主として遠隔期成績を論ずる段階になった．解離が上行大動脈におよばないB型の動脈瘤では特別の合併症がないかぎり，降圧療法を中心に保存的に治療する事が多い．

2）ステントグラフト内挿術

1991年，ブラジルの Parodi ら[7]が腹部大動脈瘤にカテーテル法によるステントグラフト内挿術を報告し，その後急速に世界中に広まった．現在では胸部大動脈瘤でも，真性だけでなく，解離性動脈瘤にも適応が拡大されている．現在欧米では3社の人工血管を FDA が承認している．本邦では2004年1月現在ではステント用の人工血管は認可されておらず，市販の人工血管は入手できないため，各施設のステントグラフト，または井上式ステント[8]を使用しており，いまだ安全な手術とは言い難い．しかし本邦では現在ステント内挿術は保険診療で診療報酬が認められており，近い将来，安全性が確立され，市販の製品が認可されれば，大動脈瘤の治療成績は飛躍的に向上する可能性がある．とくに，解離性大動脈瘤，胸部及び腹部大動脈瘤の破裂症例など，手術で困難な症例での適応が期待されている．

心臓血管外科の専門医

1．専門医制度の問題

2004年より，心臓血管外科専門医制度が3学会（日本胸部外科学会，日本心臓血管外科学会，日本血管外科学会）構成のもとで発足した．しかし修練施設の基準はきわめて低く，修練の中心となる「基幹施設」では手術症例基準は年間75例以上である．また基幹施設の下に「関連施設」があるが，施設認可には症例数の基準はない．ここでも専門医になるための修練が行われることになり，とうていしっかりした専門医ができる体制にはならないであろう．

また，今回の専門医制度には血管外科の専門医も含まれている．欧米では血管外科は胸部外科，心臓血管外科とは独立している．本邦では心臓手術はてがけない末梢血管専門の外科医もこの専門医の取得する必要があるが，はたして可能であろうか．

2．医師数，施設数，施設基準の問題

近年本邦の医療の世界では過剰医師数こそが疫病神と叫ばれてきた．これは心臓血管外科にも当てはまる．前述のごとく，4万8000例の手術に，3学会構成の認定機構が認定する約1400名の専門医が関与する．単純計算すると，専門医1名にたいし，年平均執刀手術症例は34例となる．果たしてこれが専門医といえるであろうか．

2002年4月，「冠動脈バイパス術＋人工心肺を使用する手術」が100例に満たない施設では，診療報酬の手術料は30%減となる，いわゆる施設基準が設定され，大きな反響を呼んだ．この基準は「欧米では症例数の多い施設ほど，手術成績が良好であること」が根拠になっていると説明された．しかしこの基準が決定される前には関連学会には何も打診はなく，急に天から降ってきたというのが多くの心臓血管外科医の感想であった．しかし，欧米（米国，英国，ドイツ，フランス，），オーストラリアでは心臓血管外科の専門医は1年間に平均150例から250例の手術をしており，本邦の1施設100例基準は欧米の専門医1名分にも達しない．本邦ではこの分野のセンター化は遅れており，胸部外科学会の2001年のデータでは513カ所[1]，西田らの報告[9]では544カ所で心臓血管外科の手術が行われている．このうち2003年度に上記の施設基準の年間100例をクリアした施設は約149カ所で全施設の30%以下である．また全国の約25%の施設では年間25例以下という状態である．

前述のごとく，我が国で限られた症例を多くの外科医が手がけており，外科医一人が扱う症例数はきわめて少ないが，それだけに大変丁寧な手術がおこなわれており，欧米に比較しても手術成績は決して悪くない．2001年のデータでは冠動脈バイパス術では待機手術では全国の

平均で病院死亡率 2.0%以下と報告されており，弁膜症手術も，平均すれば欧米の成績と比較しても決して悪くない．しかし，残念ながら，手術時間はきわめて長く，たとえば冠動脈手術ではすべて動脈を使用する施設では6時間以上もかかる施設もあり，胸部大動脈瘤手術にいたっては10時間以上の手術も平然とおこなわれている．これらの手術では外科医以外にも，麻酔医，その他の多くのスタッフ（看護師，臨床工学士，事務職員など）が関与しており，医療経済的にはきわめて効率の悪い医療が行われているのが我が国の心臓血管外科の現状である．

終わりに

心臓血管外科は比較的新しい診療科で現在でもその進歩は急速である．最近では，手術成績は安定期にはいり，低侵襲でQOLの高い医療が要求されている．一方では，心臓血管外科を志す外科医が症例数に比較して異常に多く，また施設数も過剰で1施設当たりの症例数は欧米に比べてきわめて少ないために専門医になるための修練は必ずしも満足できるものではない．著者は厚生労働省主体の改革の一環である問題点の多い「施設基準」の縛りがむしろ黒船となり，患者にとっても外科医にとっても有利な施設のセンター化が促進されることを願っている．

文　献

1) Yada I, Wada H, Shinoda M, Yasuda K ; Committee of Science, Japanese Association for Thoracic Surgery : Thoracic and cardiovascular surgery in Japan during 2001 : annual report by the Japanese Association for Thoracic Surgery. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 51 : 699-716, 2003
2) 20 year results-Carpnentier-Edwards perimount aortic pericardial bioprosthesis. Clinical Communiqué, Edwards Lifesciences, 2003
3) Cox JL, Schuessler RB, D'Agostino HJ Jr, Stone CM, Chang BC, Cain ME, Corr PB, Boineau JP: The surgical treatment of atrial fibrillation. III. Development of a definitive surgical procedure. J Thorac Cardiovasc Surg 101: 569-583, 1991
4) Kosakai Y, Kawaguchi AT, Isobe F, Sasako Y, Eichi K, Tanaka N, Kito Y, Kawashima Y : Cox maze procedure for chironic atrial fibrillation associated with mitral valve disease : J Thorac Cardiovasc Sug.108 : 1049-1055, 1994
5) Benussi S, Ascimbene S, Agricola E, Calori G, Calvi S, Caldarola A, Oppizzi M, Casati V, Pappone C, Alfieri O : Surgical ablation of atrial fibrillation using the epicardial radiofrequency approach : mid-term results and risk analysis. Ann Thorac Sug 74 : 1050-1057, 2002
6) Li Poa. : Atrial fibrillation : ablation modalities and current state of the art. 第56回日本胸部外科学会総会（Meet the expert), 東京，2003
7) Parode JC, Palmaz JC, Barone HD : Transfemoral intraluminal graft implantation for abodominal aortic aneurysms. Ann Vas Surg 5 : 491-499, 1991
8) Inoue K, Iwase T, Sato M, Sato M, Yoshida Y, Tnaka T, Kubota Y, Tamaki S, Hasegawa K, and Yamazato A : Clinical application of transluminal endovascular graft placement for aortic aneurysms. Ann Thorac Surg 63 : 522-528, 1997
9) 西田博，黒沢博身，遠藤真弘，冨澤康子：二次医療圏からみた心臓血管外科における施設基準．第4回胸部外科医療効率研究会，東京，2003

慶應医学・81(2)：99～103，2004

綜　説

てんかんの神経病理学

独立行政法人国立病院機構下総精神医療センター
冨永（とみなが）　格（いたる）

Key Words：epilepsy, cortical dysplasia, microdysgenesis, focal cortical dysplasia, hippocampalsclerosis

はじめに

てんかんは，1）発作を慢性に反復する脳障害で，2）現在進行中の既知の疾患が原因となっているものを除き，3）その発作は突発性脳律動異常によるもので，発作症状はその律動異常の脳内での始発部位とその広がり方に従って，意識障害，けいれん，自動症その他さまざまな様態をとるもの，と定義することができる[1]．国際分類によれば，てんかんは，局在関連てんかん（部分てんかん，焦点性てんかん）と全般てんかんとに大別され，それぞれが特発性のものと症候性のものとに分けられる[2]．症候性てんかんにおいては，奇形，発達障害，外傷後の瘢痕，腫瘍，膿瘍ないし寄生虫による病変などが存在し，そのために局所のけいれん閾値が低下している可能性がある．しかし，これらの病変はてんかんを示さない脳にも多く認められるため，てんかん原性との関連は明確とはいえない．てんかん患者にみられる形態学的異常は，けいれんの結果あるいは抗けいれん薬の投与により生じたもの，または偶発的な所見であるかもしれない．一方，近年画像診断技術の向上と臨床神経生理学の進歩によって，てんかん原性焦点を明確に診断できるようになり，難治性てんかんに対する外科手術が普及している．その結果，手術によって採取された脳組織をもとに神経病理学的検索，生化学的及び分子生物学的研究がなされている．本綜説では，最近特に注目されている cortical dysplasia（皮質異形成）についてまず述べ，次いで従来てんかんの代表的な所見として知られている海馬硬化を中心とする脳病変，外傷等てんかんに続発する病変などについても言及する．

皮質異形成（cortical dysplasia）

脳（主として大脳新皮質）の細胞構築学的異常を生じる奇形性病変をさす．一般に皮質の層構築が障害され，ニューロンの配置に異常を認め，しばしば隣接する大脳白質も侵される．以下のものがこれに含まれる．

1．微小形成不全（microdysgenesis）

肉眼的な異常は認められず，ニューロンやグリア自体に形態学的な異常はないが，顕微鏡的な検索ではじめて異常が見出されるものをさす．このような軽微な病変がてんかんの原因となるか否かについてはすでに20世紀の初頭に注目されていた[3]．Veith ら[4]を始めとする剖検脳を用いた研究が少なからずあり，また難治性の部分発作を呈する患者より採取した大脳皮質組織でも Nordborg ら[5]以後この病変が脚光を浴びている．これには以下のようなものが含まれる[6]．

1）柔膜下神経細胞（subpial neuron）の存在

柔膜直下の大脳皮質表層に神経細胞が多数出現する．

2）皮質第 I－II 層の神経細胞密度の増加

大脳皮質の浅層に，正常より多くの（主に小型）神経細胞を多数認める．

3）軟膜神経グリアヘテロトピア（leptomeningial neuroglial heterotopia）

神経細胞やグリア細胞よりなる小細胞集団が，脳軟膜を突き破って外側に突出している．

4）主として分子層（大脳皮質第 I 層）における脳表層の髄鞘過形成

脳表層，特に分子層において接線方向に走行する髄鞘を多数認める．

5）皮質内における神経細胞/グリア細胞の小集簇像

(neuroglial clustering)

大脳皮質に神経細胞やグリア細胞から構成される小さな結節性の細胞集団を認める．

6）皮質神経細胞の柱状構造の遺残（persistent columnar architecture）

神経細胞が縦方向への遊走を終了し，次いで横方向へのネットワーク形成に伴って層構造が構築されるが，その前段階で神経細胞の移動が停止したもの．

7）深部白質における神経細胞のヘテロトピア（single neuronal heterotopia）

深部白質に比較的大型の錐体神経細胞を多数認める．

8）深部白質における血管周囲グリア細胞の衛星現象（perivascular glial satellitosis）

血管周囲にオリゴデンドログリアと考えられる小グリア細胞核を多数認める．

これらのうちで，てんかん患者に有意に多く出現するのは5)，7)，8）であるとの報告もあるが[7]，発作による二次的な変化であるとする考えもあり[8]，てんかん原性との関連の解明が今後の課題である．Arai らは対照例との比較により，グリア細胞の衛星現象を伴った白質内のニューロンの存在と血管周囲グリア細胞の衛星現象が微小形成不全に特異的であり，それらは発達途上におけるニューロン遊走の停止ないしそれに類するエピソードにより生じるのであろうと述べている[9]．

2．限局性皮質異形成（focal cortical dysplasia）

これは1971年 Taylor らが最初に注目したもので[10]，彼らはてんかん患者の lobectomy によって得られた脳組織のうちで，病理学的に同一のカテゴリーに属すると考えられる10例の臨床・神経病理学的所見を詳細に報告している．組織学的には皮質と白質の境界が不明瞭かつ不規則で，正常の層構造は失われ，神経細胞の配列異常を認め，しばしば白質に単一異所性神経細胞や異所性灰白質が出現する．また dysplastic neuron とよばれる顕著に枝分かれした樹状突起を伴った奇異な巨大神経細胞を第I層以外の皮質内及び皮質と白質の境界に認める．時に balloon cell とよばれる多形性の核と好酸性で硝子様の細胞質を有する細胞も出現する．Palmini らは，これらの異常細胞が出現せず皮質層構造の異常のみを示す grade 1, dysplastic neuron を伴う grade 2, さらに balloon cell も伴う grade 3 とに分類している[11]．Dysplastic neuron は，免疫組織学的に高分子量及び中分子量のニューロフィラメントのエピトープに強い陽性所見を示し[12]，一方 balloon cell は GFAP（グリア線維性酸性蛋白）を発現するものや，グリア及びニューロンのマーカーを発現するものがある[13,14]．画像所見としては，MRI の T2 強調画像における大脳皮質－白質の不明瞭化が特徴的で，大脳皮質と直下の白質との境界における有髄線維の形成不全を描出しているとされる[15]．本病変を示した薬物治療抵抗性の部分てんかん15例の検索によれば，balloon cell を含む領域は，それに近接する dysplastic な領域よりもてんかん原性が低かったという[16]．これは balloon cell そのものはてんかん発作を抑制する方向に働いているが，balloon cell も含めた dysplastic な領域全体がニューロンネットワークを著しく障害し，てんかん原性を高めている可能性を示唆しているのかも知れない．また temporal lobectomy（側頭葉切除術）をうけた側頭葉てんかんの患者28例中，本病変のみを有する9例と，本病変に加えて後述する海馬硬化を合併した19例とを比較した場合両群間に予後の差異は認められなかったとの報告がある[16]．発生学的には，微小形成不全は皮質発達の後期，限局性皮質異形成はニューロンの原基が形成される分裂後期にそれぞれ生じた障害と考えられる[17]．皮質異形成にはこれら以外に大脳回症（macrogyria），多小脳回，厚脳回，片側巨脳症なども含まれるが省略する．

海馬硬化（hyppocampal sclerosis）

てんかん患者の剖検脳を肉眼的に観察して海馬が硬化し，萎縮しているのを報告したのは Bouchet らにさかのぼる[18]．これが後に海馬硬化として知られるようになり，その組織学的所見を Sommer が報告している[19]．彼は海馬の Sommer's sector とよばれる領域で錐体細胞が消失していることを見いだした．これは Lorente

第1図　海馬の解剖学的区分（本文参照）
DG；歯状回，SUB；海馬支脚

de Nó による CA1 領域に相当する[20]（第 1 図）．Sommer はまた海馬歯状回門の内部（CA4 領域）におけるニューロンの脱落も指摘している．1899 年 Bratz はより詳細な研究に基づき，側頭葉てんかんの海馬では CA1 領域の錐体ニューロンは消失するが，CA4（終板）や最も病変が生じにくい CA2 でもニューロンの脱落は軽度に認められ，海馬支脚などその他の領域ではニューロンは保たれると報告している[21]．以上より海馬硬化とは本来硬くなり，萎縮した海馬についての記載であり，組織学的には特定の領域にニューロンの脱落が目立ち，2 次的にアストロサイト（星状膠細胞）の増生を伴うものといえる．なおこの病変は，てんかん剖検脳の 20～80%，側頭葉てんかんの切除例では 50～70%に見いだされるという[22]．海馬硬化におけるニューロンの脱落を Bruton は，顕微鏡を用いて定性的に 3 段階に分類している[23]．すなわち，「古典的（classic）」海馬硬化では CA1 と CA4 においてニューロンが高度ないし完全に脱落しているが，顆粒層では脱落の程度はより軽度で，CA2 では最も軽い．また「完全な（total）」海馬硬化では，海馬のすべての領域でニューロンが破壊されている．さらに「終板（CA4）」硬化では，終板のニューロンのみが消失しているという．

近年薬物治療抵抗性の側頭葉てんかんに対する脳外科治療によって切除された海馬組織に対して，免疫組織学的な手法を用い，ニューロペプチド Y，ソマトスタチン，P 物質やダイノルフィンなどさまざまな神経ペプチドの局在がしらべられている[24]．それによれば歯状回顆粒下層におけるペプチド作動性ニューロンの脱落と，歯状回分子層へのペプチド作動性ニューロンの軸索発芽が海馬硬化と関連している可能性があるとされる．一方海馬硬化は低酸素状態，乳幼児期の中毒ないし脱水状態などによって生じることが以前より知られており，またこの病変を認めても臨床的にてんかんを示さない例も少なくない．さらに海馬硬化が側頭葉てんかんの原因であるかあるいは結果であるかについてもいまだ一定の結論には達していないが[25,26]，ラットを用いた実験では，発作重積状態によって海馬硬化が生じ，慢性に発作を反復するのみでは生じないという[27]．最近では海馬以外の部位も含めて，内側側頭葉硬化（mesial temporal sclerosis）という表現もよく用いられるが，従来神経生理学の分野で注目されてきた扁桃核についての病理学検索は少なく[28]，その病変の程度は海馬硬化とは必ずしも相関しないともいわれる．今後は剖検脳も含めて扁桃核もしらべることが，発作焦点をより明確にするためにも不可欠であろう．

てんかん発作に続発する病変

てんかん発作に続発する病変として，病因的には以下のものが挙げられる[17]．すなわち，

1）発作重積状態により生じる神経細胞の急性病変

神経細胞体は全体に萎縮し，好酸性（ヘマトキシリン・エオジン染色で赤く染まる）の染色態度を示し，核は濃染する．

2）慢性に反復する発作により生じる神経細胞脱落および反応性グリオーゼ（線維性星状膠細胞の増殖）

小脳をはじめとして視床，大脳皮質，下オリーブ核などで認められる．グリア染色により大脳皮質第I層に強いグリオーゼを見出すことが多く，これは Chaslin の辺縁グリオーゼ（Randgliose）として有名である．また重積に至らないような全般性の発作でも脳の発達に影響を及ぼすことが動物実験で確かめられている[29]．

3）発作による転倒などにもとづく脳の外傷性変化

陳旧性の脳挫傷が多く，前頭葉眼窩面，前頭極および側頭極や側頭葉下面に好発する．外傷後に発症するてんかんとの鑑別が困難な場合がある．

4）治療により生じる障害

抗てんかん薬であるフェニトインは脳に著しい変性を生じる可能性があり，以前よりこの薬物の中毒で小脳失調などの神経症状やその他の臨床症状とともに神経病理学的変化が認められたとの報告は少なくない．所見としては，小脳プルキンエ細胞の脱落，（プルキンエ細胞層に存在する）ベルクマングリアの増生，小脳分子層のグリオーゼ，小脳髄樹の部分的な髄鞘脱落とグリオーゼ，小脳歯状核周辺白質の軽度グリオーゼ，延髄下オリーブ核神経細胞の中等度脱落とグリオーゼ，延髄楔状束核におけるスフェロイド（軸索腫脹）の出現などが代表的である．動物実験でも小脳プルキンエ細胞と深部神経核の変性，神経終末部の腫脹が見出されている[30,31]．

おわりに

最近てんかんの分子遺伝学的研究が盛んに行われ，新たな知見が集積されつつある[32]．

本綜説ではてんかんで近年注目されている事柄を神経病理学的な面に限り概説した．今回は触れなかったが，てんかん患者の突然死は決してまれではない．入浴中の溺死など明らかな外因死と見なされるものは発作が原因であると推定されるが，目撃者が不在で，状況が不明な場合には，死因として発作重積状態による死亡ないし心

臓死などとされることが多い．この問題に関する研究はこれまで十分とはいえず[17]，今後解明すべき課題といえよう．てんかんは従来精神神経科で取り扱われることが多かったが，現在では神経内科，脳神経外科，小児科など多くの科で診療が行われている．神経病理学を含め，てんかんの研究がよりいっそう進展し，てんかんの本態の解明に少しでも近づき，わが国に約100万人いるとされる[1]患者のQOLが改善するよう願っている．

謝　辞

本綜説を記すにあたってご協力いただいた，独立行政法人国立病院機構下総精神医療センターの織田辰郎副院長，堀宏治臨床研究部長（慶應義塾大学医学部非常勤講師），女屋光基研究検査科長兼臨床研究部神経病理研究室長（慶應義塾大学医学部非常勤講師）ならびに中根潤リハビリテーション科医長に感謝いたします．

引用文献

1) 大熊輝雄：てんかん．現代臨床精神医学（大熊輝雄著）．金原出版，p219, 2002
2) Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy：Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Epilepsia 30：389-399, 1989
3) Alzheimer A：Die Gruppierung der Epilepsie. Allgemeine Z Psychiatrie 64：418-448, 1907
4) Veith G, Wicke R：Cerebrale Differenzierungsstoerungen bei Epilepsie. Jahrbuch. Koln-Opalden, Westdeutscher Verlag, p. 515-534, 1968
5) Nordborg C, Sourander P, Silfvenius H et al：Mild cortical dysplasia in patients with intractable partial seizures：a histological study. Adv Epileptol, Vol. 16. (Ed) Wolf P, Dam M, Janz D, Dreifuss FE, Raven Press, New York, p. 29-33, 1987
6) 新井信隆：難治てんかんの外科病理学．神経進歩，44：124-133, 2000
7) Kasper BS, Stephan H, Buchfelder M, Paulus W：Temporal lobe microdysgenesis in epilepsy versus control brains. J Neuropathol Exp Neurol 58：22-28, 1999
8) Emery JA, Roper SN, Rojiani AM：White matter neuronal heterotopia in temporal lobe epilepsy：a morphometric and immunohistochemical study. J Neuropathol Exp Neurol 56：1276-1282, 1997
9) Arai N, Umitsu R, Komori T, Hayashi M, KurataK, Nagata J, Tamagawa K, Mizutani T, Oda M, MorimatsuY：Peculiar form of cerebral microdysgenesischaracterized by white matter neurons with perineuronaland perivascular glial satellitosis：a study using a variety of human autopsied brains. Pathology International 53：345-352, 2003
10) Taylor DC, Falconer MA：Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. J Neurol Neurosurg Psychiatry 34：369-387, 1972
11) Palmini A, Andermann F, Olivier A, Tampieri D, Robitaille Y, Andermann E, Wright G：Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy：a study of 30 patients. Ann Neurol 30：741-749, 1991
12) Duong T, De Rosa MJ, Poukens V, Vinters HV, Fisher RS：Neuronal cytoskeletal abnormalities in human cerebral cortical dysplasia Acta Neuropathol 87：493-503, 1994
13) Vinters HV, Fisher RS, Cornford ME, Mah V, Secor DL, De Rosa MJ, Comair YG, Peacock WJ, Shields WD：Morphological substrates of infantile spasms：studies based on surgically resected cerebral tissue. Childs Nerv Syst 8：8-17, 1992
14) Vital A, Marchal C, Loiseau H, Rougier A, Pedespan JM, Rivel J, Vital C：Glial and neuroglial malformative lesions associated with medically intractable epilepsy. Acta Neuropathol 87：196-201, 1994
15) Yagishita A, Arai N, Maehara T, Shimizu H, Tokumaru AM, Oda M：Focal cortical dysplasia：appearance on MR images. Radiology 203：553-559, 1997
16) Srikijvilaikul T, Najim IM, Hovinga CA, Prayson RA, Gonzalez-Martinez J, Bingaman WE：Seizure outcome after temporal lobectomy in temporal lobe cortical dysplasia. Epilepsia 44：1420-1424, 2003
17) Honavar M, Meldrum BS：Epilepsy. Greenfield's Neuropathology, 7th ed. Volume I. (Ed) Graham DI, Lantos PL, Arnold, London, p.899-941, 2002
18) Bouchet C, Cazanveieih M：De l'épilepsie considervée dans ses rapports avec l'aliénation mentale：recherche sur la nature et le siège de ces deux maladies. Arch Gén Méd 9：510-542, 1825
19) Sommer W：Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. Arch Psychiatr Nervenkr 10：631-675, 1880
20) Lorente de Nó RI：Studies on the structure of the cerebral cortex, II：continuation of the study of the ammonic system. J Psychol Neurol(Leipzig) 46：143-177, 1934
21) Bratz E：Ammonnshornbefunde bei Epileptikern. Arch Psychiatr Nervenkr 32：820-835, 1899
22) Meencke HJ, Veith G：Hippocampal sclerosis in epilepsy. Epilepsy Surgery. (Ed) Luders HO, Raven Press, New York, p.705-715, 1991
23) Bruton CJ：The Neuropathology of Temporal Lobe Epilepsy. Oxford University Press, Oxford, 1988
24) de Lareroile NC：The pathology of the epilepsies：insights from pathology to mechanisms of causation of temporal lobe epilepsy. Pediatric Epilepsy：Diagnosis and Therapy. (Ed) Pellock JM, Bourgeois WED,

Demos, New York, p.45-60, 2001
25) Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA : The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. Epilepsy Res 26 : 151-161, 1996
26) Sutula TP, Pitkanen A : More evidence for seizure-induced neuron loss : is hippocampal sclerosis both cause and effect of epilepsy? Neurology 57 : 169-170, 2001
27) Gorter JA, Pereira PMG, van Vilet EA, Aronica E, da Silva FHL, Lucassen PJ : Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epileticus and not by later repeated spontaneous seizures. Epilepsia 44 : 647-658, 2003
28) Wolf HK, Aliashkevich AF, Blumcke I, Wiestler OD, Zentner J: Neuronal loss and gliosis of the amygdaloid nucleus in temporal lobe epilepsy. A quantitative analysis of 70 surgical specimens. Acta Neuropathol 93: 606-610, 1997
29) Gong Z, Obenaus A, Li N, Sarty GE, Kendall EJ: Recurrent nonstatus generalized seizures alter the developing brain. Epilepsia 44 : 1380-1387, 2003
30) 武市昌士：慢性アレビアチン中毒ラット小脳に出現する異常軸索の生成に関する電子顕微鏡学的検討．神経進歩，21：559, 1977
31) 武市昌士：慢性アレビアチン中毒ラット小脳に出現する異常軸索の晩期変化像に関する電顕学的検討．神経進歩，22：547-548, 1978
32) 廣瀬伸一：てんかんの分子生物学．精神経誌，105：407-412, 2003

慶應医学・81(2)：105～108，2004

解　説

疾患病態・治療薬作用のモデルシステムの開発

大阪大学大学院医学系研究科　情報薬理学講座
北岡裕子・鈴木慎悟・山田充彦・倉智嘉久

Hiroko Kitaoka, Shingo Suzuki, Mitsuhiko Yamada and Yoshihisa Kurachi

要　旨

文部科学省リーディングプロジェクト「細胞生体機能シミュレーション」神戸拠点で現在進行中のプロジェクトのうち，薬物の構造から心臓不整脈発生の危険度を予測するシステムと，3次元CT画像を用いて換気分布を解析・予測するシステムについて，開発内容を解説した．

Key Words：シミュレーション，イオンチャネル，不整脈，分子薬物相互作用，換気画像

はじめに

人体を計算機内（in silicon tips）に再現することを目指して，「インシリコヒューマン研究会」が，大阪大学を中心にして2002年の4月に発足した．本研究会には，大阪大学だけでなく，神戸大学，奈良先端技術大学，九州工業大学，国立大阪病院，日本原子力研究所など，多くの大学・病院・研究機関の研究者が参画している．研究者の専門分野は，臨床医学，基礎医学，生命科学，物理化学，計算科学，情報科学など多岐にわたり，分子レベルから臓器レベルまで，また，基礎科学から臨床現場での応用まで，さまざまなテーマの研究が進行中である（第1表）．多様な研究者と多様な研究テーマに共通するのは，計算機を駆使してモデリングとシミュレーションを行うことによって，生体現象の解明と医療への貢献を目指していることである．

もちろん，究極の目標はシステムとしてのIn Silico Humanの構築であるが，そのゴールは果てしなく遠い．おそらく，現在の研究参画者は誰一人，生存中にゴールにたどり着くことはできないであろう．遠大なゴールを夢見る前にまず，実現可能な具体的な目標を設定し，医療応用を目指すのが，本研究会の特徴である．それが細胞生体機能シミュレーションプロジェクト神戸拠点に生きている．計算機シミュレーションという研究手法が医学・医療に本当に役に立つことを社会に示し，研究の裾野を広げていくことが，神戸拠点およびIn silico Human研究会の果たすべき役割であると考えている．

生体シミュレーションが医学研究と臨床応用に有用であろうと思われる課題は数多くある．しかし，それらが数年後に実現するかどうかを予測するのは，きわめて難しい．臨床的なテーマが必ずしも実現可能性が高いとは限らない．なぜなら，臨床で問題になる生体現象をモデル化する際に使える数学的な道具が，ほんのわずかしかないからである．逆に，一見，臨床とはかけ離れているような分子動力学シミュレーションの成果が，創薬に直結する可能性はきわめて高い．

本稿では，文部科学省リーディングプロジェクト「細胞生体機能シミュレーション」神戸拠点で現在進行中の研究テーマのうち，薬物の構造から心臓不整脈発生の危険度を予測するシステムの開発と，3次元CT画像を用いて換気分布を解析・予測するシステムの開発について，紹介させていただく．前者は分子レベル，細胞レベルの研究で，創薬に関連する．後者は臓器レベルの研究で，臨床診断に関連する．

第83回慶應医学会総会シンポジウム（平成15年11月14日開催）において講演

第1表　インシリコヒューマン研究プロジェクト

1）神経・筋モデルと臨床応用に関する研究	運動ニューロン，筋電図，パーキンソン病，リズム発生モデル
2）心臓興奮性モデルと薬物作用に関する研究	心筋細胞活動電位，QT延長，薬物動態シミュレーション，薬物受容体
3）肺モデルと呼吸機能に関する研究	肺モデル，呼吸機能解析，換気分布シミュレーション
4）骨・軟組織の形態計測と関節システムの機能解析技術に関する研究	骨，軟組織，先進的非侵襲計測，理モデリング，生体力学物性評価
5）ネットワーク利用型股関節手術計画支援システムの構築	股関節，関節動態解析・力学解析，手術計画，コンピュータネットワーク
6）インシリコヒューマンにおける生理機能，機能解剖，病理診断に関する研究	関節，神経，組織病変，顕微鏡画像，ネットワーク

薬物の構造から心臓不整脈発生の危険度を予測するシステムの開発

新薬が市販されるまでには，動物実験と臨床治験が，多大なコストと時間をかけて行なわれる．新薬候補の半分は，心電図異常や不整脈などの心臓副作用が原因で脱落すると言われている[1]．薬物による不整脈誘発機構は，心筋細胞の膜上にあるイオンチャネルに薬物が作用して，コンダクタンスなどの特性を変化させるため，活動電位に異常が生じるからである．ここでもし，生体での実験を行なう前に，計算機シミュレーションによって薬物効果を推定できれば，創薬の効率を飛躍的に高めることが可能である．我々の最終目標は薬物の化学構造から致死性不整脈発生の危険性を予測できるようにすることである．すなわち，(1)薬物とチャネルの相互作用の分子動力学的予測モデル，(2)電気生理学的実験に基づいたイオンチャネルの薬物動態モデル，(3)心筋組織内における興奮伝導のモデルを確立し，分子，細胞，そして組織レベルにわたる，幅広い階層を統合するためのシステム構築が不可欠となる．その全体の概要を第1図に示す．

薬物がイオンチャネルをブロックする機構は多様であるが，これはチャネルの開閉状態の違いによる，薬物との親和性の差，および結合部位などの相違によってもたらされるからである．このような分子レベルでの相互作用を扱うためには，分子動力学的手法を用いなくてはならない．一方，細胞レベルのモデル化には，電気生理学的実験のデータが不可欠である．第1図中央に，HERGと呼ばれるカリウムチャネルを流れる電流を，3種類の

第1図　心臓不整脈誘発予測システムの全体像

薬物がブロックする様式を示している．カリウム電流は，膜電位を再分極させる働きがある．このため，カリウム電流のブロックは活動電位を延長させ，不整脈誘発の原因となるが，その危険性は薬物によって大きな差のあることが知られている．我々のグループは，実験に基づいたチャネル阻害の特性を，動的心筋細胞モデル[2]に取り込むことにより，各薬物の催不整脈作用の機構を明らかにした．今後は，分子レベル，細胞レベルのモデルと，細胞間の興奮伝導や心臓の部位毎の細胞特性の非一様性といった組織レベルのモデルを結合し，全心臓モデルの構築を目指す予定である．

換気分布の解析・シミュレーションシステムの開発

呼吸器疾患における換気障害は，気管支肺胞系の構造変化が原因である．肺内のどのような構造変化がどのような換気障害を起こし，換気効率を低下させているかを知ることは，病態の理解と治療効果の判定にきわめて重要である．しかし，現行の呼吸機能検査法は，口から呼出される空気量や流速を計測するものであるため，肺内局所の情報を得ることはできない．肺内での3次元的な換気分布を知る方法としては，核医学検査が主で，最近では ^{3}He-MRI (Magnetic resonance imaging) が開発されている[3]．しかし，現時点ではいずれの方法も高額の薬剤や重装備の設備を要し，また，解像度や再現性に問題があることから，研究的な段階にとどまっている．我々は，被験者ごとの画像データをもとに肺の換気分布を解析し，さらに，シミュレーションにより治療効果予測を行なうシステムの開発に取り組んでいる．システムは胸部3DCTによる解剖学的解析と変形解析を行なう

第2図　健常人の仰臥位安静換気時の換気画像．中肺野の水平断層像．

アナライザーと，気流と肺変形の連成計算をするシミュレーターからなる．

肺の変形解析は，吸気呼気3次元CTの画像位置合わせによって行なう．位置合わせにより得られる変位ベクトル場から，局所の容積変化，すなわち局所換気量が得られる．第2図は健常ボランティアの仰臥位における安静時換気分布の1例である．単位容積あたりの換気量がグレイスケールで表示されている．荷重部（背側）で換気量が多い．また，区域的な低換気領域が散見される．

肺内の弾性率分布が既知であれば，変位ベクトル場か

第3図　肺の4次元モデルによる換気分布シミュレーション．A：安静換気時．B：喘息発作時．小葉性の換気不均等が著しい．

ら肺内の圧分布が算出され，気管支樹を流れる気流を計算することができるが，弾性率分布は計測することは，実際上不可能である．しかし，ある気管支を通過する気流量はその気管支の支配領域の換気量に等しいので，実画像から計測された換気分布と一致するような気流分布を与える弾性率分布を求めればよいことになる．このようにして得られた弾性率分布と気流分布をもとに，病的状態，薬剤投与時の換気分布をシミュレートすることができる．このシミュレーションは被験者の画像情報をもとにした個別シミュレーションであるので，臨床的な有用性は高いと考えられる．

実画像を用いたシミュレーションは着手したばかりなので，ここでは，数理的に構築した仮想の肺モデルを用いた換気分布シミュレーションを紹介する[4,5]．第3図Aは安静仰臥位における換気分布シミュレーション画像である．血管や葉間など，肺胞の存在しないところは換気量0であるため黒い．第2図の実画像解析例に見られる重力依存性と多面体の低換気領域が再現されている．同じ肺モデルを用いて，気管支収縮がおこった状態をシミュレートしたのが第2図Bである．直径1mmから2mmまでの気管支の20%で，16%の気道径の減少が生じたとしている．第2図Aに比して，換気の不均等が著しく，換気効率が低下していることがわかる．

おわりに

文部科学省リーディングプロジェクト「細胞生体機能シミュレーション」神戸拠点での活動状況の一部を紹介させていただいた．これらは，In silico Human 研究会で発展してきたものである．このプロジェクトは，平成15年度にスタートし，5年間続く予定である．4年後には，我々の試みがどこまで実現したか，厳しい検証が待っている．

文　献

1) Noble D：Modeling the heart--from genes to cells to the whole organ. Science 295：1678-82, 2002
2) Luo CH, Rudy Y：A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. Circ Res 74：1071-1096, 1994
3) de Lange EE, Mugler JP 3rd, Brookeman JR, Knight-Scott J, Truwit JD, Teates CD, Daniel TM, Bogorad PL, Cates GD：Lung air spaces：MR imaging evaluation with hyperpolarized 3He gas. Radiology 210：851-857, 1999
4) Kitaoka H, Takaki R, Suki B：A three-dimensional model of the human airway tree. J Appl Physiol 87：2207-2217, 1999
5) Kitaoka H：International Conference of the American Thoracic Society, A422, 2003

慶應医学・81(2)：109～115，2004

講　座

近赤外分光法による非侵襲的脳酸素代謝モニタリング

独立行政法人国立病院機構東京医療センター脳神経外科
斎藤良一・市来嵜　潔

Key Words：near-infrared spectroscopy, cerebral oxygenation, monitoring

はじめに

脳は虚血や低酸素に対して容易に障害を受けやすく，脳酸素代謝モニターは脳神経外科や救急医療の場において極めて重要である．その侵襲的モニタリング法として，血管内にカテーテルを挿入することにより内頚静脈酸素飽和度測定が行われているが，より簡便な脳の非侵襲的酸素モニタリングが望まれる．従来，脳の非侵襲的モニターは厚い頭蓋骨があるため困難とされたが，近赤外線分光分析装置の出現により頭皮から可能となった．近赤外線分光法は近赤外光が生体組織を透過する際，血液中のヘモグロビンが近赤外光を吸収し，その酸素化状態により吸光度が変化すること利用して酸化，還元ヘモグロビンの濃度変化を測定している．この装置は開発当初の1980年代は頭蓋骨が薄く光学的に有利である新生児の脳研究に主に応用されてきた．モニタープローブは近赤外光照射部と光検出部からなる．光検出器は脳組織や頭蓋骨の影響で極めて減衰された光を正確に測定するため超高感度であることが要求される．この分野では日本の技術力がすばらしく，ノーベル物理学賞を昨年受賞された小柴昌俊博士のニュートリノの研究で有名になったカミオカンデの心臓部である光電子増倍管を開発した浜松ホトニクス社が作成した近赤外線分光分析装置NIRO 500により成人の脳酸素モニターを確実にした．これにより成人においても脳の酸化および還元ヘモグロビン濃度の変化を相対的に経時的に観察されるようになった．しかし，その変動を相対的に評価することが可能であるが，絶対的評価ができずその使用は限られていた．その後さらに改良され，これまでの機能に加え絶対的指標である脳内の総ヘモグロビン濃度に対する酸素化ヘモグロビンの割合（tissue oxygenation index, TOI）の測定を可能にした近赤外線分光分析装置NIRO 300が1998年に開発された．これにより幅広い臨床応用がより現実的となった．当院ではこの装置を導入しその臨床応用を研究してきたが，プローブを頭皮に密着させるだけで極めて簡便に脳の酸素モニターができその有用性が明らかになってきた．以下に測定装置の基本原理とモニタリングの実際についてこれまでの報告例を紹介しながら述べる．

測定法

1. 測定原理

近赤外分光法（near infrared spectroscopy, NIRS）は吸光物質を含む溶液に光を照射した時の光の減衰と吸光物質の濃度の関係を示すBeer-Lambertの法則を基に光の散乱を考慮して導かれたmodified Beer-Lambert法を基本測定原理としている[1]．これは次ぎのように表される．$\triangle OD = \varepsilon(\lambda)^*\Delta c^*d^*B$

$\triangle OD$：吸光度の変化，$\varepsilon(\lambda)$：モル吸光係数，λ：光の波長 Δc：吸光物質濃度変化 d：距離，B：differential pathlength factor

すなわち吸光度の変化を測定することにより吸光物質の濃度変化を計算することができる．組織内の酸化，還元ヘモグロビン，酸化チトクロームオキシダーゼは近赤外光を吸収するためこれらの濃度変化を相対的に測定することができる．

またNIRSを用いた測定法としてmodified Beer-Lambert法以外に空間分解分光法（spatial resolved spectroscopy）がある．空間分解分光法では測定部位の異なる複数の受光部からなるプローブを用いて入射光の減衰の程度を測定している．

距離（ρ）に対する吸光度（OD）の変化率（$\partial OD/\partial\rho$）は次式で表される．

$\partial OD/\partial\rho = 1/\ln 10^*(\sqrt{3}\varepsilon^*(\lambda)k^*c+2/\rho)k$：光散乱特

性を表す未知定数
複数の受光部のプローブより測定された吸光度（OD）の変化率より相対濃度ｋｃを以下のように求める．

$$k^{*}c = 1/3\varepsilon(\lambda)^{*}(\ln 10^{*}\partial OD/\partial\rho - 2/\rho)^{2}$$

これにより酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの相対濃度が求められ次式により総ヘモグロビン濃度に対する酸素化ヘモグロビン濃度の割合であるTOI（tissue oxygenation index）を計算することができ，絶対的指標として用いることができる．

$$TOI = (HbO2/HbO+HbR)^{*}100$$

また位相分解分光法や時間分解分光法により絶対濃度を測定することが可能であるが測定が煩雑で装置も高額となり普及していない．

モニタープローブは近赤外光照射部と光検出部からなるが，NIRO300では光源として4波長の半導体レーザーが用いられ照射プローブへ導かれる．照射強度はレーザークラス1で生体に安全である（国際規格，IEC60825-1に基づく）．検出器は照射部から通常5 cm離れており3 mm間隔で配列された3つの受光素子（シリコンフォトダイオード）からなる（第1図，第2図）．中央の受光素子より吸光度の時間変化を測定しmodified Beer-Lambert法により吸光物質の濃度変化を測定し，3つの受光素子の受光光量の差より吸光度の変化率を測定しSRS法によりTOI値を算出している．これにより酸化ヘモグロビン濃度変化，還元ヘモグロビン濃度変化，総ヘモグロビン濃度変化，チトクロームオキシダーゼの濃度変化，TOI値が表示される．測定は最短0.5秒間隔で行なわれ連続表示されるため短時間の変化をリアルタイムで表示可能である．

第1図　NIRO 300本体

第2図　NIRO 300　プローブ

2.　測定部位

頭皮から測定したNIRSは頭蓋外組織の骨や頭皮の血流をどの程度反映しているのかという問題が生じる．これについては種々の検討がなされている．プローブの近赤外線照射部と検出部は5 cm離れているが，頭蓋に入射した光が脳組織で反射された反射光を検出している．この照射部と受光部の間隔が広くなると頭蓋内の寄与が大きく，頭皮，頭蓋の影響を減少させる．照射プローブと光検出部をバナナ状につなぐ領域が測定領域となるが[2]，その距離が4 cmなら脳表より0.45-1.35 cmの深さではNIRSで測定した酸化ヘモグロビン，還元ヘモグロビン，総ヘモグロビン変化はいずれもPET（Positron Emission Tomography）で測定した局所脳血流変化と有意に相関し，さらに脳表から2.7 cmの深さまではNIRSで捕らえた総ヘモグロビンの変化はPETで測定した局所血流変化と有意な相関を示したと報告されている[3]．

また頚動脈内膜剥離術中に外頚動脈と内頚動脈をクランプした際の前頭部から記録したTOI値の変動を，Laser Doppler Flowmetry（LDF）による皮膚血流，Transcranial Dopplerを用いた患側中大脳動脈のmean Flow Velocity（FV）の変動と比較した研究がある[4]．外頚動脈のクランプにより60例全例で皮膚血流は低下したが，TOI値は8例を除き52例で変動しなかった．TOI値が変動した8例では外頚動脈クランプに伴い平均血圧の変動かΔFVの変動がみられ体血圧，頭蓋内外の側副路の存在による影響が強く疑われた．内

頚動脈クランプによりFVは60例中56例で変動し，このうちTOI値は49例で変動した．FVが変化しなかった4例でTOI値が変動した例は認められなかった．この結果FV変動に対するTOI値の感度と特異度はそれぞれ87.5%，100%であった．また内頚動脈クランプに伴うTOI値の変動（% change TOI）とFVの変動（% change FV）では有意な正の相関関係が見られたが，TOI値（% change TOI）の変動とLDFの変動（% change LDF）では相関関係は認められなかった．これらの結果はTOIは高い感度と特異度を持って脳の酸素化を反映していることを示している．

また頭蓋内のどこのヘモグロビンを捉えているかも問題となる．測定領域には動脈，毛細血管，静脈が含まれるがNIRSではすべての血管のヘモグロビンの情報を得ている．脳血管の静脈相は約70%であるといわれNIRSのデータは静脈血のヘモグロビンの酸素化状態に大きく影響されると考えられている．しかし心臓血管外科手術の際の人工心肺中に得られたＴＯＩ値と内頚静脈酸素飽和度（SjO_2）を比較検討した報告があるが，両者に相関は認められていない[5]．SjO_2の変動はTOIの変動より有意に大きく，SjO_2のほうがより鋭敏に変化するとも言われている．SjO_2は脳全体の酸素代謝を反映するがNIRSでは局所的な酸素代謝情報を得ており，これら測定部位の違いや変化に対するsensitivityの相違により両者は必ずしも相関しないと考えられている．NIROでは脳局所組織内のヘモグロビン，すなわち動脈血，毛細管，静脈血のヘモグロビンの総和を捕らえていると解釈すべきである．

NIRSの測定領域に血腫が存在すると血腫のヘモグロビンの影響を受けることがあるので注意する必要がある．しかしこれを応用してGopinnat[6]らは頭部外傷患者において頭蓋内血腫のある半球側と血腫のない対側半球におけるNIRSの吸光度を比較して血腫の診断について研究した．吸光度の変化（$\log_{10}(I_N/I_H)$ I_N：血腫対側における反射光強度，I_H：血腫側における反射光強度）は硬膜下血腫，硬膜外血腫の厚さが1.5 cm以下では厚さと有意に相関した．またNIRSの変化は脳圧変化や神経所見の変化より早く現れ，頭部外傷後の遅発性脳内血腫をNIRSにより早期に診断することが可能と報告している．

3. モニタリング法

NIRO 300ではプローブを2つ有し体表上に装着するのみで酸化-還元ヘモグロビン濃度変化，総ヘモグロビン濃度変化，酸化—還元チトクローム変化およびTOIを2か所よりモニタリングできる．通常頭髪のない前額部に装着し前頭葉の情報を得るが，運動領野や視覚領野などを測定する際はそれぞれの部位に装着することが求められる．救急領域では脳のみならず全身の酸素代謝障害も把握する必要があり，脳と全身の酸素代謝の一指標として筋肉のTOIを測定するため我々はプローブを前額部と上腕部に装着している．プローブの装着に際し，プローブと皮膚を密着させプローブを遮光用のラバーで覆うようにする．

モニタリングの実際

1. 神経活動時の脳酸素代謝の変動

正常者において神経活動時の脳酸素代謝の変動をNIRSにより捉えることが可能である．手指運動負荷により運動中枢での脳血流が増加し，一般に酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビンが増加し還元ヘモグロビンが低下する[7,8]．計算や言語活動時では左前頭葉においては酸化ヘモグロビン，総ヘモグロビンは増加し還元ヘモグロビンは変化しないか減少する[9,10]．光刺激では後頭葉において酸化ヘモグロビン，総ヘモグロビンは増加するが還元ヘモグロビンの変化は一様ではないと報告されている[11~13]．PETを用いた研究では神経活動時には脳血流は平均40%増加するものの脳酸素消費量（$CMRO_2$）は平均5%の軽度増加にとどまる結果，脳酸素摂取率（OEF）は減少するいわゆるluxury perfusionを示すといわれている[14]．神経活動時のNIRSの結果は一般に神経活動時には著明な脳血流増大にともない総ヘモグロビン，酸化ヘモグロビンは増加するが，それに比べ還元ヘモグロビンの変化が小さいため静脈内では見かけ上変化しないかむしろ減少するものと考えられている．

しかし神経活動時のNIRSは健常者において必ずしも一様な変化を示すわけではない．言語活動時の左前頭葉におけるNIRS変化は3型に分類される[15]．パターンAは言語活動時に酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビンが増加するもの，パターンBは逆に酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビンが減少するものでパターンAとBでは還元ヘモグロビンは低下ないしは変化しない．パターンCは酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビンが増加し還元ヘモグロビンも増加するものである．これらの型のうちパターンAがもっとも多く見られる．このパターンの出現は年齢の影響を大きく受け，高齢では若年者にくらべパターンAの頻度は減少しパターンB, Cの頻度が増加するのに対して，若年者ではパターンAが大半でパターンB, Cは少ない．また高齢者では言語活動時の

酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビンの増大反応が低下することも報告されている[9]．

また疾患によりこの反応が変化する．脳卒中後の失語症症例では言語活動時におけるNIRS変化はパターンCが最も多くなる[10]．失語症症例では言語活動に際し正常者よりも酸素消費量が亢進していることが推測される．健常者では言語活動に際し，左前頭葉のみならず左頭頂葉においても総ヘモグロビンと酸化ヘモグロビンの上昇がみられるが，アルツハイマー病では左頭頂部における両者の上昇はみられず，逆にともに減少することが報告される[3]．

精神神経科領域では精神分裂病（統合失調症）患者において mirror drawing task 施行時の両側前頭葉におけるNIRS変化を記録した報告がある[16]．健常者では左または両側前頭葉で酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビンは上昇し，還元ヘモグロビンは減少したのに対し精神分裂病症例では task 時に左前頭葉ではNIRSが変化せず右前頭葉で総ヘモグロビン，酸化ヘモグロビンがむしろ減少する変化や左前頭葉では総ヘモグロビン，酸化ヘモグロビンの上昇があるものの右前頭葉では逆に総ヘモグロビンが減少するなど奇異な現象（dysregulated pattern）が観られ半球間の統合障害と関連していると報告されている．

2. 術中モニタリング

脳神経外科領域では頚部内頚動脈狭窄に対する頚動脈内膜剥離術（CEA）において，術中頚動脈一時遮断に伴い発生する脳虚血の酸素代謝モニタリングとして用いられている．NIRSは前頭部よりモニターし，脳波やSEP（体性感覚誘発電位）と組み合わせて用いられている．内頚動脈遮断による脳虚血により通常酸化ヘモグロビンが減少し，還元ヘモグロビンが増加し，総ヘモグロビンとTOIは減少する．CEAの術中にNIRSとTranscranial Dopplerを用いた患側中大脳動脈のmean Flow Velocity（FV）の変動を比較すると[17]，内頚動脈クランプに伴い低下する酸化ヘモグロビン濃度とmean FVの減少は有意に相関した．また酸化ヘモグロビンが6.8 μM/l 以上低下した症例では，全例脳波の抑制化を来たし中大脳動脈血流速度が60%以上の低下する高度脳虚血を示し，酸化ヘモグロビンが5 μM/l 未満の低下にとどまった症例では高度脳虚血を呈した症例は皆無であったことからNIRSを用いて高度脳虚血を生じる閾値を求めることが可能であると報告されている[17]．TOI値については後述するが，我々の施設ではTOI値が内頚動脈遮断中に60%以上保たれることを指標としている．

またCEA以外に心臓血管外科手術の人工心肺中の脳虚血のモニタリングとしてNIRSが使用されている[5]．また内頚動脈閉塞術を要する脳動脈瘤症例では，処置に先行して内頚動脈バルーン閉塞テストを行なうが，テストの判定にNIRSが用いられている．

3. 救命救急領域におけるNIRO 300モニタリング

NIRO 300は近年開発された装置でありTOIの測定が可能である．それまでは酸化，還元ヘモグロビンの相対的変動の観察が可能であったものの絶対的指標がなく，症例毎の脳酸素代謝の経時的変化を観察することにNIRSが使用されてきた．このため症例ごとの酸素代謝障害の絶対評価は行なわれず，救命センターでのNIRSの使用は限られていた．TOIにより症例間の比較が可能となったが，TOIのモニタリングについての報告は少なく我々はTOIの変動と正常値と異常値について検討した[18]．当院でNIRO 300によりモニターした症例を以下に示す．プローブは前額部に装着した．また症例により全身の酸素代謝障害の指標として筋肉のNIRSを捕らえるために前腕部にもプローブを装着した．

症例1（第3図）：45歳　男性．意識レベル300（JCS）で入院した重症くも膜下出血の患者である．両側瞳孔散大しており保存的に加療したが次第に血圧低下，心停止にいたった．前額部に装着したプローブより脳のTOIを測定した．入院時は約50%であったが，血圧低下に伴い酸化ヘモグロビン（Hb O_2）は減少，還元ヘモグロビン（Hb R）は増加しTOIは低下した．TOIは心停止後約20%まで低下した．

第3図　症例1　心停止を来した症例におけるNIRS変化

第4図　症例2　くも膜下出血後再出血を来した症例における NIRS 変化

第5図　症例3　脳圧亢進症例における NIRS 変化

第6図　症例4　心肺停止後蘇生した症例における NIRS 変化

症例2（第4図）：84歳　女性．意識レベル100（JCS）で入院したくも膜下出血の患者で，両側の前額部にプローブを装着した．測定された脳の TOI は約55%であった．入院後再出血を来たし両側瞳孔散大した．再出血後酸化ヘモグロビンは急激に減少，還元ヘモグロビンは増加し TOI は急速に低下し40%台となった．

症例3（第5図）：51歳 女性．重症くも膜下出血で入院．脳圧（ICP）をモニターし，さらに NIRS プローブを前額部，上腕部に装着した．脳圧亢進し意識レベル300（JCS），両側瞳孔散大となった．脳の TOI（前額部 TOI）は筋肉の TOI（上腕部 TOI）より低く，脳圧亢進に伴い脳の TOI は徐々に低下したが筋肉の TOI は保たれていた．その後血圧低下し TOI は両者とも低値となった．

症例4（第6図）：50歳　男性．心肺停止で来院，心肺蘇生術施行後心拍再開した．前額部，上腕部より測定した脳と筋肉の TOI はそれぞれ約25%，40%で心マッサージ中は特に変化を認めなかったが，心拍再開し血圧上昇後，酸化ヘモグロビンは増加，還元ヘモグロビンは減少し TOI は増加した．筋肉の TOI が脳の TOI よりすみやかに60%以上に回復したが，脳の TOI は50%未満でその後意識の回復は見られなかった．

4.　脳の TOI 値

1）正常値（第1表）

我々は TOI の正常値を検討するため健常人5人の脳と筋肉の TOI を測定した．

プローブは前額部と前腕に装着した．脳の TOI は65～82%（平均 75.4 ± 7.5%）で筋肉の TOI は67～73%（平均 69.4±2.9%）であった．脳の TOI 値は筋肉の TOI 値より有意に高値であった[18]．

第1表　各疾患における TOI

疾　患	n	TOI	% (mean±SD)
健常者	5	TOI-A	69.4±2.9
		TOI-B	75.4±7.5
CPA	4	TOI-A	34.2±8.3
		TOI-B	23.2±4.1
SAH	14	TOI-A	68.8±3.4
		TOI-B	55.6±7.3
CPAR	4	TOI-A	70.2±3.4
		TOI-B	46.2±5.9

TOI-A：筋肉の TOI　TOI-B：脳の TOI

CPA：心肺停止　SAH：くも膜下出血　CPAR：心肺停止蘇生後

2）脳損傷時のTOI

重症な脳障害例でTOI値を測定したところ，救命救急センターに搬入された心肺停止患者（CPA）では脳のTOIは平均23.2±4.1%（n=4, 22-40%），筋肉のTOIは34.2±8.3%まで低下しており両者とも正常者に比べ有意な低下であった．心肺停止蘇生後症例（CPAR）では脳のTOIは46.2±5.9%（n=4, 42-55%）と正常に比べ有意に低く，筋肉のTOIは70.2±3.4%と回復していた．重症くも膜下出血で昏睡状態の症例では脳のTOIは55.6±7.3%（n=14, 39-68%），筋肉のTOI値は66.8±3.4%であった．これら疾患群においては脳のTOI値は健常者のTOI値より有意に低く，またいずれの群でも脳のTOI値は筋肉のTOI値より低下していた．

3）脳と筋肉のTOIの比較

脳と筋肉のTOIを測定することにより脳と全身の酸素代謝状態を比較検討することができる．健常人では脳のTOIは平均75.4±7.5%で筋肉のTOI（平均69.4±2.9%）より有意に高値を示した．NIRSではその測定データは主に静脈血の酸素状態に影響されると考えられているが脳の酸素摂取率は他臓器より高いため内頚静脈酸素飽和度は混合静脈血より低値を示すと言われ，脳のTOIが筋肉のTOIを下回ることが推測されたが，実際は逆であった．しかし前述したようにTOI値と内頚静脈酸素飽和度を比較検討すると必ずしも相関はないことが示されおり，臓器別に固有の値を示すものと考えられる．脳に障害があると脳と筋肉のTOI値が逆転して脳のTOI値が筋肉のTOI値より低下する[18,19]．心肺停止蘇生後症例（CPAR），重症くも膜下出血症例では前述のごとく，脳のTOI値は筋肉のTOI値より低く，その差は有意である．この逆転現象をモニターすることにより脳の障害を評価することが可能である．

NIRSを用いたモニタリングの解釈

連続モニターすれば酸化，還元ヘモグロビン濃度の相対的変化により脳の酸素代謝異常を捕らえることはもちろん可能で確実であるが，症例間の比較は不能である．ではTOI値のみで脳の酸素代謝異常を検出できるのであろうか．健常者のTOIは75.4±7.5（n=5），重症くも膜下出血症例では55.6±7.3（n=14）で，CPARでは46.2±5.9（n=4），心肺停止症例（CPA）では23.2±4.1（n=4）であった．これら疾患群におけるTOIの低下は健常者と比較して有意であった．このようにTOI値が各疾患で有意に低下すること，またCPAでもっとも低いTOIが示されることはTOI値のみで脳酸素代謝の異常を検出することが可能であることを示唆している．

健常者では全例脳のTOIは63%以上であった．CPARでは42-55%，CPAでは22-40%で全例60%未満であった．正常値を求めるにはさらに症例を増やさねばならいが，60%未満は異常であることが示唆される．重症くも膜下出血では39-68%で60%以上が3例あった．NIROの測定領域に血腫が存在するとそのヘモグロビンによりTOI値が影響されることが言われており，出血症例ではTOI値の信頼性に注意すべきかもしれない．脳のTOI値が60%未満なら酸素代謝障害の異常が示唆されるが，60%以上なら正常であるとは必ずしも言えないことにも留意すべきである．正常では脳のTOI値は筋肉のTOI値より高く示されるが，これを利用して脳酸素代謝の異常を検出することも可能であるが，脳のTOI値が60%以上でも筋肉のTOI値を下回っていれば脳酸素代謝障害の存在が示唆される．脳梗塞症例においてもその逆転がみられる[18,19]．

またTOI値は脳の局所の値のみを反映しており，測定部位によりfocal lesionの異常を検出できないことに留意すべきである．いわゆるglobal brain damageを生じるような血圧低下や脳圧亢進，低酸素血症などでは前額部からのモニターで異常を検出することが可能な良い適応であると思われる．

近赤外線分光分析装置の発達により簡便に酸素代謝情報の絶対値まで評価することが可能となったが，その特性に留意すれば手軽に有用な脳の酸素情報を得ることが可能と思われる．またその非侵襲性ゆえ起立性低血圧[20]や精神科領域の臨床研究[16]にも広く応用されており，今後の発展が期待される．

文　献

1）片山容一，酒谷薫：臨床医のための近赤外分光法（日本脳代謝モニタリング研究会編集）．新興医学出版社，p. 1-10，2002

2）Gratton G, Maier J, Fabiani M, Mantulin W, Gratton E：Feasibility of intracranial near-infrared optical scanning. Psychophysiology 31：211-215, 1994

3）Hock C, Villringer K, Muller-Spahn F, Wenzel R, Heekeren H, Schuh-Hofer S, Hofmann M, Minoshima S, Schwaiger M, Dirnagl U, Villringer A：Decrease in parietal cerebral hemoglobin oxygenation during performance of a verbal fluency task in patients with Alzheimer's disease monitored by means of near-infrared spectroscopy（NIRS）-correlation with si-

multaneous rCBF-PET measurements. Brain Res 755：293-303, 1997

4) Al-Rawi PG, Smielewski P, Kirkpatrick PJ：Evaluat ion of a near-infrared spectrometer (NIRO 300) for the detection of intracranial oxygenation chages in the adult head. Stroke 32：2492-2500, 2001

5) amashita K, Kazui T, TeradaH, Washiyama N, Suzuki K, Bashar AHM：Cerebral oxygenation monitoring for total arch replacement using selective cerebral perfusion. Ann Thorac Surg 72：503-508, 2001

6) Gopinath S, Robertson CS, Contant CF, Narayan RK, Grossman RG, Chance B：Early detection of delayed traumatic intracranial hematomas using near-infrared spectroscopy. J Neurosurg 83：438-444, J Neurosurg 1995

7) Kleinschmidt A, Obrig H, Requardt M, Merboldt KD, Dirnagl U, Villringer A, Frahm J：Simultaneous recording of cerebral blood oxygenation changes during human brain activation by magnetic resonance imaging and near-infrared spectroscopy. J Cereb Blood Flow Metab 16：817-826, 1996

8) Hirth C, Obrig H, Villringer K, Thiel A, Bernarding J, Muhlnickel W, Flor H, Dirnagl U, Villringer A：Non-invasive functional mapping of the human motor cortex using near-infrared spectroscopy. Neuroreport 7：1977-1981, 1996

9) Hock C, Muller-Spahn F, Schuh-Hofer S, Hofmann M, Dirnagl U, Villringer A：Age dependency of changes in cerebral hemoglobin oxygenation during brain a ctivation：A near-infrared spectroscopy study. J Cereb Blood Flow Metab 15：1103-1108, 1995

10) Sakatani K, Xie Y, Lichty W, Li S, Zuo H：Languag e-activated cerebral blood oxygenation and hemodynamic changes of the left prefrontal cortex in poststroke aphasic patients A near-infrared spectroscopy study. Stroke 29：1299-1304, 1998

11) Kato T, Kamei A, Takashima S, Ozaki. T：Human visual cortical function during photic stimulation monitoring by means of near-infrared spectroscopy. J Cereb Blood Flow Metab13：516-520, 1993

12) Meek JH, Elwell CE, Khan MJ, Romaya J, Wyatt JS, Delpy DT, Zeki S：Regional changes in cerebral haemodynamics as a result of a visual stimulus measured by near infrared spectroscopy. Proc R Soc Lond B 261：351-356, 1995

13) Heekeren HR, Obrig H, Wenzel R, Eberle K, Ruben J, Villringer K, Kurth R, Villringer A：Cerebral haemoglobin oxygenation during sustained visual stimulation-a near -infrared spectroscopy study. Phil Trans R Soc Lond B 352：743-750, 1997

14) Fox P, Raichle ME：Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. Proc Natl Acad Sci USA 83：1140-1144, 1986

15) Sakatani K, Lichty W, Xie Y, Li S, Zuo H：Effects of aging on language-activated cerebral blood oxygenation changes of the left prefrontal cortex：Near infrared spectroscopy study. J Stroke Cerevrovascular Dis 8：398-403, 1999

16) Okada F, Tokumitsu Y, Hoshi Y, Tamura M：Impaired interhemispheric integration in brain oxygenation and hemodynamics in shizophrenia. Eur Arch Pschiatry Clin Neurosci 244：17-25, 1994

17) Kirkpatrick PJ, Lam J, Al-Rawi P, Smielewski P, Czosnyka M：Defining thresholds for critical ischemia by using near-infrared spectroscopy in the adult brain. J Nerusurg 89：389-394, 1998

18) 堀口崇，斎藤良一，各務宏，山本紳一郎，菊野隆明，中村芳樹，市来嘉潔：重症脳損傷患者における近赤外線分光分析装置（NIRO 300）を用いた脳酸素代謝障害の評価．日本救急医学会雑誌，12：1-10，2001

19) 堀口崇，斎藤良一，稲枡丈司，山本紳一郎，菊野隆明，中村芳樹，市来嘉潔：救命救急センターにおける近赤外線分光分析装置（NIRO 300）を用いた脳酸素代謝障害の評価 －第二報－．日本救急医学会雑誌，13：174-182，2002

20) Harms MPM, Colier WNJM, Wieling W, Lenders JWM, Secher NH, Lieshout JJ. Orthostatic tolerance, cerebral oxygenation, and blood velocity in humans with sympathetic failure. Stoke 31：1608-1614, 2000

慶應医学・81(2)：117～123，2004

講　座

無力妄想について

慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室
濱田秀伯（はまだ ひでみち）

Key Words：delusion, paranoia, psychasthenia, psychopathology, schizophrenia

無力妄想 asthenic delusion は著者の造語である．強力性のパラノイアの対極に位置する無力性，すなわち確信に満ちた他罰・闘争的な体系妄想ではなく，不安と疑惑の中を揺れ動きながら，自己を卑下して引きこもりがちになる軽い非体系妄想を指している．ある時は人格障害に，ある時は神経症にも見えるこの妄想が，統合失調症とその周辺領域の症状形成を考える示唆を与えてくれる．本講座の目的は，精神病理学の立場から無力妄想の概念を紹介することにあり，具体例を1例挙げながら，症候学，転帰，症状形成，治療を述べ，その臨床に占める意義を示すことにする．

歴史的な展望

1．ドイツ語圏

19世紀のドイツにおいて思考，知性面の機能精神障害を広く包括する概念であった偏執狂 Verrücktheit を，パラノイアへと発展させたのは Kraepelin, E である．彼は一方で今日の統合失調症の先駆概念である早発痴呆を，他方で気分障害に相当する躁うつ病を念頭に置きながら，偏執狂を縮小し，妄想疾患としてのパラノイアを確立していった．教科書5版（1896）において，パラノイアは「分別が完全に保たれながら持続性で揺るぎない妄想体系が極めてゆっくりと形成されてゆく」慢性に進行する不治の妄想と定義され，6版（1899）ではそのうち幻覚のあるものは早発痴呆へ移され，エネルギッシュに復権行為を繰り返す好訴妄想が中核になった[1]．

19世紀末から20世紀初頭にかけて，こうした強力性のパラノイアに対して，無力性の妄想が注目され始めた．Friedmann, M[2]は1905年に，30歳台の女性に生じる治癒性の被害妄想を，軽症パラノイア型 milde Paranoiaform の名で記載した．幻覚はみられず，分別は保たれ，適応能力の低下もなく，3年前後の経過で治癒に至る．彼はこの妄想を，ある素質の上に葛藤体験が加わって発病するパラノイアの変種と考えた．

Gaupp, R[3]は1910年に，従来のパラノイアとは対蹠的な臨床像の頓挫パラノイア abortive Paranoia を記載している．弱力性体質をもつ25～45歳の男性に徐々に現れる被害関係妄想で，幻覚はみられず，空想・誇大的でなく論理性が保たれ，利己・闘争的ではなく，むしろ自己卑下，抑うつ傾向が病像を支配し，寛解と増悪の経過をたどり部分的な病識をもつ．妄想を育む弱力性の体質とは，良心的で自信がなく，小心翼々と他者の目を気にして反省を繰り返す性格傾向を指しており，後に述べる Claude, H の統合失調体質に近い．

Kretschmer, E[4]は1918年に，性格，体験，環境の要素からなる敏感関係妄想を提唱した．土壌になる敏感性格は，基本的にやさしさ，弱さ，傷つきやすさなど無力優位ながら，同時に強力性の自尊心や野心をあわせもつ特徴がある．こうした性格の人に，不全感や敗北感を伴う体験が加わると，内的緊張が高まり妄想に転化するという．

こうした流れを受けて教科書8版（1909～15）の Kraepelin, E は，初めて軽症パラノイアや頓挫パラノイアの存在を認めている．この版では好訴妄想が心因疾患に分類され，パラノイアは傷つき易さと自負がまじりあって社会適応が困難になる少数の妄想に限定されることになった．以後，その独立性や統合失調症との関連をめぐる議論が絶えない[1]．

2．フランス語圏

フランスにおけるパラノイアの原形は，Esquirol, JED（1838）[5]の記載したモノマニー，すなわち発揚・熱情性の部分精神病である．Sérieux, P と Capgras, J[6]は1909年に，多様な妄想解釈を形成しながら拡散的に発展する解釈妄想と，執拗な支配観念にとらわれ慢性興

奮のなかで損害の補償を求めて行動する復権妄想を記載した．前者はKraepelin, Eの8版のパラノイア，後者は好訴妄想に相当する．今日のフランスにおけるパラノイアとは，一般にこの2つの類型を挙げるが，いずれもパラノイア人格の上に生じる強力性の妄想で，互いに移行がある．

一方，無力優位の妄想もさまざまな名称で記載されている．Ballet, Gは1892年に，マスターベーションや放蕩に関する心気的なこだわりと引け目が強く，周囲から嫌がらせをされると訴える自責的被害者 persécuté auto-accusateur を学会報告した．Séglas, J[7]は1894年にこれを取り上げ，ふつうの被害妄想患者とは対照的に控えめな性格で，些細な性的，宗教的な過ちを誇張して自分を恥じ，向けられる非難をやむをえないと感じる点に特徴を置いた．

これらをふまえてArnaud, FL[8]は1903年に，慢性体系妄想を発揚型と抑うつ型に分け，後者に一次性体系自責妄想 délire systématique primitif d'auto-accusation を記載した．内気で小心だが，自尊心が強く挫折しやすい，いわば敏感性格者の妄想で，外に向かう遠心性ではなく，ひたすら自身の人間性にこだわり，自分は人間として生きる資格がないと思いこむ．幻覚はなく知的活動も十分に保たれ，潜伏期，状態期，常同期の3病期で進展し，最終段階でも痴呆にはならないとされる．

Claude, H[9]は1926年に，闘争的なパラノイア体質とは対蹠的に，夢想的，現実逃避的な統合失調体質を記載し，これが病的な類統合失調症 schizomanie に進展すると考えた．類統合失調症は，自閉的で知的解離を示し，困難を回避するために急性錯乱や衝動行為を起こすが病識は保たれている．

Capgras, J[10]は1930年に，解釈妄想の無力類型を，新たに弱力性解釈妄想 délire d'interprétation hyposthénique の名で記載した．周囲の出来事，偶然の一致を自分に結びつける点で解釈妄想と同じ構造をもっているが，迷いと憶測を繰り返して確信に至ることがない．入院は不要で精神療法にある程度は反応し，長い寛解時には社会生活も可能だが，完全に治癒することはないとされている．彼はこの妄想を精神衰弱とパラノイアの中間ないし移行型と見て，Friedmann, Mの軽症パラノイア型，Gaupp, Rの頓挫パラノイア，Kretschmer, Eの敏感関係妄想などに近いと考えた．

3. わが国

統合失調症と神経症の両方の特徴をもち，どちらにも当てはまらない一群の患者は従来，境界例，偽神経症性統合失調症などと呼ばれてきた．こうした境界領域において，わが国では1960年代から，自分の体から悪臭が漏れ出て他人から嫌われると確信する一群の青年患者が，自己臭症あるいは自己臭恐怖などの名で注目されるようになった．体感異常を伴い，多くは自責と微小妄想を前景に単一症候性に経過するが，一部は統合失調症に移行する．疾患分類上は重症対人恐怖，思春期妄想症，パラノイアなど議論がある[11,12]．

藤縄[13]は1972年に，自己臭恐怖，自己視線恐怖，考想伝播，独語妄想などに共通する，自分から何かが外に漏れ出ていく，という要素を自我漏洩症状としてまとめた．妄想は被害ではなく微小・罪業主題をとり，体系化に乏しい．外から内へ侵入する被影響現象とは対極に位置する統合失調症の類型ともみなされる．

関[14]は1980年に，世界へ害毒を流していると訴える5例の女性を，統合失調症性加害妄想として報告した．いずれも良心的，責任感の強い性格をもち，体験の方向が遠心的で，狭義の自我意識障害を欠き，自他未分化で妄想的他者は現れず，自分が将来犯す可能性のある罪を先取りする未来志向で物語性に乏しく，自己の存在を否定して世界秩序の回復を図ろうとするコタール症候群の巨大妄想に類似した側面をもつという．彼はこの妄想を，パラノイアに代表される解釈を主体とする迫害妄想の対極に位置付けた．

中安[15]は1980年代に，顕在発症に先立つ初期統合失調症の主症状として，自生体験，気付き亢進（知覚過敏），漠とした被注察感（まなざし意識性），緊迫困惑気分を抽出した．これらの中にも，自分のせいで相手を嫌な気分にさせると悩む自責の強い無力性の患者が含まれており，緊迫困惑気分から対他緊張を生じ，加害・自罰性へ進展したものとされている．

著者が無力優位の妄想患者に関心を抱いたのは1970年代後半である．40歳以降に初発する遅発性妄想が回復期に無力性のうつ状態を生じること[16]，パラノイアの典型とされる嫉妬妄想に敏感関係妄想に似た無力性の類型がみられること[17]に気付いた．臨床経験を積むうちに，エネルギッシュで乱暴なパラノイア患者，衝動行為を繰り返す境界例患者が，こころの奥深くに低い自己評価を抱えており，統合失調症の幻聴が実は自責の声であり[18]，被害妄想はその強迫的な自責を他罰にすりかえたものとして理解できるようになった[19]．無力妄想の語を使用したのは1994年である[20]．2002年にこれらをまとめ，Ey, Hの器質力動説，Laborit, Hの侵襲学を援用して，無力妄想の本質が外部環境から独立しようとする主体の自由にかかわる問題にあり，進化した脳をもつ人間に宿

命的に内在する病態であることを論じた[21]．

症例呈示

19歳　女性

生来明るく元気な子だったのに，14歳ころから人前で緊張しやすくなり，理由なく気分が落ち込むようになった．明るい未来が開かれず，何をしても失敗しそうな，たとえ達成できても虚しい気がして，生きていることそのものが辛い．理想を掲げて気高く生きる自信がなく，ほかの人が楽に生活している様子が不思議でたまらず，存在価値のない自分を責める．

15歳時，読書のストーリーは分かるが，作者の意図がうまくつかめない．音楽を聴いても，音の羅列が体内を通り過ぎるだけで共感することができない．外界の遠近感が無くなり，景色が平板に見え，目の前の人が遠くに感じたり，手に持っている携帯電話が小さく見えたりする．自分の身体に確かな実感がもてない．わからないので必死につかもうとしてもがくと，動作がぎこちなくなる．空白な未来が不安で，予定や約束をたくさん入れ，疲れるのもかまわず毎日のように外出する．

16歳時，一人でいるととりとめなく考えが湧いてくる．聴きなれたCMソングがよみがえる．過去の思い出などがイメージで出てくることもある．自問自答を繰り返し，ついとらわれて長時間ふけってしまう．遠くを走る車の音が耳について離れず，光がまぶしくなり，視野の周囲がくっきり見える．エアコンの音が工場の騒音のように大きく，かけている毛布がまるで岩のように重く感じる．

17歳時，周囲から圧倒され，すべてが受身にまわるようになった．人目が気になり，非難されているように感じる．他人と自分を比べてあせってしまう．誰もが持っている当たり前のものを自分は持ちそこなっている．ものごとを知らず幼稚で，そばを通るだけで他人に不快を与えている．人間として生きている意味がない，他人から見放され，見捨てられると思ってしまう．

18歳時，全身倦怠と集中力低下を訴え，進学を断念して部屋に閉じこもりがちとなった．近況を知らせる友人からの年賀状を見るのが怖い．彼らの大学入学，就職など新しい活動を知ると，自分一人が取り残されるように感じる．他人と会うのは怖いが，一方で誰からも愛されたい．自分の考えにこだわり，我を通そうとして家族をふりまわす．親の愛情が実感として感じられない．とくに「早く進路を決めるように」「世間の常識では」という話題になると，「自分を分かってくれない」と怒りだし，家族にあたりちらす．

19歳時，自分をコントロールできず，衝動的に傷つけたくなる．周囲の出来事にまきこまれやすく，両親が口論すると自分のせいではないかと思い，不安で声が出なくなる．一方，世間を醒めた目で見るようにもなってきた．頭の中で自分を責める声が聴こえる気がする．明瞭な声はでなく声と考えの中間で，自問自答のようでもあり，責める部分に他人のようなニュアンスもある．初診時のDSM-IV[22]による診断は，I軸は社会恐怖，II軸は境界性人格障害である．

症候学

感情面では，漠然とした全般性不安と，軽い持続性の抑うつ気分の中にある．何をしても失敗しそうな将来への予期不安，周囲から忌避される見捨てられ不安の形をとりやすい．気分変動，空虚感，絶望感，アンヘドニア（快楽消失），対人場面で緊張しやすい対人恐怖，他人を傷つけたのではないかと悩む加害恐怖などで，自責的になる一面で無感情にもなる．

思考面では，一人でいる時にとりとめない考えが湧いてきて，堂々巡りする自生思考がみられる．集中力が低下し，軽い連合弛緩があり，表面的なことはわかるが，会話に含まれた意味，ドラマの意図などが捉えられない．周囲の出来事をすべて自分に結びつける関係妄想は，無力妄想の主体となる症状である．患者の自己評価は低く，主題は基本的に微小妄想であるが，一過性の被害妄想を抱くこともある．いずれも半信半疑，浮動性で，ある程度は訂正と了解が可能な妄想様観念である．確信に近い優格観念や侵入性の強迫観念になることもあるが，体系妄想にはならない．

知覚面で目立つのは，感覚過敏と知覚変容である．遠くの音，生活騒音，陽光，かすかな臭いなどが強く感じられ，普段は気に留めない視野の周辺，身体の位置や習慣動作などに注意を奪われる．内部の主観空間には仮性幻覚を生じる．聴覚領域には聞きなれたメロディがよみがえる聴覚表象ないし音楽幻聴[23]，頭の中で反省，反芻する自問自答，視覚領域には過去の場面が映像で浮かぶ記憶性視覚表象[24]などである．いかにもありそうな架空の会話や空想表象，言葉が外に漏れ出る言語性精神運動幻覚，考えが声になって聴こえる考想化声[25]を伴うこともある．

解離性ないし転換性症状として，一過性の失声，運動障害，健忘，もうろう状態，ガンザー症候群などを生じることがある．

意志・欲動面では，意欲が減退し自発性が低下する．微小妄想による自責を避けて自ら身を退き，自閉的になりやすい．一方で抑制がきかず，過食，自傷などの衝動行為，確認を主体とする強迫行為を生じることもある．

こうした精神活動全般の中核を占め，多彩な症状をもたらすもとになるのは自我意識の障害である．Jaspers, K[26]は，自我意識に能動性意識，単一性意識，同一性意識，外界に対立する自我意識の4つを区別した．これら自我意識の脱落と症状との関連は，病像の形成の項で述べることにする．

経過と転帰

多くは10歳台後半の青年期，早ければ7歳ころ，遅いと30歳を過ぎてから人格変化の形で発病する．最初は患者の内面に，何かが失われて自分が低格化したという無力性の自責感と，未来が閉ざされて生きていきにくい束縛感を生じる．Hecker, E[27]が破瓜病に記した「はっきりとしない，言いようのない悲哀感と心的な被圧迫感」，Ballet, G[28]が慢性幻覚精神病の初期に重視した不全感，あるいはConrad, K[29]のいう統合失調症のトレマに近いもので，臨床的には漠然とした軽い抑うつにも見える状態である．病初期には必ずしも持続的でなく，しばしば「理由なく落ち込みを繰り返す」などと訴える周期性気分変調の形をとる．症状未分化な一種の人格障害であるが，この段階で内面の変化を周囲に気付かれることは少なく，精神科を受診することもほとんどない．

数か月から数年後に，内的な体験は身体と外界へ広がり，現実生活の困難や社会的コミュニケーションの支障をもたらす．中核をなすのは加害的な対人恐怖ないし社会恐怖である．患者は，低格化した自分に負い目を感じ，周囲に不快を及ぼしていると確信し，家族や世間から見捨てられることを恐れる．世間を恐れて引きこもりがちとなり，些細なことに傷ついて食行動の異常や，リストカット，抜毛などの自罰行為に走り，学業や就職が長続きしない．この段階における診断は，前景にたつ病像によりいわゆる境界例，さまざまな神経症，摂食障害，適応障害，ストレス反応など多岐にわたる．患者の外見や疏通性は十分に保たれているものの，こだわりが強く変化を嫌うので，どこか不安定でバランスの悪い印象を気付かれることがある．

一般に無力妄想は，状況に応じて寛解と悪化を繰り返しながら動揺性に経過するが，さらに進行して病像が変化する例もある．すなわち，言語幻聴と被害妄想を生じて統合失調症に，復権行為が頻発してパラノイアへと進展する可能性をもつ．治療開始から寛解までに，およそ2～3年を要する．

病像の形成

Ey, H[30]は，Jackson, JHによる神経系の進化と解体の理論を発展させ，新ジャクソン学説あるいは器質力動説の立場から，精神機能の最上層に解剖学的構造とは対応しない時間展開をもつエネルギー体系を想定した．何かしら不明の，おそらくは非特異的な侵襲が加わり，最も上位でかつ最も脆い層に軽い全般的な解体を生じると，自由な生の流れは弛緩し，患者は自らを時間化させて未来を開くことが出来なくなる．この自由の制限restriction of freedomが，器質力動説でいう陰性症状に相当するもので，無力妄想の基本障害である．

主体の自由が制限された最も早い表現は，精神活動全般を司る自我意識，とりわけその同一性意識に現れる．同一性意識が脱落すると，時間軸に沿った自我の一貫性が失われるので，患者は視点を内部で自在に移動させることができない．過去は断片化して自生思考や記憶表象などの自動症となり，未来への展望は開かれず，患者は目的を失い，いま何をなすべきかが分からなくなる．それは自らを未決定の未来に投げ，「いま・ここ」を超越して高みを志向する自由を奪われることであり，患者は言い知れぬ空虚感，絶望感，アンヘドニアの中に置かれる．「理想が描けない」「生きる意味が分からない」など，自己評価の低い自責的な訴えはここから生じる．

自我意識の障害は，しだいに能動性意識，単一性意識，外界に対立する自我意識へと広がり，離人症，二重自我，自我境界の希薄化などをもたらす．離人症では，外界，記憶，行動などの現実感，空腹や満腹感などの身体感覚が希薄になり，家族の愛情や他人の言葉のニュアンスが捉えにくくなる．自生思考，記憶表象などの自動症は，二重自我を生じることにより，異質なものが意識に押しつけられる強迫観念，強迫表象へと転じてゆく．自我境界に障害が及ぶと，患者は周囲にまきこまれ，雰囲気にのまれて気おされるので，なすことのすべてが受身に回りがちになる．自我境界が微かに破綻した状態を，Schneider, K[31]は自我・外界関門の透過性亢進と呼んでいるが，自己評価の低い患者が些細な状況変化に動揺し，出来事をすべて自分に結びつけるところから自我漏洩症状へと発展する．

Conrad, K[29]はゲシュタルト分析の立場から，統合失調症の初段階にある患者は視点の変換ができず，全体の関連系から脱落するために背景と前景の区別がつかなく

なり，自責感，不信感，罪業妄想を抱くと考えた．視点を自分から離し，立場を変えてさまざまな角度から見ることができないと，客観的な自己像が描けず，対象の捉えかたも一面的になる．患者は他人と比較して自らの欠点を詮索し，世間からどう見られるかばかりを気にして，むしろ周囲のほうを自分に合わせようとする．自分には何かが足りないと強迫的に反省する「自然な自明性の喪失（Blankenburg, W）」[32]，世間から見放されることを恐れる「見捨てられ不安（Masterson, JF）」[33]，対象を部分的にしか捉えられない「部分対象関係（Klein, M）」[34]，all or none な「反立的態度（Minkowski, E）」[35]，しばしば境界例に指摘される他人への操作 manipulation[36]などを，このように考えると症候学的に理解しやすいように思う．

器質力動説の陽性症状とは，上層の脱落部分を補う下層の活動表現とされている．患者が制限されつつある自由を取り戻し，精神的ホメオスタシスを維持するために自ら行う対処行動 coping のことであるが，無意識的な場合は一種の防衛機制とみなすこともできる．いずれも行き過ぎた過剰な形をとり，かえって患者の不自由を増強する結果になりやすい．不安や恐怖を機械・反射的に回避するものが解離，いわゆるヒステリーであり，患者なりに工夫をこらし力動的な解消を試みると強迫行為になる．

視点を未来に動かせず，先が読めない患者は，しばしば未来を先取りする行為を起こす．先のスケジュールを隙間なく入れ，空白を埋め尽くした予定表にしたがって生活することにより，未決定の要素を排除しようとする．これは統合失調症患者に特有のありかたとして，わが国で微分回路的認知の優位（中井久夫）[37]，アンテ・フェストゥム構造（木村 敏）[38]などの名称で注目されてきた現象に相当する．

現実感のなさ，不確かな印象を確かにするために，患者は複数の感覚を動員し，自らの知覚レベルを1段階高く設定し直す．これが患者に内的な過度覚醒をもたらし，外界に対して感覚過敏，実体意識性，妄想知覚の本質属性などを，身体には心気症，異常体感などを引き起こすのである．衝動的な過食やリストカット，自問自答を声に変換して耳から入れる考想化声[25]，表象の空想加工[24]なども，こうした確認強迫の側面をもっている．

自由が制限されて能動的に行動を起こせない患者は，行動を決めてくれる規範を，目に見える具体的な形で外に求めようとする．世間と自身を納得させやすい法律，資格，成績，順位などであり，摂食障害の患者が頑なに数値にこだわるのも，境界例の患者が流行に敏感で浪費に走るのも，それを達成することで低い自己評価を補い，世間から見捨てられまいとする過剰な自助努力である．

治　療

無力妄想の進行は一般に破壊的ではなく，患者自身にも周囲にもそれと気付かれず，数年を緩慢に経過した後に受診する場合が多い．その間に，陰性症状と陽性症状，患者の自助努力，年齢的な成長，自生的回復などが混じり合い，病像を複雑にする．治療者が最初になすべきは，これらを整理し，治療方針を明らかにすることである．

薬物療法の目的は，病気の進行を阻止し，過剰な生体反応を抑制し，自己治癒の機制をうながすことにある．Laborit, H は，侵襲学の立場から病気を，侵襲を受けた生体が環境に対する自律性を保とうとして起こす不調和反応とみて，その治療には生体の防御反応を強化するのではなく，逆にすべての物質代謝を低減させる人工冬眠を提唱した[39,40]．これを無力妄想の陽性症状にも適用できるとすれば，単一受容体に選択性の高い，賦活効果にすぐれた薬物より，むしろ複数の受容体に鎮静効果をもつ薬物（chlorpromazine, sulpiride, quetiapine など）が有効である．

無力妄想の病像はうつ状態にも見えるが，一般に抗うつ薬の効果は少ない．三環系抗うつ薬やセロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）は，睡眠障害，抑うつ気分，自発性低下，強迫症状などにある程度有効であるが，患者を過度覚醒にし，抑制を消失させて衝動行為を助長する場合も少なくないので，第一選択にはせず，抗精神病薬による効果を確認した後に併用する．気分変動や周期性気分変調に対しては，むしろ炭酸リチウム，抗てんかん薬（carbamazepine, sodium valproete など）が有効である．これらを組み合わせ，症状の推移をみながら修正を繰り返し，最終的には複数の系のバランスを整える少量の処方に収斂させる．

精神療法の目的は，無力な患者を支え，自助努力の方向を是正し，社会的な自立を促すところにある．自己評価が低く，内面に深刻な自責を抱える患者を，まず全体として受け容れる態度で接する．それには解釈を主体とする古典的な精神分析ではなく，むしろ支持的な個人精神療法が望ましい．治療者は患者の生きていきにくさ，辛さに共感し，不安から逃れるために，見捨てられないために，自責を軽くするために，逸脱行動に向かわざるを得ないことを，了解することから始める．

薬物により考想化声，妄想，強迫などの陽性症状が消失すると，患者はかえって支えを失い，見通しの定まら

ない空虚感の中に陥りやすい．精神病後抑うつと呼ばれる段階で，脱落性の陰性症状に回復時の目覚め現象 awakenings が混じり合う，不安定で複雑な病像である[41]．無力妄想の全経過中，患者にも治療者にも試練となるこの数か月間は，精神療法を最も必要とする期間である．治療者は患者に，再び病的な対処行動に戻ることなく，現実に生きる場所と安全を保障しなければならない．それは寄り添いながら当面の目標を設定し，生活態度を改善し，患者の自立への歩みを少しずつ確かなものにする作業である．

精神病後抑うつを脱し，自己評価が上向き，回復の軌道が見え始めた患者に対しては，視点を内外で恐れずに変換させることを促す．他人の立場に立つ，対人関係を上から見るなどの視点の変化により，等身大の自己像を描くことが徐々に可能になる．治療者は患者に特定の理念や価値観を押し付けるのではなく，患者自らが過去の対人緊張を修復し，まだ少し残る自責を抱えながら周囲と新しい関係を築くことを見守るのである．

無力妄想の意義と疾患分類上の位置付け

無力妄想は独立した疾患形態ではなく，統合失調症を中核に，妄想性障害，パラノイア，パラフレニー，摂食障害，社会恐怖，強迫性障害，全般性不安障害，解離性障害，身体表現性障害，適応障害，気分変調症，境界性人格障害，回避性人格障害など，周辺領域の多様な精神障害の基底をなし，これらを結ぶ要となる病態である．前景を占める症状しだいで，ある時は人格障害に，またある時は神経症にも，軽い精神病にも単なる引きこもりにも見える．不安抑うつを基調とするが，内因うつ病とは，感情と意欲の症状が均等でなく，自我意識の障害を伴い，微小妄想の主題が日常卑近を越えて形而上学的になり，内省や詮索の執拗すぎる点などが異なる．

Ey, H は，急性精神病を意識野の病態，慢性精神病を人格の病態とみて，後者が解体レベルに応じて互いに移行しあう人格障害，神経症，慢性妄想ないし統合失調症，痴呆の表現をとると考えた．無力妄想も人格全体の解体であるから，その最も早い段階は症状未分化な人格障害の形をとる．すなわち，これまでとは異質な人格が生じる人格発展の屈折であり，この不連続が無力妄想を，生来性の異常人格に還元できない根拠である．見方を変えれば，従来は妄想を育む病前性格，体質などといわれてきたものが経過中の一病像にすぎず[42]，さらに統合失調症やパラノイアを，病態が進行して人格水準が低下し，病像変化と特有な社会困難を現した無力妄想の後半段階と考えることも可能である．

無力妄想の概念を導入することで，病気の全体像を捉えることができ，その中に占める患者の位置を知ることができるだろう．それはたとえば，ある時は摂食障害，ある時は強迫性障害などと入院ごとに診断が変わる患者，どの操作的診断基準をも満たさない患者を正しく理解することである．また，目の前の患者が境界性人格障害なのか，それとも統合失調症のはじまりなのかという果てしなく繰り返された議論に終止符をうち，統合失調症における早期診断・治療のプログラムに再検討を促すことでもある．こうして精神病理学は，これまで生物学，心理学，現象学などが別々に探求し，異なるアプローチを行ってきた対象を，同じ臨床の場に重ね合わせる役割を担うのである．

無力妄想はまた，本来の健全な精神，人間存在のありかたを改めて考える機会を与えてくれる．その長い診療を通して治療者は患者とともに，精神障害を単純に脳科学に還元しえないという印象を抱かざるをえず，自分の意志で未来を拓くこと，より高みを目指して生きようとすること，他人と協調しながら個を保つことなどが，人間にどのような意味をもつのかについて，深く思いをめぐらせる．そして精神医学の臨床には，知識や技術ばかりでなく，それらを越えてこころを通わせる側面が，どうしても欠かせないことに思い至る．生きる意味を信じる治療者のみが，それを失った患者に勇気を与えることができるからである．

文　献

1) Kraepelin, E, Lange, J：パラノイア論(内沼幸雄,松下昌雄訳)．医学書院，1976
2) Friedmann, M：Beitrage zur Lehre von der Paranoia. Monatschr Psychiatr Neurol 17：467-484, 532-560, 1905（精神医学，35：91-98, 209-216, 1993　茂野良一，佐久間友則，大橋正和訳）
3) Gaupp, R：Paranoische Veranlagung und abortive Paranoia. Centrablt Nervenheilkunde Psychiatrie NF 21：65-68, 1910
4) Kretschmer, E：敏感関係妄想（切替辰哉訳）．文光堂，1962
5) Esquirol, JED：Des maladies mentales considérées sous les rapports médical, hygiénique et médico-légal. Baillère, Paris, 1838
6) Sérieux, P, Capgras, J：Les folies raisonnantes：le délire d'interprétation, Alcan, Paris, 1909
7) Séglas, J：Leçons cliniques sur les maladies mentales et nerveuses. Asselin et Houzeau, Paris, 1895
8) Arnaud, FL：Psychoses constitutionnelles. Traité de Pathologie Mentale. (Ed) Ballet, G, Doin, 1903
9) Claude, H, Borel, A, Robin, G：Démence précoce,

schizomanie et schizophrénie. Encéphale 19：145-151, 1924（精神医学，33：1015-1023, 1991 荻生田晃代，濱田秀伯訳）
10) Capgras, J：Le délire d'interprétation hyposthénique, délire de suppositin. Ann méd-Psychol 88 T1：272-299, 1930
11) 正視恐怖・体臭恐怖（笠原 嘉編集）．医学書院，東京，1972
12) 村上靖彦：「思春期妄想症」30年間の研究の流れ．臨床精神病理，23：3-12, 2002
13) 藤縄 昭：自我漏洩症状群について．分裂病の精神病理1（土居健郎編集），東京大学出版会，1972
14) 関 忠盛：分裂病性加害妄想について．臨床精神病理，1：195-209, 1980
15) 中安信夫：分裂病症候学．星和書店，1991（増補改訂版，2001）
16) 濱田秀伯：40歳以降に初発する幻覚妄想状態の臨床的研究－特に予後の見地から．慶應医学，55：111-132, 1978
17) 西園 文，荻生田晃代，深津千賀子ほか：「敏感嫉妬妄想」の一症例．臨床精神病理，9：305-314, 1988
18) 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
19) 濱田秀伯，村松太郎，山下千代ほか：自責・加害的な強迫症状．精神医学，42：29-35, 2000
20) 濱田秀伯：精神症候学．弘文堂，1994
21) 濱田秀伯：精神病理学臨床講義．弘文堂，2002
22) American Psychiatric Association：DSM-Ⅳ精神障害の分類と診断の手引（高橋三郎，大野 裕，染矢俊幸訳）．医学書院，1995
23) 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
24) 森本陽子：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．慶應医学，81：31-47, 2004
25) 濱田秀伯，小野江正頼：考想化声．精神医学，43：8-16, 2001
26) Jaspers, K：精神病理学総論（全3巻）（内村祐之，西丸四方，島崎敏樹ほか訳）．岩波書店，1953
27) Hecker, E：破瓜病（渡辺哲夫訳）．星和書店，1978
28) Ballet, G：La psychose hallucinatoire chronique et la désagrégation de la personnalité. Encéphale 8 T1：501-508, 1913（精神医学，28：1405-1414, 1986 三村 將，濱田秀伯訳）
29) Conrad, K：分裂病のはじまり（山口直彦，安 克昌，中井久夫訳）．岩崎学術出版社，1994
30) Ey, H：ジャクソンと精神医学（大橋博司，三好暁光，浜中淑彦ほか訳）．みすず書房，1979
31) Schneider, K：Primäre und sekundäre Symptome bei der Schizophrenie. Fortschr Neurol Psychiatr 9：487-490, 1957
32) Blankenburg, W：自明性の喪失（木村 敏，岡本 進，島 弘嗣訳）．みすず書房，1978
33) Masterson, JF：Treatment of the adolescent with borderline syndrome (a problem in separation-individuation). Bull Menninger Clin 35：5-18, 1971
34) Klein, M：羨望と感謝．メラニー・クライン著作集5（小此木啓吾，西園昌久，岩崎徹也ほか編集，小此木啓吾，岩崎徹也訳）．誠信書房，1996
35) Minkowski, E：精神分裂病（村上 仁訳）．みすず書房，1954
36) Gunderson, JG：境界パーソナリティ障害－その臨床病理と治療（松本雅彦，石坂好樹，金 吉晴訳）．岩崎学術出版社，1988
37) 中井久夫：分裂病の発病過程とその転導．分裂病の精神病理3（木村 敏編集）．東京大学出版会，1974
38) 木村 敏：分裂病の時間論－非分裂病性妄想病との対比において．分裂病の精神病理5（笠原 嘉編集），東京大学出版会，1976
39) Laborit, H：侵襲に対する生体反応とショック－人工冬眠法の原理と応用（山口與市，土屋雅春，川村 顕，秋庭忠義訳）．最新医学社，1956
40) 土屋雅春：生体反応とアグレッソロジー．日本医学館，1994
41) 荻生田晃代：精神病後抑うつ状態（postpsychotic depression）を示した精神分裂病の経過類型に関する研究．慶應医学，67：1033-1050, 1990
42) 斎藤正範，濱田秀伯：分裂病とパラノイア人格の関係についての1考察．精神医学，38：1281-1286, 1996

慶應医学・81(2)：125～133，2004

講　座

外傷性脊髄損傷に対する神経幹細胞移植を用いた新規治療法の開発に向けて

[1]慶應義塾大学医学部整形外科学教室，[2]慶應義塾大学医学部生理学教室
小川祐人[1]・中村雅也[1]・戸山芳昭[1]・岡野栄之[2]

要　約

従来，成人の中枢神経系には組織再生能はないとされてきた．しかし，近年の神経科学の進歩により神経幹細胞と呼ばれる中枢神経系を構成するニューロン，アスロトロサイト，オリゴデンドロサイトの何れにも分化することができ（多分化能），かつこの様な分化能を保ちつつ増殖することが可能な（自己複製能）細胞が成人の中枢神経系にも存在することが確認され，障害された成人の中枢神経系組織においても何らかの方法を用いれば組織再生が可能ではないかと考えられるようになってきた．障害中枢神経系組織の組織再生を目的とした治療法のひとつとして，細胞移植による治療法が現在考えられている．神経幹細胞は前述の多分化能と自己複製能を持ち，かつ *in vitro* での培養が可能で旺盛な増殖能を持つ細胞であるため，移植細胞の候補として期待が持たれている．われわれは中枢神経系疾患のひとつである外傷性脊髄損傷に対して，動物実験モデルを用い，胎児脊髄由来培養神経幹細胞を移植することで傷害脊髄内に新たにニューロンを導入し脊髄機能の改善を得ることに成功した．更にこの移植細胞由来ニューロンはホストニューロンとシナプスを形成しており，その軸索には髄鞘化が認められ，移植細胞由来のニューロンがホストの脊髄内にある程度組み込まれていることが確認された．神経幹細胞の移植に際して最も重要であった要素は損傷脊髄内の微小環境であった．今後，この手法による治療法の開発を進めるにあたっては，移植部の微小環境について更なる検討を行うことが大切であると思われた．また，神経幹細胞と呼ばれる細胞は均質なものではないことが分かっており，移植細胞そのものに関する詳細な検討も重要であると思われた．

Key Words：neural stem cell, spinal cord injury, transplantation, rat

はじめに

従来，成体の中枢神経系には組織再生能はないとされてきた．しかし，30年ほど前より哺乳類の成体脳においても海馬・歯状回と線状体の側脳室周辺ではニューロンの新生が起こっていることが，まずネズミで，ついで他の種でも明らかにされてきた．また，ヒトについても近年，海馬・歯状回でニューロンの新生が成人になっても起こっていることが明らかにされた[1]．さらに，中枢神経系を構成するニューロン，オリゴデンドロサイト，アストロサイトの3種類の細胞に分化しうる能力を持ち（多分化能）かつ多分化能を保ちつつ細胞分裂を行うことができる（自己複製能）中枢神経系神経幹細胞（Neural stem cell：NSC）と呼ばれる細胞の選択的培養法[2,3]やNSCに対する細胞マーカー[4~6]が開発され，これらを用いることで本来成体においてはニューロンの新生が起きていない中枢神経系の部位にもNSCが存在することが判明してきた[3,7]．これらの知見から成体中枢神経系には組織再生能がないという概念は否定されるようになってきた．

外傷性脊髄損傷は四肢に重篤な障害を残す疾患である．

平成15年度三四会奨励賞受賞者

脊髄は中枢神経系組織であるため傷害脊髄の再生は従来不可能とされてきた．実際，現在行われている治療法は急性期における組織障害を最小限にすることを目的とした治療法と，慢性期における残存機能を最大限に活用することを目的とした治療法であり，傷害された脊髄組織の再生とそれに基づく脊髄機能の回復を目的とした治療法は行われていない．しかし，前述の如く，近年の神経科学の進歩により脊髄を含めた中枢神経系組織にも組織再生能がある可能性が示されたことで，近年，損傷により傷害された脊髄組織の再生と機能回復を目的とした治療法の開発が動物実験レベルで盛んに試みられるようになっている．脊髄組織の再生を促すために，現在大きく分けて2つの方法が考えられている．一つは成体脊髄にも存在する内在性NSCを利用し組織再生を得るというものである．もう一つは外部よりNSCなどの未分化な細胞を脊髄内に導入し組織再生を得るというものである．しかし，成体においてニューロンを新生していない脊髄では，脊髄損傷後に増殖する脊髄由来の内在性NSCと思われる細胞はニューロンへは分化せずアストロサイトへと分化することが報告されており[7]，現在のところ前者の方法により損傷脊髄の再生と機能回復が得られたとの報告はない．一方，後者の方法を用いた報告としては，未分化な神経系細胞を多く含む胎児脊髄組織を移植材料として用いた報告があり，ラットや猫を用いた実験では移植組織のホスト脊髄内での生着と障害脊髄機能の回復が認められている[8~10]．また，パーキンソン病では既に胎児脳組織移植による治療法が臨床応用されており治療効果が示されている[11~13]．しかし，胎児組織移植による治療法は倫理面やドナーの確保の面で多くの問題が指摘されている．一方で，NSCは旺盛な増殖能を持つ細胞であるため前述のNSCの選択的培養法[2]を用いれば，少量の胎児組織より大量のNSCを確保すること可能である．従って，培養NSCを移植材料として利用可能ならば，ドナーの確保という実際面での問題点は解決することができる．

本稿では，外傷性脊髄損傷に対する培養NSC移植による損傷脊髄の組織再生とそれに基づく機能回復を目的とした治療法の開発について，現在までわれわれが行ってきた研究の成果[14]と今後の課題について述べる．

何らかの原因により変性または損傷した成体中枢神経系組織の再生には，適当な部位に，適当な細胞が存在し，更に適当な神経回路網が再構築されることが必要である．これをNSCの移植により実現するためには，NSCが適当な部位で適当な細胞に分化し，成熟していかなければならない．NSCの分化・成熟は細胞そのものが持つ内的因子と細胞が存在する部位の微小環境（外的因子）の両方により規定されてくるため，NSCの移植による中枢神経系の再生には，これら二つの因子について常に考える必要がある．従って，脊髄損傷に対するNSC移植による組織再生を目指す場合，NSCそのものについての検討と移植部位である損傷脊髄の微小環境についての検討が重要である．

移植材料としてのNSC

NSCとは前述の如き多分化能と自己複製能を持つ細胞と現在のところ定義されている．この様な性質を持った細胞は胎児から成体に至るまで中枢神経系の様々な部位に存在することが証明されているが，これらの細胞は均質なものではなく採取した時期および部位により細胞の性質が異なることが報告されている．すなわち，*in vitro*において同一条件で培養を行っても採取時期および部位が異なることでNSCの増殖能やニューロンやグリアへの分化能が異なるということである．また，*in vivo*においても同一部位に移植してもNSCの採取時期および部位が異なることで，NSCが異なる性質を持つ細胞へと分化することが報告されている[15]．従って，脊髄損傷に対してNSCの移植を行う際に，前述の内的因子について考慮した場合，どの時期のどの部位から組織を採取し培養すべきか詳しく検討する必要があると思われる．古くから行われているラット脊髄損傷モデルに対するラット胎児脊髄移植の実験でも，胎生16日目以降の脊髄組織を移植するとそれ以前の胎児脊髄を移植したものに比べ生着率が低下することが報告されている[8]．またネコの胎児新皮質または脊髄をネコ脊髄損傷モデルに移植した実験で，移植後の運動機能評価で新皮質を移植したものは脊髄を移植したものに比して運動機能の回復が劣っていたとの報告もある[16]．もし胎児中枢神経系組織移植による機能回復が胎児中枢神経系組織中に多く存在するNSCによるものであるならば，これらの結果をNSCの移植に際して考慮する必要がある．そこで，われわれはラット脊髄損傷モデルを用いたNSC移植による治療法の開発に関する基礎的実験を行うにあたり，移植細胞の採取部位は脊髄とし，脊髄のみの分離採取が技術的に可能となる胎生14.5日目を採取時期とし，移植に用いるNSCを培養した．培養はWeissらのneurosphere法[2]に準じて行った．この方法は増殖因子を加えた無血清培地で細胞を浮遊培養するもので，われわれの実験では増殖因子としてfibroblast growth

factor-2（FGF-2）20 ng/ml を 1 日おきに培養液に加えた．継代は 1 週間おきに行った．この方法で 3 回継代することにより，1 腹の胎児（12～15 胎児）脊髄から少なくとも 450 匹分の移植細胞を得ることが可能であった．このことから培養 NSC は将来の臨床応用を考えた場合，少量の胎児中枢神経系組織から大量の移植細胞が得られるという点で，胎児中枢神経系組織移植と比較してより実際的な移植材料であると考えられた．

損傷脊髄の微小環境

脊髄損傷部およびその周囲の微小環境は，正常脊髄のそれとは大きく異なり，また損傷後経時的に大きく変化していく．損傷直後の急性期においては強い炎症反応が損傷部およびその周囲で起きており，IL-1β, IL-6, TNF α などの炎症性サイトカインが損傷後 6～12 時間をピークとし 4 日目まで損傷部周囲に多量に存在していることが報告されている[17]．また，この時期には成体になっても脊髄に内在する NSC が盛んに細胞分裂を行い損傷部周囲へ細胞を供給することが報告されている[18,19]．さらにこれらの報告には，損傷部へ供給される内在性 NSC 由来の細胞はアストロサイトへと分化し，ニューロンには分化しないことが記されている．なぜこれらの細胞はニューロンへ分化しないのか．Shihabuddin らは，成体脊髄由来の NSC を成体になってもニューロンの新生が起きている部位に移植するとニューロンへと分化するが，ニューロンの新生の起きていない正常脊髄などの部位に移植するとニューロンへは分化しないと報告している[20]．この報告は *in vitro* のみならず *in vivo* においても成体脊髄に内在する NSC はニューロンへの分化能を持つこと，ニューロンへの分化には細胞が存在する周囲の微小環境が重要であることを示している．従って，急性期における内在性 NSC のアストロサイトへの分化は，成体脊髄に内在する NSC の内的因子によるものではなく急性期における損傷脊髄部の微小環境によるものと考えられた．実際，急性期に上昇する IL-1β, IL-6 は Jak/Stat シグナル経路を介して NSC をアストロサイトへと分化させることが知られている[21]．この様な微小環境を有する急性期の損傷脊髄に培養 NSC の移植を行っても内在性の NSC と同様に移植細胞はニューロンへは分化せずアストロサイトへと分化していくことが予想され，NSC の移植による組織再生は難しいと考えられた．また，この時期には TNFα などの cytotoxic なサイトカインが損傷部周囲に多く存在しており，細胞そのもののホストへの生着も困難であると考えられた．

実際，われわれはラット脊髄損傷モデルの損傷脊髄内に損傷後 24 時間で胎児脊髄由来の培養 NSC を移植する実験を行ったが，生着した移植細胞はほとんどなかった．これらのことより，培養 NSC の移植時期としては損傷直後の急性期は適当ではないと考えられた．しかし，あまり長い期間移植を遅らせると，損傷部に生じる組織欠損部（空洞）の周囲には反応性にグリア瘢痕が形成される．グリア瘢痕が完成すると，損傷を免れた正常脊髄はグリア瘢痕により損傷部と完全に隔絶されるため，損傷部周囲の微小環境は正常時のものへと回復することが予想される．従って，この時期に損傷部周囲に移植を行っても，正常脊髄に移植を行ったときと移植部の微小環境は同様であると考えられ，やはり移植細胞はニューロンへは分化しないことが予想された．また損傷部に生じた空洞に移植を行ってもグリア瘢痕により周囲の脊髄とは隔絶されているため，やはり移植細胞と非損傷脊髄との間での機能的組織構築は困難と思われた．そこで，われわれは炎症性サイトカインが多く存在する急性期からグリア瘢痕が完成する慢性期への移行期である亜急性期に NSC の移植を行った（第 1 図）．具体的には損傷後 9 日目に NSC の移植を行った．実験は成体ラットの頚髄圧挫損傷モデル[22]を用い，損傷後 9 日目に NSC を多く含むラット胎児脊髄由来培養神経前駆細胞を，この時期に既に損傷部に生じている空洞（第 2 図）に移植した．結果であるが，脊髄機能のうち上肢巧緻運動機能につい

第 1 図　脊髄損傷後の損傷部およびその周囲の微小環境の変化．内在性の NSC が盛んに増殖する(A)の時期は，損傷部の微小環境が急性期にある．この微小環境により，内在性の NSC はニューロンへは分化せずアストロサイトへと分化していくのだと考えられた．一方，われわれが NSC の移植を行った損傷後 9 日目には損傷部の微小環境は急性期から亜急性期へと既に変化しており，移植細胞の生着やニューロンへの分化とその成熟に有利な環境になっていたと思われた．（文献 42. の Figure 2 を許可を得て転載，一部改変）

て損傷後6週目に評価したところ，神経系前駆細胞を移植した群で対照群と比較して有意な脊髄機能の改善を認めた（第3図a, b）．また移植部の脊髄について組織学的検討を行ったところ移植部には移植細胞の生着が認められ，移植細胞由来のアストロサイトのみならずニューロン，オリゴデンドロサイトも生着していることが確認された．また，移植細胞由来のニューロンの一部は移植後に移植部においてニューロンに分化したことも確認された．更に移植細胞由来のニューロンに髄鞘化されているものが存在すること（第4図a），移植細胞由来のニューロンがホストのニューロンとシナプスを形成していることも確認された（第4図b, c, d）．

われわれは，上述の如く移植細胞と移植部周囲の微小環境について検討を加え，胎児脊髄由来培養神経系前駆細胞をラット脊髄損傷モデルに損傷後亜急性期に移植することで，傷害脊髄内に新たにニューロン，オリゴデンドロサイト，アストロサイトを導入し脊髄機能の改善を得ることに成功した．更にこの移植細胞由来ニューロンの軸索には髄鞘化が認められ，ホストニューロンとシナプスを形成していることも確認され，ホスト脊髄内に組織学的にも組み込まれていることが確認された．なぜこの様なことが可能となったのかについて，以下に考察する．

第2図　ラット頚髄損傷モデルの作成とNSC移植（文献42. のFigure 1を許可を得て転載，一部改変）．a. 成体ラット頚髄圧挫損傷モデルの作成は，第4，5頚椎に椎弓切除を加え，同部において脊髄背側に35 gの重錘を15分間静置することにより作成した．b. NSCの移植は損傷部に生じた空洞に，細胞濃度を5〜10×106 ヶ/ml に調製した細胞含有液をマイクロシリンジを用いて20〜40 μl 注入することにより行った．

ホスト脊髄での移植細胞由来のニューロン・オリゴデンドロサイト・アストロサイトの生着とニューロンの新生・成熟

Hammangらはマウス由来の培養NSCをミエリン欠損ラット脊髄に移植したところ移植細胞はオリゴデンドロサイトへと分化していき移植細胞由来のアストロサイト，ニューロンは認めなかったと報告している[23]．またPark らはあらかじめ幼児期に坐骨神経を切断することで腰髄部において片側のみ前角細胞を欠損させたラットに対して，NSCを腰髄部に移植すると移植細胞は前角細胞へと分化するが，前角細胞の欠損していない正常ラットに移植しても前角細胞には分化しないことを報告している[24]．これらの報告は，何らかの細胞が欠損している脊髄における微小環境はNSCを欠損している細胞へと分化させる方向に傾いていることを示していると思われた．脊髄損傷後，脊髄損傷部では多くのニューロン，オリゴデンドロサイト，アストロサイトが失われる．従って，損傷後経時的に微小環境が大きく変化する損傷脊髄においても，微小環境がNSCを失われた細胞へと分化させる方向へ傾いている時期がある一定期間存在すると考えられた．今回われわれが移植を行った損傷後9日目がちょうどその期間に含まれていたため，正常脊髄ではアストロサイトへと分化していく移植細胞が移植後にホスト脊髄内でニューロンへ分化したのだと考えられた．移植細胞由来のオリゴデンドロサイトの生着が認められたのも同様な理由によると考えられた．また，移植を行った損傷後9日目は損傷部に血管新生が盛んに起こる時期でもあり[25]，このことも移植細胞の生着に関して有利に働いたと考えられた．他に，ホストの微小環境のみならず大量の神経系前駆細胞を移植したことにより，移植細胞自身の何らかの因子がautocrine, paracrine的に働き，移植細胞の生着とニューロン，オリゴデンドロサイトへの分化を促した可能性も考えられた．

移植による脊髄機能回復のメカニズム

Schrimsherらはラット頚髄部分切断モデルを用いて脊髄の傷害部位別ごとの前肢運動機能の変化を報告している[26]．それによると餌取り動作のような前肢の巧緻運動には後索を通る上行性知覚線維が重要な役割を果たしているとされている．われわれの実験に用いたラット脊髄損傷モデルではもっとも傷害される部位は後索，後角および灰白質中心部であり，本実験において餌取り試験を用いた行動評価で神経系前駆細胞を移植した群が対照群と比較して有意な脊髄機能の改善を認めたのは，傷害

第3図　餌とり試験による脊髄機能の評価（文献14．のFigure 5を許可を得て転載）．a. 餌とり試験はDienerらの方法に準じて行った[10]．具体的には12個のマス目の中にそれぞれ5個ずつの小さな餌を入れ，マス目とラットを鉄柵で仕切り，前肢（矢印）でのみ餌を取ることができるような檻を作成する．予め絶食させておいたラットをこの檻に入れ，前肢で餌を取る訓練をさせる（Figure 5 A）．この訓練は脊髄損傷作成前に1週間連日行い，更に移植後4週目から同様に1週間連日行う．移植後5週目に2日間連続で試験を行い，2日間で取れた餌の数の合計を検討した．b. 5個以上餌を食べられたラットは，移植群（A群）では15匹中13匹であったが，培養液のみを注入した群（B群）と損傷のみの群（C群）ではそれぞれ17匹中9匹，13匹中8匹であった．統計学的に検討すると移植群は対照群と比較して有意に多くの餌をとることができていた．しかし，非損傷群（D群）と比較すると移植群の餌のとれた数は有意に少なかった（*$p < 0.01$）．

第4図　移植細胞由来ニューロンのホスト脊髄内での組織構築（電子顕微鏡による所見）（文献14．のFigure 4を許可を得て転載）．a. EYFP陽性(黒)の軸索が髄鞘化されている．スケールバー：0.2 μm．b. EYFP陽性(黒)のシナプス前構造とEYFP陰性のシナプス後構造によりシナプスが形成されている．スケールバー：0.5 μm．c. EYFP陰性のシナプス前構造とEYFP陽性(黒)のシナプス後構造によりシナプスが形成されている．スケールバー：0.2 μm．d. ホスト前角細胞と移植細胞由来ニューロンとのシナプス形成．スケールバー：1 μm，枠内 0.3 μm．星印：シナプス小胞，矢印：post-synaptic density

された後索の機能が何らかの機構により改善されたためと考えられた．本実験においてわれわれは神経系前駆細胞の移植により傷害脊髄内に新たなニューロンを導入することができ，それらのニューロンの軸索が髄鞘化され，ホストニューロンとの間にシナプスを形成していることを示した．このことから後索機能が改善した理由の一つとして，傷害された上行性の線維連絡を新たに導入された移植細胞由来のニューロンが中継することで，中枢側へと信号が伝達された可能性が考えられた（第5図a）．またCroweらはサルとラットの脊髄圧挫モデルを用いて傷害軸索のワーラー変性に伴って傷害軸索にミエリンを巻いているオリゴデンドロサイトに損傷後8日目をピークとしてアポトーシスが生じると報告し，中枢神経系ではオリゴデンドロサイトは複数のニューロンにミエリンを巻いているため，このオリゴデンドロサイトのアポトーシスにより傷害を免れた軸索にも脱髄が起こり，脊髄機能が2次的に更に障害されると述べている[27]．わ

第5図　脊髄機能回復のメカニズム（文献42.のFigure 4を許可を得て転載，一部改変）．a.傷害された上行性の線維連絡を新たに導入された移植細胞由来のニューロンが中継することで，中枢側へと信号が伝達された可能性．b.そのものは傷害されていないが脱髄により機能の障害された軸索が，移植細胞由来のオリゴデンドロサイトにより再髄鞘化され機能回復した可能性．

れわれは本実験で移植細胞由来のオリゴデンドロサイトをホスト脊髄内に確認している．これら移植細胞由来のオリゴデンドロサイトにより，そのものは傷害されていないが脱髄により機能が障害された軸索に再髄鞘化が生じ障害軸索の機能回復がなされたことが後索機能改善のもう一つの理由として考えられた（図5b）．

今後の展望

われわれはこれまでの研究でラット脊髄損傷モデルを用いた実験において胎児脊髄由来培養神経系前駆細胞を移植することで損傷脊髄へのニューロンおよびオリゴデンドロサイトの導入と障害脊髄機能の回復を得ることができた．しかし，今後実際の臨床応用を考えた場合，多くの問題が存在する．倫理的な問題については，今後様々な見地からの更なる議論が必要であると思われるが，本稿では実際面での問題点について考えたい．

細胞移植による傷害脊髄の再生を考えた場合，よりよい治療法の開発には前述の如く移植細胞と移植を受ける脊髄の微小環境の両面からの検討が必要である．

今回われわれは移植細胞としてNSCを多く含む胎児脊髄由来培養神経系前駆細胞を用いた．しかし，移植細胞の候補はNSCだけではなく，他にも胚性幹細胞（Embryonic stem cell：ES細胞）をNSCに分化させたもの[28]，Olfactory ensheething glial cell[29~31]，Schwann cell[32]，骨髄間質細胞[33~35]，免疫系細胞の一つである樹状細胞[36]などを移植細胞として用いることで障害脊髄の機能回復が得られたとの報告がある．NSCを含めこれらの細胞は移植細胞としてそれぞれ一長一短がある．例えば，ES細胞は非常に未分化な細胞であるため，motor neuronへの分化も容易に可能であるが，一方で，分化を完全に制御することは未だできていないため，移植後に移植部に奇形腫が発生する危険性がある．骨髄間質細胞は自家移植が可能であるが，その分化制御についてES細胞と同様にやはり課題がある．NSCについても，検討すべき課題は多い．今回われわれは胎児脊髄由来のNSCを用いたが，ヒトのNSCはラットのNSCに比して増殖能が低く，更に胎児脊髄由来のNSCは*in vitro*での増殖能が胎児前脳由来のNSCと比較してかなり劣っている．従って，実際の臨床応用を考えた場合，移植細胞の確保という点で，もし胎児前脳由来のNSCを用いても同様な機能回復が得られるならば移植細胞の確保はさらに容易となる．われわれはラット胸髄圧挫損傷モデルを用いた実験で，胎児前脳由来のNSCを移植材料として用いても胎児脊髄由来のNSCを移植した場合と同等な機能回復が得られることを既に確認しており[37]，現在さらに詳細な検討を進めている．また成人の大脳由来のNSCを用いても機能回復が得られるならば，自家移植による治療も可能となり，ドナーの問題のみならず倫理面での問題も解決される．更に，由来する組織の違いによるNSCの性質の差異に関する研究が進めば，成人大脳由来のNSCに何らかの操作を加えることで移植に最適な性質を持つNSCを作成することも可能になると思われる．どの細胞が移植細胞として最適であるか，或いはこれらの細胞を組み合わせることが有効であるのか，今後の更なる検討が必要である．

今回のわれわれの研究から脊髄損傷に対するNSCを用いた治療法を有効に行うには移植の時期すなわち移植部における微小環境が重要であることが判明した．移植部の微小環境は移植細胞の生着・分化・移動・成熟の全てに関与する．今後この手法を用いた治療法により，より良い治療効果を得るためには，経時的に変化する損傷脊髄の微小環境を更に詳細に検討し移植に最適な時期を明確にしていくことが必要であると思われた．また更に進んで，何らかの操作を行うことで移植部の微小環境をより良いものにすることも必要であると思われた．今回の実験では移植細胞は損傷部に生じた空洞の辺縁部には生着するが空洞の中心部にはその生着は認められなかった．このことから，移植細胞の生着には細胞を栄養する血管の存在が非常に重要であると思われた．従って，移

植の際に hepatocyte growth factor や vascular endothelial growth factor などの血管増殖因子を直接添加したり，またはこれらの因子を分泌する細胞を同時に移植することなどにより，移植部に血管を増生させることで，移植細胞の生着率を上げることができるのではないかと考えられた．また，損傷後急性期に損傷部に盛んに分泌される炎症性サイトカインは外傷により機械的に傷害された脊髄にさらに化学的な傷害を加えると考えられている．損傷脊髄の微小環境についての研究が進めば，何らかの方法によりこの化学的傷害を抑制することも可能になると考えられ，脊髄が受ける障害を最小限にしたうえで，障害機能の再生を目的とした治療を行えばよりよい治療効果が得られると思われる．従来はこの化学的傷害を抑制する薬剤としてステロイド剤であるメチルプレドニゾロンが唯一臨床応用されてきたが，われわれは急性期に分泌される炎症性サイトカインの一つであるIL-6の作用を抑制する抗体をマウス胸髄圧挫損傷モデルに投与することで脊髄に対する化学的傷害を抑制し損傷後の脊髄機能障害を抑制することに成功しており[38]，臨床応用に向けて研究を進めている．この様な観点からも損傷脊髄の微小環境についての研究は重要であると思われた．

NSC移植による治療が成功するには，移植した細胞が損傷前の細胞と同様な細胞に分化し同様な位置に移動し更に同様な神経回路網が再構築されることが理想であるが，実際にこの様なことを実行するのは現時点では不可能と思われる．そのため，現在どのような細胞に優先的に分化させることが機能回復に対して有効なのかが，盛んに検討されている．最近，ニューロンの新生・分化・成熟や軸索伸展にある種のアストロサイトが強く関与していることが報告されており[39~41]，必ずしもニューロンやオリゴデンドロサイトだけが機能回復に関与しているとは限らない．今回のわれわれの研究においてNSC移植により脊髄機能の回復が認められたが，機能回復のメカニズムについては未だ推測の域を出ていない．このメカニズムを解明することができれば，自ずと機能回復に重要な細胞が判明すると思われ，今後この方面からの研究もより有効な治療法の開発のために重要であると思われた．

まとめ

われわれは，胎児脊髄由来培養NSCを移植することでラット脊髄損傷モデルにおいて傷害脊髄にニューロン・オリゴデンドロサイト・アストロサイトを新たに導入することができ，脊髄機能の回復を得ることができた．しかし，実際の臨床応用を考えた場合，検討すべき課題は未だ多い．今後，移植細胞そのもの，移植部である脊髄損傷部およびその周囲の微小環境，および細胞移植による脊髄機能の回復のメカニズムについて更に詳細な検討を加えることが臨床応用に向けて重要であると思われた．

文　献

1) Eriksson, PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordcrg C, Peterson DA, Gage FH：Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med 4：1313-1317, 1998
2) Reynolds BA, Weiss S：Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. Science 255：1707-1710, 1992
3) Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA：Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. J Neurosci 16：7599-7609, 1996
4) Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H：Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. Dev Biol 176：230-242, 1996
5) Lendahl u, Zimmerman LB, McKay RD：CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60：585-595, 1990
6) Penvy LH, Sockanathan S, Placzek M, Lovell-Badge R：A role for SOX1 in neural determination. Development 125：1967-1978, 1998
7) Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J：Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96：25-34, 1999
8) Reier PJ, Perlow MJ, Guth L：Development of embryonic spinal cord transplants in the rat. Brain Res 10：201-219,1983
9) Anderson DK, Howland DR, Reier PJ：Fetal neural grafts and repair of the injured spinal cord. Brain Pathol 5：451-457, 1995
10) Diener PS and Bregman BS：Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. J Neurosci 18：763-778, 1998
11) Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, Bjorklund A：Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. Science 247：574-577, 1990

12) Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, Lone T, Zhang YB, Snyder JA, Wells TH, Olson RL, Thompson L, Mazziotta JC, Huang SC, Grafton ST, Brooks D, Sawle G, Schroter G, Ansari AA : Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. N Engl J Med 327 : 1549-1555, 1992
13) Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, Sanberg PR, Holt DA, Kordower JH, Vingerhoets FJ, Snow BJ, Calne D, Gauger LL : Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. Ann Neurol 38 : 379-388, 1995
14) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Toyama Y, Koike M, Uchiyama Y, Bregman BS, Okano H : Transplantati on of *in vitro* expanded fetal neural progennitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion in rats. J Neurosci Res 69 : 925-933, 2002
15) Na, E, McCarthy M, Neyt C, Lai E, Fishell G : Telen cephalic progenitors maintain anteroposterior identitie's cell autonomously, Curr Biol 27 : 987-990, 1998
16) Reier PJ, Stokes BT, Thompson FJ, AndersonDK : Fetal cell graft into resection and contusion/compression injuries of the rat and cat spinal cord, Exp Neurol 115 : 177-188, 1992
17) Nakamura M., Houghtling RA, MacArthur L, Bayer BM, Bregman BS : Differences in cytokine gene expression profile between acutely and chronically injured adult rat spinal cord. Exp Neurol 184 : 313-325, 2003
18) Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J : Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96 : 25-34, 1999
19) Namiki J, Tator CH : Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. J Neuropathol Exp Neurol 58 : 489-498, 1999
20) Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH : Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. J Neurosci 20 : 8727-8735, 2000
21) Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg M : Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the Jak/Stat-signaling pathway. Science 278 : 477-483, 1997
22) Holtz A, Nystrom B, Gerdin B : Spinal blood flow measured by 14C-iodoantipyrine autoradiography during and after graded spinal compression in rats. Surg Neurol 31 : 350-360, 1989
23) Hammang JP, Archer DR, Duncan ID : Transplantat ion of epidermal growth factor-responsive neural stem cell progeny into the murine central nervous system. Exp Neurol 147 : 84-95, 1997
24) Park KI, Liu S, Flax JD, Nissim S, Stieg PE, Snyder EY : Transplantation of neural progenitor and stem cells : developmental insights may suggest new therapies for spinal cord and other CNS dysfunction. J Neurotrauma 16 : 675-687, 1999
25) Casella GT, Marcillo A, Bunge MB, Wood PM : New vascular tissue rapidly replaces neural parenchyma and vessels destroyed by a contusion injury to the rat spinal cord. Exp Neurol 173 : 63-76, 2002
26) Schrimsher GW, Reier PJ : Forelimb motor performance following dorsal column, dorsolateral funiculi, or ventrolateral funiculi lesions of the cervical spinal cord in the rat. Exp Neurol 120 : 264-276, 1993
27) Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS : Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. Nat Med 3 : 73-76, 1997
28) McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat Med 5 : 1410-1412, 1999
29) Keyvan-Fouladi N, Raismaan G, Li Y : Functional repair of the corticospinal tract by delayed transplantation of olfactory ensheething cells in adult rats. J Neurosci 23 : 9428-9434, 2003
30) Santos-Benito FF, Ramon-Cueto A : Olfactory ensheething glia transplantation : a therapy to promote repair in the mammalian central nervous system. Anat Rec 271B : 77-85, 2003
31) Verdu E, Garcia-Alias G, Fores J, Lopez-Vales R, Navarro X : Olfactory ensheething cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. Glia 42 : 275-286, 2003
32) Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB : Schwann cells but not olfactory ensheething glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. J neurosci 22 : 6670-6681, 2002
33) Koshizuka S, Okada S, Okawa A, Koda M, Murasawa M, hashimoto M, Kamada T, Yoshinaga K, Murakami M, Moriya H, Yamazaki M : Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. J Neuropathol Exp Neurol 63 : 64-72, 2004
34) Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L : Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. Proc Natl Acad Sci USA 99 :

2199-2204, 2002
35) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A : Brain from bone : efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 68 : 235-244, 2001
36) Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M : Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis, and functional recovery. J Neurosci Res, in press
37) Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H : Comparison between fetal spinal cord-and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord injury. Dev Neurosci, in press
38) Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H : Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. J Neurosci Res, in press
39) Garcia-Abreu J, Mendes FA, Onofre GR, De Fraitas MS, Silva FC, Moura Neto V, Cavalcante LA : Contribution of heparan sulfate to the non-permissive role of the midline glia to the growth of midbrain neurites. Glia 29 : 260-272, 2000
40) Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE, McKay RD : A glial-derived signal regulation neuronal differentiation. J Neurosci 20 : 8012-8020, 2000
41) Song H, Stevens CF, Gage FH : Astroglia induce neurogenesis from adult neurall stem cells. Nature 417 : 39-44, 2002
42) Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Iwanami A, Toyama Y : Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. Seminars in cell & Development Biology 14 : 191-198, 2003

慶應医学・81(2)：135～140，2004

調査報告

医療訴訟の長期化
－その原因と改善への取り組み－

慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室
長塚行雄・島田直樹

ABSTRACT

Prolongation of Medical Law Suits -Causes and Ideas for Amelioration

Yukio Nagatsuka and Naoki Shimada

Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University

The pursuit of medical malpractice in the courts is gaining momentum in Japan just as it has been in the United States, and consequently, the number of medical lawsuits is tending to increase year by year.

However, the problem with medical lawsuits is that the trial period is too long, which places an excessive burden on the plaintiff, and obstructs the justice of the medical lawsuit. In a medical lawsuit in particular, these three processes： 1) claim scheduling period, 2) taking of evidence procedure, and 3) appraisal, cause prolongation of lawsuits. The Japan Supreme Court and District Courts all over the country are instating various changes in order to eliminate problems in each of these processes, which are causing prolongation in order to facilitate the progress of swift and appropriate medical lawsuits. The ideas of the Medical Affairs Lawsuit Committee of the Japan Supreme Court and the Department of Medical Affairs of the Tokyo District Court are introduced. Finally, subjects that should be ameliorated from the justice side and the medical treatment side will be considered.

Key Words：medical lawsuit, prolongation, claim scheduling period, procedures for evidence collection, appraisal

我が国においても米国と同様に医療過誤を法廷で追及しようという気運が高まりつつあり，それに伴って医療訴訟は年々増加傾向にある．ところが医療訴訟には審理期間が長すぎるという問題点があり，そのことが当事者に過大の負担をかけ適正な医療訴訟を阻害している．特に医療訴訟の中で，1）主張整理期間，2）証拠調べ手続き，3）鑑定という3つのプロセスが長期化をもたらしている[1]．これらの各プロセスにおける長期化の原因を取り除き迅速で的確な医療訴訟を行うために，最高裁判所および全国の地方裁判所は様々な取り組みを始めている．その中から，最高裁判所の医事関係訴訟委員会と東京地方裁判所の医療集中部での取り組みを紹介する．最後に，これから司法側と医療側が工夫改善すべき点について考察する．

医療訴訟の現状と問題点

1．医療訴訟の件数と平均審理期間

第1図から分かるように医療訴訟の新受事件数は，平成14年度で前年度比10%増の896件で，平成5年の442件に比較して2倍以上になっている．それに伴い未済事件数も増加している．また，既済事件の平均審理期間を見ると，30.4ヶ月で最近数年に比較して短くなっている．しかし，2000年に東京地方裁判所が関与

第1図　医事関係訴訟事件の処理状況及び平均審理期間[2]

第2図　従来の医療訴訟の進行[1]

した医療訴訟を含めた全事件の平均審理期間である8.8ヶ月，対席判決（原告と被告の当事者双方が，口頭弁論期日に出席した上で行われる判決）で終了した事件の平均審理期間13.7ヶ月，および人証調べ（決められた証拠調べの期日の間に，証人，原告，および被告本人の供述などを調べること）をして判決で終了した事件の平均審理期間20.3ヶ月[1]と比較すると，いかに医療訴訟の審理に時間がかかっているか分かる．

2. 従来の医療訴訟の典型的な進行

次に，従来の典型的な医療訴訟の進行の流れを述べ，どこが長期化の原因となっているのかを述べる．

第2図のようにまず，患者側の原告訴訟代理人である弁護士によって裁判所の民事部へ提訴される．そして，裁判所では「弁論」という手続きで，争点の整理を行う．ここでは，法廷において準備書面の交換をしたりして争点の整理を行う．次に，証拠調べとして人証調べが行われる．人証調べは，医師の主尋問，その3ヶ月後に医師の反対尋問，その3ヶ月後に原告の尋問，といったように長時間かかる．さらに人証調べの途中でも，争点の違いが新たに見つかったりして，再び準備書面の交換を行って争点整理を行うことがある．そして，多くの事件で鑑定を行い，これにも時間をかけた末，最後に判決にたどりつく．

東京地方裁判所の医療過誤訴訟検討チームが1999年に実施した調査[2]によると，このような従来の医療訴訟の進行に当たって，長期化の原因となっているのは主張整理期間，証拠調べ手続き，鑑定の3点であった（第1表）．主張整理期間とは，「訴状受理時から『主張整理終了日』までの期間」と定義し，かつ，主張整理終了日を

第1表　各手続きの審理期間の比較[2]

訴訟の段階	平均審理期間
①訴状提出から第1回期日までの期間	61日
②第1回期日から主張整理終了までの期間	486.8日
③人証期間（証拠調べ手続きとして）	335.2日
④鑑定採用から鑑定結果陳述までの期間	324.8日
⑤和解手続の期間	106.4日
⑥終結後判決言渡しまでの期間	64.6日
合　計	1378.8日

東京地裁医療過誤訴訟検討チーム調べ
※東京地裁が1999年の2月15日から9月30日までの間に審理を終えた61件のうち，各段階をすべて含む5件について統計をとった．

「記録上主張整理が終了したことが明らかな日，最初の人証の採用日，鑑定採用日の中で最も早い日」と定義する（相当程度主張が明確になった後に，人証調べ，鑑定などが行われるので，このような定義としている）．

3．医療訴訟の長期化の原因

それでは，主張整理期間，証拠調べ手続き，鑑定においてそのプロセスの何が長期化の原因となっているのだろうか．それぞれについて細かく見ていく．

まず主張整理期間についてである．この期間の長期化の原因として次のような点が挙げられる[1,3]．

1）被告側（医療側）が積極的に事実経過について主張しようとせず，診療録や診療時に撮影した写真などの書証などもなかなか提出しない．従って，原告側（患者側）の弁護士も主張すべき被告側の過失行為の内容を特定できない．

2）原告側（患者側）の弁護士が専門的な医学をゼロから勉強して訴訟を遂行する場合が多く，診療経過などの分析に手間取る．

次に，証拠調べ手続きについてである．この期間の長期化の原因は，主張整理期間において争点となる過失内容が絞り込めないまま，この期間に入ってしまうことによる[1,3]．つまり証拠調べ手続きが長引くというよりも，再び準備書面を提出し争点整理手続き，つまり主張整理がやり直されることが長期化の原因となっている．また，争点が絞り込めない原因には，裁判所の専門知識が不足していて，争点整理の指揮が取れず，結局全ての主張を取り上げて証拠調べをしなければならなくなっていることも挙げられる．

最後に，鑑定についてである．鑑定長期化の第1の原因として，医師になかなか鑑定を引き受けてもらえないことが挙げられる．医師が鑑定を引き受けない理由として次の8点が挙げられる[1,3,4]．

1）自分1人の鑑定だけで裁判の結果が決まるのは重荷である．

2）時間がかかり負担が大きい．

3）論文や学会発表と異なり，鑑定書を書いても何の評価もされない．

4）医師に不利益な鑑定書を書くと，医師仲間から疎んじられる．

5）患者に不利益な鑑定書を書くと患者から嫌がらせを受けることがある．

6）鑑定書を書くと，裁判所に出頭を命じられ，多くの拘束を受ける．

7）鑑定人に対する尋問，特に反対尋問が必要以上に敵対的で人格非難的な場合が多く，客観的に見ても適切な尋問がなされていない場合がある．

8）鑑定書を提出しても，裁判がどうなったのか，自分の見解が採用されたのかについて裁判所から連絡がない．

鑑定長期化の第2の原因として，鑑定人の選任システムが確立されていないという問題がある[1]．従来は，鑑定人が必要になると，個々の裁判官あるいは書記官が鑑定人を探し鑑定依頼をしていた．しかし，この方法では医師から何度も断られ非効率である上に，その医師の能力を正確に見極めた上での依頼ができない．裁判官，書記官は，鑑定を何度も断られると，引き受けてもらうだけでもありがたいという気持ちになり，鑑定にふさわしい医師なのかどうかを考えなくなる．つまり，この第2の原因は，迅速性だけでなく適正な裁判も阻害しているといえる．

鑑定長期化の第3の原因として，仮に鑑定人が選任されたとしても，数十ページにのぼる「鑑定書」の作成に時間がかかりすぎることが挙げられる[1,4]．医師が忙しいことが主たる原因であるが，裁判所の鑑定事項の決め方が不適切であるために鑑定書の作成が困難であったり，裁判所が鑑定人に訴訟記録を丸投げして鑑定を依頼するので，鑑定人はそれを整理するだけで時間が取られたりしている．

実際の取り組みから見た医療訴訟改善方法

では，前述の主張整理期間，証拠調べ手続き，鑑定での問題点を解決するには，どうしたらよいのか．現在，最高裁判所や全国の地方裁判所で様々な取り組みが始まっているが，それらを象徴する2つの取り組みを紹介する．まず，主に鑑定の問題点を改善する試みとして最高裁判所の医事関係訴訟委員会を，次に全ての問題を包括的に改善する試みとして東京地方裁判所の医療集中部を紹介する．

1．最高裁判所の医事関係訴訟委員会

平成13年7月に最高裁判所に医事関係訴訟委員会が設けられた．この委員会は，医学者，医師，司法関係者（弁護士，元裁判官），一般有識者の計13人で構成されている．この委員会は，各地の裁判所からの要請に応じて医療訴訟の鑑定人候補者を選ぶ．具体的には，1）各地の裁判所から鑑定人候補者の選定の要請を受けると，委員会はその医療訴訟の内容を検討して，該当する診療科に関係する学会に鑑定人の推薦を依頼する，2）学会から鑑定人候補者が推薦されると，委員会でその候補者の検討を行い，鑑定人として適切と判定すれば各地の裁判所に推薦する，という仕組みである（第3図）．この委員会が設置されたことによって全国的に恒常的な鑑定人選任システムが整備された[5~7]．

平成15年7月現在までの状況を見てみると，本委員会は10回開催されており，第3回以降は8回にわたって鑑定人候補者選定分科会が合同開催されている．委員会の前身である懇談会での取り扱い事例を含めると平成13年1月から平成15年6月までに79件の鑑定人候補者推薦依頼を各地の裁判所から受理し，第2表のよう

第3図　最高裁判所医事関係訴訟委員会の仕組み

第2表　医事関係訴訟委員会の鑑定人候補者選定の状況（平成15年6月現在）[5,9]

1）裁判体からの依頼総数79件（うち4件は2学会宛てに依頼）
2）学会宛て依頼（83件中）完了83件：未了0件
3）学会からの回答（83件中）完了72件：未了7件：依頼取下げ3件：適任者無しとの回答1件
4）候補者の鑑定人選任（72件中）選任55件：検討中15件：選任までに和解1件：鑑定人として選任せず1件
5）鑑定書の提出（55件中）提出37件：未提出18件
6）鑑定書提出後の訴訟の進行（37件中）判決5件：和解8件：係属中24件

に処理している[8,9]．大半のケースで鑑定人候補者についての学会回答が戻っており，候補者選任までの期間については従来よりも短縮されていると考えられる．つまり，委員会は鑑定人の量的拡大と選任の迅速化に一定の成果を上げていると考えられる．

しかし一方で，選任された鑑定人の質について疑問を投げかける次のような意見もある[9]．

1）学会がどのような仕組みでその候補者を推薦しているのかを把握できていない．

2）鑑定書の事後的評価がなされていない．

1）については，委員会が各学会に望ましい選定システムのあり方を積極的に提示するとともに，各学会も推薦の内部プロセスの情報公開を行うなどの解決策がある．2）については，作成された鑑定書を各学会と委員会で評価すると共に，鑑定書を公開することで鑑定書の質を保つという解決策がある．

このように医事関係訴訟委員会は鑑定人選任の迅速性だけでなく，公平性，中立性も確保することがこれからの課題といえる．

2．東京地裁医療集中部

平成13年4月，東京地方裁判所に医療関係訴訟を専門的に扱う民事部である「医療集中部」が発足した．医療事件の審理が長期化していることへの対策と，専門的知識を要する医療訴訟に対する適正な判断を確保するために，医療集中部では一般の民事部とは異なる以下のような訴訟進行を行う（第4図）．

1）争点整理段階

争点整理段階では，まず争点整理の迅速，適正化のため，事実関係が早期に確定することを目指し，原告被告双方の代理人に対して，「診療経過一覧表」「検査一覧表」「投薬一覧表」「医学用語集」などの作成を要請する．被告代理人に対しては，審理開始当初に，翻訳付カルテ，レントゲンフィルムなどの基本的な書証の早期提出を要請する．そして裁判所は，主張が整理された段階で「争点整理表」を作成し的確に争点整理を行う[10]．

また，争点整理は準備手続で行うことがほとんどだが，準備手続においては，双方の代理人と裁判所間で口頭でのディスカッションを導入したり，準備手続の経過，予定を書面化し，プロセスカードとして当事者に交付したりして，当事者と裁判所との認識を共通にし，円滑な訴

第4図　東京地裁医療集中部の仕組み

訟運営を目指す[1,10]．

2）人証調べ

人証調べでは，確定した争点に従って，全ての証人を1日，あるいは近接した複数回の期日で行う「集中証拠調べ」を実施する．この結果，裁判所が心証（事実の存否への認識や確信）を取ることができれば弁論を終結して判決を書いたり，あるいは，鑑定が必要と判断すれば鑑定を行った上で判決を書いたりする[1]．

3）鑑定

中立公正な鑑定人を選任することができるようにするため，裁判所，弁護士会，医師の3者協議会を開催している．この協議会を通して，医療訴訟が被害者救済だけでなく医療の水準向上にも有益であることを説明し，医師が鑑定に対して消極的な姿勢にならないよう求める．こうして鑑定人の選任がスムーズになされる基盤を作るように努めている．

一方，鑑定の必要性を吟味し，すでに人証調べの段階で原告側の相談医や被告側の担当医から証言が得られ裁判所が心証を形成できているのであれば，長期化をもたらす鑑定という方法を安易に採用しない[11]．

鑑定を採用する場合でも，鑑定依頼や鑑定方法に次のような工夫をしている．まず鑑定依頼に関しては，1）鑑定事項を鑑定人の意見を聴取した上で最終的に決定する，2）争点整理段階で作成した診療経過一覧表および争点整理表を鑑定人に交付して当事者の主張を分かりやすく提示する，3）訴訟記録を丸投げせずに，裁判所が当事者と協議した上で，鑑定を行うために必要な証拠資料を限定して交付する，4）鑑定手続きや鑑定書の書き方を分かりやすく示した鑑定要領などを交付する，5）事件が終了した場合には終局結果を通知する，などの方法をとり，鑑定を引き受けてもらいやすいようにしている[1]．

第3表　カンファレンス方式による鑑定の基本的な考え方[1,8]

①3人の鑑定人を選任する．
②鑑定人に，原則として鑑定事項についての結論と理由の要旨をA4 1枚程度に簡潔にまとめて提出してもらう．
③裁判所，当事者，及び鑑定人が，裁判所に集まる．
④裁判所の訴訟指揮に基づき，鑑定人から鑑定事項について意見を聞き，それから鑑定人同士で協議してもらう．
⑤裁判所，当事者が疑問点について質問する．
⑥当日に検討できない事項があったら，第2回目の期日を設ける．
⑦これらの結果を録音反訳調書として作成し，鑑定人の陳述とする．

また鑑定方法も，鑑定書の不要なアンケート方式による鑑定[1]（訴訟記録を細かく検討しなくても回答できるようにアンケート項目を整理し，それを利用して複数の鑑定人に鑑定を依頼する），またはカンファレンス方式の鑑定[12,13]（第3表）を採用することで，鑑定の公正・中立性を高めつつ簡略化も進めるとともに，医師が鑑定を引き受けやすくしている．

さらなる改善のために

今まで見てきたように，ここ数年様々な改善が試みられるようになり，既済事件の平均審理期間も年々短くなってきている．しかし，それでも2年半という，他の民事訴訟に比較して長い期間が費やされるのは，まだポイントを突いた的確な訴訟が行われていないことを示している．それは，医療側，患者側双方にとって大変な負担であり，医療の発展に必要な医療訴訟そのものが敬遠される原因ともなる．

そこで，医療訴訟の審理期間短縮のために，さらにどのような取り組みが必要か司法側と医療側に分けて考える．

1. 司法側

まず，医療訴訟専門の弁護士を養成することが必要である．そのような弁護士が増えることで専門性の壁に阻まれている主張整理期間と証拠調べ手続きを短縮化できる．最近では，医師と弁護士の両方の資格を取得する人も増えていることから，このような人に積極的に医療訴訟の場で活躍してもらうことも一つの方法である．また，司法試験の合格を目指す医師や，医師を目指し医学部進学を希望する弁護士には，一定の条件の下で国から補助金を出すことも考慮すべきであろう．このような対策によって医学，医療の専門知識を備えた医療訴訟専門の弁護士を増やし，最終的には全ての医療訴訟に関与してもらえれば有効であろう．

次に，裁判所（判事および事務員），弁護士，医師の3者間で医療訴訟の勉強会を定期的に開催するべきである．これは，既に千葉地裁で試みられている[4,14~16]が，知識の向上や思い込みの除去のために必要である．内容としては，鑑定に対する医師の思い込みをなくすために鑑定の新しい取り組みを裁判所が説明したり，医療過誤の起こりやすい分野について注意すべき点を医師が説明したりすることなどが考えられる．

2. 医療側

まず，各学会，各病院に鑑定人推薦委員会を作ることが必要である．このような委員会を既に作っている学会もあるが，まだ少数である[1]．また学会のみでなく，鑑定人候補者（およそ講師以上のレベルの医師）が多く在籍する大学病院などの病院にも，学会や裁判所からの要請にすぐ応えられるように鑑定人推薦委員会を作るべきである．こうすることで鑑定人選任の時間が短縮できる．

次に，鑑定を引き受ける見返りを，システムとして作ることを検討すべきである．例えば，鑑定書を論文として認めて評価するシステムを作る．または鑑定に費やす時間を勤務時間として認め，給料を支払う．そのような財政的余裕がない場合は国の補助も検討する．このように鑑定を引き受けることが社会的にも金銭的にも「得」となるシステム作りが必要である．

最後に，医療訴訟の教育，例えば医療訴訟の現状やケーススタディを医学部や研修医の教育に取り入れるべきである．この目的は，医療訴訟が一面では医学，医療の発展に必要不可欠であることや，医療訴訟の遂行には医師の協力が必要であることを教える点にある．そして，学生や研修医の頃からそのような意識を持つようになれば，積極的に鑑定人や，医療訴訟に臨む患者の相談医になる土壌が生まれ，的確，迅速な医療訴訟が行われるようになることが期待される．

おわりに

医療訴訟の長期化の原因について検討した上で，その改善のために最高裁判所や東京地方裁判所で行われている取り組みを紹介した．これらの取り組みは着実な成果を上げており，他の裁判所においても同様の取り組みが求められる．しかし，それだけでは不十分であり，さらに必要な取り組みについて司法側と医療側に分けて考察した．司法側と医療側の双方の継続した努力と協力によって，迅速で的確な医療訴訟が行われるようになることが期待される．

文　献

1) 前田順司：特別版　医事紛争予防学　10年近く鑑定結果が出ないケースも　医療訴訟改善に医師の協力は不可欠．日経メディカル，(1月号)：117-123, 2002
2) 東京地方裁判所医療過誤訴訟検討チーム：東京地方裁判所における医療過誤訴訟の審理の実情について．判例タイムズ，(No.1018)：59-66, 2000
3) 東京地方裁判所プラクティス第1委員会：医療過誤訴訟の運営について．判例タイムズ，(No.1018)：32-58, 2000
4) 医事鑑定の在り方に関する検討会（第1回）．判例タイムズ，(No.1071)：33-45, 2001
5) 最高裁に鑑定人推薦委．朝日新聞，(1月27日)，2001
6) 医事関係訴訟委員会（今月のキーワード）．日経メディカル，(8月号)：19, 2001
7) 林道晴：医事・建築関係訴訟委員会の設置及び活動について．判例タイムズ，(No.1066)：4-18, 2001
8) 最高裁判所ホームページ http://courtdomino2.courts.go.jp/home.nsf
9) 堀康司：医事関係訴訟委員会～発足後1年で何が見えてきたか～．医療事故情報センターホームページ　緊急特集－医療過誤訴訟をいかに改革すべきか－ http://www3.ocn.ne.jp/~mmic/kinkyutokusyu.htm
10) 医療訴訟対策委員会：医療集中部における審理の実情について．判例タイムズ　No.1072　2001：23-38.
11) こちら，東京地裁専門部－知ってますか？今の方式（特集）．ＬＩＢＲＡ, 2：2-4, 2002
12) カンファレンス方式の鑑定　医療訴訟で東京地裁が新方式　迅速化と公正・中立性確保狙う（トレンドビュー）．日経メディカル，(4月号)：26-27, 2003
13) 医師3人，討論方式で鑑定．朝日新聞，(1月8日付)，2003
14) 医療訴訟関係裁判運営改善協議会（第1回）．判例タイムズ，(No.1061)：4-17, 2001
15) 医療訴訟関係裁判運営改善協議会（第2回）．判例タイムズ，(No.1076)：25-40, 2002
16) 医療訴訟関係裁判運営改善協議会（第3回）．判例タイムズ，(No.1081)：34-48, 2002

話　題

高齢女性におけるEBMに基づいた骨粗鬆症治療

EBM (evidence-based medicine) とは「医学研究の成果 (evidence) を知った上で，医師の経験や医療施設の特性，患者の病状や意向を配慮し，医療を行うための診療戦略」である．すなわち，一人一人の患者について診療上の問題点を整理し，問題点を解決するための文献検索を行い，得られた文献を批判的立場に立って分析し，文献に示されたevidenceが患者に適応できるか否かを判断することにより，個々の患者の診療上の問題点に対処するという診療戦略である．Evidence が真実を反映している程度は evidence level によりグレード付けされおり，最もグレードが高いのはメタアナリシスにより導き出されたevidenceである．

骨粗鬆症は高齢女性に多発するが，脊椎や大腿骨頚部の骨折は寝たきりの原因となり，高齢者の自立を阻む大きな要因となるばかりでなく，生命予後をも左右する因子ともなりうるため，それを防止することは健康寿命確保のうえで極めて重要である．骨粗鬆症の予防あるいは治療の基本は，カルシウムやビタミンの摂取不足を改善し，活動性を高め，しかもその状態を維持することである．しかし，診断基準に基づいて"骨粗鬆症"と診断された症例や，"骨量減少症" でも以後の急激な骨量減少が予想されたり，骨折のリスクを有すると判断された症例等については薬物による治療が行われる．骨粗鬆症の治療体系からみると，運動や栄養，さらには薬物として骨吸収抑制剤の有用性はすでに確立され，新しい骨形成促進剤が臨床的に使用されつつある．

本邦における骨粗鬆症治療薬として，カルシウム，ビタミンD，ビタミンK，カルシトニン，女性ホルモン，ラロキシフェンやエチドロネート，アレンドロネート，リセドロネートなどのビスフォスフォネートがあるが，効果の高いとされる副甲状腺ホルモンは未だ認可されていない．

本邦においては骨粗鬆症治療薬に対する大規模無作為化比較試験のメタアナリシスの報告は皆無である．海外では，骨粗鬆症を有する閉経後女性における薬物治療（副甲状腺ホルモンは除く）が脊椎および非脊椎の骨折予防に対するメタアナリシスの結果が2002年に報告されている (Cranney et al., Endocr Rev 2002)．脊椎骨折の発生率を有意に減少させ，かつ無作為化比較試験の結果の均一性が高い薬剤はアレンドロネート，リセドロネートおよびエチドロネートであり，大腿骨頚部骨折を含む非脊椎骨折の発生率を有意に減少させ，かつ無作為化比較試験の結果の均一性が高い薬剤はアレンドロネートとリセドロネートである．アレンドロネート，リセドロネートおよびエチドロネートの脊椎骨折のリスク低下率はそれぞれ48%，36%，37%，またアレンドロネートとリセドロネートの非脊椎骨折のリスク低下率はそれぞれ49%と37%である．これらの結果から，脊椎骨折が多発するのみならず大腿骨頚骨折の発生率も上昇する高齢の骨粗鬆症女性に対し，EBMに基づいて薬物治療を行う場合，アレンドロネートが第一選択薬となろう．

EBMでは，文献検索により得られた最もグレードの高いevidenceに基づいて治療が行われる．しかし，実際の臨床の場では同じ疾患でも個人差があることも事実であり，多くの集団についての統計学的分析から得られたevidenceをすべての患者に当てはめることにも無理がある．すなわち，EBMに基づいた画一的な治療法の選択には限界があると考えられる．高齢女性の骨粗鬆症に対する薬物治療においても，ビタミンD，ビタミンK，カルシトニン，ラロキシフェンさらにはエチドロネートもそれぞれの特徴があり，症例によっては必要かつ有効である．特に骨形成作用を有するビタミンKは，肝癌の再発や肝機能障害に伴う骨量減少を予防したり，血清コレステロール値を低下させる作用も有しており，筆者は肝機能障害あるいは高脂血症の認められる患者に対しては，アレンドロネートの併用薬として積極的に用いている．

最近，個人差の問題を遺伝子レベルで解決しようとするtailor made medicineが注目されている．近い将来，高齢女性の骨粗鬆症に対する治療においても，一人一人の患者にとって最良の治療薬を選択できる時代が到来するであろう．

岩本　潤（慶應義塾大学スポーツクリニック）

内科的側面からみた老齢者の頻尿

正常な蓄尿および排尿機構を維持するには，十分量（300 ml以上）の蓄尿容量をそなえ，空虚になるまで収縮が可能な膀胱があり，尿を抵抗なく排出しかつ尿流を完全に止めることのできる尿道が必要と考えられています．このような解剖学的，力学的構造に加え，下位および上位中枢神経支配を含む自律神経系と体性神経の協調も必要となります．老齢者では，加齢に伴い膀胱，尿道

の形態学的変化や排尿に関与する中枢および末梢神経系の萎縮性変化が生じてきますが，このような生理的老化現象の範囲内であっても排尿障害が出現してきます．また，男性では前立腺肥大症や前立腺癌などによる尿道狭窄，女性では骨盤底筋群の収縮力低下による括約筋機構の異常などといった排尿機構に直接関与する疾患や異常の頻度が加齢とともに増加してきます．加えて老齢者では，高血圧，心不全，糖尿病，腎障害，脳血管障害，悪性腫瘍などさまざまな疾患を有する頻度が高く，排尿障害がそれらの疾患の一症状として出現してくるため，その原因を単一の疾患のみで説明しきれないことが多くあります．一般社会に生活する老齢者では，夜間頻尿，排尿困難，尿失禁などの排尿障害を有する頻度は60%程度あるといわれています．また，内科系疾患のため外来受診している老齢者では，90%程度の症状出現率があるといわれています．その中で，特に高血圧、糖尿病と頻尿との関連について最新の知見を含めご紹介したいと思います．加齢に伴い身体機能は徐々に低下し，代謝内分泌学的には耐糖能低下による糖尿病症例が増加します．教科書的には，糖尿病の排尿障害は末梢神経障害による排出障害とされていますが，末梢神経障害を来す前に蓄尿障害を来す糖尿病症例が少なくありません．その原因として微小脳梗塞が指摘されています．老齢者では加齢に伴い明らかな麻痺のない微小脳梗塞の頻度が高くなりますが，糖尿病や高血圧症ではその頻度がさらに高いことが知られています．脳血管障害で頻尿となる代表的な部位は前頭葉内側面です．この部位は，ネコを用いた実験で，電気刺激で膀胱収縮を起こす部位と膀胱収縮を抑制する部位が隣接しているのですが，膀胱収縮を抑制する部位のほうが多いとされています．また，ネコの前頭葉内側面の直回や帯状回などには橋排尿中枢へ投射するニューロンも多数存在します．したがって，前頭葉内側面には橋排尿中枢に抑制性投射するニューロンが多いと考えられ，微小脳梗塞が橋排尿中枢への排尿抑制性投射経路の一部をまきこんだ結果頻尿をきたすと考えられます．糖尿病で頻尿の場合，残尿が多く有効膀胱容量が低下して頻尿となっている場合が一般的ですが，残尿のない過活動膀胱の糖尿病症例で，老齢者の場合，微小脳梗塞の可能性を考慮する必要があると考えられます．また，高血圧が頻尿，特に夜間頻尿をもたらす原因として指摘されています．その機序として，まず日中のカテコラミン高値が腎血管抵抗を上昇させ，必要な腎血流量を維持できず，尿産生量が低下し，夜間にカテコラミンが低下したときに腎血管抵抗が低下し，腎血流量が増加して夜間尿産生量が増加すると考えられています．もうひとつの機序として，血中のカテコラミンが脊髄に作用することもいわれています．等容量性律動性膀胱収縮状態のラットの脊髄髄腔内にアドレナリンα1D受容体遮断薬を投与すると，投与直後の数分間のみ排尿反射が消失します．排尿反射の回復後は膀胱内圧や収縮頻度に変化は少ないとされています．このことは排尿反射の脊髄内求心路を構成するニューロンにα1D受容体があり，この受容体の遮断は排尿反射を消失させることを意味するわけです．同様の結果は慢性胸髄損傷ラットでも見られます．脊髄へのカテコラミンニューロンの投射は脳幹から下行するので，これらのことは血中のカテコラミンが脊髄に作用して尿意知覚に影響している可能性を示唆しています．これは，緊張時の尿意の自覚する機序とも考えられるわけです．したがって，夜間頻尿には日中の高血圧による夜間多尿の場合と夜間高血圧による尿意知覚亢進の場合があると考えられます．老齢者では高血圧症や糖尿病症例が増加し，脊椎，脊髄疾患も増加するため，頻尿の原因診断に苦慮した場合には，微小脳梗塞や脊髄の圧迫なども考え，必要に応じて脳や脊髄の MRI なども考慮すべきと考えます．老齢者における頻尿はその患者さんの QOL を著しく下げることになります．老齢者では、下部尿路疾患でも神経因性膀胱でもない排尿障害患者さんも存在することより、内科的側面からの原因検索も必要であり，今後泌尿器科医の関わる責任は重大であると思われます．

中野間　隆（南多摩病院泌尿器科）

男性更年期について

日本の高齢者の人口が増えているといわれるが，具体的なイメージがわかなかったため，国勢調査のデータから60歳以上の男性人口が10年でどのように変化したかを単純に計算してみた．そのひとつを例として挙げると，1980年に65歳から69歳であった男性人口（1,743,659人）は1990年には75歳から79歳の年齢層となり，その10年間で31.3%の人口の減少があった．ところが1990年に65歳から69歳（2,194,783人）であり2000年に75歳から79歳の年齢層となった方々は10年間で26.9%の減少を認めるのみであった．これら比較的ご年齢の高い方々の人口減少がこれだけ抑制されるようになったのは，諸先輩方の努力の結果として誇りに思うべきデータと個人的には考えている．しかしこの数値は中高年男性がいかにQOLを保ちながら自立した生活を営んでいくかを考えることが本当に必要な時代になってきたことをいまさらながらに痛感させる結果であった．実際，今まで世間の関心を集めなかった中高年の方々の様々な問題に対する社会的な取り組み

について，最近は非常に前向きな議論が交わされるようになってきている．今回取り上げる男性更年期も以前では中高年男性の単なる加齢による変化として扱われる傾向にあったはずで，ようやく最近になり広く議論されるようになった問題のひとつではないだろうか．いろいろな理解が深まっていく中で2004年4月の日本泌尿器科学会総会においても重要なテーマのひとつとして取り上げられ，今後泌尿器科医が真剣にかかわっていかなければならないテーマになってきている．

では臨床現場において男性更年期はどのように考えられているのだろうか．一般に男性更年期の症状といわれるものには精神・心理関連の症状としての落胆，抑うつ，苛立ち，不安，神経過敏など，身体関連症状は関節や筋肉症状，発汗，ほてり，睡眠障害，記憶・集中力低下など，性機能関連では性欲低下，勃起障害があげられる．これらが女性更年期の症状に類似し，同じような年齢層で自覚されはじめることから男性更年期 (andropause) という呼称がこれらの症状を総括して使われている．しかし本来，更年期という表現には性ホルモンの減少が背景に存在しているという暗黙の理解があるにもかかわらず，上述した症状は性ホルモンの減少とは関係なく，単なるストレスやうつ病だけでも自覚症状として認められる．したがって男性ホルモンの減少を伴う厳密な意味での男性更年期は androgen decline in the aging male (ADAM) と表現されるべきともいわれている．注意しなければいけないのは中高年男性で観察されるこれらの症状は，女性のような劇的な内分泌環境の変化を伴うものではなく，正確にはある程度の男性ホルモンの低下を伴う際に生じてくる症状の総称とすべきものである．したがって ADAM 自体も正確な表現ではなく，本来は partial androgen deficiency in the aging male (PADAM) のほうが適切な表現ではないかといわれている．総括すると医療現場において男性更年期は，中高年男性によく認められる体調の変化をいわゆる男性更年期と呼ぶと割合都合がいいだろうし，その中に性ホルモンの変化が微妙に影響を及ぼしている方もいらっしゃるので注意して診療を行うべき病態である，というのが大まかな理解といえる．医療を受ける側からすれば，医学会における細かい言葉の定義は別に男性更年期という言葉が独り歩きし，ストレスで疲弊した中高年男性が自分の症状がまさしく男性更年期と考えて医療機関を受診することで，たとえ性ホルモンの異常とは関連がない病状であっても適切な治療を受ける契機となったことはむしろ歓迎すべきことかもしれない．実際テレビなどで取り上げられて以降，男性更年期外来といった専門外来の受診者数は飛躍的に増大し，このような外来の潜在的ニーズが大きかったことが明らかになっている．

本来の男性更年期の中に含まれる男性ホルモンの低下を伴う方々の治療には，最近男性ホルモンの補充療法が積極的に用いられるようになってきている．しかし中高年男性の内分泌環境の変化は女性の更年期と比較するとその変化は緩徐であり，個人差もかなりあるといわれている．また総テストステロン値は目安のひとつであるが，生理活性を有するテストステロンを正確には反映しない上，日内変動も考慮しないと正確な把握は難しいことが指摘されている．遊離テストステロンは総テストステロンに比較すると信頼性は高いといわれているが，測定方法によっては問題があり，注意が必要である．これらの背景もあり，American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines などの臨床的示唆はあるものの，いまだに男性ホルモンの補充療法の基準や是非についてはあまり明確にされていない．さらに中高年男性の病態は男性ホルモンの減少のみがその原因でなく，様々なホルモンが加齢とともに増加減少していく際に顕在化してくる複雑な肉体の変化の集大成であることも考慮する必要がある．つまり男性ホルモンの減少だけに目を向けすぎることは，中高年男性の病態生理の全体像を見失ってしまう可能性を危惧しなければならない．にもかかわらず男性ホルモンの補充療法は男性更年期の治療において一定の効果があることは以前より経験的に認められているため，今後も重要な治療戦略のひとつであるはずである．実はこれら内分泌環境の理解以前の問題として，前立腺癌が男性ホルモンと密接に関係していることより，最近まで泌尿器科医は中高年男性への男性ホルモン補充療法に対して非常に慎重であった．幸い前立腺特異抗原(PSA)が鋭敏な前立腺癌マーカーであることで，ようやくおそるおそるホルモン補充療法を多くの症例で試してみながら，悪影響ばかりでなく，その治療効果の客観的評価を蓄積してきているというのが現状と思われる．ところで以前，進行した前立腺癌を有した方で，来院時までテストステロンを含有する市販の強精剤を長期に服用していた症例を経験したことがある．この症例の前立腺癌の発症と市販薬の因果関係は追求できないが，並行輸入でもなんでもない普通の市販強精剤にたとえば蛇の粉とともにテストステロンが含有され，副作用に関する充分な指導もないままに一般の方々が内服していることは問題ではないかと考えている．話がさらにそれてしまうが，医師がこれだけ注意を払って投与している男性ホルモンなのであるから，こういった製剤に関する情報の開示はもっと厳格に行うべきであろうし，しかもこれらの市販の薬剤が病院で処方される薬剤の薬価からみれば法外とも思えるような値段で市中の薬局の

店頭に堂々と陳列されているのをみると，数円単位で厚生労働省と折衝を重ねる保健医療の現在と比較し本当に複雑な心境である．今後医療行為としての男性ホルモン補充療法が客観的に評価された結果が徐々に公表され，その効果と危険性がもっと世間において認知されるようになれば，こういった状況も次第に改善されていくものと期待したい．

男性更年期では女性更年期における骨粗鬆症のような客観的な評価が可能である病変はほとんどなく，精神心理的な評価が治療判定の大部分を占めている．したがって男性ホルモンの補充療法のみで治療が単純に終わることは通常なく，充分な精神的，肉体的カウンセリングを行う体制が本来最も重要になってくる．たしかに男性ホルモン補充が必要と考えられる症例であっても，良好な治療効果を得るためにはカウンセリングに依存する部分がかなり大きいことがわかってきているうえに，正確には把握していないが性ホルモンとは関連のない精神的ストレスが症状の主体である方々が，受診する科がないために男性更年期を扱う外来を受診しているケースは少なくないはずである．さらに精神心理的面に対しての投薬には専門家の判断も当然必要になってくることから，複数の科にまたがる医療を同時に提供できるような外来が理想である．ただこれらの患者さんに適切にかつ効率的に医療を提供していくシステムが構築されるにはもう少し時間が必要とおもわれ，しばらくの間は男性更年期様の症状を訴えて来院する患者さんには泌尿器科医が治療の窓口となり試行錯誤しながら総合的なケアを組み立てていくことになるであろう．

今のまま平和な日本が50年間続けば，ようやく中高年人口の割合は減少しゆとりの医療が将来実現されているかもしれないが，今後最低30年間は中高年男性の人口の割合は増加傾向にあることは間違いないことである．その間，日本の医療を行う医師として，また自らが中高年予備軍で医療サービスを今後享受するものとして，泌尿器科医が中高年男性のQOLの向上にお手伝いをすることができれば幸いと考えている．

矢内原　仁（埼玉医科大学泌尿器科）

プロとアマチュア

先日午後8時過ぎに長男が，「いつもなら放送されている番組が今日はない，どうしたの．」と尋ねてきた．祭日だからだろうと思ったが，一応テレビを見た．すると声の良い歌手が，スタジオにあるスクリーン上の坂本九とともに，よく知られたある歌を歌っていた．私はいつものテレビ番組とは違う，何か変だと思い確認してみたところ，昨年の紅白の再放送とわかった．ところが何かいつもの紅白とは違っていた．NHKの方針が変わったのだろうと思ったが，その後に五木寛之氏が私と全く同じ感想を述べていた．歌手は皆，少なくとも私が見始めてからは浩然として歌っていた．格調が高いのである．堕していないのである．アナウンサーも同様であった．それは，ただ緊張して原稿を読み上げると言うのではない，自身が紅白の進行に一役買っているという，今までに私が感じたことのない強烈な自負心であり，私はテレビの前で彼らの迫力に圧倒された．番組を構成する人々は，歌手，アナウンサー，裏方構成含め，皆プロである．アマチュアの私が，プロの本気で作り上げた至境に驚愕するのは考えてみれば当然であろう．

だいぶ前のことであるが，私は苦労して将棋の初段の免状をいただいた．谷川浩司氏の主催する通信教育講座で，初段申請の許可をもらったからである．昨年米長邦雄氏が紫綬褒章を受章されたため，私も二段となる栄誉を賜ることとなった．しかしアマの二段はプロ棋士の指す手の意味を突き詰めれば絶対理解できない．露骨に言えば死ぬまでできない．羽生氏は小学校の時に少なくともアマ四段の腕前で奨励会に最下級で入会しているはずである．私は誰かの説明を聞いたとしてもプロの棋譜の理解は本質的には無理である．まして谷川氏，米長氏（プロ九段）の指す手が理解できるはずがない．ただし，先手と後手がそれぞれ二手飛車先の歩を進めたら，次の一手は金を左上にあげることくらいは知っている．しかしアマ10級の人にはこれさえも少し難しいかもしれない．力の差とは人が思う以上にあるように感じる．いわゆる「実感」である．

私は医者としては産婦人科で，野澤志朗教授の御指導により細胞診指導医という資格を持っている．先日の日本産婦人科学会栃木地方部会では，自治医科大学産婦人科の鈴木光明教授（慶応義塾出身）の直属の弟子にあたる先生が子宮癌の治療に関する新鮮な発想を発表されたとき，私は驚いて確認をお願いした．座長はいつもお世話になっている大和田助教授であったが，鈴木教授に回答を求められた．鈴木教授は，「欧米は頚癌の治療を放射線治療にたよるきらいがあるため，手術についてはわれわれのやっていることが即ち回答そのものである．」と明言された．しびれるような，体がぞくぞくするようなかっこよさであった．この瞬間，国立栃木病院の院長である長谷川寿彦先生（慶應義塾出身）が感嘆の視線を鈴木教授に向けられたように感じた．その後も種々の議論は続いたが，生殖に関する議論では必ず獨協医大の稲葉教授がコメントを加え，腫瘍に関する議論では必ず自治医大の鈴木教授がコメントを加えておられた．私は稲

葉教授ご自身が広汎子宮全摘出術の大家であることも，鈴木教授門下から生殖医学に関する優秀な医師が輩出されていることももちろん知っている．プロとはなんとすばらしいことであろうか，そして専門分野で高度化すればするほど，他人の領域に対する理解も深まり，かつ慎ましくなるものなのであろうか．この会は本当に実りあるものであった．なお発表および発言の少なくとも半分は慶應義塾ゆかりの医師によるものであったのを誇りに思い，極めて痛快であった．

最近人生を心から楽しい，と感じることができるようになってきた．全部の分野においてプロになることはできない．しかしプロがやっていることをある程度まで理解することは，専門外の分野であっても可能かもしれない．福沢先生の直系である慶應義塾の塾生ならそれくらいのことは当然であろう．私は幸いにして最近それを知った．今は趣味で株式相場の変動（具体的には特定の建設銘柄）をチェックしている．しかしアマチュアが株式の売買益をコンスタントに出すことは不可能であるとの一般論に落ち着きそうである．傍目にはどんなに簡単に見えるようなことでも人生をかけているプロには，アマチュアにはわからない苦労と底知れぬ実力があるものなのかもしれない．なお益出しを考えなければ，株価の分析は十分に楽しめる．

ある程度他の分野にも興味を持って余力を有しつつ医療を行うほうが，患者にとっても幸せでないか，真の実力が発揮できるのではないか，と最近感じるようになってきている．

岸川　剛（芳賀赤十字病院産婦人科）

生殖医療と遺伝医療
－東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンターの診療－

はじめに：生殖補助医療技術の進歩は挙児を切望する不妊夫婦に多大なる恩恵をもたらした．しかし同時に，“次世代へ繋がる医療”という側面から，生殖医療に関わる様々な社会的，倫理的問題が提起されている．そして今，これらの諸問題，特に生命倫理に配慮した生殖医療が求められる時代になりつつある．このような時代の流れを背景として，平成14年4月，東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンターが開設された．

東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンターの基本理念：当センターの基本理念は，(1)医学的側面に加え，社会的，心理的および倫理的側面に配慮した診療を実現する，(2)“次世代に繋がる生殖医療”に必須である遺伝子診療部を設置した運営を行う，という2点である．

理念の実行：この2つの理念を実現に導くために，まずハード面として，従来の外来診療部門（産婦人科，泌尿器科外来）から切り離し，新たな空間としてリプロダクションセンターを新設した．施設内容としては，緊張を和らげる静かな落ち着いた空間を提供するために内装，照明，ソファの風合いなどに配慮するとともに，診療におけるプライバシー保護のために診察室・カウンセリングルームを個室空間とした．組織面では女性不妊担当の産婦人科，男性不妊担当の泌尿器科，遺伝子診療・新生児医療担当の小児科，によりセンターを構成した．遺伝子診療部は，遺伝カウセリングを行うとともに，現在は精子形成遺伝子の解析行っている．ソフト面では，関連職種（各専門科医師，看護師，エンブリオロジスト，不妊カウンセラー，臨床心理士など）が必要に応じてセンター内で一同に会して，御夫婦とともに医学的，社会的，倫理的，心理的側面に配慮した診療を行う体制とした．

診療の流れ：センターにおける診療は原則として夫婦単位である．来院された方は，センター内で産婦人科ないしは泌尿器科の診療を受けてもらうとともに，できるだけ早い時期に御夫婦で不妊教室（男性ないし女性不妊教室）に参加していただき，不妊の原因，治療方法，不妊治療における遺伝医学的側面（染色体異常，奇形，重篤な疾患の発生など次世代に関するリスク）について全般的知識を得る機会としている．この際，当センターの目指す生殖医療，診療の流れ，提供できる医療サービスについても同時に提示する．こどもが欲しいという切実な気持ちに加え様々な葛藤をかかえている御夫婦が生殖医療に関わるときに，一度立ち止まって生殖医療と次世代について考える時間をもつことは，その後の診療を進めるために重要なことである．遺伝医療を必要とする御夫婦，遺伝子解析を希望した御夫婦に対しては結果を説明し，結果をもとに今後の診療方針の検討を行う．この段階では関連科の医師，臨床遺伝専門医（小児科），不妊カウンセラーが，御夫婦とともにカウンセリングルームに集まり1回40分を目安に話し合う．妊娠成立後は妊娠中の健康，分娩，胎児に関する不安や心配については産科と遺伝子診療部，出生後は新生児科へという診療の流れを円滑に進める体制作りに努力している．

当センター遺伝子診療部の2年間：診療の流れ，遺伝子診療部の業務も徐々に軌道にのってきた．男性不妊教室は，質疑応答を聞く限り参加者が普段馴染みの少ない不妊の病態，治療，染色体，遺伝子などの話をかなり的確に理解していることが伺われ，診療の出発点として機能していることが感じられる．生殖医療に関する基本

的知識の共有関連職種と御夫婦が一同に介して問題点を話し合う環境設定は，夫婦間および夫婦と医療者間の信頼関係を築き，ひいては円滑な意思疎通の実現につながっている．臨床現場で実感される良好な患者-医療者関係は，我々が御夫婦の自己決定を生殖医療の種々の段階において援助し，生命倫理原則のひとつであるオートノミー（個人を尊重し，その人の意思決定を認める）を守るための必須条件である．

この2年間に行った遺伝カウセリングは，男性不妊のほか，Duchenne型筋ジストロフィー症の家族歴をもつ夫婦の挙児希望，重複近親婚夫婦の挙児希望，染色体異常症出産や先天異常児出産の既往を持つ夫婦の第2子希望など多岐にわたっている．「このような相談をする機関がなかなか見つからなかった」という声を耳にすることから，今後さらにニーズは高まるものと予想している．

今後の展望：今まさにゲノム時代．生殖医療のみでなく医療現場全般において遺伝医療が求められる時代になりつつある．今後，少しずつ守備範囲を広げ，現場のニーズに応えられる遺伝診療部に発展させたいと夢をふくらませている．

田中葉子（東京歯科大学市川総合病院小児科）

人工膝関節の新しい波

変形性関節症や関節リウマチの患者さんにとって，人工膝関節は疼痛や障害から解放されるということでは大きな役割を果たして来ました．その手術手技もある程度は完成されたものと言えます．しかし最近になって，技術的に注目すべきことがいくつかあります．1：手術にnavigation systemを導入する．2：手術をロボットに行わせる．3：手術を最小侵襲で行う．4：正座が可能な人工関節の開発．などです．東京医療センターでは昨年（平成15年秋）から，navigation system（以下，本システム）を用いて人工膝関節置換術を行っており，良好な結果を得ていますので，話題を提供させて頂きます．

本システムの臨床的有用性として第1に挙げられることは，従来の種々のジグを用いた手術方法と比較して，より正確な骨切り・骨切除が行えるために人工関節のサイズ決定および設置角度が正確になり，ひいては手術成績が向上することになります．さらに手術器具を工夫改良することによって最小侵襲で行えるようになると，術後の回復も早くなり，手術創の大きさも半分で済むことが予想されます．その結果，患者さんへの肉体的・精神的負担も少なくなり，入院期間の短縮にもつながるため，病院にとっても患者さんにとっても有益であると言えます．

本システムの機械構成は，主に3つの部分からなっています．1：赤外線検知カメラは天井あるいは術者の背後から患肢の位置を立体的に正確に追尾するシステムで，大腿骨と脛骨に1カ所ずつ取り付けた赤外線反射ボールとともに重要な機能を担っています．予め術前に3D-CT撮像を行ってシステムに組み込む方法もありますが，当院ではCT撮像をせずに術中に関節表面のランドマークの追尾・認識を行い，取得したポイントデータを基に3Dモデルを構築します．2：タッチスクリーンは上記3Dモデル画像を映し出すディスプレイであり，マウスやキーボードを使用せずに全ての操作を画面上で行うことが出来ます．タッチ面を滅菌フィルムで覆えば，もちろん術者自身で画面操作することも可能となります．映し出された3Dモデルを見ながら適切な人工関節のサイズと，その各コンポーネントの設置位置と角度を正確に決定することが出来ます．また術中ナビゲーション時に，3D靭帯バランス画面を見ながら屈曲および伸展ギャップの調整も行えます．3：本システムの心臓部では，パーソナルコンピュータによって，以上に述べた患者位置追尾と3Dモデル作成を行います．1996年にブレインラボ社がmassive marker technologyを業界で最初に採用して以来，ナビゲーション技術での患者・手術器具追尾法の標準的な方法となっています．

このような特徴を持った本システムを，昨秋から導入(関東地区では当院が最初にブレインラボ社のシステムを使用)しています．まだわずか7例程度の経験ですが，人工関節各コンポーネントの設置が非常に正確になったことがX線写真上でも明確であり，このことは手術の長期成績に有利な影響を及ぼすものと考えています．

横井秋夫（東京医療センター　整形外科）

何故紫外線を防御しなければいけないのか？ －皮膚科医の立場から－

私の子供の頃，といっても半世紀も前になるが，さんさんと照りつける太陽光のもとでの日光浴は健康の源と思われていた．夏に日光浴をしておくと，冬に風邪をひきにくいなどとも言われた．ところが近年，母子手帳からは日光浴の項目が消え，夏になるとテレビで天気予報と一緒に紫外線情報が放映される時代となった．いったいどうして，紫外線が悪者になってしまったのか？

太陽光は巾広い発光スペクトルをもっているが，地表に到達する波長域は290nmより長波長域である．それより短い波長域はオゾン層で吸収されて地表に到達しな

い．オゾンの最大吸収波長帯が260 nm付近にあり，DNAの吸収波長域と一致しているので，もしオゾン層が消滅すれば，260 nmの光が地表にふりそそぎ，地上の生物は全てDNA損傷を受けて消滅してしまうことになる．さて，皮膚の色が特別白くもなく，黒くもない平均的日本人が，真夏の正午に伊豆の海岸で約20分の日光浴をすると，12～24 時間後をピークに皮膚に紅斑を生じる．この紅斑反応はサンバーンとよばれ，その作用波長は290～320 nmの中波長紫外線（UVB）である．紅斑を生じる最少のUVBのエネルギー量をMEDという．窓ガラス越しの光ではサンバーンはおこさない．ガラス板は320 nmより短い波長の光を透過させないためである．320 nmから可視光域にいたる400 nmまでの波長域を長波長紫外線（UVA）という．従来，紫外線の害というとUVBを意味することが多かったが，最近ではUVAの生物学的作用も重要視されるようになった．

では何故われわれは紫外線を防御しなければならないのか．結論から先に述べれば，皮膚の光老化と光発癌の発症を防ぎ，快適な人生を送るためである．皮膚は年齢を重ねると，乾燥し，しわやしみが目立つようになる．露光部にみられるこれらの変化は生理的老化に光老化が混ざりあったもので，光防御を心がければ，すくなくとも光老化は予防することができる．光発癌は，マウスへのUVBの反復照射が日光角化症，基底細胞癌，有棘細胞癌などの悪性腫瘍を発症することで証明されている．興味深いことは，光発癌の腫瘍細胞はあらかじめUVB照射をうけた同種マウスには移植が可能であるが，UVB照射をうけないマウスには移植ができないことである．皮膚への光照射が免疫能を低下させることは明らかで，光免疫という研究領域が生まれている．人類は光環境の中で，光照射によって生じる損傷に耐えうる機能的，構造的機構を獲得することにより，今日まで生き長らえてきた．しかし，これらの紫外線防御能の閾値を越えた紫外線に，年余にわたり照射されると，光老化や光発癌をみることになる．

光が皮膚に照射されて，生物学的反応がおこるためには，光が皮膚に存在する標的分子と光化学反応をおこさなければならない．光化学反応なくして，光老化や光発癌のような生物学的反応はおこり得ない．ではどのような光化学反応がこれらの現象にかかわるのであろうか．光は波長の長いほど皮膚の深部まで到達できる．UVBは表皮を透過して真皮上層まで，UVAは真皮深層まで到達する．UVBは表皮を構成する細胞の核に吸収されると，2本鎖DNAにピリミジン2量体や（6-4）光産物などのDNA損傷を形成する．その数は，MEDの3倍のUVBに照射されると，核1個あたり10～100万個といわれている．しかし，この傷はヌクレオチド除去修復機構によって直ちに正常の2本鎖DNAに修復される．これが光損傷にたいする代表的な機能的光防御機構である．この除去修復機構に欠損があると，日光照射で容易に紅斑を生じ，子供の頃から皮膚に悪性腫瘍を多発する色素性乾皮症になることはよく知られている．ヌクレオチドの除去修復にかかわるAからGまでの7つの蛋白の遺伝子はすべてクローニングされており，その変異のある遺伝子により色素性乾皮症は相補性群が分類されている．除去修復機構に欠損のない健常人でも，サンバーンをくり返せば，修復エラーを生じ，突然変異を誘発して発癌をみる危険性はある．光発癌はUVBによるピリミジン2量体の蓄積ばかりでなく，最近ではDNAの酸化的損傷である8-ハイドロキシデオキシ・グアノシンの関与も示唆されている．一方，UVAは皮膚の深部まで到達できるので，皮膚に存在する内因性あるいは外因性のクロモフォアを介して標的分子と光化学反応をおこすことが可能となる．クロモフォアは光のエネルギーを吸収して励起され，ラジカルや活性酸素を生成して光化学反応をおこす．前者が関与する光化学反応をタイプI反応，後者が関与するのをタイプII反応という．分かりやすい例では，内服した薬剤の皮膚への沈着により発症する薬剤性光線過敏症は，その作用波長がほとんどUVAで，外因性のクロモフォアによる光化学反応の結果といえる．

構造的光防御機構の代表例は色素細胞で生成されるメラニン色素である．黄色人種の皮膚は白人に比べて光損傷をうけにくい．サンバーンのあとに続くサンタンは，メラニン色素の産生を高めて構造的光防御機構を亢進する自己防衛手段の結果といえる．しかし，人工的にサンタンをおこす目的で日焼けサロンでおこなわれる紫外線照射は，皮膚科医にとって目を疑う行為である．ひと昔前に，若い女の子に流行したガングロの皮膚は，年を経てどのようになるのであろうか．

さて，ここまで紫外線がいかに皮膚に傷害をあたえるかを述べた．しかし，皮膚科医としては最後に紫外線が難治性の皮膚疾患の治療に利用されていることを簡単に紹介しておきたい．尋常性乾癬はイスラエルの死海での海水浴と日光浴の組み合わせで皮疹が消退する．それぞれ単独では効果がない．恐らく死海の水にふくまれる未知のクロモフォアとUVA（海抜マイナス400 mの死海にはUVBはほとんど到達しない)との光化学反応の効果であろう．乾癬の治療にUVB照射も利用するが，最近では光発癌のリスクをすこしでも少なくしたnarrowband UVB (311 nm) の照射が使われるように

なった．また，UVAでも長波長側のUVA-1 (340-400 nm) がアトピー性皮膚炎の治療に利用されている．太陽が善悪二つの顔をあわせもつローマ神話の双面神ヤウスに例えられるのはむべなるかなと思われる．

松尾聿朗（帝京大学医学部附属市原病院皮膚科）

学会展望

第27回慶應外科フォーラム総会

日　時：2004年1月24日（土）13：40～18：30
場　所：東京コンファレンスセンター
主　催：慶應外科フォーラム
事務局：〒160-8582　東京都新宿区信濃町35番地
慶應義塾大学医学部一般消化器外科内

13：00	開会の辞	会長　北島政樹
13：05～13：40	学術講演（I）1～5	座長　大森　泰
13：40～14：22	学術講演（II）6～11	座長　森　光生
14：22～15：04	学術講演（III）12～17	座長　井上　聡
15：04～15：25	－休　憩－	
15：25～16：14	学術講演（IV）18～24	座長　平畑　忍
16：14～16：56	学術講演（V）25～30	座長　高林　司
16：56～17：00	－休　憩－	
17：00～18：00	特別講演 『膵のIPMTとMCTについて』	司会　北島政樹 杏林大学医学部第一外科　教授　跡見　裕
18：15～18：25	前田賞授与式	
18：25	閉会の辞	会長　北島政樹

1. 食道類基底細胞癌の一例

足利赤十字病院外科
高橋辰郎，藤崎真人，高橋孝行
平畑忍，前田大，亀井秀策
戸倉英之，犬塚和徳，鈴木実
樋野忠司，川嶋八也，保坂靖子
野呂智仁
同病理　清水和彦

目的：食道類基底細胞癌の一例を経験したので報告する．

症例：74歳，女性．既往歴および家族歴に，特記すべきことなし．平成14年末より食欲低下，食事摂取に伴う胸部違和感，吃逆，背部痛を認めていた．また，10 kgの体重減少を認めていた．近医にて上部消化管内視鏡を施行し，食道癌と診断され，当院転院となる．上部消化管内視鏡にて，上切歯列より35 cmの胸部下部食道に亜全周性の易出血性の腫瘍を認めた．内視鏡は通過せず，腫瘍より肛門側の検索は，不可能であった．検査の結果，食道癌（類基底細胞癌）（Lt-Ae, type5, T3 (Ad), N2, M0, Stage III)と診断した．腫瘍マーカーは，SCC, CEA, CA19-9すべて陰性．血色素の低下を認める他，臨床化学検査結果に異常を認めなかった．平成15年4月8日，全身麻酔下にて，左開胸開腹胸部下部食道切除，胸腔内胃管再建施行した．病理学的検査の結果，Lt-Ae, type5u, INFα, T3 (Ad), ie (-), ly1, v1, n2 (#1, #2, #7, #11p), ow(-), aw(-), ew(-) であった．角化のない扁平上皮の基底細胞類似癌細胞が浸潤性癌胞巣をなして増殖し，一部，扁平上皮癌の成分組織増を認めた．8病日目に，術後透視を施行し，吻合不全，吻合部狭窄等認めず，経口摂取を開始した．術後に問題を認めず，29病日目に軽快退院となった．追加治療は行っていない．

術後5か月後のcomputed tomographyにて，心嚢液貯留，肝転移および肺転移を指摘されているが，外来にて経過観察中である．

考察および結語：食道類基底細胞癌は，全食道癌の約2%に認められる稀な組織型である．化学療法および放射線治療に抵抗性であり，今後有効な補助療法の開発が期待される．

2. 胃食道逆流症に対する新しい経内視鏡的噴門部縫縮術

慶應義塾大学医学部外科
小澤壯治，吉田　昌，北川雄光
才川義朗，北島政樹
同大学病院内視鏡センター　熊井浩一郎

目的：最近，胃食道逆流症に対する新しい低侵襲治療として内視鏡下食道噴門部縫合結紮による敏襲形成術が注目されている．本邦ではEndo Cinch (BARD社) を用いた経内視鏡的噴門部縫縮術（Endoluminal Gastroplication，以下ELGP法）の治療成績と手技の評価を行うことを目的として「ESS研究会」が設立された．教室ではその研究に参加してこれまでに10症例に対してELGP法を施行したので，その手技上の問題点と治療成績を検討した．

対象と方法：QUEST SCORE 4点以上，内視鏡所見でLA分類GradeA, B, C，食道裂孔ヘルニア2 cm以下などの選択基準を満たす10例を対象とした．年齢は24歳～71歳，男性6例，女性4例．術前の酸分泌抑制剤使用は，H2RAが3例，PPIが7例．臨床例にELGP法を行う前に，ブタモデルを用いて術者，助手，介助看護士は十分に手技を習得した．手技の実際は，まず意識下鎮静法で内視鏡を胃内まで挿入し，胃内貯留液を十分に吸引除去し，オーバーチューブを挿入した．Endo Cinch装着用内視鏡を食道内へ挿入し，扁平円柱上皮接合部（Zライン）の1 cm肛門側の右前壁，右後壁，場合により左前壁にそれぞれZ型縫合術を行いplicationを形成した．結紮はハーフノット固定用内視鏡を用いて行った．治療前後に，アンケート形式の自覚症状評価，内視鏡検査，24時間食道pHモニタリングを行い評価した．最長観察期間は13か月である．

結果：平均plication数は2, 1，平均所要時間94.5分，Plication当たりの平均所要時間37.9分，12か月累積無症状率78%，内視鏡所見のLA・分類改善率78%，Plication完全残存率52%であった．PH4以下の逆流パーセントは術前平均27.1%から9.6%に低下した．合併症は粘膜損傷による出血2例，オーバーチューブ挿入による咽頭痛1例であったが，いずれも保存的に治療可能であった．

結論：ELGP法は症例選択を慎重に行えば胃食道逆流症に対する効果的な低侵襲内視鏡治療であると考えられた．また，合併症発生を防止するためにはトラブルシューティングを含めた手技の習熟が必要である．

3. 術前放射線化学療法後に顕在化した食道結核を合併した食道癌の一例

けいゆう病院外科
山田洋平，石川廣記，片野智之
山本健太郎，関　博章，亀谷武彦
松本秀年，森　光生，嶋田昌彦

患者は57歳男性．嚥下痛を訴え上部内視鏡施行したところ，門歯列より20 cmから40 cmにいたる全周性の糜爛，易出血性を認め生検より扁平上皮癌と診断された．放射線50 Gy＋化学療法（CDDP 200 mg＋5 FU7500 mg）を術前に施行したところ，門歯列より37 cmに全周性の狭窄を認め，また頚部CTにて右鎖骨上窩に内部が壊死状のリンパ節腫大を認め転移が疑われた．手術は開胸開腹胸部食道全摘胃管吻合術(胸骨後)を施行．病理組織学的診断にて食道の扁平上皮はほとんどの領域において欠損しており，粘膜下層に一箇所の癌の胞巣を認めるのみで，組織型はmucoepidermoid carcinomaの診断であった．また食道壁の糜爛面と提出したリンパ節（#106，右104）には乾酪壊死を伴った肉芽腫が認められ食道結核と診断された．臨牀所見上肺結核の合併は見られなかった．食道結核は比較的稀とされているが，今症例に於は術前放射線化学療法施行後にリンパ節腫大を契

機に顕在化しており，興味深い症例と思われた．

4. EMRを施行した食道類基底細胞癌の一例

平塚市民病院外科
中村　威，金井歳雄，高林　司
中川基人，坂田道生，松本圭五
関みな子，今井　俊，澤柳智樹
宮沢直人

症例は65歳，男性．平成14年11月の健康診断で下部食道に異常を指摘され当科紹介となった．当院での上部消化管造影検査では下部食道から腹部食道に移動する腫瘍像を示し，上部消化管内視鏡検査で門歯列より40 cmに約2 cm大の有茎性病変を認めた．生検で扁平上皮癌と診断され，Lt領域0-Ip型食道癌と診断し，平成14年11月26日EMR施行した．病理組織診断はbasaloid-squamous carcinoma, inf β, pT1a, ly1, v0, 断端陰性であった．患者の希望で経過観察中であるが，1年を経過した現在，再発所見は認めていない．食道類基底細胞癌は食道悪性腫瘍の中でも比較的まれな疾患であり，報告例もまだ少ない．扁平上皮癌に比べて一般に予後不良とされていたが，近年は表在型の報告も増え，表在型では比較的予後が良いとの報告もある．今回，われわれは胸部下部食道に発生した表在型食道類基底細胞癌の一例を経験したので報告する．

5. 当院におけるステレオガイド下針生検（マンモトーム®）36例の検討

慶應義塾大学医学部外科学教室一般・消化器外科乳腺班
和田真弘，池田　正，神野浩光
麻賀創太，武藤　剛，嶋田俊之
髙橋麻衣子，北島政樹

背景：近年検診によるマンモグラフィーが導入されることによって，微小石灰化病変が検出される機会が増加してきた．また，1990年代よりステレオガイド下針生検が臨床に導入されるようになり，それ以前と比較して微小石灰化病変の生検が容易になってきた．

目的：微細石灰化の性状のカテゴリー分類の有用性，およびステレオガイド下針生検（マンモトーム®）における採取本数の診断率に与える影響について検討する．

対象：2002年5月から2003年9月までに，マンモグラフィーにてカテゴリー3～5の微小石灰化病変を認めるものの，触診，超音波検査で明らかな異常を指摘できず，マンモトームを施行した36症例を対象とした．

方法：ステレオ撮影が可能なマンモグラフィーにより，石灰化の位置を三次元的に決定し，これに組織の吸引・切除を自動で行うマンモトームRを組み合わせて針生検を施行した．

結果：平均年齢は46.8歳（26～68歳）であった．平均採取本数は7.9本（2～32本）で，5本以下が6例，6本以上が30例であった．マンモトーム施行前のマンモグラフィーのカテゴリー（以下Cと省略）分類内訳は，C3が15例（41.6%），C4が16例（44.4%），C5が5例（14.0%）であった．病理組織検査結果で，乳癌症例は36例中8例（22.2%）であった．C分類別では，C4が3例，C5が2例と全てC4以上であった．採取本数別でみると，4本以下の場合（6例/36例，16.6%）3例がこのテレオガイド下針生検のみでは診断がつかず，切除生検を施行した．

考察：非触知微細石灰化病変の診断ではカテゴリー分類は有用であると考えられた．またマンモトームでは採取本数は少なくとも6本以上採取する方が適当と考えられた．

6. 肝細胞癌に対して腹腔鏡下切除，ラジオ波熱焼灼術を施行し得た1経験例

静岡市立清水病院外科
黒田浩章，川口正春，福本和彦
山崎将典，谷口正美，松田　巌

はじめに：今回我々は，肝細胞癌に対して腹腔鏡下に腫瘍切除とラジオ波熱焼灼術を施行し得た症例を経験したので報告する．

症例：75歳，男性，主訴：肝腫瘍精査，既往歴：慢性C型肝炎，肺結核後遺症にて近医通院中．昭和32年に肺結核に対して右肺上葉切除術施行（この時輸血あり）．

現病歴：近医通院中にAFPの上昇，エコー上肝右葉に約1 cm大の腫瘤を認め2003年10月に当院内科を受診し，精査加療目的にて入院となった．

入院後経過：身長152 cm，体重43 kg，貧血，黄疸，腹水なし．血液生化学的所見では，GOT/GPT=72/73，AFP=11，PIVKAII＝362と軽度の肝機能障害，腫瘍マーカーの上昇を認めた．腹部CT，超音波検査，血管造影検査施行し，肝S4に突出した2 cm大の腫瘤を認め，肝細胞癌と診断した．その他に腫瘍性病変がなく単発病変であること，今後のTAE治療の可能性を考え，腫瘍切除＋胆嚢摘出術目的にて外科に依頼となった．

手術手技：全身麻酔下にLap-C同様に開腹法にてトロッカー（12 mmを2本，5 mmを2本）を留置した．術前認めた腫瘍は肝S4の辺縁に突出するように存在した．腹腔鏡下に腫瘍切除可能と判断し，まず胆嚢摘出術を施行した．肉眼的にsafety marginをとりLCSにて腫瘍を切除した．切除標本上一部腫瘍の露出を疑わせる所見を認めたため，露出が疑われた切離面に対してラジオ波熱焼灼術を追加した．手術時間は2時間13分であった．術後呼吸機能の悪化を認めたが，大きな合併症なく術後第12病日に軽快退院した．

結語：肝細胞癌に対して，腹腔鏡下に腫瘍切除，ラジオ波熱焼灼術を施行した1例を経験したので報告した．

7. 静注メトロニダゾールが肝機能改善に有効であったアメーバ性肝膿瘍の一例

東京歯科大学市川総合病院外科，
半田　寛，正村　滋，佐藤道夫
小川信二，原田裕久，田中豊治
浅原史卓，安藤暢敏
同放射線科
豊田圭子，清水　桜

症例は34歳，男性．5年前に1年半タイに在住しており，男性同性愛歴がある．平成14年12月30日，39度の発熱，右背部痛のため当院泌尿器科紹介受診となった．WBC 19000, CRP 32.8で右腎盂腎炎を疑い同日入院となった．抗菌薬使用するも解熱傾向を認めなかったため，平成15年1月6日腹部CT検査施行したところ，肝膿瘍，肝腫大を認め，外科転科となった．同日，経皮経肝膿瘍ドレナージ術を施行し旧血様粘調な液体が吸引できた．ドレナージ後もチューブからの流出悪く，黄疸も増強し肝不全への移行も危惧された．膿汁からの一般細菌培養は陰性で，アメーバ性肝膿瘍を疑うも，膿瘍，糞便の鏡検では虫体虫卵は確認できなかった．血清赤痢アメーバ抗体が高値であったことから赤痢アメーバによる肝膿瘍と診断した．メトロニダゾールの内服を試みるも併存する麻痺性イレウスのためには内服は不可能であったため，「熱帯病オーファンドラッグ研究班」から供与された静注用メトロニダゾールを投与し，膿瘍の縮小，炎症所見の消退と共に肝機能全身状態も改善した．文献的考察も加えて報告する．

8. 総胆管に穿破した膵管内乳頭粘液性腫瘍の1例

伊勢原協同病院外科
篠田政幸，中安邦夫，飯尾　宏
西岡道人，横山剛義，熊谷厚志
別所　隆

はじめに：膵管内乳頭粘液性腫瘍（intraductal papillary-mucinous tumor, IPMT）は，ときに十二指腸，総胆管などの他臓器に穿破することが知られている．われわれは，総胆管に穿破したIPMT由来の浸潤性膵管癌の1例を経験した．

症例：67歳，男性．主訴：黄疸．

経過：糖尿病の治療中に主訴出現．PTCD造影で，総胆管と膵管との瘻孔が疑われた．また，PTCDから1日3000 mlにもおよぶ大量の粘液の排出が見られた．CT, MRI, ERCPより膵鉤部の分枝型IPMTが総胆管に穿破したものと診断した．PTCSでは，いわゆるイクラ状の乳頭状腫瘍が観察された．膵頭十二指腸切除（PD-IIA-1）を施行した．なお検査入院中，十二指腸潰瘍穿孔を併発し保存的に治療したため，全胃幽門輪温存術は行わなかった．TS2，局所進展度因子はCH（+）以外すべて（−）で，T3N0, s Stage IIIであった．術後経過は良好で，術後18日目に退院した．

病理所見：高円柱上皮からなる腫瘍が分枝膵管および主膵管内に乳頭状に増殖し，一部浸潤像も認められ"膵管内腫瘍由来の浸潤癌"と診断された．リンパ節転移は認めずf Stage IIIと判定した．

考察：IPMTは腺腫（IPMA）と腺癌（IPMC）とに分けられる．予後の良い膵癌と考えられていたIPMCも，本例のように他臓器へ穿破する例は非浸潤例に比べれば必ずしも良いとはいえず注意を要する．本腫瘍の穿破機序，予後についての文献的考察とともに報告する．

9. 腹腔鏡下胆嚢摘出術のクリニカルパスを使用した収益面からの検討

済生会宇都宮病院外科
玉川英史，篠崎浩治，加瀬建一
植松繁人，小林英之，小林健二
大塚秋二郎
同経営支援課　菅田典孝

目的：近年日本の医療は包括医療にむけての準備がなされつつある．そこで当院で古くから使用されている腹腔鏡下胆嚢摘出術（以下LC）のパスを用いて期待される収益，収益に影響する因子を検討した．

対象：2002年9月1日から2003年2月28日までに予定入院でLCを行った18症例を対象とした．

結果：使用したパスは当院での第2世代の腹腔鏡下胆嚢摘出術用パスで，手術前日入院，術後2日目から4日目に退院の設定となっている．入院収益を直接人件費，直接材料費，間接材料費，間接人件費，共通間接費に分け日毎に算出した．バリアンス発生で退院が延びた症例は3例（18%）であった．執刀医ごとの使用する機材による差は余り認められなかった．手術前日入院日から退院日までの収益は入院日-6000，手術当日＋13万，1POD＋11000，2POD＋600，3POD＋600，4POD退院日＋3300（単位：円）であった．手術時間における人件費が最も大きく影響した．手術時間は64.3±20.5分であったが，手術時間が30分の症例は75分の症例に比し＋35000であった．手術時間が4時間半で入院の収益が0になると予想された．当院で腹腔鏡下胆嚢摘出術のパスを用いて治療すると＋138000の収益が得られる計算となった．当院における腹腔鏡下胆嚢摘出術のパスの変遷と，今後の展望，共同研究病院として済生会福井病院，済生会熊本病院の数値も参考として発表する．（済生会医学・福祉共同研究）．

10. 切除可能であった非機能性膵島細胞腫瘍の一例

国立埼玉病院外科
小島正之，牛島康榮，原 彰男
石塚裕人，早津成夫，牛田知宏
福光 寛
同病理 島田哲也

膵内分泌腫瘍の比較的まれな一例を経験しこれを報告する．症例は63歳，女性．自覚症状はなし．2002年3月子宮体癌（Stage I）にて準広汎子宮全摘，両側附属器切除，骨盤リンパ節郭清施行し，術後化学療法にて外来経過観察中であった．同年8月婦人科のフォローアップCTにて，膵尾部に3 cm大の腫瘤を認め，外科紹介・入院となる．術前腹部画像診断で，膵尾部に3 cmのsolid tumorを認め，CTで比較的辺縁平滑で，境界明瞭，MRIにてT2で膵実質よりややhigh intensityをしめし，早期より濃染される点から，孤立性のislet cell tumorと診断．同年11月13日膵尾部切除，脾臓摘出術施行した．腫瘤割面では比較的境界の明瞭な色調の異なる2種類の組織像を呈していた．また，ミクロ像にて組織学的にはislet cell tumorと呼べるものであるが，一つはgyriformが，もう一つにはglandularな構造を主構造にもっていた．またglandularな構造をもつ方にのみ周囲膵組織・脂肪組織・副脾に対して浸潤性の増殖を認め一部表面への露出，リンパ節転移を疑わせる所見を呈していた．同一膵内に2種類の異なった構造をもつ内分泌腫瘍を経験した．また，1種類に関しては，周囲への浸潤像を呈し，リンパ節転移も疑われた．文献的考察を加え報告する．

11. 慶應義塾大学病院における成人肝移植適応候補者の検討

慶應義塾大学病院移植コーディネーター 添田英津子
同大学医学部外科
島津元秀，若林 剛，星野 健
田辺 稔，河地茂行，吉田 昌
北島政樹

目的：わが国における肝移植は1997年に臓器移植法が施行されたが脳死ドナーからの臓器提供者は少なく，肝移植は生体ドナーによる生体肝移植に頼らざると得ない状況である．一方，最近の移植手術や術後管理の進歩により，急性肝不全，肝細胞性疾患（B型・C型肝硬変など），腫瘍性疾患（肝細胞癌など）の末期肝不全状態にある患者に対しても肝移植手術適応が拡大し肝移植候補者数は増加してきている．この研究の目的は，これまでの当院における肝移植候補者の転帰を分析することにより，本邦の肝移植の現況とその問題点を考察することである．

対象および方法：2003年1月から12月までの期間，慶應義塾大学外科に登録中の成人肝移植候補者39名の肝移植登録用紙（エントリーシート）を用い，原疾患，平均年令，転帰を分析する．

結果：移植登録患者の原疾患はC型肝炎ウィルス（20名，51%）とB型肝炎ウィルス（6名，17%），アルコール性肝硬変（4名，10%），PBC・PSC（4名，10%）とその他（5名，12%）であり，登録者の平均年齢は51.0歳であった．登録者のうち4名（6%）が生体ドナーがいないため脳死肝移植を希望していた．生体肝移植希望者のうち4名（10%）が生体肝移植手術に至り，12名（31%）が移植待機中，13名（33%）が移植手術に至らずうち8名（21%）が死亡していた．その他，3名が消息不明，3名が他施設で移植手術を受けていた．移植手術に至らない理由としては，移植登録の時点ですでに原疾患が移植適応外や禁忌項目の存在（6名），生体ドナーがいない（5名），高齢（2名）などがあった．

考察および結論：肝移植候補者が増加する一方で，生体肝移植で対応できない症例が多数存在していることがわかった．今後，国内の極端な脳死ドナー不足，医療費の問題，生体ドナーの術後の精神的・身体的健康状態の長期観察など多くの問題を解決することが大切である．

12. 腫瘍性病変様の形態を呈したGastritis Cystica Profundaの一例

水戸赤十字病院外科
川久保雅祥，諏訪達志，内田智夫
佐々木貴浩，星川竜彦，佐藤宏喜
古内孝幸，竹中能文，佐久間正祥
同病理 堀眞佐男

はじめに：Gastritis Cystica Profunda（GCP）は胃切除後の吻合部に発生する慢性嚢胞性胃炎として報告されてきたが，手術既往のない胃の原発性隆起性病変としてのGCPは極めて稀である．最近35歳の悪性腫瘍様の形態を呈したGCPの一例を経験したので報告する．

症例：35歳 男

現病歴：胃集団検診で異常を指摘され，平成15年3月当院を受診．自覚症状なし．

経過：内視鏡検査では，胃体下部大弯に最大径約4 cmの扁平隆起性病変を認めた．境界は比較的明瞭だが，腫瘍表面は凹凸不整で白苔の付着を伴っていた．同部の生検を2回施行したが，regenarative mucosaであった．しかし，肉眼的には腫瘍性病変様であり，わずかの悪性の可能性を否定しきれず，3月末，幽門側胃切除術（D2, B-I再建）を施行した．術後経過は問題なく，術後17日目に退院した．

病理所見：炎症性細胞浸潤を伴う病変は主に粘膜下層内に存在し，粘膜下層の肥厚を伴っていた．粘膜固有層から粘膜下層にかけては，多数の大小不同，様々な形をとる嚢胞化した腺成分と平滑筋成分を含んでいた．腺は一部破裂して粘液が間質に及んでいるが悪性像はなく，gastritis cystica profundaと診断された．

考察：本疾患はまれな疾患であり，かつては胃切除後の吻合部に発生する前癌病変と考えられていて，GCPを発生母地とした癌の発生例の報告もある．現在では一般的に萎縮性

過形成性胃炎の一群として認識されてきているが，その病態発生機序はほとんど不明である．基本的には非腫瘍性の良性病変であるが，腺成分のみならず平滑筋成分の増生をも含むことから，全体として悪性腫瘍様の形態を呈することもある．良性であることの確定診断が困難なため，臨床的取り扱いにおいて十分配慮を要すると考えられた．

13. 上部胃癌に対する完全腹腔鏡下噴門側胃切除

㈱ライフ・エクステンション研究所附属永寿総合病院外科
松井英男，五十嵐直喜，萩生田純
星本相淳，小山恭正，宮北　誠

腹腔鏡下手術の普及により，主として縮小手術の可能な中下部胃癌に対し，腹腔鏡下幽門側胃切除が行なわれるようになったが，上部胃癌に対する腹腔鏡下手術は，とくに再建手技が確立されていないこともあり，報告が少ない．胃上部領域では，腹腔鏡による視野の方が開腹時よりも格段に優れており，腹腔鏡下手術の良い適応と考えられる．また，噴門側胃切除術は，脂肪の消化吸収やガストリンなどの消化管ホルモンの分泌が温存されるなどの理由から胃全摘術に比較して利点も多い．われわれは，自動縫合器（linear stapler）を用いた食道・消化管吻合法の導入により，胃上部胃癌に対し完全腹腔鏡下噴門側胃切除を施行したので報告する．症例は，81歳女性．貧血を主訴に来院し，上部内視鏡検査にて胃噴門部に約4 cm大の0-I+IIa型の易出血性病変を認め，生検で胃癌と診断された．術前診断では，cT1（SM）N1（No 2）H0P0であり，臨床研究的治療であるという十分な説明の後，腹腔鏡下手術が選択された．手術は，開脚頭高位5 portで開始した．胃結腸間膜を左1/3の部位より脾門部にかけて切離し，左胃大網動静脈，短胃動静脈を処理し，脾上極を残して小彎に移り，右胃動脈の第2枝以降を切離しNo 3を郭清した．小網を切開し，迷走神経肝枝は温存した．胃の切離は術中内視鏡で腫瘍より3 cm離して自動縫合器で施行した．次に右横隔膜脚が露出するよう横隔食道靭帯を切離，尾側で膵上縁を剥離し，左胃動静脈を処理することでNo 9, 7, 11 pを*en-block*に郭清した．さらに左側の横隔食道靭帯を切離し，左下横隔動脈の食道噴門枝を根部で処理し，No 2を郭清した．食道周囲は約5 cm長にわたり十分に剥離した．剣状突起下に1 port追加し，再建は切除胃をつけたまま食道残胃側側吻合を鏡視下に行った．共通孔は自動縫合器で閉鎖し，その操作に連続して食道の切離を終了した．左下のportを3.5 cmに開大し，切除胃を摘出した．手術時間は7時間14分，出血量は150 mlであった．患者は第1病日より歩行可能で，第7病日よりsoft dietを開始し，術後経過は良好であった．

14. 腹腔鏡下胃部分切除3年後に腹腔内再発を来たした早期胃癌の1例

多摩丘陵病院外科
清水芳政，白部多可史，川上真未
今井　達郎

腹腔鏡下手術は低侵襲性が評価され悪性疾患に対しても急速に普及・発展してきている．胃癌に対しては本学の故大上医師によりEMR対象外の深達度Mの早期胃癌に対して行なわれた腹腔鏡下胃部分切除術（以下，大上式）が最初である．この手術は数箇所の孔だけで胃の部分切除が行なえる画期的な術式であり，多くの患者さんがその恩恵を蒙ったものと思われる．しかし，リンパ節郭清を行なわない本術式はいたずらに適応を拡大しないこととリンパ節再発も念頭に置いた術後の経過観察が重要と思われる．今回われわれは早期胃癌に対する大上式手術後，3年2ヶ月で，広範な腹腔内リンパ節再発が認められた症例を経験したので報告する．症例は74歳の男性で1998年4月に早期胃癌で他施設において大上式手術を受けた．術後定期的に内視鏡検査を受け，再発はないと言われていたが，2001年1月に脳出血で倒れリハビリ目的で当院に入院した．入院後食思不振・体重減少があり精査したところ胃壁・肝外側区域・膵体尾部を巻き込んだ巨大な腹腔内再発が認められた．脳出血後でリスクは非常に高かったが，本人の希望もあり左上腹部内臓全摘術を施行した．術後呼吸・循環器動態が安定せず集中治療を続けていたが，12 PODに突然の予期せぬ腹腔内大量出血で死亡した．病理学的診断でも胃癌の再発であることが確認され，腹腔内のリンパ節転移であると推定された．初回手術時の病理診断でsm1, ly0, v0と診断されたが，sm 1の範囲がわずかであることから再手術は行なわれなかったようである．また術後の再発チェックも内視鏡検査だけであったため高度に進行した再発が見逃されていたものと思われ，腹腔鏡下手術に携わる一員として示唆に富む症例と考えられたので報告した．

15. 進行・再発胃癌に対するSecond line chemotherapyとしてのWeekly Paclitaxel療法

済生会神奈川県病院外科
江川智久，長島　敦，北野光秀
土居正和，林　　忍，吉井　宏

目的：進行・再発胃癌における化学療法の有用性は，生存においてbest supportive careに比して良好というエビデンスはあるものの，いまだ標準的治療は存在しない．Second line chemotherapyでは，腫瘍量が多く，患者の全身状態の悪い症例もあり，効果もされことながらfeasibleなレジメンが求められる．今回，われわれはTS-1を中心としたfirst line chemotherapyの後のsecond line chemotherapyにおけるweekly Paclitaxelの有用性につき検討した．

対象および方法：前治療歴を有する進行・再発胃癌11例を対象とし，retrospectiveに，奏功率・副作用・生存期間

を検討した．実際の投与法は short premedication 後に Paclitaxel 70 mg/m² を5%グルコース 250 ml に溶解して1時間かけて静脈内に投与した．Paclitaxel は週に1回，3週投与し1週休薬を1クールとした．

結果：1〜23クール（平均5.4クール）の投与が施行され，奏効率は33%であった．副作用としては grade 3 以上の好中球減少が27.2%に認められた．全生存期間の中央値は160日，無増悪生存期間の中央値は104日であった．

考察および結論：Weekly Paclitaxel 療法は second line chemotherapy 以降の胃癌化学療法として有用であることが示唆された．ただし，performance status 2 以上の症例では grade 3 以上の好中球減少が生じやすく注意が必要である．

16. 術前化学放射線療法にて病理組織学的 CR を得た局所進行胃癌の2例

慶應義塾大学医学部外科
中村理恵子，才川義朗，久保田哲朗
吉田　昌，古川俊治，大谷吉秀
熊井浩一郎，北島政樹

目的：われわれは2001年5月より S-1/low dose CDDP を局所進行胃癌に導入し良好な結果を報告してきた．今回 S-1/low dose CDDP に放射線療法を追加し，原発，リンパ節ともに complete response（CR）を得た症例を2例経験したので報告する．

症例と結果：（症例1）76歳，男性．術前検査にて cStage IV（cT4, cN2, cP0, cH0, cM0）を診断され，全身化学療法（S-1 100 mg/m²＋CDDP 20 mg/m² 5投2休を1クールとして3クールを1コース）施行した．画像上，著変を認めず NC と診断した．全身化学療法に放射線療法（2Gy/Fr, 計28 Gy）を加えた併用療法を追加し，1コース施行した．化学放射線療法後，原発巣とリンパ節転移巣の著明な縮小を認め，partial response（PR）と診断した．加療後の診断は cT4, cN 1, cP0, cH0, cM0, cStage II であった．毒性は grade 3 血小板減少と grade 2 白血球減少を認めた．その後胃全摘術（D1）を施行した．病理組織学的に原発，リンパ節ともに腫瘍細胞を認めなかった．（症例2）37歳，男性．術前検査にて cStage IV（cT4, cN2, cP0, cH0, cM0）を診断された．全身化学療法（S-1 60 mg/m²＋CDDP 20 mg/m² 5投2休を1クールとして3クールを1コース）後，画像上，NC と診断した．全身化学療法（CDDP 6 mg/m² に変更）1コースに放射線療法（2Gy/Fr, 計30 Gy）を追加し，原発巣とリンパ節転移巣の著明な縮小を認め，PR と診断した．加療後の診断は cT4, cN 1, cP0, cH0, cM0, cStage II であった．その後胃全摘術（D2），脾摘を施行した．切除標本に腫瘍細胞を病理組織学的に認めなかった．

結論：近年，新規抗癌剤の開発により進行胃癌に対して奏効率が上昇している．その中でも TS-1・CDDP 併用化学療法は高い奏効率を有し，化学療法単独で奏効率75%を示すが，放射線療法を追加することにより病理組織学的に grade 3 を得ることができた．本療法は高度局所進行胃癌に対する新しい治療戦略の一つになり得ると考えられる．

17. 早期胃癌症例で Mucosal break を伴う逆流性食道炎を認めた場合，未分化型胃癌である理由

慶應義塾大学医学部外科
細田シロシ，吉田　昌，久保田哲朗
大谷吉秀，古川俊治，才川義朗
中村哲也，北島政樹
同病院内視鏡センター　熊井浩一郎
同大学医学部救急医学　石川秀樹

目的：食物に含まれる亜硝酸塩が唾液中に分泌され，噴門部で胃酸と出会うと nitric oxide となり，発癌に関与している可能性が報告されている．そこで，噴門の形態や萎縮の程度が，胃酸の食道逆流などを介し，癌の発生部位に影響をおよぼす可能性を検討した．

方法：2001年4月10日2003年2月26日にかけて当院で施行された257例の早期胃癌症例の上部消化管内視鏡検査を検討した．逆流性食道炎は Losangeles 分類で，色調変化型も加えて評価し，食道裂孔ヘルニアは Keio Cancer Detection Center form（K-form）にて，噴門形態は，Isail らの V-grades にて評価した．萎縮は A 型萎縮に加え，B 型を木村，竹本分類で評価した．K-form：Grade 0；正常，Grade C；胃粘膜が非全周性に挙上，Grade B；3 cm 未満の全周性挙上，Grade A；3 cm 以上の全周性挙上．V-grades：V0；正常，V1；small hernia 下部食道のしまり良好，V2；hernia を認めない open cardia，V3；大きなヘルニアを伴う open cardia.

結果：内視鏡的逆流性食道炎と組織型（(分化型/未分化型）に統計学的に関連を認め，分化型癌では mucosal break を認めることは無く，Mucosal break を認めた症例は，全て未分化型癌であった．しかし，V-grades も，K-form も組織型との間に関連を認めなかった．噴門部癌と V-grades, K-form との関連も認めなかった．萎縮の範囲と組織型について検討すると，早期胃癌のほとんどが，Open Type に存在した．未分化型胃癌については，Closed Type にも存在することがあり，有意差を認めた．すなわち，Closed Type では殆どが未分化型癌であった．萎縮の範囲と噴門部癌（食道-胃接合部から2 cm）について検討すると，噴門部癌も他の部位の癌とほぼ同じで，全ての症例がopen typeの胃に存在していた．

結論：mucosal break を伴う逆流性食道炎は，萎縮の少ない Closed Type の症例に起こり，Closed Type の胃にできる癌の殆どが未分化癌であった．したがって，癌の発生に対する噴門形態の関与は否定的であり，噴門部癌は他の部位の癌と同様に，胃粘膜の萎縮に伴って発生することが示唆された．

18. Hemosuccus pancreaticus を呈した膵仮性胞に巨大総腸骨動脈瘤をともなった1例

慶應義塾大学医学部外科
和多田晋，松本賢治，松原健太郎
秋好沢林，井上史彦，新谷恒弘
金田宗久，北島政樹

症例は69歳，男性．2003年6月20日，背部痛を主訴に近医受診し，急性膵炎を疑われ同日入院．精査にて径6cmの左総腸骨動脈瘤を認めたため，7月1日当院転院となった．腹部CT，MRI検査にて左総腸骨動脈瘤および膵体部に膵仮性？胞を認め，胞内出血が疑われた．緊急血管撮影検査にて，脾動脈根部，背側膵動脈に仮性瘤を認め，胞内へ造影剤が流出していた．仮性瘤に対し塞栓術を施行し，胞はcoilingした．また，造影剤の主膵管への流出を認め，hemosuccus pancreaticusを呈していた．その後，徐々に全身状態は改善し，左総腸骨動脈の巨大瘤に対して，まず7月17日にF-Fバイパス術施行．22日に左総腸骨動脈瘤に対し，中枢および末梢側よりコイル塞栓術を施行した．術後の造影で膵仮性胞ならびに左総腸骨動脈への血流は認めず，8月12日退院となった．本症例は，比較的まれなhemosuccus pancreaticusをきたした病態に巨大総腸骨動脈瘤をともなっており，様々な治療法の選択により良好な結果が得られた．

19. 感染性腹部大動脈瘤に対し人工血管置換術を施行した1例

川崎市立川崎病院外科
狩野忠滋，掛札敏裕，石井誠一郎
納賀克彦

目的：今回我々は感染性腹部大動脈瘤に対し人工血管置換術を施行した1例を経験したので報告する．

対象・結果：症例：62歳男性　主訴：下腹痛　現病歴：2003年10月中旬に下腹痛を訴え近医を受診し，CTにて腹部大動脈瘤を指摘され当院紹介受診となった．経過：CTにて腎動脈以下に径5.5cmの嚢状動脈瘤を認めた．術前の血液培養では陰性であったが，WBC10040，CRP9.7と炎症所見を認めた．感染性瘤が疑われたため，術前に抗生剤を投与した．手術ではリファンピシン浸漬グラフトをもちいて直型人工血管置換術を施行し，大網充填も施行した．瘤壁は可及的に切除した．瘤壁の病理組織所見では肥厚した壁内に炎症細胞浸潤がみられ感染性動脈瘤の所見と一致していた．また，明らかな細菌コロニーは認められなかった．瘤壁の細菌培養は陰性であった．術後は炎症反応も陰性化し経過良好にて退院となった．

考察：感染性腹部大動脈瘤は比較的稀な疾患であるが，急速に増大し破裂に至るため可及的すみやかな外科的治療が必要とされる．自検例に若干の文献的考察を加えて報告する．

20. 癌細胞に対し増殖抑制および形態変化を及ぼした，癌浸潤リンパ球由来ヒトモノクローナル抗体に関する分析

慶應義塾大学医学部外科
青木真彦，熊井浩一郎，才川義朗
吉田　昌，古川俊治，大谷元秀
久保田哲朗，北島政樹

目的：ヒト癌細胞に対して生物学的反応性を示すヒトモノクローナル抗体を取得し，*in vitro* における特性評価を行った．

対象および方法：手術切除検体の各種癌組織から癌浸潤リンパ球を遊離し，マウスミエローマ細胞株P3U1と融合し，ハイブリドーマを作製し抗体の産生を行った．①cell ELISA法にて既存の癌細胞株との反応性を示すクローンを選択し，クローニング後，産生抗体の精製を行った．②精製抗体の単独での作用評価として，MTT assayなどを用いた増殖抑制効果や光学顕微鏡を用いた肉眼的に把握可能な変化について分析した．③精製抗体の癌特異性の評価として，ホルマリン固定した正常組織切片と癌組織切片を用いて免疫組織化学染色にて反応性を比較した．④精製抗体の認識する抗原の同定を試みた．

結果：①肺癌組織浸潤リンパ球からヒトモノクローナル抗体HoAKs-1が取得された．②HoAKs-1は肺・膵・胃癌細胞株に対して癌細胞に形態変化を及ぼし，正常血管内皮細胞に対しては変化を及ぼさなかった．肺・膵癌細胞株で約50%以上の増殖抑制効果を示した．③HoAKs-1は免疫染色では，肺・膵癌細胞株の大部分に反応性を示し，肺正常組織に反応性を示さなかった．④抗原は分子量約55 kDaで，解析にて中間径フィラメントのペプチド配列の一部と一致する部分を有した．

考察および結論：HoAKs-1はいくつかの癌細胞株に対して，①癌細胞の形態変化，②癌細胞増殖抑制効果，③癌細胞との特異的反応性を示した．現在，本抗体の臨床応用への可能性について更なる検討を行っている．

21. 当院における胃内視鏡的粘膜切除の成績

川崎市立川崎病院外科
一色聡一郎，清水宏之，大森泰
石井誠一郎，納賀克彦

当院では胃腫瘍性病変に対し，主として可変針長の高周波ヘラ状メスを用いた切開剥離法により内視鏡的粘膜切除（EMR）を施行している．潰瘍瘢痕を伴わない分化型粘膜内癌のうち径1.5cm以下の陥凹型もしくは2cm以下の隆起型を適応としているが，最近では小さな未分化型癌，広範なIIa病変，潰瘍瘢痕を伴う病変に対しても充分なインフォームドコンセントをとった上で粘膜切除を施行している．過去5年間の症例につき集計し報告する．1999～2003年に当院において施行した胃EMRは154例で，うち胃癌症例は132例であった．手技としては切開剥離法（56%）を中心

にEMR-C法，2チャンネル法などが用いられていた．合併症として4例の出血と，1例の穿孔を認めた．再発は4例で，断端不明もしくは陽性のまま経過観察されていた症例であった．いずれもEMR施行後1年以内に再発が確認されており，追加EMRおよびAPC焼灼によりコントロールされている．完全切除例では再発例はなかった．切開剥離法を用いて行った85例のうち，病理組織学的一括完全切除は75%，断片の再構成により完全切除と判定したものが5%であった．また，完全切除率は年々向上しており，2002年以降の完全切除率は90%以上であった．胃癌のEMRに際しては病理組織学的な根治性の検証のためには，できうる限り一括切除することが望ましい．切開剥離法は確実に胃癌を一括切除しうる優れた手技であり，今後内視鏡的粘膜切除の主流になりうる手技と考えられる．一方合併症のリスクはまだ高く，今後も手技の習熟，処置具の改善が必要であると考える．

22. 内視鏡下に切除し得た十二指腸Brunner腺腫の一例

東京電力病院外科
隈元雄介，栗原直人，菊池　潔
露木　晃，藤城保男

Brunner腺腫は以前は比較的稀な疾患と考えられていたが，内視鏡診断の進歩に伴い近年報告が増加している．しかし，術前診断が困難なことが多く，術式の選択に苦慮する場合が多い．今回，我々は，十二指腸球部に発生した径3.5センチ大の粘膜下腫瘍様の形態を示した腫瘤に対し，内視鏡下粘膜切除術を施行しBrunner腺腫と診断した症例を経験したので報告する．

症例：37歳　男性．主訴，なし．

経過：平成15年4月，検診の上部消化管造影検査で十二指腸球部の異常を指摘され，精査加療目的に当院紹介となる．上部消化管内視鏡・造影検査にて十二指腸球部後壁より立ち上がりをもつ腫瘤を認めた．表面は正常粘膜に覆われており，潰瘍形成なし．超音波内視鏡では，腫瘤は全体的に等エコーを示したが，一部のう胞状変化を示唆する低エコー域を伴っていた．MRI検査では，Gd造影効果のある上皮性腫瘍が疑われた．術前画像検査からは確定診断がつかず，GIST，カルチノイドなどの悪性疾患との鑑別が必要と考え，内視鏡下粘膜切除術を試行した．病理組織検査にてBrunner腺過形成と診断されたが，一部，Ki-67陽性で核腫大と組織構造の乱れを伴う領域があり，adenomaとしての性格が混在すると診断された．術後経過は順調で，第11病日に退院した．

考察：Brunner腺腫は十二指腸球部に好発し，表面が正常粘膜に覆われるため粘膜下腫瘍の形態をとることが多い．組織学的にはBrunner腺腫と呼ばれているが，真の腫瘍ではなく，粘膜固有層の深層や粘膜下層に分布する異型性のないBrunner腺の過形成により腫瘤を形成したものと考えられてきたが，少ない頻度であるが，真の腺腫と考えられる病変も存在することがわかってきた．今回のように術前診断が困難であり，内視鏡下粘膜切除，開腹局所切除により，診断されることが多い．

結語：今回我々は内視鏡下に切除し得た十二指腸Brunner腺腫の一例を経験した．Brunner腺腫の画像診断につき検討した報告は少なく，患者のQOLを考えた適切な術式を選択するためにも今後の症例の蓄積が必要と思われた．

23. 中心壊死による空洞形成を伴う胃GISTの一例

荻窪病院外科
金子剛士，村井信二，半田真一
中村明彦，山内秀夫

今回われわれは，難治性の胃潰瘍を伴う胃憩室と診断し，手術を施行し，術後の病理診断にてGISTと診断された一例を経験したので報告する．症例は85歳女性．特別養護老人ホームに入院中の平成15年7月より食欲不振を認め，近医でHb6.1と貧血を認めたため，精査目的に当院入院となった．上部消化管造影では，胃体上部前壁に径5.5 cmの憩室と内部に潰瘍形成を認めた．上部消化管内視鏡検査では，胃体上部小弯側に憩室と思われる入口部と内部からの出血を認めた．腹部CTでは胃体上部に空洞を伴う径6.5 cmの腫瘤形成を認めたため胃憩室と診断した．家族の希望により，保存的治療を試みたが，食事のたびに出血が見られるため当科依頼．9月22日に憩室切除術を施行した．術後の病理診断にてGISTと診断され，腫瘍の中心壊死による空洞形成によるものであることがわかった．中心壊死による空洞形成を伴う胃GISTの一例を経験し，若干の文献的考察とともに報告する．

24. 貧血によるめまい，下血を主訴として発症した小腸Gastrointestinal stromal tumor (GIST) の2症例

東京電力病院外科
栗原直人，隈元雄介，菊池　潔
露木晃，藤城保男
同内科　若林寛二，小玉博明

はじめに：GISTは消化管原発の間葉系腫瘍の総称である．今回，十二指腸および回腸GISTを経験したので報告する．

症例1：64歳，男性．1998年7月29日下血，めまいを主訴に来院し，高度貧血にて緊急入院した．上部消化管内視鏡・造影検査にて十二指腸Vater乳頭やや肛門側に径3.5 cm，中心に潰瘍を伴った粘膜下腫瘍が認められた．血管造影では膵十二指腸動脈アーケードから栄養される十二指腸原発平滑筋肉腫が疑われた．ASPDA，PSPDA，IPDAからTAE施行，腫瘍濃染は消失した．TAE 2週間後のCTでは腫瘍は約50%縮小したが，造影効果は陽性であった．9月14日手術施行し，十二指腸下行脚下部に径2.8×2.2 cmの腫瘍が認められ，肝転移，腹膜転移は認められなかった．病変部を局所切除し，同部位を縫合閉鎖した．病理所見は境界明瞭な結節性病巣が認められ，充実性に紡錘型細胞が増殖し，

切除断端は陰性であった．免疫組織化学的検討ではS-100（+），desmin（+）であり，神経と平滑筋の両者に分化傾向がある GIST と診断した．核分裂像は目立たず，低悪性度と判定した．

症例2：56歳，女性．2003年7月17日下血，めまいを主訴に来院し，高度貧血にて緊急入院した．上部・下部消化管内視鏡検査は特記すべき異常は認められなかった．腹部CTは，径5cm大の回盲部腫瘤が認められ，造影剤服用後，腫瘍内部に造影剤は認められず，腫瘍により腸管が圧迫されていた．小腸透視では中央に深い潰瘍がある4cm大の粘膜下腫瘍が回腸に認められた．小腸GISTを疑い，手術施行した．手術所見はトライツ靭帯から210cmの回腸に径9×6cmの壁外発育型粘膜下腫瘍が認められ，肝転移，腹膜転移は認められず，腫瘍を中心に回腸部分切除施行した．病理組織所見は粘膜面に潰瘍を形成する腫瘍で，紡錘型細胞が索状に配列，細胞密度は高く，免疫組織化学的検討では c-kit（+），CD34（+），α-SMA（+），S100（−），Desmin（−）であり GIST と診断した．

結語：GIST に対する治療の原則は外科的切除である．非切除症例あるいは再発症例に対してメシル酸イマチニブの有効性が報告されているが，補助化学療法としての有効性についての報告はない．上記症例は現在まで再発は認められていないが，今後も厳重経過観察が必要であると考えられた．

25. 診断が困難であった回盲部腫瘤の一例

国立霞ヶ浦病院外科
田野敦子，壁島康郎，亀山哲章
戸泉篤，田村洋一郎，影山隆久

今回我々は診断が困難であった回盲部腫瘤の一例を経験したので報告する．症例は55歳，男性．平成12年9月胃癌に対し幽門側胃切除術を施行，術後経過は順調であったが，平成15年4月より右下腹部痛が出現した．注腸検査で回腸末端部に狭窄を認め，その原因として潰瘍または潰瘍瘢痕，クローン病，腫瘍性病変が考えられた．下部消化管内視鏡検査において回腸末端に Type2 様の病変を認めたが，生検結果では悪性所見は認められなかった．CT 検査では回腸末端部から盲腸付近の著明な壁肥厚を認め腫瘍性病変が疑われたが，炎症性疾患も否定できなかった．以上から，回腸末端部の狭窄の原因として小腸癌または炎症性腸疾患が考えられ，症状が持続していたことから，7月3日悪性腫瘍に準じて腹腔鏡併用回盲部切除術（D2郭清）を施行した．病理組織組検査の結果は UI-Ⅳ の潰瘍で回腸末端部に限局した単純性小腸潰瘍と診断され，悪性所見は認められなかった．術後経過は順調で術後15日目に退院となった．単純性小腸潰瘍は確定診断が得られれば内科的治療が第一選択とされるが，突然の大量下血や腸穿孔で発症した場合は手術適応となることが多い．しかし今回我々は診断が困難であった単純性小腸潰瘍に対して，待機手術を行い順調な術後経過を示した症例を経験したため報告する．

26. ステロイド抵抗性潰瘍性大腸炎（UC）に対して顆粒球吸着療法（GCAP）が奏効した1例

浜松赤十字病院外科
橋口尚子，奥田康一，安形俊久
小林尚史，大住幸司，清野徳彦
龍村俊樹，西脇　眞，安藤幸史

目的：今回我々は，ステロイド抵抗性潰瘍性大腸炎に対し顆粒球吸着療法（GCAP）が奏効した1例を経験したのでその有効性について若干の文献的考察を加え報告する．

症例：患者は30歳，男性．主訴は腹痛，粘血便．平成15年8月上旬より腹痛と6〜7行の粘血便が出現し，8月28日当院外科紹介受診した．大腸内視鏡検査施行しS状結腸までの挿入にて，S状結腸から直腸にかけて連続的に発赤，浮腫，びらん，膿性粘液及び顆粒状変化を認めたため潰瘍性大腸炎と診断した．入院の上，禁食，ペンタサ9T 3×，ステロネマ注腸開始したが粘血便は20行以上となり，腹痛も持続したため9月10日全大腸内視鏡検査施行した．内視鏡所見では盲腸から直腸にかけてびまん性に地図状の潰瘍形成，管腔の狭小化，発赤，浮腫，びらん，膿性粘液を認めたため全大腸炎型潰瘍性大腸炎診断した．ステロネマ注腸を中止しプレドニゾロン40mg/日より点滴静注を開始し，80mg/日まで増量したが効果認められず10月24日GCAP開始した．

結果：GCAP施行3回目ごろより症状軽快しはじめ，6回目終了後には腹痛，粘血便は消失した．プレドニゾロンを静注より内服に変更し，漸次減量を計り20mg/日で緩解を維持している．

考察および結論：急性期の潰瘍性大腸炎でステロイド療法に抵抗性のある患者に対し GCAP は過剰な免疫反応を調節し炎症を沈静化させ，ステロイドの節減をもたらすと考えられた．

27. 下部直腸癌に対する内肛門括約筋部分切除術の長期予後と術後肛門機能

慶應義塾大学医学部外科
鶴田雅士，長谷川博俊，西堀英樹
石井良幸，青木成史，矢部信成
柳　在勲，岡林剛史，落合大樹
高野正太，浅原史卓，北島政樹

目的：当科では通常の器械吻合（DST）では肛門側切除断端（AW）の確保が困難であり，骨盤底筋群に癌の浸潤がないと考えられる下部直腸癌に対し，内肛門括約筋部分切除による括約筋温存手術（ISR）を施行してきた．今回，本術式の長期予後と肛門機能について評価し適応と有用性について検討した．

方法：1993年から2002年までに ISR を施行した下部直腸癌は31例あり，これらの臨床病理学的因子と治療成績と

の関連について評価した．ISRの全例に一時的人工肛門を造設したが，そのうち人工肛門を閉鎖し自然肛門を使用している症例に対しアンケート調査を行い，肛門機能を評価した．また，同時期に下部直腸癌（Rb）に対しDSTを施行した症例に対してもアンケート調査を行い，両群の肛門機能について比較検討した．

結果：ISR 31例の内訳は男性：21例，女性：10例，平均年齢：57.3±9.3歳，観察期間中央値：57.1ヶ月（4-106ヶ月）であった．平均AWは1.3±0.6 cm，pT stageは
T0：1例，T1：8例，T2：11例，T3：9例，T4：1例，pTNM stageは0：1例，I：15例，II：5例，III：9例，IV：1例であった．全生存率は85.1%，無再発生存率は65.7%，遠隔再発率は10.3%，局所再発率は31.0%であった．局所再発率は，最大腫瘍径（<3 cm：11.8%，≧3 cm：58.3%；P=0.014）とpT stage（T1：0.0%，T2：45.5%，T3：40.0%；P=0.003）に有意な関連を認めた．肛門機能のアンケート有効回答例は，ISR群17例とDST群15例であった．肛門縁から腫瘍下縁までの距離（AV）（4.0（2.0-6.0）vs. 7.0（5.0-9.0）cm；P<0.001）とAW（1.3（0.5-2.1）vs. 2.0（1.0-3.0）cm；P<0.05）はISR群で有意に短かった．排便回数，urgency, day soiling，パッドの使用，残便感，Cleveland Clinic Incontinence Score（CCIS）に有意差は認めなかったが，night soiling（76.5 vs. 26.7%；P<0.005）はISR群で有意に高率であった．

考察：本術式の適応は，T1癌が妥当と考えられた．肛門機能はISR群ではDST群と比較し，night soilingが高率であったが，CCISに有意差は認めず，本術式は括約筋温存手術として有用と考えられた．

28. 塩酸モルヒネ15,000 mg/日にて疼痛コントロールを行った痔瘻癌再発の一症例

大田原赤十字病院外科
安倍晋也，赤松秀敏，白土裕之
金井義彦，三井洋子，松田純一
松井淳一，雨宮　哲

症例は44歳，男性．胃癌・右腎癌・痔瘻癌の三重癌の診断で，二期的に平成11年12月27日幽門側胃切除術vD2＋右腎摘出術，平成12年1月31日骨盤内臓全摘術＋左大殿筋・薄筋による筋皮弁充填術を施行した．痔瘻癌の組織型はmucinous carcinoma，右梨状筋浸潤（＋）であったが，組織学的にはew（－）とされた．骨盤内臓全摘術2年5ヵ月後，画像上骨盤内局所再発が指摘された．平成14年7月24日から9月4日まで骨盤内照射（計50 Gy）し，経口全身化学療法（UFT-E 400 mg/日）を併用，継続し，退院となった．以後徐々に会陰～殿部痛が増強し，硫酸モルヒネ（MSコンチン）20 mg/日内服を開始，漸次増量し，硫酸モルヒネ（カディアン）240 mg/日に移行するも疼痛コントロール不十分であり，平成15年6月24日入院となった．塩酸モルヒネ持続点滴を100 mg/日から開始し，フェンタニル貼付剤（デュロテップパッチ）も併用したが投与量は漸増した．全身状態は良好であり在宅モルヒネ持続静注を考慮するため，7月2日より塩酸モルヒネ持続点滴単独に変更し，800 mg/日から開始，レスキューとして1日量の1/5～1/4を点滴静注投与した．モルヒネ投与量はWHOラダーに従い疼痛の訴えに応じて1.3～1.5倍に徐々に増量した．7月3日には1,600 mg/日，7月30日には6,000 mg/日にまで達したが，多少の眠気と便秘を認めるだけで，呼吸器・中枢神経等の副作用はなく，完全除痛状態が得られた．疼痛により著しく低下していたADLも改善し，上大静脈留置カテにインフューザーポンプ（バクスター製，容量275 ml，5.0 ml/時，塩酸モルヒネ5,000 mg/日注入可能）を接続することで外出も可能となった．なお，外出時には塩酸モルヒネ末1,000 mg/包をレスキューとして内服した．その後も疼痛増強とともにモルヒネ投与量は漸増し，9月3日には10,000 mg/日，9月7日には15,000 mg/日に達した．最終的に9月9日失ったが，死亡直前まで疼痛やモルヒネの副作用に苦しむことなく，意識清明，呼吸状態良好で，経口摂取，会話も可能であった．塩酸モルヒネ15,000 mg/日持続静注で充分な除痛が得られ，副作用もコントロールでき，非常に良好なQOLの得られた終末期癌患者の一症例を経験したので報告する．

29. S状結腸腹膜垂捻転症の1例

多摩丘陵病院外科
川上真未，白部多可史，
清水芳政，今井達郎

今回われわれは急性虫垂炎の診断で緊急手術を施行し，術中所見でS状結腸腹膜垂捻転症と判明した症例を経験したので報告する．

症例は45歳の男性で右下腹部痛を主訴に来院した．理学所見より急性虫垂炎を疑い同日緊急手術を施行した．腹腔鏡で腹腔内を観察すると虫垂は正常であったが，右下腹部腹壁に黒く変色壊死した脂肪織が癒着していた．周囲を剥離していくとS状結腸の腹膜垂の捻転・壊死であることが判明したためendo-GIAで切除し手術を終了した．切除した組織は病理組織学的には出血性梗塞壊死を起こした脂肪結合織で腹膜垂捻転症に合致した所見であった．術後経過は良好で5病日に退院した．

腹膜垂は大腸の自由結腸紐に沿って存在する漿膜下脂肪組織に連続した脂肪体でS状結腸や盲腸に多く見られる．腹膜垂捻転症は腹膜垂炎（epiploic appendagitis）の一型であり比較的稀な疾患である．腹膜垂炎は血行障害型と非血行障害型に大別され，本邦報告例の多くは血行障害型で，その原因は捻転による出血性梗塞がほとんどである．捻転の成因としては腹膜垂の基部が細く捻転しやすい先天的要因の存在や脂肪沈着が高度となり重くなった腹膜垂が捻転しやすいなどの後天的要因が挙げられているが詳細は不明である．非血

行障害型には憩室炎や回腸炎など周囲の炎症が波及したものが多く含まれていると考えられ，真の腹膜垂炎には含まれないケースも多い．

症状が重篤化することはほとんどないが急性腹症で発症し特徴的な臨床症状や検査所見がなく，急性虫垂炎や憩室炎・付属器炎などの疑いで開腹手術が行われ，術中にはじめて診断されることがほとんどである．治療は壊死した腹膜垂の切除だけで十分であり予後も良好である．

急性腹症の緊急手術ではこのような予期せぬ疾患に遭遇することもあり腹腔鏡下手術の有用性は非常に大きい．今回の手術でも不必要な虫垂切除や大開腹を行なうことなく必要最低限の侵襲で治療を終了することができた．

30. 脾転移および脾静脈血栓を伴った上行結腸癌の1例

公立福生病院外科
平岩訓彦，古川秋生，鎌野俊彰
河島俊文，仲丸　誠，五月女恵一
宮崎洋史，諸角　強英

症例は49歳女性．2003年5月腹痛を主訴に当院内科を受診した．X線にて小腸ガスを認めたため腸閉塞と診断し，入院となった．下部消化管内視鏡検査・注腸造影にて上行結腸癌を認め外科転科となった．CTにて脾臓に転移と考えられる低吸収領域を認めた．また，血管造影およびMR angiographyにて脾静脈は描出されず，脾静脈合流部において門脈に突出する造影欠損を認めたことから，腫瘍塞栓の合併が考えられた．6月18日上行結腸癌に対して結腸右半切除（D3郭清），脾・膵体尾部・門脈合併切除施行．術中所見として脾静脈から門脈へ連続する塞栓を触知したため，門脈前面で膵を切離し，門脈を脾静脈合流部で部分切除，端端吻合した．また，脾転移の横隔膜浸潤を認めたため横隔膜合併切除を行った．病理組織診断はmoderately differentiated adenocarcinoma, aw(-), ow(-), INFγ, se, ly(2), v(1), 2群リンパ節転移陽性，結腸癌脾転移と診断された．脾静脈内には腫瘍細胞は存在せず，脾静脈血栓症と診断された．術後6ヶ月現在外来にて化学療法を行っている．大腸癌の脾転移に対する脾摘の意義に関しては，症例数も少なく一定の見解は得られていないが，長期生存例の報告もある．上行結腸癌に脾転移および脾静脈血栓を伴った例はこれまでに報告が無く，若干の文献的考察を加えて発表する．

慶應医学会平成15年度庶務・会計報告

平成16年2月9日（月）第5会議室において午後1時30分より理事会・評議員会が開かれ，平成15年度庶務・会計決算報告ならびに平成16年度予算が承認された．

承認事項は下記の通りである．

○**会費**：年額5,000円（ただし，無給教員と大学院生は3,000円）

○**平成15年度庶務報告**（平成15年1月1日～12月31日）

会　　員：2,604名（学内928名，学外1,676名）

物故会員：計4名

五島雄一郎（24），　伊賀　六一（27），　西本　征央（特），　矢作　浩通（36）

総　　会：（第83回）平成15年11月14日（金）午後3時開会

シンポジウム『システム生物学　ー生体を捉える新しい手法とその展望ー』（慶應ライフフォーラムと合同開催）を開催した．

例　　会：35回（平成15年1月1日～12月31日）

理事会・評議員会：平成15年2月4日（火）＜平成14年度決算報告＞

平成15年10月20日（月）＜平成15年度中間報告＞

編集会議：年5回開催

雑　　誌：『慶應医学』第80巻1号～4号まで発刊

○**平成16年度事業計画**（平成16年1月1日～12月31日）

1）学術雑誌『慶應医学』編集発行

2）慶應医学会総会（平成16年11月12日予定）

3）慶應医学会例会，年約50回開催（慶應医師会・THE KEIO JOURNAL OF MEDICINEと共催）

4）理事会・評議員会，毎年2回（中間報告・決算報告）開催

5）定例編集会議，必要に応じて開催

○平成 15 年度会計決算報告（平成 15 年 1 月 1 日～ 12 月 31 日）

収入の部				支出の部			
勘定科目	予算(A)	実績(B)	差額(B)−(A)	勘定科目	予算(A')	実績(B')	差額(B')−(A')
補助金収入＊1	1,600,000	100,000	△ 1,500,000	原稿費	600,000	222,220	△ 233,339
会費収入	9,500,000	10,566,000	1,066,000	査読費		144,441	
広告料収入	600,000	391,720	△ 208,280	論文掲載補助費	600,000	780,000	180,000
掲載料収入	1,600,000	5,308,629	3,708,629	業務委託費	8,000,000	2,681,770	1,935,432
雑収入	50,000	143,393	93,393	印刷費＊2	−	7,253,662	
				発送費	600,000	906,555	306,555
				会議費	100,000	46,409	△ 53,591
				学会費	3,000,000	2,440,419	△ 559,581
				事務費	1,100,000	2,211,988	1,111,988
				備品費	100,000	0	△ 100,000
				雑費	100,000	0	△ 100,000
				予備費	1,500,000	0	△ 1,500,000
当期収入合計	13,350,000	16,509,742	3,159,742	当期支出合計	15,700,000	16,687,464	987,464
前期繰越額	24,315,317	24,315,317	0	当期収支差額	△2,350,000	△177,722	2,172,278
収入合計	37,665,317	40,825,059	3,159,742	次期繰越収支差額	21,965,317	24,137,595	2,172,278

＊1　医学部からの補助金の入金が遅れた為，￥1,500,000 過少に表示されています．（平成 16 年 1 月 19 日入金済）
　　なお，この￥1,500,000 は平成 16 年度補助金収入に計上されます．

＊2　15 年度より実費請求

○平成 16 年度予算（平成 16 年 1 月 1 日～ 12 月 31 日）

収入の部			支出の部		
勘定科目	平成 15 年度予算	平成 16 年度予算	勘定科目	平成 15 年度予算	平成 16 年度予算
繰越金	24,315,317	24,137,595	原稿料	600,000	800,000
補助金＊1	1,600,000	3,100,000	査読費		225,000
会費収入	9,500,000	10,000,000	業務委託費	8,000,000	1,280,000
広告料収入	600,000	600,000	印刷費		9,000,000
掲載料収入	1,600,000	3,850,000	論文掲載補助費	600,000	750,000
雑収入	50,000	50,000	発送費	600,000	940,000
			会議費	100,000	30,000
			学会費	3,000,000	2,150,000
			事務費	1,100,000	1,000,000
			備品費	100,000	50,000
			予備費	1,500,000	1,500,000
			支出計	15,600,000	17,725,000
			次期繰越収支差額	22,065,317	24,012,595
合　計	37,665,317	41,737,595	合　計	37,665,317	41,737,595

＊1　医学部からの補助金￥1,500,000が入金の遅れにより，平成 16 年度収入となる．
　　そのため，医学部からの補助金￥1,500,000の入金が平成 16 年度に 2 回あるため補助金予算を￥1,500,000 増額し，修正した．

○慶應医学会役員

（任期：平成15年1月1日～平成16年12月31日）

会　　長　北島　政樹

理　　事　相磯　貞和（副会長）

石川　博通（会計担当）

小口　芳久（渉外担当）

池田　康夫（総務担当）

監　　事　小川　　聡

末松　　誠

編集委員　林　　松彦（編集委員長）

上田　政和

梅澤　明弘

鹿島　晴雄

斎藤　英胤

村田　　満

村松　太郎

饗庭　　了

○評議員

（任期：平成15年1月1日～平成16年12月31日）

岡田　保典

小林　紘一

武田　純三

末舛　恵一

矢部　　裕

岡島　重孝

○慶應医学会会則（昭和59年11月改訂）

第1条：本会は慶應医学会と称する．

第2条：本会の目的は医学の進歩と啓発を図るにある．

第3条：本会は慶應義塾大学医学部の出身者，関係者ならびに本会の目的に賛同する医師およびその他の者で組織する．

第4条：本会に会長1名，副会長1名，理事若干名を置く．会長は医学部長があたり，理事は評議員の選挙により，また副会長は理事の互選により決める．副会長と理事の任期は2年とする．但し，重任を妨げない．

第5条：本会に監事2名を置く．監事は会長が指名し，任期は2年とする．

第6条：本会に評議員若干名を置く．評議員は会長が委嘱し，任期は2年とする．

第7条：本会の事務所は慶應義塾大学医学部内に置く．

第8条：本会は毎年1回総会を開き，また随時例会を開く．本会の会員，あるいは理事会が承認した者でなければ本会の主催する諸学会で研究業績を発表することが出来ない．

第9条：本会は学術雑誌『慶應医学』を刊行して会員に無料で配布し，また有料で会員以外にも頒布する．

第10条：本会の経費は会費，その他の収入を当てる．会費の額は理事会および評議員会において決定し，総会の承認を受ける．

第11条：本会の会計年度は毎年1月1日から始まり，同年12月31日に終る．

第12条：理事は毎年度の収支決算書を作成し，監事の監査を受けたのち，評議員会の承認を経て総会に報告しなければならない．

第13条：本会則は総会の決議を経なければ変更することが出来ない．

雑　　報

慶應医学会例会第 1347 回

日　時　平成 16 年 2 月 18 日(水)　午後 5 時

場　所　セミナールーム 5

演　題　Development of liposome encapsulated hemoglobin and studies of hemorrhagic shock by use of imaging studies with oxygen-15 and other radiotracers

演　者　Dr. William Thomas Phillips
Professor
University of Texas Health Science Center at San Antonio TX
USA

担　当　外科学教室

慶應医学会例会第 1348 回

日　時　平成 16 年 4 月 13 日(火)　午後 5 時

場　所　新棟 11 階大会議室

演　題　Anti-TNF antibody for IBD

演　者　北川　誠司先生
Associate Professor of Pediatrics
Baylor College of Medicine
Pediatric Gastroenterology
Texas Children's Hospital
Houston, TX
USA

担　当　小児科学教室

『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す．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す．掲載の採否は編集委員会にて決定し，採用となった場合は速やかに掲載証明書を発行し掲載巻号を通知いたします．

原稿はオリジナルとコピーを一部ずつ下記あてに届けて下さい．

〒160-0016
東京都新宿区信濃町 35 信濃町煉瓦館 3 階
財団法人国際医学情報センター学会事務室
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）

初校の校正は著者にお願いします．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．A 4 判の白紙に横書き（35 字/行×23 行の約 800 字詰）で，上下を約 2.5 cm ずつ，左右を約 3 cm ずつあける．外国語の原語綴は行末で切れないようにする．変換できない文字や記号は手書で明瞭に書き入れる．第 1 ページには，表題・著者名・所属を和文と英文で記入し，図表の数，希望別刷部数（50 部単位），連絡先（郵便番号，住所，所属，電話および Fax 番号，e-mail のアドレスなど）を必ず記入する．編集や印刷上の注意事項があれば朱書で指示を入れる．原稿には頁数を各頁の右下に記入する．

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT）　英語での表示とする．

1）読者が一読して論文の主旨が明確にわかるもの．

2）150 語ないし 200 語以内にまとめる．

3）ダブルスペースで A4 判の用紙にタイプする．

4）題名にすでに表記されているものを最初の文章で繰り返さないこと．

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

6）数字が文頭にある場合はスペルアウトし，文中ではアラビア数字を用いる．

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

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

略語は各分野を通じて周知のもの以外は使わない．

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

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

9. 見出しの振り方（参照例）

研究成績

1. 臨床的事項

1）頻度

a) ……

(1)……

(i)……

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

11. 図（写真） そのまま印刷できる鮮明なものを用いること．光沢のある白い印画紙の上に焼き付けたものかそれに準じたものとする．手書は受付けない．大きさは原則として横幅8 cm もしくは16 cm，縦（最長）23 cm 以内のものを用意する．電子顕微鏡写真および光学顕微鏡写真は倍率を明示すること．原図の裏に著者名・図番号・天地の指示（矢印）を鉛筆書きし，A 4 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[1]によれば，……という報告がある[2,3]．" のように肩に番号をふる．文献表は本文とは別とする．共著者のある場合すべての著者名を書き，スタイルはバンクーバー方式とする．論文のタイトルの文頭のみ大文字とし，あとは小文字で書く．雑誌名は公式の略号を用い，頁は最初と最後を必ず書く．（下記の例を参照する．）

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

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

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

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

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

16. 単位，符号 基本単位：10^3→k，10^6→M，10^{-6}→μ，10^{-9}→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，$a=m^2\times10^2$，$ha=a\times10^2$．容積：m^3，mm^3，m*l*，d*l*，*l*，質量：pg，ng，μg，mg，g，kg．時間：hr，min，sec，msec（本文中でジ・フン・ビョウと読む場合は時・分・秒と書いてもよい）．電気諸単位：(volt)；μV，mV，V，kV，MV，(ampere)；μA，mA，A，kA，(ohm)；mΩ，Ω，kΩ，MΩ，(watt)；μW，mW，W，kW，MW，(farad)；pF，μF．放射能諸単位：(becquerel)；Bq，kBq，MBq，(sievert)；mSv，Sv．放射性同位元素：^{131}I，^{14}C，^{3}H．

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する．

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

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので，参照のこと．

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

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

3) Day RA：How to write and publish a scientiffic 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て下さい．

（2003年1月）

「学位申請論文」投稿の手引き

「学位申請論文」について

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

1．学位取得の十分条件ではない．

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

2．二重投稿が回避できる．

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

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

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

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

3．プライオリティーを主張することはできない．

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

論文作成上の注意

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

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

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

4．英文抄録（ABSTRACT）は不要である．

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

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

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

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

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

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

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

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

なお，ご不明の点については事務局に問い合わせて下さい．

（2002 年 5 月）

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

編集後記

手術成績や癌治療の5年生存率の病院間の較差が巷の話題になっています．医療情報の公開は今後益々進み，患者が病院を選ぶ際の情報もそれにつれて増加してゆくでしょう．情報公開は必要なことでありますが，情報は正しく提供され正しく理解されないとさまざまな影響がでること，そして正しい情報を提供する為には多くの労力と財源が必要なことも理解されるべきでしょう．

4月から臨床研修の必修化がスタートしました．既にさまざまな現場の声が聞こえてきます．新制度が成功するかは今後数年が正念場と思われますが，いずれにしても新制度が臨床系の医師の大学での研究に大きな影響を与えることは間違いありません．このような中で，高い医学的レベルを保ちつつ専門外の人々にも解りやすい内容を提供することが「慶應医学」の役割です．編集委員としては「慶應医学」の高いレベルを保ちつつ各分野の専門家による原著や解説論文をもっともっと充実させたいところです．

今月号（第81巻2号）の慶應医学には総説4編，解説1編，講座3編が掲載され，また調査報告，話題などもあり，非常に盛り沢山の内容になりました．いずれも話題性があり，読みやすくまた大変興味深い内容です．引き続き皆様からの平易かつ質の高い論文の投稿をお待ち致しております．

(村田　満)

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6月19日　印刷
平成16年6月25日　発行
編集者
発行者　北島政樹
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下さい．

複写される方へ
本誌に掲載された著作物を複写したい方は，(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 oder 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2号別頁
平成16年6月25日

学位論文

慶應医学会

慶應医学・81(2)：T39～T50，2004

学位論文

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

慶應義塾大学医学部外科学教室
（指導：河瀬　斌教授）
福永篤志

（平成15年9月22日受付）

Key Word： unruptured cerebral aneurysm, higher brain function, cerebral blood flow, smoking

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またはラッピング術（以下，開頭術という）が施行されることが多くなってきた[1]．くも膜下出血を発症すると，その半数以上の人が死亡または運動麻痺や失語症などの後遺症のために通常の日常生活を送れなくなってしまうので，それを予防できることは社会的にも非常に有意義である．このような観点から，われわれ脳神経外科専門医は，患者さんおよびその家族に充分な説明を行い，同意を得た上で手術を行っている．

UANの開頭術は，死亡率がほぼ0％で安全性が高いと言われているが[1]，手術後に「集中力が低下した」，「記憶力が低下した」などの高次脳機能障害を呈する患者が少なからず存在する．明らかな神経学的異常所見を示さないために，外来では何もせずそのまま経過観察されることがほとんどであるが，術前には可能だった仕事に支障をきたす場合もあり，患者にとっては極めて重要な問題である．このような高次脳機能障害を，外来で簡単な神経心理学的検査することで早期に発見し，その回復過程を注意深く経過観察する必要があるが，いまだ確立された方法はなく，手術後どのような時点で職場復帰させればよいかという指標がないのが現状である．したがって，開頭術が正常な大脳へ及ぼす影響について，高次脳機能や脳血流の変化など，詳細に検討することは極めて重要であると考えられる．また，脳ドックは日本独自のもののため，全く正常な活動をしている人の手術前後の高次脳機能を調査した研究は世界的にも少ない[2~5]．

本研究では，正常大脳に及ぼす開頭術の影響を神経心理学的アプローチにより詳細に検討することを目的とする．まず第1段階として，UAN 61例に対し高次脳機能検査と脳血流検査を開頭術前後に施行して，これらの変化を検討する．一方，以前より喫煙と脳疾患との関連性が指摘されている[6]．Rogers[7]らによれば，慢性喫煙により動脈硬化が促進され局所脳血流が低下し，その結果脳卒中が増加するのだろうと考えられており，井坂[8]らも，慢性喫煙は，高齢者においてとくに脳血流低下促進因子になると注意を呼びかけている．また，Cervilla[9]らは，喫煙は認知機能障害の危険因子で，高齢者には禁煙を促すべきだと主張している．そこで，第2段階として，習慣性喫煙が開頭術前後における高次脳機能の変化に及ぼす影響に注目して詳細に検討する．

対象および方法

1．対象

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て前側頭アプローチ（pterional approach）による開頭術が施行されたUAN患者61例で

本論文は，Fukunaga A, Uchida K, Hashimoto J, Kawase T：Neuropsychological evaluation and cerebral blood flow study of 30 patients with unruptured cerebral aneurysms before and after surgery. Surg Neurol：51：132-139, 1999の一部，およびFukunaga A, Kawase T, Kashima H, Hashimoto J, Uchida K：Effects of habitual cigarette smoking on higher cortical function in patients with unruptured cerebral aneurysms. Neurol Med Chir (Tokyo)：42：419-426, 2002の一部を含む．

ある．本研究に関して充分な説明を行い，全例に研究参加の同意を得た．内訳は，男性29例，女性32例，年齢21～77歳（平均56.3歳）で，術前に，軽度の頭痛やめまい以外の明らかな神経学的異常所見を認めた症例はなかった．70歳以上の高齢者は3例であった．全例右利きで，アルコール中毒，重症頭部外傷，貧血の既往歴はなかった．

2. 喫煙者と非喫煙者

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例であった．中等度喫煙者は5例と少なかったので，本研究（第2段階）の比較対照からは除外した．

3. 脳動脈瘤および手術の準備

UANの部位の内訳は，中大脳動脈19例，前交通動脈18例，内頚動脈17例，その他（椎骨脳底動脈または複数の動脈）7例であった．術前カンファレンスで，主治医を含めた脳神経外科専門医8～12人により手術適応や手術法に関する綿密なディスカッションを行い，その後，主治医から患者およびその家族に対して手術に関する充分な説明を行い，同意を得た．

4. 高次脳機能検査

かなひろいテスト，迷路テスト，Mini-mental state examination（MMSE）の3検査を，術前と術後1ヶ月に同一検者が施行し，術後1ヶ月に異常を認めた場合には術後3ヶ月に再検査するようにした．

1）かなひろいテスト：406文字からなる昔話を読み，意味を読みとりながら同時に「あ，い，う，え，お」を拾い上げて丸をつける．61点満点．制限時間2分間．年代毎に平均点が決まっており，1.5 SD（標準偏差）以下は異常と判定する．前頭葉機能評価に適しており，正常者には通常，学習効果（2回目以降の再検査で点数が上昇すること）があると言われている[10]．

2）迷路テスト：5×6のます目に花，星，りんごの絵が描いてあり，花，星，りんごの順にスタートからゴールまで辿っていくもの．正常者は60秒以内にゴールに到達できる．所要時間（秒）がそのままスコアとなり，90以上を異常と判定した．前頭葉と右頭頂葉の機能評価に適している[11]．

3）MMSE：見当識，言語，計算，記憶再生，描写の5つの項目に分かれており，主に大脳後半部の機能評価に適している．国際的に汎用されている認知機能検査の1つ．30点満点で24点以下は痴呆と判定される[12]．

5. reliable change indicesの計算

同じ高次脳機能検査を同一被検者に2回繰り返して行なう場合，検査結果に変動が生じることが知られている[13~15]．今回われわれは，学習効果などの再検査時のスコアの変動を考慮して，Jacobsonら[13]の方法でreliable change indices（RCI）も計算し，データを詳細に検討した．すなわち，まず術前後のスコアデータからコンピューターソフトウエア（StatView 5.0）を用いてSDとtest-retest reliability（相関係数；Rel）を計算し，その値から相違標準誤差（SEdif）を下記の公式(1)より算出する．SEdifは，もし実際に被検者に変化がなかった場合の予測されるスコアの変化分布を表している．

公式（1）：$SEm = SD \times \sqrt{(1-Rel)}$

$SEdif = SEm\sqrt{2}$

そしてRCI値は，下記の公式(2)で計算される．

公式（2）：RCI＝｜（術後スコア）－（術前スコア）｜/SEdif

計算されたRCI値が1.64よりも小さい場合には，信頼区間90%以上で実際には変化がなかったであろうと判断できるという[14,15]．よって，RCI（90%信頼区間）＝±1.64×SEdifとなる．

6. 脳血流検査

Single photon emission computed tomography（SPECT）により，高次脳機能検査と同時期に脳血流測定を行った．具体的には，アイソトープ［99 m-technetium-ethyl cysteinate dimmer（^{99m}Tc-ECD），925MBq］を，アセタゾラミド15 mg/kg静脈注射して15分後に静注し，東芝製ガンマカメラ（GCA-9300A/HG）にて撮影を行った．投影データは15分間の連続スキャンで収集され，フィルター補正逆投影法にて128×128マトリクスで再構築された．作製された画像は2名の放射線科医が読影し，術後1ヶ月の局所脳血流が術前より明らかに低下していると判断した場合に「脳血流低下」と診断した．

7. 統計学的解析

カイ2乗検定，Mann-Whitney U-test，One-way ANOVA，repeated measures ANOVAとフィッシャー直接確率法にて，StatView 5.0（Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA）を用いて計算した．有意差は$p<0.05$とした．また，重度喫煙者と非喫煙者の比較の

第1表　未破裂脳動脈瘤61例のデータ，動脈瘤の部位別特徴および重度喫煙者（Heavy smokers）と非喫煙者（Non-smokers）の比較．（Fukunaga A et al：Neurol Med Chir (Tokyo) 42：419-426, 2002 の Table 1 を許可を得て改変，転載）

	Total (N=61)	MCA (N=19)	ACoA (N=18)	IC (N=17)	F, p values**	Heavy smokers (N=11)	Non-smokers (N=45)	p value
Men	29	10	8	6	not examined	8	18	0.051#
Women	32	9	10	11	not examined	3	27	0.051#
Age (yrs)	56.3±8.8* (range 21-77)	56.3±10.1* (range 21-69)	57.0±9.6* (range 40-77)	55.9±6.7* (range 45-72)	0.063, 0.94	60.5±8.7*	56.0±8.9*	0.17**
Educational level (yrs)	13.5±2.7* (range 8-16)	13.4±2.9* (range 8-16)	13.9±2.9* (range 8-16)	14.1±2.0* (range 11-16)	0.34, 0.71		13.5±2.7*	0.16**
Site of aneurysm								0.94**
MCA	19	—	—	—		3	14	
ACoA	18	—	—	—		4	13	
ICA	17	—	—	—		3	12	
others	7	—	—	—		1	6	
Size of aneurysm (mm)	6.2±3.9* (range 3-25)	6.6±2.6* (range 3-10)	5.5±3.0* (range 3-13)	7.0±6.1* (range 3-25)	0.63, 0.54	5.6±2.7*	6.0±4.3*	0.99**
Operation time (min)	356±97* (range 194-719)	348±77* (range 230-493)	378±83* (range 260-562)	343±116* (range 210-719)	0.63, 0.53	381±113*	349±95*	0.34**
Temporary occlusion time (min)	6.9±2.7* (N=7)	7.3±3.8* (N=3)	5.8±1.9* (N=3)	9 (N=1)	not examined	9 (N=1)	6.6±2.8* (N=6)	not examined
Postoperative CT abnormal finding	7	1	2	2	not examined	1	6	0.70#
Smokers	16	5	5	5	not examined	11	0	not examined
Past history								
cerebral ischemia	3	1	1	1	not examined	1	2	0.54#
hypertension	21	6	6	6	not examined	3	16	0.60#
diabetes	3	1	1	1	not examined	0	3	0.38#
heart disease	4	2	0	2	not examined	1	2	0.54#

*平均値±標準偏差，**One-way ANOVA，#カイ2乗検定，**Mann-Whitney U test. MCA：middle cerebral artery, ACoA：anterior communicating artery, ICA：internal carotid artery.

際に，年齢，教育年数，性別，手術時間，喫煙の各因子の結果に対する影響度を検討するために，ロジスティック回帰法による解析を加えた．

結　果

1．動脈瘤の部位別特徴

第1表に症例の特徴と手術に関するデータをまとめた．全例に pterional approach による開頭術が施行され，脳べらは脳に対して愛護的に使用された．動脈瘤の部位を前交通動脈，中大脳動脈，内頚動脈に分類し，それぞれの特徴も第1表に示した．年齢，教育年数，動脈瘤の大きさ，手術時間をそれぞれ One-way ANOVA 法にて統計学的に検討したが，動脈瘤の部位間に有意差は認めなかった．前交通動脈瘤クリッピングの際に，やむを得ず直回を吸引除去する手技があるが，今回の研究でこの方法を用いた手術は1例もなかった．術後1週間に施行された頭部単純 CT では，51例中7例（14%）に血流障害と思われる小さな脳実質内低吸収域を認めたが，明らかな神経学的異常所見を呈した症例は1例もなかった．

2．重度喫煙者と非喫煙者

詳細は第1表に示した．2群間において，性別，年齢，教育年数，動脈瘤の大きさ，既往歴，手術時間は，それぞれ有意差は認めなかった（カイ2乗検定，Mann-Whitney U-test）．脳動脈瘤の局在分布は，2群ともほぼ一致していた．

3．高次脳機能検査

術前の高次脳機能検査で「異常」と判定された症例は，かなひろいテストで7例（11%），迷路テストで20例（33%），MMSE で3例（4.9%）であった．かなひろいテストで異常と判定された7例の内訳は，前交通動脈瘤2例，中大脳動脈瘤4例，内頚動脈瘤1例であった．同様に，迷路テストの内訳は，前交通動脈瘤7例，中大脳動脈瘤7例，内頚動脈瘤4例であった．MMSE の内訳は，前交通動脈瘤，中大脳動脈瘤，内頚動脈瘤それぞれ1例ずつだった．これらの術前に異常と判定された症例のうち，術後1ヶ月でも異常と判定されたのは，かなひろいテストで5例，迷路テストで10例，MMSE で2例と，それぞれ術前の50～70%程度であった．

術前と術後1ヶ月の高次脳機能検査のスコア変化を見てみると，第1図のごとく，かなひろいテストでは，

第1図　動脈瘤部位別にみた，かなひろいテストにおける平均スコアの術前・術後1ヶ月の変化．ACoA（前交通動脈）は MCA（中大脳動脈）や ICA（内頚動脈）に比べて，術後1ヶ月にスコアがより低下しやすかったが，有意差はなかった（p=0.33, repeated measures ANOVA, エラーバー＝±1標準誤差）．

第2図　動脈瘤部位別にみた，迷路テストにおける平均スコア（所要時間）の術前・術後1ヶ月の変化．ACoA（前交通動脈）は MCA（中大脳動脈）や ICA（内頚動脈）に比べて，術後1ヶ月に所要時間がより長くなる傾向がみられたが，有意差はなかった（p=0.79, repeated measures ANOVA, エラーバー＝±1標準誤差）．

前交通動脈瘤は他の部位の動脈瘤よりも，術後1ヶ月に低下しやすい傾向があったが，有意差はなかった（p=0.33, repeated measures ANOVA）．同様に，迷路テストでも，前交通動脈瘤は他の部位の動脈瘤よりも，術後1ヶ月に所要時間が長い傾向があったが，有意差はなかった（p=0.79, repeated measures ANOVA）

第3図　動脈瘤部位別にみた，MMSEにおける平均スコアの術前・術後1ヶ月の変化．ACoA（前交通動脈）はMCA（中大脳動脈）やICA（内頚動脈）に比べて，術後1ヶ月にスコアがより低下しやすい傾向がみられたが，有意差はなかった（p=0.89, repeated measures ANOVA，エラーバー＝±1標準誤差）．

（第2図）．また，MMSEでも，前交通動脈瘤は他の部位の動脈瘤よりも，術後1ヶ月に低下しやすい傾向があったが，有意差はなかった（p=0.89, repeated measures ANOVA）（第3図）．

続いて，術前に比し術後1ヶ月でスコアが悪化した症例について検討した．術後1ヶ月にスコアが術前よりも1点（または1秒）以上悪化したのは，かなひろいテスト31例（51%），迷路テスト23例（38%），MMSEで18例（30%）であった．かなひろいテストに注目してみると，31例の低下例の動脈瘤部位別の内訳は，前交通動脈瘤10例（/18例，56%），中大脳動脈瘤9例（/19例，47%），内頚動脈瘤8例（/17例，47%）で，前交通動脈瘤に低下した症例が多かった．70歳以上の高齢者は3例全例低下した．また，迷路テストに注目してみると，23例の悪化例の内訳は，前交通動脈瘤8例（/18例，44%），中大脳動脈瘤7例（/19例，37%），内頚動脈瘤7例（/17例，41%）で，前交通動脈瘤に低下例がやや多く認められた．70歳以上の高齢者は1例のみ（33%）低下した．MMSEでの18例の低下例の内訳は，前交通動脈瘤8例（/18例，44%），中大脳動脈瘤4例（/19例，21%），内頚動脈瘤4例（/17例，24%）で，やはり前交通動脈瘤に低下例が多く認められた．70歳以上の高齢者は1例のみ（33%）低下した．

術後3ヶ月の高次脳機能検査では，検査を施行した21例中18例（86%）が術前レベルまで回復した．回復しなかった3例は，いずれも中大脳動脈瘤の症例で，迷路テストだけが回復しなかった．内訳は，重度喫煙者が2名（68歳と69歳），非喫煙者が1名（64歳）であった．

4. RCI値による高次脳機能評価

Jacobsonらの方法[13]に基づいて計算した結果を第2表に示す．再検査による結果の変動（学習効果等の影響）に関するRCI値（90%信頼区間）は，MMSE±2.92，迷路テスト±74.57，かなひろいテスト±9.07であり，したがって，術後の再検査で，それぞれ3，75，10ポイント以上点数が悪化したら，再検査による結果の変動を考慮しても高次脳機能が低下したと判定できることになる．この基準に基づいて判定すると，かなひろいテスト7例（11%），迷路テスト10例（16%），MMSE 6例（9.8%）にそれぞれ低下を認めた．かなひろいテストに注目すると，7例の低下例の動脈瘤部位別の内訳は，前交通動脈瘤3例（/18例，17%），中大脳動脈瘤2例（/19例，11%），内頚動脈瘤1例（/17例，5.9%）で，前交通動脈瘤に低下した症例が多かった．70歳以上の高齢者には低下例はなかった．迷路テストにおける10例の低下例の内訳は，前交通動脈瘤3例（/18例，17%），中大脳動脈瘤2例（/19例，11%），内頚動脈瘤4例（/17例，24%）で，内頚動脈瘤に低下例がやや多かった．70歳以上の高齢者は1例（33%）低下していた．MMSEにおける6例の低下例の内訳は，前交通動脈瘤1例（/18例，5.6%），中大脳動脈瘤2例（/19例，11%），内頚動脈瘤1例（/17例，5.9%）と，分布にバラつきがみられた．

第2表　各高次脳機能検査におけるtest-retest reliability（相関係数）およびRCI（90%信頼区間）値．（Fukunaga A et al：Neurol Med Chir (Tokyo) 42：419-426, 2002のTable 2を許可を得て改変，転載）

Examination	Test-retest reliability	SEm	SEdif	RCI (90%)
MMSE	0.56	1.26	1.78	± 2.92
Maze test	0.37	32.15	45.47	±74.57
Kana-hiroi test	0.89	3.91	5.53	± 9.07

SEm：測定標準誤差，SEdif：スコア間相違標準誤差，RCI (90%)：reliable change indices (90%信頼区間)，MMSE：Mini-mental state examination.

第4図　65歳女性，未破裂前交通動脈瘤に対して右pterional approachにて開頭クリッピング術を施行．術前（A），術後1ヶ月（B），術後3ヶ月（C）の脳血流検査（SPECT ^{99m}Tc-ECD法）の結果を示す．術後1ヶ月では，明らかに手術側（右前側頭部）の局所脳血流低下が認められたが，術後3ヶ月には術前とほぼ同じ状態に回復している．（Fukunaga A et al：Surg Neurol 51：132-139, 1999 の Fig 1, 2, 3 の一部を許可を得て転載）

5. 脳血流検査

術後1ヶ月の脳血流検査で，術前と比べて手術側の脳血流が低下したと判断された症例は61例中20例（33%）であった．内訳は，前交通動脈瘤13例（/18例，72%），中大脳動脈瘤5例（/19例，26%），内頚動脈瘤2例（/17例，12%）で，前交通動脈瘤と内頚動脈瘤の間に有意差を認め（p=0.0005，フィッシャー直接確率法），さらに，前交通動脈瘤と中大脳動脈瘤の間にも有意差を認めた（p=0.0086，フィッシャー直接確率法）．

一方，70歳以上の高齢者では，3例全例が術後1ヶ月の脳血流検査で低下し，70歳未満の症例（58例中17例，29%）と比較して有意差を認めた（p=0.032，フィッシャー直接確率法）．

術後3ヶ月の脳血流検査では，施行した15例全例が，術前レベルにまで回復した．

6. 症例提示

65歳女性（非喫煙者）は，脳ドックのmagnetic resonance（MR）angiogramで前交通動脈瘤（大きさ4 mm）が見つかり，手術目的で入院となった．手術は順調に終了し術後経過も良好であったが，術後1ヶ月の高次脳機能検査で，MMSE 22から19へ，かなひろいテスト9から0へ，迷路テスト90秒から175秒に，それぞれ悪化していた．術後1ヶ月の脳血流検査でも手術側（右前側頭部）に明らかな血流低下を認めた（第4図A，B）．術後3ヶ月に再度高次脳機能検査と脳血流検査を施行したところ，両方とも術前と同じレベルにまで回復した（第4図C）．

7. 重度喫煙者と非喫煙者の高次脳機能検査

術前と術後1ヶ月の高次脳機能検査のスコア変化を各グループ間で比較すると，迷路テストでは，重度喫煙者は非喫煙者よりも，術前に比べ術後1ヶ月に有意に所要時間が長い傾向があった（p=0.0015，Mann-Whitney U-test）（第5図）．また，かなひろいテストでは，重度喫煙者は非喫煙者よりも，術前，術後1ヶ月，術後3ヶ月のすべてにおいて有意に低下していた（p=0.0086，p=0.011，p=0.0028，Mann-Whitney U-test）が，とくに術後1ヶ月では術前よりも平均点が低下する傾向が見られた（第6図）．MMSEでは，重度喫煙者に低下傾向が認められたが有意差はなかった（p=0.16，Mann-Whitney U-test）（第7図）．

RCI（90%信頼区間）値から術後1ヶ月に低下した

第5図　迷路テストにおける重度喫煙者（Heavy smokers）と非喫煙者（Non-smokers）の術前（preoperation）・術後1ヶ月（1M after surgery）・術後3ヶ月（3Ms after surgery）の所要時間変化．所要時間が長いほど，認知機能が低下していることを意味するが，重度喫煙者は，非喫煙者と比べて術後1ヶ月に有意に低下している（*p=0.0015，Mann-Whitney U-test，エラーバー＝±1標準誤差）．術後3ヶ月には，術前とほぼ同じレベルに回復した．（Fukunaga A et al：Neurol Med Chir (Tokyo) 42：419-426, 2002のFig 1を許可を得て転載）

第6図　かなひろいテストにおける重度喫煙者（Heavy smokers）と非喫煙者（Non-smokers）の術前（preoperation）・術後1ヶ月（1M after surgery）・術後3ヶ月（3Ms after surgery）のスコアの変化．重度喫煙者は非喫煙者と比較して，術前後とも有意にスコアが低下していた（*p=0.0086，**p=0.011，***p=0.0028，Mann-Whitney U-test，エラーバー＝±1標準誤差）．（Fukunaga A et al：Neurol Med Chir (Tokyo) 42：419-426, 2002のFig 2を許可を得て転載）

第7図　Mini-mental state examinationにおける重度喫煙者（Heavy smokers）と非喫煙者（Non-smokers）の術前（preoperation）・術後1ヶ月（1M after surgery）・術後3ヶ月（3Ms after surgery）のスコアの変化．重度喫煙者は非喫煙者と比べて，術後1ヶ月にスコアが低下する傾向が見られたが，明らかな有意差はなかった（*p=0.16, Mann-Whitney U-test，エラーバー＝±1標準誤差）．（Fukunaga A et al：Neurol Med Chir (Tokyo) 42：419-426, 2002のFig 3を許可を得て転載）

例を検討すると，迷路テストにおいて，重度喫煙者では11例中5例（45%），非喫煙者では45例中5例（11%）がそれぞれ低下し，有意差を認めた（p=0.018，フィッシャー直接確率法）．ロジスティック回帰法にて，年齢，教育年数，性別，手術時間，喫煙の5つの因子の結果に対する影響度を検討したところ，p値はそれぞれ0.25, 0.071, 0.65, 0.90, 0.010であり，喫煙だけが有意な危険因子であった．かなひろいテストとMMSEでは有意差は認めなかった．

8.　重度喫煙者と非喫煙者の脳血流検査

術後1ヶ月の脳血流検査で手術側の脳血流が低下したと判断された症例の内訳は，重度喫煙者11例中7例（64%），非喫煙者45例中11例（24%）で，重度喫煙者群に有意に多かった（p=0.02，フィッシャー直接確率法）．しかし，ロジスティック回帰法にて，年齢，教育年数，性別，手術時間，喫煙の5つの因子の結果に対する影響度を検討したところ，p値はそれぞれ0.082, 0.61, 0.85, 0.78, 0.28であり，有意な危険因子は見出せなかった．

考　察

1.　未破裂脳動脈瘤手術について

UANは破裂するとくも膜下出血を起こし，時には生命にかかわる重篤な状態となる．そのため，くも膜下出血を未然に防ぐために，本人・家族とのインフォームドコンセントのうえ，開頭術（または血管内手術）が勧められることが多い．UANの年間破裂率は0.8～2.3%と報告[16~18]にばらつきがあり，まだ明らかにされてはいない．1998年に，国際多施設共同研究調査団の後ろ向き（retrospective）症例群の観察で，くも膜下出血に合併しない群で10 mm未満の病変の年間破裂率が0.05%であると報告された[19]．しかし，この研究は症例の選択基準，観察期間，母集団の脳動脈瘤の性質の偏りなど多くの欠点が指摘されている[20]．また，この報告には多数の症候性脳動脈瘤を含み，大きさ，部位などの分布も脳ドックで発見されるUANと異なるため，その破裂率をそのまま我が国に当てはめるのは不適当であると考えられる．そこで，現在日本未破裂脳動脈瘤悉皆調査（UCAS JAPAN，日本脳神経外科学会）という全国規模の多施設共同研究が進行中であり，その結果報告が待たれるところである．

手術適応について日本脳ドック学会の脳ドックのガイドライン（2003年）[21]によれば，1）動脈瘤は硬膜内にある，2）大きさは最大径5 mm前後より大きい，3）年齢はほぼ70歳以下である，という3つの基準がある．年齢については，仮に年間破裂率を1.0%，開頭術によるmortalityを1.0%と設定した場合に，70歳前後で手術の意味がなくなるだろうという見地から判断されている．我々の施設でもUANの手術症例は破裂脳動脈瘤より増加している傾向があり，今後もしばらく続くと考えられる．

開頭術によるmorbidityは約5%と言われているが[1]，この中に「記憶力や集中力が低下した」などの高次脳機能障害は含まれていない．ほとんどの患者が術後職場復帰を希望するが，このような高次脳機能障害のために仕事に支障をきたすことも稀に経験される．したがって，開頭術後の高次脳機能評価は極めて重要であるが，この類の研究は極めて少ない[2~5]．

2.　高次脳機能検査

今回選択した3つの検査は，全てベッドサイドで施行可能で，全検査を行なっても30分以内に終了することができ，患者の負担をできるだけ軽減するよう配慮さ

れている．また，かなひろいテストと迷路テストは主に前頭葉機能評価に用いられるが，開頭術では，pterionと呼ばれる蝶形骨，頭頂骨，前頭骨，側頭骨の接合部を中心に前頭側頭開頭を行ったうえで，通常Sylvius裂を切開剥離しながらトルコ鞍の方向へ術野を展開して，前頭葉に脳べらなどで操作を加えるため，これらのテストは本研究に適していると考えられる．本研究では，前交通動脈瘤患者で，とくにかなひろいテストにおいて，術後1ヶ月に低下した例が多く認められた．かなひろいテストは，我が国で広く使用されている老年期痴呆の診断のための代表的な検査の1つであるが[10,11]，左片麻痺患者や脳虚血患者の認知機能評価[22]や，脳梗塞患者に対する浅側頭動脈－中大脳動脈吻合術前後の高次脳機能評価[23]など，痴呆患者に限らず，脳血流障害による高次脳機能低下が疑われる患者に対しても汎用されている．

一方，重度喫煙者は非喫煙者に比べ，術前，術後1ヶ月・3ヶ月にかなひろいテストのスコアが有意に低く，術後1ヶ月に迷路テストの所要時間が有意に長かった．迷路テストは，図柄を見て認識しながら道を辿っていく検査で，主に右頭頂葉が関与しているが，本研究に用いた迷路は複雑であり，前頭前野も賦活されていると考えられている[11]．今後は，機能的MR imagingや近赤外線スペクトロスコピーなどを用いた機能画像診断により，このような高次脳機能検査の脳賦活部位が特定されるであろう．その他の前頭葉機能評価法として，Wisconsin card sorting test (Keio version)[24]や言語流暢性検査[25]などが挙げられるが，今後の研究に加えていきたいと考えている．

3. なぜ術後に高次脳機能が低下するのか？

前回われわれは，前交通動脈瘤患者や高齢者において，開頭術後に一過性に高次脳機能が低下しやすい傾向があると報告した[2]．本研究でも，前交通動脈瘤症例は他の部位の動脈瘤の症例よりも，術後一過性に高次脳機能が低下しやすかった．これは，最近の報告と同じである[3,5]．小林ら[3]は，UAN 29例に対し，開頭術前後にWechsler Adult Intelligence Scale revisedとMRスペクトロスコピーを施行し，開頭術の及ぼす大脳半球の高次脳機能および脳代謝への影響について検討しているが，やはり前交通動脈瘤患者は他の部位の脳動脈瘤患者に比べて，術後高次脳機能が有意に低下しやすく，開頭側前頭葉白質のN-acetylaspartate/total creatine比も有意に低下しやすかったと報告している．

前交通動脈瘤の破裂によるくも膜下出血をきたした症例は，術後に「コルサコフ症候群様」記憶障害，性格変化などを起こすことがあり，「前交通動脈瘤症候群」と呼ばれている[26~29]．その原因として，前交通動脈の穿通枝の血流障害により，基底前脳部の梗塞をきたし，Papez回路やYakovlev回路の記憶回路が損傷されたためではないかと推察されている．本研究では，未破裂なのでくも膜下出血による直接的な脳損傷や脳血流障害はなく，また術後に明らかな記憶障害を呈した症例はなかったが，術後高次脳機能障害を起こした原因として，前交通動脈瘤の場所が深く，手術中に前頭葉を脳べらで強く圧排せざるをえないという，他の動脈瘤手術にはない手技が要求されることが考えられる．脳べらとは，脳の表面に垂直に押し当てて，充分な術野を確保するために脳神経外科手術で通常用いられる金属製の厚さ数mm程度の板状のもので，用途に応じて幅3～15 mmの範囲内で選択できる．藤本ら[30]によると，犬を用いた基礎的実験で，脳べらにより大脳皮質一次感覚野を圧迫して局所脳血流量，局所脳灌流圧，および体性感覚誘発電位を測定したところ，圧迫解除後体性感覚誘発電位のN1振幅の回復が悪かった例では，1）圧迫開始圧が40 mmHgを越えていた，2）圧迫中，N1振幅が圧迫前の50%以下まで低下していた，3）組織学的に少なくとも皮質の浮腫，小出血を有していた，という結果が得られ，脳圧迫開始圧を40 mmHg以下にとどめ，N1振幅を正常の50%以上に保つことが，術後の神経機能障害を防止する指標となりうると考えられたという．また，使用法としては，脳べらを間欠的に使用する方が，連続的に使用するよりも脳損傷が少なく，電気生理学的にも圧迫後の回復が早いという報告がある[31]．したがって，脳動脈瘤術後に高次脳機能障害を起こさないためには，とくに前交通動脈瘤患者の手術の際には，脳べらを間欠的に使用するなど，より慎重な手術操作が不可欠だと考えられる．

一方，高齢者の場合には，70歳以上の高齢者に脳べらを使用しないで破裂脳動脈瘤の開頭術を行なったところ，脳べらを使用したときと比べて局所脳血流の低下が少なかったという報告がある[32]．その理由として，高齢者の脳は，可塑性や柔軟性が低下しており，脳べらの圧迫による局所循環障害の影響を受けやすいためだと推察されている．今回70歳以上の高齢者はわずか3例であり，今後症例を重ねてさらなる検討を行いたいと考えている．

本研究では，術後3ヶ月の高次脳機能検査で，3例のみ術前レベルに回復しなかったが，いずれも前交通動脈瘤ではなく中大脳動脈瘤症例であった．すなわち，開頭術後の高次脳機能の低下は，ほとんどの場合一過性で回

復し，前交通動脈瘤症例に多く見られ，おそらく脳べらによる脳への過度の圧迫によるものだと考えられるが，術後高次脳機能が低下した中大脳動脈瘤症例の中には3ヶ月経過しても回復しないケースもあり，これらは脳べらによる圧迫だけが原因ではないと考えられる．中大脳動脈瘤の特徴は，脳表に近いので比較的早く到達できるが，動脈瘤から細い動脈が分枝していることがあり，動脈瘤は不整形で大きなものも多く，クリッピングが困難な場合があるとされている[33]．すなわち，クリッピングによって細い分枝動脈の血流障害を起こす可能性があり，灌流域である大脳基底核などの一部に循環不全を起こしている症例も存在するかもしれない．よって，本研究において術後3ヶ月経過しても回復しなかった中大脳動脈瘤症例は，術中操作によって回復困難な動脈性の血流障害をきたしてしまったのではないかと推察される．

4.　繰り返し検査による高次脳機能評価法

1回目の神経心理学的検査で正常範囲内であった被検者に対して，同じ検査を繰り返して施行する場合，2回目以降のスコアは学習効果により通常上昇傾向にあることが知られている[10]．したがって，2回目以降の検査で1点でも悪化した場合には，「高次脳機能低下」と判断することもできる．一方で，1回目の検査で異常値を示した場合には，とくにかなひろいテストの場合には，2回目以降の学習効果はほとんどないと言われている[10]．よって，2回目以降検査では点数が上昇するだけでなく下降する可能性もあり，他の検査でも同様である．本研究では，かなひろいテストとMMSEでは，1回目の検査で正常だった症例が89～95%存在したので，この2検査に関しては学習効果の影響は無視できず，2回目以降は点数が上昇する可能性が高いと考えられるが，迷路テストでは約3分の1の症例で1回目の検査ですでに異常値を示しており，2回目以降にはたして学習効果がどの程度みられたのか，スコアの上下変動の幅はどの程度か，などの判断は困難である．そこで今回は，2回目の検査で1点でも悪化した場合に「高次脳機能低下」と判定した方法に加え，Jacobsonら[13]の方法によりRCI値を計算し，その90%信頼区間から逸脱した場合に「高次脳機能低下」と判断する手法も使用した．結果として，いずれの方法でも，前交通動脈瘤群に術後1ヶ月の高次脳機能低下例が多く見られる傾向があったが，RCI値による方法では，高次脳機能低下と判定された症例が少なく，動脈瘤部位にバラつきが見られた．今後は症例数を増やし，また正常人の繰り返し検査によるスコアデータからRCI値を計算して，さらなる検討を加えていきたいと考えている．

5.　習慣性喫煙の影響

Kannelら[34]は，慢性喫煙者と非喫煙者に，それぞれ5%二酸化炭素または100%酸素を吸入させたところ，慢性喫煙者の方が脳動脈の拡張または収縮の度合いが小さかったと指摘し，喫煙が動脈硬化をもたらしたと考察している．Kubotaら[35]は，健常成人111人の血清脂質量と脳血流量を測定したところ，慢性喫煙者（男性）は非喫煙者よりも総コレステロール値が有意に高くHDLコレステロール値が有意に低かったので，動脈硬化が進行して血管内腔が狭小化し，そのために脳血流が低下しやすいのだろうと推察している．また，Weirら[36]は，破裂動脈瘤患者に有意に喫煙者が多く，しかも喫煙量に依存していたこと，くも膜下出血後の脳血管攣縮も喫煙者に有意に発生しやすかったことから，喫煙により脳動脈壁の弾性板に何らかの損傷をきたし，血管内皮機能に影響を及ぼしているのではないかと報告している．さらに，Princeら[37]によると，中等度以下の知的レベルの女性においてPaired associate learning testの成績が悪かったのは，1日の喫煙本数と強い相関があったという．このように，喫煙習慣により血管性の病変や動脈硬化が進行し，脳血流低下をきたし認知障害の危険性が増すと言われているが，詳しい機序はまだ明らかではない[9]．

今回，かなひろいテストでは，術前および術後に重度喫煙者は非喫煙者よりも有意にスコアが低下していた．迷路テストでは，術後1ヶ月に重度喫煙者は非喫煙者よりも所要時間が有意に長くなったが，このテストは，注意力，短期記憶，空間認知などが同時に要求される複雑なタスクで，大脳の広範な領域が関与した課題であり，重度喫煙者にとって比較的困難なテストとなったと考えられる．

以上のことから，重度喫煙者で術後に高次脳機能の低下が見られたのは，習慣性喫煙による脳内毛細血管の動脈硬化に関連した微小循環不全が存在するために，脳べらや吸引管などによる局所脳への圧迫により，非喫煙者よりも局所脳血流障害を起こしやすいためではないかと推測できる．

6.　脳血流検査

前回の報告[2]と同様に，70歳以上の高齢者や前交通動脈瘤患者において，術後1ヶ月に脳血流低下例が有意に多かった．これは，おそらく脳べらによる圧迫や静脈損傷による影響ではないかと推察される．鐙谷ら[38]は，

2. 全RNAおよびポリ－(A)＋RNAの抽出

全RNAは，RNeasy Mini Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を使用して上記サンプルより抽出した．ポリ－(A)＋RNAは全RNAからQuickPrep Micro mRNA Purification Kit（Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）を使用して抽出した．ポリ－(A)＋RNAの濃度は吸光度計を用い，QuickPrep Micro mRNA Purification Kitに付属のエルーションバッファーにて0.03 μg/μl に調整した．

3. プローブの作製

ヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の細胞内領域および *β2-microglobulin* に相補的な特異的cDNAプローブ（以下，それぞれN4-In, N1-In, β2-MGと呼ぶ）をReverse transcription polymerase chain reaction（RT-PCR）にて作製した．これらのcDNAプローブはノーザンブロット，ドットブロット，*in situ* ハイブリダイゼーションにて使用した．RT-PCRはTaKaRa RNA LA PCR Kit（AMV）ver.1.1（Takara Bio Inc., Shiga）を用いて行った．逆転写反応溶液は5 mMの$MgCl_2$, 1×RNA PCR Buffer, 1 mMのdNTP混合液，1U/μlのRNase inhibitor, 0.25U/μlの逆転写酵素，2.5 μMのrandom 9 mers，0.03 μgのpoly－(A)＋RNAである．逆転写反応の条件は30℃/10分，55℃/30分，99℃/5分である．PCR反応溶液は逆転写反応溶液，2.5 mMの$MgCl_2$, 1×LA PCR Buffer II（Mg^{2+} free), 2.5 U/100 μlのTaKaRa LA Taq, 0.2 μMのプライマーセットを含んでいる．PCRの反応条件は，94℃/20秒，60℃/45秒，72℃/90秒を30サイクル行い，次いで72℃/10分で伸長反応を行った．RT-PCRを行うにあたって使用したプライマーセットを第2表に示した．PCR産物は1.2%アガロースゲルにて電気泳動し，特異的バンドを含むゲルを切り出しQIAEX II Gel Extraction kit（QIAGEN）を用いて精製した後，Klenow enzyme（Takara）とT4 polynucleotide kinase（Takara）を用いてリン酸化平滑末端とし，脱リン酸化してあるpBluescript II SK＋ベクター（Stratagene, La Jolla, CA, USA）のSma Iサイトにライゲーションしてサブクローニングした．

in situ ハイブリダイゼーション用には，ヒト *Notch4* の3'UTR領域（N4-3'UTRと呼ぶ）およびヒト *Notch1* の3'末端領域(N1-3'ENDと呼ぶ）で新たにプローブを作製した．これらのプローブは上述の方法と同様に作製した．また特異的プライマーは第2表に示した通りである．

4. ノーザンブロット解析

2つの正常子宮内膜サンプル(増殖期中期；検体番号N2, 分泌期中期；検体番号N9）と1つの子宮内膜癌サンプル（検体番号C3）を用いてノーザンブロット解析を行った．10 μgの全RNAを電気泳動し，Hybond N＋ membrane（Amersham, Little Chalfont, UK）にブロットした．メンブレンは，5 mlの5×SSPE/0.5%－SDS/5×デンハルト液/50%-ホルムアミドを含む溶液にcDNAプローブを加え，50℃で一晩反応させた．ハイブリダイゼーション後のメンブレンは以下の条件で洗浄した．2×SSPE/0.1%-SDS溶液で室温にて10分間，ついで1×SSPE/0.1%－SDS溶液で50℃にて20分間，

第2表　プローブ作成用特異的プライマー

遺伝子	プローブ	プライマー	bp*	温度**
ヒト *Notch4*	N4-In	5'-ACTAGGCGAGGACAGCATTG-3' 5'-CGGCGTCTGCTCCCTGTTGT-3'	802	60
	N4-3'UTR	5'-TCCCGCCTCCTTGCCTTACTCC-3' 5'-CCACTCCACTCTGCCCTCCTGT-3'	378	62
ヒト *Notch1*	N1-In	5'-CCGCCTTTGTGCTTCTGTTCT-3' 5'-GTTAGCCCCGTTCTTCAGGAG-3'	935	60
	N1-3'END	5'-ATGGTCAATGCGAGTGGCTGTC-3' 5'-GCTTTGCTGCTGCTGGATGTTT-3'	308	62
β2-microglobulin	β2-MG	5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3' 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	120	60

*bp：RT-PCRによって増幅される塩基対長
**温度：PCRにおけるアニーリング温度（℃）
(Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[52]のTable IIを一部改変し，許可を得て転載)

これを2回行い，さらに0.1×SSPE/0.1%－SDS溶液で50℃にて20分間の洗浄後，メンブレンをイメージングプレート（Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo）に収容し，室温にて24時間露出した．イメージングプレートはBAS 2000 Image Analyzer（Fuji Photo Film）を用いて解析した．メンブレンにハイブリダイズしたプローブは沸騰水の中に15分間浸し，プローブをメンブレンから解離させ，他のプローブを同一のメンブレンに上記の手順で再度ハイブリダイズさせた．

5. ドットブロット解析

ドットブロット解析には12個の正常子宮内膜サンプルと12個の子宮内膜癌サンプルを用いた（第1表）．前述の0.03 μgに調製したポリ－(A)＋RNAを用いてRT-PCRを施行し，ヒト*Notch4*，ヒト*Notch1*，*β2-microglobulin*の発現の有無を確認した．逆転写反応の条件はプローブ作成時と同条件である．PCRの条件はヒト*Notch4*，*β2-microglobulin*に対しては94℃/20秒，60℃/45秒，72℃/90秒を16サイクル反応させ，72℃/10分の伸長反応を行った．ヒト*Notch1*に対してはアニーリング温度を62℃とした．正確な測定をきすためにPCR産物が指数関数的に増幅している過程にあり平衡状態に到達していないことを確認した．3 μlのPCR産物をHybond N＋ membraneにブロットし，α^{32}P-dCTPでラベルしたヒト*Notch4*，ヒト*Notch1*，*β2-microglobulin*に対するそれぞれの特異的プローブにてハイブリダイゼーションを行った．ハイブリダイゼーションは0.5%－SDS，5×SSPE，100 μgのサケ精子DNAおよび各々のプローブ(ヒト*Notch4*ではN4-Inプローブ，ヒト*Notch1*ではN1-Inプローブ，および*β2-microglobulin*ではβ2-MGプローブ）を含んだ混合液中で65℃，17時間行った．メンブレンの洗浄は5×SSPE，0.1%－SDSの混合液で65℃にて15分間2回行い，ついで，1×SSPE，0.1%－SDS混合液で室温にて10分間，0.1×SSPE，0.1%－SDS混合液で室温にて10分間洗浄した．洗浄したメンブレンはイメージングプレートに室温で30分間露出し，BAS 2000 Image Analyzerにて解析した．各ドットのシグナル強度はImage Analyzerにて定量化した．ヒト*Notch4*およびヒト*Notch1*のドットのシグナル強度はバックグラウンドの補正を行い，同一サンプルの陽性コントロールである*β2-microglobulin*のシグナル強度との比を算出した後，これらの比をStudent's *t*-testにて検定した．

6. *in situ* ハイブリダイゼーション

in situ ハイブリダイゼーションに使用したプローブはDIG RNA Labeling Kit（Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany）を用いてジゴキシゲニンにて標識したヒト*Notch4*（N4-3'UTR）およびヒト*Notch1*（N1-3'END）のセンスおよびアンチセンスのcRNAプローブをT3/T7 RNAポリメラーゼにて合成した．

正常子宮内膜および子宮内膜癌サンプルを採取後，4%－パラホルムアルデヒドにて6時間固定した．続いて30%－蔗糖溶液にて置換反応を行い，OCT compound（Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo）に包埋した後，液体窒素にて凍結した．凍結された組織をクリオスタットにて18 μmに薄切し，シランコートされたスライドグラスにのせた．切片は49℃で一晩ホルムアミドを加えた反応液中でジゴキシゲニンで標識した上記の特異的プローブ（0.1 μg/ml）とハイブリダイズさせた．その後はAnti-digoxigenin-AP, Fab fragments（Boehringer Mannheim）と結合させ，発色基質であるBM purple AP Substrate, precipitating（Boehringer Mannheim）にて発色反応を行った．明らかな発色を得るためにプローブによって発色反応時間を変更した．

結　果

1. ヒト*Notch4*およびヒト*Notch1*の正常子宮内膜における発現

正常子宮内膜におけるヒト*Notch4*の発現の有無を確認するために正常子宮内膜から抽出した全RNAを用いてノーザンブロット解析を行った．第1図に示すように，ヒト*Notch4*およびヒト*Notch1*の全RNAは正常子宮内膜の増殖期および分泌期において明らかなシグナルを検出することはできなかった．正常子宮内膜でヒト*Notch4*が発現していないのか，あるいは発現量が微量のため検出できないのかを確認するために各月経周期の正常子宮内膜から抽出したポリ－(A)＋RNAを用いてドットブロット解析を行った．マウス*Notch4/int-3*や*TAN-1*（ヒト*Notch1*）はそれぞれマウス乳癌および急性T細胞性白血病において細胞内領域が過剰発現しているので，ヒト*Notch4*およびヒト*Notch1*の細胞内領域でプローブを作製した．第2図Aに示したように，ヒト*Notch4*とヒト*Notch1*はさまざまな月経周期の正常子宮内膜において発現していることが確認された．Image Analyzerによってドットのシグナル強度を定量化し統計学的に検討を行った結果，正常子宮内膜では，

第1図　正常子宮内膜および子宮内膜癌組織を用いたノーザンブロット解析の結果．プローブは N4-In（中央図），N1-In（右図）で，陽性コントロールとして β2-MG（左図）を使用している．図左側の数字は RNA 断片の長さ（単位は Kb）を示している．ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* は正常子宮内膜および子宮内膜癌において，その転写産物を検出できなかった．P：正常子宮内膜の増殖期，S：正常子宮内膜の分泌期，T：子宮内膜癌．（Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[53]の Fig. 1 を許可を得て転載）

第2図　ドットブロット解析による正常子宮内膜（12例）および子宮内膜癌（12例）におけるヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現．A：正常子宮内膜の増殖期におけるヒト *Notch4* の発現は分泌期より増加している．ヒト *Notch1* の発現は増殖期と分泌期では同様のレベルである．Pro：正常子宮内膜の増殖期，Sec：正常子宮内膜の分泌期，β2-MG：，*β2-microglobulin*．B：子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* の発現は正常子宮内膜と比較して減少している．ヒト *Notch1* の発現は正常子宮内膜と子宮内膜癌において同様である．RT(−)：逆転写酵素を用いないで RT-PCR を行ったもの（陰性コントロール）．Case No. は第1表に掲載されているドットブロットの検体番号に一致．（Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[53]の Fig. 2 を許可を得て転載）

ヒト *Notch4* の発現量は増殖期から分泌期になると有意に減少した（$P<0.005$，第3図 A）．ヒト *Notch1* については増殖期と分泌期とでは有意な差を認めなかった（第2図 A，第3図 B）．

2．ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* の子宮内膜癌における発現

子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* の発現の有無を調べるためにノーザンブロット解析を行った．正常子宮内膜の時と同様にヒト *Notch4* は子宮内膜癌においてもノーザンブロット解析ではその発現を確認できなかった（第1図）．子宮内膜癌においてヒト *Notch4* が全く発現していないのか，あるいは発現量が微量のために検出できないのかを確認するために，12個の子宮内膜癌サンプルから抽出したポリー(A)＋RNA を用いてドットブロット解析を行った．第2図 B に示したようにヒト *Notch4*，ヒト *Notch1* ともにその発現を確認することができた．Image Analyzer を用いてドットのシグナル強度を解析し統計学的処理を行った結果，ヒト *Notch4* は正常子宮内膜より子宮内膜癌においてその発現量が有意に減少していることが確認された（$P<0.01$，第3図 C）．一方，ヒト *Notch1* の発現量はヒト *Notch4* とは異なり，子宮内膜癌においてその発現量が有意に増加していた（$P<0.05$，第3図 D）．

第3図　A, B：正常子宮内膜の増殖期と分泌期におけるヒト *Notch4*（A）およびヒト *Notch1*（B）の発現量の比較．増殖期におけるヒト *Notch4* の発現量は分泌期に比較して有意に増加している（$P<0.005$, n=6）．ヒト *Notch1* の発現は有意な差を認めなかった（n=6）．C, D：正常子宮内膜と子宮内膜癌におけるヒト *Notch4*（C）およびヒト *Notch1*（D）の発現量の比較．子宮内膜癌は正常子宮内膜と比較して，ヒト *Notch4* の発現量は有意に減少しており（$P<0.01$, n=12），逆にヒト *Notch1* では有意に増加している（$P>0.05$, n=12）．それぞれのバーは12検体の平均値±標準偏差を示す．P：正常子宮内膜の増殖期，S：正常子宮内膜の分泌期，N：正常子宮内膜（増殖期および分泌期），T：子宮内膜癌，N. S.：有意差無し．（Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[53] の Fig. 3 を許可を得て転載）

3. 正常子宮内膜および子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* の局在

ノーザンブロットやドットブロット解析では正常子宮内膜や子宮内膜癌組織全体から全RNAまたはポリー(A)+RNAを抽出したものを用いたが，これらの組織には腺細胞，間質細胞，癌細胞，血管内皮細胞など，様々な細胞が含まれている．したがって，内膜組織や癌組織のどの細胞にヒト *Notch4* が発現しているのかはノーザンブロットやドットブロット解析では検出することができない．しかし，ヒト *Notch4* やヒト *Notch1* タンパクの子宮内膜や子宮内膜癌における機能を推定するにあたり，どの細胞で発現しているかを知ることは非常に重要である．そこで，ヒト *Notch4* プローブ(N4-3'UTR）およびヒト *Notch1* プローブ（N1-3'END）を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．第4図Aに示すように，正常子宮内膜ではヒト *Notch4* 遺伝子は主に腺細胞に発現していることが確認できた．また弱いながらも，間質細胞にも発現していることが確認された．ヒト *Notch1* 遺伝子も主に腺細胞で発現していることが確認された（第4図B）．子宮内膜癌組織では，ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* はともに癌細胞に発現を認めた．また，正常子宮内膜とは異なり，間質細胞においても癌細胞と同等のレベルで発現していることが確認できた（第4図C, D）．

考　察

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 *Notch4* およびヒト *Notch1* 遺伝子の時間的空間的発現を明らかにし，ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* 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．

ノーザンブロット解析では正常子宮内膜および子宮内膜癌においてヒト *Notch4* 転写産物は検出できなかった．しかしながら，PCRを16サイクル行った後のドットブロット解析を行うことによって正常子宮内膜および子宮内膜癌のすべてのサンプルにおいてヒト *Notch4* とヒト *Notch1* を検出することができた．以上のことから，ノーザンブロット解析によってヒト *Notch4* とヒト *Notch1* を検出できなかった理由として，正常子宮内膜や子宮内膜癌での発現量が微量であることが考えられた．また，*in situ* ハイブリダイゼーションで発現を確認できた理由としてはノーザンブロット解析よりも感度の高いRNAプローブを使用したこと，発色を検出できるまで発色時間を長くしたことによると考えられた．

ヒト *Notch4* の発現量は月経周期にあわせて変化した．その発現は，増殖期から分泌期に移行すると有意に減少していた（$P<0.005$）．月経周期においてヒト *Notch4* の発現量が増加している時期は子宮内膜の腺細胞や間質細胞で細胞分裂が見られる時期と一致していた．増殖期にヒト *Notch4* の発現量が増加していることは，今までに知られている *Notch* ファミリーの機能の1つである「秩序だった細胞増殖の状態を保っておく」ことと一致していた[46]．すなわち，増殖期でその発現量が高い状態にあるヒト *Notch4* が子宮内膜の腺細胞に増殖期の表現型を示すように機能していると考えられた．さらに，ヒト *Notch4* の発現量は分泌期になると減少しており，ヒ

第4図　A, B：正常子宮内膜（増殖期）の切片で，N4-3'UTR アンチセンスプローブ（A）および N1-3'END アンチセンスプローブ（B）を用いてそれぞれ *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．ヒト *Notch4*，ヒト *Notch1* ともに内膜腺細胞で発現を認めた．C, D：子宮内膜癌（類内膜腺癌，G2）の切片に対して N4-3'UTR アンチセンスプローブ（C）および N1-3'END アンチセンスプローブ（D）を用いた．子宮内膜癌では癌細胞と間質細胞の両方でヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現を認めた．E, F：正常子宮内膜（増殖期）（E）および子宮内膜癌（類内膜腺癌）（F）の切片に対して N4-3'UTR センスプローブ（E）および N1-3'END センスプローブ（F）を用いた．センスプローブでは陽性反応を認めない．（Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[53]の Fig. 4 を許可を得て転載）

ト *Notch4* の発現量の低下が腺細胞の増殖期の表現型を分泌期の表現型に変化させる機能と関連があると考えられた．ヒト *Notch4* の発現量は有意な差をもって月経周期において変化していたが，ヒト *Notch1* の発現量については増殖期から分泌期になると減少する傾向はあるものの，統計学的には有意ではなかった（第3図B）．ドットブロット解析の結果から，ヒト *Notch4* もヒト *Notch1* も月経周期を通じて同様の傾向で変動するので，正常子宮内膜においてヒト *Notch1* はヒト *Notch4* と同様の機能を持っていると推察されるが，ヒト *Notch4* に比較してヒト *Notch1* は月経周期における子宮内膜の変化への関与は少ないことが示唆された．しかしながら，*Notch1* 変異マウスでは，胎児の発生過程で秩序を失った体節形成を示すことから，*Notch1* が体節形成の過程で協調的に機能していることが示唆されている[47]．したがって，その相同遺伝子であるヒト *Notch1* が正常子宮内膜においても正常構造を構成するのに少なからず関与していると考えられた．

また，月経周期によって変化することから，エストロゲンとの関連性の有無について考察されるべきであるが，現在までのところ *Notch* とエストロゲンのシグナル伝達の関連性を示唆する報告はなく，今後のさらなる検討を要すると思われる．

ドットブロット解析において，正常子宮内膜に比較して子宮内膜癌では，ヒト *Notch4* の発現量は有意に減少していた（$P<0.01$）．子宮内膜癌の発生母地である増殖期内膜と子宮内膜癌で比較をすればさらに有意に減少していた．ここで，*in situ* ハイブリダイゼーションの結果とあわせて考察すると，子宮内膜癌では癌細胞と間質の両方にヒト *Notch4* が発現しているため，正常子宮内膜より発現量が増加していると考えることができる．しかし，これは発現量の少ないヒト *Notch4* のシグナルを検出するために，長時間発色反応をおこなったためであり，しかも，正常子宮内膜における発色反応時間よりも長くなっている．このことより，*in situ* ハイブリダイゼーションの結果は定量性に乏しく，むしろドットブロット解析の結果が定量的であると考えられた．

この結果は今までの腫瘍との関連についての報告，つまり腫瘍性変化によって *TAN-1*（ヒト *Notch1*）やマウス *Notch4/int-3* などの *Notch* 相同遺伝子では，その細胞内領域が過剰発現している[28,42]こととは反対の結果である．この一見矛盾した結果はヒト *Notch4* 遺伝子の構造が他の *Notch* 相同遺伝子と異なることから説明しうる．ヒト *Notch4* 遺伝子は EGF-like リピート数が他の *Notch* 相同遺伝子よりも少ないため（*Notch1*, 36；*Notch2*, 36；*Notch3*, 34；*Notch4*, 29），*Notch* ファミリーの中では *Notch4* が最も相同性の低い遺伝子であると報告されている[32]．さらに，ヒト *Notch4* の cdc10 領域をヒト *Notch1*，ヒト *Notch2*，マウス *Notch3* といった他の相同タンパクの同領域と比較すると，それぞれ63%，66%，65%の相同性しか認められない．これらのことから，ヒト *Notch4* は異なったシグナル伝達や機能を示す別のリガンドが存在する可能性もある．そのために，腫瘍性変化に伴ってヒト *Notch4* ではこれまで報告されている他の *Notch* 相同遺伝子とは異なる挙動，すなわち発現量が減少するものと考えられる．さらに，HPV 誘因の子宮頸癌においてヒト *Notch1* の発現が減少し，ヒト *Notch2* の発現が維持または増加しているという報告[48]からも，子宮内膜癌においては，ヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現量の相違があると考えられた．

また胎児における *Notch* 活性に関する研究では，いくつかある *Notch* の機能の主なものとして上皮の発生またはその状態を維持する機能が報告されていることから[8]，正常子宮内膜におけるヒト *Notch4* の機能の1つとして正常内膜上皮構造の維持というものが考えられる．これらのことより子宮内膜におけるヒト *Notch4* の発現の減少によって内膜の正常な細胞増殖状態と組織構築を維持できなくなり，異常な細胞増殖，つまり，子宮内膜の癌化に関与するものと考えられる．したがって，子宮内膜癌の発生機序はマウスにおける乳癌やヒトの白血病とは異なることが推察される．

ドットブロット解析において，ヒト *Notch4* とは反対にヒト *Notch1* の発現量は正常子宮内膜より子宮内膜癌において有意に増加していたので（$P<0.05$），ヒト *Notch1* も子宮内膜癌の発生に関与していることが考えられ，ヒトにおける新生物の発生に関与しているという以前に報告されている結果とも一致する[28,43]．しかし，ヒト *Notch1* において増殖期内膜と子宮内膜癌を比較した場合には発現量の差が有意でなくなることから，発現量の変化が大きいヒト *Notch4* の方が子宮内膜癌の発生に，より関与しているものと思われた．

ヒト *Notch4* 遺伝子のプロモーター領域には2つの GATA 認識領域と推定される部位があることが報告されている[32]．GATA 転写因子は細胞系譜特異的な運命決定に関与している[49~52]ため，細胞系譜特異的な運命決定の場面では GATA 転写因子がヒト *Notch4* の発現を調節していることを示唆している．このことからヒト *Notch4* の発現の減少が GATA 転写因子を介しているとすれば，細胞系譜に非特異的な運命決定が行われ，秩序を失った細胞の増殖を引き起こし，結果として子宮内

膜癌でみられる腺細胞の乱れた配列を引き起こすことが推察される．この推察は，*in situ* ハイブリダイゼーションの結果からも裏付けられる．ヒト *Notch4*，ヒト *Notch1* ともに，正常子宮内膜では腺細胞に強く発現しているのに対して間質ではわずかな発現しか認められないが，癌組織では癌細胞と間質とに発現し，その差が明確ではなかった．つまり癌組織では腺細胞と間質細胞の間で lateral specification（側方特異化）が機能しておらず，細胞がある特定の方向へ運命決定（分化）されていないものと考えられた．これはヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現が正常子宮内膜あるいは子宮内膜癌組織で同一部位に観察されたという *in situ* ハイブリダイゼーションの結果からからも支持される．さらにこの結果はこれら2つのタンパクが正常内膜構造を維持するにあたり協調的に機能していることも示していると考えられた．

今回の研究では，正常子宮内膜と比較して子宮内膜癌においてヒト *Notch4* の発現が減少しており，一方でヒト *Notch1* の発現量は増加していることを示した．このことはヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現量比の変化が，正常な細胞の運命決定や秩序だった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を示唆するものであると考えられた．

総　括

正常子宮内膜および子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* 遺伝子の役割に関して検討を行い，以下の結果を得た．

1. 正常子宮内膜および子宮内膜癌組織においてヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* が発現していることが確認された．

2. 月経周期によってヒト *Notch4* の発現量が増殖期内膜で増加し，分泌期では低下することが確認され，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．

3. *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果，ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* は正常子宮内膜では主に内膜腺細胞に，また子宮内膜癌では癌細胞とその間質細胞にも発現していた．

4. 子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* の発現量は正常子宮内膜と比較して減少していた．一方，ヒト *Notch1* は正常子宮内膜より子宮内膜癌にて発現量が増加しており，両者の発現量比の変化が，正常な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．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深謝いたします．また，実験の技術面で援助をいただきました国立遺伝学研究所発生工学研究室の中辻憲夫教授（現，京都大学再生医科学研究所再生統御学研究部門発生分化研究分野教授），白吉安昭助手（現，鳥取大学医学部生命科学科分子細胞生物学講座細胞工学分野助教授），同田村勝博士（現，国立遺伝学研究所系統生物研究センター哺乳動物遺伝研究室助手），同湯浅喜博氏（現，国立遺伝学研究所発生遺伝研究部門研究員）に感謝いたします．また，実験を様々な面から援助して下さった慶應義塾大学医学部産婦人科学教室青木大輔講師，宇田川康博講師（現，藤田保健衛生大学産婦人科教授），産婦人科第一研究室諸兄に感謝いたします．

本研究の要旨の一部は，第28回婦人科腫瘍学会学術集会において報告した．なお，本研究の一部は平成11年度医学部研究奨励費により行われた．

文　献

1) Krumlauf R：Hox genes in vertebrate development. Cell 78：191-201, 1994
2) Heitzler P, Simpson P：The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. Cell 64：1083-1092, 1991
3) Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME：*Notch* signaling. Science 268：225-232, 1995
4) Simpson P：Developmental genetics. The *Notch* connection. Nature 375：736-737, 1995
5) Cabrera CV：The generation of cell diversity during early neurogenesis in Drosophila. Development 115：893-901, 1992
6) Poulson DF：The effects of certain X-chromosome deficiencies on the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. J Exp Zool 83：271-325, 1940
7) Artavanis-Tsakonas S, Simpson P：Choosing a cell fate：a view from the *Notch* locus. Trends Genet 7：403-408, 1991
8) Hartenstein AY, Rugendorff A, Tepass U, Hartenstein V：The function of the neurogenic genes during epithelial development in the Drosophila embryo. Development 116：1203-1220, 1992
9) Lieber T, Kidd S, Alcamo E, Corbin V, Young MW：Antineurogenic phenotypes induced by truncated *Notch* proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for *Notch* in nuclei. Genes Dev 7：1949-1965, 1993
10) Giniger E, Jan LY, Jan YN：Specifying the path of

the intersegmental nerve of the Drosophila embryo : a role for Delta and *Notch*. Development 117 : 431-440, 1993

11) Fortini ME, Rebay I, Caron LA, Artavanis-Tsakonas S : An activated *Notch* receptor blocks cell-fate commitment in the developing Drosophila eye. Nature 365 : 555-557, 1993

12) Xu T, Caron LA, Fehon RG, Artavanis-Tsakonas S : The involvement of the *Notch* locus in Drosophila oogenesis. Development 115 : 913-922, 1992

13) Yochem J, Weston K, Greenwald I : The *Caenorhabditis elegans lin-12* gene encodes a transmembrane protein with overall similarity to *Drosophila Notch*. Nature 335 : 547-550, 1988

14) Yochem J, Greenwald I : glp-1 and lin-12, genes implicated in distinct cell-cell interactions in C. elegans, encode similar transmembrane proteins. Cell 58 : 553-563, 1989

15) Sherwood DR, McClay DR : Identification and localization of a sea urchin *Notch* homologue : insights into vegetal plate regionalization and *Notch* receptor regulation. Development 124 : 3363-3374, 1997

16) Bierkamp C, Campos-Ortega JA : A zebrafish homologue of the Drosophila neurogenic gene *Notch* and its pattern of transcription during early embryogenesis. Mech Dev 43 : 87-100, 1993

17) Coffman C, Harris W, Kintner C : *Xotch*, the *Xenopus* homolog of *Drosophila Notch*. Science 249 : 1438-1441, 1990

18) Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G : A homolog of Drosophila *Notch* expressed during mammalian development. Development 113 : 199-205, 1991

19) Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G : *Notch2* : a second mammalian *Notch* gene. Development 116 : 931-941, 1992

20) Del Amo FF, Smith DE, Swiatek PJ, Gendron-Maguire M, Greenspan RJ, McMahon AP, Gridley T : Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila *Notch*, suggests an important role in early postimplantation mouse development. Development 115 : 737-744, 1992

21) Kopan R, Weintraub H : Mouse notch : expression in hair follicles correlates with cell fate determination. J Cell Biol 121 : 631-641, 1993

22) Reaume AG, Conlon RA, Zirngibl R, Yamaguchi TP, Rossant J : Expression analysis of a *Notch* homologue in the mouse embryo. Dev Biol 154 : 377-387, 1992

23) Lardelli M, Lendahl U : Motch A and motch B-two mouse *Notch* homologues coexpressed in a wide variety of tissues. Exp Cell Res 204 : 364-372, 1993

24) Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U : The novel *Notch* homologue mouse *Notch 3* lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. Mech Dev 46 : 123-136, 1994

25) Robbins J, Blondel BJ, Gallahan D, Callahan R : Mouse mammary tumor gene *int-3* : a member of the notch gene family transforms mammary epithelial cells. J Virol 66 : 2594-2599, 1992

26) Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J : *Notch4/int-3*, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian *Notch* gene. Development 122 : 2251-2259, 1996

27) Shirayoshi Y, Yuasa Y, Suzuki T, Sugaya K, Kawase E, Ikemura T, Nakatsuji N : Proto-oncogene of *int-3*, a mouse *Notch* homologue, is expressed in endothelial cells during early embryogenesis. Genes Cells 2 : 213-224, 1997

28) Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J : *TAN-1*, the human homolog of the Drosophila *Notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 66 : 649-661, 1991

29) Stifani S, Blaumueller CM, Redhead NJ, Hill RE, Artavanis-Tsakonas S : Human homologs of a Drosophila Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. Nat Genet 2 : 119-127, 1992

30) Larsson C, Lardelli M, White I, Lendahl U : The human *NOTCH1*, *2*, and *3* genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. Genomics 24 : 253-258, 1994

31) Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T : Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II : gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a *Notch* homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene *int-3*. Genomics 23 : 408-419, 1994

32) Li L, Huang GM, Banta AB, Deng Y, Smith T, Dong P, Friedman C, Chen L, Trask BJ, Spies T, Rowen L, Hood L : Cloning, characterization, and the complete 56.8-kilobase DNA sequence of the human NOTCH4 gene. Genomics 51 : 45-58, 1998

33) Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS : Signal transduction by activated m*Notch* : Importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. Proc Natl Acad Sci U S A 93 : 1683-1688, 1996

34) Honjo T : The shortest path from the surface to the nucleus : RBP-Jk/Su(H) transcription factor. Genes Cells 1 : 1-9, 1996

35) Kato H, Taniguchi Y, Kurooka H, Minoguchi S, Sakai T, Nomura-Okazaki S, Tamura K, Honjo T : Involvement of RBP-J in biological functions of mouse *Notch1* and its derivatives. Development 124 : 4133-4141, 1997

36) De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V,

Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R : A presenilin-1-dependent g-secretase-like protease mediates release of *Notch* intracellular domain. Nature 398 : 518-522, 1999

37) Ye Y, Lukinova N, Fortini ME : Neurogenic phenotypes and altered *Notch* processing in Drosophila Presenilin mutants. Nature 398 : 525-529, 1999

38) Rebay I, Fehon RG, Artavanis-Tsakonas S : Specific truncations of Drosophila *Notch* define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. Cell 74 : 319-329, 1993

39) Struhl G, Fitzgerald K, Greenwald I : Intrinsic activity of the Lin-12 and *Notch* intracellular domains *in vivo*. Cell 74 : 331-345, 1993

40) Roehl H, Kimble J : Control of cell fate in *C. elegans* by a GLP-1 peptide consisting primarily of ankyrin repeats. Nature 364 : 632-635, 1993

41) Varmus HE : Recent evidence for oncogenesis by insertion mutagenesis and gene activation. Cancer Surv 1 : 309-319, 1982

42) Jhappan C, Gallahan D, Stahle C, Chu E, Smith GH, Merlino G, Callahan R : Expression of an activated *Notch*-related *int-3* transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. Genes Dev 6 : 345-355, 1992

43) Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S : Alterations in *Notch* signaling in neoplastic lesions of the human cervix. Proc Natl Acad Sci U S A 92 : 6414-6418, 1995

44) Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserve E : *Notch3* mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. Nature 383 : 707-710, 1996

45) Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserve E : *Notch3* mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. Ann N Y Acad Sci 826 : 213-217, 1997

46) Lardelli M, Williams R, Lendahl U : *Notch*-related genes in animal development. Int J Dev Biol 39 : 769-780, 1995

47) Conlon RA, Reaume AG, Rossant J : *Notch1* is required for the coordinate segmentation of somites. Development 121 : 1533-1545, 1995

48) Talora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP : Specific down-modulation of *Notch1* signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. Genes Dev 16 : 2252-2263, 2002

49) Orkin SH : GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. Blood 80 : 575-581, 1992

50) Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH : An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. Nature 371 : 221-226, 1994

51) Joulin V, Bories D, Eleouet JF, Labastie MC, Chretien S, Mattei MG, Romeo PH : A T-cell specific TCR delta DNA binding protein is a member of the human GATA family. Embo J 10 : 1809-1816, 1991

52) Ip HS, Wilson DB, Heikinheimo M, Tang Z, Ting CN, Simon MC, Leiden JM, Parmacek MS : The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle- specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. Mol Cell Biol 14 : 7517-7526, 1994

53) Suzuki T, Aoki D, Susumu N, Udagawa Y, Nozawa S : Imbalanced expression of *TAN-1* and human *Notch4* in endometrial cancers. Int J Oncol 17 : 1131-1139, 2000

慶應医学・81(2)：T63～T72，2004

学位論文

急性広範性肺動脈血栓塞栓症52剖検例の法医病理学的研究

慶應義塾大学医学部法医学教室
（指導：村井　達哉教授）
呂（ろ）　彩子（あやこ）

（平成15年11月20日受付）

Key Words：pulmonary thromboembolism, deep vein thrombosis, sudden death, autopsy, histopathology

肺動脈血栓塞栓症（pulmonary thromboembolism，以下PTE）は静脈系で形成された血栓が塞栓子となり肺動脈を閉塞する疾患で，肺門部が閉塞された場合には，急激な右心負荷と低酸素血症により短時間で死に至る．Dalenらによると米国では年間63万人のPTE患者が発生し，うち11%は1時間以内に死亡するという[1]．このため欧米では，PTEは冠動脈疾患，脳血管疾患にならぶ循環器系の致死性疾患として恐れられている[2]．

米国ではPTE患者の死亡率は1960年代から80年代中盤にかけて増加したのち減少している[3]のに対し，本邦におけるPTE患者は後述するように1970年代から90年代にかけてむしろ増加している．しかし，Silverstein[4]ら，Kumasaka[5]らがそれぞれ報告した日米のPTE患者の発症数を比較すると，1990年代においても人口100万人あたりのPTEの発症数は米国で690人，本邦で28人と大きく隔たりがみられた．本邦において患者数が増加したといわれる近年でも，PTEは米国に比しはるかに希な疾患であるといえる．

本邦におけるPTEの疫学研究は日本剖検輯報にもとづく調査がいくつか行われ[6,7]，1958年には総剖検例中0.89%であったPTE症例が1998年には3.31%と増加を認めている．また，Sakuma[8]らが死亡診断書にもとづく人口動態統計を用いた解析においても，人口10万人あたりのPTEによる死亡者数が1956年には0.08であったのが，1996年には0.77と明らかに増加がみられている．

日本剖検輯報および人口動態統計の報告が主として臨床診断のついた症例，もしくは他疾患で入院中の患者のPTE発症例を対象とするのに対し，生前診断のつかないまま突然死をきたし，剖検によってはじめて広範性PTEと診断された症例については，本研究の対象施設の一部となった東京都監察医務院における行政解剖の統計が疫学的資料として重要である[9～13]．吉村ら[9]，村井[10]によれば内因性急死例の総行政解剖数におけるPTEの占める割合は1970年には0.15%（2/1356例）であったが，1980年には0.32%（4/1249例），1988年には1.05%（17/1619例）となり，近年増加がみられている．

本邦におけるPTE患者増加の原因については，食生活の欧米化による肥満，高脂血症など易血栓性を来たす疾患の増加などが推察されている一方で，肺動脈造影やMRIなどの画像診断技術の進歩による診断精度の上昇の関与もうかがえる．またいわゆるエコノミークラス症候群（旅行者血栓症）といった，特定の環境下で発症するPTEが一般人に広く知られるようになった[14]ことで本症は多方面から注目される結果となっている．法医学領域においても，以前から問題となっていた下肢外傷後のPTE症例における事故と死亡との因果関係に加えて，院内発症によるPTEの予防など医療行為が適切であったかの判断が近年では求められている[15]．

PTEは塞栓子の形状により多彩な病態を示すが，なかでも短時間で致死性発作をきたす急性広範性PTEはその急激な経過ゆえに生前の診断が困難なため，本邦における研究報告が非常に少ない．PTEの専門治療を行

本論文は，Ro A, Kageyama N, Tanifuji T, Kobayashi M, Takada A, Saito K, Murai T：Histopathological study of pulmonary arteries in 14 autopsy cases with massive pulmonary thromboembolism.Legal med 5：s315-s317, 2003の一部および呂　彩子，谷藤隆信，景山則正，濱松晶彦，村井達哉：院外発症の肺動脈血栓塞栓症による突然死51例の病理形態学的検討．脈管学，43：627-632, 2003の一部を含む．

う全国でも有数の機関である国立循環器センターにおいても，1995年までの10年間に発症した急性PTEは77例で，うち致死性PTEは14例にすぎない[16]．本邦では剖検によるPTEの病理学的な研究報告が少なく，病理解剖における連続剖検例にみられたPTE症例として，その割合を水上は13.5%（27/200例）[17]，伊東は24.0%（54/225例）[18]，伊藤は15.4%（77/500例）[19]と述べるとともにその病理形態学的特徴を報告している．しかしこれらは亜広範性PTEや，腫瘍塞栓も対象とされており，急性広範性PTEの病態把握に充分な資料ではない．またいずれも病理解剖例であり，心疾患や脳血管障害，癌などの重篤な疾患の合併がみられる例が多く含まれている．

以上の背景を踏まえ，本研究の目的は本邦における広範性PTEによる急死例の病態を剖検所見から把握することとした．そのために，広範性PTEの52剖検例を対象として肺動脈の病理所見を検討するとともに，症例の臨床的背景を把握し，両者の対比を行った．また塞栓源として左右下肢深部静脈の詳細な検索が可能であった18例については，PTEと下肢深部静脈血栓症（deep vein thrombosis，以下DVT）の病理形態学的関連性についても検討した．

対象と方法

1．対象

対象は1999年から2003年の5年間に慶應義塾大学医学部法医学教室，東京都監察医務院，埼玉医科大学法医学教室，榊原記念病院において施行された剖検例（総剖検数13488例）のうち，剖検によって広範性PTEによる死亡と診断された52例で，内訳は男性24例（平均年齢54.0±16.9歳），女性28例（平均年齢53.6±14.8歳）であった．PTEによる死亡とは，Reporting standards in venous disease[20]における剖検時PTE診断基準のprobably lethal PTEもしくはpossibly lethal PTE，すなわち合計して左右葉動脈一対以上の面積を閉塞する広範性PTE（第1図）であり，他に致死的な病変が存在しない例である．

本研究では，致死性発作より以前にPTEの診断・加療歴がある症例は検討対象から除外した．また剖検によって播種性血管内凝固など全身性の血栓傾向をきたす疾患の合併が明らかとなった例も除外した．

塞栓源検索は50例に施行され，うち47例にDVTを確認した（DVT検出率94.0%）．47例のうち46例が下肢DVTであった．1例は下肢DVTが認められず，

第1図　剖検時肺所見．矢印で示すごとく左右肺門部を閉塞するいわゆる騎乗血栓が認められる．

上肢の血管病変に起因する右上肢のDVTが確認された．52例の平均心重量は379.3 gであった．

2．方法

1）臨床的背景の検討

調書から52例の疫学的特徴，生前の身体状況および臨床経過を検討した．

検討項目：(a) 性差・年齢分布，(b) 血栓形成に影響する背景因子の有無，(c) 症例の臨床経過（前駆症状の有無と医療機関への受診・PTE診断の有無），(d) 発症場所（院内発症/市中発症の別），(e) 発症場所と前駆症状との関連．

2）肺動脈の病理形態学的検討

標本作製：剖検時に肉眼的血栓の有無を確認したのち，肺を摘出し気管支より10%ホルマリンを注入し加圧固定を行った．用手的に周囲組織を取り除き，肺動脈を露出した．区域動脈から末梢にいたる5 mm間隔の横断切片を作製し，血栓の性状を肉眼的に観察するとともに，肺動脈幹もしくは葉動脈（A0），区域動脈・亜区域動脈（A1），亜々区域枝およびその末梢の弾性動脈（A2），筋性動脈および末梢域（A3）を網羅する組織標本作成を行った．標本はパラフィン包埋後，3 μmに薄切し，Hematoxylin and Eosin，Elastica van Gieson，Phosphotungstic acid hematoxylinの各染色を行った．標本の平均ブロック数は一症例あたり276個であった．

検討項目：(a) 器質化血栓の分布，(b) 器質化血栓の存在部位，(c) 肺梗塞の有無，(d) 筋性動脈の変化（内膜平滑筋細胞の縦走化・器質化血栓の有無），(e) 前駆症状との対比．

なお器質化血栓とは，組織学的に血栓成分は認められないものの，血管壁に明らかに血栓由来と思われる膠原線維や弾性線維からなる偏在性肥厚が認められるものとした．

3）下肢 DVT と PTE の血栓分布の比較

検討対象：52 例のうち，左右下肢深部静脈全域の標本作製が可能であった 18 例（男性 9 例，女性 9 例，平均年齢 50.2±15.4 歳）．

下肢深部静脈の検索：剖検時に下肢を背面からアプローチし，下肢深部静脈を摘出した[21]．10%ホリマリンにて固定後，肺動脈と同様に 5 mm 間隔の横断切片標本を作製し，新鮮血栓と器質化血栓の分布を組織学的に検討した．DVT の平均ブロック数は一症例あたり 206 個であった．

検討項目：(a) DVT の左右差，(b) DVT の存在部位，(c) 器質化血栓の分布と PTE との関連．

検討（b）では左右下肢を［1］腸骨静脈，［2］大腿静脈，［3］膝窩静脈，［4］腓腹静脈，［5］前脛骨静脈，［6］後脛骨静脈，［7］腓骨静脈，［8］ヒラメ静脈の 8 区域に分け DVT の存在頻度を求めた．1 例で左右下肢に広範囲に DVT が見られた例では重複肢とした．

検討（c）では，著者らの過去の報告[22]にしたがい，下肢 DVT を Gradel：新鮮血栓のみで器質化血栓が確認されない群，Grade II：ヒラメ静脈のみに器質化血栓を認める群，Grade III：膝窩静脈およびその末梢側に器質化血栓を認める群，Grade IV：大腿静脈およびその中枢側に器質化血栓を認める群に分類した．各症例の DVT の Grade と，結果(2)（a）の肺動脈の Grade との関連をスピアマン順位相関係数を用いて検定した．

結　果

1.　臨床的背景

1）性差・年齢分布：男女比は 1：1.17 でやや女性が多かった．年齢は 19～84 歳であり，30 代から 50 代にかけてピークがみられた(第 2 図)．

2）背景因子：PTE に関連する背景因子として，肥満［body mass index≧24］21 例（40.4%），精神疾患 15 例（28.8%），高年齢［70 歳以上］13 例（25.0%），下肢外傷の既往 6 例（11.5%），悪性腫瘍の既往 3 例（5.8%），高脂血症 1 例（1.9%），下肢 DVT の既往 1 例（1.9%），PTE の家族歴 1 例(1.9%)が存在した．また，これらの危険因子が全く存在しない例は 12 例(23.1%)であった．

第 2 図　急性広範性 PTE 52 例の性別および年齢分布．男女比は 1：1.17 で女性にやや多く，年齢は 19 歳から 84 歳に分布し，30 代から 50 代にピークがみられた．

3）臨床経過：34 例（65.4%）に呼吸困難や胸痛など PTE に起因すると考えられる前駆症状が認められた．前駆症状の出現時期は 1 日未満 13 例（25.0%），1 日以上 21 例（40.4%）であった．前駆症状が存在した 34 例中 16 例（47.1%）は医療機関を受診していたが，PTE の疑いがもたれたのはそのうち 4 例のみであった．

4）発症場所：院内発症例すなわち他疾患で入院中の患者が PTE を発症した例は 11 例（21.2%）であった．入院疾患の詳細は 6 例が精神疾患による長期入院患者であり，5 例が外傷関連入院(整形外科 4 例，脳神経外科 1 例）であった．

5）発生場所と前駆症状：院内発症例における前駆症状の出現率は 18.2%（2/11），市中発症例における前駆症状の出現率は 78.0%（32/41）であった．

2.　肺動脈の病理形態学的検討

1）器質化血栓の分布：肺動脈 1 区域の中で A0-A3 のいずれかに器質化血栓が認められたものを 1 枝として左右 18 区域動脈枝における器質化血栓の分布を求めたところ，症例は Gradel（G1）：器質化血栓が認められないもしくは 5 枝以内に認められる群 16 例，Grade 2（G2）：器質化血栓が 6-15 枝に認められる群 14 例，Grade3（G3）：器質化血栓が 16 枝以上に認められる群 22 例であった．

2）器質化血栓の存在部位：A0-A3 の各部位における器質化血栓の有無を調べたところ，器質化血栓なし 1 例，A1 のみ 3 例，A2 のみ 5 例，A1・A2 に分布 11 例，A1-A3 に分布 10 例，A0-A2 に分布 7 例，A0-A3 に分布 15 例であった．結果（2）（a）の G1-G3 との関連は第 3 図に示した．

3）肺梗塞：病理学的梗塞，すなわち肺の壊死像は 21.2%（11/52）に認められた．結果（2）（a）の G1-

第3図　肺動脈内における器質化血栓の分布．器質化血栓が18区域動脈中5本以内と少ないG1群では器質化血栓が区域動脈域に限局しているが，6－15枝にみられたG2群，16枝以上にみられたG3群と器質化血栓の分布が高度になるにつれ，葉動脈から末梢の細い動脈まで器質化血栓の分布が瀰漫性となっていた．新鮮血栓のみで器質化血栓が存在しない例は52例中1例のみであった．

第4図　筋性動脈における内膜平滑筋細胞の縦走化（ヘマトキシリン・エオジン染色×100）．急激な肺高血圧の結果生じると考えられる本所見は，52例中25例（48.0%）に認められた．なお，本所見は器質化血栓の分布が高度なG2,G3群にのみ存在した．

第5図　筋性動脈の器質化血栓（エラスチカワンギーソン染色×100）．52例中27例（51.9%）に認められた．本所見は器質化血栓の分布が高度なG2,G3群にのみ存在した．

3各群における肺梗塞の割合はG1で12.5%（2/16）G2で28.5%（4/14）G3で22.7%（5/22）であった．

4）筋性動脈の変化：内膜平滑筋細胞の縦走化（第4図）は48.0%（25/52）にみられ，結果（2）（a）のG1-G3各群における割合はG1で0%（0/16），G2で71.4%（10/14），G3で63.6%（14/22）であった．筋性動脈の器質化血栓（第5図）は全体の51.9%（27/52）にみられ，G1-G3の各群における割合はG1で0%（0/16），G2で71.4%（10/14），G3で68.1%（15/22）であった．

5）前駆症状との対比：結果（2）（a）のG1-G3各群における前駆症状の出現率はG1で37.5%（6/16），G2で71.4%（10/14），G3で81.8%（18/22）であった．

3.　下肢DVTとPTEの血栓分布の比較

1）DVTの左右差：DVTが両肢にみられたものは13例（72.2%），片肢のみのものは5例（27.8%，左肢3例・右肢2例）であった．

2）DVTの存在部位：18例（左右36肢）の下肢深部静脈の各部位におけるDVTの検出頻度は，腸骨静脈4肢（11.1%），大腿静脈6肢（16.7%），膝窩静脈17肢（47.2%），腓腹静脈15肢（41.7%），前脛骨静脈9肢（25.0%），後脛骨静脈22肢（61.1%），腓骨静脈24肢（66.7%），ヒラメ静脈30肢（83.3%）であった（第6図）．

3）器質化血栓の分布とPTEとの関連：DVTの

第6図　急性広範性PTEを合併した18例36肢の新鮮血栓および器質化血栓を含めたDVT検出率．最もDVT検出頻度が高いヒラメ静脈から還流経路にしたがって，腓骨静脈，後脛骨静脈，膝窩静脈と中枢側にむかうにつれDVT検出率が低くなっている．ヒラメ静脈の還流経路ではない腓腹静脈・前脛骨静脈では下腿静脈であってもDVT検出率がやや低く，フリーフロート血栓として遊離・塞栓子化したと考えられる大腿静脈・腸骨静脈ではDVT検出率がきわめて低かった．

第7図　PTEとDVTの器質化血栓の進行度の分布．器質化血栓の分布によりPTEをGrade1-3, DVTをGradeI-IVに分類した．症例ごとのPTEとDVTのGradeには相関がみられた（スピアマン順位相関係数の検定，$p<0.05$）．

GradeはGradeIが4例GradeIIが5例GradeIIIが7例GradeIVが2例であり，PTEのGradeはG1が5例G2が6例G3が7例であった．症例ごとのPTEとDVTのGradeには相関が認められた（スピアマン順位相関係数の検定，$p<0.05$）（第7図）．

考　察

本研究から得られた広範性PTEの臨床的背景のうち，性差・年齢分布については女性が多く，30から50代にピークがみられるという，過去の疫学的調査結果[23]と一致していた．

背景因子として，症例の76.9%に何らかの血栓形成因子が存在していた．DVT/PTEは多因子疾患であり，易血栓性にはいわゆるVirchowの三徴，すなわち血流の停滞・血管壁の損傷・血液凝固能の亢進が古くから知られている[24]．また近年では血栓性素因を先天的・後天的因子に分類する考え方もみられる[25]．これは，欧米でDVT患者の20～60%にFactor V Leiden変異がみられ[26]，また5.5～7.1%にprothrombin遺伝子異常（G20210A変異[27]）が存在することがわかり，先天性血栓性素因の重要性が近年指摘されてきたためである．本研究では生前の臨床検査が行われなかった例がほとんどであるため，上記2変異を含めた凝固能異常の有無ついての精査は行っていない．しかし，かつて著者らが行った広範性PTE 35剖検例の検討では，Factor V Leiden変異およびprothrombin遺伝子異常（G20210A変異）はいずれも認められなかった[28]．これらの遺伝子異常は日本人を含めたアジア諸国でいまだに発見されておらず，欧米に比し本邦でPTE患者が少ない一因と考えられている．

また市中発症のPTEの特徴として精神疾患の合併が多いことが以前より指摘されている[11]．向精神薬による易血栓性が指摘されるとともに[29,30]，疾患にともなう活動性の低下などが関与しているものと推察される．

広範性PTEは，発症から短い経過で急死するために，生前の症状はほとんど存在しないものと考えられてきた．しかし臨床症状を再検討したところ，実に52例中34例がPTEに関連する前駆症状を訴えていた．しかも16例が医療機関を受診していたにも拘わらず，PTEの疑いがもたれたのは4例のみであった．受診した患者に対するPTE診断率は25.0%であるが，検討例全体から見ると7.7%にすぎない．PTEの前駆症状は咳や息切れなど非特異的で重篤感の少ない例が多いことが低診断率の一因となっているものと考えられるが，広範性PTE

の救命率をあげるためには，前駆症状出現群の受診率および診断率を上昇させることが急務と思われる．

ここで興味深いことは，前駆症状の出現率が，院内発症例18%・市中発症例78%と発生場所により大きく異なっていたことである．田中らの報告によればPTEによる突然死44例の前駆症状の出現率は院内発症例18%・市中発症例67%とされ[31]，本検討と同様の傾向がみられる．小塞栓子の遊離と器質化を繰り返しながら徐々にDVTが増悪する市中発症例に対し，院内発症例では臥床などの血栓形成要因が集中することでDVTが入院後に短期間で形成され，静脈壁に付着・器質化されないうちに大塞栓子化するためと考えられている[31~33]．現在，米国胸部外科学会が2001年に提唱したガイドラインにもとづき[34]，本邦でもPTEの院内発症予防のためのガイドラインの作成が試みられているが[35]，PTEの多様性を充分考慮し，個々の患者の病態に即したDVT対策が必要であろう．

つぎに，剖検所見から広範性PTEの時間的経過を病理学的に推察するために器質化血栓の有無と分布を検索した．その結果，52例中51例は致死性発作となった新鮮血栓とともにPTEの既往を示唆する器質化血栓の混在がみられ，病理所見からは慢性反復性の経過が推察された．

Morpurgoは1本以上の区域動脈を閉塞したPTE 538剖検例の検討のうち，15%が発症時期の違う“heterochronic”な肺梗塞をともなっていたと報告し[36]，本邦では国枝らが急性致死性PTE 14例のうち36%が再発型であったと報告している[16]．以前著者らが行った検討では院外発症のPTE 51例のうち82.4%が再発型と考えられた[32]．本研究では肺動脈の詳細な検索を目的とするために一症例あたりの標本を多数作製したことで，器質化血栓の確認率が高くなり，再発型の比率が自験例を含めた過去の報告に比し著しく上昇したと考えられる．

さらに，前駆症状の出現率の高さと併せて考察すると，これまで一回発症型のため予見困難といわれていた本邦における広範性PTEによる急死例の多くが，臨床下(subclinical)の慢性反復性PTEの経過をとっていることが本研究から判明した．

器質化血栓の分布と存在部位を対比させたところ，器質化血栓の分布が少ないG1では区域動脈域に限局して存在しており，器質化血栓が広範に存在するG2, G3では葉動脈から末梢まで瀰漫性に分布した症例が多く，分布と存在部位はある程度相関しているものと考えられた．

PTEが再発性塞栓と器質化の履歴を反復しながら増悪していく経過として，初期に非致死性の小塞栓子が第2，第3分岐で捕捉され，続いて血栓の線溶にともなう断片化によってより細い末梢側の動脈の閉塞がおこると考えられている[37]．さらに新たな血栓塞栓子が肺動脈に運ばれた場合には，以前の塞栓子の器質化による閉塞部より中枢側で塞栓子が停滞するため，結果として葉動脈域に器質化血栓が形成されるのではないかと推察される．このために反復性塞栓症の履歴が進行した例では，肺動脈の様々な径の部位に器質化血栓が瀰漫性にみられると考えられた[38,39]．以上のことから病理所見からみたPTEの経過は，G1, G2, G3と器質化血栓の分布が高度になるにつれ，反復性塞栓症の履歴も多く，病状が進行した状態を示すと推察された．

肺梗塞に関して中村らはPTE 57剖検例のうち39%に肺梗塞がみられたと述べているが[40]，同時に肺梗塞合併例の73%が心疾患を合併してることから，血液供給の予備機能が低い症例に肺梗塞が多く見られるのではないかと考察している．本研究では重篤な心疾患の合併例を検討対象から除外したことが，中村らの報告例より肺梗塞の割合が低くなった一因と考えられる．また広範性PTEの多くが発症からきわめて短時間で死亡するために，肺の壊死が病理形態学的に表現されるまでの時間経過がみられなかったことも一因であろう．ただし，本検討では各Gradeにおける肺梗塞の比率に大きな差がみられず，器質化血栓の分布が高度であるにもかかわらず肺梗塞が見られない例も多かった．肺梗塞が形成される際には，肺動脈の閉塞面積のみならず，おそらく塞栓子の閉塞部位と経過時間が複雑に関与しているのではないかと考えられる．

広範性PTEは中枢側の肺動脈にのみ焦点がおかれることが多い．PTEの病理形態学的な分類においても肺葉動脈から区域動脈にPTEが存在する場合をマクロPTE，直径1000 μm以下の小動脈に血栓塞栓子が存在する場合をミクロPTEとし，両者は異なる病態を呈すると考えられている[41]．しかし著者は広範性PTEに筋性動脈の変化が見られる例をしばしば経験しており[42]，本検討でも約半数に筋性動脈の病変が確認された．

筋性動脈の内膜平滑筋細胞の縦走化は急激な肺高血圧症の際にみられる所見であり，八巻らは筋弾性線維症と称している[43]．比較的短時間に生じた肺高血圧に中膜の肥厚が追いつかず，内膜肥厚で対応するものと考えられている．また本病変は原発性肺高血圧症にみられる中膜肥厚とは異なり，可逆性をもち肺動脈圧の減少によって改善することが特徴とされている．

筋性動脈の器質化血栓は，心房中隔欠損などの先天性

心疾患や鎌状赤血球症にともなうものが有名であるが[43]，検討例のような広範性 PTE に付随する例としては，微小塞栓子によるものもしくは，前述したように区域動脈域での血栓塞栓子の停滞に基づく分断化による結果と考えられる．

これらの筋性動脈の変化は，ある程度反復性塞栓症の履歴が進行した G2, G3 の症例のみに確認された．筋性動脈の変化が長期的に継続すれば当然右心機能に対する影響も強くなると考えられるため，器質化血栓が区域動脈域に限局しており筋性動脈病変が出現する以前の PTE 治療がより効果的であると推察される．

また，筋性動脈を侵す肺血管疾患として，しばしば原発性肺高血圧症との鑑別が問題となる[44]．しかしながら検討例では原発性肺高血圧症に特徴的と言われる叢状病変は認められず，中枢側の太い肺動脈に新鮮血栓が存在していることや，大多数の例で塞栓源として四肢の DVT を確認していることなどから鑑別は比較的容易であった．

臨床経過と病理所見の対比を検討したところ，G1, G2, G3 と病理学的に反復性塞栓症の履歴が進行していくにしたがい，前駆症状の出現率も高くなっていた．器質化血栓の分布が高度な群では，肺動脈の閉塞部位が増加すること，および前述した筋性動脈病変の出現により右心の負荷が増加することなどが前駆症状の出現率の上昇につながっていると推察される．

これらの結果をもとに，広範性 PTE による急死例を臨床経過と病理所見から総合的に考察すると，症例は G1 にみられるような初回発作から短期間のうちに前駆症状の出現もないまま死亡する群と，G2, G3 にみられるように subclinical な小発作を繰り返しながら病状が進行し，前駆症状を訴えながらも生前診断のつかないうちに致死性発作により急死する群とに大別されるものと考えられる．今後も PTE 症例を蓄積し両者の特徴をさらに比較検討することが，広範性 PTE の病態把握において重要であると考える．

第二の研究課題として，PTE と下肢 DVT との関連を病理形態学的に検討した．すなわち，臨床的に経過が不明瞭である PTE の経過および病態を，下肢 DVT からの静脈血栓塞栓症（venous thromboembolism，以下 VTE）として総合的に考察した．

はじめに DVT の左右差を検討したところ，72.2%が両側性発症で左右差は認められなかった．前述した院外発症 PTE 51 例の検討でも両側性 DVT は 60.0%と高率であった[32]．しかし，DVT の発症様式からみると腸骨静脈圧迫症候群による左肢 DVT 例が多いことが一般に知られており，折井らの報告では DVT 528 例中，左肢 53.6%，右肢 30.8%，両側性 16.1%と，両側性 DVT の比率はかなり低い[45]．この差異を検討するには，広範性 PTE を合併する DVT という対象例の特殊性を考慮する必要があろう．

應儀は DVT をその発症様式から腸骨型，大腿型，下腿型に分類している[46]．それぞれの発症様式と DVT の左右差を考察すると，腸骨静脈圧迫症候群が中心となる腸骨型，および入院中のカテーテル損傷などにともなって発症しやすい大腿型では片肢発症を，主に血流鬱滞が関与する下腿型では両側性発症をきたしやすいと考えられている．さらに，DVT の経過として腸骨型・大腿型では，末梢側に血栓が進展するため塞栓子となりにくいこと，早期の大腿部の静脈閉塞により発赤・疼痛などの臨床症状を呈しやすく，DVT の加療が行われる例が多いことなどから PTE の合併が少ないと考えられている．このため PTE を合併する DVT は下腿型が多く，その発生機序から両側性 DVT をきたしやすいと考えられる．事実，PTE を合併した 95 例の DVT を検討した秋山らの報告では両側性 DVT が 37.9%で最も多かった[47]．

また，今回の検討例の中で，片肢性 DVT をおこしやすいと考えられる一肢のみの下肢外傷をともなう 6 例においても，DVT が片肢発症の例と両側性発症の例とがみられた．広範性 PTE 発症例では，両側性 DVT の存在を念頭においた塞栓源検索および治療が必要と考えられる．

つぎに DVT の存在部位を検討した結果では，下腿静脈，なかでもヒラメ静脈における DVT 検出頻度が 83.3%と最も高かった．著者らは以前より急性広範性 PTE における DVT は下腿型が多いこと[48]，さらに DVT の検出率が最も高く，かつ血栓の器質化の進行度も最も高度であるヒラメ静脈が DVT の発生源として重要であると報告してきた[22,49]．ヒラメ静脈に血栓が発生しやすい理由については，立位で最も静水圧がかかる部位であるためと推察されているもののいまだ明確な説はない．またヒラメ静脈血栓の発生機序として長期臥床による血流鬱滞の関与が示唆されるが，本検討例は多くが直前まで臥床傾向のない市中発症例であった．剖検例のみからヒラメ静脈血栓の発生機序を推察するのは困難であり，今後も臨床・剖検の両側面から病態解明を行う必要がある．

ここで，下肢全体の DVT の分布を検討すると，最も DVT 検出率が高いヒラメ静脈から，その還流経路である腓骨静脈，後脛骨静脈，膝窩静脈と中枢側にむかうにつれて DVT の検出率が低くなっている．これらヒラメ静脈に関連した下腿静脈に比べて，大腿静脈，腸骨静脈

ではDVTの検出率が16.7%，11.1%と，きわめて低率であったことから，検討例の多くが下腿型DVTと考えられた．

應儀らによるPTEを合併したDVT 78症例の検討では，腸骨型60肢・大腿型17肢・下腿型13肢と，腸骨・大腿型症例が多く[50]，今回の結果と一見矛盾している感がある．しかし，應儀らの検討は亜広範性PTEが多く含まれており，腸骨・大腿部の血栓が致死性の大塞栓子として遊離する以前の状態を反映していると考えられる．

著者らは過去の研究結果から，広範性PTEをひきおこすDVTは，まずヒラメ静脈を中心とした下腿静脈で一次血栓が発生し，血栓性閉塞にもとづく血流鬱滞のため還流経路，すなわち膝窩静脈を経て大腿静脈・腸骨静脈へと，中枢側にむけて二次血栓が進展していると推察している[22,49]．また，一次血栓が緩徐な形成過程で血栓の器質化により静脈壁に固定されやすいのに対し，二次血栓は短期間に形成された血栓のため静脈壁に固定されないフリーフロート血栓となり，下肢動作によって遊離，塞栓子化しやすいと考えられている[46,49]．このために，本研究においては一次血栓で遊離しにくい下腿静脈においてDVTが高率に確認され，遊離して致死性の大塞栓子となった二次血栓が存在していたと考えられる大腿静脈・腸骨静脈ではDVTの検出率が低くなったのであろうと考えられる．

なお，下腿静脈のなかでも腓腹静脈および前脛骨静脈ではDVTの検出率が比較的低かった．ヒラメ静脈の還流経路ではない腓腹静脈・前脛骨静脈では，ヒラメ静脈血栓の進展過程で膝窩静脈が閉塞した結果二次性に血栓が形成されることが多いためではないかと著者らは推察している[22]．

こうした研究成果から推察されたDVTの成長過程と，肺動脈における反復性塞栓子の器質化の進行過程を関連づけるために，DVTとPTEの分布をそれぞれGradeに分類して検討したところ，両者の器質化血栓の分布の進行度に相関が得られた．以前著者らが行った検討でも，下肢DVTの器質化血栓がヒラメ静脈に限局した例では肺動脈の標本に占める器質化血栓の割合が6.2%であったのに対し，DVTの器質化血栓が下肢全域に分布している例では肺動脈における器質化血栓の割合が40.0%と高く，下肢DVTで器質化血栓の分布が高度な例では，PTEにおける血栓塞栓子の器質化の割合が高度であった[39]．

これらは塞栓源－閉塞部位の関係からみれば当然の結果ではあるが，VTEの診断・治療の際には常に下肢と肺の総合的な病態把握が必要であると同時に，剖検例においても肺動脈の検索のみでは不十分であり，下肢深部静脈についても新鮮血栓の確認にとどまらず下肢全域の検索が重要であることが再認識された．

本研究は生前の情報が乏しい広範性PTEの急死例を対象とし，肺動脈と下肢深部静脈の病理組織学的検討からその病態把握を行った．得られた成果を踏まえ，今後は生前にPTEの診断・加療がなされた症例群の検討を追加し，臨床経過や治療効果と病理所見との対比を行うことで，PTEのより詳細な病態解明が期待できる．また広範性PTEの直接死因となる右心不全の病態解明のためには，本研究では検討を行わなかった右心機能についても病理形態学的評価法を確立し，本研究成果と照らし合わせた総合的考察が求められるため，今後も更なる検討が必要である．

総　括

本研究では，急性広範性PTEの52剖検例を病理組織学的に検討し，その病態把握を行った．

1. 広範性PTEによる急死例のほとんどに新鮮血栓と器質化血栓の混在がみられ，病理学的には慢性反復性の経過が示唆された．器質化血栓の分布と局在から，PTEの病状の進行は，まず区域動脈域で塞栓子の器質化がおこり，その後反復性塞栓症および肺動脈内での血栓の線溶・分断化によって葉動脈から末梢の細い動脈まで広範かつ瀰漫性に器質化血栓による閉塞が生じると考えられた．

2. 広範性PTEにともなう副所見として，21%に肺梗塞がみられた．筋性動脈の変化は内膜肥厚が48%に，器質化血栓が52%に認められた．肺梗塞の出現率は器質化血栓の分布との関連がみられなかったが，筋性動脈の変化は高度器質化例で多く認められた．

3. 症例の65%が生前にPTEに起因する前駆症状を呈し，うち47%が医療機関を受診していたが，PTE診断率は症例全体の8%であった．臨床症状と病理所見の対比では，器質化血栓の分布が高度になるにつれ前駆症状の出現率が高くなっていた．

4. 下肢DVTはほぼ全例に認められ，7割が両側性発症で，ヒラメ静脈が最も高頻度であった．また，肺動脈における反復性塞栓症の履歴の進行にともなって，下肢DVTも下腿静脈から下肢全域に器質化血栓の分布が広範かつ高度になっていた．

以上のことから，従来一回発症型のため予見が困難で

あると考えられていた広範性 PTE の多くが，subclinical な VTE の既往をもつ慢性反復性 PTE と考えられた．反復性塞栓症の経過にともない PTE とそれにともなう病変も重篤化するため，病初期の段階で DVT/PTE を診断することが致死性発作の回避に重要であると考えられた．

稿を終えるにあたり御指導を賜りました慶應義塾大学医学部法医学教室　村井達哉教授に深甚なる謝意を表します．また剖検例の検索を御許可くださいました東京都監察医務院，埼玉医科大学法医学教室，および榊原記念病院の諸先生方に深謝いたします．ならびに標本作製および症例検討に御協力いただきました慶應義塾大学医学部法医学教室の教職員および東京都監察医務院の技術職員の方々に心より感謝申し上げます．

また本研究の要旨の一部は第 44 回日本脈管学会総会（2003 年，福岡）において報告した．

文　献

1) Dalen JE, Alpert JS：Natural history of pulmonary embolism. Prog Cardiovasc Dis 17：259-270, 1975
2) Giuntini C, Ricco GD, Marini C, Melillo E, Palla A：Pulmonary embolism：epidemiology. Chest 107：3s-9s, 1995
3) Lilienfeld DE：Decreasing mortality from pulmonary embolism in the United States, 1979-1996. Int J Epidemiol 29：465-469, 2000
4) Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O' Fallon WM, Melton LJ 3rd：Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism：a 25-year population-based study. Arch Intern Med 158：585-593, 1998
5) Kumasaka N, Sakuma M, Shirato K：Incidence of pulmonary thromboembolism in Japan. Jpn Circ J 63：439-441, 1999
6) 長谷川 淳，長田 博，山内雅夫，村越敏雄，小熊 豊，武井秀昭，村尾 誠：肺血栓・塞栓・梗塞症の疫学（続）．日胸，8：677-681, 1981
7) 佐久間聖仁，高橋 徹，北向 修，白土邦男，中村真潮，矢津卓宏，山田典一，太田雅弘，中野 赳：肺塞栓症頻度の推定　日本病理剖検輯報を用いた検討．Ther Res 23：632-634, 2002
8) Sakuma M, Konno Y, Shirato K：Increasing mortality from pulmonary embolism in Japan, 1951-2000. Jpn Circ J 66：1144-1149, 2002
9) 吉村三郎，柳田純一：突然死の剖検：監察医務よりみた統計的観察．循環科学，1：1328-1332, 1981
10) 村井達哉：急死例よりみた疫学；行政解剖を中心として．Cardiac Prac 3：127-131, 1992
11) 村井達哉：肺動脈血栓塞栓症による突然死に関する研究．平成 5 年度厚生省科学研究費助成金成人病対策総合研究事業，「突然死に関する研究」研究報告書．90-94, 1994
12) 谷藤隆信，景山則正，呂 彩子，濱松晶彦，三澤章吾：致死性肺動脈血栓塞栓症 40 例における下肢深部静脈血栓症の検討：肺動脈血栓塞栓症による突然死の剖検例からの報告．静脈学，14：189-195, 2003
13) 濱松晶彦，谷藤隆信，景山則正，呂 彩子：肺血栓塞栓症の疫学．The Lung perspectives 11：142-148, 2003
14) 森尾比呂志，藤森義治，寺沢公仁子，山田克己，長谷川 修，松尾 哲，尾世川正明：航空機による旅行中に発症した肺塞栓症の 14 例：エコノミークラス症候群．呼と循，48：411-415, 2000
15) 呂 彩子，景山則正，谷藤隆信，濱松晶彦，馬場美年子，中島理加，久 康成，篠塚達雄，村井達哉：下肢外傷後に発症した致死性肺動脈血栓塞栓症 7 例の病理形態学的検討．法医学の実際と研究，45：67-73, 2002
16) 国枝武義：肺動脈血栓塞栓症の疫学－わが国の現状．呼と循，45：325-332, 1997
17) 水上陽真，村井容子，福島保喜，斉木茂樹：高齢者連続剖検 200 例にみられた肺塞栓症．呼と循，24：979-984, 1976
18) 伊東早苗：肺塞栓症の臨床及び病理学的検討．三重医学，25：586-597, 1982
19) 伊藤雅文：肺動脈塞栓症の病理．呼と循，39：567-572, 1991
20) Porter JM, Moneta GL：Reporting standards in venous disease：an update. J Vasc Surg 21：635-645, 1995
21) 景山則正，谷藤隆信，黒須勝美，呂 彩子：肺動脈血栓塞栓症の剖検における下肢深部静脈の検索法：背側からのアプローチ．病理と臨床，20：626-627, 2002
22) 景山則正，谷藤隆信，呂 彩子，濱松晶彦，三澤章吾：致死性肺動脈血栓塞栓症における両側下肢深部静脈の病理形態学的検討．静脈学，14：239-246, 2003
23) 佐久間聖仁，高橋 徹，北向 修，白土邦男：急性肺動脈血栓塞栓症Ⅰ病因と病態 1 疫学．日内会誌，90：193-198, 2001
24) Virchow R：Cellular Pathology as based upon physiological and pathological histology. Churchill, London, p. 197, 1860
25) Rosendaal FR：Venous thrombosis：a multicausual disease. Lancet 353：1167-1173, 1999
26) Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH：Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 369：64-67, 1994
27) Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM：A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 88：3698-3703, 1996
28) Ro A, Hara M, Takada A：The factor V Leiden mutation and the prothrombin G20210A mutation was not found in Japanese patients with pulmonary thromboembolism. Thromb Haemost 82：1769, 1999
29) Zornberg GL, Jick H：Antipsychotic drug use and

risk of first-time idiopathic venous thromboembolism：a case-control study. Lancet 356：1219-1223, 2000
30) Kamijo Y, Soma K, Nagai T, Kurihara K, Ohwada T：Acute massive pulmonary thromboembolism associated with risperidone and conventional phenothiazines. Jpn Circ J 67：46-48, 2003
31) 田中英樹：急性肺血栓塞栓症による突然死. J Cardiol 29：267-275, 1997
32) 呂　彩子，谷藤隆信，景山則正，濱松晶彦，村井達哉：院外発症の肺動脈血栓塞栓症による突然死51例の病理形態学的検討. 脈管学，43：627-632, 2003
33) 應儀成二：周術期肺塞栓症の原因と診断. 呼吸，22：551-554, 2003
34) Geerts WH, Heit JA, Clagett GP, Pineo GF, Colwell CW, Anderson FA Jr, Wheeler HB：Prevention of venous thromboembolism. Chest 119：132S-175S, 2001
35) 中村真潮：本邦ならびに欧米の肺血栓塞栓症予防ガイドライン. 日臨，61：1811-1817, 2003
36) Morpurgo M, Schmid C：Clinico-pathological correlations in pulmonary embolism：a posteriori evaluation. Prog Resp Res 13：8-15, 1980
37) Sevitt S：Organic fragmentation in pulmonary thrombo-emboli. J pathol 122：95-102, 1977
38) Ro A, Kageyama N, Tanifuji T, Kobayashi M, Takada A, Saito K, Murai T：Histopathological study of pulmonary arteries in 14 autopsy cases with massive pulmonary thromboembolism. Legal med 5：s315-s317, 2003
39) 呂　彩子，景山則正，谷藤隆信，濱松晶彦，三澤章吾，村井達哉：肺動脈血栓塞栓症の剖検例における肺動脈・下肢深部静脈の bands & webs 検出頻度の検討. 静脈学，14：31-36, 2003
40) 中村陽一，由谷親夫，今北正美，植田初江，関野考史，飯田一樹，久木良平：肺梗塞発生に至る静脈血栓症および肺血栓塞栓症の病理組織学的研究. 静脈学，7：17-22, 1996
41) 由谷親夫，今北正美，植田初江，葛城充明，羽尾裕之：肺血栓塞栓症：その病理病態像について. 脈管学，33：399-406, 1993
42) 呂　彩子，景山則正，谷藤隆信，村井達哉：剖検にて慢性反復性の経過が示唆された肺動脈血栓塞栓症による突然死の3例. 脈管学，43：20-25, 2003
43) 八巻重雄：臨床家のための肺血管病変肺生検診断. メディカルレビュー，p. 53-57, 2000
44) Wagenvoort CA：Lung biopsies in the differential diagnosis of thromboembolic versus primary pulmonary hypertension. Progress in Respiratory Research,vol 13, Pulmonary Embolism. (Ed) Widimsky J, Karger S, Basel, p. 16-21, 1980
45) 折井正博，新見正則，松本秀年，朝見淳規，白杉　望，北島政樹：再・多発性下肢深部静脈血栓症の病態に関する臨床的研究. 静脈学，3：1-8, 1992
46) 應儀成二：肺血栓塞栓症の塞栓源としての深部静脈血栓症. 循環器科，49：387-391, 2001
47) 秋山芳伸，松本賢治，森末　淳，原田裕久，北島政樹，折井正博：急性肺動脈塞栓症115例の臨床的検討. 脈管学，37：191-195, 1997
48) 景山則正，谷藤隆信，呂　彩子：致死性肺動脈血栓塞栓症33例における下肢深部静脈の組織病理学的検討. 脈管学，42：187-191, 2002
49) 景山則正，谷藤隆信，呂　彩子，濱松晶彦：下肢深部静脈血栓症における静脈弁の病理形態学的検討：致死性肺動脈血栓塞栓症を合併した6剖検例の報告. 脈管学，42：953-960, 2002
50) 應儀成二，金岡　保，前田晃央，森　透，上原美朗，田部俊比古：肺塞栓と下肢深部静脈血栓症の閉塞型. 静脈学，5：211-216, 1994

慶應医学・81(2)：T73～T85，2004

学位論文

マウスバソプレッシンV1a, V1b受容体遺伝子のクローニングと解析

慶應義塾大学医学部小児科学教室
（指導：高橋孝雄教授）
菊池 信太郎

（平成15年11月27日受付）

Key Words：V1a vasopressin receptor, V1b vasopressin receptor, gene, cloning, mouse

アルギニンバソプレッシン（以下AVP）受容体は，AVPに特異的な膜受容体である．様々なAVPの生理作用はこの受容体を介して発現する．1970年代以降，AVP受容体にはそのシグナル伝達機構の違いにより，2つのサブタイプが存在することが明らかになった．腎臓ではcyclic AMP（以下cAMP）依存性シグナル伝達により抗利尿作用が，肝臓ではcAMP非依存性シグナル伝達（イノシトール3リン酸を介するシグナル伝達）によりグリコーゲン分解作用が発現する．このシグナル伝達機構の違いによって，腎臓に存在する受容体はV2受容体，肝臓に存在する受容体はV1受容体と分類された[1,2]．V1受容体はさらに組織分布や種々の薬物（リガンド）に対する反応性の違いにより，V1aとV1bの2種類の受容体に分類される[3,4]．

AVP受容体遺伝子のクローニングについては，ヒトV2受容体遺伝子[5]，ラットV2受容体complementary DNA（以下cDNA）[6]，ヒトおよびラットV1a受容体遺伝子[7~9]，ヒトおよびラットV1a受容体cDNA[10,11]，ヒトおよびラットV1b受容体cDNA[12~14]の報告がある．V2, V1a, V1b受容体遺伝子は，いずれもG蛋白結合型受容体に共通な構造的特徴である7つの細胞膜貫通ドメイン構造を持つ．また，オキシトシン受容体に類似した塩基配列を持つため，オキシトシン受容体サブファミリーとして分類される．この所見は，V2, V1aおよびV1b受容体遺伝子が，古代生物ではオキシトシン受容体と共通の遺伝子から派生したことを示唆する．

V2受容体は腎に特異的に発現する．V2受容体を介し，AVPの主な生理作用である腎集合管における水の再吸収を調節する抗利尿ホルモン作用が発現する[15]．V1a受容体は，血管平滑筋，副腎，膵臓，リンパ組織，タイプIIの肺胞上皮，脳，生殖器，網膜上皮に分布する[7,9]．V1a受容体を介し，血管平滑筋収縮[10,16]，肝臓でのグリコーゲン分解およびグルコースの放出[17]，肝細胞分裂または他の細胞の有糸分裂を惹起する生理作用，血小板での凝集作用[18]，膵臓でのβ細胞からのインスリン分泌調節[19]，副腎での腺細胞からのコルチゾールやアルドステロンの分泌促進が発現すると考えられている[20,21]．V1b受容体は，下垂体，胸腺，心臓，肺，膵臓，副腎，腎臓，精巣に分布する[12,13]．V1b受容体を介し，下垂体前葉におけるadrenocorticotropic hormone（以下ACTH）放出調節作用[13]，脳内における神経伝達物質作用が発現すると考えられている．

腎以外の組織における未知のAVPの生理作用は，V1aまたはV1b受容体を介し発現すると考えられる．血管収縮作用は，イヌおよびラットの尿崩症モデルで血清浸透圧の上昇時および循環血液の減少時に，V1a受容体を介し発現することが明らかにされている[16]．一方，イヌの心不全モデルでは，V1（V1aおよびV1b）受容体選択的アゴニストは平均動脈血圧と末梢血管抵抗を下げ，心拍出量を増大させる作用を発現することが明らかにされている[22]．この成績から，心不全時における血行動態の改善に対するV1受容体選択的アゴニストの有効性が期待されている[22]．また，AVPは神経伝達物質または神経刺激物質として，記憶の形成，社会的発達，精神病発症に関与し[23~26]，これらの作用はV1b受容体遺伝子を介していることがラットを用いた実験から推測さ

本論文は，Kikuchi S, Tanoue A, Goda N, Matsuo N, Tsujimoto G：Structure and sequence of the mouse V1a and V1b vasopressin receptor genes. Jpn J Pharmacol 81：388-392, 1999の一部を含む．

れている．

今回著者は，V1aおよびV1b受容体遺伝子改変動物の作製を目的として，マウスV1aおよびV1b受容体遺伝子の同定と塩基配列の決定を行い，これらの遺伝子を用いた解析を行った．

方　法

1. マウスV1a受容体遺伝子の単離

マウスV1a受容体遺伝子単離において第一製薬株式会社前川啓二博士から供与された，1.5 kbのマウスV1a受容体cDNAフラグメント（Date Accession Number D49729）をプローブとして用いた．ランダムプライマーキット（宝酒造，滋賀）を用い^{32}Pアイソトープでラベルし，これをプローブとして129 SVJマウス肝ゲノムライブラリー（Stratagene, La Jolla, CA, USA）をスクリーニングした．

2. マウスV1b受容体遺伝子の単離

ヒトV1b受容体cDNA[12]を用いて上記のマウス肝ゲノムライブラリーのスクリーニングを行った．陽性クローンが得られなかったため，ヒトおよびラットV1b受容体cDNAと，マウスV1a受容体遺伝子間で相同性が高いと推測される塩基配列部をpolymerase chain reaction（以下PCR）法により増幅し，275 bpのフラグメントを得た．このフラグメントは，塩基配列上ヒトV1b受容体cDNA[12]と90%一致し，ラットV1b受容体cDNA[13]とは96%一致した．このフラグメントをプローブとしてマウス129/Sv-+p+c MgfSJ/J BACライブラリー（ResGen, Huntsville, AL, USA）をスクリーニングした．

3. マウスV1a, V1b受容体遺伝子の構造解析

スクリーニングから得られたクローンについて，種々の制限酵素を用いて制限酵素地図を作製した．また，得られたクローンよりサザンブロット解析によって同定されたエクソン1およびエクソン2に相当する部位をサブクローニングし，それぞれの遺伝子のエクソンと，イントロンの一部の塩基配列を決定した．塩基配列の決定は，dye terminator法を用い，ABI 377 DNA Sequencer（Perkin Elmer, Foster City, CA, USA）によった．

4. V1a, V1b受容体遺伝子の5'上流領域の解析

遺伝子転写機構を明らかにするため，V1a, V1b両受容体遺伝子の5'上流領域の解析を行った．V1a受容体遺伝子では約2 kb, V1b受容体遺伝子では約1.5 kbのプロモーター領域の塩基配列を決定し，V1a, V1b受容体遺伝子の転写開始点をプライマー伸長法により決定した．

第1図　マウスV1a受容体遺伝子5'上流領域の塩基配列．5'上流領域の塩基配列を示す．第1番目のATGコドンを+1とし，非翻訳部位を小文字で，TATA類似モチーフ，Sp-1, NF-κB, PEA3結合配列を下線で示す．第1図で左向きの矢印は，プライマー伸長法に用いたプライマーの塩基配列に相当する．（Kikuchi S et al：Jpn J Pharmacol 81：388-392のFig 3を許可を得て転載）

プライマー伸長法には，3種類のプライマーを用いた（第1図，第2図のprimer 1～3）．それぞれのプライマーを，両受容体遺伝子の翻訳開始部位（ATGコドン）よりも，各々約30塩基下流，100塩基上流，250から300塩基上流に相当する部分に設定し，その5'末端をγ-^{32}P ATPで標識，マウスの肝臓および脳より抽出したRNAと，yeast RNA（対照）を用いプライマー伸長反応を行った．各RNA（数10 μg）と標識したプライマー

```
-1410 tggtgacaag ctcttgcaac cttctgagtg gacataattt cttaaagagt ggtcaacgga
-1350 cacccctagc tcatgaaatg tatcctcaga gaggctagaa gttcagattt agcctggaga
-1290 tgcaaactct atttggaatt tctctaatca cgccagactc ccgggtctag ctccttctat
-1230 catctcctga cacacacccc caggtcgccc agtcacaaat gtcctcactt ttcttctgcc
-1170 tccacagctc caagtaccta tcctaagaaa aatggctgtc acatctggtt ttccagagtc
-1110 ggtttcttca gggcatgctt ctcagccatt tgagatcttt cacacatgcc tagggctccc
-1050 cgcagcagca ctgttgtgtt tgggaagctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc
-990  tctctctctc tgggaagcgc gctctctctc ttccctccct ctctccctct ctctctctct
-930  ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct cacacacaca cacacacaca
-870  cacacacaca cacacacaca cacgcaaact cacctgtcta acgagagttg agggatcagg
-810  atggcagtgt aggtgagttt ggtgctcagt ggatcctggc tgccagaaag agctagcttc
-750  tcgcttctcc tacatttcct tgatcctcct cctctacagt cccacccagc tcctcagccc
-690  ctccctcag taccccctgt ctgaagagag ccactgagtc tcactccacc ctcctctgca
          Ap-2
-630  ggagccaacc gacaagcggc agcctctgga ctaggaatcc aagagcataa aacgctctga
-570  gctgctgcat ctgctcatgc ctgtgttcag tctgctcatg cctgtgttca ccctccggtg
-510  agagcgcggt gggagcacgc cgtggcttgg caggggttcc caattcctgc aggcaccgcc
                                        NF-κB
-450  catggtcctg gacctcacct tcaagacaac ttagaaacgg ctactctctc cgattccaaa
-390  agaaagtttg gacaaagtaa atttggggtg gatttgggag atggcagctg ctccctttgc
-330  ttcctcggtg tcacctctca gaagcccccc cttccaacct cctccaacct tcccatatta
-270  acacccacct cccagcccgc cttttcttcc tttgattccc cagcctctat ggggtcaggg
          Ap-2          Sp-1          Ap-2
-210  atgtcggttc tgctccttac tcctttcgtt ctctctgtcc ctgtctgctg aactatctca
-150  cctgtttcca agccttcact ccaccgtcac ccctcacctc cctttctttcc ctccacctct
-90   aacctttctc tctcactatc caacttctta cttgcaccca caccgtccct ccatccacct
-30   tcccctcctt ctctccctct aaacctaacc ATGGATTCTG AGCCTTCTTG GACTGCTACC
```

第2図　マウス V1b 受容体遺伝子 5' 上流領域の塩基配列．5' 上流領域の塩基配列を示す．第1番目の ATG コドンを+1とし，非翻訳部位を小文字で，TATA 類似モチーフ，Sp-1, NF-κB, Ap-2 結合配列を下線で示す．(Kikuchi S et al：Jpn J Pharmacol 81：388-392 の Fig 3 を許可を得て転載)

（数千カウント）に TE バッファーを加えて 90℃で 10 分間加熱後，緩やかに 37℃に冷却，20 単位の avian myeloblastis virus (AMV) reverse transcriptase (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)，デオキシヌクレオチド3リン酸（最終濃度 0.25 mM）を加え，37℃で1時間ハイブリダイゼーションした．エタノール沈殿させ，熱変性後に 6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した．

5. V1a, V1b 受容体発現細胞の作製

マウス V1a, V1b 受容体遺伝子の機能解析のため，V1a, V1b 受容体安定発現細胞を作製した．

1）発現細胞導入用プラスミドの作製

マウス V1a および V1b 受容体の cDNA を，それぞれのゲノム遺伝子より PCR 法を用いてクローニングした．クローニングに用いたプライマーは以下の通りである．

V1a-1：5'-AATGAATTCATGAGTTTCCCGCGAGGC-3', 80 bp～106 bp)

V1a-2：5'-TCCGGATCCAGTGGAGACAGGGTAAA-3',1323 bp～1348 bp)

V1b-1：5'-CAAGAATTCATGGATTCTGAGCCTTCT-3', 224 bp～250 bp)

V1b-2：5'-AACGGATCCAGAGATGCTGGTCTCCAT-3',1460 bp～1486 bp)

得られた V1a および V1b 受容体 cDNA クローンの塩基配列を直接シークエンサーで確認した．次いで，PCR 法を用い完全長の cDNA を作製し，発現ベクターである pEGFP-N3 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) にサブクローニングし，発現プラスミドを作製した．また，制限酵素消化および塩基配列の決定により，両受容体遺伝子が導入されていることを確認した．

2）発現細胞の作製と解析

V1a または V1b 受容体遺伝子を組み込んだ pEGFP-N3 ベクターを，ヒト腎臓由来の培養細胞 HEK293 にリポフェクタミン (Lipofectamine plus™ reagent, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) を用い遺伝子導入した．導入 72 時間後から Geneticin (G418) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) 500 μg/ml 添加による薬物耐性クローンの選別を行った．抗 green fluorescent protein（以下 GFP）抗体を用いて遺伝子導入した細胞を cell sorting し，GFP の発現量の多いクローンの選別を行った．選別された GFP 融合 V1a および V1b 受容体発現細胞を用い，結合実験，蛍光顕微鏡的検討，Western blot 法により受容体の薬理学的機能，細胞内発現部位，受容体蛋白の発現解析を行った．

結合実験は，1）V1a および V1b 受容体安定発現細胞を細胞重量の 5 倍量の sucrose buffer (Tris-HCl pH7.4, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM sucrose 250 mM, 4℃) で回収，sonication 後 3,000×g で 10 分間遠心分離，2）上清を遠心分離 (35,000 × g, 30 分間) 後，沈渣を Tris-HCl buffer (Tris-HCl pH8.0, 100 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 1 mM 0.1%w/v bovine serum albumin) で再懸濁，膜分画標本を作成，3）調製した膜標本を [^{3}H]AVP(0.2-10nM)に添加，25℃で 1 時間培養後，放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定，4）非特異的結合は 2 μM AVP で測定，飽和曲線を作製後 Scatchard plot 解析により解離定数 (Kd) および最大

結合量（Bmax）を算出，タンパク量をBCA試薬（Pierce, Rockford, Ill., USA）で測定することによった．

V1a, V1b受容体蛋白の細胞内発現部位は蛍光顕微鏡的に検討した．GFPを融合したV1aまたはV1b受容体安定発現細胞をグラスカバーシャーレで培養し，コンフォーカルレーザー顕微鏡（confocal laser-scanning microscope, Olympus IX70）を用いGFPの蛍光を観察した．

Western blot法は以下の手順によった．1）V1aおよびV1b安定発現細胞を氷冷phosphate-buffered saline（PBS）で洗浄，lysis buffer（50 mM Tris, pH7.4 150 mM, NaCl 0.5%, octylphenoxypolyethoxyethanol P-40 1 μg/ml, leupeptin 10 mM, NaF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride）に懸濁，2）30分間氷上に放置し10,000×gで30分間遠心，上清のタンパク量をBCA試薬で測定，1 mg/mlに調製，3）このtotal cell lysateをprotein G sepharose（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA）および抗GFP抗体と4時間インキュベーションし，沈渣をlysis bufferで4回洗浄，4）sample bufferと等量で混合し5分間煮沸後，10%のsodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis（SDS-PAGE）によりタンパク分離，polyvinylidene difluoride（PVDF）膜に転写，5）この膜をBlock Ace（大日本製薬，東京）を用いて室温で1時間blocking，6）抗V1aまたはV1bペプチド抗体と室温で1時間反応後，二次抗体の反応を室温で1時間，二次抗体反応後，ECL kit（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA）を用いて特異的バンドを検出した．

6. マウス組織における結合実験

受容体蛋白の発現量を検討するために，マウス組織（肝臓，海馬，全脳）より膜標本を精製し，ラジオアイソトープ標識の特異的リガンド（^{3}H-AVP）を用いて結合実験を行った．組織膜分画標本の調製は，マウスを頸椎脱臼後肝臓および海馬を摘出し，組織重量の5倍量のsucrose bufferで懸濁した後，発現細胞の結合実験同様に膜標本の作製および結合実験を行った．対照として，マウスV1aおよびV1b cDNAを発現させた細胞を用いた．

7. V1a, V1b受容体mRNAの発現組織解析

マウスV1aおよびV1b受容体mRNAの発現組織をNorthern blot法，reverse transcription-PCR（以下RT-PCR）法で解析し，マウスの中枢神経における発現部位を*in situ* hybridizationで解析した．

1）Northern blot法，RT-PCR法

マウスの種々の組織を用いNorthern blot法，RT-PCR法により解析した．Northern blotには肝臓，腎臓，脳を，RT-PCRには脳，下垂体，心臓，肺，大動脈，肝臓，腎臓，脾臓を用いた．各組織よりtotal RNAを抽出，poly（A$^+$）RNAに精製した．約10 μgのpoly（A$^+$）RNAを用い電気泳動を行い，その後ナイロンメンブレンにブロッティングし，ハイブリダイゼーションを行った．RT-PCRは，total RNAより逆転写酵素を用いてcDNAを作製した．さらに，V1aおよびV1b cDNAに特異的プライマーを用いPCR反応を行い，電気泳動により解析した．

2）*in situ* hybridization

V1aおよびV1b cDNAよりアンチセンスcRNAプローブを作製，マウスの脳切片を用い発現部位の解析を行った．プローブの標識には^{35}S-uridine 5'-triphosphate（UTP）を用い，野村らの方法にしたがった[27]．

結　果

1. マウスV1a受容体遺伝子の単離

約100万個のファージプラークのスクリーニングを行い，2つの異なるクローン（S1, S2）を得た．S1クローンは全長約8kb, S2クローンは約12 kbで，種々の制限酵素処理によって得られた制限酵素地図から，両者は互いに重複しているクローンであった（第3図）．

第3図　マウスV1a受容体遺伝子のゲノム構造．白抜き箱はエクソン，斜線は翻訳部位を示す．エクソン1は323番目までのアミノ酸をコードし，5'上流非翻訳部位を含む．エクソン2は，残りの94個のアミノ酸をコードし，3'非翻訳部位を含む．開始コドンATG，終末コドンTGAを矢印で示す．縦線は制限酵素部位を示す（E, EcoRI；H,HindIII；X,XbaI）．（Kikuchi S et al：Jpn J Pharmacol 81：388-392のFig 1を許可を得て転載）

第4図　マウス V1a 受容体遺伝子の塩基配列．マウスゲノム DNA をヒトゲノム DNA，ラット cDNA と対比して示す．膜貫通ドメイン（第1～第7番目）に相当する塩基配列部位を下線で示す．四角で囲った塩基配列は，各種間で一致している部分である．アミノ酸をコードしている配列を大文字で，非コード部を小文字で示す．（Kikuchi S et al：Jpn J Pharmacol 81：388-392 の Fig 1 を許可を得て転載）

得られたマウスクローンをヒトおよびラット V1a 受容体遺伝子の塩基配列と比較した．両クローンは V1a 受容体遺伝子の第1エクソンおよび第2エクソンを含んでいた．第1エクソンは 5'上流領域から第6膜貫通ドメイン（アミノ酸配列では1番から 329 番目のアミノ酸）をコードしていた．一方，第2エクソンは第7膜貫通ドメインから 3'非翻訳領域（アミノ酸配列では 330 番から 423 番目のアミノ酸）をコードしていた（第4図）．

2. マウス V1b 受容体遺伝子の単離

マウス 129/Sv-+p+c MgfSJ/J BAC ライブラリーのスクリーニングにより1個の陽性クローンを得た．このクローンより Southern blot 法を用い，プローブとハイブリダイズする 14kb の EcoRV 遺伝子断片をプラスミドにサブクローニングした（V1bR クローン）．

第5図　マウス V1b 受容体遺伝子のゲノム構造．白抜き箱はエクソン，斜線は翻訳部位を示す．エクソン1は 311 番目までのアミノ酸をコードし，5'上流非翻訳部位を含む．エクソン2は，残りの 110 個のアミノ酸をコードし，3'非翻訳部位を含む．開始コドン ATG，終末コドン TGA を矢印で示す．縦線は制限酵素部位を示す（E, Eco RI；H,HindIII；X,XbaI）．（Kikuchi S et al：Jpn J Pharmacol 81：388-392 の Fig 2 を許可を得て転載）

第6図　マウスV1b受容体遺伝子の塩基配列と他種との相同性．マウスゲノムDNAをヒトcDNA，ラットcDNAと対比して示す．膜貫通ドメイン（第1〜第7番目）に相当する塩基配列部位を下線で示す．四角で囲った塩基配列は，各種間で一致している部分である．アミノ酸をコードしている配列を大文字で，非コード部を小文字で示す．(Kikuchi S et al：Jpn J Pharmacol 81：388-392のFig 2を許可を得て転載)

このV1bRクローンの制限酵素地図および塩基配列を決定し（第5図），ヒトおよびラットV1b受容体cDNAの塩基配列と比較した．このクローンはV1a受容体遺伝子と同様第1エクソンと第2エクソンを含んでいた．第1エクソンは5'上流領域から第6膜貫通ドメイン（アミノ酸配列では1番から311番目のアミノ酸）をコードし，第2エクソンは，第7膜貫通ドメインから3'非翻訳領域（アミノ酸配列では312番から422番目のアミノ酸）をコードしていた（第6図）．

3. マウスV1a, V1b受容体遺伝子の構造解析

V1a, V1b受容体遺伝子はともに約10 kbの遺伝子で，2つのエクソンと1つのイントロンから構成されていた．V1a受容体遺伝子のイントロンの大きさは約2.3 kbで，V1b受容体遺伝子のイントロンの大きさは約8 kbであった．両者のイントロンは，G蛋白結合型受容体で共通な7回膜貫通ドメイン上，第6番目と7番目の間に位置した．

エクソン－イントロンの結合部および全塩基配列を決定するために，制限酵素地図に基づいて両クローンをサブクローニングした．V1a, V1b受容体の塩基配列および，ラットおよびヒトゲノムDNA，cDNAの塩基配列を第4図，第6図に示す．マウスV1a受容体遺伝子のcoding regionは，ラットおよびヒトV1a受容体遺伝子[7〜9]のcoding regionとそれぞれ90%，82%の相同性を示し，ラットV1b受容体[13,14]，ラットV2受容体遺伝子[6]のcoding regionとそれぞれ58%，53%の相同性を示した．マウスオキシトシン受容体[28]のcoding regionとは61%の相同性を示した．V1b受容体遺伝子のcoding regionは，ラットおよびヒトV1b受容体遺伝子[12〜14]のcoding regionとそれぞれ93%，83%の相同性を示し，ラットV2受容体，マウスオキシトシン受

容体の coding region とは 56%，62%の相同性を示した．

V1a, V1b 受容体遺伝子の塩基配列の相同性は，マウス，ヒト，ラットの異種間で非常に高い．また，オキシトシンファミリーに属する V2 受容体，オキシトシン受容体遺伝子とも高いことが明らかになった．有核細胞のほとんどの遺伝子は，エクソン－イントロン結合部におけるイントロン側の塩基配列が，GT（5' エクソン側）－AG（3' エクソン側）法則に従う[29]．V1a 受容体遺伝子のエクソン－イントロン結合部はこの法則に完全一致したが，V1b 受容体遺伝子の 5' 側エクソン部は，GT の代わりに GC という塩基配列を持っていた（第 6 図）．

4. 5' 上流領域の解析

マウス V1a, V1b 受容体遺伝子の発現および転写調節の解明のため，両遺伝子の 5'上流の 2kb 領域の塩基配列を決定した（第 1 図，第 2 図）．図中の下流向きの矢印は，現在までに報告された転写因子結合部位に類似した塩基配列部位を示す．V1a, V1b 両遺伝子は，遺伝子転写開始部位（ATG コドンの上流約 25～30 bp）の上流領域においても，ATG 上流 1 kb の領域においても，TATA および CCAAT 配列を保有していなかった．ATG コドンの上流 400bp のグアニン（G）とシトシン（C）の含有率は，V1a では 60%，V1b では 52%であった．しかし，両遺伝子は GC ボックスモチーフ（GC box motif）を持たなかった．

コンピューター遺伝子解析プログラムにより，5'上流領域の配列解析を行った．V1a 受容体遺伝子は TATA 類似の配列を－623 および－442 bp に，Sp－1 結合配列[30]を－1212，－1189，－602 bp に保有した．V1b 受容体遺伝子は，Sp－1 結合配列を－454，－255 bp に保有し，TATA 類似の配列を保有しなかった．また，両遺伝子は NF－κB 結合配列を保有し，さらに V1a 受容体遺伝子は PEA－3 を，V1b 受容体遺伝子は AP－2 結合配列を保有した．

プライマー伸長法により，転写開始部位を検討した．V1a 受容体遺伝子は，大きさの異なる複数の DNA フラグメントを保有した．転写開始部位は，プライマーの設定部から ATG 開始コドンの上流約 130, 270, 280, 330, 530, 660, 750 bp に相当すると推測された（第 7 図）．この結果からマウス V1a 受容体遺伝子は複数の転写開始部位を持つと推測された．一方，V1b 受容体遺伝子の解析では，特異的なバンドは検出されなかった．

第 7 図　マウス V1a 受容体遺伝子の転写調節部位の解析（プライマー伸長法）．左端の数値は DNA フラグメントのバンドサイズ（bp）を示す．M はマーカー，mL はマウス肝臓 mRNA，mB はマウス脳 mRNA，yR は yeast RNA（対照）を示す．矢印部は検出された DNA フラグメントと，推測される転写開始塩基位を示す（第 1 番目の ATG コドンを＋1 とした）．

5. V1a, V1b 受容体発現細胞の作製と解析

発現プラスミドにサブクローニングした完全長のマウス V1a および V1b 受容体 cDNA から推定される一次構造と，ヒトおよびラットの同遺伝子から推定される一次構造を比較した．塩基配列より推測されるマウスの受容体蛋白のアミノ酸配列は，ヒトおよびラットに対してそれぞれ 60%の相同性を有していた（第 8 図，第 9 図）．

発現プラスミド（pEGFP-N3）を用い，マウス V1a または V1b 受容体を発現させた細胞での結合実験では，V1a の Kd 値は 1.3±0.2 nM，Bmax は 5700±300 fmol/mg protein（n＝4）で，V1b の Kd 値は 2.1±0.3 nM，Bmax は 1100±250 fmol/mg protein（n＝4）であった．蛍光顕微鏡的観察では，V1a 受容体を発現

第8図　マウスV1a受容体のアミノ酸配列の比較．塩基配列より推定されるマウスV1a受容体のアミノ酸配列を，ヒト，ラットのアミノ酸配列と対比して示す．3種間で一致したアミノ酸を*印で示す．

第9図　マウスV1b受容体のアミノ酸配列の比較．塩基配列より推定されるマウスV1b受容体のアミノ酸配列を，ヒト，ラットのアミノ酸配列と対比して示す．3種間で一致したアミノ酸を*印で示す．

第10図　GFP融合V1a受容体の細胞内局在．マウスV1a受容体遺伝子のカルボキシル基末端にGFP遺伝子を融合し，HEK293細胞に遺伝子導入を行った．遺伝子導入24時間後に，蛍光顕微鏡を用いて細胞膜に発現しているGFPを観察した（×400）．細胞膜に緑色のGFPの蛍光が認められる．

させた細胞の細胞膜に GFP の緑色の蛍光が認められ，受容体蛋白が同部位に優位に発現していた（第 10 図）．V1b 受容体でも同様の結果が得られた．Western blot 解析では，発現させた細胞において GFP，V1a または V1b 受容体に対する特異的抗体に対する蛋白産生が確認された．

6. マウス組織における結合実験

マウス組織（肝臓，海馬，全脳）を用い，[^{3}H]AVP と V1a 受容体との結合実験を行った．肝臓における Kd は 1.0 nM, Bmax は 198.2 fmol/mg protein，海馬における Kd は 0.3 nM, Bmax は 18.1 fmol/mg protein であった．全脳における Kd, Bmax は測定できなかった．

7. V1a, V1b 受容体の発現部位解析

Northern blot 法による解析では，V1a 遺伝子は肝臓に発現していたが，V1b 遺伝子はいずれの臓器においても発現していなかった（データ呈示なし）．RT-PCR 法による解析では，V1a 受容体 mRNA は脳，大動脈，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓において，V1b 受容体 mRNA は下垂体，大動脈，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓において発現していた（第 11 図）．

中枢神経系における V1a および V1b 受容体の発現部位を検討するために，*in situ* hybridization 解析を行った．マウスでは，V1a 受容体 mRNA は視索上核に，V1b 受容体 mRNA は海馬に特異的に発現していた（第 12 図）．

第 11 図　V1a および V1b 受容体発現組織の解析（RT-PCR）．脳（B），下垂体（P），心臓（H），肺（Lu），大動脈（A），肝臓（Li），腎臓（K），脾臓（S）における受容体遺伝子の発現を RT－PCR 法により検出した．V1a 受容体では脳，心臓，肺，大動脈，肝臓，腎臓，脾臓に，V1b 受容体では下垂体，心臓，肺，大動脈，肝臓，腎臓，脾臓に発現が認められた．

第 12 図　V1a および V1b 受容体の脳における局在．*in situ* hybridization 法を用いて，マウス脳における V1a, V1b 受容体の発現部位の局在を観察した．V1a 受容体は視索上核に，V1b 受容体は海馬においてその発現が認められる．

考　察

今回著者は，マウス V1a および V1b 受容体遺伝子をクローニングし，両遺伝子が G 蛋白結合型受容体遺伝子に特徴的な 7 つの膜貫通ドメインに相当する塩基配列を持つ，約 10 kb の遺伝子であることを明らかにした[31]．マウス V1a, V1b 受容体遺伝子は，2 つのエクソン間にそれぞれ全長約 2.3 kb, 8.0 kb のイントロンを有し，そのイントロンは，7 回膜貫通部の第 6 番目と第 7 番目の膜貫通ドメイン間に位置する．V1a, V1b 以外のマウス G 蛋白結合型受容体遺伝子において，V1a および V1b 受容体遺伝子と類似したエクソン－イントロン構造，すなわち第 6 番目と第 7 番目膜貫通部にイントロンが挿入される構造は，V2 受容体とオキシトシン受容体遺伝子においても認められる[5]（第 13 図）．この所見は，マウスのみならずラットとヒトにおいても認められ，マウス，ラット，ヒトの G 蛋白結合型受容体遺伝子が共通の遺伝子から進化してきたことを示唆する．

有核細胞の遺伝子では，エクソン－イントロン結合部の塩基配列は共通性が高い．イントロンの上流側に GT の塩基配列が，イントロンの下流側に AG の塩基配列

第13図　G蛋白結合型受容体におけるイントロン挿入部位の比較．G蛋白結合型受容体におけるイントロン挿入部位の違いを示す．I～VIIは膜貫通ドメイン部を示し，▽はイントロンの位置を示す．数字はイントロンの順番を示す．

が存在する．しかし，マウスV1a受容体遺伝子はこの法則にしたがっていたが，マウスV1b受容体遺伝子はこの法則にしたがっていなかった（イントロン上流側の塩基配列はGTからGCに変わっていた）．この例外はヒトV1b受容体遺伝子にも認められ，ヒトV1a受容体遺伝子はこの法則にしたがうが，ヒトV1b受容体遺伝子はこの法則にしたがわない（イントロンの上流側の塩基配列はGTからGCに変わる）．また，このまれな例外は，ヒトアセチルコリン受容体遺伝子，ヒトペルオキシドジスムターゼ遺伝子などにおいて認められている[32]．しかし，その遺伝子変異の意義は不明である．

マウスV1a, V1b受容体遺伝子の5'上流領域の解析により，両遺伝子は典型的なTATAやCCAATプロモーター配列を持たないこと，Sp-1およびTATA類似の配列を持つこと，また，ATG上流400 bpのグアニンとシトシンの含有率が高いことが明らかにされた．これらの所見は，マウスV1aおよびV1b受容体遺伝子が典型的なハウスキーピング遺伝子である可能性を示唆している[7]．ラットV1a受容体，ヒトV1a受容体，ヒトV2受容体，ラットオキシトシン受容体でも同様に，典型的なTATAおよびCCAATプロモーター配列は認められない[5,9,33]．また，マウスV1a, V1b受容体遺伝子の5'上流領域で認められたSp-1, NF-κB配列は，ラットV1a受容体，ラットオキシトシン受容体でも認められたが，これらの配列が実際にプロモーター活性を有するか否かは不明である[7]．

プライマー伸長法により，マウスV1a, V1b受容体遺伝子の発現解析を行った．V1a受容体遺伝子については，大きさの異なる複数のDNA産物が得られた．この成績は，マウスV1a受容体遺伝子には複数の転写開始配列が存在し，転写を制御するプロモーターが複数存在する可能性を示している．ラットV1a受容体遺伝子でも複数の転写開始部位が想定されている[7]．種差によらずV1a, V1b受容体遺伝子がハウスキーピング遺伝子の特徴を有し，また典型的な遺伝子発現プロモーター配列を持たないことから，V1a, V1b受容体遺伝子は，未知の普遍的生理作用に関与し，生理的状況に応じて柔軟に発現すると推測される．

本研究によりマウスV1aおよびV1b受容体遺伝子をクローニングした後に，マウスの全ゲノムが解明された．その結果，マウスV1a, V1b，V2受容体遺伝子の染色体上の位置は，それぞれ10番，1番，X染色体（ヒトではそれぞれ12番，1番，X染色体）上にあることが判明した．また，今回クローニングしたマウスV1a, V1b受容体遺伝子をもとに，それぞれの受容体遺伝子のノックアウトマウスが作製された[34,35]．それら遺伝子改変動物を用いた研究をはじめとして，V1a, V1b受容体の未知の生理作用に関する研究が進展してきている．

バゾプレッシン受容体の生理作用について解析する場合に，動物種による相違を考慮に入れることは特に重要である．V1a受容体遺伝子発現の組織分布はマウス，ラット，ヒトで異なる．筆者は，マウスV1a受容体mRNAが，RT-PCR解析では，脳，肝臓，腎臓，心臓，肺，大動脈，脾臓で，Northern blot解析では，肝臓のみで発現することを報告した[31]．一方，ラットではV1a受容体mRNAは肝臓，腎臓，脾臓で[8]，ヒトでは腸管膜動脈，腎臓，副腎，大動脈，肝臓[11]，なかでも肝臓で最も強く発現していることが示されている[9]．

V1b受容体遺伝子発現の組織分布も，マウス，ラット，ヒトで異なる．筆者は，マウスV1b受容体mRNAが，下垂体，心臓，肺，大動脈，肝臓，腎臓，脾臓で発現していることを示した[31]．一方，ラットV1b受容体mRNAは，下垂体前葉，小腸，膵臓，腸管膜，膀胱で発現していた[14]．ヒトV1b受容体mRNAは，下垂体，肝臓，心臓，脳，肺，胎盤，骨格筋，膵臓で発現していた[12]．

近年，バゾプレッシンが糖尿病に関与する可能性が示唆されている．上記のように，V1a受容体遺伝子が，マウス，ラット，ヒトのいずれの種においても肝臓で強く発現していることから，V1a受容体を介するバゾプレッシンの生理作用は主に肝臓で発現すると推測される．

ラットでは，バゾプレッシンによる肝グリコーゲン分解およびグルコース放出が報告されており[17]，さらに，糖尿病モデルマウスの肝臓では，V1a 受容体 mRNA の発現が低下することが示されている[36]．

V1b 受容体と糖尿病発症の関連についてもいくつかの知見が集積している．V1b 受容体は，ヒト膵ランゲルハンス島，特にαグルカゴン，βインスリン，ソマトスタチン分泌細胞で発現し[37]，ハムスターα膵細胞ではバゾプレッシンが V1b 受容体を介してグルカゴン分泌を促すこと[37]，マウス膵ランゲルハンス島ではインスリン分泌を促すこと[34]が報告された．以上，V1a, V1b 受容体がともに糖代謝，インスリン分泌に関与していることを示す結果である．ヒト，マウス肝臓におけるバゾプレッシンの生理的作用については未だ不明な点が多く，今後の研究成果が期待される．

中枢神経系におけるバゾプレッシンの未知の生理作用についても研究成果が多く報告されている．本論文で報告したように，マウス V1a 受容体は視索上核で特異的に発現する．Young ら[38]は，V1a 受容体局在の種差がバゾプレッシンの生理作用の種差を招来し，それぞれの種固有の社会行動様式，雄性生殖行動をもたらすことを報告している．今回の成績は，上記報告に矛盾しない．

マウス V1b 受容体については，*in situ* hybridization 解析により海馬に特異的な発現が確認されている[31]．一方，ラットでは，梨状皮質，視索，海馬，視床下部，扁桃体，小脳など広範囲に分布していることが示されている[39,40]．バゾプレッシンは V1b 受容体を介して，ストレス刺激による ACTH の分泌に関与していることが知られているが[13]，V1b 受容体が中枢神経系の広範囲に発現していることを考慮すると，バゾプレッシンは種によって部分的に異なる複数の部位で，神経伝達物質と情動行動に関わる可能性が推測される．また，組織分布およびリガンド親和性の種差は，バゾプレッシンの生理機能の種差の少なくとも一部を証明すると思われる．

バゾプレッシン受容体遺伝子ノックアウトマウスにより，中枢神経系におけるバゾプレッシンの生理作用に関する研究がさらに進展した．V1a 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは，空間記憶が減弱すること[41]，不安行動が減じ，バゾプレッシンの投与による典型的なひっかき行動，身繕い行動が認められないこと[42]などが報告されている．また，V1b 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは，正常マウスに比べて血清 ACTH 値が低値であること，ストレス刺激による ACTH 分泌が減少することから，ACTH 分泌の制御においては，ACTH 放出ホルモン，およびその受容体を介する系よりもバゾプレッシン-V1b 受容体を介する系が中心的役割を果たしていることが示された[35]．さらに，攻撃性の減弱を認めた，とする報告もある[43]．

以上のように，V1a, V1b 受容体遺伝子改変動物は，バゾプレッシンの様々な生理作用の解析，特に哺乳動物の行動解析に有用と思われる．バゾプレッシン受容体の多彩な生理機能の解明により，受容体関連特異的薬物のスクリーニングや，心不全，高血圧，糖尿病，記憶障害などに対する薬物開発が進展すると期待される．

総　括

ヒトにおけるバゾプレッシン受容体サブタイプの機能を解析するため，マウス V1a および V1b 受容体遺伝子改変動物の作製を目的として，両遺伝子をクローニングした．

1. マウス V1a, V1b 遺伝子は，ラット，ヒトにおける同遺伝子と構造上極めて類似していた．
2. マウス V1a, V1b 遺伝子は，遺伝子構造上ハウスキーピング遺伝子の特徴を有していた．
3. マウス V1a 受容体は視索上核に，マウス V1b 受容体は海馬に特異的に発現していた．
4. マウスバゾプレッシン V1a, V1b 受容体ノックアウトマウスの機能解析が今後の重要な課題である．

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小児科学教室松尾宣武教授（現慶応義塾大学医学部小児科学教室名誉教授，国立成育医療センター総長），高橋孝雄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御指導いただきました国立小児病院研究センター分子細胞薬理研究部辻本豪三部長（現京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野教授），田上昭人室長（現国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部部長），ならびに御協力いただきました研究部の諸先生方に感謝申し上げます．

本研究の一部は第 72 回日本薬理学会（1999 年札幌）において発表した．

本研究でクローニングしたマウス V1a および V1b 受容体遺伝子の塩基配列を GenBank に登録した（AB030013, AB030448, AB030449）．

文　献

1) Michell RH, Kirk CJ, Billah MM：Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin.

Biochem Soc Tran 7 : 861-865, 1979
2) Hirasawa A, Nakayama Y, Ishiharada N, Honda K, Saito R, Tsujimoto G, Takano Y, Kamiya H : Evidence for the existence of vasopressin V2 receptor mRNA in rat hippocampus. Biochem Biophys Res Commun 205 : 1702-1706, 1994
3) Buckingham JC : Vasopressin receptors influencing the secretion of ACTH by the rat adenohypophysis. J Endocrinol 113 : 389-396, 1987
4) Antoni FA : Novel ligand specificity of pituitary vasopressin receptors in the rat. Neuroendocrinology 39 : 186-188, 1984
5) Seibold A, Brabet P, Rosenthal W, Birnbaumer M : Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gene. Am J Hum Genet 51 : 1078-1083, 1992
6) Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, Brownstein MJ : Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. Nature 357 : 336-339, 1992
7) Murasawa S, Matsubara H, Kijima K, Maruyama K, Mori Y, Inada M : Structure of the rat V1a vasopressin receptor gene and characterization of its promoter region and complete cDNA sequence of the 3'-end. J Biol Chem 270 : 20042-20050, 1995
8) Morel A, O'Carroll AM, Brownstein MJ, Lolait SJ : Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. Nature 356 : 523-526, 1992
9) Thibonnier M, Graves MK, Wagner MS, Auzan C, Clauser E, Willard HF : Structure, sequence, expression, and chromosomal localization of the human V1a vasopressin receptor gene. Genomics 31 : 327-334, 1996
10) Thibonnier M, Auzan C, Madhun Z, Wilkins P, Berti-Mattera L, Clauser E : Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptor. J Biol Chem 269 : 3304-3310, 1994
11) Hirasawa A, Shibata K, Kotosai K, Tsujimoto G : Cloning, functional expression and tissue distribution of human cDNA for the vascular-type vasopressin receptor. Biochem Biophys Res Commun 203 : 72-79, 1994
12) Sugimoto T, Saito M, Mochizuki S, Watanabe Y, Hashimoto S, Kawashima H : Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. J Biol Chem 269 : 27088-27092, 1994
13) Lolait SJ, O'Carroll AM, Mahan LC, Felder CC, Button DC, Young WS 3rd, Mezey E, Brownstein MJ : Extr apituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene. Proc Natl Acad Sci USA 92 : 6783-6787, 1995
14) Saito M, Sugimoto T, Tahara A, Kawashima H : Molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor : evidence for its expression in extra-pituitary tissues. Biochem Biophys Res Commun 212 : 751-757, 1995
15) Handler JS, Orloff J : Antidiuretic hormone. Annu Rev Physiol 43 : 611-24, 1981
16) Laszlo FA, Laszlo F Jr, De Wied D : Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. Pharmacol Rev 43 : 73-108, 1991
17) Hems DA, Rodrigues LM, Whitton PD : Glycogen phosphorylase, glucose output and vasoconstriction in the perfused rat liver. Biochem J 160 : 367-374, 1976
18) Haslam RJ, Rosson GM : Aggregation of human blood platelets by vasopressin. Am J Physiol 223 : 958-967, 1972
19) Dunning BE, Moltz JH, Fawcett CP : Actions of neurohypophysial peptides on pancreatic hormone release. Am J Physiol 246 : E108-114, 1984
20) Perraudin V, Delarue C, Lefebvre H, Contesse V, Kuhn JM, Vaudry H : Vasopressin stimulates cortisol secretion from human adrenocortical tissue through activation of V1 receptors. J Clin Endocrinol Metab 76 : 1522-1528, 1993
21) Enyedi P, Balla T, Antoni FA, Spat A : Effect of angiotensin II and arginine vasopressin on aldosterone production and phosphoinositide turnover in rat adrenal glomerulosa cells. J Mol Endocrinol 1 : 117-124, 1988
22) Naitoh M, Suzuki H, Murakami M, Matsumoto A, Arakawa K, Ichihara A, Nakamoto H, Oka K, Yamamura Y, Saruta T : Effects of oral AVP receptor antagonists OPC-21268 and OPC-31260 on congestive heart failure in conscious dogs. Am J Physiol 267 (6 Pt 2) : H2245-H2254, 1994
23) Gash D, Herman J, Thomas G : Vasopressin and animal behavior. Vasopressin. (Ed) Gash D, Boer GJ, Plenum Press, New York, p.517-547, 1987
24) Dantzer R, Bluthe RM : Vasopressin and behavior : from memory to olfaction. Regul Pept 45 : 121-125, 1993
25) Insel TR, Winslow JT, Williams JR, Hastings N, Shapiro LE, Carter CS : The role of neurohypophyseal peptides in the central mediation of complex social processes-evidence from comparative studies. Regul Pept 45 : 127-131, 1993
26) Legros JJ, Ansseau M, Timsit-Berthier M : Neurohy pophyseal peptides and psychiatric diseases. Regul Pept 45 : 133-138, 1993
27) 野村慎太郎：in situ ハイブリダイゼーション 1 cRNA プローブを用いる方法．細胞工学ハンドブック（黒木登志夫編集）．鍬谷書店．p214-221, 1992
28) Kubota Y, Kimura T, Hashimoto K, Tokugawa Y, Nobunaga K, Azuma C, Saji F, Murata Y : Structure and expression of the mouse oxytocin receptor gene. Mol Cell Endocrino 124 : 25-32, 1996

29) Francois J : The apparatus for nuclear splicing. GENES 5. (Ed) Benjamin L, Oxford University Press, New York, p.911- 916, 1994
30) Dynan WS, Tjian R : Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. Nature 316 : 774-778, 1985
31) Kikuchi S, Tanoue A, Goda N, Matsuo N, Tsujimoto G : Structure and sequence of the Mouse V1a and V1b vasopressin receptor genes. Jpn J Pharmacol 81 : 388-392, 1999
32) Amin KM, Scarpa AL, Winkelmann JC, Curtis PJ, Forget BG : The exon-intron organization of the human erythroid beta-spectrin gene. Genomics 18 : 118-125, 1993
33) Rozen F, Russo C, Banville D, Zingg HH : Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor gene. Proc Natl Acad Sci USA 92 : 200-204, 1995
34) Oshikawa S, Tanoue A, Koshimizu T, Kitagawa Y, Tsujimoto G : Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors : A combined pharmacological/knockout approach. Mol Pharmacol (in press)
35) Tanoue A, Ito S, Honda K, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu TA, Mori T, Tsujimoto G : The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. J Clin Invest 113 : 302-309, 2004
36) Morita M, Kita Y, Morikawa N, Iwami M, Notsu Y : Expression of arginine vasopressin and vasopressin V1a receptor mRNA in diabetic (db/db) mice. Exp Clin Endocrinol Diabetes 109, 261-266, 2001
37) Folny V, Raufaste D, Lukovic L, Pouzet B, Rochard P, Pascal M, Serradeil-Le Gal C : Pancreatic vasopressin V1b receptors : characterization in In-R1-G9 cells and localization in human pancreas. Am J Physiol Endocrinol Metab 285, E566-E576, 2003
38) Young LJ, Nilsen R, Waymire KG, MacGregor GR, Insel TR : Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from a monogamous vole. Nature 400 : 766-768, 1999
39) Vaccari C, Lolait SJ, Ostrowski NL : Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. Endocrinology 139 : 5015-5033, 1998
40) Hernando F, Schoots O, Lolait SJ, Burbach JP : Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland : anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. Endocrinology 142 : 1659-1668, 2001
41) Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, Mishima K, Fukue Y, Takano Y, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M : V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. 356 : 195-198, 2004
42) Bielsky IF, Hu SB, Szegda KL, Westphal H, Young LJ : Profound Impairment in Social Recognition and Reduction in Anxiety-Like Behavior in Vasopressin V1a Receptor Knockout Mice. Neuropsychopharmacology 26 (advance online publication), 2003
43) Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll AM, Lolait SJ, Young WS 3rd : Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. Mol Psychiatry 7 : 975-984, 2002

慶應医学・81(2)：T87～T100，2004

学位論文

子宮体癌におけるDNAミスマッチ修復遺伝子異常とマイクロサテライト不安定性の解析

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
（指導：野澤志朗教授）
阪埜浩司（ばんのこうじ）

（平成15年12月15日受付）

Key Words：Revised Amsterdam Criteria, DNA mismatch repair gene, *hMLH1*, *hMSH2*, Microsatellite instability

婦人科悪性腫瘍の中で子宮体癌は生活様式の欧米化と環境の変遷に伴い近年増加の一途をたどり，我が国においても子宮癌全体の約40%に迫る勢いである．本邦において罹患実数および罹患率ともに増加傾向にあり，国際的にもさらに増加が予想されている．しかしながら，その発癌機構，進展形式はいまなお不明な点が多いのも事実である．以前より，子宮体癌では肥満や高エストロゲン状態などといった環境因子がその発癌に重要な役割を担っていると考えられていた．しかし，その一方で，子宮体癌患者には重複癌が多いこと，子宮体癌患者に家系内に癌集積性が認められる事実から，その発癌に環境因子ばかりではなく遺伝的素因も密接に関与していることが推測されていた．近年，家族性腫瘍である遺伝性非ポリポーシス大腸癌（hereditary nonpolyposis colorectal cancer；HNPCC）の女性患者において，高率に子宮体癌が合併する事実が明らかとなり，家族性腫瘍としての子宮体癌が存在することが明らかとなってきた．

HNPCCは，1971年にLynchによりその概念が提唱された疾患で[1]，近年，分子遺伝学的にその病態の解析が進んでいる常染色体優性遺伝形式をとる家族性腫瘍の一つである[2]．1990年にはHNPCCのInternational Collaborative Group (ICG)-HNPCCにより，①家系内に3名以上組織学的に確認された大腸癌患者がおり，そのうち1人は他の2名に対し第一度近親者であること，②大腸癌の発生が2世代にわたること，③少なくとも1人は50歳未満で大腸癌と診断されていることという古典的アムステルダムクライテリアといわれるHNPCCの臨床診断基準が示された[3]．

その後，1999年のICG-HNPCCにおいてアムステルダムクライテリアが改訂され新アムステルダムクライテリア（アムステルダムクライテリアII）が成立した[4]（第1表）．この新アムステルダムクライテリアでは，それまで大腸癌のみが診断基準の対象癌であったのに加え，子宮体癌，小腸癌，尿管癌，腎臓癌などもHNPCC関連腫瘍として診断の対象癌として含まれるように改訂された．この改訂により，子宮体癌の一部に家族性腫瘍として発症する症例が存在することが初めて国際的にも認識された．

また，1993年にはこのHNPCCの原因遺伝子がDNAミスマッチ修復（DNA mismatch repair；MMR）酵素をコードする遺伝子であることが判明した．この事実より，子宮体癌の一部はHNPCC同様のMMR遺伝子異常により発生すると推測され，子宮体癌の原因遺伝子の候補として特にMMR遺伝子群が注目されてきた．

細胞におけるDNAの突然変異は放射線や変異原物質などの外的因子の影響ばかりでなく，細胞自身のDNA

本論文は，Banno K, Susumu N, Hirao T, Yanokura M, Hirasawa A, Aoki D, Udagawa Y, Sugano K, Nozawa S：Identification of germline *MSH2* gene mutations in endometrial cancer patients not fulfilling the new clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer Gent Cytogenet 146：58-65, 2003の一部，および阪埜浩司，進　伸幸，平尾　健，岩田　卓，平澤　晃，青木大輔，野澤志朗：遺伝性非腺腫症性大腸癌（HNPCC）と子宮内膜癌．家族性腫瘍 3：62-67, 2003の一部を含む

第1表　HNPCCの臨床診断基準

Amsterdam Minimum Criteria (1990)
1. At least 3 colorectal cancer in relatives (pathological verified)
2. One is a first degree relative of other two
3. At least two successive generations should be affected
4. One colorectal cancer diagnosed before the age of 50 years
5. FAP should be excluded

Revised Amsterdam criteria II (1999)
1. At least 3 relatives with an HNPCC-associated cancer (cancer of colorectum, endometrium, small bowel, ureter or renal pelvis)
2-5: same

1999年の改訂により子宮体癌を含む4種の癌がHNPCC関連腫瘍として診断の対象癌として追加された．（阪埜浩司，他：家族性腫瘍，3：62-67, 2003の表1より許可を得て転載）

複製時のエラーによっても生じることが知られている．このようなDNAの変異は蓄積すると細胞に癌化などの重大な変化を引き起こすと推測されている．DNA修復機構とはこのような細胞に生じたDNAの変異を細胞自身が取り除き修復させる機構である．細胞におけるDNAの修復には様々機構が存在すると考えられており，その一つがDNA複製時のエラーを検出し，修復を行うDNAミスマッチ修復（MMR）機構である．この機構を担うのはDNAミスマッチ修復酵素（MMR enzyme）群とよばれる蛋白である．MMR遺伝子の解析は大腸菌で最も歴史が長く，以前よりMut S, Mut Lなどの MMR遺伝子が同定されていた．その後，これらの遺伝子が種を越えて保存されている事実がわかり，現在までに6種のMMR遺伝子（*hMSH2*, hMLH1, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2*）が同定され，このMMR遺伝子こそがHNPCCの原因遺伝子であることが明らかとされている[5]．ヒトにおいてこれらのMMR蛋白は複合体を形成し機能すると推測されている．DNA複製時に生じた塩基のミスマッチを*hMSH2*蛋白が認識し，他のMMR蛋白と複合体を形成し修復を行う．その際，1および2塩基のミスマッチに対しては*hMSH2*蛋白とhMSH6蛋白の複合体が，2から4塩基の欠損，挿入には*hMSH2*蛋白とhMSH3蛋白の複合体が認識する．さらにhMLH1蛋白やhPMS2蛋白と結合しDNAの修復が行われると考えられている[6]．

MMR遺伝子に異常があると，DNA複製時に生じた塩基のミスマッチを正しく修復することができず，長さの異なったDNA鎖が生じることになる．この現象は，ヒトゲノムの中の数塩基を1単位とする繰り返し配列の連続領域に特に生じやすく，マイクロサテライト不安定性（Microsatellite insyability；MSI）と呼ばれる．MSIが生じると発癌に関与する標的遺伝子異常の発生頻度が上昇し，その結果として細胞が癌化すると想定されている．このMSIは全大腸癌の約15%程度に認められている．このMSI陽性大腸癌の約25%程度に家族性腫瘍であるHNPCCが存在していると推測されており，MSI解析はHNPCCの有用なスクリーニング法として期待されている．6種のMMR遺伝子の中でも第3番染色体短腕の*hMLH1*遺伝子と第2番染色体短腕の*hMSH2*遺伝子の生殖細胞変異がHNPCCの原因の大部分（約60%）を占めると考えられているが，遺伝性腫瘍としての子宮体癌においても同様の機構や遺伝子異常がどの程度関与しているかについてはいまだ不明である．MMR機構異常の標的癌関連遺伝子の候補としては，現在までHNPCCにおいて細胞増殖抑制に関与する*TGF-βtypeIIR*遺伝子やアポトーシス誘導に関与する*BAX*遺伝子などが報告されている[7,8]．これら遺伝子以外にも標的遺伝子の候補としては，*E2F*遺伝子[9] *MSH3*[10]，*TCF-4*遺伝子[11]などの報告もあるが，子宮体癌における遺伝子異常の頻度はどれも低く，臓器によって発癌に関与するMMR機構異常の標的遺伝子が異なり子宮体癌独特の標的遺伝子が存在する可能性も示唆されている．

HNPCCと同様の発癌機構により生じる子宮体癌には，通常の子宮体癌の自然史とは異なる発癌機構と，独特な生物学的特性の存在が推測される．すでにHNPCCに関しては，北欧諸国や米国を中心に国家レベルでの多施設共同研究のための組織が構築され，質の高いデータの蓄積が進み[12~18]，全大腸癌の約5%程度にHNPCCが存在すると推測されている．さらにHNPCCに関しては臨床病理学的に①若年発症である，②右側大腸に好発する，③低分化腺癌，粘液性腺癌が多い，④予後が良好である，等の特徴が明らかとされている．これに対し，家

族性腫瘍としての子宮体癌に関する解析は世界的にも報告が極めて少なく，遺伝浸透率も含めその病態や臨床病理学的特徴は全く不明である．家族性腫瘍としての子宮体癌の病態解明には我が国における疾患の頻度や家族歴といった詳細な疫学的調査のみならず，分子レベルの病態機構の解析，いわゆる分子疫学的解析が不可欠と考えられる．

本研究では，HNPCC の関連腫瘍としての視点で子宮体癌をとらえ，家族性腫瘍としての子宮体癌の病態を我が国で初めて分子疫学的に解析することを目的とした．当科にて 1991 年?2002 年の間に治療を行った子宮体癌 385 例に対し，詳細な家族歴，既往歴等の疫学的調査を実施した．さらに，その中で同意を得られた 39 例に対し，DNA ミスマッチ修復（MMR）遺伝子である *hMLH1* 遺伝子と *hMSH2* 遺伝子の異常に着目し MSI 解析を含む分子生物学的解析を実施し，家族性腫瘍としての子宮体癌の病態と MMR 遺伝子異常の関連性を検討した．

本研究は，文部科学省ら 3 省庁合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」，8 学会合同の「遺伝学検査に関するガイドライン（案）」および家族性腫瘍研究会の「家族性腫瘍における遺伝子診断研究とこれを応用した診療に関するガイドライン」を遵守して実施した．本研究計画は施設内倫理委員会にて審査され，承認を受けている．

実験方法

1. 子宮体癌症例における家系調査および既往歴調査

慶應義塾大学病院産婦人科において 1991 年から 2002 年までの間に治療を実施した子宮体癌患者 385 例より，同意を得た上で詳細な家族歴・既往歴を面接により聴取した．発端者から第 3 度近親者までの血縁者について，性別・悪性腫瘍の罹患部位および罹患年齢・現年齢・生存期間等について調査した．ただし，不確定な内容は除外し家系図を作成した．家族性腫瘍である HNPCC の新アムステルダムクライテリアを満たす症例を子宮体癌 385 例から抽出し，子宮体癌における家族性腫瘍の頻度を調査した．

2. 子宮体癌組織および正常組織からの DNA の抽出

患者の同意のもと，当科にて手術的に摘出した子宮体癌組織 39 例を無菌的に液体窒素中に保存した．また正常組織は，同一症例の末梢血を採取し，ロイコプレップを用いて白血球を単離し，マイナス 20℃で保存した．DNA の抽出については，子宮体癌組織および末梢血中の白血球を Proteinase K で処理した後，SS-phenol/chloroform にてフェノール抽出し，3M 酢酸ナトリウムおよびエタノールを加えて DNA を沈殿させ，ペレットを乾燥させた後 TE buffer に溶解し 4℃で保存し実験に使用した．

3. マイクロサテライト不安定性（MSI）解析

同意が得られた子宮体癌 39 例において，末梢血から抽出した DNA と子宮体癌組織から抽出した DNA を，それぞれ *D2S123*・*D3S1284*・*D5S404*・*D9S162*・*hMSH2 intron12* の 5 領域で PCR 増幅した（第 2 表）．*D2S123*・*D3S1284*・*D5S404*・*D9S162* は CA リピートを含むマイクロサテライト領域である．プライマーは Research Genetics 社製のものを使用し，アンチセンス鎖用のプライマーの 5' 端を Cy5 amidite (indodicarbocyanine) で蛍光標識した．PCR では，Taq Polymerase および buffer はすべて Parkin Elmer 社の ampliTaq を用いて，以下のプロトコールで実験を行った．*D2S123*・*D3S1284*・*D5S404*・*D9S162* に関しては，Premixture 液 24 μl（蒸留水 16.125 μl, 1.25 mM dNTP 4 μl, 10×buffer 2.5 μl, OD2.2 forward Primer 0.625 μl, OD2.2 Reverse Primer 0.625 μl, Taq

第 2 表　マイクロサテライトマーカーのプライマー配列

Locus	Forward primer Sequence	Reverse primer Sequence	Size (bp)
D2S123	5'AAACAGGATGCCTGCCTTTA 3'	5'GGACTTTCCACCTATGGGAC 3'	197-227
D3S1284	5'GGAATTACAGGCCACTGCTC 3'	5'GGAATTACAGGCCACTGCTC 3'	155-177
D5S404	5'GATCACCACATTCCACCTAAT 3'	5'GATCACCACATTCCACCTAAT 3'	180-198
D9S162	5'GCAATGACTTAAGGTTC C'	5'GCAATGACCAGTTAAGGTTC 3'	172-196
hMSH2 intron12	5'GATGTTCCACATCATTACTG 3'	5'GTGGTTCCACATCATTACTG 3'	182

実験に使用した 5 種のマイクロサテライトマーカーのプライマー配列とその PCR 産物を示す．*hMSH2 intron12* はモノヌクレオチドマーカー，それ以外の 4 種のマーカーはダイヌクレオチドマーカーである．(Banno K et al : Cancer Genet Cytogenet 146 : 58-65, 2003 の Table1 より許可を得て転載)

Polymerase 0.125 μl）に 0.1 μg/μl の検体 DNA（鋳型）1 μl を加えて計 25 μl とし，95℃5 分で一本鎖に解離させた後，95℃30 秒，55℃40 秒，72℃40 秒を計 40 サイクル行って増幅し，更に 72℃で 7 分加熱した後 4℃に冷却し保存した．

hMSH2 intron12 は，PolyA 配列を含むマイクロサテライト領域であり，プライマーは，DNA 合成機にて作成し，センスおよびアンチセンス鎖用のプライマーの 5'端を Cy5 amidite（indodicarbocyanine）で蛍光標識した．PCR 条件は，Premixture 液 24 μl（蒸留水 16.125 μl，1.25 mM dNTP 4 μl，10 × buffer 2.5 μl，OD2.2 forward Primer 0.625 μl，OD2.2 Reverse Primer 0.625 μl，Taq Polymerase 0.125 μl）に 0.1 μg/μl 検体 DNA（鋳型）1 μl を加えて計 25 μl とし，95℃5 分で一本鎖に解離させた後，95℃30 秒，55℃40 秒，72℃40 秒を計 40 サイクル行って増幅し，更に 72℃で 7 分加熱した後 4℃に冷却して保存した．

マイクロサテライト領域の複製エラーをみるため，*D2S123・D3S1284・D5S404・D9S162* については増幅 DNA をホルムアミド変性後 7 M 尿素入り 8%アクリルアミドゲルを用いて ALFred DNA Sequencer（Pharmacia）で電気泳動し，正常組織（白血球）由来 DNA と子宮体癌組織由来 DNA の各領域の波形の違いを比較した．泳動結果の解析には，同社の解析ソフトウェア，Fragment manager を用いた．*hMSH2 intron12* については増幅 DNA をホルムアミド変性後 12%アクリルアミドゲルを用いて ALFred DNA Sequencer で電気泳動し，正常組織（白血球）由来 DNA と子宮体癌組織由来 DNA の波形の違いを比較した．泳動結果の解析には同様に Fragment manager を用いた．

以上のように 1 症例につき最大 5 種のマイクロサテライト領域においてマイクロサテライト不安定性（MSI）を解析し，1 領域でも複製エラーを認めたものは MSI 陽性（MSI+）と判定した．解析したすべての領域で複製エラーを認めない症例は MSI 陰性（Microsatellite stability；MSS または MSI-）と判定した．

4. MSI 陽性子宮体癌と臨床病理学的情報との関連性の検討

MSI 陽性子宮体癌と MSI 陰性子宮体癌において発症年齢，分化度，臨床進行期，重複癌の有無の各事項について統計学的手法（Fisher の直接確率計算法）を用いて関連性があるか検討した．更に予後との相関を解析するために生存率に差異があるかについて検討した．

5. 免疫組織化学的解析

MSI 解析を実施した子宮体癌 39 例中同意の得られた 28 例の子宮体癌手術検体パラフィン包埋ブロックを使用し，MMR 遺伝子がコードする hMLH1 および hMSH2 蛋白の発現を抗体による免疫組織化学染色により解析した．

ホルマリン固定された子宮体癌部を含むパラフィン包埋ブロックを 3 μm に薄切し，スライドガラスに貼り付けた後 60℃で一晩乾燥させた．キシレンにて 15 分間脱パラフィンし，100%エタノールより段階的に脱キシレン処理後，クエン酸バッファー（pH 7.0）により 121℃10 分間オートクレーブ処理し抗原性の賦活化を行った．さらに内因性ペルオキシダーゼ活性除去のため PBS に溶解した 3% H_2O_2 にて室温で 5 分間インキュベートした後，一次抗体と反応させた．hMLH1 蛋白と hMSH2 蛋白に対する一次抗体として抗 hMLH1 抗体（G168-15, Pharmingen 社，San Diego CA, USA）と抗 hMSH2 抗体（Polyclonal, Santa Crutz Biotechnology 社，CA, USA）をそれぞれ 30 倍，300 倍に希釈して実験に用いた．

染色は Vectastain ABC kit（Vector Laboratories 社，Burlingame CA,USA）を使用し，diaminobenzidine（SIGMA 社，St.Louis MO, USA）で発色させた．PBS で洗浄後，Mayer heatoxyline にて核染色を行った．

免疫組織化学的解析は 1 症例あたり複数回実施し，周囲の正常子宮内膜腺や間質細胞の核の染色性をインターナルコントロールとして子宮体癌部の染色性を評価し，陽性または陰性と判定した．hMLH1 蛋白および hMSH2 蛋白と MSI との関連性を統計学的に解析した（Fisher の直接確率計算法）．

6. *hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異解析（PCR-SSCP 法）

12 例の MSI 陽性症例については HNPCC の主な原因遺伝子とされる MMR 遺伝子の *hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子について生殖細胞変異の有無を PCR-SSCP 法にて検査した．本実験は施設内倫理委員会にて審査され，承認の後に，十分な説明と書面による同意のもと実施された．*hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子の各エクソンについてプライマーを作成し，末梢血白血球由来 DNA をそれぞれ PCR 増幅した．Premixture 液 24 μl（蒸留水 16.125 μl，1.25 mM dNTP 4 μl，10× buffer 2.5 μl，OD2.2 forward Primer 0.625 μl，OD2.2 Reverse Primer 0.625 μl，Taq Polymerase 0.125 μl）

第3表　*hMSH2* 遺伝子の PCR-SSCP 解析用の電気泳動条件

Exon	Time (h)	Water temperature (℃)
1	4	18
2	4	18
3	6	18
4	4	18
5	3	18
6	4	18
7	4	18
8	3	18
9	4	18
10	10	10
11	3	18
12	4	18
13	6	10
14	4	16
15	4	16
16	4	16

hMSH2 遺伝子の各エクソンごとの電気泳動時間と温度条件を示す．(Banno K et al：Cancer Genet Cytogenet 146：58-65, 2003 の Table 2 より許可を得て転載)

Primer sequences for *hMSH2*

	Sense primer sequence		Antisense primer sequence		Size of PCR products (bp)
Exon1	1a	5' [illegible] 3'	1b	5' [illegible] 3'	285
Exon2	2a	5' [illegible] 3'	2b	5' [illegible] 3'	227
Exon3	3a	5' [illegible] 3'	3b	5' [illegible] 3'	265
Exon4	4a	5' [illegible] 3'	4b	5' [illegible] 3'	276
Exon5	5a	5' [illegible] 3'	5b	5' [illegible] 3'	246
Exon6	6a	5' [illegible] 3'	6b	5' [illegible] 3'	214
Exon7	7a	5' [illegible] 3'	7b	5' [illegible] 3'	246
Exon8	8a	5' [illegible] 3'	8b	5' [illegible] 3'	260
Exon9	9a	5' [illegible] 3'	9b	5' [illegible] 3'	179
Exon10	10a	5' [illegible] 3'	10b	5' [illegible] 3'	235
Exon11	11a	5' [illegible] 3'	11b	5' [illegible] 3'	164
Exon12	12a	5' [illegible] 3'	12b	5' [illegible] 3'	325
Exon13	13a	5' [illegible] 3'	13b	5' [illegible] 3'	255
Exon14	14a	5' [illegible] 3'	14b	5' [illegible] 3'	307
Exon15	15a	5' [illegible] 3'	15b	5' [illegible] 3'	232
Exon16	16a	5' [illegible] 3'	16b	5' [illegible] 3'	346

Primer sequences for *hMLH1*

	Sense primer sequence		Antisense primer sequence		Size of PCR products (bp)
Exon1	1a	5' [illegible] 3'	1b	5' [illegible] 3'	195
Exon2	2a	5' [illegible] 3'	2b	5' [illegible] 3'	192
Exon3	3a	5' [illegible] 3'	3b	5' [illegible] 3'	231
Exon4	4a	5' [illegible] 3'	4b	5' [illegible] 3'	231
Exon5	5a	5' [illegible] 3'	5b	5' [illegible] 3'	198
Exon6	6a	5' [illegible] 3'	6b	5' [illegible] 3'	262
Exon7	7a	5' [illegible] 3'	7b	5' [illegible] 3'	179
Exon8	8a	5' [illegible] 3'	8b	5' [illegible] 3'	177
Exon9	9a	5' [illegible] 3'	9b	5' [illegible] 3'	214
Exon10	10a	5' [illegible] 3'	10b	5' [illegible] 3'	232
Exon11	11a	5' [illegible] 3'	11b	5' [illegible] 3'	231
Exon12	12a	5' [illegible] 3'	12b	5' [illegible] 3'	474
	12b	5' [illegible] 3'	12a	5' [illegible] 3'	240/300
Exon13	13a	5' [illegible] 3'	13b	5' [illegible] 3'	289
Exon14	14a	5' [illegible] 3'	14b	5' [illegible] 3'	214
Exon15	15a	5' [illegible] 3'	15b	5' [illegible] 3'	175
Exon16	16a	5' [illegible] 3'	16b	5' [illegible] 3'	278
Exon17	17a	5' [illegible] 3'	17b	5' [illegible] 3'	168
Exon18	18a	5' [illegible] 3'	18b	5' [illegible] 3'	202
Exon19	19a	5' [illegible] 3'	19b	5' [illegible] 3'	259

*First PCR 12a 12b　Second PCR 12a 12b

第1図　*hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の DNA 構造とプライマー配列．上段に DNA 構造を，下段にシークエンス用のプライマー配列を示す。*hMSH2* 遺伝子は 16 のエクソンから，*hMLH1* 遺伝子は 19 のエクソンから構成されている．(Banno K et al：Cancer Genet Cytogenet 146：58-65, 2003のFig 1 より許可を得て転載)

に 0.1 μg/μl 検体 DNA（鋳型）1 μl を加えて計 25 μl とし，95℃5 分で一本鎖に解離させた後，95℃30 秒，55℃30 秒，72℃30 秒を計 35 サイクル行って増幅し，更に 72℃で 7 分加熱した後 4℃に下げて保存した．

hMLH1 遺伝子の各エクソンの PCR 増幅産物は 7.5 %アクリルアミドゲル（AA：BIS＝30：1, 10×Tris-Glycine）内を電圧 200V, 15℃下で 2 時間電気泳動したのち銀染色して異常バンドの出現を解析した．*hMSH2* 遺伝子についても各エクソンの PCR 増幅産物は 10%アクリルアミドゲル（AA：BIS＝30：1, 10×Tris-Glycine）内を電気泳動した後，銀染色して異常バンドの出現を解析した．ただし *hMSH2* 遺伝子についてはエクソンごとの泳動温度・時間が異なるため，第 3 表の条件で電気泳動を実施した．

7. *hMLH1* 遺伝子および hMSH2 遺伝子の生殖細胞変異の検出

上記の PCR-SSCP 法にて異常バンドが検出されたエクソン部位についてはオートシークエンサーにて DNA 塩基配列を解析し，*hMLH1* 遺伝子および hMSH2 遺伝子の既知の正常配列と比較することにより，*hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を検出した（第 1 図）．検出された生殖細胞変異が機能的変異として報告されているかについて，文献検索および遺伝子変異のデータベース上の登録の有無を調査した．

本研究は，文部科学省ら 3 省庁合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」，8 学会合同の「遺伝学検査に関するガイドライン（案）」および家族性腫瘍研究会の「家族性腫瘍における遺伝子診断研究とこれを応用した診療に関するガイドライン」を遵守して実施した．

結　果

1. 新アムステルダムクライテリアをみたす家族性子宮体癌症例の頻度

我々は，当院にて 1991 年 2002 年の間に子宮体癌治療を行った 385 例に対し，詳細な家族歴，既往歴の調

第2図　新アムステルダムクライテリアを満たす症例Aの家系図．↗は発端者である子宮体癌症例である．○は女性，□は男性を示す．◐およびEnは子宮体癌，◔およびCCは大腸癌，◕はその他の癌腫を示す（Gは胃癌，Proは前立腺癌，Heは肝臓癌，Cxは子宮頸癌，Btは脳腫瘍，Laは喉頭癌を表す）．数字は診断時の年齢を示す．斜線は死亡した家系構成員を表す．左のローマ数字は世代を表す．発端者を含め，第一度近親者以内に5例のHNPCC関連腫瘍を認めた．母親も子宮体癌と大腸癌の重複癌症例であった．（阪埜浩司，他：家族性腫瘍，3：62-67, 2003の図1より許可を得て転載）

第3図　新アムステルダムクライテリアを満たす症例Bの家系図．↗は発端者である子宮体癌症例である．○は女性，□は男性を示す．◐およびEnは子宮体癌，◔およびCCは大腸癌，◕はその他の癌腫を示す（Leuは白血病を表す）．数字は診断時の年齢を示す．斜線は死亡した家系構成員を表す．左のローマ数字は世代を表す．発端者は41歳という比較的若年で子宮体癌を発症している．発端者を含め，第一度近親者以内に3例のHNPCC関連腫瘍を認めた．（阪埜浩司，他：家族性腫瘍，3：62-67, 2003の図2より許可を得て転載）

査を実施した結果，385例中2例（0.5%）がHNPCCの新アムステルダムクライテリアをみたす家族性子宮体癌症例であった[19]．

症例Aは54歳（2妊2経）の子宮体癌症例で1998年に当科にて手術治療を受けている．病理学的診断は類内膜腺癌の低分化型（G3）でFIGOの手術進行期はIb期であった．彼女の母親および2名の子供の大腸癌の既往歴があり，これらを含めると第三度近親者以内に6例もの大腸癌患者を認め，そのうち3名は30歳以下という極めて若年で発症していた（第2図）．症例Bは比較的若年発症である41歳（2妊2経）の症例で，1991年に当科にて手術治療を受けている．病理学的診断は異型子宮内膜増殖症であった．本症例の姉も比較的若年の42歳で子宮体癌に罹患していた．父親，祖父を含め，第三度近親者以内に5例の大腸癌症例を認め，癌集積性のある家系であった（第3図）．

第4図　症例1におけるMSI解析．腫瘍部由来のDNAに認められた異常な波形を矢印で示す．最大5領域のマイクロサテライトマーカーにより解析し，1領域以上で複製エラーによる異常波形を認めた症例をMSI陽性と判定した．（Banno K et al：Cancer Genet Cytogenet 146：58-65, 2003のFig 2より許可を得て転載）

第 4 表　子宮体癌 39 例における MSI 解析

Case	Age at operation	Histological type	Grade	Stage	Double cancer	D2	D3	D5	D9	IN
1	58	E	G2	IIIa	-	+	+	+	+	+
2	56	E	G1	Ia	-	+	+	-	+	+
3	55	AS	G2	IIIc	-	+	+	+	-	+
4	55	AS	G3	Ic	OC	+	+	+	+	-
5	60	E	G1	Ib	-	+	-	+	-	+
6	62	E	G2	IIIc	-	+	+	-	+	-
7	55	E	G3	IIIc	-	+	-	+	+	-
8	54	E	G1	Ia	CC	+	+	+	-	-
9	50	E	G1	IIb	OC	-	+	-	+	-
10	56	E	G2	Ic	-	-	-	-	-	+
11	66	E	G1	Ia	-	-	-	-	-	+
12	44	E	G2	IIIc	CC	+	ND	ND	ND	ND
13	59	E	G1	IIa	BC, OC	-	-	-	-	-
14	48	E	G2	Ib	-	-	-	-	-	-
15	58	E	G2	IIIc	-	-	-	-	-	-
16	65	E	G3	IIIc	-	-	-	-	-	-
17	72	E	G2	IVb	-	-	-	-	-	-
18	55	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
19	65	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
20	56	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
21	69	E	G1	Ia	-	-	-	-	-	-
22	68	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
23	34	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
24	50	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
25	61	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
26	57	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
27	55	E	G1	Ia	BC	-	-	-	-	-
28	64	E	G3	IIIa	-	-	-	-	-	-
29	56	E	G1	Ic	-	-	-	-	-	-
30	44	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
31	45	E	G1	Ib	OC	-	-	-	-	-
32	53	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
33	69	E	G1	Ia	CC	-	-	-	-	-
34	81	E	G1	IIIa	-	-	-	-	-	-
35	58	E	G1	Ib	-	-	-	-	-	-
36	60	E	G3	Ic	-	-	-	-	-	-
37	64	E	G1	IIIc	-	-	-	-	-	-
38	66	S	G2	IIIa	-	-	-	-	-	-
39	62	S	G2	IIIa	-	-	-	-	-	-

E: Endometrioid adenocarcinoma, AS：Adenosquamous carcinoma,
S: Serous adenocarcinoma, OC：Ovarian cancer, BC：Breast cancer,
CC: Colorectal cancer, D2：D2S123, D3: D3S1284, D5：D5S404, D9: D9S162,
IN：*hMSH2* intron 12, ND: not done
子宮体癌 39 例の MSI 解析の結果と臨床病理学的情報（発症年齢，臨床進行期，分化度，重複癌の有無）を表にまとめた．解析の結果，12 例のMSI 陽性腫瘍を認めた（MSI 陽性率 30.7%）．(Banno K et al：Cancer Genet Cytogenet 146：58-65, 2003 の Table 3 より許可を得て転載，一部改変)

以上の 2 症例に関しては，遺伝子レベルの解析に対する同意が得られず，その後の解析は実施できていない．

2. 子宮体癌におけるマイクロサテライト不安定性（MSI）解析

第 4 図に示すように，白血球由来 DNA（Normal）と子宮体癌組織由来 DNA（Tumor）を最大 5 種類のマ

イクロサテライト領域においてマイクロサテライトマーカーを用いてPCR法により増幅し，電気泳動により正常組織由来のPCR産物には存在しない異常なピークが出現したとき，マイクロサテライト不安定性（MSI）陽性と判定した．この結果，解析した子宮体癌39例中12例（30.7%）がマイクロサテライト領域5領域中少なくとも1領域以上の複製エラーを認め，MSI陽性症例であると判定された[20]．子宮体癌の発症年齢，病理組織学的所見，重複癌の有無などを調査し表にまとめた（第4表）．これらの結果からMSI陽性子宮体癌の臨床病理学的特性を検討した．発症年齢が50歳以下の子宮体癌はMSI陽性子宮体癌で2例，MSI陰性子宮体癌で5例認めたがMSI陽性子宮体癌において有意に若年発症が多い傾向は認められなかった（p=0.63）．他臓器の重複癌に関して，MSI陽性子宮体癌は12例中4例（33.3%）において卵巣癌，大腸癌などの他臓器癌の重複を認め，MSI陽性子宮体癌はMSI陰性子宮体癌（27例中4例，14.8%）に比べて頻度が多い印象があったものの統計学的に有意差は認められなかった（p=0.18）．また，病理組織学的分化度との関連についてはG2およびG3腺癌がそれぞれ12例中4例（33.3%）および3例（25%）と合計で7例（58.3%）と過半数を占めたがMSI陰性子宮体癌におけるG2およびG3腺癌は29.6%に認められるに過ぎず，MSI陽性子宮体癌においてはG2およびG3腺癌が多い傾向を示した（p=0.09）．FIGO臨床進行期との関連では，MSI陽性子宮体癌の41.6%（12例中5例）が転移を示すIII期およびIV期であったが，統計学的にMSI陽性子宮体癌と転移の有無との関連は証明されなかった（p=0.86）．予後との比較においては，MSI陽性例で12例中1例の死亡（16.7%）に対し，MSI陰性（MSS）例では27例中5例（18.5%）の死亡（うち1例は乳癌にて死亡）であり，生存率による予後との関連性は認められなかった．

3.　子宮体癌におけるhMLH1およびhMSH2蛋白の免疫組織化学的発現解析

MSI解析を実施した39例中28例の子宮体癌症例（MSI陽性例12例，MSI陰性例16例）の手術標本を用い，抗hMLH1抗体および抗hMSH2抗体による免疫組織化学的にそれぞれの発現を解析した（第5図）．その結果，MSI陽性子宮体癌12例中8例（66.7%）において抗hMLH1抗体の染色性の消失が認められたのに対し，MSI陰性子宮体癌16例においてはわずか1例でしか抗hMLH1抗体の染色性の消失が認められず，統計学的にMSI陽性子宮体癌と*hMLH1*蛋白の発現低下との関連性が示された（p=0.0012）（第5表）．一方，抗hMSH2抗体の染色性の消失は，MSI陽性子宮体癌12例中2例（16.7%）にしか認められず，MSI陰性子宮体癌16例においても抗hMSH2抗体の染色性の消失は認められなかった．

第5図　子宮体癌におけるhMLH1蛋白の発現低下．抗hMLH1抗体を用いたMSI陰性症例（症例13）およびMSI陽性症例（症例5）の免疫組織化学染色の結果を示す．右図の症例5においては子宮内膜癌部の核における抗hMLH1抗体の染色性が消失している．なお，両症例とも癌周囲の正常部は染色されている（倍率X100）．（阪埜浩司，他：家族性腫瘍，3：62-67，2003の図5より許可を得て転載）

第5表　子宮体癌における MSI と hMLH1 蛋白の発現低下との関連

	抗 hMLH1 抗体による癌部の染色性		計（例）
	+	-	
MSI(+)	4	8	12
MSI(-)	15	1	16

(p=0.0012 Fisher's exact probability test)

MSI（+）例における hMLH1 蛋白の発現低下率=8/12 例（66.7%）

MSI（-）例における hMLH1 蛋白の発現低下率=1/16 例（6.3%）

子宮体癌 28 例における MSI と抗 hMLH1 抗体の染色性との関連を示す．MSI陽性子宮体癌において有意に hMLH1 蛋白発現低下が認められた（p=0.0012）．（阪埜浩司，他：家族性腫瘍，3：62-67，2003の図4より許可を得て転載，一部改変）

4. MSI 陽性子宮体癌例における *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子生殖細胞変異解析

MSI 陽性子宮体癌 12 例において，施設内倫理委員会の承認と書面による同意のもと DNA ミスマッチ修復（MMR）遺伝子である *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を解析した．その結果，12 例中 2 例（症例 1 と症例 11，16.6%）で *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を[20]，1 例（症例 12，8.3%）で *hMLH1* 遺伝子の生殖細胞変異を認め，合計として MSI 陽性子宮体癌の 25%に *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を検出した（第 6 図）．この 3 例は *hMSH2* 遺伝子のコドン 688 の atg が ata（Met が Ile）への 1 塩基変異，コドン 390 の ctt が ttt（Leu が Phe）への 1 塩基変異および hMLH1 遺伝子のコドン 100 のナンセンス変異（Arg が Stop コドン）と推測された（第 6 表）．これらの 3 症例はいずれも家族内癌集積傾向を示したものの，新アムステルダムクライテリアは満たしていなかった（第 7 図）．症例 11 では発端者の 2 名の妹も子宮体癌に罹患しており，この 2 名においても今回検出されたコ

第 6 図　PCR-SSCP 解析の結果．*hMSH2* 遺伝子の PCR-SSCP 解析の結果，異常なバンドを示した症例を示す．左図に症例 1 のエクソン 1 を，右図に症例 11 のエクソン 7 の結果を示す．異常なバンドを矢印で示した．（Banno K et al：Cancer Genet Cytogenet 146：58-65，2003 の Fig 3 より許可を得て転載）

第 6 表．*hMLH1* 遺伝子および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異

Case	Exon affected	Genomic DNA alteration	predicted effects (codon)
1	Exon 13 (*hMSH2*)	ATG to ATA	Met (688) Ile
11	Exon 7 (*hMSH2*)	CTT to TTT	Leu (390) Phe
12	Exon 3 (*hMLH1*)	CGA to TGA	Arg (100) Term

MSI 陽性子宮体癌 12 症例中 3 例の MMR 遺伝子の生殖細胞変異を検出した．症例 1 では *hMSH2* 遺伝子のコドン 688 に，症例 11 ではコドン 390 に 1 塩基の変異が同定された．症例 12 では *hMLH1* 遺伝子のコドン 100 にナンセンス変異が同定された．（Banno K et al：Cancer Genet Cytogenet 146：58-65，2003 の Table 4 より許可を得て転載，一部改変）

第 7 図　症例 1 の家系図．*hMSH2* 遺伝子のコドン 688 に生殖細胞遺伝子変異を認めた症例 1 の家系図を示す．矢印は発端者である子宮体癌症例である．○は女性，□は男性を表す．◐および En は子宮体癌，◔および CC は大腸癌，◕はその他の癌腫を表す（G は胃癌，Br は乳癌を表す）．斜線は死亡した家系構成員を示し，数字は癌の発症年齢又は死亡年齢を示す．左のローマ数字は世代を表す．（Banno K et al：Cancer Genet Cytogenet 146：58-65，2003 の Fig 4 より許可を得て転載，一部改変）

第8図　症例11の家系図．*hMSH2*遺伝子のコドン390に生殖細胞遺伝子変異を認めた症例11の家系図を示す．矢印は発端者である子宮体癌症例である．○は女性，□は男性を表す．◐およびEnは子宮体癌，◔およびCCは大腸癌を表す．斜線は死亡した家系構成員を示し，数字は癌の発症年齢又は死亡年齢を示す．左のローマ数字は世代を表す．発端者を含め3姉妹が子宮体癌に罹患しており，発端者も大腸癌の重複癌を認めている．（Banno K et al：Cancer Genet Cytogenet 146：58-65, 2003 の Fig 5 より許可を得て転載，一部改変）

ドン390のcttがtttへ（LeuがPhe）の変異と同様の生殖細胞変異を認めた（第8図）．症例12は子宮体癌の手術時に回盲部大腸癌の重複癌が発見された．症例12では抗hMLH1抗体を用いた免疫染色により子宮体癌部のみならず，重複癌の回盲部大腸癌の粘液性腺癌部においても染色性の消失を認め，子宮体癌部および回盲部癌部におけるhMLH1蛋白の発現低下を確認した．

考　察

HNPCCは常染色体優性遺伝形式をとる家族性大腸癌であり，従来は大腸癌患者を発端者として分子遺伝学的アプローチによる解析が実施されてきた．しかしながら，HNPCC患者における第一度近親者内の大腸癌以外の癌腫の発生頻度としては子宮体癌が最も多く，欧米では約9～19%と報告されている[21]．我が国における1994年までのHNPCC34家系167例の解析でも10例（6.0%）に子宮体癌の発生を認めている[22]．1999年のアムステルダムクライテリアの改訂により子宮体癌の一部が家族性腫瘍であること，その発癌機構はHNPCC同様MMR遺伝子の異常が関与している事実が明らかとなってきた．子宮体癌において以前よりその発生に遺伝的素因の関与が指摘されていたこと，家族性腫瘍であるHNPCCにおいて子宮体癌の発生率が高いこと，罹患後の生存率も比較的高い癌腫であることなどを考えると，二次発癌への予防対策や家系内の血縁者へのサーベイランスといった家族性腫瘍独特な治療戦略の視点からも家族性子宮体癌の病態解析は重要な意味を持つと考えられているが，分子疫学的なアプローチによる病態の解析はいまだなされていない．

今回，著者は報告としては現時点で国内最大数の子宮体癌385例を対象とした家系調査を実施し，HNPCCの新アムステルダムクライテリアを満たす2例（0.5%）の家族性子宮体癌家系を発見した．現在まで，我が国の家族性腫瘍としての子宮体癌の頻度に関しては本研究以外にはわずか1件しか報告されていない．Sagawaらは本研究より少ない子宮体癌161例を調査し2例（1.5%）が新アムステルダムクライテリアを満たしたと報告している[23]．いずれの結果も5%程度にHNPCCが存在すると報告されている大腸癌に比べるとはるかに低頻度であった．この新アムステルダムクライテリアにはHNPCCと関連すると報告されている卵巣癌や胃癌が診断基準の対象癌に含まれていないという問題点が指摘されており，このような理由により新アムステルダムクライテリアでは家族性子宮体癌のごく一部の症例しか抽出できていない可能性がある．今後，我が国における家族性腫瘍としての子宮体癌の頻度を明らかにするためには地域性による発生頻度の差が生じている可能性も含め，大規模かつ全国的な子宮体癌症例の家系調査が必要であると考えられた．

家族性腫瘍であるHNPCCの発癌はDNAのミスマッチ修復（MMR）機構の異常により生じると考えられおり，これは原因遺伝子とされるMMR酵素遺伝子の生殖細胞変異に起因すると推測されている．このMMR機構の異常はマイクロサテライト不安定性（MSI）として検出することができる．実際にHNPCCでは90%以上でMSIを示すため，MSI解析はHNPCCのスクリーニング法としても期待されている[24]．本研究において著者は，子宮体癌38例を対象として最大5種類のマイクロサテライトマーカーを用いてMSI解析を実施した．解析した38例中12例にMSI陽性を認め，子宮体癌が30.7%という高いMSI陽性率を示す事実が明らかになった．このMSI陽性率の結果は大腸癌（19%），肝癌（14%），乳癌（4%）などの報告[25]と比較しても高率であり，子宮体癌の発癌にMMR異常が深く関与していることを示唆している．

高率にMSI陽性を示すHNPCCの臨床病理学的特徴は近年の解析により明らかとなりつつある．一般的にその特徴は①若年に発症する（平均42歳），②右側大腸に発生する，③同時性，異時性に大腸癌が好発する，④低分化型腺癌が多い，⑤粘液性腺癌が多い，⑥予後良好である，との6項目にまとめることができる[26]．一方，

MSI 陽性子宮体癌の臨床病理学的特徴に関して，我が国における報告はわずかで，統一された結論は得られていない．本研究において MSI 陽性子宮体癌と臨床病理学的特徴との関連を統計学的に解析したが，家族性腫瘍で一般的に認められる若年発症や重複癌の傾向は認められなかった．又，病理組織学的な分化度との関連については HNPCC 同様，MSI 陽性子宮体癌においては G2 および G3 腺癌といった低分化腺癌が多い傾向を示すという知見を得た（p=0.09）．一般的に，子宮体癌で最も高頻度な高分化型子宮内膜癌は肥満や高エストロゲン状態などの環境因子が発癌に密接に関与していると考えられており，この結果は MMR 異常による発癌機構が通常の子宮体癌とは明らかに異なる機序と生物学的特性を有していることを示唆しており興味深い．今後さらなる症例数を検討することで，MMR 異常と低分化型腺癌の発癌機構の関連を明らかにできる可能性が示された．

HNPCC における MMR 異常の主たる原因遺伝子は MMR 酵素をコードする *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子と推測されている．本研究において著者は子宮体癌と MMR 異常との関連を免疫染色による hMLH1 蛋白および hMSH2 蛋白の発現と *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異により解析した．

免疫染色による子宮体癌部における hMLH1 蛋白および hMSH2 蛋白の発現を検討では，MSI 陽性子宮体癌 12 例中 8 例（66.7%）と高率に hMLH1 蛋白の発現低下が認められ，子宮体癌で高率に認められる MSI の多くは hMLH1 蛋白の発現低下に起因していることが示唆された．さらに統計学的に MSI 陽性子宮体癌と hMLH1 蛋白の発現低下が強く相関したことより（p=0.0012），hMLH1 蛋白の免疫染色が子宮体癌における MSI の簡便な検出法として代用できる可能性を初めて示した．

著者はさらに MSI 陽性子宮内膜癌 12 例において，DNA ミスマッチ修復（MMR）酵素遺伝子である *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を解析した．その結果，12 例中 3 例（25%）で *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子の生殖細胞変異を認めた．2 例が *hMSH2* 遺伝子の 1 塩基の変異であり，*hMSH2* 遺伝子のコドン 688 の atg が ata（Met が Ile）に，コドン 390 の ctt が ttt（Leu が Phe）に変異していた．1 例は hMLH1 遺伝子のコドン 100 の cga が tga へ変異するナンセンス変異（Arg が Stop コドン）であった．本研究により検出されたこれらの生殖細胞変異はアメリカの遺伝子変異のデータベースである

Human Genome Database（HGMD）（http：//archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.htm）に登録されており，今回検出されたものと同様の生殖細胞変異が国際的には HNPCC 症例において既に報告されている[27~29]．また現存する遺伝子多型のデータベース上にも登録されておらず，機能的な遺伝子変異と推測される．一方，2 例の *hMSH2* 遺伝子の 1 塩基の変異は遺伝子多型であるという可能性も完全に否定できない．我が国をはじめとして *hMLH1* および *hMSH2* 遺伝子などの MMR 遺伝子の健常人における遺伝子多型解析の報告とデータの蓄積が非常に少ない状況では正確な判断は難しいといえる．最近，症例 1 と同様の生殖細胞変異は Nomura らによって日本人の HNPCC 症例においても検出された[18]．この報告において，コントロールの日本人 158 例では *hMSH2* 遺伝子のコドン 688 は全て野生型を示し，変異を認めなかったと報告しており，断定はできないものの機能的なミスセンス変異の可能性を指摘している．症例 11 においては，発端者の妹 2 名にも子宮体癌の罹患歴が確認されたばかりでなく，その妹 2 名にも同一の *hMSH2* 遺伝子コドン 390 の 1 塩基変異が同定された．この 1 塩基変異が遺伝子多型とすれば，日本人において極めて高率に生じている遺伝子多型ということになる．この発端者および妹の 1 名にも大腸癌が発症したという強い癌集積性をもつ家族歴から推測すると機能的な変異である可能性も否定はできず，今後さらに症例を検討していく必要がある．*hMLH1* 遺伝子のナンセンス変異が認められた症例 12 においては，回盲部大腸の粘液性腺癌が重複していたこと，子宮体癌部および回盲部大腸癌部で *hMLH1* 蛋白の発現が低下していたこと，発端者の妹にも同様の生殖細胞変異が検出されたことからも明らかな機能的遺伝子変異であると考えられた．*hMLH1* 遺伝子の生殖細胞変異に起因する MMR 機構の異常により子宮内膜や腸管に癌腫が発生した症例と推察される．

1999 年までに ICG-HNPCC には 134 例の *hMLH1* 遺伝子変異が，87 例の *hMSH2* 遺伝子変異が集計されている．変異の種類として *hMLH1* 遺伝子はミスセンス変異が多く，*hMSH2* 遺伝子ではフレームシフト変異が多いと報告されている[30]．本研究により子宮体癌では HNPCC では頻度が比較的低いとされる *hMLH1* 遺伝子のナンセンス変異と hMSH2 遺伝子のミスセンス変異が検出されたという事実は，MMR 遺伝子の遺伝子変異型により発生する癌腫の表現型が異なる可能性を示している．今後，解析を進め，子宮体癌の発生と特異的に関連する MMR 遺伝子の種類および遺伝子変異型を明らかとしたい．

本研究においてMMR遺伝子である*hMLH1*遺伝子および*hMSH2*遺伝子で生殖細胞変異を認めた3例は家系内癌集積傾向を認めたものの，いずれの症例も新アムステルダムクライテリアを満たしていなかった．この結果からも新アムステルダムクライテリアでは我が国の家族性子宮体癌の一部しか抽出できない事実を確認し，この診断基準を満たす症例以外にもさらに多くの家族性子宮体癌の存在が推察された．現在の臨床的診断基準である新アムステルダムクライテリアに代わる精度の高い，我が国独自の家族性子宮体癌の診断基準の確立が必要であると考えられた．また，MSI陽性子宮体癌の25%にMMR遺伝子の生殖細胞変異を認めたという事実は，家族性子宮体癌症例のスクリーニング法としてMSI解析が大腸癌と同様に有用である可能性を示した．家族性子宮体癌の診断として，仮に新アムステルダムクライテリアを満たさない症例であってもMSI陽性であり，かつ家族内癌集積傾向を認める症例に対しては積極的にMMR遺伝子を対象とした遺伝子解析を実施するべきであろう．

前述したようにMSI陽性子宮体癌に高頻度に*hMLH1*蛋白の発現低下が認められた．*hMLH1*蛋白の発現低下が認められた8例中*hMLH1*遺伝子の生殖細胞遺伝子変異はわずか1例であった．この結果より，子宮体癌で生じている高頻度の*hMLH1*蛋白の発現低下は生殖細胞変異に起因しない遺伝子の不活化機序によるものと推測された．最近になってDNAのプロモーター領域のメチル化異常といったエピジェネティックな変化による遺伝子発現の消失機構が注目されており，hMLH1遺伝子のプロモーター領域に高頻度に異常メチル化が生じている事実が報告された[31]．この報告からも子宮体癌におけるMSIには*hMLH1*遺伝子のエピジェネティックな変化である異常メチル化異常が深く関与している可能性が高い．今回，MSI陽性子宮体癌において家族性腫瘍で一般的に認められる若年発症や重複癌といった傾向が証明されなかった事実もこの可能性を支持している．

子宮体癌の発癌に関与するMMR遺伝子の候補として本研究では多くのHNPCCにおいて生殖細胞変異が生じている*hMLH1*遺伝子および*hMSH2*遺伝子に着目し解析した．しかしながら，本研究結果において，この2種の遺伝子異常は確かに存在し関与しているものの，*hMLH1*遺伝子および*hMSH2*遺伝子の異常という機序だけではMMR異常のすべてを説明できるものではなく，さらなる別のMMR遺伝子の関与も予測される．HNPCC遺伝子の原因遺伝子として，MMR遺伝子は現在まで*hMLH1*遺伝子，*hMSH2*遺伝子以外に*hMSH3*遺伝子，*hMSH6*遺伝子，*PMS1*遺伝子およびPMS2遺伝子の計6種が同定されている．そのなかでも最近*hMSH6*遺伝子の生殖細胞変異がHNPCCで同定された．*hMSH6*遺伝子変異例では子宮体癌，卵巣癌を合併すると報告され[32,33]，特に子宮体癌の発癌との関連性で*hMSH6*遺伝子は注目されはじめており，今後の研究において重要な遺伝子として位置づけられる．

子宮体癌の一部が家族性腫瘍であり，その発癌にMMR遺伝子異常が深く関与している事実は，発癌機構が一部不明であった子宮体癌の生物学的特徴を理解するうえで貴重な知見と考えられ，本研究のようなこの種の子宮体癌症例の抽出と解析は重要な意義があると考えられる．今後，本研究で得られた知見を基盤として家族性子宮体癌の精度の高い臨床診断基準やサーベイランス法が確立されれば本疾患の早期発見や早期治療が可能となる．また家族性子宮体癌の遺伝子診断法が確立されれば，発症前診断が可能となり，患者本人のみならず広く家系構成員の癌予防にも寄与できる．さらに本研究が発展し，将来的にMMR遺伝子変異型と表現型との関連より子宮体癌の臨床病態が予測できるようになれば，症例に応じた子宮体癌治療個別化の実現も期待される．

総　括

我が国における家族性腫瘍としての子宮体癌の病態を分子疫学的手法にて解析するため，当科にて1991年2002年の間に治療を行った子宮体癌385例に対し疫学的調査を実施し，さらにインフォームド・コンセントの得られた39例に対してMMR遺伝子異常との関連性を検討するため分子生物学的解析を行い，以下の事項を明らかとした．

1. 新アムステルダムクライテリアを満たす家族性子宮体癌は全子宮体癌の0.5%に存在する．

2. 子宮体癌症例において30.7%と高率にMSI陽性を認め，子宮体癌の発癌にMMR異常が密接に関与している．

3. MSI陽性子宮体癌12例中8例（66.7%）にhMLH1蛋白の発現低下が認められ，統計学的にも強く相関した（$p=0.0012$）．よってhMLH1蛋白の免疫染色が子宮体癌におけるMSIの簡便な検出法として代用できる可能性がある．

4. MSI陽性子宮体癌はG2やG3といった低分化型腺癌が多い傾向を示し，MMR異常による子宮体癌は高エストロゲン状態などの環境因子が発生に寄与するとさ

れる高分化型子宮内膜癌とは異なる発癌機構と生物学特性を有する．

5. MSI陽性子宮体癌12例中3例（25%）でMMR遺伝子である*hMLH1*および*hMSH2*遺伝子の生殖細胞変異を検出した．いずれの症例も新アムステルダムクライテリアを満たしておらず，家族性子宮体癌に関してこの診断基準の問題点を具体的に明らかとした．また，我が国においては新アムステルダムクライテリアを満たさないさらに多くの家族性子宮体癌の存在が推測された．

6. 家族性子宮体癌に関して，新アムステルダムクライテリアを満たさない症例であってもMSI陽性および家系内癌集積傾向がある症例に対してはMMR遺伝子を対象とした遺伝子診断の実施は有意義と考えられる．

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産婦人科学教室野澤志朗教授に深謝致します．また，御指導いただきました栃木県立がんセンター菅野康吉博士，藤田保健衛生大学医学部産婦人科宇田川康博教授，慶應義塾大学医学部産婦人科学教室進　伸幸専任講師に感謝致します．さらに本研究に多大な御協力をいただきました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます．

本研究の一部は，第54回日本産科婦人科学会学術講演会（2002年，東京）第55回日本産科婦人科学会学術講演会（2003年，福岡）および第62回日本癌学会学術講演会（2003年，名古屋）において発表した．

なお，本研究の一部は平成13年度文部科学省科学研究費補助金，特定領域C「分子疫学的解析による遺伝性子宮内膜癌の病態解明」および平成15年度文部科学省科学研究費補助金，特定領域「分子疫学的手法を用いた家族性子宮内膜癌の病態解明と遺伝子診断」によった．

文　献

1) Lynch HT, Krush AJ：The cancer family syndrome and cancer control. Surg Gynecol Obstet 132：247-250, 1971
2) Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT：The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. Dis Colon Rectum 34：424-425, 1991
3) Lynch HT, Lynch JF：Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Semin Surg Oncol 18：305-313, 2000
4) Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT：New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. Gastroenterology 116：1453-1456, 1999
5) 阪埜浩司，二河田雅信，平澤　晃，進　伸幸，青木大輔，宇田川康博，野澤志朗：遺伝性非腺腫性大腸癌（HNPCC）と婦人科癌．産婦人科の実際，50：1819-1825, 2001
6) 阪埜浩司，進　伸幸，矢野倉恵，平尾　健，岩田　卓，平澤　晃，青木大輔，野澤志朗：遺伝性子宮内膜癌とは－特にDNAミスマッチ修復遺伝子について－．産婦人科の世界，55：863-870, 2003
7) Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B：Inactivation of the Type II TGF-β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 268：1336-1338, 1995
8) Rompino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M：Somatic frameshift mutation in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. Science 275：967-969, 1997
9) Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, Tanaka N, Shimada T, Kimura A, Shimizu K：Close correlation between mutation of E2F and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. Cancer Res 58：594-598, 1998
10) Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ, Rhyu MG, Cottrell J, Abraham JM, Biden K, Simms L, Leggett B, Bova GS, Frank T, Powell SM, Sugimura H, Young J, Harpaz N, Shimizu K, Matsubara N, Meltzer SJ：mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. Cancer Res 57：2350-2353, 1997
11) Planck M, Wenngern E, Borg A, Olsson H, Nilbert M：Somatic frameshift alterations in mononucleotide repeat-coating genes in different tumor types from an HNPCC family with germline MSH2 mutation. Genes chromosome Cancer 29：33-39, 2000
12) Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR：Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gastroenterology 104：1535-1549,1993
13) Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, Hofstra RM, Osinga J, Mecklin JP, Jarvinen HJ, Leisti J, Buys CH, de la Chapelle A, Peltomaki P：DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. Hum Mol Genet 5：763-769, 1996
14) Moslein G, Tester DJ, Lindor NM, Honchel R, Cunningham JM, French AJ, Halling KC, Schwab M, Goretzki P, Thibodeau SN：Microsatellite instability and mutation analysis of h*MSH2* and *hMLH1* in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. Hum Mol Genet 5：1245-1252, 1996
15) Wu Y, Nystrom-Lahti M, Osinga J：*MSH2* and

MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. Genes Chromosome Cancer 18：269-278, 1997

16) Herfarth K, Kodner IJ, Whelan AJ. Mutations in *MLH1* are more frequent than in *MSH2* in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. Genes Chromosome Cancer 18：42-49, 1997

17) Genuardi M, Anti M, Capozzi E, Leonardi F, Fornasaring M, Novella E, Bellacosa A, Valenti A, Gasbarrini GB, Roncucci L, Benatti P, Percesepe A, Ponz de Leon M, Coco C, de Paoli A, Valentini M, Boiocchi M, Neri G, Viel A：*MLH1* and *MSH2* constitutional mutations in colorectal cancer families not meeting the standard criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Int J Cancer 75：835-839, 1998

18) Nomura S, Sugano K, Kashiwabara H,Taniguchi T, Fukuyama N, Fujita S, Akasu T, Moriya Y, Ohhigashi S, Kakizoe T, Sekiya T：Enhanced detection of deleterious and other germline mutations of h*MSH2* and *hMLH1* in Japanese hereditary nonpolyposis colorectal kindreds. Biochem Biophys Res Commun 271：120-129, 2000

19) 阪埜浩司，進　仲幸，平尾　健，岩田　卓，平澤　晃，青木大輔，野澤志朗：遺伝性非腺腫症性大腸癌(HNPCC)と子宮内膜癌. 家族性腫瘍 3：62-67, 2003

20) Banno K, Susumu N, Hirao T, Yanokura M, Hirasawa A, Aoki D, Udagawa Y, Sugano K, Nozawa S：Ident ification of germline *MSH2* gene mutations in endometrial cancer patients not fulfilling the new clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer Gent Cytogenet 146：58-65, 2003

21) Watoson P, Lynch HT：The tumor spectrum in HNPCC . Anticancer Res 14：1653-1640, 1994

22) 野水　整，土屋敦雄，大木進司，渡辺文明，八巻義雄，阿部力哉，本多つよし，佐藤　章，Vasen H：遺伝性非ポリポーシス大腸癌家系にみられる子宮体癌の特徴. 外科. 58：186-189, 1996

23) Sagawa T, Yamada H, Yamamoto R, Sakuragi N, Fujimoto S：Two cases of endometrial cancer meeting new criteria of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gynecol Oncol 79：327-331, 2000

24) Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicoladies NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW.：Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. Nat Med 2:169-174, 1996

25) Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y：Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. Cancer Res 53：5087-5089, 1993

26) Horii A , Han HJ , Shimada M , Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, Yasui W, Tahara E, Nakamura Y：Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. Cancer Res 54：3373-3375, 1994

27) Okamura S, Koyama K, Miyoshi Y, Monden M, Takami M：Novel germline mutation of hMSH2 in a patient with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and in a patient with six primary cancers. J Hum Genet 1998; 43：434-40, 1998

28) Yuan Y, Han HJ, Zheng S, Park JG：Germline mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic early onset colorectal cancer. Dis Colon Rectum 41：219-227, 1998

29) Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Saurin JC, Maugard C, Navvaro C, Ruano E, Descos L, Trillet-Lenoir V, Bosset JF, Puisieux A：Prevalence of germline mutations of hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2 and hMSH6 genes in 75 French kindreds with nonpolyposis colorectal cancer. Hum Genet 105：79-85, 1999

30) 馬場正三，松原長秀：HNPCC in the year 2000. マイライフ社, p.25-31, 2000

31) Kondo E, Furukawa T, Yoshinaga K, Kijima H, Semba S, Yatsuoka T, Yokoyama T, Fukushige S and Horii A：Not hMSH2 but hMLH1 is frequently silenced by hypermethylation in endometrial cancer but rarely silenced in pancreatic cancer with microsatellite instability. Int J Oncol 17：535-541, 2000

32) Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T：Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer . Nat Genet 17：271-272, 1997

33) Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y：Germline mutation of hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. Cancer Res 57：3920-3923, 1997

慶應医学・81(2)：T101～T113，2004

学位論文

関節リウマチに見出される新しい自己抗体の対応抗原分析および臨床的・病因的意義の解明

慶応義塾大学医学部内科学教室
（指導：池田康夫教授）
野島崇樹

（平成15年12月16日受付）

Key Word： autoantibody, rheumatoid arthritis, cytokeratin-18, FUSE-binding protein, γsynergin

全身性炎症性疾患である膠原病は多種類の自己抗体の産生を特徴とする．これらの自己抗体は特定の疾患または臨床像と密接な関係を持つことが示され，疾患のマーカーとして診断・病型分類や予後の推定・治療効果判定など臨床的に有用とされる．さらに自己抗体が認識する対応抗原（自己抗原）は，遺伝子の複製，転写，RNAプロセシング，翻訳などの生命現象に不可欠な酵素や調節因子であることが明らかとなり，自己抗原の分析は自己抗体産生機序の解明，自己免疫疾患の病因・病態の追究のために重要と考えられる[1]．

関節リウマチ（Rheumatoid Arthritis：RA）は，多発関節炎を主症状とする全身性炎症性疾患で[2]，リウマトイド因子（RF）などの存在により全身性自己免疫疾患として位置づけられているにもかかわらず，他の膠原病のような疾患特異的自己抗体の報告は少なく，自己免疫現象とRAの病因・病態との関与も明らかになってはいない[3]．

本研究では，第一に検出感度の高いHeLa細胞を抗原に用いた免疫ブロット法によりRA特異自己抗体の検出を行った[4,5]．さらに，新たな自己抗体が対応する自己抗原遺伝子cDNAのクローニングを進め，その臨床的・病因的意義を追求した．

対象ならびに方法

1. 対象

対象は教室の膠原病患者136例，（アメリカリウマチ協会（ARA）のRA改訂分類基準[6]を満たすRA患者64例，RA以外の膠原病72例（ARAの改訂分類基準[7]を満たす全身性エリテマトーデス（SLE）36例，ARAの分類予備基準[8]を満たす強皮症（SSc）18例，Bohanらの診断基準[9]を満たす多発性筋炎および皮膚筋炎（PM/DM）18例），健常人9例の保存血清を用いた．

2. HeLa細胞を抗原に用いた免疫ブロット法

HeLa細胞（1検体当たり1×10^6個）をTris-Bufferd Saline（TBS，10 mM Tris-HCl，150 mM NaCl，pH7.5）で1回洗浄後，sodium dodecylsulphate（SDS）sample buffer（62.5 mM Tris-HCl，2% SDS，5% 2-mercaptoethanol，10% glycerol，0.005% bromophenol blue，pH 6.8）を加え，超音波破砕器で破砕した．このHeLa細胞抽出物を5分間100℃で加熱し，SDS-10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後，Towbinらの方法[10]に従い，ニトロセルロース膜（BA-85，Schleicher & Schuell社，Dassel，Germany）に転写し，2%（W/V）スキムミルク（森永乳業，東京，日本）/TBS溶液でブロックした．このニトロセルロース膜を5 mm幅の短冊型に切り，TBS-

本論文は，Nojima T, Kamata M, Matsunobu T, Kimura M, Mimori T, Matsumura M, Fujii T and Akizuki M：Detection of autoantibodies in sera from patients with rheumatoid arthritis. Jpn J Rheumatol 6：189-200, 1996の一部を含む．

NP40（TBS, 0.05% Nonidet P-40）で希釈した被験血清（1：50）と4℃で一晩反応させた．これをTBS-NP40で4回洗浄した後，アルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgGヤギ血清（Promega社, Madison, WI, USA, 1：7500希釈）と室温で1時間反応させた．TBS-NP40で3回洗浄後，これにアルカリホスファターゼ用緩衝液（100 mM Tris-HCl，100 mM NaCl，5 mM MgCl2，pH9.5）50 ml，nitro blue terazolium（NBT）330 μl（Promega社），5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate（BCIP）165 μl（Promega社）を加えて発色させ，抗体と反応する蛋白を検出した．

3. RA自己抗体が認識する自己抗原cDNAのクローニング

HeLa細胞由来のλgt11 cDNAライブラリー（Clontech社，Franklin Lakes, NJ, USA）をYoungとDavisの方法[11]に準じてスクリーニングした．2種類のRA特異的自己抗体（抗75 kD蛋白，抗45 kD蛋白抗体）陽性の3例のRA患者等量混合血清をTBSで1：100に希釈し，大腸菌Y1090菌体成分と反応させ抗大腸菌抗体を吸収した．λgt11 cDNAライブラリーファージ（1×10^4 plaque forming unit：pfu）を50 mM硫酸マグネシウム中に浮遊させた大腸菌Y1090株（1×10^9/ml）0.3 mlと37℃で15分間保温して感染させ，50℃に融解したトップアガー（0.7%バクトアガー（GIBCO-BRL社，Rockville, MD, USA）添加Luria-Bertani's（LB）培地（バクトトリプトン（GIBCO-BRL社）10 g，イーストエクストラクト（GIBCO-BRL社）5 g, NaCl 10 g/H_2O 1000 ml））3 mlを加えて，アンピシリン（ABPC 50 μg/ml）添加寒天プレート（90 mm径）上に散布した．42℃で3時間培養して溶菌斑を形成後，プレート表面に10 mMイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド（IPTG, Roche Diagnostics社，Basel, Switzerland）を浸したニトロセルロースフィルター（BA-85, 82 mm径，Schleicher & Schuell社）をのせ，さらに37℃で2時間培養を続け，融合蛋白を発現させると同時にフィルターに転写した．このフィルターをスキムミルク/TBS溶液で1時間ブロックした後，上記の大腸菌吸収RA混合血清中で室温3時間反応させた．これをTBS-NP40で4回洗浄した後，アルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgGと室温で1時間反応させた．TBS-NP40で3回洗浄後，これにアルカリホスファターゼ用緩衝液50 ml, NBT 330 μl, BCIP 165 μlを加え，抗体が反応するプラークを発色させて検出した．得られた陽性クローンは希釈して同様のスクリーニングを行い，プラークが100%陽性になるまで繰り返して精製した．

4. DNAの精製

陽性クローンを含むλファージ1×10^5 pfuを大腸菌Y1090株に感染後，トップアガーを加えてABPC添加アガロースプレート上に散布し37℃で12時間培養して増殖させた．SM緩衝液（100 mM NaCl, 8 mM MgSO4, 50 mM Tris-Cl, 2% gelatin, pH 7.5）を加えて室温で5時間浸透して溶出したファージを，10%ポリエチレングリコール，1M NaClを等量加えて沈殿させ，さらにフェノール・クロロホルムでλファージDNAを回収した．精製したファージDNAは制限酵素EcoRI（宝酒造社，東京，日本）で切断し，1%アガロースゲル電気泳動で分画，インサートDNAを含むゲルを切り出し，ガラス粒子吸着法（Geneclean kit, Bio101社，Vista, CA, USA）でcDNAを精製した．

5. DNAサザンブロット法

精製ファージDNAを制限酵素EcoRIで切断し，1%アガロース電気泳動で分画した．0.4N NaOHを転写バッファーとして，このゲルを2時間ナイロンメンブレン（Hybond-N+, Amersham Bioscience社，Piscataway, NJ, USA）にアルカリブロッティングを行い，ペルオキシダーゼで標識したカルパスタチン部分cDNA（京都大学三森経世教授より供与）と42℃10時間ハイブリダイズさせ，ルミノール反応を用いた化学発光により検出した（ECLキット，Amersham Bioscience社）．

6. βガラクトシダーゼ（βGal）-融合蛋白の誘導

上記により精製した組み換えλgt11ファージを大腸菌Y1089に感染させ，ライソゲン化した．これを32℃で振とう培養し，$OD_{600\,nm}=0.5$まで増菌した時に15分42℃に温度を上げ，IPTG（終濃度：1 mM）を添加してさらに37℃で2時間培養し，βGal-融合蛋白を発現させた．

7. βGal-融合蛋白の免疫ブロット法

上記βGal-融合蛋白をSDS sample bufferに溶解して，5分間100℃で加熱し，SDS-10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後，ニトロセルロース膜に転写し，スキムミルク/TBS溶液でブロックした．このニトロセルロース膜を5 mm幅の短冊型に切り，TBS-NP40で希釈した大腸菌吸収被験血清（1：100）と4℃で一晩反応させた．これをTBS-NP40で4回洗浄した後，ア

ルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG と室温で 1 時間反応させた．TBS-NP40 で 3 回洗浄後，これにアルカリホスファターゼ用緩衝液 50 ml, NBT 330 μl, BCIP 165 μl を加えて発色させ，多数の膠原病患者血清を用いて同様の方法で βGal-融合蛋白との反応性を検討した．陽性コントロールとして，1 次抗体にマウス抗 βGal 抗体（Promega 社，1：5000 希釈），2 次抗体にアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG ヤギ血清（Promega 社，1：7500 希釈）を用いた．

8. DNA シークエンス法

陽性クローン RA5, RA9, RA21 の部分 cDNA（EcoRI 切断済）を，M13mp18RF-DNA（宝酒造社）の EcoRI 部位にサブクローニングした．これらの組換え DNA を大腸菌 JM101 株に感染させ得られた 1 本鎖 DNA で Sanger らの dideoxy 法[12]により修飾 T7DNA ポリメラーゼ（Sequenase, Amersham Bioscience 社）を用いて，塩基配列を決定した．得られた塩基配列および推定アミノ酸の相同性の検索は GenBank（NCBI：National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda, MD, USA）の DNA データベースと照合した．

9. 抗サイトケラチン-18（CK-18）抗体陽性例の臨床的特徴の検討

RA における，抗 CK-18 抗体陽性例と陰性例を層別化し，臨床的特徴に統計的有意差があるかどうか，Fisher の完全確率を計算し比較検討した．

10. 健常人末梢血 mRNA 由来 cDNA の合成

健常人協力者より採血した末梢血を，Ficoll-Paque（Amersham Bioscience 社）を用いて有核細胞として回収し，細胞の全 RNA を TRIzol（Life Technologies 社, Gaithersburg, MD, USA）を用いて抽出した．1 μg の全 RNA をスーパースクリプトIIRNAaseH 逆転写酵素（Gibco-BRL 社）と反応させて，ヒト末梢血 cDNA を合成した．

11. c-myc far upstream element binding protein（FBP）全長 cDNA の分離ならびに発現ベクター pMAL-C2X へのサブクローニング

FBP 全長 cDNA を得るため，上記 10 のヒト cDNA を template とし，既報の FBP mRNA[13]のオープンリーディングフレームを含む F1 と F2（第 1 表）をプライマーに用い，Expand TM High Fedelity PCR System（Roche Diagnostics 社）により，94℃2 分反応後，94℃30 秒（ディネーチャー反応），64℃1 分（アニーリング），68℃3 分（エクステンション），30 サイクルの PCR 反応を T3 Thermocycler（Biometra, Whatman 社, Goettingen, Germany）で行った．さらに，nested PCR を行うことで（PCR 条件は上記と同様），FBP-A（192-975），FBP-P（897-1,978），FBP-L（393-2,226）の部分 cDNA を作成した（第 1 図）．なお，それぞれのプライマーセットは，5' 側に XbaI リンカー，3' 側に HindIII リンカーをつけ（第 1 表），合成された部分

第 1 図　c-myc far upstream element binding protein（FBP）遺伝子の構造と PCR 産物．FBP 遺伝子は全長 2,325 bp, 27-1,961 が open reading frame で，DNA 結合部位である K Homology を 4 箇所に認める．クローニングで確認した λgt11 phage(RA9)は FBP 遺伝子の 185-1,432 をコードしていた．FBP-full を PCR 増幅し，さらに 3 種の部分 cDNA(FBP-A，FBP-P，FBP-L)を nested PCR で増幅し，pMAL-C2X へのサブクローニングに使用した．

第 1 表　FBP-cDNA の PCR 増幅に用いたプライマー

position	5'-primer		3'-primer	
full (8-2227)	F1	CGGCTCTTATAGTGCAACCA	F2	ATCACAAAGCATCAACCACA
FBP-A (192-975)	A1	CCTCTAGAAATGACTATGGTTATGGGGGAC	A2	GGAAGCTTTGCTATCCTTTCGGGTGTTGT
FBP-P (897-1978)	P1	CCTCTAGAATAGGAAGAAATGGAGAGATGAT	P2	GGAAGCTTCACACAATGAAGCAAATACTG
FBP-L (393-2226)	L1	CCTCTAGAATCTCACGCATACAACAGGAA	L2	GGAAGCTTATCACAAAGCATCAACCACAT

cDNA が発現ベクター pMAL-C2X（New England BioLabs 社, Beverly, MA, USA）の XbaI/HindIII site にサブクローニングされた場合に reading frame が一致するようデザインした（第1図）.

得られた cDNA と pMAL-C2X を, XbaI/HindIII で制限酵素処理し, T4 DNA ligase（MBI Fermentas 社, Hanover, MD, USA）を用いてライゲートし, 大腸菌 DH5α コンピテントセル（GIBCO-BRL 社）に加えて, 形質転換させ, 100 μg/ml ABPC 添加 LB 寒天プレートにまき, 陽性クローンを獲得した.

12. 免疫ブロット法による FBP 融合蛋白の発現の確認

11 で得られた陽性クローンを ABPC 添加 LB 培地 20 ml で 37℃振盪培養し, $OD_{600\,nm}$=0.5 まで増菌した時に, IPTG（終濃度：1 mM）を添加して, さらに 37℃で 2 時間培養, マルトース結合蛋白（MBP）との融合蛋白を発現させた. 免疫ブロット法により, MBP-FBP 融合蛋白と RA プローブ血清との反応を検討した.

13. MBP-FBP-A 融合蛋白（FBP-A）の免疫ブロット法

FBP-A を, SDS-10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後, ニトロセルロース膜に転写し, スキムミルク/TBS 溶液でブロックした. このニトロセルロース膜を 5 mm 幅の短冊型に切り, TBS-NP40 で希釈した大腸菌吸収被験血清（1：100）と 4℃で一晩反応させた. これを TBS-NP40 で 4 回洗浄した後, アルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG と室温で 1 時間反応させ, TBS-NP40 で 3 回洗浄後, アルカリホスファターゼ用緩衝液 50 ml, NBT 330 μl, BCIP 165 μl を加えて発色させ, 多数の膠原病患者血清を用いて同様の方法で融合蛋白との反応性を検討した. 陽性コントロールとして, 1 次抗体に抗 MBP 家兎抗体（New England BioLabs 社, 1：5000 希釈), 2 次抗体にアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体（Promega 社, 1：7500 希釈）を用いた.

14. 抗 FBP-A 抗体陽性例の臨床的特徴の検討

RA における, 抗 FBP-A 抗体陽性例と陰性例を層別化し, 臨床的特徴に統計的有意差があるかどうか, Fisher の完全確率を計算し比較検討した.

結　果

1. HeLa 細胞を抗原に用いた免疫ブロット法

第2図. HeLa 細胞を抗原とした免疫ブロット法による自己抗体の検出. RA 血清 20 例の結果を示す. レーン 1-10 は 60 kD 蛋白, レーン 6-14 は 45 kD 蛋白, レーン 13-20 は 75 kD 蛋白と特異的な反応を示した.（Nojima T et al：Jpn J Rheumatol 6：189-200, 1996 の figure 3 を, 許可を得て転載).（Mr：分子量マーカー）

第2表　免疫ブロット法により新たに見出された自己抗体のリウマチ性疾患における頻度

	症例数	抗 60 kD 抗体	抗 45 kD 抗体	抗 75 kD 抗体
RA	(42)	15 (36%)	10 (24%)	8 (19%)
SLE	(32)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)
SSc	(10)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
PM/DM	(9)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)
健常人	(9)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

(Nojima T et al：Jpn J Rheumatol 6：189-200, 1996 の table 1 を許可を得て一部改変転載)

RA 患者血清 42 例中 33 例（79%）で様々な HeLa 細胞由来の蛋白との反応がみられた. これらのうち未知の抗原である 60 kD 蛋白, 45 kD 蛋白, 75 kD 蛋白が複数の血清によって認識され, それぞれ 15 例（36%), 10 例（24%), 8 例（19%）と高頻度であった（第2図). しかし, これらの抗原はいずれも非 RA 血清および健常人血清ではほとんど認識されず, わずかに 60 kD 蛋白が SLE32 例中 1 例, 75 kD 蛋白が皮膚筋炎 9 例中 1 例で認識された（第2表).

2. cDNA ライブラリーからのクローニング

cDNA ライブラリーファージ 1×10^6 個のスクリーニングにより RA 患者混合血清と反応する 24 個のクローンを単離した. スクリーニングで得られたクローンの cDNA を, カルパスタチン cDNA との異同についてハ

第3図　プローブ血清と反応する自己抗原をコードするcDNA．スクリーニングで得られた陽性クローンRA5, RA9, RA21のDNAをEcoRI処理後，アガロース電気泳動で分画した．各クローンのインサートcDNAはそれぞれ0.85 kb, 1.1kb, 0.7kbであった．

イブリダイゼーションを行い，24個のクローンのうち4個がカルパスタチンcDNAであることが明らかとなった．また，カルパスタチン以外の，cDNAクローンについて異同を確認したところ，3種のcDNAクローン（RA5, RA9, RA21）が確認され，各クローンのインサートは各々，0.85kb, 1.1 kb, 0.7 kbであった（第3図）．

3. RAプローブ血清によるβGal-融合蛋白の反応

各陽性クローンによりコードされるcDNAより発現させたβGal-融合蛋白を抗原として，スクリーニングに用いたRA患者混合プローブ血清と抗βGal-モノクローナル抗体を用い免疫ブロットを行った．スクリーニングで得られた陽性クローンRA5, RA9, RA21由来の融合蛋白は，RA患者混合プローブ血清および抗βGalモノクローナル抗体と反応することが確認された（第4図）．

第4図　免疫ブロット法によるβgal-融合蛋白とプローブ血清との反応．精製した陽性クローンRA5, RA9, RA21より発現させたβGal-融合蛋白を抗原として，スクリーニングに用いたRA患者混合プローブ血清と抗βGalモノクローナル抗体との反応が確認された．（Pt：RA患者混合プローブ血清，Mo：抗β-Galモノクローナル抗体）

4. 膠原病患者血清によるβgal-融合蛋白の反応

次にあらかじめ大腸菌抗体を吸収した膠原病患者血清（RA 64例，SLE 36例，SSc 18例，PM/DM 18例）および健常人9例と各陽性クローンの融合蛋白との反応が確認された．

第5図　免疫ブロット法によるRA5, RA9, RA21融合蛋白とRA患者血清との反応．大腸菌で吸収したRA患者血清と陽性クローンの融合蛋白との反応性を免疫ブロット法で検討した．(A) RA5融合蛋白はRA患者10例と反応が確認された(lane 1-10)．(B) RA9融合蛋白はプローブ血清1例が反応したのみであった（lane 1）．(C) RA21融合蛋白は多くのRA患者血清との反応が確認された（lane1-12）．(FP：融合蛋白)

第3表　膠原病患者血清のβgal-融合蛋白との反応性

	症例数	RA5	RA9	RA21
RA	(64)	10 (16%)	1 (2%)	23(36%)
SLE	(36)	0 (0%)	1 (3%)	9(25%)
SSc	(18)	0 (0%)	0 (0%)	2(11%)
PM/DM	(18)	1 (6%)	0 (0%)	4(22%)
健常人	(9)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)

応性を免疫ブロット法で検討した．その結果，RA5融合蛋白はRA64例中10例（16%）で陽性となり（第5図A），SLE, SSc, PM/DMに比し高頻度であった（第3表）．RA9融合蛋白はプローブに用いたRA 1例（2%）と，SLE 1例（3%）のみが反応した（第5図B，第3表）．RA21融合蛋白はRA 23例（36%），SLE 9例（25%），SSc 2例（11%），PM/DM 4例（22%）が陽性で，広く膠原病患者血清と反応した（第5図C，第3表）

5.　RA-5, 9, 21をコードするcDNAのシークエンシング

RA-5, 9, 21のインサートcDNAの塩基配列および推

```
RA5   :   1  ESKIREHLEKKGPQVRDWSHYFKIIEDLRAQIFANTVDNARIVLQIDNARLAADDFRVKY  60
             ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CK-18: 109  ESKIREHLEKKGPQVRDWSHYFKIIEDLRAQIFANTVDNARIVLQIDNARLAADDFRVKY  168

RA5   :  61  ETELAMRRSVENDIHGLRK  79
             ::::::: ::::::::::::
CK-18: 169  ETELAMRQSVENDIHGLRKVIDDTNITRLQLETEIEALKEELLFMKKNHEEEVKGLQAQI  228

CK-18: 229  ASSGLTVEVDAPKSQDLAKIMADIRAQYDELARKNREELDKYWSQQIEESTTVVTTQSAE  288

RA5   :                                          233  YALVMEQLNGILLHLESE  240
                                                      ::: ::::::::::::::
CK-18: 289  VGAAETTLTELRRTVQSLEIDLDSMRNLKASLENSLREVEARYALQMEQLNGILLHLESE  348

RA5   : 241  LAQT-GRGQCQVQEYEALLNIKVKLEAEIATYRRLLEDGEDFSLGDALDSSNSMQTIGKT  300
             ::::   :: : ::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::
CK-18: 349  LAQTRAEGQRQAQEYEALLNIKVKLEAEIATYRRLLEDGEDFNLGDALDSSNSMQTIQKT  408

RA5   : 301  TT  302
             ::
CK-18: 409  TTRRIVDGKVVSETNDTKVLRH  430
```

第6図　RA5とヒトサイトケラチン-18（CK-18）のアミノ酸配列の相同性．RA5 cDNAより推定されるアミノ酸配列はCK-18と95.6%の相同性を認めた．塩基レベルでも97.0%の相同性を認めた．

第4表　抗CK-18抗体陽性RAの臨床特徴

臨床特徴	抗CK-18抗体 陽性（10例）	抗CK-18抗体 陰性（54例）	p値
男：女	4：6	12：42	n.s.
発症年齢（歳）	53.3±9.75	44.8±14.6	p=0.09
罹病期間（月）	70±60.9	103±89.6	n.s.
関節症状			
朝のこわばり（>1hr）	6 (60%)	30 (56%)	n.s.
腫脹関節数	0.63±0.48	0.8±1.42	n.s.
疼痛関節数	3.75±4.24	3.63±3.27	n.s.
レントゲン変化	7 (70%)	42 (78%)	n.s.
Stage	2.00±1.00	2.57±1.21	p=0.08
(I, II, III, IV)	(4, 3, 2, 1)	(13, 17, 4, 20)	
Class	1.40±0.49	1.70±0.68	n.s.
(I, II, III, IV)	(6, 4,0 , 0)	(23, 24, 7, 0)	
関節外症状			
レイノー現象	1 (10%)	8 (15%)	n.s.
皮下結節	1 (10%)	7 (13%)	n.s.
血管炎	1 (10%)	5 (10%)	n.s.
間質性肺炎	0 (0%)	3 (6%)	n.s.
シェーグレン症候群	2 (20%)	6 (11%)	n.s.
検査所見			
赤沈（mm/hr）	44.8±4.24	57.8±36.4	n.s.
CRP（mg/dl）	2.37±1.79	2.25±2.90	n.s.
貧血	2 (20%)	8 (15%)	n.s.
RF陽性	9 (90%)	39 (72%)	n.s.
抗核抗体陽性	4 (40%)	27 (50%)	n.s.

```
RA9  :   1 NSNDYGYGGGKRPLEDGDGPDAKKVAPQNDSFGTQLPPMHQQQRSVMTEEYKVPDGMVGF 60
           ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
FBP  :  54 NSNDYGYGGGKRPLEDGDGPDAKKVAPQNDSFGTQLPPMHQQQRSVMTEEYKVPDGMVGF 113

RA9  :  61 IIGRGGEQISRIQGESGCKIQIAPDSGGLPERSGMLTGTPESVQSAKRLLDQIVEKGRPA 120
           ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
FBP  : 114 IIGRGGEQISRIQGESGCKIQIAPDSGGLPERSGMLTGTPESVQSAKRLLDQIVEKGRPA 173

RA9  : 121 PGFHHGDGPGNAVQEIMIPASKAGLVIGKGGETIKQLQERAGVKMVMIQDGPQNTGADKP 180
           ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
FBP  : 174 PGFHHGDGPGNAVQEIMIPASKAGLVIGKGGETIKQLQERAGVKMVMIQDGPQNTGADKP 233

RA9  : 181 LRITGDPYKVQQAKEMVLELIRDQGGFREVRNEYGSRIGGNEGIDVPIPRFAVGIVIGRN 240
           ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
FBP  : 234 LRITGDPYKVQQAKEMVLELIRDQGGFREVRNEYGSRIGGNEGIDVPIPRFAVGIVIGRN 293

RA9  : 241 GEMIKKIQNDAGVRIGFKPDDGTTPERIAQITGPPDRCQHAAEIITDLLRSVQAGNPGGP 300
           ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
FBP  : 294 GEMIKKIQNDAGVRIGFKPDDGTTPERIAQITGPPDRCQHAAEIITDLLRSVQAGNPGGP 353

RA9  : 301 GPGGRGRGRGQGNWNMGPPGGLQEFNFIVPTGKTGLIIGKGGETIKSISQQSGARIELQR 360
           ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
FBP  : 354 GPGGRGRGRGQGNWNMGPPGGLQEFNFIVPTGKTGLIIGKGGETIKSISQQSGARIELQR 413

RA9  : 361 NPPPNADPNMKLFTIRGTPQQIDYARQLIEEKI 393
           ::::::::::::::::::::::::::::::::
FBP  : 414 NPPPNADPNMKLFTIRGTPQQIDYARQLIEEKI 446
```

第7図　RA9 と c-myc far upstream element binding protein（FBP）のアミノ酸配列の相同性．RA9 cDNA より推定されるアミノ酸配列は FBP のアミノ酸配列と 100%の相同性を認めた．塩基レベルでも 100%の相同性を認めた．

```
RA21        :   1 SSISSEQKFDDKYDALKEEASPVPLTSNVGSTVKGGQNSTAASTKYDVFRQLSLEGSGLG 60
                  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
γ synergin  : 700 SSISSEQKFDDKYDALKEEASPVPLTSNVGSTVKGGQNSTAASTKYDVFRQLSLEGSGLG 759

RA21        :  61 VEDLKDNTPSGKSDDDFADFHSSKFSSINSDKSLGEKAVAFRHTKEDSASVKSLDLPSIG 120
                  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
γ synergin  : 760 VEDLKDNTPSGKSDDDFADFHSSKFSSINSDKSLGEKAVAFRHTKEDSASVKSLDLPSIG 819

RA21        : 121 GSSVGKEDSEDALSVQFDMKLADVGGDLKHVMSDSSLDLPTVSGQHPPAA 170
                  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
γ synergin  : 820 GSSVGKEDSEDALSVQFDMKLADVGGDLKHVMSDSSLDLPTVSGQHPPAA 869

RA21        : 171 GSGSPSATSILQKKETSFGSSENITMTSLSKVTTFVSEDALPETTFPALASFKDTIPQTS 230
                  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
γ synergin  : 916 GSGSPSATSILQKKETSFGSSENITMTSLSKVTTFVSEDALPETTFPALASFKDTIPQTS 975

RA21        : 231 EQKEYENRDYKDFTKQDL 248
                  ::::::::::::::::::
γ synergin  : 976 EQKEYENRDYKDFTKQDL 993
```

第8図　RA21 とγsynergin（AP1γ結合蛋白）のアミノ酸配列の相同性．　RA21 cDNA より推定されるアミノ酸配列は γsynergin のアミノ酸配列と 100%の相同性を認めた（但し，配列の一部が欠失していた）．

第9図　免疫ブロット法による MBP-FBP 融合蛋白とプローブ血清との反応．免疫ブロット法による MBP-FBP 融合蛋白とプローブ血清との反応では，DNA 結合部位である K homology を 2 個含む FBP の N 末側をコードする MBP-FBP-A 蛋白（A）と強い反応が確認されたが，C 末側の MBP-FBP-P 蛋白(P)，全長の約 8 割をカバーする MBP-FBP-L 蛋白（L）はプローブ血清との反応が弱かった．

定アミノ酸配列を，第 6，7，8 図に示した（第 6，7，8 図）．これらの配列について GenBank データベースとのホモロジーサーチを行い，RA5, 9, 21 蛋白はそれぞれサイトケラチン-18（CK-18）[14]，FBP，γsynergin（AP1γ結合蛋白）[15]と考えられた．

6. 抗 CK-18 抗体陽性 RA の臨床特徴

抗 CK-18 抗体陽性 RA 10 例について，臨床的特徴を同抗体陰性 RA 54 例と比較検討した．有意差こそ無いものの，陽性例の発症年齢が平均 53.3 歳と，陰性例 44.8 歳よりやや高齢で，陽性例の Stage[16]が 2.00±1.00（陰性例 2.57±1.21）と骨破壊が進行していないことが確認された．関節外症状および検査所見については，抗 CK-18 抗体陽性例に明らかな特徴は認められなかった（第 4 表）．

7. 免疫ブロット法による MBP-FBP 融合蛋白とプローブ血清との反応性

免疫ブロット法による MBP-FBP 融合蛋白とプローブ血清との反応では，DNA 結合部位である K homology を 2 個含む FBP の N 末側をコードする FBP-A に強い反応が確認されたが，C 末側の FBP-P，全長の約 8 割をカバーする FBP-L はプローブ血清との反応が弱かった（第 9 図）．

8. 膠原病患者血清と MBP-FBP-A 融合蛋白（FBP-A）との反応性

大腸菌抗体を吸収した膠原病患者血清（RA64 例，

第10図　RA患者血清とMBP-FBP-A融合蛋白（FBP-A）との反応．免疫ブロット法により，大腸菌抗体を吸収したRA患者血清においてFBP-Aとの反応性が確認された(lane 1-6)．(FP：融合蛋白)

SLE27例）および健常人9例とFBP-Aとの反応性を免疫ブロット法で検討した．その結果，FBP-AはRA64例中9例（14.1%）が反応し，SLE 1例（3.7%）に比し高頻度であった（第10図）．

9.　抗FBP-A抗体陽性RAの臨床特徴

抗FBP-A抗体陽性9例について，臨床的特徴を同抗体陰性55例と比較検討したところ，有意な検査所見として赤沈値が低いことが判明した．また，有意差は明らかでないものの，罹病期間が短く，Stageが進行しておらず，CRP値が低い傾向が認められた（第5表）．

考　察

膠原病は血清中に自己のさまざまな細胞成分に対する自己抗体を持っている．RAもSLE, SSc, PM/DMなど他の膠原病と同様に自己免疫現象をともなう自己免疫疾患であり，従来RAではRFを除くと自己抗体検出率が低く，再現性にも問題があったが，近年RAにおいても種々の自己抗体が報告されている．

1.　HeLa細胞を抗原に用いた免疫ブロット法によるRA特異自己抗体の検索

今回の研究でヒト由来のHeLa細胞を抗原とし，免疫ブロット法という高感度検出法を用いて自己抗体を検

第5表　抗FBP-A抗体陽性RAの臨床特徴

臨床特徴	抗FBP抗体 陽性（9例）	抗FBP抗体 陰性（55例）	p値
男：女	4：5	12：43	n.s.
発症年齢（歳）	49.7±15.4	45.6±14.0	n.s.
罹病期間（月）	60.1±43.9	104.2±90.2	p=0.08
関節症状			
朝のこわばり（>1hr）	6（67%）	30（55%）	n.s.
腫脹関節数	0.55±0.68	0.81±1.41	n.s.
疼痛関節数	3.56±1.89	3.66±3.60	n.s.
レントゲン変化	6（67%）	43（78%）	n.s.
Stage	1.89±0.99	2.58±1.20	p=0.06
(I, II, III, IV)	(4, 3, 1,1)	(13, 17, 5, 20)	
Class	1.55±0.49	1.67±0.69	n.s.
(I, II, III, IV)	(4, 5, 0, 0)	(25, 23, 7, 0)	
関節外症状			
レイノー現象	0（0%）	9（16%）	n.s.
皮下結節	1（11%）	7（13%）	n.s.
血管炎	0（0%）	6（11%）	n.s.
間質性肺炎	0（0%）	3（6%）	n.s.
シェーグレン症候群	1（11%）	7（13%）	n.s.
検査所見			
赤沈（mm/hr）	18.6±7.54	62.6±34.1	p<0.001
CRP（mg/dl）	1.11±0.90	2.47±2.94	p=0.09
貧血	2（22%）	8（15%）	n.s.
RF陽性	6（67%）	41（75%）	n.s.
抗核抗体陽性	5（56%）	26（47%）	n.s.

索したところ，RA患者血清42例中33例（79%）と高頻度に様々な自己抗体が検出された．このことからRAもSLE, SSc, PM/DMなど他の膠原病と同様に多彩な自己免疫現象をともなう自己免疫疾患であることが確認された．従来RAで自己抗体検出率が低かったのは，感度の低い検出法や主としてヒト以外の動物の臓器抽出物を用いていたことに原因があるものと思われる．

これまでに報告のない抗体として，未知の60 kD, 45 kDおよび75 kD蛋白に対する抗体がRAに検出されたことが注目された．これらの抗体はいずれも非RA血清ではほとんど検出されず，RA特異抗体である可能性が示唆された．抗60 kD蛋白抗体はSLE 32例中1例，抗75 kD蛋白抗体は皮膚筋炎9例中1例に検出されたが，いずれもRAにおける出現頻度よりも有意に低値であった．このうち，抗75 kD蛋白抗体陽性の皮膚筋炎例では，RA様の骨破壊性関節炎を伴っており，抗75 kD抗体はRAに特異的と考えて差し支えないと考えられた．

Mimoriらは，RA特異的自己抗体（抗60 kD蛋白抗体）が陽性とされた血清を用いて，それらの対応自己抗原をコードするcDNAのクローニングを行い，60 kD蛋白がカルシウム依存性中性プロテアーゼ（カルパイン）の特異的内在性阻害蛋白であるカルパスタチンであることを突き止めた[17]．さらに，カルパスタチンへの自己抗体の結合がカルパスタチンのカルパイン阻害活性を抑制し，カルパインのプロテアーゼ活性を亢進させることによってRAの病態に関与する可能性を示した[17,18]．

2. RAにおける特異自己抗体の対応抗原クローニング

今回プローブとして用いたRA患者血清（抗45 kD蛋白抗体および抗75 kD蛋白抗体陽性）と反応することが確認されたRA5, 9, 21クローンは，それぞれサイトケラチン-18（CK-18），c-myc FUSE-結合蛋白（FBP），γsynergin（AP1γ結合蛋白）と考えられた．また，これらのアミノ酸配列から推定される分子量よりCK-18は抗45 kD蛋白抗体の，そしてFBPは抗75 kD蛋白抗体の対応抗原と考えられた．

これまでにRAに特異的に出現する自己抗体として，抗Hat-1抗体[19]，抗RA33抗体[20]，抗Sa抗体[21]，抗カルパスタチン抗体[17]，抗フィラグリン/CCP抗体[22,23]，抗gp130-RAPS抗体[24]，が報告されている．抗RA33抗体はhnRNPの構成成分であるA2蛋白（33 kD）蛋白を抗原とする自己抗体で，抗Sa抗体はvimentinとの相同性が認められる50 kD蛋白を抗原とする抗体である．抗フィラグリン/CCP抗体はサイトケラチンフィラメントの凝集に関与するフィラグリン（約40 kD）に対する自己抗体で，フィラグリン分子上のシトルリン残基（CCP）が自己抗体のエピトープとされる．抗gp130-RAPS抗体はinterleukin-6のシグナル伝達物質であるgp130のスプライシングバリアントで約50 kD蛋白である．また，抗Hat-1抗体は150 kD蛋白を抗原としており，我々が示した免疫ブロッティングでの分子量ならびにアミノ酸配列から類推される分子量とは一致せず，抗原としては異なるものと考えられた．

3. RA特異的自己抗体の臨床的意義

自己抗体の産生機序は自己免疫疾患の病因および発症の基本的メカニズムと密接に関与していると考えられている．今回検出されたRAの自己抗体が認識する抗原蛋白の機能を理解することは，RAの病因および自己抗体産生機序を理解する上で重要な意義を持つものと思われ，CK-18, FBP, γsynerginについて，生理的意義ならびにそれらに対する自己抗体の，RAにおける病因・病態への関連について考案する．

1）CK-18のRAにおける意義

CK-18は細胞骨格を形成する中間径フィラメントであるケラチンファミリーの一つで，上皮系細胞に広く発現し滑膜組織内の内皮細胞での発現が確認されている[25]．サイトケラチンは他の細胞骨格線維と密接に関連しながら，細胞形態・細胞運動・細胞分裂を制御すると考えられているが，滑膜組織中でのCK-18の生理的意義についてはこれまで明らかとはなっていない．

抗ケラチン抗体は間接蛍光抗体法によりRA患者血清中に存在することが既に報告されている[26]．牛の肝臓より抽出したCK-18を用いたELISA法により，RAおよび変形性関節症患者（OA）における抗CK-18抗体が検討され，RA患者ではIgA型抗CK-18抗体が39.6%とOAに比し有意に高頻度であると報告されている[27]．

我々が免疫ブロット法によりヒトCK-18を抗原としたIgG型抗体を検出したところ，RA64例中10例（16%）が陽性で他の膠原病ではほとんど検出されず，RAに特異性が高いと考えられた．

抗CK-18抗体陽性10例について，臨床的特徴を同抗体陰性例と比較検討したところ，陽性例の発症年齢は平均53.3歳と，陰性例44.8歳よりやや高齢で，陽性例の骨破壊のStageが2.00±1.00（陰性例2.57±1.21）と進行していない傾向が見られた．しかし，関節外症状および検査所見については，抗CK-18抗体陽性例に明らかな特徴は認められなかった．

RAでは滑膜組織に浸潤した炎症細胞からの炎症性メディエーターやセリンプロテアーゼ産生，そして滑膜組織からのマトリックスメタロプロテアーゼの発現により，軟骨組織の破壊が進行する．軟骨細胞の細胞骨格蛋白の分解や軟骨組織破壊の際に，抗原提示が行なわれている可能性がある．また，CK-18はRAの病因の一つとも考えられているEBウイルスの核蛋白p62とのアミノ酸相同性を2箇所（アミノ酸残基13（62-74），15（54-68）それぞれ53.8%，53.3%）で認めており，これまでに報告された多くの自己抗原蛋白とウイルス蛋白のアミノ酸相同性の報告と同様に，ウイルス蛋白との交差反応が自己抗体産生のトリガーになる可能性が示唆される[27,28]．

RAでは従来の抗ケラチン抗体と同時に核周囲因子（perinuclear factor）と呼ばれる自己抗体が同時に出現しやすいことが知られてきた[29]．近年これらの対応抗原としてサイトケラチンフィラメントの凝集に関与するフィラグリン（filaggrin）が報告され[22]，アルギニンがシトルリンに変換されたフィラグリン分子上のシトルリン残基（CCP）がRAの自己抗体（抗CCP抗体）が認識するエピトープとして重要であると示されている[23]．CK-18のシトルリン化の有無はこれまで明らかにされてはおらず，本研究で確認された抗CK-18抗体と抗フィラグリン/CCP抗体との関連性については明らかではない．

2）FBPのRAにおける意義

c-myc far upstream element binding protein（FBP）は，前癌遺伝子c-mycの1.5kb上流に結合し，c-myc蛋白の発現さらには細胞増殖を調節している[30]．c-mycはRAの関節病態で重要な役割を担っており，c-mycの発現を調節するFBPは，注目すべき自己抗原であると考えられる．

RAは多発関節炎を主症状とし，滑膜細胞が腫瘍様に異常増殖することが特徴とされ，この異常増殖した滑膜が軟骨や骨を破壊すると考えられている．滑膜異常増殖の原因として，Myc, Rasなど前癌遺伝子の過剰発現が示唆され[31]，c-mycのアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることで，RAの滑膜細胞にアポトーシスを誘導するという報告もあり，RAの滑膜組織でのc-myc発現調節は滑膜増殖を左右する重要な役割を担っていると考えられる[32]．また，RAの関節内軟骨細胞のアポトーシスの際にc-mycの発現を認める報告もあり[33]，RAの関節局所におけるc-mycの病態への関与，および自己免疫現象との関連が注目される．

今回クローニングしたRA9はFBPの185-1432をコードする部分cDNAであり，λgt11ライソゲンとして発現したβgal融合蛋白を抗原に用いた免疫ブロットでは，RA 1例，SLE 1例にしか反応性が認められなかった．しかし，PCRクローニングを行い，192-975をコードするMBP-FBP-A融合蛋白（FBP-A）を抗原に用いて免疫ブロットに用いたところ，RA64例中9例（17%）に反応性が確認された．FBPの185-1432をコードするRA9蛋白がRA1例（プローブ血清のみ）しか反応していなかったにもかかわらず，RA9よりも短い192-975をコードするFBP-AがRA9例と反応した理由として，FBP-AのC末端が，DNA結合ドメイン（K Homology）を途中までしかコードしておらず，ドメインの構造が変化することで新たなエピトープが出現した可能性が考えられた．このことは，シェーグレン症候群の特異自己抗原として知られるαフォドリンが，240 kDテトラマーの骨格蛋白構造からアポトーシスにより限定的に分解処理されることで抗原として認識されることに類似している[34]．なお，今回作製したMBP-(FBP-P,FBP-L)-融合蛋白は免疫ブロットにおいて標準血清との反応性が弱く，また他の血清との反応性も弱かったため陽性陰性の評価が困難であった．

抗FBP-A抗体陽性9例，陰性55例で層別化し，臨床所見を検討したところ，陽性例では赤沈値が有意に低いことが明らかとなり，さらに罹病期間が短く，Stageが進行しておらず，CRP値が低い傾向が認められた．RAの骨破壊の病期を表すX線所見のstagingにおいて，stageI 17例の中で4例（23.5%）が陽性であり，stageII以上の47例中では5例（10.6%）と頻度が低く，抗FBP-A抗体陽性例はRA骨破壊病態の初期，もしくは軽症例において見出される自己抗体である可能性が考えられた．すなわち，抗FBP-A抗体を確認することで骨破壊の進行の遅いRAサブセットを見極められる可能性があり，RAにおける初期治療を選択する上で有用な情報となる可能性が示唆されたことは興味深い．

FBPはDNA helicase活性をもち，DNA helicase Vと同一蛋白であることが示されている[35]．これまでに，膠原病患者にみられる抗DNA/RNA helicase抗体として，重複症候群における抗Ku（DNA helicase II）抗体[36]，皮膚筋炎における抗Mi-2（SNF2/RAD 54 helicase family）抗体[37]，強皮症における抗RNA helicase II/Gu抗体[38]，自己免疫性肝炎における抗TIP49抗体[39]，ループス腎炎における抗RNA helicase A抗体[40]が報告されており，われわれが見出した抗FBP（DNA helicase V）抗体が6つめの報告となる（第6表）．

第6表　膠原病患者にみられる抗DNA/RNA helicase抗体

抗　原	膠原病	文　献
Ku (DNA helicase II)	重複症候群	Mimori et al, 1981
Mi-2 (SNF2/RAD 54 helicase family)	皮膚筋炎	Seelig et al, 1995
RNA helicase II/Gu	強皮症	Valdez et al, 1996
TIP49 (DNA helicase)	自己免疫性肝炎	Makino et al, 1998
RNA helicase A	ループス腎炎	Suwa et al, 2000
FBP (DNA helicase V)	RA	Nojima et al

FBPは生命現象に重要な役割を持つDNA helicaseであるとともに，関節での滑膜細胞増殖 や軟骨細胞アポトーシスの際に発現するc-mycの調節因子である．本抗体のRAにおける臨床的意義を明らかにするためには，本抗体陽性例の臨床経過を注意深く観察するとともに，早期RAにおける陽性頻度・臨床特徴の解析を進め，RAの活動性・臨床経過との関連を検討するために，定量が可能なELISAの開発が必要と考えられた．

3) γsynerginのRAにおける意義

γsynerginは，EHドメインをもつ内在性蛋白質で，細胞質やゴルジ体膜のγアダプチン（AP-1を構成するサブユニットの一つ）に結合することから，ゴルジ体からエンドソームへのオルガネラ間のクラスリン/AP-1小胞輸送において，重要な役割を担っていると考えられている[15]．そして，EHドメインを有することから，クラスリンを介するepidermal growth factor（EGF）受容体のエンドサイトーシス制御への関与が示唆される[41]．

γsynerginはスプライシングバリアントが多数あり分子量は110-190 kDとされるが，スクリーニング時の免疫ブロット法によるRA血清とHeLa細胞蛋白との反応では，110-190 kDに相当するバンドは8例（19%）のみであった（data not shown）．RA21を用いた検討では，γsynerginに対する自己抗体はRAの36%と高頻度に検出されているが，他の膠原病においても11-25%に検出され，RAにおける特異性は低かった．γsynerginに対する自己抗体が膠原病の病因・病態にどのように関連するかはいまのところ不明であるが，サイトカイン受容体ファミリーのシグナル伝達を担い，軟骨細胞や血管内皮細胞で強発現しているfps/fesチロシンキナーゼがγアダプチンと発現局在を同じくすることや，小胞輸送がアクチン細胞骨格の再編成や細胞運動に影響することより，γsynerginが関節炎局所での滑膜・軟骨病変に関与する可能性が示唆され，興味深い自己抗原であると考えられた[42]．

総　括

HeLa細胞を抗原に用いた免疫ブロット法によりRA特異自己抗体の検出を行い，新たな自己抗体が対応する自己抗原遺伝子cDNAのクローニングを進め，その臨床的・病因的意義を追求した．

1. HeLa細胞抽出物を抗原とした検出感度の高い免疫ブロット法を用いたところ，RA患者血清42例中33例（79%）でさまざまなHeLa細胞由来の蛋白との反応がみられた．これらのうち，未知の抗原である60 kD蛋白は15例（36%），45 kD蛋白は10例（24%），75 kD蛋白は8例（19%）と高頻度で，いずれも非RA膠原病患者血清および健常人血清ではほとんど認識されず新しいRA特異自己抗原と考えられた．

2. RA特異自己抗体と考えられる抗45 kD蛋白抗体および抗75 kD蛋白抗体陽性のRA患者血清をプローブとして，対応自己抗原遺伝子cDNAのクローニングを行ったところ，3種のcDNAクローン（RA5，RA9，RA21）が分離され，RA5, 9, 21蛋白はそれぞれサイトケラチン-18（CK-18），c-myc FUSE結合蛋白（FBP），γsynergin（AP1γ結合蛋白）と同定された．これらのアミノ酸配列から推定される分子量よりCK-18は抗45 kD蛋白抗体の，そしてFBPは抗75 kD蛋白抗体の対応抗原と考えられた．

3. 抗CK-18抗体はRA 10例（16%）に陽性で，臨床的特徴を同抗体陰性RA 54例と比較検討したところ，陽性例の発症年齢平均53.3歳は陰性例44.8歳より高齢で，陽性例のStageが平均2で比較的骨破壊が進行していない傾向が認められた．

4. 抗FBP抗体はRA9融合蛋白に対してはRAとSLEの各1例しか反応が見られなかった．しかし，FBPの192-975をコードするMBP-FBP-A融合蛋白を抗原に用いて免疫ブロット行うと，RA 64例中9例（14%）に反応性が確認された．この抗FBP-A蛋白抗

体陽性RA 9例，陰性RA 55例で層別化し，臨床所見を比較すると，陽性例では赤沈値が有意に低いことが明らかとなり，罹病期間が短く，Stageが進行しておらず，CRP値が低い傾向が認められた．

5. γsynerginに対する自己抗体はRA 23例（36%）と高頻度に検出されたが，他の膠原病においても検出され，RAにおける特異性は低かった．

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内科学教室，池田康夫教授に深甚なる感謝の意を表します．また，本研究を直接御指導，御助言いただきました三森経世教授（京都大学大学院医学研究科臨床免疫学），さらに御協力いただきました慶應義塾大学医学部分子生物学教室の清水信義教授，蓑島伸生先生，内科学教室リウマチ研究室の諸先生に心より深謝いたします．

本論文の要旨は，第12回ヨーロッパリウマチ学会（2000年6月），第43，44回日本リウマチ学会（1998年5月，1999年6月）にて発表した．本研究の一部は，平成8年，9年慶應医学部研究奨励費，および平成10年，11年度文部省科学研究費補助金（特別研究員奨励費）により行われた．

文　献

1) 三森経世：抗核抗体研究の進歩：自己抗体が認識する核および細胞質蛋白の構造と機能．リウマチ 32：366-378, 1992
2) Harris ED Jr.：Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. N Engl J Med. 322 (18)：1277-89, 1990
3) Shmerling RH and Delbanco TL：The rheumatoid factor：an analysis of clinical utility. Am J Med. 91 (5)：528-34, 1991
4) 野島崇樹，鎌田麻衣子，松延　毅，木村　充，三森経世，松村麻実，藤井隆夫，秋月正史：慢性関節リウマチにおける自己抗体の検索.リウマチ 34：871-878, 1994
5) Nojima T, Kamata M, Matsunobu T, Kimura M, Mimori T, Matsumura M, Fujii T and Akizuki M：Detection of autoantibodies in sera from patients with rheumatoid arthritis. Jpn J Rheumatol 6：189-200, 1996
6) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medzger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL and Hunder GG：The 1987 revised ARA criteria for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 31：315-324, 1988
7) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N and Winchester RJ：The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 25：1271-1277, 1982
8) Masi AT, Rodnan G, Medzger TA, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF, LeRoy EC, Kirsner AB, MacKenzie AH, McShane DJ, Myers AR and Sharp GC：Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis Rheum 23：581-590, 1980
9) Bohan A and Peter JB：Polymyositis and dermatomyositis. N Engl J Med 292：344, 1975
10) Towbin H, Staehelin T and Gordon J：Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets：procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76：4350-4354, 1979
11) Young RA and Davis RW：Efficient isolation of genes by antibody probe. Proc Natl Acad Sci USA 80：1194-1198, 1983
12) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR：DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74：5463-5467, 1977
13) Duncan R, Bazar L, Michelotti G, Tomonaga T, Krutzsch H, Avigan M and Levens D：A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. Genes Dev 8 (4)：465-480, 1994
14) Leube RE, Bosch FX, Romano V, Zimbelmann R, Hofler H and Franke WW：Cytokeratin expression in simple epithelia. III. Detection of mRNAs encoding human cytokeratins nos. 8 and 18 in normal and tumor cells by hybridization with cDNA sequences *in vitro* and in situ. Differentiation 33 (1)：69-85, 1986
15) Page LJ, Sowerby PJ, Lui WW and Robinson MS：γ-synergin：an EH domain-containing protein that interacts with gamma-adaptin. J Cell Biol 146 (5)：993-1004, 1999
16) Steinblocker O, Treager G and Batterman：Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. JAMA 140：659-662, 1949
17) Mimori T, Suganuma K, Tanami Y, Nojima T, Matsumura M, Fujii T, Yoshizawa T, Suzuki K and Akizuki M：Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. Proc Natl Acad Sci USA 92：7267-7271, 1995
18) Kanazawa Y, Kaneshiro U, Sawa M, Yasuoka H, Nojima T, Ohosone Y and Mimori T：Domain reactivity of autoantibodies to calpastatin in patients with systemic rheumatic diseases. Modern Rheumatology 10：38-44, 2000
19) Abe Y, Inada S and Torikai K：A new autoantibody in patients with rheumatoid arthritis：Characterization of the anti Hat-1 antibody system. Arthritis Rheum 31：135-139, 1988
20) Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, Kolarz G,

Scherak O, Graninger W, Thumb N and Smolen JS : Demonstration of a new antinuclear antibody (Anti RA33) : That is highly specific for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 32 : 1515-1520, 1989

21) Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ and Menard HA : The Sa system : a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. J Rheumatology 21 (6) : 1027-33, 1994

22) Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ and Serre G : The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest 95 (6) : 2672-9, 1995

23) Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB and van Venrooij WJ : Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest 101 (1) : 273-81, 1998

24) Tanaka M, Kishimura M, Ozaki S, Osakada F, Hashimoto H, Okubo M, Murakami M and Nakao K : Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. J Clin Invest 106 (1) : 137-44, 2000

25) Cooper D, Schermer A and Sun TT : Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins : strategies, applications, and limitations. Lab Invest 52 (3) : 243-56, 1985

26) Kurki P, Aho K, Palosuo T and Heliovaara M : Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. Arthritis Rheum 35 (8) : 914-7, 1992

27) Borg AA, Dawes PT and Mattey DL : Increased levels of IgA antibodies to cytokeratin-18 and epidermal keratin in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 36 (2) : 229-33, 1993

28) Sulitzeanu D and Anafi M : EBV, molecular mimicry and rheumatoid arthritis : a hypothesis. Immunol Lett 20 (2) : 89-92, 1989

29) Nienhuis RL and Mandema E : A New serum factor in patients with rheumatoid arthritis ; The antiperinuclear factor. Ann Rheum Dis 23 : 302-5, 1964

30) He L, Liu J, Collins I, Sanford S, O'Connell B, Benham CJ and Levens D : Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression. EMBO J 19 (5) : 1034-44, 2000

31) Trabandt A, Gay RE and Gay S : Oncogene activation in rheumatoid synovium. APMIS 100 (10) : 861-75, 1992

32) Hashiramoto A, Sano H, Maekawa T, Kawahito Y, Kimura S, Kusaka Y, Wilder RL, Kato H, Kondo M and Nakajima H : C-myc antisense oligodeoxynucleotides can induce apoptosis and down-regulate Fas expression in rheumatoid synoviocytes. Arthritis Rheum 42 (5) : 954-62, 1999

33) Yatsugi N, Tsukazaki T, Osaki M, Koji T, Yamashita S and Shindo H : Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis : correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. J Orthop Sci 5 (2) : 150-6, 2000

34) Ulbricht KU, Schmidt RE and Witte T : Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. Autoimmun Rev 2 (2) : 109-13, 2003

35) Vindigni A, Ochem A, Triolo G and Falaschi A : Identification of human DNA helicase V with the far upstream element-binding protein. Nucleic Acids Res 29 (5) : 1061-7, 2001

36) Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S and Homma M : Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. J Clin Invest 68 (3) : 611-20, 1981

37) Seelig HP, Moosbrugger I, Ehrfeld H, Fink T, Renz M and Genth E : The major dermatomyositis-specific Mi-2 autoantigen is a presumed helicase involved in transcriptional activation. Arthritis Rheum 38 (10) : 1389-99, 1995

38) Valdez BC, Henning D, Busch RK, Woods K, Flores-Rozas H, Hurwitz J, Perlaky L and Busch H : A nucleolar RNA helicase recognized by autoimmune antibodies from a patient with watermelon stomach disease. Nucleic Acids Res 24 (7) : 1220-4, 1996

39) Makino Y, Mimori T, Koike C, Kanemaki M, Kurokawa Y, Inoue S, Kishimoto T and Tamura T : TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. Biochem Biophys Res Commun 245 (3) : 819-23, 1998

40) Suwa A, Hirakata M, Nojima T, Satoh S, Nakajima T and Mimori T : Autoantigenic epitopes targeted by autoantibodies to RNA helicase A in systemic lupus erythematosus. Annals of the Rheumatic Diseases 60 [suppll] : 102, 2001

41) Nakashima S, Morinaka K, Koyama S, Ikeda M, Kishida M, Okawa K, Iwamatsu A, Kishida S and Kikuchi A : Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. EMBO J 18 (13) : 3629-3642, 1999

42) Haigh J, McVeigh J and Greer P : The fps/fes tyrosine kinase is expressed in myeloid, vascular endothelial, epithelial, and neuronal cells and is localized in the trans-golgi network. Cell Growth Differ 7 (7) : 931-44, 1996

慶應医学　第81巻第２号号外
平 成 16 年 6 月 25 日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第１７２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　３月　８日 慶大博士甲第２２５９号	菊池　信太郎	昭和４５年　８月２４日
同 同　第２２６１号	小浦　貴裕	昭和４７年　１月　２日
同 同　第２２６２号	小西　正洋	昭和３７年１２月２２日
同 同　第２２６３号	佐藤　俊朗	昭和４７年１１月２４日
同 同　第２２６９号	野島　崇樹	昭和４６年　１月　８日
同 同　第２２７０号	阪埜　浩司	昭和４３年　１月　３日
同 同　第２２７５号	真鍋　知宏	昭和４７年　１月２３日
同 同　第２２７７号	安岡　秀剛	昭和４６年　４月１２日
平成１６年　３月２３日 慶大博士甲第２１８９号	櫻庭　茂樹	昭和５０年　５月　６日
同 同　第２２０２号	菊池　有利子	昭和５０年１１月１４日
同 同　第２２０４号	中本　伸宏	昭和４９年　３月１５日
同 同　第２２０６号	呂　彩子	昭和４７年　６月２６日
同 同　第２２５６号	石谷　健	昭和４４年　７月１６日
同 同　第２２５７号	伊藤　圭介	昭和５０年　６月２４日
同 同　第２２５８号	柏木　哲	昭和４４年　２月２１日
同 同　第２２６０号	光村　かの子	昭和４９年　１月１４日
同 同　第２２６４号	鈴木　正崇	昭和５１年　３月　９日
同 同　第２２６５号	張　強	昭和４４年１０月　７日

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成１６年　３月２３日 慶大博士甲第２２６６号	寺西貴英	昭和４２年１２月１０日
同 同　第２２６７号	土井知光	昭和５１年　８月１５日
同 同　第２２６８号	西山隆恒	昭和４８年１１月２６日
同 同　第２２７１号	平沢晃	昭和４５年　９月３０日
同 同　第２２７２号	藤田秀樹	昭和４９年　６月２４日
同 同　第２２７３号	前田卓哉	昭和４８年　６月１９日
同 同　第２２７４号	松田就人	昭和４８年　１月１３日
同 同　第２２７６号	森本陽子	昭和４６年　５月２０日
同 同　第２２７８号	矢作尚久	昭和４９年１０月１１日
同 同　第２２７９号	吉野純	昭和５０年　５月２４日
平成１６年　４月１２日 慶大博士甲第２２８１号	井上幸治	昭和４１年　３月　４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１６年　３月　８日 慶大博士乙第３７８６号	大塚友吉	昭和３９年　８月２９日
同 同　第３７８７号	髙木英惠	昭和４５年１２月２５日
同 同　第３７８８号	鄭智誠	昭和４０年　６月２７日
同 同　第３７８９号	山岸由幸	昭和４４年　４月２２日
平成１６年　４月１２日 慶大博士乙第３７９０号	淡谷典弘	昭和４１年　５月２６日
同 同　第３７９１号	日下部浩	昭和４１年　５月１６日
同 同　第３７９２号	竹下啓	昭和４３年　９月２０日
同 同　第３７９３号	前川裕一郎	昭和４５年　６月１０日
同 同　第３７９４号	山田ゆかり	昭和４０年　７月２８日
平成１６年　５月１０日 慶大博士乙第３７９７号	尾羽澤実	昭和４４年　７月１９日
同 同　第３７９８号	金治有彦	昭和４４年１０月１５日
同 同　第３７９９号	志津木健	昭和４４年　１月２３日
同 同　第３８００号	角田和之	昭和４３年　１月２５日
同 同　第３８０１号	吉田英彰	昭和４０年　１月１８日

目　次

菊池信太郎　マウスバゾプレッシンV1a，V1b受容体遺伝子のクローニングと解析 …… 7

小浦　貴裕　Anisotropic Conduction Properties in Canine Atria Analyzed by High-Resolution Optical Mapping. Preferential Direction of Conduction Block Changes From Longitudinal to Transverse With Increasing Age.
（高分解能光計測法によるイヌ心房筋における異方向性伝導特性の検討～加齢により伝導ブロックは筋線維走行に平行方向から直交方向へ変化する～） …… 8

小西　正洋　Ethanol Upregulates Pro-fibrogenic Connective Tissue Growth Factor（CTGF）Gene Expression in HepG2 Cells via Cytochrome P450 2E1-mediated Ethanol Oxidation.
（エタノールはチトクロームP4502E1により制御されるエタノール酸化系を介して、HepG2細胞における線維化関連遺伝子Connective tissue growth factor（CTGF）の発現をupregulateする） …… 9

佐藤　俊朗　Hyperexpression of Inducible Costimulator and Its Contribution on Lamina Propria T cells in Inflammatory Bowel Disease.
（炎症性腸疾患腸管粘膜内T細胞におけるInducible costimulatorの発現亢進とその役割） …… 10

野島　崇樹　関節リウマチに見出される新しい自己抗体の対応抗原分析および臨床的・病因的意義の解明 …… 11

阪埜　浩司　子宮体癌におけるDNAミスマッチ修復遺伝子異常とマイクロサテライト不安定性の解析 …… 12

眞鍋　知宏　Hypertrophic stimuli augment expression of cMG1/ERF-1, a putative zinc-finger motif transcription factor, in rat cardiomyocytes.
（さまざまな心肥大刺激はラット心筋細胞においてzinc-finger型転写因子cMG1/ERF-1の発現を誘導する） …… 13

安岡　秀剛　A Novel Protein Highly Expressed in Testis Is Overexpressed in Systemic Sclerosis Fibroblasts and Targeted by Autoantibodies.
（精巣で高発現する新規蛋白は強皮症線維芽細胞で高発現し、自己抗体の標的となる） …… 14

櫻庭　茂樹　Effects of neuromuscular blocking agents on central respiratory control in the isolated brainstem-spinal cord of neonatal rat.
（新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いた筋弛緩薬の中枢性呼吸調節機構への影響） …… 15

菊池有利子　Uptake of Cadmium in Meals from the Digestive Tract of Young Non-smoking Japanese Female Volunteers.
（日本人非喫煙若年女性ボランティアにおける食事中カドミウムの消化管からの取り込み） …… 16

中本　伸宏　A Free Radical Scavenger, Edaravone, Attenuates Steatosis and Cell Death via Reducing Inflammatory Cytokine Production in Rat Acute Liver Injury.
（新規ラジカル消去剤エダラボンは炎症性サイトカインの抑制を介してラット急性肝障害における脂肪化、細胞死を抑制する） …… 17

呂　彩子　急性広範性肺動脈血栓塞栓症52剖検例の法医病理学的研究 …… 18

石谷　健　転写共役因子p54^{nrb}による男性ホルモン受容体転写制御機構の解析 …… 19

伊藤　圭介　Induction of Apoptosis in Leukemic Cells by Homovanillic Acid Derivative, Capsaicin, through Oxidative Stress：Implication of Phosphorylation of p53 at Ser-15 Residue by Reactive Oxygen Species.
（ホモバニリンサン誘導体カプサイシンによる白血病細胞のアポトーシス誘導：活性酸素によるp53セリン15リン酸化の意義） …… 20

柏木　哲　Nonendothelial Source of Nitric Oxide in Arterioles But Not in Venule : Alternative Source Revealed In Vivo by Diaminofluorescein Microfluorography.
（細動脈における非血管内皮由来の一酸化窒素分画と細静脈における内皮由来の分画の重要性について：一酸化窒素感受性蛍光色素を用いた生体内顕微鏡の適応により解明された微小循環床における一酸化窒素の多様な産生源）…… 21

光村かの子　Different Roles of p38 MAPK and ERK in STI571-Induced Multi-Lineage Differentiation of K562 Cells.
（チロシンキナーゼ阻害剤STI571によるK562細胞の多系統血球分化誘導におけるp38 MAPKおよびERKの役割）…… 22

鈴木　正崇　Recombinant single-chain antibodies with various oligopeptide tails for targeted gene delivery.
（標的遺伝子導入のための種々のペプチドテイルを付加した組換え一本鎖抗体）…… 23

張　強　Characterization of *AOC2* gene encoding a copper-binding amine oxidase expressed specifically in retina.
（網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素*AOC2*の遺伝子の解析）…… 24

寺西　貴英　Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer.
（マウス核移植において体細胞型リンカーヒストンは卵子特異的リンカーヒストンH1fooに速やかに置換される）…… 25

土井　知光　*De novo* protein synthesis is required for the activation-induced cytidine deaminase function in class-switch recombination.
（クラススイッチ組換えにおけるAIDの機能発現には新たなタンパク質合成が必要である）…… 26

西山　隆恒　Multifocal Magnetoencephalogram Applied to Objective Visual Field Analysis.
（多局所視覚誘発脳磁による他覚的視野評価）…… 27

平沢　晃　Association of 17q21-q24 Gain in Ovarian Clear Cell Adenocarcinomas with Poor Prognosis and Identification of *PPM1D* and *APPBP2* as Likely Amplification Targets.
（卵巣明細胞腺癌の悪性形質獲得に関与する遺伝子探索の試み－卵巣明細胞腺癌の予後不良因子としての17q21-q24領域増幅の検出と標的遺伝子候補*PPM1D*と*APPBP2*の同定－）…… 28

藤田　秀樹　ヒトダイオキシン受容体抑制因子の同定およびそのPro185Ala多型と矮小陰茎との相関研究…… 29

前田　卓哉　Expression and characterization of recombinant pyruvate kinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoites
（トキソプラズマ急増虫体の遺伝子組換えピルビン酸キナーゼの発現と解析）…… 30

松田　就人　正常組織由来色素細胞と母斑組織由来色素細胞のE-cadherinにおける細胞遊走能の差異…… 31

森本　陽子　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…… 32

矢作　尚久　Position-specific expression of the *Hox* genes along the gastrointestinal tract.
（ヒト腸管全長における*Hox*遺伝子の部位特異的な発現）…… 33

吉野　純　Leukemia Inhibitory Factor Is Involved in Tubular Regeneration after Experimental Acute Renal Failure.
（急性腎不全回復期における尿細管再生への白血病阻止因子の関与）…… 34

井上　幸治　Dynamic Observation of Oxygenation-Induced Contraction of and Transient Fiber-Network Formation-Disassembly in Cultured Human Brain Microvascular Endothelial Cells.
（ヒト培養脳微小血管内皮細胞における酸素暴露により誘発される細胞収縮と一過性のファイバーネットワーク形成の動的考察）…… 35

大塚　友吉　脳卒中予後予測における頭部CT所見の有用性について…… 36

高木　英惠　Contrasting Action of IL-12 and IL-18 in the Development of Dextran Sodium Sulfate Colitis in Mice.
（マウスDSS腸炎におけるIL-12とIL-18の対照的作用）…… 37
鄭　智誠　着床不全病態の解明
ー子宮内膜インテグリン$\alpha_v\beta_3$の発現を指標にー …… 38
山岸　由幸　Ethanol modulates gut ischemia / reperfusion-induced liver injury in rats.
（ラット腸管虚血再灌流惹起性肝障害のエタノールによる修飾）…… 39
淡谷　典弘　Novel Variant Isoform of G-CSF Receptor Involved in Induction of Proliferation of FDCP-2 Cells：Relevance to the Pathogenesis of Myelodysplastic Syndrome.
（FDCP-2細胞株増殖獲得能に基づく骨髄異形成症候群の病期進展に関与する顆粒球コロニー刺激因子受容体新規アイソフォームの解明）…… 40
日下部　浩　Osseointegration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem
（ハイドロキシアパタイトコートされた多層メッシュステムの骨結合能）…… 41
竹下　啓　Hypercapnic Acidosis Attenuates Endotoxin-Induced Nuclear Factor-κB Activation.
（高二酸化炭素性アシドーシスはエンドトキシンによるNuclear Factor-κBの活性化を抑制する）…… 42
前川裕一郎　Prognostic Significance of Peripheral Monocytosis After Reperfused Acute Myocardial Infarction：A Possible Role for Left Ventricular Remodeling.
（急性心筋梗塞における再疎通後末梢血単球増多の臨床意義：左室リモデリングとの関連）…… 43
山田ゆかり　Preventive home visits for community-dwelling frail elderly people based on Minimum Data Set-Home Care：Randomized controlled trial.
（無作為化比較対照試験による虚弱在宅高齢者へのMDS-HCを用いた予防訪問の効果検証）…… 44
尾羽澤　実　Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head.
（線維柱帯細胞と視神経乳頭由来アストロサイトにおける豚オプチニュリンおよびミオシリンの発現機構の解析）…… 45
金治　有彦　Improvement of Skeletal Lesions in Mice with Mucopolysaccharidosis Type Ⅶ by Neonatal Adenoviral Gene Transfer.
（ムコ多糖症Ⅶ型モデルマウスの骨格異常は生後早期のアデノウイルスベクター全身投与で改善する）…… 46
志津木　健　転写因子AP-1構成タンパクの内耳支持細胞における発現誘導と感音難聴に対する防御的役割…… 47
角田　和之　母常性天疱瘡モデルマウスを用いた病原性抗デスモグレイン３モノクローナル抗体作製とエピトープ解析…… 48
吉田　英彰　Synaptic Blockade Plays a Major Role in the Neural Disturbance of Experimental Spinal Cord Compression.
（実験的脊髄圧迫モデルの神経障害機序におけるシナプス伝達遮断の重要性）…… 49

マウスバゾプレッシンV1a，V1b受容体遺伝子のクローニングと解析

菊池　信太郎

内容の要旨

アルギニンバゾプレッシン（以下AVP）受容体はAVPに特異的な膜受容体で、様々なAVPの生理作用はこの受容体を介して発現する。AVP受容体には２つのサブタイプ、V1およびV2受容体が存在する。シグナル伝達機構の違いによって、主に腎臓に存在するV2受容体と、主に肝臓に存在するV1受容体に分類されている。V1受容体はさらに組織分布や種々のリガンドに対する反応性の違いにより、V1aとV1bの２種類の受容体に分類される。V1a受容体は、血管平滑筋、副腎、脳などに発現し、血管平滑筋収縮、肝臓でのグリコーゲン分解およびグルコースの放出、血小板での凝集作用に関与していると考えられている。一方、V1b受容体は、下垂体、胸腺、心臓、肺などに発現し、下垂体前葉におけるACTH放出調節作用、脳内における神経伝達作用に関与していると考えられている。腎以外でのAVPの生理作用の多くは、V1aおよびV1b受容体を介して発現すると考えられているが、その詳細は不明である。今回著者は、V1aおよびV1b受容体遺伝子を介したAVPの生理機能解析のための遺伝子改変動物の作製を目的として、マウスV1aおよびV1b受容体遺伝子の同定と塩基配列の決定を行い、これらの遺伝子を用いた解析を行った。

マウスV1aおよびV1b受容体遺伝子をクローニングし、塩基配列の決定と構造解析を行った結果、V1aおよびV1b受容体遺伝子は、V2受容体同様G蛋白結合型受容体に共通な構造的特徴である７つの細胞膜貫通ドメイン構造を持っていた。5'上流領域の解析により、両遺伝子は典型的なハウスキーピング遺伝子である可能性が示唆された。また典型的な遺伝子発現プロモーター配列を持たないことから、V1a、V1b受容体遺伝子は、未知の普遍的生理作用に関与し、生理的状況に応じて柔軟に発現すると推測された。

V1a、V1b受容体遺伝子の発現組織分布はマウス、ラット、ヒトで異なる。マウスにおいては、V1a受容体遺伝子はRT-PCR解析では、脳、肝臓、腎臓、心臓、肺、大動脈、脾臓で、Northern blot解析では、肝臓のみで発現が確認できた。また、脳における*in situ* hybridization解析では視索上核で特異的に発現していた。V1b受容体遺伝子は、RT-PCR解析では、下垂体、心臓、肺、大動脈、肝臓、腎臓、脾臓で、*in situ* hybridization解析では、海馬で特異的に発現していた。バゾプレッシンは種によって部分的に異なる複数の部位で、神経伝達物質と情動行動に関わる可能性が推測された。V1a、V1b受容体遺伝子改変動物は、バゾプレッシンの様々な生理作用の解析に有用と思われる。

論文審査の要旨

バゾプレッシン受容体には３種の受容体（V1a、V1b、V2）が存在する。バゾプレッシンの主な生理作用の一つである抗利尿作用は、腎のV2受容体を介して発現する。一方、V1a、V1b受容体を介した生理作用については不明な点が多く、その解明には遺伝子改変動物を用いた解析などが有用である。本研究ではバゾプレッシン受容体遺伝子改変動物の作製を目的としてマウスV1a、V1b受容体遺伝子のクローニングを行い、同遺伝子の解析を行った。本研究により、両受容体遺伝子はともに２つのエクソンを有する10kbの遺伝子であり、ハウスキーピング遺伝子の特徴を有していることが示された。また、V1a、V1b受容体遺伝子の塩基配列および構造は、マウス、ラット、ヒトにおいて極めて類似していることが示された。一方、遺伝子発現の組織分布に動物間で差があることから、V1a、V1b受容体の生理作用には種差があることが示唆された。

審査では、一部の専門用語の使用法、および結合実験の解析方法の記載を改善するように指摘された。以上の点については、最終投稿原稿で加筆、修正することとした。V1a受容体が細胞膜に限局して発現することを示した実験において、対照実験の必要性が指摘された。遺伝子転写開始部位を推測するためには、転写因子結合配列の存在のみならず、他の新たなアプローチを用いた検討が必要であるとの指摘がなされた。バゾプレッシン受容体遺伝子がオキシトシン受容体遺伝子と共通の遺伝子から派生したと結論付けるためには、イントロン挿入部位など遺伝子構造に関する解析に加えて、さらなる検討が必要であると指摘された。次に、V1a受容体遺伝子が、マウス、ヒト、ラットにおいて、主に肝臓で発現していることの意義について質問された。V1受容体を介したバゾプレッシンの作用が糖尿病発症と関連している可能性について、最近の報告を含めて解答された。バゾプレッシンはV1a受容体を介して血管平滑筋を収縮させることから、V1a受容体拮抗薬が高血圧、心不全の治療に有用である、とした点について、その効果については慎重に検討する必要がある、との指摘があった。バゾプレッシンの未知の生理作用のなかで、今後、特に解明が期待されるものについて質問された。中枢神経系における機能、特に、ニューロペプチドとしての新たな機能解析が期待され、遺伝子改変動物の行動解析等が特に有用であると回答された。

以上、本研究は、マウスV1a、V1b受容体遺伝子の解析方法の一部に改善の余地があり、また、各種疾患におけるバゾプレッシンの関与については今後の研究課題であるものの、両遺伝子をクローニングしたことにより遺伝子改変動物が作製され、バゾプレッシンの生理作用に関する研究が進展した点において意義のある研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　小児科学　髙橋　孝雄
　　分子生物学　清水　信義　　内科学　猿田　享男
　　内科学　石井　裕正
学力確認担当者：
　　審査委員長：清水　信義

試問日：平成16年２月10日

Anisotropic Conduction Properties in Canine Atria Analyzed by High-Resolution Optical Mapping. Preferential Direction of Conduction Block Changes From Longitudinal to Transverse With Increasing Age.

（高分解能光計測法によるイヌ心房筋における異方向性伝導特性の検討
～加齢により伝導ブロックは筋線維走行に平行方向から直交方向へ変化する～）

小　浦　　貴　裕

内容の要旨

心筋細胞は細長い形状を呈し、ギャップ結合の分布はside-to-sideに比べてend-to-endに多く、また筋線維間には間質が存在する。このため心筋線維走行に直交（T）する方向では平行（L）な方向に比べて電気抵抗は高く不連続性が増し、L、T方向によって電気的興奮の伝導速度や伝導安全性に違いが生じる（異方向性伝導特性）。伝導速度はL方向に速くT方向に遅いことは知られているが、伝導ブロックがL、Tのいずれの方向に生じ易いか、という点について一定の見解が得られていない。また、生後の成長、加齢に伴うギャップ結合の分布の変化や間質の線維化により異方向性伝導特性は修飾されると考えられるが、これまでにその詳細な検討はなされていない。

本研究では幼犬（1～2ヶ月）、若犬（6～12ヶ月）、老犬（6～10年）の右心房筋切片において、point stimulationによる興奮伝播を光計測法により観察し、異方向性伝導特性およびその加齢による変化を検討した。また同部位の光学顕微鏡下の観察およびギャップ結合蛋白の免疫染色により組織学的検討を行い、異方向性伝導特性との関係について考察した。

ビーグル犬の右心房筋自由壁約3x4cmを切除し、電位感受性色素Di-4-ANEPPSで染色し、高速CCDカメラMiCAM01および蛍光顕微鏡を用いて、心外膜面約2.8x4.2mmの範囲から60x90点の活動電位波形を記録し画像化した（時間解像度2ms、空間解像度45μm）。幼犬の興奮伝播様式はelliptical型を示し、若犬、老犬となるに従いsquare型へ変化した。L方向への伝導速度は老犬、若犬では幼犬よりも速く、T方向への伝導速度も同様の傾向を示したが有意ではなかった。L、T方向への伝導速度の比（L/T）は加齢と伴に増大し、異方向性伝導特性はより顕著になることが示唆された。高頻度刺激および早期刺激により伝導ブロックの誘発を行った。幼犬ではL方向ブロックが生じ易く、老犬ではT方向ブロックが生じL方向ブロックは出現しなかった。光学顕微鏡による観察では、加齢により筋線維の断面積の増加を認め、老犬では間質への脂肪細胞浸潤が顕著であった。ギャップ結合蛋白Connexin43を免疫染色したところ、幼犬では心筋細胞の全周に均等に分布していたが、老犬では細胞のend-to-endの介在板に多く分布し、若犬ではその中間であった。

以上より生後の成長や加齢に伴うギャップ結合の分布の変化と間質の増生により、興奮伝播様式がelliptical型からsquare型へ変化し、伝導ブロックはL方向よりT方向で生じ易くなることが明らかとなった。高齢者において心房細動などのリエントリー性不整脈の発症が増加するが、この発症に異方向性伝導特性の加齢による変化が関与している可能性が示唆された。

論文審査の要旨

心筋線維走行に直交（T）する方向と平行（L）な方向では電気的興奮の伝導速度や伝導安全性が異なる（異方向性伝導特性）。これまで伝導ブロックが生じ易い方向については一定の見解がない。また、生後の成長や加齢に伴い異方向性伝導特性は修飾される可能性が予測される。本研究では幼犬（1～2ヶ月）、若犬（6～12ヶ月）、老犬（6～10年）の右心房筋切片における興奮伝播を電位感受性色素を用いた光計測法により観察し、同部位の組織学的観察およびギャップ結合蛋白の免疫染色を行った。異方向性伝導特性およびその加齢による変化、組織学的所見との関係について考察した。幼犬の興奮伝播様式はelliptical型を示し、若犬、老犬となるに従いT方向伝導速度の低下によりsquare型へ変化し、L、T方向への伝導速度の比（L/T）は加齢と伴に増大した。高頻度刺激および早期刺激により伝導ブロックを誘発すると、幼犬ではL方向ブロックが生じ易く、老犬ではT方向ブロックが生じL方向ブロックは出現しなかった。組織学的検討では、加齢により筋線維の断面積の増加を認め、老犬では間質結合織の増生と脂肪細胞浸潤が顕著であった。ギャップ結合蛋白Connexin43は、幼犬では心筋細胞の全周に均等に分布し、老犬では主に細胞長軸端に分布していた。生後の成長や加齢に伴うギャップ結合の分布の変化と組織学的変化により、興奮伝播様式が変化し、不整脈発生基盤となる可能性が示された。

審査では、光計測法で計測された活動電位波形について従来の電極法における活動電位との比較について質問され、電位の絶対値は不明であるものの時間経過に伴う変化を反映しているとの説明がなされた。また、ギャップ結合蛋白Connexin43の分布部位による機能の差異や、Connexin43以外の蛋白を介した電流による興奮伝導への影響の程度についての検討を要するとの指摘がなされた。

光学顕微鏡下の観察において老犬の間質に認めた細胞が脂肪細胞である証明としてその染色が必要との指摘がなされた。またヒト心房筋にも同様の細胞浸潤が認められるかどうかの質問がなされ、特殊な心筋症を除くと加齢に伴う脂肪細胞の増加の報告はないとの回答がなされた。

高頻度刺激プロトコールの臨床における意義についての質疑がなされた。心房筋切片を用いた実験系であり、臨床不整脈の誘発の直接的なモデルではないものの、高齢者に頻度の高い心房細動などの不整脈の発症機序に異方向性伝導特性が関与していることが示唆されたとの回答がなされた。

以上のように、本研究には今後さらに検討すべき点はあるものの、成長や加齢による興奮伝導を異方向性伝導特性の観点から詳細な検討を行っており、高齢者におけるリエントリー性不整脈の発症機序の解明につながる有意義な研究であると評価された。

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

試問日：平成16年2月24日

Ethanol Upregulates Pro-fibrogenic Connective Tissue Growth Factor（CTGF）Gene Expression in HepG2 Cells via Cytochrome P450 2E1-mediated Ethanol Oxidation.

（エタノールはチトクロームP4502E1により制御されるエタノール酸化系を介して、HepG2細胞における線維化関連遺伝子Connective tissue growth factor（CTGF）の発現をupregulateする）

小　西　　正　洋

内容の要旨

Connective tissue grwoth factor（CTGF）は細胞の増生、分離、接着やアポトーシス、発生などに関連する多岐にわたる細胞機能を有する遺伝子群であるCCN遺伝子ファミリーに属し、ヒトの全身の様々な線維性疾患に関わる線維化制御因子として注目を集めている。CTGFの肝臓における発現の増強は、主として活性化した肝臓の星細胞（伊東細胞）におけるCTGF mRNAの発現を介したもので、CTGFの発現量と肝臓の線維化の程度に相関関係があることが報告されている。アルコールは肝線維症の最も大きな原因の一つであるが、CTGFのアルコール性肝線維症に果たす役割についての研究はこれまでのところない。一方、飲酒により誘導されるエタノール代謝酵素群の一つであるチトクロームP4502E1（以下、CYP2E1）による肝毒性の増強とフリーラジカル産生による酸化ストレスが、アルコール性肝線維症の発症に極めて大きな役割を果たしていることがこれまで基礎的・臨床的な研究で報告されてきた。そこで申請者はCYP2E1を安定的に発現する細胞（HepG2-E9細胞）系を用いて、CYP2E1によるエタノール酸化系が、CTGF遺伝子の発現に与える影響を検討し、アルコール性肝線維症におけるCTGF遺伝子の関与を明らかにすることを目的とした。

CTGF mRNAのreal-time RT-PCR法による定量では、エタノールはE9細胞においてCTGF mRNAの発現量を有意に増加した。このCTGF発現量の増加はCYP2E1の発現を増加させる薬剤であるphorbol myristate acetate（PMA）の添加で増加し、CYP2E1阻害薬である4-methylpyrazole、グルタチオンの前駆体であるN-acetylcysteineやビタミンEの前駆体であるtrolox添加で有意に抑制された。新しい酸化ストレスのマーカーである抗アクロレイン抗体による染色では、エタノールを添加したE9細胞は染色されたのに対し、非添加のE9細胞は染色されなかった。

申請者は、本研究でエタノールがチトクロームP4502E1により制御されるエタノール酸化系を介して、HepG2-E9細胞における線維制御遺伝子CTGFの発現をupregulateすることを明らかにした。E9細胞内のエタノールによる酸化ストレスは抗アクロレイン抗体で可視化したが、CTGF発現量の増加はCYP2E1阻害薬の添加により抑制され、同時に抗酸化作用のある薬物によっても抑制されることなどから、CTGFの発現量は細胞内の酸化ストレスに依存して増加する可能性が示唆された。この研究により、CTGFがアルコール性肝線維化においても、線維化の制御遺伝子として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の要旨

CTGFはヒトの様々な線維化を伴う疾患に関わる線維化制御因子として注目を集めている。飲酒により誘導されるエタノール代謝酵素群の一つであるCYP2E1による肝毒性の増強とフリーラジカル産生による酸化ストレスが、アルコール性肝線維症の発症に関与していることが報告されてきた。そこで本研究ではCYP2E1のtransfectantでCYP2E1を安定的に発現する細胞（E9細胞）系を用いて、CYP2E1によるエタノール酸化系が、CTGF遺伝子の発現に与える影響を検討し、アルコール性肝線維症におけるCTGF遺伝子関与の解明を試みた。

エタノールはCTGFの発現を有意に増加することがE9細胞において確認されたが、E9細胞におけるCYP2E1発現を、phorbol myristate acetate（PMA）により増加させるとCTGFの発現量は増加し、4-methylpyrazoleなどの薬物により抑制させるとCTGFの発現量は減少することが明らかとなり、エタノールによるE9細胞でのCTGFの発現は細胞内でのCYP2E1の発現量に依存することが示唆された。また、抗酸化作用のある薬物であるN-acetylcysteineやvitamin E analogueであるtroloxによってE9細胞におけるCTGFの発現量は有意に減少することから、CTGFの発現量は細胞内の酸化ストレスに依存して増加する可能性も示唆された。エタノールによるE9細胞における酸化ストレスの誘導は、抗アクロレイン抗体による染色で確認された。

審査ではまず、E9細胞への添加実験での100mMエタノールが、飲酒後の生体内濃度としてどの程度かとの質問がなされた。申請者からはアルコール濃度としては酩酊といえる高い値であるが、添加実験に際しては液体培地からのエタノールの蒸発の問題があり、実際には培養液中の濃度は実測値40～80mM程度で推移しているとの回答がなされた。また、CYP2E1の阻害薬として用いられている4MPに関連して、4MPはADHの阻害薬でもあり、E9細胞においてADHの発現はあるかとの質問がなされたが、申請者からはADHの発現はないとの回答がなされた。阻害実験において4MP以外、化学構造の異なる最低２種類以上の阻害薬による実験がなされるべきであったとの指摘がなされたが、申請者から論文上データは提示していないが、阻害薬としてdiallylsulfide、抗酸化薬としてvitamin Eなどによる実験も行い同様の結果を得ていたとの回答がなされた。CYP2E1は薬物の代謝酵素であり、エタノールと競合的に代謝される薬物の影響を検討し臨床上より有意義な研究とすべきではなかったかとの助言もなされた。また、E9のコントロール細胞としてのMV5細胞による対照実験の不足が指摘された。さらにウイルス性とアルコール性の肝線維化においてCTGF発現に差異があるかとの質問がなされ、CYP2E1による機序はアルコール独自の機序である可能性が示唆されると回答された。CTGFの肝臓内における発現については、肝臓内のCYP2E1の発現と平行して組織学的に観察すべきではなかったかとの指摘もなされた。

以上、本研究はさらに検討すべき課題を残しているものの、アルコール性肝線維症におけるCTGF遺伝子の関与の可能性が示されたという点で、消化器病学上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　内科学　石井　裕正
　　解剖学　相磯　貞和　　医化学　末松　　誠
　　外科学　北島　政樹
学力確認担当者：
　審査委員長：相磯　貞和

試問日：平成16年１月26日

Hyperexpression of Inducible Costimulator and Its Contribution on Lamina Propria T cells in Inflammatory Bowel Disease.

（炎症性腸疾患腸管粘膜内T細胞におけるInducible costimulatorの発現亢進とその役割）

佐　藤　　俊　朗

内容の要旨

潰瘍性大腸炎（UC）・クローン病（CD）に代表される炎症性腸疾患は腸管内抗原に対して過剰な免疫反応が起きた結果、腸管粘膜の慢性持続性炎症を認める疾患である。特に腸管粘膜内T細胞（LPT）の活性化が重要であることが示唆されており、これは後天性免疫不全症候群の併発や、免疫抑制剤であるサイクロスポリンの投与により緩解が導入されることで裏付けられている。T細胞は活性化する際、T細胞受容体を介した抗原刺激以外に副刺激が必要であることが知られている。今回著者は新規副刺激分子であるInducible costimulator（ICOS）の炎症性腸疾患腸管粘膜内T細胞における発現について検討した。ICOSはUC・CDの炎症部腸管粘膜で発現が亢進しており、健常者の腸管粘膜では発現していなかった。また、ICOSのリガンドであるB7hも同様にUC・CDの炎症部腸管粘膜において発現の亢進を認めた。発現したICOSが機能的な活性を有しているかどうかを確認するため、抗CD3抗体、抗ICOS抗体によりLPTを刺激し、増殖活性を検討した。抗ICOS抗体はLPTに対して抗CD3抗体とともに相乗的に増殖刺激効果を示し、粘膜局所におけるICOSとB7hの発現亢進がLPTの増殖に関与していることが示された。次に抗ICOS抗体を用いて、ICOS刺激によるLPTのサイトカイン産生について検討した。ICOS刺激はLPTに対して、末梢血T細胞と同様にIL-4, IL-5, IL-10, IFN-γの産生を誘導したが、IL-2の産生誘導能は低かった。また、UCではCDおよび健常者に比しCD3/ICOS刺激によるLPTのIL-5産生能が有意に高かった。このことはUCがTh2-like diseaseとされていることを裏付ける所見と考えられた。CDはTh1 diseaseとされており、IFN-γ産生が高いことが予想されたが、CD3/ICOS刺激によるLPTのIFN-γ産生能は健常人と同等であった。LPTに対してCD3/ICOS刺激にIL-12を加えて刺激した後のIFN-γの産生を検討したところ、CDのLPTはUCや健常人のLPTに比し有意に高いIFN-γ産生能を有していた。CDのLPTにおいて、ICOSはIL-12とともに相乗的にIFN-γ産生誘導をしていることが示された。

このように、ICOSはそのリガンドであるB7hとともに炎症性腸疾患の炎症粘膜局所で発現が亢進しており、LPTの増殖活性亢進、サイトカイン産生の誘導に強く関与していた。また、ICOSは末梢血T細胞に発現しておらず、炎症粘膜局所に特異的に発現することから治療標的としても非常に有用な分子となりうることが示唆された。

論文審査の要旨

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎（UC）・クローン病（CD））は腸管粘膜の慢性持続性炎症を認める疾患であるが、その成因の一つとして、腸管粘膜内T細胞（LPT）の活性化が重要であることが示唆されている。そこで申請者は新規副刺激分子であるInducible costimulator（ICOS）の炎症性腸疾患腸管粘膜内T細胞における発現について検討した。ICOSはUC・CDの炎症部腸管粘膜で発現が亢進しており、健常者の腸管粘膜では発現していなかった。また、ICOSのリガンドであるB7hも同様にUC・CDの炎症部腸管粘膜において発現の亢進を認めた。LPTは抗CD3抗体、抗ICOS抗体により相乗的に増殖刺激効果を示し、サイトカイン産生はUCにおいてIL-5産生能が高く、CDにおいてIFN-γ産生能が高かった。ICOSはそのリガンドであるB7hとともに炎症性腸疾患の炎症粘膜局所で発現が亢進しており、LPTの増殖活性亢進、サイトカイン産生の誘導に強く関与することが示された。また、ICOSは末梢血T細胞に発現しておらず、炎症粘膜局所に特異的に発現することから治療標的としても非常に有用な分子となりうることが示唆された。

審査では上皮間T細胞（IEL）のICOSと上皮細胞のB7hの発現について質問され、炎症性腸疾患のIELもICOSの発現が亢進すること、上皮細胞のB7hは発現が弱く活性が弱いと考えられるが、機能解析が必要であると回答した。また、UCとCDにおけるサイトカイン産生の結果について質問され、CDはTh1優位、UCは典型的ではないがTh2優位であり、それぞれの疾患の病態に関与していること、また、炎症による抗CD3抗体に対する抵抗性のため炎症性腸疾患のLPTではサイトカイン産生が低下すると回答した。さらに、炎症性腸疾患の病態におけるICOSの意義について質問され、ICOSはメモリーT細胞に発現しており、炎症性腸疾患の病因ではなく炎症の結果と考えられること、ICOSとB7hの誘導により炎症の増悪、維持に関与している可能性について回答した。また、ICOSの発現細胞は同時にCD25を発現しているが、増殖活性は亢進しており、調節性T細胞である可能性が低いと回答した。さらに炎症性腸疾患の活動性の指標として内視鏡基準を使用した方がよいこと、ICOSの発現の表現を％ではなくmean fluorescence indexを用いた方がよいことを助言された。

以上、本研究はなお検討すべき点が残るものの、炎症性腸疾患の病態におけるICOS分子の重要性を明らかにし、ICOS陽性細胞を標的とした新たな治療法の可能性を示唆した点で消化器病学上価値のある優れた研究と評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　石井　裕正
　微生物学・免疫学　石川　博通　　外科学　北島　政樹
　微生物学・免疫学　小安　重夫
学力確認担当者：
　審査委員長：石川　博通

試問日：平成16年２月10日

関節リウマチに見出される新しい自己抗体の対応抗原分析および臨床的・病因的意義の解明

野島　崇樹

内容の要旨

関節リウマチ（Rheumatoid Arthritis：RA）は、リウマトイド因子などの存在により全身性自己免疫疾患として位置づけられているにもかかわらず、RA疾患特異的自己抗体の報告は少なく、自己免疫現象とRAの病因・病態との関与も明らかになってはいない。

HeLa細胞抽出物を抗原とした検出感度の高い免疫ブロット法を用いたところ、RA患者血清42例中33例（79%）でさまざまなHeLa細胞由来の蛋白との反応がみられた。これらのうち、未知の抗原である60kD蛋白は15例（36%）、45kD蛋白は10例（24%）、75kD蛋白は８例（19%）と高頻度で、いずれも非RA膠原病患者血清および健常人血清ではほとんど認識されず新しいRA特異自己抗原と考えられた。

そこで、RA特異自己抗体と考えられる抗45kD抗体および抗75kD抗体陽性のRA患者血清をプローブとして、対応自己抗原遺伝子cDNAのクローニングを行ったところ、３種のcDNAクローン（RA5，RA9，RA21）が分離され、RA5，９，21蛋白はそれぞれサイトケラチン-18（CK-18）、c-myc FUSE結合蛋白（FBP）、γ synergin（AP1γ結合蛋白）と同定された。

抗CK-18抗体はRA 64例中10例（17%）に陽性で、臨床的特徴を同抗体陰性RA 54例と比較検討したところ、陽性例の発症年齢平均53.3歳は陰性例44.8歳より高齢であること、陽性例のStageが平均２で比較的骨破壊が進行していない傾向が認められた。CK-18はRAの病因の１つとも考えられているEBウイルス核蛋白p62とのアミノ酸相同性を認めており、ウイルス蛋白との交差反応が自己抗体産生のトリガーになる可能性が考えられた。

抗FBP抗体はRA9融合蛋白に対してはRAとSLEの各１例しか反応が見られなかった。しかし、FBPの192－975をコードするMBP-FBP-A融合蛋白を抗原に用いて免疫ブロット行うと、RA 64例中９例（17%）に反応性が確認された。この抗FBP-A蛋白抗体陽性RA ９例、陰性RA 55例で層別化し、臨床所見を比較すると、陽性例では赤沈値が有意に低いことが明らかとなり、罹病期間が短く、Stageが進行しておらず、CRP値が低い傾向が認められた。抗FBP抗体陽性例はRA骨破壊病態の初期、もしくは軽症例において検出される自己抗体である可能性が考えられた。FBPは、関節での滑膜細胞増殖や軟骨細胞アポトーシスの際に発現するc-mycの調節因子であり、RAの局所病態に関与する可能性があり注目された。

γシナージンに対する自己抗体はRA 23例（36%）と高頻度に検出されたが、他の膠原病においても検出され、RAにおける特異度は低かった。

論文審査の要旨

本研究では、先ずHeLa細胞抽出物を抗原とした免疫ブロット（IB）法を用いて、関節リウマチ（RA）患者血清42例中33例（79%）でさまざまな蛋白との反応がみられることを示したが、その中で未知の抗原である45kD蛋白（陽性10例（24%））、75kD蛋白（陽性８例（19%））に注目し、これらの蛋白と反応するRA患者血清をプローブとして、対応自己抗原遺伝子cDNAのクローニングを行い、３種のcDNAクローン（RA5、RA9、RA21）を分離し、それらがサイトケラチン-18（CK-18）、c-myc FUSE結合蛋白（FBP）、γ synerginであることを示した。

抗CK-18抗体はRA64例中10例（17%）が陽性で、陽性例の発症年齢は平均53.3歳であり、陰性例より高齢であった。陽性例の病期は平均２で骨破壊が比較的進行していない傾向を認めた。また、FBPの192-975をコードするMBP-FBP-A融合蛋白を抗原に用いてIBを行うと、RA64例中９例（14%）が抗FBP-A抗体陽性であり、これらの症例では陰性例に比し、赤沈値が有意に低いことが示され、また罹病期間が短く、病期が進行しておらず、CRP値が低い傾向を認めた。γ synerginに対する自己抗体はRA23例（36%）と高頻度ながら特異性は低いことが示された。

審査では、自己抗体が病因・病態と関与するのかとの質問がなされ、自己抗体の存在は結果である可能性が高いが、その存在が発症後の病態を反映し、臨床像との関連を意味付ける可能性があること、また、遺伝子変異（もしくは多型性）の存在により、自己抗原がトリガーの１つとしてRA発症や病態形成に関連する可能性があると回答された。続いて、①クローニングを行うにあたりHeLa細胞のライブラリーを使った理由、②早期RAでの検討、③経時的な抗体価の変化、④γ synerginのより詳細な検討、について質問がなされ、それぞれに対する回答として、①抗核抗体の精査にHeLa細胞を用いており、またIB法でのスクリーニングでHeLa細胞を用いたため、②早期RAでは抗FBP-A抗体の陽性率が特に高くはなかった、③経時的に抗体価を測るアッセイ系が確立できていない、④γ synerginのRAにおける特異性が低いこと、また全長クローニングを行うことが困難であった、などが述べられた。また、臨床的立場より、HLAや薬剤感受性との関連性の検討や、骨変化についてsharp scoreによる詳細な検討が望ましいとの助言がなされた。

以上、本研究は多くの検討されるべき点を残しているが、RAにおいても種々の自己抗体が存在することを示し、その対応抗原クローニングにより、病態に関与する可能性のある自己抗原を突き止め、それらのRA特異的自己抗体が臨床的にも有用である可能性を示した点において、価値ある研究と評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　池田　康夫
　微生物学・免疫学　小安　重夫　　病理学　岡田　保典
　　整形外科学　戸山　芳昭
学力確認担当者：
　審査委員長：小安　重夫

試問日：平成16年２月16日

子宮体癌におけるDNAミスマッチ修復遺伝子異常とマイクロサテライト不安定性の解析

阪　埜　　浩　司

内容の要旨

【目的】子宮体癌は近年増加傾向にあるが、その発癌機構はいまだ解明されていない。家族性腫瘍である遺伝性非ポリポーシス大腸癌（HNPCC）の患者において、子宮体癌が高率に合併する事実から、子宮体癌の一部が家族性腫瘍であることが明らかとなったが、その報告は極めて少なく、病態や臨床病理学的特徴は全く不明である。本研究では、HNPCCの原因遺伝子であるDNAミスマッチ修復（MMR）遺伝子の異常に注目して、家族性子宮体癌の頻度および病態を分子疫学的に明らかにすることを目的とした。

【方法】1991年～2002年に当科にて治療を行った子宮体癌385例を対象に家族歴などの疫学的調査を実施した。さらに、同意の得られた39例に対し、MMR遺伝子である*hMLH1*遺伝子と*hMSH2*遺伝子に注目し、マイクロサテライト不安定性（MSI）解析、蛋白発現解析、生殖細胞変異解析を実施し、家族性子宮体癌の病態とMMR遺伝子異常との関連を検討した。

【結果・考察】子宮体癌385例を対象とした家系調査により２例（0.5%）のHNPCCの診断基準（新アムステルダム基準）をみたす家族性子宮体癌家系を同定した。

子宮体癌39例を対象としたMSI解析の結果、12例（30.7%）がMSI陽性と判定された。このMSI陽性率は他臓器癌にくらべ高く、子宮体癌の発癌にMMR異常が深く関与していることが示唆された。また、MSI陽性子宮体癌においてはG2、G3腺癌が多い傾向を示した（p＝0.09）。この結果は、MMR異常による発癌機構が高エストロゲン状態などの環境因子によるとされる多くの子宮体癌の発癌機構とは異なる可能性を示唆した。さらに、MSI陽性子宮体癌8/12例（66.7%）において抗hMLH1抗体の染色性の消失が認められ、統計学的にMSI陽性子宮体癌とhMLH1蛋白の発現低下との関連性が示された（p＝0.0012）。この結果より、hMLH1蛋白の免疫染色がMSIの簡便な検出法として代用できる可能性が示された。

MSI陽性子宮体癌12例を対象としたMMR遺伝子の生殖細胞変異解析の結果、３例において*hMSH2*遺伝子のコドン688のatgがata（MetがIle）への１塩基変異、コドン390のcttがttt（LeuがPhe）への１塩基変異および*hMLH1*遺伝子のコドン100のナンセンス変異（ArgがStopコドン）を検出した。しかし、いずれの症例も家系内癌集積性を認めたものの新アムステルダム基準は満たしていなかった。

【結論】新アムステルダム基準では我が国の家族性子宮体癌の一部しか抽出できず、さらに多くの家族性子宮体癌症例が存在していることが明らかとなった。家族性子宮体癌の診断として、新アムステルダム基準を満たさない症例であってもMSI陽性および家系内癌集積がある症例に対してはMMR遺伝子による遺伝子診断は有意義と考えられた。

論文審査の要旨

子宮体癌は近年、罹患数が増加傾向を示し全子宮癌の約４割を占めているが、その発癌機構は不明な点が多い。本研究では、子宮体癌を家族性腫瘍である遺伝性非ポリポーシス大腸癌（HNPCC）関連腫瘍としてとらえ、原因遺伝子であるDNAミスマッチ修復（MMR）遺伝子である*hMSH2*、*hMLH1*遺伝子の異常とマイクロサテライト不安定性（MSI）との関連性を解析した。385例の子宮体癌症例に家系調査を実施し、HNPCCの新臨床診断基準をみたす２家系（0.5%）を同定した。次に、子宮体癌39例を対象にMSI解析を実施し、12例（30.7%）にMSI陽性を認めた。このMSI陽性体癌はG2およびG3腺癌が多い傾向（p＝0.09）と高頻度なhMLH1蛋白の発現低下（66.7%）を示した。これらMSI陽性症例に対し、*hMSH2*、*hMLH1*遺伝子の生殖細胞変異を解析した。その結果12例中２例で*hMSH2*遺伝子のミスセンス変異と１例で*hMLH1*遺伝子のナンセンス変異を検出した。いずれの症例もHNPCCの新臨床診断基準をみたしておらず、現在の診断基準をみたさないさらに多くのHNPCC関連の家族性子宮体癌が存在していることが示唆された。

審査では、MMR遺伝子異常とMSI解析が中心の本論文の主旨より表題を一部修正するべきとの指摘がなされた。次に現在６種同定されているヒトMMR遺伝子のなかで*hMSH2*、*hMLH1*遺伝子の２種を選定した理由が質問され、HNPCCにおいて*hMSH2*、*hMLH1*遺伝子の生殖細胞変異が６割を占めているとの報告に基づき選定したと回答された。また、本研究で検出された生殖細胞変異が機能的変異といえるかとの質問がなされ、文献的にもHNPCC症例で報告されている遺伝子変異であること、日本人の遺伝子多型として報告されていないこと、免疫組織化学的に蛋白発現の低下を認めていることなどから機能的変異と推察していると回答された。MSI陽性子宮体癌が他臓器癌にくらべて高頻度な理由について質問がなされ、子宮体癌の発癌においてはむしろgeneticでない、*hMLH1*遺伝子のメチル化に代表されるepigeneticな変化が大きく影響していることが予想され、MSI陽性体癌が若年発症や重複癌の傾向を示さない事実もこの理由で説明できると回答された。さらにHNPCCの新臨床診断基準の問題点について質問され、我が国のHNPCCに多く合併する胃癌、卵巣癌をHNPCC関連腫瘍として追加することが重要と認識していると回答された。

以上より本研究は他のMMR遺伝子の関与や子宮体癌の発癌に寄与するMSIの標的遺伝子の解明など今後検討するべき課題を残しているものの、子宮体癌におけるMMR遺伝子異常の関与を明らかとし、我が国における家族性腫瘍としての子宮体癌に関して新たな知見を示した価値のある論文と評価された。

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　　分子生物学　清水　信義
　病理学　坂元　亨宇
学力確認担当者：
　審査委員長：吉村　泰典

試問日：平成16年２月19日

Hypertrophic stimuli augment expression of cMG1/ERF-1, a putative zinc-finger motif transcription factor, in rat cardiomyocytes.

（さまざまな心肥大刺激はラット心筋細胞において zinc-finger型転写因子cMG1/ERF-1の発現を誘導する）

真鍋　知宏

内容の要旨

心筋細胞は、心筋梗塞や心筋炎などで壊死した心筋の機能を代償するために、肥大することにより心臓のポンプ機能を保持しようとする。心肥大はアンジオテンシンⅡ、エンドセリン－１、ノルエピネフリンのような神経体液性因子や伸展刺激、圧負荷などの機械的負荷により惹起される。神経体液性因子や機械的負荷は細胞表面に発現している各種受容体を介して、細胞内情報伝達系を活性化し、心肥大に関連する遺伝子群の発現調節を行っている。したがって心肥大に関わるこれら一連の分子生物学的機序を明らかにすることは、心不全の機序の解明と新たな治療法開発につながる可能性がある。近年、心筋細胞において心肥大に関与するサイトカインやシグナル伝達物質が研究されている。白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor, 以下LIF）はある種の白血病細胞の増殖を抑制する物質として同定されたが、後に心筋細胞肥大を強く引き起こす因子でもあることが判明した。LIFはInterleukin-6ファミリーに属するサイトカインであり、gp130という受容体を介して細胞内への情報伝達が行われる。トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの知見から、gp130が心筋細胞の増殖、肥大などの過程で重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかし、gp130の下流で心肥大を司る遺伝子の詳細についてこれまでのところ明らかになっていない。本研究では、LIFにより発現が変化する遺伝子をクローニングし、その遺伝子の心筋細胞肥大現象への関与を検討することを目的とした。

新生仔ラット初代培養心筋細胞にLIF刺激を行い、LIF刺激前後で発現の変化する遺伝子をRNA differential display法を用いてクローニングした。その中でcMG1/ERF-1というzinc-fingerモチーフを有する転写因子をコードする遺伝子を同定した。本遺伝子に関してLIF以外の心肥大惹起因子を作用させた際の発現の変化、機械的伸展刺激や急性圧負荷における発現の変化をNorthern blot法、さらにはこの遺伝子発現にいかなる細胞内情報伝達系が関与するのかをAG490（JAK2阻害薬）、wortmannin（PI3-K阻害薬）、PD98059（MEK阻害薬）、genistein（チロシンキナーゼ阻害薬）を用いてNorthern blot法により検討した。cMG1/ERF-1遺伝子はLIF刺激により誘導され、その発現は刺激30分後に最大となった。LIFによるcMG1/ERF-1の発現はAG490で有意に抑制され、genisteinで部分的に抑制された。PD98059やwortmanninではほとんど変化は認められなかった。これらの結果から本遺伝子の発現に対するJAK/STAT系の関与が示唆された。cMG1/ERF-1遺伝子はアンジオテンシンⅡ、エンドセリン－１、フェニレフリンなどの心肥大促進因子によっても誘導された。培養心筋細胞の機械的伸展刺激によりcMG1/ERF-1遺伝子の発現が増強した。またラット腹部大動脈結紮での急性左室圧負荷によってもcMG1/ERF-1遺伝子の発現増強が認められた。この結果から、cMG1/ERF-1はc-fosやBNPと同様に心肥大のマーカー遺伝子であり、本遺伝子の下流に存在して発現調節を受けている標的遺伝子が心肥大をより直接的に惹起する可能性が示唆された。

以上より、LIF刺激により心筋細胞においてcMG1/ERF-1遺伝子が活性化され、その経路に主にJAK/STAT系が関与しており、培養系の機械的伸展刺激のみならず、生体内での急性圧負荷によってもその発現が増加することが示された。

これまでにcMG1/ERF-1遺伝子が上皮系細胞において初期応答遺伝子として機能することは報告されていたが、心筋細胞との関係は報告されていなかった。本研究により、心肥大発症機序にcMG1/ERF-1が関与することが初めて示された。

論文審査の要旨

心肥大現象はさまざまな病的状態に対処するための心臓の代償反応の１つである。心肥大を惹起する刺激として、圧負荷や伸展刺激、サイトカインが知られている。心肥大を惹起するサイトカインの１つであるLIFはgp130をその受容体としている。このgp130の下流において、心肥大を司る遺伝子の詳細については解明されていなかった。本研究では、LIFにより発現が変化する遺伝子をRNA differential display法を用いてクローニングし、その遺伝子の心筋細胞肥大現象への関与ならびにその活性化に至る経路を検討した。その結果、cMG1/ERF-1というzinc-fingerモチーフを有し構造上転写因子と推測されている遺伝子を同定した。この遺伝子はLIF以外の心肥大惹起因子によってその発現を増強させ、培養心筋細胞における機能的伸展刺激のみならず、生体内での急性左室圧負荷によってもその発現を増強させた。また細胞内情報伝達系の各種阻害薬を用いた実験より、その経路におけるJAK/STAT系の主たる関与が示唆された。cMG1/ERF-1はc-fosやBNPと同様に心肥大のマーカー遺伝子であり、本遺伝子の下流に存在して発現調節を受けている標的遺伝子が心肥大をより直接的に惹起する可能性が示唆された。

論文審査においては、機械的伸展刺激時の細胞内情報伝達系に関する考察が論点となった。LIF刺激時にはJAK/STAT系を経てcMG1/ERF-1遺伝子が誘導されているが、機械的伸展刺激時の細胞内情報伝達系に関する検討がなされていないとの指摘があった。臨床的にはサイトカイン刺激よりも機械的伸展刺激や圧負荷刺激の方が心肥大に関連が強いと考えられるので、各種阻害薬を用いた実験を施行すべきであったとの指摘もあった。また、増殖シグナルと肥大シグナルが同一の経路なのかという問題が提起された。これに対して、心筋細胞は最終分化した細胞であり容易に増殖が生じない機構が備わっており、増殖と肥大のシグナルは別々に考えた方がよいとの回答があった。さらに、cMG1/ERF-1遺伝子が転写因子でなく、炎症性サイトカインのmRNAに結合し、その機能を不安定化させるという最新の知見に関する議論が行われた。cMG1/ERF-1を強制発現させた際に心筋細胞肥大を惹起するというデータを提示しながら、本遺伝子が肥大に対して抑制的に働くサイトカイン群のmRNAを阻害して、心筋細胞を肥大させるという仮説が提示された。また、本遺伝子に関するpolymorphismや遺伝子破壊マウスに関する報告があり、今後臨床との関連が明らかになる可能性があることも示された。その他に、生体内における心肥大と培養系における心筋細胞肥大現象を同一次元で議論することについての限界に関する意見も出された。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき課題を残しているものの、これまで心肥大との関連が提起されていなかったcMG1/ERF-1が、培養系のみならず生体内においても心肥大現象と関連することを初めて示したという点で有意義であり、今後発展の余地があると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　小川　聡
微生物学・免疫学　小安　重夫　　外科学　四津　良平
内科学　池田　康夫

学力確認担当者：
審査委員長：小安　重夫

試問日：平成16年２月24日

A Novel Protein Highly Expressed in Testis Is Overexpressed in Systemic Sclerosis Fibroblasts and Targeted by Autoantibodies.

（精巣で高発現する新規蛋白は強皮症線維芽細胞で高発現し、自己抗体の標的となる）

安　岡　　秀　剛

内容の要旨

強皮症患者で検出されるほとんどの自己抗体は普遍的にすべての細胞に発現する蛋白を標的とし、病変部に限局した発現を示す蛋白を標的とするものはこれまで同定されていない。我々は、精巣に高発現する新規蛋白PHET（protein highly expressed in testis）に対する自己抗体が強皮症患者血清中に特異的に検出され、PHETが強皮症線維芽細胞で異所性に高発現していることを示した。

強皮症患者血清を用いたcDNAライブラリーのスクリーニングにより、陽性クローン9pを単離した。9pはその塩基配列からUniGeneクラスターHs.129872に属する遺伝子と考えられたが、特有のエクソンを１つ含む点が他のvariantと異なった。正常組織パネルを用いたRT-PCRでは9p mRNAが精巣にのみ高発現したことから、PHET（protein highly expressed in testis）と名付けた。抗PHET抗体は強皮症患者の8.4%に特異的に検出され、全身性エリテマトーデスおよび健常人では検出されなかった。抗PHET抗体陽性例は広汎な皮膚硬化を伴うdiffuse型および肺線維症と関連し、より強い線維化病態との関連が示唆された。

抗PHET抗体は女性例でも検出され、またPHETは癌細胞株や形質転換した細胞株で高発現されていたことから、強皮症の病変部皮膚の線維芽細胞でPHETが異所性に発現される可能性を考えた。この仮説を証明するため、強皮症病変部および他疾患の健常部皮膚由来の培養皮膚線維芽細胞におけるPHETの発現をmRNAおよび蛋白レベルで検討した。デンシトメトリーおよびTaqMan™を用いた定量的PCRでは強皮症線維芽細胞におけるPHETの高発現が確認された。間接蛍光抗体法ならびに免疫ブロットを用いた蛋白レベルの解析でも強皮症線維芽細胞の細胞質でPHETが高発現していた。更に、組織でのPHETの発現をin situ hybridizationにより検討したところ、PHET mRNAは強皮症６例中４例で真皮深層の線維芽細胞および血管内皮細胞に検出されたが、健常皮膚５例には検出されなかった。

以上の結果より、強皮症病変部線維芽細胞に発現し、自己抗体の標的となる分子としてPHETを同定した。また、本来は精巣に限局するPHETが強皮症病変部に異所性に高発現することにより、自己抗体産生が誘導される可能性が示された。したがってPHETの異所性発現は自己抗体産生と線維化という強皮症に特徴的な２つの現象を同時に説明しうる可能性があることから、線維芽細胞におけるPHETの発現機構および機能的役割の追究により、強皮症の病態に迫ることができるもしれない。

論文審査の要旨

強皮症は線維化および微小血管障害を特徴とするが、自己抗体産生という免疫学的特徴を持つ。一方強皮症の線維化では線維芽細胞が中心的役割を担っている。これまで線維芽細胞と自己抗体に関する研究は別々に検討され、これら二つを同時に説明する機序の報告はない。本研究では、強皮症患者血清を用いたcDNAライブラリーのスクリーニングにより得られたクローンの１つがUniGeneクラスターHs.129872に属し、特有のエクソンを有するalternative splice variantの１つで、正常組織では精巣のみに高発現することが示され、protein highly expressed in testis（PHET）と命名された。また、抗PHET抗体は強皮症の8.4%で特異的に検出され、広汎かつ強い線維化病態との関連が示された。更に培養皮膚線維芽細胞におけるPHET mRNAおよび蛋白の発現レベルが検討され、いずれも強皮症皮膚由来培養線維芽細胞で高発現されることが示された。以上より抗PHET抗体は強い線維化病態と関連し、PHETが皮膚線維芽細胞で異所性に高発現されることにより免疫系に曝露され抗体産生が誘導されることが推測され、線維化と自己抗体産生の両方を説明しうる抗原である可能性が示唆された。

審査では抗RNAポリメラーゼ抗体陽性血清を用いたHepG2 cDNAライブラリーのスクリーニングにつき質問され、当初RNAポリメラーゼⅠ/Ⅲのクローニングを目的として利用可能なライブラリーを用いて行われたことが回答された。またPHETの発現調節の検討のためにプロモーターの検討が必要となることから真のinitiation codonの位置を明確にすることを指摘された。PHETが限局型強皮症の線維芽細胞で検出されうるか質問され、PHETが癌細胞株などの増殖細胞に発現する知見から、進行例では検出されうると回答された。また抗PHET抗体が女性例においては“自己”抗体ではないのではという指摘に対し、PHETがレベルは低いものの精巣以外でも発現されている可能性、およびその他のvariantが普遍的に発現されることから自己免疫と考えてよいと回答された。また抗PHET抗体陽性率が低いこと、線維芽細胞でPHETの発現を認めるものの、抗体陰性となる理由につき質問され、強皮症特異的自己抗体の頻度も各20%前後であること、今回の検出系はpartialなfragmentを用いており、陽性率が過小評価される可能性、およびPHETの高発現によりcrypticなエピトープが出現しやすいが、HLAによってPHETが免疫系に提示されず、抗体産生が誘導されない可能性が回答された。

以上のように、本研究はなお検討を要する点が残されてはいるものの、強皮症の病態を解明する上で重要な知見となりうる可能性があり非常に重要な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　池田　康夫

微生物学・免疫学　小安　重夫　　皮膚科学　西川　武二

病理学　岡田　保典

学力確認担当者：

審査委員長：小安　重夫

試問日：平成16年２月18日

Effects of neuromuscular blocking agents on central respiratory control in the isolated brainstem-spinal cord of neonatal rat.

（新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いた筋弛緩薬の中枢性呼吸調節機構への影響）

櫻　庭　　茂　樹

内容の要旨

1．緒言

筋弛緩薬は筋型ニコチン性アセチルコリン受容体アンタゴニストとして機能するが、過去の研究では神経型ニコチン性アセチルコリン受容体にも拮抗作用を有することが示されている。そこで、筋弛緩薬が呼吸中枢に発現している神経型ニコチン性アセチルコリン受容体に拮抗的に作用し呼吸活動を抑制するという仮説を持つに至った。

2．材料・方法

新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いて、筋弛緩薬D-tubocurarineとvecuroniumの呼吸活動および呼吸ニューロンへの作用を検討した。幼若ラット（日齢０～４日）から摘出した延髄脊髄標本をチェンバー内に固定し、酸素化人工脳脊髄液（ACSF）で灌流した。吸引電極でC4前根より吸息性神経出力を連続記録し、ACSFを筋弛緩薬溶解ACSFに切り換え、再度ACSFでwash outを行った。プロトコール１では、両筋弛緩薬の濃度（１、10、100μM）によるC4 burst activityへの影響を筋弛緩薬投与前後で解析した。プロトコール２では両筋弛緩薬（40μM）の呼吸ニューロンネットワークへの作用を検討することで、筋弛緩薬の中枢性呼吸調節機構作用メカニズムを解析した。C4前根からの吸息性神経出力を記録すると同時に、延髄腹側部にガラス電極を刺入し呼吸ニューロンをホールセルパッチクランプし、呼吸ニューロンへの影響を筋弛緩薬投与前後で解析した。

3．結果

（プロトコール１）両筋弛緩薬は、用量依存性にC4 respiratory rateを抑制した。

（プロトコール２）両筋弛緩薬は、C4 respiratory rateとinspiratory（Insp）neuronのdepolarizing cycle rateを同期させて抑制したが、preinspiratory（Pre-I）neuronのdepolarizing cycle rateには作用しなかった。また、筋弛緩薬による呼吸抑制時にも、C4は常にPre-I neuronの脱分極相で発火していた。両筋弛緩薬はInsp neuronとPre-I neuronのdrive potential amplitudeとintraburst firing frequencyを減少させた。筋弛緩薬によりInsp neuronの膜電位および膜抵抗は変化しなかったが、Pre-I neuronの膜電位は過分極し、膜抵抗は増加した。

4．結語

筋弛緩薬は、Pre-I neuronへの直接抑制作用とPre-I neuronからInsp neuronへのシナプス伝達抑制作用を介して、中枢性呼吸調節機構を抑制する。また、ニコチン性アセチルコリン受容体が中枢性呼吸調節機構に含まれていることが示唆された。

論文審査の要旨

術後遷延性呼吸抑制の原因究明は、その予防および治療につながる重要課題である。本研究では、神経筋接合部ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬である非脱分極性筋弛緩薬が、中枢性呼吸調節機構において重要な機能を有している神経型ニコチン性アセチルコリン受容体に作用して、呼吸活動にどのような影響をおよぼすかを検討した。その結果、非脱分極性筋弛緩薬d-tubocurarineおよびvecuroniumは、中枢性呼吸調節機構を抑制し、呼吸数を減少させることが明らかになった。その機序として、非脱分極性筋弛緩薬の前吸息性ニューロンへの抑制作用と、前吸息性ニューロンから吸息性ニューロンへの興奮性シナプス伝達の抑制作用によることが示唆された。また、その抑制作用の結果より、前吸息性ニューロンが中枢性呼吸調節機構におけるリズム形成機構であることが示唆された。

審査ではまず、非脱分極性筋弛緩薬の呼吸ニューロンへの作用が、直接作用か間接作用かを調べるには本研究では不十分ではないかとの指摘があった。これに対し、テトロドトキシン等のシナプス結合を分離する薬剤を使った実験が今後必要であることが回答された。また、非脱分極性筋弛緩薬の中枢性呼吸調節機構抑制作用を拮抗するには、どのような方法があるかを尋ねられた。これに対し、血液脳関門を通過するアルツハイマー治療薬ドネペジル等のコリンエステラーゼ阻害薬により拮抗されうるのではないかと回答された。さらに、審査員より中枢性睡眠時無呼吸症候群の治療薬としてドネペジルが有効であり、本研究がその基礎的研究となることが評価された。次に、非脱分極性筋弛緩薬のニューロンへの作用を統計的に検討しているが、各々のニューロンにより受容体の発現が異なっている可能性があり、非脱分極性筋弛緩薬の作用をニューロンごとに検討する必要があることが指摘された。これに対して、論文作成に当たり統計処理を行ったが、個々のニューロンにより反応が相違することがあり、将来的な検討が必要であると回答した。これに関連して、審査員よりニューロンごとにニコチン性アセチルコリン受容体の発現を同定すること、また、その発達段階における変化を解明することが将来的に必要であることが指摘された。次に、非脱分極性筋弛緩薬による呼吸抑制時に、前吸息性ニューロンから吸息性ニューロンへの興奮性シナプス伝達の有無は、どのように決められるかとの質問があった。これに対して、興奮性シナプス伝達がある場合は前吸息性ニューロンの脱分極が大きく、伝達がない場合は小さいのではないかとの印象を持っているが統計的解析はしていないと回答した。

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、非脱分極性筋弛緩薬の中枢性呼吸調節機構への抑制作用及び機序を明らかにした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　臨床麻酔学　武田　純三
　　生理学　岡野　栄之　　内科学　小川　　聡
　　解剖学　仲嶋　一範

学力確認担当者：
　　審査委員長：岡野　栄之

試問日：平成15年12月15日

Uptake of Cadmium in Meals from the Digestive Tract of Young Non-smoking Japanese Female Volunteers.

（日本人非喫煙若年女性ボランティアにおける食事中カドミウムの消化管からの取り込み）

菊池　有利子

内容の要旨

食物由来のカドミウム摂取に対する耐容週間摂取量設定のための基礎的情報を得るため、主として米由来のカドミウムの消化管からの取り込み、および、摂取後の生体試料中のカドミウム濃度変動を評価することを目的とし、日本人非喫煙若年女性ボランティア25名（20－23歳）を対象に、20日間のボランティア実験を実施した。

カドミウム濃度が0.004ppm（Rice L）および0.340ppm（Rice H）の白米と、カロリー・栄養バランスを考慮した超低カドミウム含有副食材を用い、低カドミウム食（Meal L, Rice L+副食材で構成）と比較的高カドミウム食（Meal H, Rice H+副食材で構成）を用意した。Meal Lに含まれるカドミウムの約12%、Meal Hに含まれるカドミウムの約92%は米由来であった。

予備実験結果に基づき、25名のボランティアは11日間Meal Lを摂取し、カドミウム摂取量と糞中排泄量バランスを一定にした。25名中15名は、12日目にMeal Hを摂取し（Group D1）、残りの10名は、12～14日目の３日間Meal Hを摂取した（Group D3）。その後実験終了日（20日目）まで、両GroupはMeal Lを摂取した。実験期間中の全食事、糞、尿を採取し、一日カドミウム摂取量（Cd-I）、一日糞中カドミウム排泄量（Cd-F）、一日尿中カドミウム排泄量（Cd-U）を測定した。実験開始直前、12日目、20日目には全員から、他の実験日は５～８名のボランティアから採血し、血中カドミウム濃度（Cd-B）を測定した。

Meal LおよびMeal Hを摂食した際の平均Cd-Iは、4.51μg（範囲：1.85－6.93）および48.48μg（27.98－56.27）であった。Cd-Iの変動に対しCd-FとCd-Bは短時間でCd-I依存的に変動したが、Cd-Uはばらつきが大きかった。体内蓄積カドミウムの消化管排泄量を無視することができる（１－過剰Cd-F／過剰Cd-I）と定義したカドミウム取り込み率は、Group D1で47.2%（範囲：－9.4～83.3）、Group D3で36.6%（－9.2～73.5）であり、（１－Cd-F／Cd-I）と定義したカドミウム出納バランスは、Group D1で23.9%（－4.0～37.7）、Group D3で23.7%（－8.2～56.9）であった。

Cd-Iの変動を反映する生物学的モニタリング指標としては、Cd-FおよびCd-BがCd-Uより優れていた。主として米由来のカドミウム取り込み率およびカドミウム出納バランスは、先行ボランティア研究結果より高めであった。この差違は、用いた指標の定義の相違、摂取負荷したカドミウムの化学形態（米中Cd、$CdCl_2$の添加）の相違、対象者の特性（性、年齢）の相違によるものと考えられた。

論文審査の要旨

わが国の流通米のカドミウム（Cd）基準値は0.4ppm未満であるが、FAO/WHO合同食品添加物専門家会合のリスク評価結果にもとづき、暫定耐容週間摂取量（PTWI）７μg/kgおよび米のCd基準値0.2ppmが提案された。しかし、Cdのリスク評価を行うための定量情報データは十分ではない。本研究では、食品由来（主として米）Cdの消化管からの取り込み率を定量的に評価すること、Cd摂取量と生体試料中Cd濃度変化の評価を目的とし、非喫煙女性25名（20－23歳）を対象に20日間のボランティア実験を実施した。低および相対的高Cd食中の平均一日Cd摂取量（Cd-I）、4.51μg（米由来12%）、48.48μg（米由来92%）であった。予備実験に基づくデザインで食事コントロールを実施し、20日間のCd-I、一日糞中Cd排泄量（Cd-F）、一日尿中Cd排泄量（Cd-U）、および、血中Cd濃度（Cd-B）を測定した。Cd-FとCd-Bは短期間でCd-I量依存的に変動したが、Cd-UはCd-I量依存性は不明確であった。（1-Cd-F/Cd-I）と定義したCd出納バランス、および、（１－過剰Cd-F/過剰Cd-I）と定義したCd取り込み率は、先行ボランティア研究結果より高めであった。

審査では、対象者に若年女性を用いた理由についての質問があり、イタイイタイ病等の骨病変は女性に発生し、鉄欠乏ではCd腸管吸収が増加するという報告があること、若年者では、体内Cd蓄積が少なく、実験の実行可能であったこととされた。また対照として男性を対象にした実験も行う必要性があったのではないかとの助言があった。

Cdの消化管取り込み率にホルモン変動や人種が影響するかについて問われ、本研究対象者では21名が実験期間中に生理になったが、取り込み率に影響はなかったとされた。人種に関しては、Cdの障害に関する人種差はなく、吸収については不明であるとされた。

本研究結果からの基準値改訂、社会への提言について問われた。本研究結果の取り込み率が従前の報告よりも高めであったが、吸収率の定義、研究デザインが異なり、比較しうるものではないので、一概に基準値を下げる根拠とはならないこと、また、現在の日本人の平均一日Cd摂取量は、PTWIの半分未満であること、一般人口でCdによる腎障害発生の証拠がないこと等を考慮すると、基準値を下げる必要性はないとした。

多数の人口集団を対象に、無毒性量を明らかにするためのコホート研究、安定同位元素を用いた実験研究、通常食のデザインにおける取り込み率を評価する研究を実施することが理想であるとの助言がなされた。

以上より、本研究は、今後この論文をどう発展させるかが重要な課題であるが、多人数および長期間における出納実験を行った点で、大変価値がある研究と評価された。

論文審査担当者　主査　衛生学公衆衛生学　大前　和幸
内科学　石井　裕正　　法医学　村井　達哉
熱帯医学・寄生虫学　竹内　勤
学力確認担当者：
審査委員長：石井　裕正

試問日：平成16年１月９日

A Free Radical Scavenger, Edaravone, Attenuates Steatosis and Cell Death via Reducing Inflammatory Cytokine Production in Rat Acute Liver Injury.

（新規ラジカル消去剤エダラボンは炎症性サイトカインの抑制を介して
ラット急性肝障害における脂肪化、細胞死を抑制する）

中　本　　伸　宏

内容の要旨

【緒言】種々の肝障害において、フリーラジカル、炎症性サイトカインが重要な役割を果たしている。エダラボンは新規に開発されたラジカル消去剤であり、脳血管障害においてその有効性が知られている。しかし本薬の肝障害における効果および作用機序については解明されていない。そこで申請者はその点を明らかにする目的で、ラット四塩化炭素（carbon tetrachloride；以下CCl_4）急性肝障害モデルを用いて検討を行った。

【材料・方法】実験にはWistar系雄性ratを用いた。オリーブオイルを腹腔内投与するコントロール群、CCl_4を腹腔内投与する群、CCl_4投与直後、３時間後にエダラボンを静脈内投与する群の計３群を作成した。血清生化学的検討としてtotal bilirubin（以下TB）、alanine aminotransferase（以下ALT）、lactate dehydrogenase（以下LDH）値を測定した。組織学的検討としてHE染色、oil red O染色を行い、アポトーシスの検出としてTUNEL染色を施行した。脂質過酸化の評価として肝組織中のmalondialdehyde（以下MDA）の定量、4-hydroxynonenal（以下4-HNE）免疫組織染色を、DNA酸化傷害の評価として8-hydroxy-2-deoxyguanosine（以下8-OHdG）免疫組織染色を行った。また炎症性サイトカインの評価として、ELISA法による血清中TNF-α，IL-6，IL-10量、RT-PCR法による肝組織内TNF-α，IL-4，IL-6，IL-10mRNAの発現を検討した。

【結果】CCl_4投与後に認められた血清TB，ALT，LDHの上昇はエダラボンの投与により有意に抑制された。CCl_4単独群では24時間後に中心静脈周囲に脂肪滴の沈着、中程度の壊死性変化を認めたが、エダラボン投与群では障害の程度は軽度であった。また単独群で24，48時間後に認められたTUNEL陽性細胞もエダラボン投与により有意に減少した。脂質過酸化の指標は肝組織MDA定量、4-HNE免疫染色陽性細胞数いずれも、単独群に比べエダラボン投与群で軽度であった。一方8-OHdGは、単独群で48時間後に核染色される肝細胞が認められ、エダラボン投与群ではその数は有意に減少した。血清IL-6，TNF-α，IL-10はCCl_4投与後それぞれ６，12，24時間後をピークに上昇しエダラボンの投与により有意に低下した。またCCl_4投与により24時間後の肝組織中TNF-α，IL-4，IL-6，IL-10mRNAの発現が亢進し、エダラボン併用群では有意に抑制された。

【結論】エダラボンはラジカル消去効果に加えて、その過程において炎症性サイトカインの産生やDNA酸化傷害を抑制することにより急性肝障害保護効果を有することが明らかとなった。

論文審査の要旨

種々の肝障害の進展にフリーラジカルや酸化ストレスが関与することが知られており、ラジカルや過酸化脂質の産生抑制が肝疾患の治療において重要である。現在までに様々な抗酸化物質による肝障害抑制効果が報告されているが、臨床的に有用な薬物は少ない。近年脳梗塞の治療にフリーラジカル消去剤であるエダラボンの有効性が報告され、臨床の場において広く使われている。本研究では、エダラボンを将来的に臨床応用することを目的とし、ラット四塩化炭素（carbon tetrachloride；以下CCl_4）急性肝障害モデルを用いその肝障害に対する効果、機序を脂質過酸化、DNA酸化傷害、炎症性サイトカインならびに組織学的側面から検討した。その結果、CCl_4投与後に認められた血清学的、組織学的変化はエダラボンの投与により著明に改善した。その機序としてラジカル消去効果に加えて、TNF-α，IL-6などの炎症性サイトカインの産生やDNA酸化傷害の抑制が明らかとなり、本薬物の今後の薬物性肝障害、肝硬変、肝癌などへの臨床応用が期待される。

審査では、まず本実験で用いたCCl_4の投与量について質問があり、急性肝障害をもたらす一般的な量であり、肝硬変モデルで用いる量よりは高用量であるとの説明がなされた。次に炎症性細胞浸潤を伴う壊死性変化と脂肪変性を認める細胞のdistributionの違いの意味について質問がなされ、部位により障害程度に違いがあり、脂肪変性を認める細胞とnecrosis，apoptosisを認める細胞は違う可能性が高い旨説明がなされた。またCCl_4急性肝障害におけるラジカル、炎症性サイトカイン、DNA酸化傷害などの各因子の相互関連について質問がなされた。これに対し、肝細胞内に存在するCYP2E1により発生したラジカルにより各細胞器官の脂質過酸化、DNA酸化傷害などによる一次的な細胞障害が生じ、さらにこれらの炎症により炎症性細胞が誘導され、炎症性サイトカインなどによる二次的な障害がもたらされる旨説明がなされた。次にビタミンE，superoxide dismutase（SOD）などの抗酸化物質による効果と本薬物の比較、今後の臨床応用について質問がなされ、静脈投与による迅速な組織移行性、強力な脂質過酸化抑制効果を有しており、今後薬物性、アルコール性などの急性肝障害、劇症肝炎に対し臨床応用が期待されるとの回答がなされた。最後に本研究の問題点として、CCl_4急性肝障害における炎症細胞の活性化ならびに炎症性サイトカインの発現機序、エダラボンのP450などの薬物代謝酵素に対する影響についてのさらなる検討が必要である旨助言がなされた。

以上のように本研究はいくつかの検討課題は残しているものの、ラジカル抑制を介した肝障害に対する有効な治療法を確立するための重要な研究であり、臨床的にも価値ある研究と評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　石井　裕正
　　医化学　末松　　誠　　病理学　岡田　保典
　　外科学　北島　政樹

学力確認担当者：
　審査委員長：末松　誠

試問日：平成16年１月20日

急性広範性肺動脈血栓塞栓症52剖検例の法医病理学的研究

呂　　彩　子

内容の要旨

急性広範性肺動脈血栓塞栓症（PTE）は突然死の経過をとる例が多く、生前の情報が少ないため、その詳細な実態は不明な点が多い。本研究ではPTE52例（男性24例、女性28例、平均年齢53.8±15.8歳）を対象とし、剖検所見の肺動脈と下肢深部静脈の病理組織学的検討結果から、症例の病態把握を行った。検索方法は、剖検時に肉眼的に血栓の有無を確認したのち、肺を摘出しホルマリン加圧固定を行ったのち、肺動脈を露出して区域動脈から末梢にいたる5mm間隔の横断切片組織を作製した。下肢深部静脈についても同様に剖検時に下肢を背面からアプローチし、下肢深部静脈を摘出・固定後、腸骨静脈からヒラメ静脈にいたる横断切片標本から下肢深部静脈血栓（DVT）の組織学的性状を検討した。結果は、検討例のほぼ全例の肺動脈に新鮮血栓と器質化血栓の混在がみられ、病理学的には慢性反復性PTEの経過が示唆された。また、器質化血栓の分布と局在から、PTEの病状の進行は、まず区域動脈域で塞栓子の器質化がおこり、その後反復性塞栓症および肺動脈内での血栓の線溶・分断化によって葉動脈から末梢の細かい動脈まで広範かつ瀰漫性に器質化血栓による閉塞が生じると考えられた。

広範性PTEにともなう副所見として、21%に肺梗塞がみられ、筋性動脈の変化は内膜肥厚が48%に、器質化血栓が52%に認められた。肺梗塞の出現率は器質化血栓の分布との関連はみられず、筋性動脈の変化は高度器質化例で多く認められた。

症例の生前の臨床経過を調査したところ、6割以上が生前PTEに起因する症状を呈し、うち半数が医療機関を受診していたがPTE診断率は症例全体の8%であった。臨床症状と病理所見の対比では、器質化血栓が高度な例で前駆症状の出現率が高かった。

次にPTEとDVTの関連を検討したところ、対象の94%でDVTが確認された。PTEと同時に左右下肢深部静脈の詳細な検索を行うことのできた18例の検討では、DVTの7割が両側性発症で、ヒラメ静脈血栓の検出頻度が最も高かった。また、肺動脈における反復性塞栓症の履歴の進行にともなって、DVTも下腿静脈限局型から下肢全域に器質化血栓の分布が広範かつ高度になっていた。

以上のことから、従来一回発症型のため予見が困難であると考えられていた急性広範性PTEの多くが、subclinicalな既往をもつ慢性反復性PTEと考えられた。反復性塞栓症の経過にともないPTEとそれにともなう病変も重篤化するため、比較的初期の段階でDVT/PTEを診断することが致死性発作の回避に重要であると考えられた。

論文審査の要旨

本邦では、急性広範性pulmonary thromboembolism（PTE）の剖検例を集積した報告は少ない。本研究はPTEによる多数の急死剖検例の病態、および塞栓源としてのdeep vein thrombosis（DVT）との関連につき、主として病理組織学的手法により検討したものである。その結果、従来は一回発症型のために予見が困難であると考えられていた急性広範性PTEの多くの例で、subclinicalな慢性反復性の経過を有することが推察された。また反復性塞栓症の経過がより進行していると考えられる例においては、自覚症状や末梢肺動脈病変の出現率が高い結果が得られ、病初期の段階でDVT/PTEを診断することが致死性発作の回避に重要であることが示唆された。

審査ではまず、研究対象となった広範性PTEの定義について質問があり、本研究では過去の文献にならって新鮮血栓による葉動脈一対以上の閉塞例を対象としたが、実際には多くの症例が肺門部をほぼ閉塞する例であったとの回答がなされた。また研究期間中、全身性の血栓傾向をきたす疾患の合併のため、検討対象から除外したPTE症例が1例あったとの補足がなされた。

つぎにPTEとDVTの器質化の進行度について、両者の相関性についての統計学的検討を加えるべきではないかと指摘された。また、肺動脈のmicroembolismに関する質問に対しては、今回呈示はしていないが3例に認められたとの回答があり、microembolismの検出率が低い理由としては、心疾患の合併がなく肺の線溶能が高いためではないかとの意見が述べられた。

さらに、ヒラメ静脈血栓症が高頻度に認められた理由に関しての考察が求められたが、過去の文献や本研究の結果からは明確には理由を説明できず、非PTE患者におけるDVTの頻度・局在等についての検討を行ってヒラメ静脈血栓症とPTEとの関連性をさらに明らかにする必要があろうとの指摘があり、これらは今後の課題とされた。

本研究で得られた結果から、PTEによる急死を予防するための提言が求められ、DVTに対する積極的な予防・治療、一般人へのPTEの啓蒙による前駆症状出現時の受診率の向上、病初期における医療機関受診時の適切な診断の3点が重要であろうとの回答がなされた。

以上、本研究は今後さらに検討すべきいくつかの課題を残しているが、症例数が多く本邦のPTEによる急死例の有益な資料となりうる点、subclinical PTEの存在を指摘し臨床への示唆にもつながる点で、臨床病理学的ならびに社会医学的に有意義な研究と評価された。

論文審査担当者　主査　法医学　村井　達哉
　　病理学　岡田　保典　　外科学　小林　紘一
　　病理学　坂元　亨宇

学力確認担当者：
　審査委員長：岡田　保典

試問日：平成16年1月16日

転写共役因子p54^{nrb}による男性ホルモン受容体転写制御機構の解析

石　谷　　健

内容の要旨

（目的）性ホルモンに関する基礎研究は1987年に女性ホルモン受容体が発見されて以来、遺伝子・分子レベルの作用機構解明が焦点となった。性ホルモンは転写因子である核内受容体に属する各々特異的な受容体に結合し、性ホルモンと結合した受容体は転写共役因子群と蛋白複合体を形成して標的遺伝子の転写を調節する。したがって、今日では各種性ホルモンの転写共役因子群を同定解析することが、性ホルモンによる生理作用の理解につながると考えられている。核内受容体では転写活性化領域（AF）がAF-1、AF-2の２領域存在する。とりわけ男性ホルモン受容体（AR）のAF-1は他の核内受容体と比較して転写活性は高く相同性は低いことからAR特異的な機能を担うと考えられており、AR AF-1領域の転写活性化能を説明できる転写共役因子群の重要性が指摘されている。そこで、本研究では培養細胞由来の核抽出液を材料とした蛋白質精製と生化学的手法を用いて、AR AF-1転写共役因子群の探索と機能解析を試みた。

（方法）①２種類のタグで標識したAR AF-1蛋白が恒常的に発現する形質転換株をヒト胎児腎細胞株（HEK293）を用いて作製し核抽出液を得た。②この核抽出液を材料に２段階のタグを認識するカラム精製よりAR AF-1領域に結合する蛋白群を精製した。③精製された蛋白群を構成する各蛋白質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF MS）によって同定し、免疫共沈降法、GST pull-down法、哺乳動物細胞two-hybrid法、ルシフェラーゼレポーター法を用いてAR AF-1転写共役因子機能を解析した。

（結果）以下の事実を見出した。①上記精製によりp54^{nrb}（nuclear RNA-binding protein）、PSF（polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor）、PSP1（paraspeckle protein 1）、PSP2をAR AF-1結合蛋白質群の構成因子として同定した。②免疫共沈降法の結果、in vivoにおいてp54^{nrb}はAR AF-1領域と結合した。③GST pull-down法の結果、in vitroの無細胞系でp54^{nrb}はAR AF-1領域と蛋白同士が直接結合した。④ルシフェラーゼレポーター法の結果、p54^{nrb}はAR AF-1選択的な転写を活性化した。

（結論）p54^{nrb}はAR AF-1における転写活性化共役因子として機能することを示した。また、p54^{nrb}は複数のスプライシング因子と蛋白複合体を形成し、蛋白複合体として転写とスプライシングにおける協調的な機能を有することを示唆した。

論文審査の要旨

アンドロゲンは転写因子である核内受容体に属するARと結合し標的遺伝子の転写を開始させることによって、男性化の促進、骨代謝の調節、前立腺癌の進展など様々な作用を現す。核内受容体が有する２つの転写活性化領域のうちAF-1ではホルモン非依存的な転写活性化能を示し、AR AF-1では他の核内受容体と比較して転写活性は高く相同性は低い特徴を有する。近年、AF-2における機能解析から核内受容体の転写制御機構には転写共役因子と呼ばれる蛋白群が必須であることが明らかとなりつつあるが、AR AF-1領域における転写制御機構はほとんど明らかにされていない。AR AF-1においても転写共役因子群が存在し、重要な役割を果たすことが予想される。そこで本研究においてはAR AF-1領域に相互作用する転写共役因子複合体を明らかにすることを目的として、AR AF-1領域に相互作用する転写共役因子複合体の精製を試みた。さらに精製複合体構成因子の同定も行い、これら構成因子がAR AF-1の転写共役因子として機能するか検討した。その結果、HEK293細胞由来の形質転換株核抽出液を材料とした２段階のタグを認識するアフィニティーカラムを用いた精製およびMALDI-TOF/MSを用いた質量分析によりp54^{nrb}を含む４種のスプライシング関連蛋白質から構成される複合体を同定した。また、p54^{nrb}はAR AF-1の中央領域と直接結合し、AR AF-1の転写を活性化することを示した。

審査ではまず、HEK293細胞を精製材料に用いた理由について質問された。これに対し転写共役因子複合体はAR抗体カラムを用いた精製法では取得困難であり組織を材料に使えない点、ルシフェラーゼアッセイによってAR転写活性化能が認められかつ内在性のARを発現していない点、浮遊大量培養が可能である点から選択に至ったと回答された。次に、精製で取得されたp54^{nrb}以外の他の因子におけるAR AF-1転写活性化能に関して質問された。p54^{nrb}以外のPSF、PSP1、PSP2いずれも単独でAR AF-1転写活性化能を認めないが、p54^{nrb}とヘテロニ量体を形成するPSFはp54^{nrb}共存下でp54^{nrb}単独の場合よりもさらにAR AF-1の転写を活性化する旨、説明された。最後に本研究の臨床応用における位置づけに関して質問された。これに対し乳癌細胞におけるp54^{nrb}発現変化に関する最近の知見をあげて、p54^{nrb}によるARの顕著な転写活性化は前立腺癌の進展においても関連する可能性があると説明された。今後は幅広い視点で病態を解明し、転写共役因子機能阻害ペプチドの創薬などの臨床応用を検討すべきであるとの助言がされた。

以上、本研究はいくつかの検討を要する課題を残しているものの、p54^{nrb}がAR AF-1転写活性化共役因子として機能することを初めて明らかにしたことで、男性ホルモン受容体の新たな転写制御機構を示した点において有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　産婦人科学　野澤　志朗
　　産婦人科学　吉村　泰典　　病理学　岡田　保典
　　泌尿器科学　村井　　勝
学力確認担当者：
　　審査委員長：吉村　泰典

試問日：平成16年２月17日

Induction of Apoptosis in Leukemic Cells by Homovanillic Acid Derivative, Capsaicin, through Oxidative Stress：Implication of Phosphorylation of p53 at Ser-15 Residue by Reactive Oxygen Species.

（ホモバニリンサン誘導体カプサイシンによる白血病細胞のアポトーシス誘導：活性酸素によるp53セリン15リン酸化の意義）

伊　藤　　圭　介

内容の要旨

ホモバニリン酸誘導体カプサイシンは唐辛子に含まれる成分であり、これまで疫学的には大量の経口摂取により胃潰瘍・胃がんの発症頻度を高めるという報告がある。一方で、実験的には神経芽細胞腫に対してカプサイシンは細胞増殖を抑制するとの報告もあり悪性細胞に対する薬理作用に関しては結論が得ていなく、また、現在まで白血病細胞に対する効果に関しては検討されていない。今回我々は各種白血病細胞に対するカプサイシンの効果につき検討を行ったところ、カプサイシンは正常の骨髄単核細胞には影響を与えないものの白血病細胞に対し時間及び濃度依存性に細胞増殖を抑制することを見出した。細胞周期及びAnnexin-Vを用いた早期アポトーシスの検討から、カプサイシンはG1期細胞周期停止およびアポトーシス誘導を介して細胞増殖を抑制することが判明した。カスパーゼ活性の測定・ミトコンドリア膜電位等の検討から、カプサイシン誘導アポトーシスはBaxの細胞質分画からミトコンドリア分画へのTranslocation、cytochrome *C*のミトコンドリアから細胞質への遊離、カスパーゼ３の活性化を介する事が分かった。さらに、フローサイトメトリーを用いた細胞内活性酸素の検討より、カプサイシン誘導アポトーシスは細胞内活性酸素が上昇することが契機となっていることが判明した。興味深いことに、塩基配列の検討・野生型p53認識抗体を用いた検討よりカプサイシン感受性の白血病細胞株は野生型p53を発現しており、カプサイシン投与によりp53セリン15残基のリン酸化が誘導される。アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてp53の発現を抑制すると、カプサイシン誘導細胞周期停止及びアポトーシスは抑制されることが判明した。また、還元剤であるN-acetyl-L-cysteinおよびカタラーゼの前投与によりカプサイシン誘導p53セリン15リン酸化及びアポトーシスは完全に抑制された。臨床応用を目的に患者検体におけるカプサイシンの抗腫瘍効果につき検討を行ったところ、患者検体においてもカプサイシン感受性と野生型p53発現に相関性を認めた。さらにカプサイシンはNOD/SCID mouseを用いたin vivo白血病マウスモデルにおいても腫瘍増殖抑制、アポトーシス誘導を介し、抗腫瘍効果を示すことが判明した。

論文審査の要旨

ホモバニリン酸誘導体カプサイシンは、多量経口摂取にて胃潰瘍・胃癌を発生させるといわれる、一方で、癌細胞の細胞増殖を抑制するとの報告もあり、腫瘍細胞に対する薬理作用については一定の見解が得られていない。そこで、本研究では、カプサイシンの各種骨髄球性白血病細胞株に対する薬理作用につき検討し、濃度および時間依存性に細胞増殖抑制を誘導することを見出した。癌抑制遺伝子p53の発現およびカプサイシン感受性につき検討したところ、p53欠失および変異株と比較し野生型p53発現白血病細胞株がカプサイシンに高感受性であることが判明した。カプサイシンによるアポトーシス誘導機構の解析から、活性酸素の産生、p53誘導およびSer15リン酸化を認め、p53標的蛋白であるBaxおよびp21の誘導が見られた。さらに、還元剤N-acetyl-L-cystein（NAC）及びカタラーゼにてカプサイシン誘導アポトーシスは抑制され、さらに、p53アンチセンスオリゴヌクレオチドによるp53発現抑制にてカプサイシンによるアポトーシス誘導が認められなくなった。また、白血病患者検体にてもp53依存性細胞増殖抑制を認め、白血病モデルマウスにおいても抗腫瘍効果が見られた。以上の結果より、カプサイシンが白血病細胞株に対し、活性酸素を産生しp53依存性にp53 Ser15残基のリン酸化を介してG_0/G_1期細胞周期停止及びアポトーシスを誘導することを見出した。

審査では、まず、カプサイシンの正常造血細胞の増殖に対する影響についての質問があった。増殖因子添加培養し正常造血細胞が増殖させる条件下にても正常細胞増殖に影響を及ぼさないことが示された。また、Colony assayにおいてもカプサイシン投与にて正常細胞のコロニー形成能に影響を及ぼさず、少なくとも前駆細胞レベルにおいてもカプサイシンは細胞増殖に影響を及ぼさないことが示された。次に、白血病細胞株以外の腫瘍細胞株におけるカプサイシンの抗腫瘍効果及びp53との関連についての質問には、大腸癌細胞株であるHCT116細胞において、野生型p53発現HCT116細胞がp53欠失HCT116細胞と比較し、有意にカプサイシンに対する感受性が高いことを挙げた。本結果より、白血病細胞株以外においてもカプサイシンの抗腫瘍効果の可能性を示唆するとともに、野生型p53発現とカプサイシン感受性の相関性がより強く示されると回答された。本研究では*in vivo*におけるカプサイシンの抗腫瘍効果の検討において、腫瘍の増殖抑制・アポトーシス誘導効果を認めるもの、腫瘍消失に至っていない点の指摘もあったが、今後、製剤化を目標としていく上でも、投与方法・投与量の問題を含め*in vivo*におけるカプサイシンの抗腫瘍効果の更なる検討が必要であると結論づけた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、抗がん作用をもつ天然生理活性物質を簡易的にかつ効率よくスクリーニングする系の確立及びカプサイシンのp53を標的分子とした新たな造血器腫瘍に対する治療法への応用の可能性を示した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　池田　康夫
先端医科学　河上　　裕　　発生・分化生物学　須田　年生
医化学　末松　　誠
学力確認担当者：
審査委員長：河上　裕

試問日：平成16年２月16日

Nonendothelial Source of Nitric Oxide in Arterioles But Not in Venule：Alternative Source Revealed In Vivo by Diaminofluorescein Microfluorography.

（細動脈における非血管内皮由来の一酸化窒素分画と細静脈における内皮由来の分画の重要性について：一酸化窒素感受性蛍光色素を用いた生体内顕微鏡の適応により解明された微小循環床における一酸化窒素の多様な産生源）

柏　木　　哲

内容の要旨

一酸化窒素（NO）は血管の弛緩作用を始め多くの生理作用が報告されている。NOは二原子分子のラジカルであり、その低分子量と高い反応性からその局在など生理学上必須の情報を得ることがきわめて困難である。Diaminofluorescein（DAF-2）は、NOと特異的に反応するNO感受性蛍光プローブである。本研究では、主にNOによる微小循環分子統御機構の解析を目的に、DAF-2を腸間膜微小循環に適用し、臓器組織レベルでのNOの産生や局在をバイオイメージング法により検討した。

DAF-2をラット腸間膜にローディング、微小血管床の蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡にて撮像し、コンピュータ支援下に蛍光強度を半定量的にデジタル解析した。同時に腸間膜におけるNO合成酵素（NOS）のアイソザイムの局在を、それぞれに対するモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学及びフローサイトメトリにて検討した。

その結果、（1）腸間膜微小循環を構成する細胞群のうち、細動脈・細静脈内皮および肥満細胞にて強い蛍光上昇がみられた。（2）NOSの非選択的な阻害薬投与では細静脈側での蛍光が有意に減少したのに対し、neural NOS（nNOS）選択的阻害薬投与では細動脈側で有意に蛍光が減少した。細静脈での蛍光は白血球の膠着現象と逆相関を示した。（3）免疫組織化学では、細動脈側では血管周囲の神経終末および肥満細胞に豊富にnNOSの存在が認められたのに対し、endothelial NOS（eNOS）は認められなかった。細静脈側ではeNOSのみが血管内皮に認められた。（4）フローサイトメトリ法にて肥満細胞に豊富なnNOSが証明された。

以上より、細動脈では支配神経中のnNOS及び間質の肥満細胞が収縮性を調節する因子としてのNOを供給し、細静脈では内皮に存在するeNOSが白血病や血小板膠着抑制因子としてのNOを供給していると考えられた。また、いずれの系においても、過剰量のNOS阻害剤の投与によっても蛍光の上昇は完全に抑制されなかったことから、非酵素的に産生されるNOの存在も示唆された。脳の微小循環のNOSアイソザイムの分布も免疫組織化学により検討されたが、ほぼ類似した結果であったことから、これらの結果は全身の他の臓器組織に普遍的に適応できるものと考えられた。

細動脈・細静脈が異なるNOによる循環制御機構を持ち、これがアイソザイムの発現と産生局在の差によって達成されているという事実は、NOが内皮より産生され血管を弛緩させるという一義的な既成概念に大きな修正を加えた。また、NOの酵素非依存性分画の存在はその局在を半定量的に解析できなければ知りえない事実であり、これは現在本研究で確立された手法を用いる以外に達成され得ない。以上、本研究は今後の本手法の適用の拡大によりNOの生物学の展開に大きく貢献できるものと考えられた。

論文審査の要旨

一酸化窒素（NO）は血管内皮由来弛緩因子と同定されたガス状メディエータであるが、フリーラジカルであり、生化学的なアプローチは技術的に非常に困難である。このため、とりわけ微小循環床でのNOによる微小循環分子統御機構には不明な点が多い。本研究では、主にNO感受性蛍光プローブであるdiaminofluorescein（DAF-2）を用いNOのバイオイメージング法をin vivoにて確立し、NOの分布・産生の局在を検討した。その結果、細動脈では主に周囲の神経由来のnNOS（neuronal nitric oxide synthase）、細静脈では血管内皮由来のeNOS（endothelial NOS）をNOの主要な供給源としていることを明らかにした。これは、内皮由来のNOが循環系を統御するという一義的既成概念とは異なり、実際は微小循環床を構成する脈管がNOSアイソザイムの発現と局在を制御することでその生理的に固有な機能を実現していることが示唆された。また、NO分布の半定量的解析から、以前からその存在が推測されてきた酵素非依存性の分画の存在も強く示唆された。

審査では先ず、肥満細胞が多量のnNOSを保持することの意義につき質問がなされた。これに対し、文献を引用しconstitutiveなNO産生により自らの脱顆粒を制御していること、周囲のリンパ管のpermeabilityの制御をしている可能性が高い旨回答された。これに対し、肥満細胞欠如ラットを用いた実験をデザインすることで本方法により肥満細胞の生理的役割の解析が可能な旨助言がなされた。次に、本研究で免疫組織化学において使用されたホモロジーの高い３つのNOSアイソザイムに対する特異的なモノクローナル抗体での染色の特異性について質問がなされた。使用経験の大きい市販抗体であることや、フローサイトメトリーなどの方法を併用することで結果につきさらに検証を加えている旨の回答がなされた。また、detergent使用によって染色結果が影響を受ける可能性について指摘がなされ、使用・不使用の比較において差が見られなかった旨回答があった。次に、本研究において、径の異なる細動脈で得られた結論は定性的なものであり、モデルとした腸間膜の細動脈系を径や生理機能に基づき分類し、各々の特有の機能と関連付けて検討すべきではないかとの指摘がなされた。これに対し、免疫組織化学の結果が定性的であり、定量的な分類と対応させることは試みたが技術的に不可能であった旨回答がなされた。また、動脈硬化などの病態において本研究での結論はどのように関与しているかとの質問がなされ、各種病態モデル動物に本法を適応した検討が必要な旨回答があった。

以上により本研究には、今後なお検討すべき課題が残るものの、細動脈・細静脈がそれぞれ異なるNOによる循環制御機構を持つという事実を明らかにし、これまで信じられてきた一義的な既成概念に大きな修正を加えた研究として、微小循環学の分野において価値のある論文であると評価された。

論文審査担当者　主査　産婦人科学　吉村　泰典
　　解剖学　相磯　貞和　　内科学　池田　康夫
　　産婦人科学　野澤　志朗
学力確認担当者：
　　審査委員長：相磯　貞和

試問日：平成16年２月13日

Different Roles of p38 MAPK and ERK in STI571-Induced Multi-Lineage Differentiation of K562 Cells.

（チロシンキナーゼ阻害剤STI571によるK562細胞の多系統血球分化誘導における p38 MAPKおよびERKの役割）

光 村　か の 子

内容の要旨

（緒言）STI571はチロシキナーゼ阻害剤であり、慢性骨髄性白血病（CML）に対する分子標的治療薬として臨床的に高い細胞遺伝学的寛解をもたらす画期的な治療薬として注目されている。近年、酪酸や抗癌剤ヒドロキシカルバミドがCML細胞株K562細胞に対し、ERKの抑制とp38MAPKの活性化を介して赤芽球系への分化を誘導することが報告された。STI571もK562細胞のヘモグロビン産生を誘導することが報告されたが、STI571の血球分化誘導機構は明らかではない。ERK、JNK、p38MAPKなどのMAPKシグナル伝達経路が細胞における増殖、分化を幅広く制御していることがこれまでに報告されていることから、本実験系におけるp38MAPKとERKの果たす意義について検討した。

（方法と結果）CML細胞株K562細胞をSTI571 0.5μMで刺激し、p38MAPK、ERK、JNKのリン酸化をウェスタンブロット法で確認したところ、p38MAPKのリン酸化とERKの脱リン酸化が誘導された。STI571によるK562細胞のヘモグロビン産生誘導と細胞増殖抑制効果を検討したところ、STI571刺激でジアニシジン陽性細胞、すなわちヘモグロビン産生が増加した。さらにMEK/ERK特異的阻害剤U0126添加下ではジアニシジン陽性細胞がさらに増加し、p38MAPK阻害剤SB203580添加下ではヘモグロビン産生がほぼ抑制されたことから、STI571による赤芽球系への分化誘導にERKの脱リン酸化とp38MAPKのリン酸化が重要であることが示唆された。またSTI571刺激により、各血球系統細胞表面マーカー（CD11b、CD13、CD41a、CD42b、glycophorin A：GP-A）の発現が増強し、SB203580の投与で発現が減弱したことからSTI571はp38MAPK経路を介して赤芽球系分化のみならず、顆粒球系、巨核球系分化も誘導することが確認され、形態学的にも同様の結果を得た。血球分化に関与する各種転写因子の発現変化をRT-PCRで検討したところ、STI571刺激でc-mybの発現が低下したが、SB203580投与によりその発現低下は抑制された。STI571はablキナーゼの他にc-kit、PDGFRα、PDGFRβなどのキナーゼ活性を阻害することも知られているが、K562細胞ではこれらキナーゼの発現は認めなかった。一方Ph染色体陰性赤芽球性白血病細胞株TF-1細胞においてはc-kitの発現を認めるが、STI571刺激でのGP-A発現変化は認められなかった。

（結語）STI571はAblキナーゼ活性を抑制し、p38MAPKのリン酸化とERKの脱リン酸化によりK562細胞の多系統への分化を誘導すると考えられた。

論文審査の要旨

慢性骨髄性白血病細胞株K562細胞は、酪酸などの薬剤で赤芽球系への分化が誘導されることが報告されている。その機序としてp38 MAPKのリン酸化とERKの脱リン酸化の重要性が報告されている。STI571によるK562細胞の赤芽球系への分化も報告されているが、その機序は明らかではない。本研究ではSTI571によるK562細胞の分化誘導にp38 MAPKのリン酸化とERKの脱リン酸化が重要であり、かつSTI571により多系統血球分化誘導が認められることを明らかにした。

論文審査において、STI571刺激によりヘモグロビン産生が誘導される際のミトコンドリアの状態の確認や、MTT assayで増殖抑制効果を確認するのみではなく、細胞周期の停止が起きているのかあるいはアポトーシスが誘導されているのか詳細な検討が必要と指摘を受けた。またSTI571刺激によりこれまで報告されてきた赤芽球系のみではなく、多系統血球分化誘導が示され、血球分化に重要である転写因子c-mybの発現変化をRT-PCRで確認しているが、プロモーター領域のメチル化、ヒストンの修飾（メチル化、アセチル化）を将来解析すると転写因子の発現調節の解明につながると助言された。さらに本研究ではSTI571によりp38MAPKのリン酸化が上昇するものの、その上流であるMKK3/6のリン酸化が変化しないことについて質問があった。これに対し、p38 MAPKの上流に関しては未だ全貌が明らかではなく、おそらくMKK3以外にも重要な因子が存在している可能性があること、また過去の報告例でも本研究同様赤芽球系分化誘導にp38 MAPKのリン酸化が重要であったが、MKK3のリン酸化は変化しなかったことを回答した。また、本論文ではK562細胞にc-kit、PDGFRα、PDGFRβが発現しておらず、かつPh染色体陰性の赤芽球性白血病細胞株TF-1は分化能をもつにもかかわらずSTI571では分化が誘導されないことを根拠に、STI571による分化がabl1キナーゼ活性を抑制することで誘導されるとしたが、K562細胞にc-kitを発現させたうえでSTI571による分化誘導がおこるかを確認することも重要であると指摘された。

以上より本研究はさらなる検討されるべき点はあるものの、STI571による分化誘導に着目し、その機序としてp38 MAPKの活性化、転写因子c-mybの発現低下を初めて明らかにした点で価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　池田　康夫
発生・分化生物学　須田　年生　微生物学・免疫学　小安　重夫
医化学　末　松　　誠
学力確認担当者：
審査委員長：須田　年生

試問日：平成16年２月12日

Recombinant single-chain antibodies with various oligopeptide tails for targeted gene delivery.

（標的遺伝子導入のための種々のペプチドテイルを付加した組換え一本鎖抗体）

鈴　木　　正　崇

内容の要旨

遺伝子治療は従来完治困難と考えられていた疾患に対する画期的な治療法として期待され、世界的に臨床試験が行われている。しかし、現在の遺伝子治療の技術は完全と言えず、特定の臓器や細胞を標的できる遺伝子導入技術が必要と考えられる。当研究室では数年前にモノクローナル抗体（mAb）を用いてEGF受容体を過剰生産する扁平上皮癌細胞をターゲティングする遺伝子導入技術「イムノジーン法」を開発した。本研究ではさらに改良を加え新たに組換え一本鎖抗体（scFv）を用いた「組換えイムノジーン法」を開発し、扁平上皮癌遺伝子治療の可能性を検討した。

抗EGF受容体mAbB4G7のcDNAより作成した一本鎖抗体遺伝子に正、負電荷性ペプチドテイルを付加した８種類の組換え一本鎖抗体遺伝子を作成した。これらの組換え一本鎖抗体遺伝子（組換えイムノポーター）を大腸菌や酵母を用い発現を試みた。大腸菌発現系において全ての組換えイムノポーターは発現したが、その多くは不溶性画分に存在していた。酵母発現系では負電荷性テイルを持つ組換えイムノポーターが効率よく培養上清に分泌された。さらに高塩濃度下では培地中への分泌量が著しく増加した。この条件を用いて長い負電荷性テイルを持つ組換えイムノポーター（scFv-$(D4S)_5$）の大量調製を行った。精製した組換えイムノポーターは表面が正に帯電したDNA/PEI複合体に静電的に相互作用し、イムノジーン複合体を形成した。EGF受容体を過剰発現する扁平上皮癌由来のA431細胞において、組換えイムノジーン（scFv/DNA/PEI複合体）はmAbB4G7の細胞表面への結合を濃度依存的に阻害した。このことから複合体形成後も一本鎖抗体の抗原特異性は保たれていると考えられた。*in vitro*においてA431細胞に対する組換えイムノジーンの遺伝子導入効率をルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて測定した。市販のリポフェクション試薬と比較したところ、ほぼ同等の導入効率を示した。また、DNA/PEI複合体に較べ1000倍高い導入効率を示した。βガラクトシダーゼレポーター遺伝子を導入し、X-gal染色を行ったところ、組換えイムノジーン処理した細胞群の３～５％に染色が認められた。一方、自殺型治療遺伝子のヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ遺伝子を導入したところ、ガンシクロビルに対する感受性が50％生存率において約250倍高くなり、A431細胞に対する殺細胞効果が確認された。

組換えイムノポーターは酵母発現系で安価に大量調製可能であり、大型動物モデルおよび大量投与に対応できる。組換えイムノポーターを用いた抗体/DNA複合体（イムノジーン）は扁平上皮癌細胞A431に対し高い特異性と導入効率を示した。従って、「組換えイムノジーン法」による扁平上皮癌をターゲットした遺伝子治療の可

論文審査の要旨

遺伝子治療は従来完治困難と考えられていた疾患に対する画期的な治療法として期待されているが、現在の遺伝子治療の技術は完全と言えず、特定の臓器や細胞を標的できる遺伝子導入技術が必要と考えられる。本研究では生体内のターゲティング可能な遺伝子導入法を目指した、ヒト上皮増殖因子（EGF）受容体のエンドサイトーシスを利用した遺伝子導入「イムノジーン」法の開発について報告された。抗EGF受容体モノクローナル抗体B4G7のcDNAより作製した一本鎖抗体遺伝子に正、負電荷性ペプチドテイルを付加した組換え一本鎖抗体遺伝子を作製した。これらの組換え一本鎖抗体遺伝子（組換えイムノポーター）を大腸菌、酵母を用いて発現を試みた。先ず、酵母発現系を用いて長い負電荷性テイルを持つ組換えイムノポーターの大量調製を行った。組換えイムノポーターと遺伝子DNA、ポリエチレンイミンを混合することによって、組換えイムノジーンが形成される。この組換えイムノジーンは細胞表面のEGF受容体に特異的に結合することが示された。EGF受容体を過剰発現する扁平上皮癌細胞に対し、組換えイムノジーンはリポフェクション法とほぼ同等の導入効率を示した。また、ヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ遺伝子を導入し、ガンシクロビルで処理した結果、著しい殺細胞効果が認められた。すなわち組換えイムノポーターを用いた「組換えイムノジーン」法はターゲッティング可能な新しい遺伝子導入法であることが示された。

審査に際しては、モノクローナル抗体のFab断片を用いたFabイムノジーンとの比較、組換えイムノジーンによる遺伝子導入効率、また臨床応用への可能性に関して質疑がなされ、抗体のFab断片に較べ一本鎖抗体はやや抗原結合力が劣るが、Fabイムノポーター調製時のように化学的結合を用いない為、大量調製が簡便であることが説明された。組換えイムノジーンの遺伝子導入効率はリポフェクション法と同程度であるもののウィルスベクター法より低いとの指摘がなされた。これに対し、組換えイムノジーンは積極的に細胞質から核へ移行する機構を持たないので、エンドソームの膜透過活性を持つ分子や、核移行を促進する分子を付加して導入効率を高める予定であるとの解答がなされた。組換えイムノジーンの抗原性に関して、マウス由来の一本鎖抗体を利用したものは人体への投与には不適当だが、一本鎖抗体のヒト型化がすでに済んでおり、これを用いることにより免疫応答を回避可能であることが述べられた。また生体内での非特異的遺伝子導入を抑える為にペプチドテイル部分の改変を行い、マウスで検討しているとの説明がなされた。最後に、臨床応用に向けて生体内の組換えイムノジーンに対する免疫応答の検討、器官培養での研究を行うべきであろうとの助言がなされた。

以上、本研究はさらに検討すべき点が残されているが、一本鎖抗体を用いた遺伝子導入システム「組換えイムノジーン」法を確立し、扁平上皮癌に対する遺伝子治療の可能性を示したことなど、有意義な研究であると評価された。

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

試問日：平成16年２月４日

Characterization of *AOC2* gene encoding a copper-binding amine oxidase expressed specifically in retina.

（網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素*AOC2*の遺伝子の解析）

張　　強

内容の要旨

【目的】我々は網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素（AOC2）のクローニングに成功した。これは銅依存性アミン酸化酵素のファミリーに属する遺伝子で、血管内皮細胞に発現する接着因子（VAP-1、AOC3）と65%の相同性を持つ。マウス、ラットのAOC2を単離し、さらにその遺伝子構造、周辺遺伝子構造を解析した。遺伝子の複製などを含めてAOC2の機能について考察した。

【対象と方法】ヒトAOC2cDNAをプローブとして、マウスのゲノムDNAファージライブラリをスクリーニングした。設計したプライマーでAOC2を増幅し、AOC2の遺伝子構造を決定した。ラットAOC2エクソン１のクローニングをした。更にAOC2およびAOC3のタンパク質２次構造の解析をした。マウス、ヒトAOC2遺伝子とその周辺遺伝子の塩基配列を決定し、構造を明らかにした。AOC2 mRNAの定量分析を行った。In situ hybridizationおよび免疫染色法によるAOC2の網膜発現部位の解析をした。

【結果】マウスAOC2のcDNAは2,553塩基対よりなり、757アミノ酸のタンパク質をコードしていた。ヒトAOC1、ヒトAOC2、マウスAOC3、ヒトAOC3とそれぞれ37%、80%、61%、60%の相同性があった。活性部位や銅付着部位は保存されていた。アミノ酸配列５から17に膜貫通ドメインが存在する可能性が予測された。グリコシル化部位は７つのセリン／トレオニン残基と３つのアスパラギン残基に存在すると予測された。ラットにおいてAOC2は擬遺伝子化している可能性がある。定量的PCRの結果、網膜で特に多く発現していることがわかった。In situ hybridizationと免疫染色法によって網膜神経節細胞に特異的な発現が観察された。AOC2とその周辺遺伝子の解析によって、AOC2は２つの遺伝子、psem3とAOC3に挟まれていることが分かった。AOC2周辺にDNA転位の痕跡が見つかった。

【結論】AOC2の網膜における特異的な発現が確認された。銅付着部位、酵素活性部位およびグリコシル化部位がAOC3と一致しているから、AOC2はAOC3と似た性質をもっていると予測し、そして二つの遺伝子が縦列に存在することからAOC2はAOC3から網膜特異的な新しい接着因子として進化したと予測される。ラットの偽遺伝子化になっているAOC2の代わりにAOC3あるいは他のアミン酸化酵素が機能している可能性がある。遺伝子の構造、偽遺伝子の存在、トランスポゾンの存在からこの領域において複雑な遺伝子複製や転移が起こったことが示唆される。

論文審査の要旨

網膜に特異的かつ豊富に発現する遺伝子の捜索は視機能解明および網膜の遺伝的疾患の病態解明に重要である。我々がクローニングに成功し網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素（AOC2）は、銅依存性アミン酸化酵素のファミリーに属する遺伝子で、血管内皮細胞に発現する接着因子（VAP-1、AOC3）と65%の相同性を持つ。更にマウス、ラットのAOC2を単離し、その遺伝子構造、周辺遺伝子構造を解析した。AOC2は網膜で特に多く発現していることが判明した。活性部位や銅付着部位は保存されており、アミン酸配列５から17に膜貫通ドメインが存在する可能性が予測された。ラットにおいてAOC2は擬遺伝子化している可能性があり、AOC2は２つの遺伝子、psem3とAOC3に挟まれていることが分かった。AOC2周辺にDNA転位の痕跡が発見され、AOC2とAOC3の遺伝子が縦列に存在することからAOC2はAOC3から網膜特異的な新しい接着因子として進化したものと予測される。ラットの偽遺伝子化になっているAOC2の代わりにAOC3あるいは他のアミン酸化酵素が機能している可能性がある。遺伝子の構造、偽遺伝子の存在、トランスポゾンの存在からこの領域において複雑な遺伝子複製や転移が起こったことが示唆された。審査ではまず、AOC3遺伝子の局在とAOC2遺伝子の機能について質問がなされた。これに対して、AOC3が炎症時に内皮の表面に移動する。AOC2がAOC3との高い相同性およびゲノムDNA上縦列に存在することからAOC3と同じ接着機能と酵素活性を持っていると推測されるとの回答がなされた。また、炎症時に細胞の表面に移動することによって、細胞中のアミンの調節に影響がないのかという質問がなされた。これについては、影響があるかもしれないが、炎症時発現量が多くなる可能性があることと、AOC2とAOC3はそもそも接着機能がメインで、他の酵素が細胞中のアミン調節機能を持っている可能性があると回答された。膜貫通部位について蛋白質のN末端以外に存在する可能性もあり、推測されるN末端の膜貫通部位がシグナルペプチドの可能性もあると指摘された。これに対して、その可能性が十分あり、AOC3の結果に基づいて酵素活性と接着機能が連動しているので、N末端が細胞の中に存在するか、膜を貫通して残りの部分が細胞膜の表面にあると考えられるとの回答があった。また、膜貫通部位と考えられる部分を除去した後、この遺伝子が細胞の表面に出現するかを確認すればはっきりすると回答がなされた。その他免疫染色で、蛋白分解酵素を使用した理由につき討論があった。

本研究ではAOC2がAOC3に比較し、網膜の神経節細胞層に分布しさらにAOC3の機能を有していることが推測され、膜貫通に関しては議論の余地があったものの、眼科学上貴重な論文と評価された。

論文審査担当者　主査　眼科学　小口　芳久
　　病理学　岡田　保典　　解剖学　仲嶋　一範
　　生理学　岡野　栄之

学力確認担当者：
　審査委員長：岡田　保典

試問日：平成16年２月18日

Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer.

（マウス核移植において体細胞型リンカーヒストンは
卵子特異的リンカーヒストンH1fooに速やかに置換される）

寺　西　　貴　英

内容の要旨

卵子特異的リンカーヒストンは、両生類を用いた研究から、初期発生および核移植に重要な役割を果たしていることが示唆されている。我々は、カエル卵子特異的リンカーヒストンB4と高い相同性を持つマウス卵子特異的リンカーヒストンを発見し、H1fooと命名した。本実験においては、H1fooのリプログラミングへの関与を明らかにするために、マウス体細胞核移植過程においてドナー細胞のリンカーヒストンが体細胞型のものからH1fooへと置換されるかどうかを検討した。さらに、FRAP（fluorescence recovery after photobleaching）法を用いてH1fooと体細胞型リンカーヒストンであるH1cとのクロマチン結合力の差を*in vivo*で比較することで、体細胞型から卵子型へのリンカーヒストンの置換がリプログラミングへ及ぼす影響について考察した。

核移植されたドナー体細胞核へのH1fooの取り込みを検討するため、抗H1foo抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、H1fooは核移植後10分以内という短時間で核に取り込まれた後、正常受精卵と相同の発現パターンを示した。一方、体細胞型リンカーヒストンであるH1cにGFPを融合し発現させた細胞をドナー細胞として核移植を行った結果、ドナー細胞核のGFPは核移植後30分では大部分が消失した。これらの結果から、ドナー核のリンカーヒストンは体細胞型から卵子型へと速やかに置換されることが明らかとなった。H1fooとH1cとの差異を分子レベルで検討するため、再構成クロマチンをマイクロコッカルヌクレアーゼ処理し、ヌクレオソーム安定化作用を*in vitro*で比較した。その結果、H1foo、H1c共にヌクレオソーム構造を安定化させてはいるものの、両者に明確な差は無かった。しかし、H1fooまたはH1cとGFPとの融合蛋白を安定発現した細胞を用いてFRAPを行った結果、蛍光の50%回復時間はH1cに比較してH1fooが有意に短く、可動成分においてもH1fooのほうが大きかった。従って、H1fooはH1cに比べて短時間でクロマチンに結合・乖離をくり返している上、強固に結合している成分が少ないと考えられた。

ドナー核の体細胞型リンカーヒストンが卵子型H1fooに速やかに置換され、その後の初期発生におけるH1fooの発現パターンが正常受精卵と同様であることから、ドナー核の遺伝子リプログラミングにおいてH1fooが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、核移植後のドナー核では卵子型への置換によってクロマチン構造が柔軟になることで、初期胚の発生に必要な遺伝子発現を容易にしている可能性が示された。

論文審査の要旨

近年の体細胞核移植研究において、移植したドナー核の遺伝子発現パターンが体細胞のそれから初期胚のパターンへと変化することはリプログラミング（初期化）とよばれている。このような卵子に特徴的な機能には卵子特異的に発現している蛋白が深く関与していることが予想されている。本研究ではマウス体細胞核移植において、卵子特異的に発現するリンカーヒストンH1fooがドナー核に速やかに取り込まれると同時に、ドナー核の体細胞型リンカーヒストンH1cが取り除かれることを示すことで、リンカーヒストンの置換がおこっていることを明らかにした。さらに、FRAP（fluorescence recovery after photobleaching）法を用いてH1fooとH1cのmobilityを検討した結果、H1fooはH1cに比較して有意に高いmobilityと大きなmobile fractionを有しており、H1fooの高いmobilityが核移植におけるリンカーヒストンの速やかな置換に関与すると共に、H1fooの大きなmobile fractionによりドナー核のクロマチン構造が柔軟になっているとの結論を得た。これらの結果から、H1fooがリプログラミングに関与していることが示唆された。

審査では、核移植後速やかにドナー核にH1fooを認めることについて、どのようなメカニズムが考えられるか質問があった。これに対して、H1fooは核のみならず卵細胞質にすでに過剰に発現していることで、ドナー核に取り込まれる準備がなされていると回答されたが、その科学的根拠が必要であるとの助言があった。また、H1fooの高いmobilityだけでは置換機構を十分に説明できないのではないかとの指摘があった。これに対して、この現象を制御する機構は両生類においてよく研究されており、同様の機構がマウスにおいても存在するのか今後さらなる検討が必要であるとの回答があった。さらに、蛋白の修飾により核への移行が影響されるのではないかとの指摘があった。これに対し、H1fooがcdc2によってリン酸化を受けることを提示し、今後H1fooのリン酸化によりmobilityがどのように変化するかを検討予定であるとの回答がなされた。退色後の蛍光が完全に回復しないことの理由を求められた。これに対して、immobile fractionの存在により蛍光が一定の値以上は回復せず、本研究の場合immobile fractionが大きいことがDNAとの強固な結合を表しているとの回答があった。

以上、本研究にはなお検討すべき点が残るものの、体細胞核移植時の核のリプログラミング機構の解明に向けて、さらなる研究の発展が期待される興味深い現象を明らかにした点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　産婦人科学　吉村　泰典
　　小児科学　髙橋　孝雄　　医化学　末松　　誠
　　産婦人科学　野澤　志朗
学力確認担当者：
　　審査委員長：髙橋　孝雄

試問日：平成16年２月18日

De novo protein synthesis is required for the activation-induced cytidine deaminase function in class-switch recombination.

（クラススイッチ組換えにおけるAIDの機能発現には新たなタンパク質合成が必要である）

土　井　　知　光

内容の要旨

B細胞の抗体遺伝子はクラススイッチ組み換え（CSR）と呼ばれるDNA組み換えにより異なる機能を持つサブクラスを発現することが出来る。近年activation induced cytidine deaminse（AID）がCSRに必須の遺伝子として発見され、高IgM血症２型の原因遺伝子であるこが報告された。更にAIDは非B細胞で人工基質上にCSRを起こすのに十分であることから、唯一の活性化B細胞特異因子であると示唆されている。

AIDはmRNA編集酵素Apobec-1に相同性を持っていることから、AIDもmRNA編集酵素として組み換え酵素を合成しているという仮説がある（mRNA編集仮説）。一方、AIDが唯一の特異因子であることや、AIDにDNA上のシトシンを脱アミノ化する活性があることから、AIDが直接DNAに作用しているという仮設もある（DNA編集仮説）。２つの仮説の相違点はAIDの下流にタンパク質合成が必要であるか無いかである。これらの仮説を検証するために、タンパク質合成阻害剤によりAID下流の反応が抑制されるか調べることにした。しかし、タンパク質合成阻害剤はAIDがCSRを起こす前に加えなければならないが、AIDの発現前に加えるとAIDの合成そのものを抑えてしまうため、AIDを不活化状態で発現させタンパク質レベルで活性を回復させる必要があった。そこでAIDとエストロゲンレセプター（ER）のホルモン結合領域との融合タンパク質を作成した。この融合タンパク質AID-ERは、AIDを不活化状態で発現させタモキシフェン（OHT）を加えることで迅速に活性化させることが出来る。AID-ERを導入したAID欠損B細胞において、CSRが抑制されるか検討した。CSRはOHT添加後１時間で検出され始め徐々に蓄積していったが、CSRはタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド（CHX）をOHT添加１時間前から加えておくことで強く抑制された。この抑制はCHXを加えるタイミングをOHTの１時間後にすることで解除された。もしタンパク質合成がDNAの修復段階に必要であるならば、１時間後にCHXを加えた場合でも抑制されると考えられる。また、CSRにCHXによって消失してしまうような非常に代謝回転の早いタンパク質が関与している場合や、CHXがCSRを抑制するような因子を誘導している場合も同様であると考えられる。したがって、AIDは新規のタンパク質合成を介して、修復段階よりも前、おそらくDNA切断の段階に関与しているのではないかと考えられる。この結果はAIDの下流に組み換え酵素の合成があり、組み換え酵素の合成後は阻害剤に影響されないというmRNA編集仮説を指示するものであり、すでに存在するAIDが直接DNAを攻撃する説では説明しにくいものである。

論文審査の要旨

抗体遺伝子のクラススイッチならびに可変領域の体細胞変異は免疫反応において重要である。AID（activation-induced cytidine deaminase）はクラススイッチと体細胞変異の両方に必須の遺伝子であることが示されたものの、その作用機序についてはRNAエディティングを介するか、DNAの直接の脱アミノ化によるものであるかは不明であった。本研究は、この点を明らかにする目的で、AID遺伝子とエストロゲン受容体の融合タンパク質（AID-ER）を利用した。AID-ERはそのままでは活性を持たず、エストロゲンが結合すると速やかに構造変化を起こし、活性を持つようになる。AID-ERをAID欠損B細胞に導入し、クラススイッチ刺激前後でタンパク合成を阻害してクラススイッチの誘導の有無を検討した。その結果、クラススイッチ組換えが誘導されるためにはAIDの活性化のみならず、新たなタンパク合成が必要であることが示された。AIDが直接DNAを修飾するのであれば新たなタンパク合成は必要がなく、AIDがエディティング酵素として別のmRNAの塩基変換を誘導して組換え酵素を生み出す可能性が強く支持された。

審査においては、まず第２著者との同等な貢献について事実関係が質問された。これに対し、申請者は当初tatペプチドを結合したAIDタンパク質を細胞外から導入するというアイデアによって新たなタンパク合成の必要の有無を検討する計画を立てたが、tat-AIDがうまく機能せず、同時期に第２著者がAID-ERを作製したために利用したこと、それ以外のアイデアやデータは全て申請者のものであることが説明された。次に、異なるタンパク質阻害剤（シクロヘキシミドとピューロマイシン）で結果に若干の違いがある理由について質問され、薬剤の強さに差があるためであり、これはAID-ER自身の発現レベルに若干差が出ることと矛盾しないと回答された。また、AIDがクラススイッチと体細胞変異の両方に機能するのであれば、体細胞変異における新たなタンパク合成の必要性はどうであるかとの質問がなされたが、これは体細胞変異を検出する感度の問題で難しいことが説明された。さらに、AIDが核において機能するのか否かが質問され、AIDが核に移行することは確認されており、恐らく核で機能すると思われること、核移行が出来ないAID-ERの変異体を作製するなどで解答が得られるはずであるが、証明はまだであると回答された。その他、本研究のバックグラウンドならびに周辺領域に関する質問がいくつかなされ、それぞれに回答がなされた。

審査員の協議により、本研究はクラススイッチの分子機構の一端を明らかにした価値ある研究であると評価され、同時に申請者は研究の内容のみならず周辺領域に関する十分な知識を持ち、学位を与えるにふさわしいと認められた。

論文審査担当者　主査　微生物学・免疫学　小安　重夫
　微生物学・免疫学　石川　博通　　先端医科学　河上　　裕
　発生・分化生物学　須田　年生
学力確認担当者：
　審査委員長：石川　博通

試問日：平成16年２月12日

Multifocal Magnetoencephalogram Applied to Objective Visual Field Analysis.
（多局所視覚誘発脳磁による他覚的視野評価）

西　山　　隆　恒

内容の要旨

現在、眼科の臨床において視野の評価は自覚的な検査方法によって行われており、確立された他覚的な視野の検査方法は存在しない。

視野の多局所を同時に、かつ短時間で刺激、記録を行いながらも、局所の反応を抽出することを可能とした方法の一つにmultifocal techniqueを応用したVisual Evoked Response Imaging System（VERIS）がある。近年、他覚的視野評価を行うためにVERISを用いて多局所視覚誘発電位の研究が行われてきた。しかし、頭皮上で計測される電位は頭内媒体の影響を強く受けるため、視覚誘発電位ではその脳内の活動源の位置を推定することは困難であった。VERISはリアルタイムに計測、解析を行うために高い時間分解能を必要とする。視覚誘発電位と同様の時間分解能を持ち頭内媒体の影響をほとんど受けることがない非侵襲的な方法として脳磁図がある。脳磁図は頭皮上にあらわれた脳内の活動に伴って発生する磁場のパターンから、脳内の電気活動を等価電流双極子（equivalent current dipole, ECD）として代表させて推定する方法である。

本研究ではVERISと脳磁図を組み合わせて多局所視覚誘発脳磁の測定を行い、その発生源の解析を行った。対象は眼疾患を持たない健康成人男性11人である。視覚刺激は全体で中心12度を占める48分割されたダーツボードパターンを使用した。中心０－３度を中心部、３－６度を傍中心部、６－12度を周辺部とした。視覚誘発脳磁の測定は後頭葉視覚領野を広くカバーするように選ばれた16チャンネルよりVERISで行った。得られた視覚誘発脳磁の波形を元に脳磁解析プログラム上で等磁場曲線を描き、単等価電流双極子モデルを使用してECDを推定した。

測定を行った結果、視野の中心部、傍中心部からは良好な反応が得られたものの、周辺部、特に上方には一部反応の得られづらい部位が存在した。良好な反応が得られるセグメントの場所は個人差が大きいものの得られた波形の再現性は良好であった。これは、周辺部から推定されたECDが脳内の前方に推定されていることよりセンサーからの距離の影響が大きく関わっていると考えられた。

ECDは後頭葉一次視覚野に推定された。視野の上半視野、下半視野に対するECDはそれぞれ下方、上方に推定された。また、右半視野刺激、左半視野刺激に対するECDはそれぞれ左方、右方に推定された。そして、中心部、傍中心部、周辺部と刺激が周辺に移動するのに従って推定されるECDは前方内側に移動する傾向にあった。これらは視野の後頭葉視覚野における投射が半球間裂と鳥距溝に対して十字に並んでいるとする十字モデルによく一致する結果であった。

本研究により、VERISと脳磁図を組み合わせることにより他覚的に視野評価を行うことが可能となった。

論文審査の要旨

他覚的視野測定法を確立することを目的としてvisual evoked response imaging system（VERIS）と脳磁図を組み合わせて多局所視覚誘発脳磁の測定を行った。測定された視覚誘発磁場より作成された等磁場曲線のパターンから等価電流双極子（ECD）の推定を行い、視覚誘発脳磁の発生源の解析を行った。測定を行った結果、視野の中心部、傍中心部からは良好な反応が得られたものの、周辺部、特に上方には一部反応の得にくい部位が存在した。良好な反応が得られるセグメントの場所は個人差が大きいものの得られた波形の再現性は良好であった。これは、周辺部から推定されたECDが脳内の前方に推定されていることよりセンサーからの距離の影響が大きく関わっていると考えられた。ECDは後頭葉一次視覚野に推定された。視野の上半視野、下半視野刺激に対するECDはそれぞれ下方、上方に推定された。また、右半視野刺激、左半視野刺激に対するECDはそれぞれ左方、右方に推定された。そして、中心部、傍中心部、周辺部と刺激が周辺に移動するのに従って推定されるECDは前方内側に移動する傾向にあった。これらは視野の後頭葉視覚野における投射が半球間裂と鳥距溝に対して十字に並んでいるとする十字モデルによく一致する結果であった。以上より、網膜の局所の反応を正しく得ることができたと考えられる。本研究によりVERISと脳磁図を組み合わせることにより他覚的に視野評価を行うことが可能であることが示された。

審査では、今回パタン刺激により得られた反応は大脳のどの部分に投射されているのかの質問があった。これに対し今回に得られた反応は後頭葉皮質の第１次視覚野に投射されている。また今回施行した脳磁図のシステムでは深部から検出が困難であるとの回答があった。脳磁図の反応に２峰性と３峰性が見られこの比率が過去の報告と異なることへの説明を求められた。これに対しては刺激の範囲の違い、被験者大脳皮質の解剖学的相違、脳磁図では電位のダイポールの向く位置により磁場の反応が脳磁図上得られないことが原因である事などにつき図を用いた説明がなされた。次に視野の下よりも上の方が反応の小さい理由について質問があり、これも解剖学的理由によるものと説明があった。そのほか脳磁図を臨床応用する場合に、どのように行うかの議論があり、脳磁図では各刺激範囲で得られる波型を観察することで判定が出来ることを図によって説明がされた。さらにこれまでの視覚誘発電位による視野と脳磁図による視野との関連性につき評価する必要性があるのではという視野と脳磁図による視野との関連性につき評価する必要性があるのではという質問にたいし、現在実験中であるとの回答があった。そのほか反応の不応期の問題，半測失認に使用できるかの討論があった。

本研究はVERISと脳磁図を組み合わせる事により、これまで報告の無かった視野の中心，傍中心、周辺部までの視野の他覚的機能評価の可能性を示した論文であり、眼科学上意義のあるものと高く評価された。

論文審査担当者　主査　眼科学　小口　芳久
　　外科学　河瀬　斌　　解剖学　仲嶋　一範
リハビリテーション医学　千野　直一
学力確認担当者：
　審査委員長：河瀬　斌

試問日：平成16年２月14日

Association of 17q21-q24 Gain in Ovarian Clear Cell Adenocarcinomas with Poor Prognosis and Identification of *PPM1D* and *APPBP2* as Likely Amplification Targets.

（卵巣明細胞腺癌の悪性形質獲得に関与する遺伝子探索の試み－卵巣明細胞腺癌の予後不良因子としての17q21-q24領域増幅の検出と標的遺伝子候補*PPM1D*と*APPBP2*の同定－）

平　沢　　晃

内容の要旨

1．緒言

本邦で高頻度に発生するといわれている卵巣明細胞腺癌は、他の上皮性卵巣癌に比べて予後不良であると考えられている。近年、神経芽細胞腫における*MYCN*増幅や、乳癌での*ERBB2*の増幅など、予後に関与する病型特異的ゲノム異常が多数報告されてきているものの、卵巣明細胞腺癌に特異的なゲノム異常についてはいまだ定説がない。

そこで卵巣明細胞腺癌の悪性形質獲得に関与する遺伝子を同定するためCGH（Comparative genomic hybridization）法を用いてゲノムコピー数の変化を網羅的に検索し、検出された異常領域における標的遺伝子を探ることを目的とした。

2．材料・方法

慶應義塾大学病院産婦人科で初回手術を施行し検体使用の同意が得られた卵巣明細胞腺癌20例のゲノムDNAとtotal RNAを使用した。まずゲノムDNAを用いてCGH法にて染色体コピー数異常を検討した。次にCGH法の結果、遺伝子増幅が高頻度に起きていると考えられる部位に対して、データベースならびに文献より増幅領域に座位する複数の遺伝子を探し、total RNAを用いそれぞれの遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法にて検討した。その結果、ゲノム増幅の程度と発現量との間に相関が認められ、さらにその発現亢進と予後不良との間に相関を認めた遺伝子を標的遺伝子とした。

3．結果

検討症例のうちゲノムコピー数の異常を17例（85%）で検出した。コピー数の過剰は17qで最も高頻度に認められた（8例、40%）。CGHプロファイルより17qの共通増幅領域を17q21-q24と定めた。17q21-q24のコピー数過剰例は、正常例と比較して累積生存率が有意に低く、また腹腔細胞診陽性例、60歳以上の頻度も有意に高かった。定量的RT-PCR法の結果、17q増幅領域に座位する2遺伝子（*PPM1D*、*APPBP2*）ではゲノムDNAのコピー数とmRNAの発現との間に有意な相関を認め、さらにこれら遺伝子の高発現例では低発現例と比較して有意に予後不良であった。

4．考察

PPM1Dは脱リン酸化酵素であり、その基質であるp38を介してp53の不活性化に作用し最終的に細胞の増殖を促進させると考えられている。またmicrotuble binding proteinであるAPPBP2は最近乳癌において増幅と発現亢進が認められると報告されていることから、これらの2遺伝子は卵巣明細胞腺癌の悪性形質獲得に関与している可能性が示唆された。

5．結論

17q21-q24領域に増幅を認める卵巣明細胞腺癌は予後不良であり、この領域の増幅により発現亢進の認められた遺伝子*PPM1D*と*APPBP2*は卵巣明細胞腺癌の悪性形質獲得に関与し、さらに悪性度判定のバイオマーカーになりうることが示唆された。

論文審査の要旨

卵巣明細胞腺癌は欧米に比較して本邦で高頻度に発生がみられ、また予後不良である。したがって予後不良例に対する個別化治療確立の観点からその分子異常の解明が急務の課題である。そこで本研究では明細胞腺癌の予後に関わる遺伝子の同定を目的とした。

Comparative genomic hybridization（CGH）は、染色体上の特定領域に生じたゲノムDNAコピー数の変化を網羅的に解析する方法であり、その結果コピー数が過剰（gain）と判定された領域には癌遺伝子が存在していると予測される。そこで検体使用の同意が得られた20例の明細胞腺癌初回治療例を対象に、腫瘍組織のゲノムDNAを用いCGHにてゲノム一次構造変化を解析した。その結果17q21-q24領域で最も高頻度（8例、40%）にgainがみられ、さらに17q gain例はgainがない例よりも予後不良であることが判明した。そこで同領域内に存在する15種の遺伝子発現を同一検体から抽出したtotal RNAを用い定量的RT-PCR法にて解析した。その結果17q23.2領域に座位する2つの遺伝子、*PPM1D*（protein phosphatase, magnesium-dependent, 1, delta isoform）と*APPBP2*（amyloid beta precursor protein-binding protein 2）はゲノムコピー数とmRNA発現量との間に相関を認め、さらに高発現例では低発現例に比べ有意に予後不良であった。最近、これらの遺伝子は癌関連遺伝子であり、一部の癌腫においてそのmRNA高発現例が予後不良であると報告されたことより、明細胞腺癌においてもその増幅と発現亢進が予後不良因子であると考察された。

審査ではまずCGHの問題点に関して質問がなされた。それに対し今回の検討では検出感度および信頼性の限界を踏まえた上でCGHを採用し、また解像度や定量性といったCGHの問題点を改善する目的でCGHマイクロアレイを用いた新しい試みを行いつつある旨の回答がなされた。次に17q gainは明細胞腺癌特異的かと指摘されたが、漿液性腺癌と類内膜腺癌では17q gainの報告が無く、むしろ同領域はLOHのhot spotとして報告されていることからも、明細胞腺癌の特徴であると考えているとの回答がなされた。最後に今後の検討課題に関する質問に対して、抗PPM1D抗体による免疫染色と、明細胞腺癌細胞株を用いた細胞生物学的検討を現在施行中であるとの回答がなされた。

以上のように、本研究はいくつかの検討課題が残されているものの、明細胞腺癌の予後不良決定遺伝子の同定を試みることによって、その悪性形質獲得機構の端緒を明らかにした点が評価された。

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　亨宇
　分子生物学　清水　信義
学力確認担当者：
　審査委員長：吉村　泰典

試問日：平成16年1月26日

ヒトダイオキシン受容体抑制因子の同定および そのPro185Ala多型と矮小陰茎との相関研究

藤　田　　秀　樹

内容の要旨

比較的低用量のダイオキシン類を母体ラットに投与することにより、オス胎仔精嚢・前立腺の重量が減少、妊孕性低下という不完全男性化徴候が生じる。このようなダイオキシン類の生体への作用は、ダイオキシン受容体であるAryl hydrocarbon receptor（Ahr）を介して伝達される。最近、Ahrを抑制する蛋白Aryl hydrocarbon receptor repressor（Ahrr）がマウス種において同定された。本研究では、まずヒト*AHRR*遺伝子を同定した。次に「胎児が子宮内で催奇形因子に曝露した場合の奇形発症は、胎児の遺伝的背景に依存する」という作業仮説に基づき、不完全男性化徴候である矮小陰茎とAHRR蛋白の多型に遺伝疫学的な関連が存在するか否かを検討した。

GenBank遺伝子データベースに登録されたヒト無名cDNA配列群とマウス*Ahrr*遺伝子のcDNA配列を逐次比較し、アミノ酸レベルで55%の同一性・81%の相同性を有する無名cDNA配列KIAA1234を同定した。KIAA1234のヒト染色体上の位置を放射線照射ヒト・げっ歯類ハイブリッド細胞パネルを用いて決定したところ、第５染色体短腕末端にマップした。この位置はマウスAhrrのマップする第13番染色体とシンテニーの位置関係にある。以上の成績からKIAA1234がマウスAhrrのヒトオルソログであると結論した。ヒト無名ゲノム配列群とKIAA1234cDNA配列を逐次比較しエキソン・イントロン構造を決定した。正常日本人由来ゲノムDNA等量混和物を鋳型として、全エキソンの塩基配列をPCR-シーケンシング法により解析し、第６エキソン内にPro185Ala多型を同定した。

同定した*AHRR*-Pro185Ala多型と矮小陰茎（陰茎長＝平均－2.5SD未満）の発症について関連解析を行った。インフォームドコンセントを得た59人の日本人患者と80人の日本人正常男性の全血からゲノムDNAを抽出し、PCR-シーケンシング法または熱変性高速液体クロマトグラフィー法によりジェノタイピングを行った。患者群における185Proアレル・ホモ接合体の割合は46%（27/59）であり、正常対照群における27%（22/80）に比して有意に高値であった（$p=0.03$）。

今回の研究により、ダイオキシン受容体の抑制物質である*AHRR*の遺伝子多型と不完全男性化徴候である矮小陰茎に統計的な相関が存在することが示された。ダイオキシン曝露と矮小陰茎の因果関係を証明するものではないが、両者が関連すること、さらに、矮小陰茎の発症に胎児の遺伝的背景が関与している可能性を示唆する結果である。

論文審査の要旨

本研究では、GenBank遺伝子データベースに登録されたヒト無名cDNA配列群とマウスArylhydrocarbon receptor repressor遺伝子（以下*AHRR*）のcDNA配列を逐次比較し、マウス*Ahrr*と高い相同性（アミノ酸レベルで81%）を有する無名cDNA完全長配列KIAA1234を同定し、マウス*Ahrr*のオルソログであると結論した。ヒト*AHRR*第６エキソン内にPro185Ala多型を同定し、矮小陰茎（陰茎長－2.5SD未満）との関連解析を行った。59名の患者群におけるPro185アレル・ホモ接合体の割合（27/59）と正常対照群における同アレル・ホモ接合体の割合（22/80）を比較したところ有意な差を認めた。

審査では、まずKIAA1234がマウス*Ahrr*のオルソログであるとする結論の妥当性について質問された。両者の染色体座位がsyntenicな位置関係にあること、KIAA1234が放射線照射ハイブリッド細胞パネルによっても第５染色体短腕末端にマップし、他の重複遺伝子を認めなかったことが根拠として提示された。つづいてヒトAHRRの組織特異的発現について、内分泌臓器や生殖器における発現が評価されていない点について説明を求められた。精巣においてAHRRが高発現しているとの報告が提示され、*AHRR*多型と矮小陰茎の相関に生物学的意義があるとする本研究の結論に矛盾しないことが説明された。AHRRのPro185アレルとAla185アレルの機能に差があるか否かについて未検討である点が指摘され、今後、蛋白レベル、活性レベルで両アレルの機能解析を行うようにとの助言がなされた。Pro185アレルとAla185アレルがHardy-Weinberg平衡にあったことの意義について質問された。本多型が分子進化論的に中立で、reproductive fitnessに負の影響を与えることがなかった可能性が高いことが説明された。本研究は、患者群・対照群におけるAHRRと矮小陰茎の関連について評価したのであって、ダイオキシン曝露と矮小陰茎の直接的関連を評価していないことについて質疑がなされた。本研究が患者群、対照群でダイオキシン曝露量に差はないとの仮定にたって実施されたことに関連して、母乳、食物中のダイオキシン量と土壌汚染が主たる交絡要因と考えられる事、旧厚生省による調査によれば、これらの要因に大きな地域差を認めない事が説明された。今後は、母乳栄養に着目した検討、同胞間での検討が重要課題である、との助言がなされた。

矮小陰茎患者と矮小陰茎のない同胞対を対象とした解析、食物内容や居住地などの交絡要因を調整する事、Pro185アレルとAla185アレルの機能について蛋白レベル・発生レベルでの比較をする事、*Ahrr*のノックアウトマウスを作成しダイオキシン類の影響を評価する事が今後の課題であるが、*AHRR*多型と矮小陰茎の発症が関連する可能性を初めて示唆した点において意義のある研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　小児科学　高橋　孝雄
　　分子生物学　清水　信義　　産婦人科学　吉村　泰典
　　泌尿器科学　村井　　勝
学力確認担当者：
　　審査委員長：清水　信義

試問日：平成16年２月19日

Expression and characterization of recombinant pyruvate kinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoites

（トキソプラズマ急増虫体の遺伝子組換えピルビン酸キナーゼの発現と解析）

前田　卓哉

内容の要旨

トキソプラズマ（*Toxoplasma gondii*）の急増虫体（tachyzoite）はエネルギー源を主に解糖系に依存していると考えられているが、その活性調節機構を含めた詳細については、未だ体系的には理解されていない。特に解糖系の律速酵素として知られるヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼおよびピルビン酸キナーゼのうち、ヘキソキナーゼおよびホスホフルクトキナーゼは非調節酵素として存在していることが既に報告されている。一方、原虫の粗抽出酵素を用いた検討では、ピルビン酸キナーゼがアロステリック酵素として存在し、解糖系の調節酵素として重要な役割を果たしていると報告されているが、実際の調節メカニズムについては不明な点が多く残されている。今回、トキソプラズマのピルビン酸キナーゼ遺伝子をクローニングし、組換え酵素を作製して、その酵素学的性質と解糖系における役割について検討を加えた。

はじめに、ESTのデータベースをもとに、*T.gondii* cDNAライブラリーから全長2,207塩基のピルビン酸キナーゼの遺伝子をクローニングし、組換え酵素を作製した。酵素学的性状としては、①至適pHを7.0近傍にもち、②活性にはカリウムイオンが必須であり、２価の陽イオン、特にマンガンによって著明に活性化を受けた。さらに③基質であるホスホエノールピルビン酸に対してはアロステリックに作用する一方、従来から活性化物質として知られるフルクトース１，６－ビスリン酸によっては影響を受けず、ヘキソキナーゼの反応生成物であるグルコース６－リン酸の存在下においてのみ酵素は特異的に活性化された。さらに、この特徴的な性質は酵素のアミノ酸配列にも反映しており、酵素の活性部位を含む領域では種を超えて非常によく配列が保存されていたが、フルクトース１，６－ビスリン酸などのリガンドが結合する活性調整領域の相同性は低く、トキソプラズマでは極めて特異なアミノ酸配列を有していた。

トキソプラズマではホスホフルクトキナーゼが非調節酵素であり、第一の律速酵素として知られるヘキソキナーゼは、反応生成物であるグルコース６－リン酸によってフィードバック阻害を受けないが、活性が低く律速酵素として機能することが報告されている。そのうえ、グルコース６－リン酸によってピルビン酸キナーゼが活性調節を受けており、グルコース６－リン酸を介するヘキソキナーゼ－ピルビン酸キナーゼの系が、解糖系の流れを調節する重要な役割を果たしていることが示唆された。この特徴的なメカニズムについては、トキソプラズマの細胞内寄生現象と関連するか否か、その生物学的意義については今後の検討が必要である。

論文審査の要旨

細胞内寄生原虫であるトキソプラズマは、そのエネルギー産生の多くを解糖系に依存しているが、未だ解糖系の調節のメカニズムについての詳細な検討は行なわれていない。本研究は、多くの細胞で解糖系の律速酵素の一つであるピルビン酸キナーゼについて、その重要性に鑑み、トキソプラズマ急増虫体（tachyzoite）から遺伝子をクローニングし、組換え蛋白を作製して、その酵素学的解析を試みたものである。解析の結果、トキソプラズマの酵素はグルコース 6-リン酸による活性調節を受けるという極めて特異な性質を明らかにした。またこの所見に基づいて、グルコース 6-リン酸結合部とおもわれる部分のアミノ酸配列について詳細に検討を加えた。審査では組換えピルビン酸キナーゼが四量体を形成することについて、その解析方法の詳細が問われ、組換え蛋白とnativeの蛋白について、ゲルろ過法とSDS-PAGE法を行ない、四量体を形成すると推定した旨が回答されたが、さらに超遠心法等を併用してより詳細に分子量を検討する必要があること、さらに、どのような結合様式で四量体を形成するのかも併せて検討する必要があることが指摘された。また、細胞内において、ピルビン酸キナーゼが糖付加などの修飾を受ける可能性について質問がなされ、組換え蛋白とnativeの蛋白について分子量に差がみられないことから、糖付加などの修飾を受けていないと考えて矛盾しない旨が回答された。さらに、二価の陽イオンによる酵素の活性化効果に関連し、酵素蛋白にintrinsicに結合している可能性のある金属イオンの有無、酵素反応系でのイオン濃度の調整方法の詳細が問われ、組換え蛋白を予めEDTAにてキレート処理後、陽イオンが添加された旨が回答された。また、組換え蛋白の至適pHについても質問がなされ、pH7.0近傍で最も高い活性が得られ、酸性側では比較的低いpHまで活性が得られる一方、アルカリ性側では、pHが8.0を超えると急速に活性が低下する事が答えられた。さらに、解糖系のバイパス経路であるペントースリン酸回路について、その系の存在と活性調節メカニズムについては、グルコース 6-リン酸の解糖系における役割について解析する上で非常に重要であり、さらに、宿主と異なる性質をもつこのピルビン酸キナーゼが、抗トキソプラズマ薬の開発ターゲットになりうるかどうかを検討する上でも、今後検討するべき課題であるとの指摘がなされた。

以上、本研究は、グルコース 6-リン酸による活性調節の生理的意義の解明など、今後更に検討を継続する余地を残しているものの、トキソプラズマにおける解糖系の律速酵素の一つであるピルビン酸キナーゼの解析を組換え蛋白を用いて行ない、従来の報告にはない新たな活性調節メカニズムを明らかにしたものであり、原虫感染症研究の上で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者　主査　熱帯医学・寄生虫学　竹内　勤
微生物学・免疫学　小安　重夫　　病理学　岡田　保典
医化学　末松　　誠

学力確認担当者：
審査委員長：小安　重夫

試問日：平成16年２月12日

正常組織由来色素細胞と母斑組織由来色素細胞のE-cadherinにおける細胞遊走能の差異

松　田　　就　人

内容の要旨

【背景】先天性巨大色素性母斑の治療には、外科的切除術に加え植皮術やtissue expander法の併用、curettage法、レーザー治療などがある。しかし、これらの方法では整容的に満足のゆく結果は得られず、治療に難渋しているのが現状である。その主な原因として、病変部が広範囲でしばしば全身に及ぶこと、また母斑細胞が数多く真皮内にも存在することが挙げられる。そこで何らかの方法で真皮内に存在する母斑細胞を表皮内へ移動させることができれば、先天性巨大色素性母斑の治療は容易になるものと思われた。母斑細胞はメラノサイトと起源が同じneural crest由来であるといわれている。メラノサイトは通常、真皮内には留まらず表皮内に移動し定着する。この移動の過程でそれまで発現していなかった細胞接着因子のE-cadherinを強く発現することが報告されている。そこで本研究では、母斑細胞が真皮から表皮へ移動できないのは、E-cadherinの発現の有無が関係しているのではないか、との仮説のもとにE-cadherinの発現の差異、及びE-cadherinの発現の有無によるそれぞれの色素細胞のE-cadherinへの細胞遊走能につき検討した。

【方法】23人の先天性巨大色素性母斑患者から採取した組織より組織凍結切片を作成し、メラノサイトと母斑細胞のE-cadherinの発現の差異を免疫組織化学的に検討した。さらに同患者から採取した組織の正常組織から表皮由来色素細胞を、母斑組織から真皮由来色素細胞を培養した。この２つの培養細胞についてE-cadherinの発現の差異を免疫細胞化学的、Western blotting、RT-PCRで検討した。さらに、Boyden chamberでE-cadherinを発現させた方向にそれぞれの培養細胞が遊走するかどうかを検討した。

【結果と考察】組織凍結切片では、表皮メラノサイトはE-cadherinを発現しており、真皮内の母斑細胞はE-cadherinを発現していなかった。培養細胞においても免疫細胞化学、Western blotting、RT-PCRで同様の結果が得られた。また、Boyden chamberにおいては、E-cadherinを発現していた培養表皮由来色素細胞はE-cadherinの方向に遊走してきたが、E- cadherinを発現していなかった培養真皮由来色素細胞はE- cadherinの方向に遊走してこなかった。以上の研究結果より色素細胞が真皮から表皮に移動するためには、E- cadherinの発現が重要であることが証明された。またE- cadherinの発現の有無が色素細胞の局在を決める一つの要因である可能性が示唆された。

論文審査の要旨

先天性巨大色素性母斑の治療として、早期curettage法が注目されている。これは新生児の母斑組織の真皮浅層部が、疎でnatural cleavage planeを形成しているため、鋭匙などで容易に除去出来ることを応用した治療法である。しかし、真皮深層に母斑細胞が存在する場合はその除去は困難であった。本研究では、メラノサイトでのE-カドヘリンの発現の有無が色素細胞の局在を決め、しいては母斑組織が完全切除可能か否かの指標になるのではないかと考え、正常組織と母斑組織由来色素細胞のE-カドヘリン発現の差異、及びE-カドヘリン発現の有無による色素細胞のE-カドヘリンへの細胞遊走能につき比較検討した。まず免疫細胞化学的検討、Western blotting、RT-PCRを行い、培養表皮由来色素細胞はE-カドヘリンを発現しており、培養真皮由来色素細胞はE-カドヘリンを発現していないことを見出した。また、Boyden chamberにおいてE-カドヘリンの発現を阻害した培養表皮由来色素細胞では、E-カドヘリンの発現を温存したままの培養表皮由来色素細胞に比べ、E-カドヘリンに対する細胞遊走能が有意に減少した。以上より色素細胞が真皮内から表皮内に移動するには、E-カドヘリンの発現が重要であることが判明し、E-カドヘリンの発現の有無が色素細胞の局在を決める一つの要因である可能性が示唆された。

審査では、まず表皮色素細胞と真皮色素細胞のE-カドヘリンの比較検討であれば、太田母斑などに見られるdermal melanocytosisの真皮色素細胞との比較検討もすべきではないかと助言された。これに対し、本研究は先天性巨大色素性母斑の治療を確立させる基礎研究であって、正常組織由来の表皮色素細胞と母斑組織由来の真皮色素細胞の比較検討を中心としたと回答された。次に、免疫細胞化学的検討で細胞膜だけが染まっている像が確認できたか、と質疑がされた。これに対し、一次抗体の希釈倍率を変え測定したが、細胞膜だけを染めることはできなかった。しかし、免疫組織化学的検討では細胞膜だけを染めることができたと回答された。さらに、Boyden chamberでリコンビナントヒトE-カドヘリンが、メンブランにコーティングされて機能的に働くのかと質疑がされた。これに対し、機能的に働いているかの検討は難しいが、コーティングしたリコンビナントヒトE-カドヘリンが確実にコーティングされているかは、凍結切片の免疫染色により確認したと回答された。最後に今後臨床応用を踏まえると、脱メチル化などE-カドヘリンをup-regulateさせるような因子を見つけるべきではないかと助言された。さらに論文の方法論の記載法、構成のしかたにも改善の余地があると指摘されたが、先天性巨大色素性母斑の早期掻爬療法の成績を向上させるための重要な基礎研究の１つであり、臨床的にも価値ある研究と評価された。

論文審査担当者　主査　形成外科学　中島　龍夫
　　病理学　岡田　保典　　皮膚科学　西川　武二
　　病理学　坂元　亨宇
学力確認担当者：
　　審査委員長：岡田　保典

試問日：平成16年２月20日

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

内容の要旨

「頭の中に映像が浮かぶ」という視覚表象を訴える統合失調症患者を臨床的に調査し、その内容、形式、形成と経過、他の症状との関連を精神病理学的に検討した。対象は35例（男性21例、女性14例）のICD-10の統合失調症診断基準を満たした患者で、平均年齢は35.0±13.6歳、統合失調症と診断された平均年齢は22.0±5.3歳であった。35例においてJaspersの記述現象学的方法論を用いて症状を抽出し、同一症例に見られた複数のエピソードを含め、70の視覚表象エピソードが得られた。視覚表象の初回出現時の年齢は平均21.7±11.3歳で、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35例中16例（45.7%）あった。視覚表象の持続期間は１日で消退したものから内容や形式が変遷しながら33年間ほぼ連日持続しているものまで多様であった。

視覚表象の内容や形式には経過とともに変化がみられ、大きく３つの類型に分類して検討した。第Ⅰ型は、注意が弛緩しているときにひとりでに浮かんできて自分では止められないという軽い束縛を伴うが、主体にとっては意識に侵入される感じが少なく、内容も他愛ないものが中心で苦痛が少ない。自生思考が視覚的な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しうる初期段階の軽い自我障害と考えられた。第Ⅱ型は、意識に侵入される感じが強く主体は束縛され、内容も不快なものが多く、主体を動揺させ不安にする。内容が過去の現実に限らず空想的になることもあるが、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り、このような主体の反応も含めてみると、観念と行為を併せ持つ強迫症状に近いと考えられた。第Ⅲ型は、意識に侵入される自覚が弱いので出現形式は第Ⅰ型と似ているが、主体が体験の中に取り込まれており、より強く束縛されているといえる。内容は物語的に発展し、願望充足的、さらに荒唐無稽になることもある。体験に抵抗するのではなく現実への関与を放棄して自閉的となる、映像を伴う空想妄想と考えられた。

35例中23例（65.7%）で複数の視覚表象の類型が出現し、第Ⅰ型、第Ⅱ型、第Ⅲ型の順に出現する傾向が指摘でき、逆の順に進展するものについては治療との関連が推測された。統合失調症の診断確定前に視覚表象が出現していた例が45.7%あり、視覚表象、特により早期に出現する傾向がみられた第Ⅰ型の視覚表象には、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た。

視覚表象の類型の変遷には、言語幻聴に代表される統合失調症の幻覚の変遷や、経過とともに自我異質的なものから自我親和的なものへと変化する統合失調症症状の変遷と類似があり、視覚表象は自我の障害を基盤として、その進展に応じて変遷する視覚領域の仮性幻覚であると考えられた。

論文審査の要旨

本論文は、統合失調症における視覚表象について、その内容、形式、形成と経過、他の症状との関連を精神病理学的に検討したものである。Jaspersの記述現象学的方法論を用いて症状を抽出し、視覚表象を有する統合失調症患者35例において70の視覚表象エピソードを得た。視覚表象は自生的な第Ⅰ型、強迫的な第Ⅱ型、空想的な第Ⅲ型に分けることができ、おおむねこの順に経過すると考えられた。逆の順に進展するものについては、治療との関連が推測された。また統合失調症の診断確定前に視覚表象が出現していた例があることからは、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と考えられた。視覚表象の病型の変遷には、言語幻聴に代表される統合失調症の幻覚の変遷や、経過とともに自我異質的なものから自我親和的なものへと変化する妄想などの統合失調症症状の変遷と類似があり、視覚表象は自我の障害の進展に応じて変遷する視覚領域の仮性幻覚であると考えられた。

審査では、まず視覚表象の定義について、幻視との違いの確認がなされた。視覚表象が統合失調症の特定の下位分類に出現する傾向について質問され、そのような傾向は見られていないと回答された。著者が検討した３つの病型は、ICD-10の分類に対応したものかについては、対応していないと回答された。第Ⅰ型は統合失調症の発病前に出現すると考えられるかについては、発病と同時あるいは発病後に出現したものもあり、すべてが発病前に出現するとは言えないと回答された。病型がひとつの型にとどまる例については、観察期間が短いこと、および必ずしも全例進展するとは限らないことが理由として考えうると回答された。視覚表象の浮かび方について、色彩、運動が伴うと答えられたことに関して、視覚処理の多数の経路の関与が考えられるとの指摘を受けた。脳波所見については、異常例はなかったと回答された。次いで外界の実在のものは見えているのかについて、見えてはいるが注意が向かないと臨床では訴えられると回答された。第Ⅰ型と白日夢など通常の体験との差異については、主体の能動性が希薄になるところが病的であると回答された。視覚表象に聴覚表象が伴っていても視覚表象であると訴えられるのは、体験が視覚表象として訴えられやすい傾向に由来するのではないかとの指摘を受けた。また全体として患者の訴えに依存している精神科診断の枠組みは将来変わりうるのではないか、および表象と幻覚との脳画像検査所見における差異が発見されると興味深いという指摘を受けた。さらに今後の研究の方向として、PETやfunctional MRI等を用いて、脳機能、脳局在性との関連を探求するべきであるとの助言があった。

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、統合失調症の視覚表象について詳細に検討し、その精神病理学的意義を明らかにした点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　医療政策・管理学　池上　直己
外科学　河瀬　斌　　眼科学　小口　芳久
解剖学　仲嶋　一範

研究指導者：鹿島　晴雄（精神神経科学）

学力確認担当者：
審査委員長：河瀬　斌

試問日：平成16年２月14日

Position-specific expression of the *Hox* genes along the gastrointestinal tract.

（ヒト腸管全長における*Hox*遺伝子の部位特異的な発現）

矢　作　　尚　久

内容の要旨

*HOX*遺伝子群は胎芽の前後軸方向の形態形成において重要な役割を担う。ヒトを含む哺乳類のゲノム中には39個の*HOX*遺伝子が存在する。39遺伝子は*HOXA*・*HOXB*・*HOXC*・*HOXD*に分けられ、それぞれ第７番・17番・12番・２番染色体上にクラスターをなして存在する。各クラスターには、９から11個の遺伝子が順にならび、他染色体上の遺伝子配列との相同性と各クラスター内の相対的な位置に応じて１番から13番まで付番され、パラログと呼ばれる。各パラログは、クラスター内の相対的な位置に応じて、胎児の椎体・四肢・管腔臓器（腸管・生殖器）の前後軸方向に分節状に発現し、番号の小さいパラログほど頭側に、番号の大きなパラログほど尾側に発現する。最近、*HOX*遺伝子が成人腸管にも発現すること、大腸癌において異常発現することが示されたが、正常成人腸管における*HOX*遺伝子群の発現パターンに関する系統的な研究は行われておらず、成人における*HOX*遺伝子の生理的意義は不明である。

本研究では、ヒト正常成人の食道・胃・十二指腸・空腸・回腸・回盲部・盲腸・上行結腸・横行結腸・下行結腸・直腸の11部位について全層組織に由来するcDNAを鋳型とし、定量的PCR法により全39*HOX*遺伝子の発現量を測定した。まず、熱変性高速液体クロマトグラフィー法を利用して既知量の鋳型DNAを得たのち、順次等倍に希釈した。希釈系列と各組織由来のcDNA、二重鎖DNAに介在する蛍光色素（SYBR Green）を混和したのち、PCR法により増幅し、蛍光強度を定量した。指数関数的増幅相における蛍光強度の対数値を直接近似し、y切片を外挿して増幅初期における鋳型DNA量を推定した。同じ方法によりハウスキーピング遺伝子*GAPDH*の発現量を測定した。*HOX*遺伝子発現量を*GAPDH*の発現量で除して正準化し、４クラスターx39遺伝子x11部位からなる行列データを得た。被説明変数を各*HOX*遺伝子の発現量、説明変数をクラスター、腸管前後軸上における相対的位置、パラログ番号として多変量解析を行った。

主成分分析を用いて、各*HOX*遺伝子発現を２次元平面に投射したところ、前腸由来腸管のベクトルの方向、大きさはほぼ一定であることが示された。中腸由来腸管・後腸由来腸管のベクトルもそれぞれ同じ方向・大きさを有していた。permax解析によれば、前腸由来組織において高発現する遺伝子は、後腸由来組織において低発現であり、後腸由来組織において高発現する遺伝子は、前腸由来組織において低発現である傾向を認めた。すなわち、成人腸管における*HOX*遺伝子群の発現パターンは、胎芽期腸管におけるそれに類似するものであることが判明した。胎芽期腸管における*HOX*遺伝子群の発現は原始腸管の部位特異的な分化過程に関与していると考えられていることから、成人腸管における*HOX*遺伝子群の発現が腸管上皮の部位特異的な再生過程に関与している可能性が示唆された。

論文審査の要旨

胎芽の前後軸方向への形態形成を規定する*HOX*遺伝子群は成人腸管でも発現しているが、生理的意義は明らかでない。本研究では、リアルタイムRT-PCR法を用いて全39*HOX*遺伝子の発現量を定量する測定系を確立し、成人腸管11部位の全層組織について定量を行った。探索的データ解析法（主成分分析・permax解析・trend surface解析）により*HOX*遺伝子群の発現が部位特異的であることを示し、*HOX*遺伝子が腸管上皮の部位特異的再生過程に関与している可能性を示唆した。

審査では、相同性の高い他の*HOX*遺伝子が非特異的に増幅され、定量結果に影響を与えた可能性について質問された。各増幅産物の塩基配列を直接シーケンシング法により決定し、特定の*HOX*遺伝子のみに由来することを確認したとの説明がなされた。また、二本鎖DNAに非特異的に結合するSYBR Greenを用いたことにより、偽増幅産物（プライマーダイマー等）を検出している可能性について質問された。リアルタイムPCRの最終反応終了後に、融解曲線を作成し、曲線に副次的変曲線を認めないことから偽増幅産物の生成は無視しうると判断したとの説明がなされた。

permax法を用いた発現パターンの比較は、前腸・中腸・後腸由来組織の３群間で行われたが、各群内の組織間での発現パターンの比較も必要ではないかとの指摘がなされた。主成分分析法により全11部位を同時に評価したところ、前腸・中腸・後腸由来の組織に群別した場合には各群での発現パターンは類似していたが、群内の各組織は異なる発現パターンを示したとの説明がなされた。成人腸管と胎芽期における発現パターンが、*HOXA*・*HOXD*遺伝子群については類似していたが、*HOXB*・*HOXC*遺伝子群については全く異なった点について説明を求められた。*HOXB*・*HOXC*遺伝子群が成人腸管の中腸由来組織において高発現であったことが主要因であると説明がなされた。さらに*HOXB*・*HOXC*遺伝子群はリンパ球において高発現であること、中腸由来組織ではリンパ系組織が豊富であること、の２点からリンパ球における*HOX*遺伝子発現を反映している可能性があるとの説明がなされた。

遺伝子発現の定量に頻用されているTaqman probe法による追試を行いSYBR Greenを用いた遺伝子発現定量法の妥当性を検証する事、消化管全層組織ではなく層構造内での*HOX*遺伝子の発現パターンを免疫組織化学的に検討する事が今後の課題として残されたが、*HOX*遺伝子群という極めて相同性の高い遺伝子群について全遺伝子の同時定量法を確立した点、多変量解析や空間統計学の手法を多角的に応用して、定量的に各遺伝子の発現パターンを特徴づけたこと、*HOX*遺伝子群が腸管上皮の再生過程に関与する可能性を示唆した点において意義のある研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　小児科学　高橋　孝雄
　分子生物学　清水　信義　　産婦人科学　吉村　泰典
　　内科学　石井　裕正
学力確認担当者：
　審査委員長：清水　信義

試問日：平成16年２月２日

Leukemia Inhibitory Factor Is Involved in Tubular Regeneration after Experimental Acute Renal Failure.

（急性腎不全回復期における尿細管再生への白血病阻止因子の関与）

吉　野　　純

内容の要旨

虚血、薬剤等による腎臓障害後に正常の腎機能を回復するため、傷害を受けた尿細管上皮の再生が必要とされる。尿細管の再生過程において、上皮細胞が基底膜へ遊走し、脱分化・増殖し、再分化し尿細管を再編成することが知られている。この再生過程が、多くの点で腎臓の器官形成期におけるネフロンの成熟過程と類似しており、Pax-2（paired box gene-2）、Wnt-4（wingless -type MMTV integration site family, member 4）に代表される腎臓発生に必須とされている幾つかの遺伝子が、傷害後の腎尿細管で一過性に発現上昇し、再生に寄与することが諸家により報告されている。

白血病阻止因子（Leukemia inhibitory factor, 以後LIF）は、マウス白血病細胞のマクロファージへの分化誘導因子としてクローニングされた。インターロイキン６ファミリーに属し、多種多様な機能を有するサイトカインとして知られている。LIFは腎臓上皮細胞も含め種々の細胞で合成され、発生、造血、炎症、傷害後の再生を含む様々な過程に関与することが報告されている。胎生期間の腎臓において、LIFは尿管芽より分泌され、間葉細胞の上皮細胞への分化誘導因子として報告されている。

LIFの腎臓器官形成の役割から、LIFは尿細管上皮細胞の再生過程にも関与すると考え本研究を勘案した。本研究では、第一にLIFおよびLIF受容体の発現様式を、ラットの正常の胎生腎、成体腎、および虚血再灌流後の傷害腎を用いて検討した。次に、腎臓の培養上皮細胞を用いて、in vitroの虚血モデル（ATP depletion法）を作製し、尿細管再生におけるLIFの役割を調べた。

胎生期、後腎においてLIFは尿管芽由来の上皮細胞に発現を認め、LIF受容体は間葉系細胞を中心に発現を認めた。成体腎では、LIFおよびLIF受容体は集合管細胞に局在した。虚血腎傷害の回復期間において、LIFおよびLIF受容体の遺伝子発現は一過性に上昇し、その発現部位は傷害後、細胞増殖期にある近位尿細管に認めた。腎臓の培養上皮細胞を用いた、in vitroの虚血モデル（ATP depletion法）の回復期間に中和抗体を投与し内因性のLIFを阻害することで、尿細管細胞の再生過程（DNA合成能、細胞数）が抑制された。

以上の結果から、器官形成に重要な役割を果たすLIFが、傷害後の再生過程にある尿細管細胞で一過性に発現上昇し、腎臓再生に寄与することが示された。

論文審査の要旨

虚血や薬剤によって傷害を受けた腎臓が機能を回復するためには、傷害を受ける糸球体や尿細管上皮の再生が必要とされる。この再生過程の詳細は未だ明らかではない。そこで本研究では、虚血による尿細管障害後の再生に関与する諸遺伝子の中から、腎上皮細胞を含め種々の細胞で合成され、発生、造血、炎症、傷害後の再生を含む様々な過程に関与することが報告されているleukemia inhibitory factor（LIF）に注目し、尿細管上皮細胞の再生過程への関与を検討した。

LIFは、胎生期の後腎において尿管芽由来の上皮細胞に発現し、LIF受容体は間葉系細胞を中心に発現を認めた。虚血実験の回復期にLIFおよびLIF受容体遺伝子は一過性に発現亢進を示し、その発現部位は傷害後、細胞増殖期にある近位尿細管に認めた。In vivoでの検討が困難なことから、腎臓の培養上皮細胞を用いたin vitroの虚血モデルでの研究で、虚血障害の回復期間に中和抗体を投与して内因性LIFを阻害すると、尿細管細胞の再生過程の抑制を認めた。

以上の研究結果から、器官形成に重要な役割を果たすLIFが、虚血による尿細管障害の再生にも関与していることを示唆した。

このような研究に関して、まず尿細管上皮の再生に際して腎外性の骨髄由来細胞が重要であるのか、腎内の何らかの細胞が重要であるのかが議論された。当研究者はその修復過程や細胞数からみて、腎内の何らかの細胞が重要であるとされた。腎臓の再生過程には、今回当研究者が注目したLIF以外に、Pax-2（paired box gene 2）やWnt4（wingless-type MMTV integration site family member 4）など多くの遺伝子が関与することが知られているが、この中で特にLIFに注目したことも議論となった。当研究者はLIFがインターロイキン６ファミリーに属し、多種多様な機能を有するサイトカインで、色々な臓器の再生に関与している可能性があるからとされた。本研究で最も問題とされた点は、虚血障害後の再生過程の検討を、腎の上皮由来細胞株のNRK52Eを用いて行ったことである。本来ならばin vivoにおいて検討されるべきであったが、in vivoでの予備実験でLIFの上昇を抑制することを試みたが、antisense oligoを用いても抑制することができず、培養上皮細胞を用いて検討したとされた。またLIFのノックアウトマウスの作成による検討も考えたが、マウスの一過性虚血実験が困難なことから、今回は培養細胞を用いたとされた。培養上皮細胞を用いた検討で、妥当な成績が得られたことから、in vivoにおける詳細な研究は今後の課題とされた。また、この研究成果をどのようにヒトの急性腎不全の進展阻止および治療に応用していくかが今後の課題とされた。

腎再生に関与するいくつかの遺伝子の中でLIFの関与に注目し、尿細管上皮の再生に果たす役割を明らかにした点で、この領域に貢献する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
泌尿器科学　村井　　勝　　生理学　岡野　栄之
内科学　池田　康夫
学力確認担当者：
審査委員長：村井　勝

試問日：平成16年２月10日

Dynamic Observation of Oxygenation-Induced Contraction of and Transient Fiber-Network Formation-Disassembly in Cultured Human Brain Microvascular Endothelial Cells.

（ヒト培養脳微小血管内皮細胞における酸素暴露により誘発される細胞収縮と一過性のファイバーネットワーク形成の動的考察）

井　上　　幸　治

内容の要旨

我々はこれまでにヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）が酸素飽和度の高い液体に暴露されることで、約20%細胞体が収縮することを報告してきた。今回、同様の変化がヒト培養脳微小血管内皮細胞（HBEC）（n＝30）においても認められるかどうかを確認するため実験を行った。HBECの形態学的変化を観察するために、培養細胞を生きた状態で観察することができるビデオ強化型微分干渉（VEC-DIC）顕微鏡を使用した。HBECは第三世代の細胞で播種して４日目のものを使用した。カバーガラス上に密でない状態で培養されたHBECを培養し、培地の中に細胞が満たされる状態にした。培地は常に一定の速度で灌流した。顕微鏡のレンズ面から細胞のほぼ中心部を垂直面から観察し、この際の変化をビデオに録画して細胞の変化について観察した。具体的には、何も行わない状態で細胞を20秒から１分観察し、その後注入針を用いて30度の角度で培地の表面に１分あたり数mmの速度で滑らかに純酸素ガスを１分以内の時間で吹きつけ、この時の細胞の変化を観察した。その結果、細胞の細胞膜が膨張してその後皺ができ、細胞の収縮が14±７%の範囲で認められた（p＜0.001）。細胞の収縮が停止した瞬間に一時的なファイバーネットワークの形成を認めた。これは細胞内にある場所（おそらく接着プラーク）から生じて細胞全体に拡大した。ファイバーネットワークの形成は統計学的に有意であった（p＜0.01）。酸素投与の中止後、観察されたファイバーネットワークはすみかやに3.3±1.2秒のうちに消退し、0.5μm以下の小粒子に変化して、その後は細胞内構造物の一部になった。このような変化は30秒以内に終了し、酸素暴露ごとに同じ変化を認めた。同様の変化を生じるかどうか確認するために、培地の流れる速度を０－200μm/sまで変化させてずり応力を変化させる・ろ紙を用いて培地を除去する・循環している培地の温度を10℃から40℃まで変化させる・培地に空気を送り込み細胞に振動を与える・細胞に双極電極を使用し１－100Hz，0.5－3.0V DC/ACの矩形波パルス／三角波パルスの電気刺激を与える、という各種の刺激を加えてみたが、細胞には何ら形態学的変化を生じなかった。著者らは、HBECは一時的な酸素暴露刺激により強く収縮し、その後急速なネットワーク構造の形成・分解を生じたと結論した。今回の実験において認められたHBECの収縮の機序はファイバーネットワークの形成と関連している可能性がある。ファイバーはおそらく細胞骨格であり、それは細胞の腹側面に沿って存在し、末端が接着プラークに達している微小フィラメントの厚い束で構成されるストレスファイバーと考えられる。今回観察されたファイバーについてはアクチンとビメンチンから構成されているものである可能性があるが、これについては今後細胞・免疫組織化学的手法により確認される必要があると考えられる。

論文審査の要旨

脳組織血流の高酸素誘発性変化の機序はこれまで十分解明されていない。脳組織での酸素の影響を検討することを目的として実験を行った。本研究では、培養ヒト脳微小血管内皮細胞（HBEC，30細胞）の密でない状態における酸素ガス吹き付け時における細胞の形態学的変化をビデオ強化型微分干渉電子顕微鏡を用いて調べた。HBEC細胞の細胞体の真上にあたる培養液表面に精製純酸素ガスを連続的に低流速暴露すると、内皮細胞には緊張・皺化状態が生じ、細胞体は14±７%（P＜0.001）まで強く収縮した。細胞が最大限収縮しそれ以上細胞の収縮が見られなくなった後、急速に細胞内の特定スポットから線維ネットワークの一過性の形成が認められた。この線維ネットワークの出現は統計学的に有意であった。（実験で使用した30細胞中26細胞で認めた。P＜0.05）酸素供給の中止後、観察された線維ネットワークは迅速に（3.3±1.2秒以内）顆粒状の物質（0.6±0.2μm）へと分解され、その後細胞内構造体の中に完全に融合した。そしてHBEC細胞は対照と同様の外観まで完全に回復した。これらの一連の連続した経過は30秒以内に完了し、この現象は酸素ガスが供給されるごとに各細胞内で再現された。以上より、HBEC細胞は純酸素ガスの吹き付け刺激に反応して収縮し、その後線維ネットワーク構造の迅速な形成及び線維ネットワークの顆粒状物質への分解と細胞構造内への融解を生じると結論した。

審査において実験方法、結果の解釈などについて質問があった。培養血管内皮細胞の収縮をもって毛細血管の径も縮小すると考えて良いのかという質問があり、そのような可能性が考えられるという段階であると回答されたが、これに対し内皮細胞と内皮細胞の間隙が拡大し、物質の透過性が亢進することが生じる可能性の方が高いのではないかとの指摘がなされた。内皮細胞の酸素を感受する部位についての質問については詳細は不明であるが、文献上は内皮細胞内のストレスファイバーの部分のみを取り出しATPを添加することで線維が収縮すると報告されており、何らかの機序で酸素投与がATPの産生能を増加させるためではないかと考えられると回答された。今回の実験系では酸素分圧がある一定の圧を超えた瞬間に細胞の収縮を認められていることから、ATPに依存した系というよりも、酸素投与が直接収縮のエネルギー源となり得るような機序を考えた方がより自然であると考えられ、そのような実験をしてはどうかとの示唆がなされた。また、今回の変化が酸素以外のガスの吹き付けで認められないかと言う点に関しては、空気・窒素ガスの吹き付けでは全く同じような変化は観察されなかったことが回答された。以上のように、本研究は今後更に検討すべき課題があるものの、リアルタイムで初めてヒトの脳微小血管内皮細胞の酸素吹き付けに対する形態学的変化を観察できたものとして、学問的に価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　池田　康夫
　　外科学　河瀬　　斌　　医化学　末松　　誠
　　解剖学　仲嶋　一範
学力確認担当者：
　審査委員長：河瀬　斌

試問日：平成16年３月９日

脳卒中予後予測における頭部CT所見の有用性について

大　塚　　友　吉

内容の要旨

脳卒中患者の日常生活動作（以下ADL）の予後予測は、リハビリテーション（以下リハ）治療を適切に行う上で重要であるが、頭部CT所見を用いたADL予後予測の報告は少ない。本研究では、頭部CT所見が、脳卒中患者のADL予後予測に及ぼす影響を検索し、臨床応用への可能性を検討した。

【対象】1993～1994年に、関連病院で入院リハを行った脳出血又は脳梗塞患者200名（性別は男性63.0%、平均年齢は62.4歳、右片麻痺51.5%）である。

【方法】（1）リハ評価：Stroke Impairment Assessment Set（以下SIAS）による機能障害評価とFunctional Independence Measure（以下FIM）によるADLの能力評価を入・退院時に行った。

（2）頭部CT評価：発症後１ヶ月以降に撮影された画像で、横断面の不均一性や機能解剖を考慮し、橋（1）・小脳（2）・中脳（1）・前頭葉（4）・尾状核（1）・視床（2）・被殻（1）・内包（4）・外包（1）・島（1）・海馬（1）・側頭葉（2）・シルビウス部（2）・後頭葉（2）・放射冠（3）・頭頂葉（2）・中心前回（1）・中心後回（1）・角回（1）・後頭回（1）の34領域（括弧内は領域数）に分割し、各領域の病変の有無を評価した。また、卒後６年以上の２名の医師が患者25名の頭部CTを評価し、評価の一致率κを求め、妥当性を検討した。

（3）ADL予後予測：ADL予後予測のための統計処理は、ニューラルネット法で行った。対象を予測群133名と検証群67名に二分し、退院時FIM運動項目合計点を入院時のSIAS評価とFIM評価で予測した場合（non-CT法）と、その二評価に頭部CT評価を加えた場合（CT法）とで、ネットワークを予測群で構築し、検証群のデータで求めた予測値と実際値を比較した。

【結果】（1）リハ評価：SIAS評価の運動・感覚・体幹機能の11項目合計平均点は、入院時27.0点、退院時30.9点と改善した。また、FIM合計平均点は、入院時は運動領域が91点満点で66.9点、認知領域が35点満点で25.8点、退院時は各々76.9点、30.9点と改善した。

（2）頭部CT評価：頭部CT所見の２検者間の一致率は、34領域中22領域で完全に一致し、残る12領域でも一致率は高かった。また、被殻や放射冠に病変のある患者が多かった。

（3）ADL予測予後：退院時FIM運動領域合計点の予測値と実際値との相関は、non-CT法では0.802、CT法では0.837となり、ADL予後の予測因子に頭部CT評価を加えると、予測精度が向上した。

【考察】本評価法による頭部CT評価は、脳卒中患者のADL予後予測精度を向上させることが明らかになった。本評価法は、検者間での一致率も良く、病変部位や大きさのみならず、広範に散在する病変の情報もADL予後予測に反映している。本評価法は、脳卒中患者のリハ治療におけるADLの予後予測に関して臨床上有用であると結論付けられる。

論文審査の要旨

脳卒中患者のリハビリテーション（以下リハ）治療において、その機能予後を予測することは、リハゴールの設定やリハプログラム、入院期間、転帰先を決定する上で重要であるが、機能予後の予測因子としての頭部CT所見の有用性については、一定の評価を得ていない。そこで、本研究は脳卒中患者200名を対象に、日常生活動作（以下ADL）の予後予測を、慶應義塾大学リハ医学教室の関連リハ病院に入院した時のリハ評価、すなわち、Stroke Impairment Assessment Setによる機能障害評価とFunctional Independence Measure（以下FIM）を用いたADL評価から予測した方法と、リハ評価に頭部CT所見を加えて予測した方法を比較し、頭部CT所見がADL予後予測に有用か検討した。頭部CTを機能局在も考慮して全脳を34領域に分け、各領域で病巣の有無を評価した。統計処理はニューラルネットワークを用い、対象を予測群と検証群に分け、予測群で退院時FIM予測のためのネットワークを構築し、検証群のデータを応用し、退院時FIM予測値を求め、実際値との相関を検討した。その結果、頭部CT所見を加えることが、予測の精度を向上させ、頭部CT所見が脳卒中患者のADL予後予測に有用である可能性が示された。

審査では、頭部CT評価法について、全脳を34領域に分け、各領域での病変の有無を評価することが、単純な重症度を反映しているだけではないかとの質問がなされた。それに対して、領域数は病巣の広がりを反映しているが、症状の重症度とは必ずしも一致しないと回答された。また、各領域を均等な予測因子として扱うのではなく、領域毎の重みづけを行い、領域数を検討する必要性を指摘された。一方、複数の病院間でのリハ評価の均一性について質問がなされたが、対象者の評価は病院が異なってもリハ専門医による評価であり、均一性を備えていると回答された。次に、リハ治療についての内容や退院後の回復の見込みについて質問がなされた。それに対して、リハ治療は、リハ専門医の指示のもと、患者個人の症状に応じて、理学療法、作業療法、言語療法などを適切に組み合わせて行われており、入院中に最大限の機能回復を行うべくリハ治療が行われたこと、そのために、退院後は機能障害のさらなる回復は困難と考えられると回答された。リハ評価から予測した場合と、リハ評価に頭部CT所見から予測した場合とを比較し、検証群における退院時FIM予測値と実際値との相関係数の増加が有意か否かについての質問がなされたが、統計的に有意であったと回答された。

以上のように本研究は、頭部CTの評価法のさらなる検討（重みづけや脳萎縮などの要素の検討）や、頭部MRI画像を用いた予測などのさらに検討されるべき課題は残しているものの、脳卒中患者のADL予後予測において、頭部CT所見の有用性を示し、脳卒中患者のリハ治療に貢献するものと評価された。

論文審査担当者　主査　リハビリテーション医学　千野　直一
外科学　河瀬　斌　　放射線医学　栗林　幸夫
整形外科学　戸山　芳昭
学力確認担当者：北島　政樹、河瀬　斌
審査委員長：河瀬　斌

試問日：平成16年１月23日

Contrasting Action of IL-12 and IL-18 in the Development of Dextran Sodium Sulfate Colitis in Mice.

（マウスDSS腸炎におけるIL-12とIL-18の対照的作用）

高木　英惠

内容の要旨

近年、さまざまな大腸炎の原因が腸管粘膜でのTh1、Th2サイトカインバランスの異常にあることが明らかになっている。IL-12は代表的なTh1系サイトカインであり、IL-18と相乗的に作用してIFN-γ産生を誘導するほか、Th1細胞の分化に必須である。IL-18はTh1細胞やNK細胞のIFN-γ産生を促進し、NK細胞の細胞障害作用を増強する。しかし、IL-18はある条件下でTh2サイトカイン産生を刺激し、創傷治癒の初期段階に関与するとの報告もある。一方、IL-12とIL-18はヒト炎症性腸疾患（IBD）の病態形成において重要な役割を有しており、クローン病患者の腸管粘膜で過剰発現しているほか、腸炎動物モデルにおいては抗IL-12抗体、抗IL-18抗体が実験腸炎に対する治療効果を持つことが示されている。本研究ではこれらサイトカインのノックアウトマウスを用い、腸炎形成におけるサイトカインの関与とその機序について検討を行った。

本研究ではIL-18、IL-18受容体、IL-12p35欠損（IL-18$^{-/-}$、IL-18R$^{-/-}$、IL-12$^{-/-}$）マウス、および対照としてIL-12$^{+/-}$ x IL-18$^{+/-}$であるF1マウスを用い、1.2%硫酸デキストラン（DSS）水溶液を自由飲水させ、DSS腸炎を誘発した。まずDSS水溶液の間欠投与では、３サイクル６週終了時までに、F1マウスは21%、IL-18$^{-/-}$マウスは38%が死亡したが、IL-12$^{-/-}$マウスは無症状で全個体が生存した。腸炎の臨床的重症度および組織学的重症度は、DSS水溶液を７日間投与した後14日目に評価した。臨床的重症度は、体重減少、血便の有無、下痢の程度をそれぞれ０～４点にスコア化し、さらにそれらを総合して比較した。また摘出した大腸から切片を作成し、腸炎の活動性を組織学的スコアとして判定した。臨床スコアおよび組織学的スコアのいずれにおいても、IL-18$^{-/-}$マウス、IL-18R$^{-/-}$マウスはF1マウスに比べ高スコアであり、一方、IL-12$^{-/-}$マウスは組織学的にもほとんど腸炎を認めなかった。DSS非投与群では、すべての群のマウスに異常はみられなかった。次に、DSSを投与した各群のマウスから粘膜固有層単核球（LPMC）を分離、培養し、IFN-γ、TNF-αの産生をELISA法により測定した。IL-18$^{-/-}$マウスLPMCは、F1マウスと比較してIFN-γ産生が亢進し、IL-12$^{-/-}$マウスLPMCはIFN-γ、TNF-αとも産生が低下していた。

以上より、腸管粘膜において、ある条件ではIL-12とIL-18が異なる作用を示し、IL-12は炎症を悪化させ、IL-18は改善させる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

IL-12はIFN-γ産生やTh1細胞の分化誘導に中心的役割を担うTh1サイトカインである。またIL-18はIL-12と協働してIFN-γ産生を強力に誘導する一方、条件によりTh2サイトカインとして作用する場合のあることが知られている。近年、ヒト炎症性腸疾患（IBD）の腸管粘膜においてこれら二つのサイトカインが過剰発現し、病態に大きく関与することが明らかになってきているが、いまだ不明な点も多い。本研究では、硫酸デキストラン（DSS）腸炎モデルを用い、IL-12欠損マウス、IL-18欠損マウスにおける腸炎発症とその機序について検討した。IL-12欠損マウスでは対照群に比しDSS腸炎は軽微であり、IL-18欠損マウスでは重度であった。またこれらマウスの大腸から分離した粘膜固有層単核球（LPMC）では、IL-18欠損マウスでIFN-γ産生が亢進していたが、TNF-αは差を認めなかった。IL-18受容体欠損マウスでは対照群より重度の腸炎を認めた。以上より、腸管免疫においてある条件下でIL-12とIL-18が異なる作用を持ち、IL-12は炎症を悪化させIL-18は改善させる場合のあることが示された。

審査ではまず、IL-12とIL-18の二重欠損マウスでの検討を行うことで腸炎増悪の機序について重要な結果が得られる可能性があると助言された。またDSS腸炎の機序とヒトIBDとの相違について質問された。DSS腸炎はTh1、Th2の両方の免疫系が関与すると考えられその点でヒトIBDと直接的に対応するものではないが、種々の腸炎で検討を行うことで腸管免疫機構全体の解明につながると考えられると回答された。次にサイトカイン産生細胞について質問され、大腸粘膜から分離した単核球にはリンパ球だけでなくマクロファージやNK細胞が混在していると考えられると回答された。DSS腸炎では単核球のみならず好中球の関与もあることから炎症の程度との関連はこれらを含めて評価すべきであると指摘された。さらに潰瘍形成、創傷治癒とIL-12、IL-18の役割について質問され、IL-18は創傷治癒において重要であるとの知見があり、今回のIL-18欠損マウスでの腸炎増悪は創傷治癒が妨げられた結果である可能性があると回答された。腸炎形成初期から回復期までの病理組織像の変化およびサイトカイン産生の経時的変化について検討すべきであると助言された。

以上、本研究はさらに検討すべき課題はあるものの、IL-12とIL-18が腸管免疫において異なる作用を持つ場合があることを示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・免疫学　石川　博通
医化学　末松　　誠
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16年１月27日

着床不全病態の解明

－子宮内膜インテグリン$\alpha_v\beta_3$の発現を指標に－

鄭　　智　誠

内容の要旨

体外受精胚移植（IVF-ET）において、形態的に良好と思われる受精胚を子宮内に移植したにもかかわらず、着床に至らない症例、すなわち着床不全症例が多く存在し、妊娠不成立の大きな要因と考えられている。IVF-ETの成功率向上のために着床不全の治療法およびその原因究明が、生殖補助医療の大きな課題となっている。着床不全の病態解明のため、反復IVF-ET不成功患者の着床能を子宮内膜側から検討することを目的として、インテグリン$\alpha_v\beta_3$に着目し、それらの患者の子宮内膜における発現を検討した。また着床不全の治療として、子宮内膜治療薬ダナゾールの効果を臨床的に検討した。反復IVF-ET不成功患者41名に対してダナゾール（400mg/day）を12週間投与し、投与後のIVF-ETにおいて非投与群に比して有意に妊娠率が上昇した。ダナゾール投与による妊娠率の上昇は、子宮内膜症非保有患者にも見られたことより、子宮内膜症の改善以外のメカニズムによる可能性が示唆された。一方正常子宮内膜において、インテグリン$\alpha_v\beta_3$は月経周期特異的な発現パターンを示した。増殖期、分泌期前期では内膜間質に強い染色性を認め、内膜腺上皮には発現が認められなかったのに対し、着床期に相当する分泌期中期では特異的に内膜腺上皮に強い染色性を認めた。反復IVF-ET不成功患者の分泌期中期子宮内膜インテグリン$\alpha_v\beta_3$の発現は、一般不妊検査において異常の認められない不妊患者、いわゆる原因不明不妊患者に有意な発現の低下が認められた。これらの患者は形態良好胚を有していることから、着床不全という子宮内膜の機能的な異常が、従来原因不明とされている不妊症の一因となる可能性が示唆された。またインテグリン$\alpha_v\beta_3$は着床期に特異的に子宮内膜腺上皮に発現すること、IVF-ET着床不全患者の一部にその発現不全がみられたことから、子宮内膜の胚受容能を評価する指標として有用である可能性が示された。さらに原因不明不妊患者に対してダナゾールを投与し、投与前後のインテグリン$\alpha_v\beta_3$の発現を比較検討した結果、ダナゾール投与後の子宮内膜に有意なインテグリン$\alpha_v\beta_3$の発現の増強が認められた。このように、ダナゾールは子宮内膜症の改善のみならず、子宮内膜インテグリン$\alpha_v\beta_3$の発現を誘導したことより、内膜着床環境の改善を通じ、妊娠率の向上に寄与するメカニズムが示唆された。

本研究により、従来原因不明とされてきたIVF-ET反復不成功患者において、子宮内膜インテグリンの発現異常が存在し、それがダナゾールにより改善されうることが明らかとなった。

論文審査の要旨

体外受精胚移植（IVF-ET）において、形態良好胚を移植したにもかかわらず、妊娠にいたらない症例が多く存在し、不妊治療の大きな課題となっている。着床不全病態の解明および新たな着床能マーカーの有用性を検討するため、良好胚移植にもかかわらず反復不成功となるIVF-ET患者を対象に、子宮内膜におけるインテグリン$\alpha_v\beta_3$（以下$\alpha_v\beta_3$と略す）の発現を検討した。さらに不育症などの着床不全病態が疑われる症例にも臨床応用されている子宮内膜症治療薬ダナゾール（DZ）のこれらの患者に対する臨床効果およびその機序についても検討を加えた。

DZ投与により、形態良好胚数の減少はみられたが、妊娠率は有意な上昇を認めた。その機序は子宮内膜症改善によるものではなく、ほかの機序を介していることが明らかとなった。$\alpha_v\beta_3$は着床期である分泌期中期に内膜腺上皮に特異的に発現し、また原因不明不妊患者において、その発現が有意に低下していることが明らかとなった。さらにその発現はDZ投与によって増強することも明らかとなった。

審査ではまず、良好胚の判定基準についての質問がなされ、核球分裂の均等さとfragmentationの量を形態的に判別し、既報の基準によりGrade化していると回答された。論文では染色性の評価法の説明と、DZの蛋白同化作用や細胞分化、増殖に与える影響、またインテグリンの着床における血管増生などのgeneral cell biologyに関する考察が必要との指摘を受けた。続いて着床の機序及び着床におけるインテグリンの関与などについて質疑がなされた。着床現象は胚と子宮内膜との接着に始まり、上皮への侵入、貫通に続く上皮の修復、間質内への浸潤、包埋などの一連のプロセスに、接着分子や成長因子、サイトカインなどが複雑に関わる。$\alpha_v\beta_3$の着床過程における役割はまだ解明されていないが、その性質から接着、侵入などに関わり、各過程でのsignal transductionに関与するものと考えられていると回答された。細胞同士の接着において、接着分子は発現量だけでなく、そのabilityについての検討も重要であるとの指摘を受けた。また$\alpha_v\beta_3$の発現部位について、染色像では内膜上皮細胞のbasal layerを中心に発現しているが、luminal surfaceでの発現についても検討をすべきとの助言がなされた。最後にDZ投与の問題点についての質疑がなされ、今回初めて明らかとなった受精胚に対する影響とともに、肝機能障害や血栓症といった副作用について十分なinformed consentが必要であると回答された。

以上本研究はいくつか検討すべき課題はあるものの、臨床的な着床不全患者の治療法の確立、およびその臨床研究から得られた疑問点を基礎的な検討を加えることでその病態を解明し、新たな着床能評価法を確立するなど、今後の不妊治療において大変意義ある研究と高く評価された。

論文審査担当者　主査　産婦人科学　吉村　泰典
産婦人科学　野澤　志朗　　発生・分化生物学　須田　年生
医化学　末松　　誠
学力確認担当者：北島　政樹、野澤　志朗
審査委員長：野澤　志朗

試問日：平成16年1月29日

Ethanol modulates gut ischemia / reperfusion-induced liver injury in rats.

（ラット腸管虚血再灌流惹起性肝障害のエタノールによる修飾）

山岸　由幸

内容の要旨

腸管虚血再灌流（I/R）による肝微小循環障害には白血球、血管内皮接着因子の関与が報告され、この反応に腸管由来のエンドトキシン（Ex）、炎症性サイトカインの関与が示唆されている。エタノールも腸管I/R同様、肝微小循環障害を引き起こすことが知られており、Ex、あるいは組織内の脂質過酸化、oxygen tension、redox stateなどの変化がアルコール性肝障害の進展に関与する。実際に急性エタノール投与で分離肝細胞、ラット肝において微小循環障害を惹起し、慢性エタノール投与ラットではlactobacilliの投与がEx濃度の低下とともに肝障害を抑制することが報告されている。Ex血症ラットではエタノール投与が肝微小循環障害を増悪させることが報告されており、この反応にはエタノールとEx両者が関与することが示された。近年、I/R障害とエタノール投与との関係については、急性エタノール投与が腸管I/Rにおける腸管への白血球の蓄積を増悪させたという報告がある一方、脳、心臓においてはエタノール投与がI/R障害を抑制したとする報告がある。I/R惹起性肝微小循環障害、ならびに肝障害におけるエタノール投与の影響についてはあまり知られていない。今回、腸管I/R惹起性肝障害における急性エタノール投与の影響につき検討した。ラットに30分の腸管虚血後再灌流を施行した。倒立型蛍光顕微鏡にて肝表面の白血球膠着数と血流のない類洞の割合（%NPS）を観察した。また、腸管粘膜透過性（IMP）を評価し血中Ex、tumor nerosis factor（TNF）-α濃度、alanine aminotransferase（ALT）値を測定した。腸管虚血15分前または24時間前にエタノールを投与した群においても同様の検討を行った。対照群と比較し、腸管I/Rは白血球膠着数と%NPSを増加させた。また、IMPの亢進を伴い、血中のEx、TNF-α濃度、ALT値を上昇させた。低用量エタノールを15分前に投与した群では、腸管I/Rに伴う白血球膠着、%NPS、TNF-α濃度、ALT値の上昇を抑制した。高用量エタノール投与は腸管I/Rによる白血球膠着、%NPS、Ex濃度、ALT値の上昇を増悪させた。腸管虚血の24時間前にエタノールを投与した場合は、高用量エタノール投与は腸管I/R惹起性肝障害を増悪させたが、低用量エタノール投与は影響を与えなかった。これらの結果から腸管虚血直前の低用量エタノール投与は、腸管I/RによるTNF-α産生、肝微小循環障害、それに続く肝細胞障害を抑制する一方、高用量エタノール投与はExの上昇を伴い腸管I/Rによるこれらの反応を増悪させることが示唆された。以上よりエタノールの肝微小循環障害ならびに肝障害に及ぼす影響はその投与量によって大きく異なることが示された。

論文審査の要旨

腸管虚血再灌流（I/R）とエタノール投与による肝微小循環障害にはいずれも、白血球、血管内皮接着因子の関与が報告され、これに腸管由来のエンドトキシン（Ex）、炎症性サイトカインの関与が示唆されている。I/R障害に対するエタノール投与の影響については、腸管では増悪させ、脳、心臓では抑制したとする報告がある。本研究では、腸管I/R惹起性肝障害における急性エタノール投与の影響につき検討した。ラットの腸管I/R惹起性肝障害において、低用量エタノール前投与は、腸管I/Rによる腸管粘膜透過性（IMP）の亢進、血中Ex濃度の上昇には作用せず、TNF-α産生を抑制し、肝微小循環障害と続く肝障害を抑制した。高用量エタノール前投与は、腸管I/RによるIMP、TNF-α濃度の上昇には変化を与えず、血中Ex濃度の更なる上昇を伴い肝微小循環障害、肝障害を増悪させた。

審査ではまず、投与したエタノール量とヒトにおける血中濃度との相関についての質問がなされた。測定されたエタノール血中濃度は低用量では約0.07%であり、ヒトで微酔程度の飲酒量に、高用量では約0.2%と酩酊状態になる程度の飲酒量であると回答された。用量設定は、2 g/kg、3 g/kgでは実験動物による個体差が認められ、明らかに抑制的に働いた1 g/kgを低用量、増悪に働いた4 g/kgを高用量と設定した。臨床的意義の問いについては、高用量エタノールは腸管I/R障害を増悪させたことから、エタノールによる臓器障害の臨床的重要性が示され、低用量エタノールは障害を抑制することより、この機序を解明することは、pharmacological preconditioningとして、今後のI/Rによる肝障害治療の発展にもつながるものとした。更に慢性エタノール投与においても同様に抑制効果が認められるかの検討が今後の課題として指摘された。また、低用量エタノール投与ではI/RによるIMPやExの上昇を変化させずになぜ抑制的に作用するかの質問があり、エタノール投与直後にはExに対するKupffer細胞の感受性が低下することが知られており、この機序によりTNF-αの産生が低下した可能性を挙げたが、説明がつかない部分があるとの指摘を受けた。また急性エタノール投与は、adenosine、NO産生を伴うことが報告されており、その作用による可能性につき現在検討中であることを示したが、それ以外にもPGE2、あるいはTXA2など関与する可能性のある因子が挙げられ、これらを含めた機序の検討が今後必要である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はいるものの、飲酒者の臓器移植や、消化器系の虚血性疾患への飲酒の影響についての検討のみならず、エタノールによるI/R惹起性臓器障害抑制のメカニズム解明の一端となると考えられ、消化器病学上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：北島　政樹、末松　誠
審査委員長：末松　誠

試問日：平成16年1月27日

Novel Variant Isoform of G-CSF Receptor Involved in Induction of Proliferation of FDCP-2 Cells：Relevance to the Pathogenesis of Myelodysplastic Syndrome.

（FDCP-2細胞株増殖獲得能に基づく骨髄異形成症候群の病期進展に関与する顆粒球コロニー刺激因子受容体新規アイソフォームの解明）

淡　谷　　典　弘

内容の要旨

骨髄異形成症候群（MDS）と先天性好中球減少症は病期の進展にともない白血病に移行することから、白血病の発症機序解明の１モデルと位置づけることが出来る。先天性好中球減少症は約10%が急性骨髄性白血病（AML）に移行することが知られているが、それらの症例においては顆粒球コロニー刺激因子受容体（G-CSFR）遺伝子の点突然変異が白血病への移行に関与していることが近年明らかにされている。一方、造血幹細胞の異常とされるMDSは病期の進展に伴いAMLへの移行症例が増加するが、白血病への進展に関する分子機構は明らかでない。造血因子のシグナル伝達異常が白血病への進展に関与している可能性を確認するため、MDS14例と正常者10例において顆粒球系細胞のシグナル伝達に必須のG-CSFR遺伝子の構造および機能解析を行った。骨髄単核球を用いたコロニー解析では、MDSは過去の報告と同様に正常者に比較し造血因子（G-CSF, GM-CSF, IL-3）に対する増殖反応は低下していた。しかしながら、高リスク患者３例と低リスク患者１例ではG-CSFに対する増殖反応が選択的に増加していた。cDNA解析の結果、上記４例を含むMDS14中８例においてG-CSFRの膜近接部位の３ヌクレオチドの欠損が認められ、その結果アミノ酸配列の変換が生じていた（Asn^{630}⇒Lys^{630}）。ゲノムDNAの塩基配列に異常は認められず、過去に報告のない新規アイソフォームと確認された。この新規アイソフォームの機能解析を行うため同様の３ヌクレオチドの欠損したミュータントを作成しマウス顆粒球系前駆細胞株FDCP-2に発現させたところ（FDCP-2^{iso}）、野性型のG-CSFRを発現したFDCP-2細胞（FDCP-2^{wt}）よりもG-CSFに対して高い増殖能を示した。さらにG-CSFシグナル伝達の下流に位置するSTAT3の活性化が、FDCP-2^{iso}ではFDCP-2^{wt}に比較し強くかつ延長していた。以上の結果より、MDSの一部で生じているG-CSFRの膜近接部位の塩基を欠損したアイソフォームは、G-CSFからの増殖シグナルを介してMDSの病期の進展、白血病への移行に関与していることが示唆された。

論文審査の要旨

骨髄異形成症候群（MDS）はその一部の症例で急性骨髄性白血病に移行することが知られているが、その分子機構は明らかではない。本研究では、造血因子のシグナル伝達異常が白血病への進展に関与している可能性を確認するため、顆粒球コロニー刺激因子受容体（G-CSFR）の構造および機能解析を行った。骨髄単核球を用いたコロニー解析、末梢血単核球の培養実験による検討では、MDSは正常者に比較しG-CSF、GM-CSF、IL-3に対する反応性は低下していた。しかしながら、高リスク患者３例と低リスク患者１例ではG-CSFに対する増殖反応が、他の造血因子と比較し選択的に増加していた。cDNA解析の結果上記４例を含む14例中８例にG-CSFR膜近接部位の３塩基が欠損した新規アイソフォームが確認された。マウス顆粒球系前駆細胞株にこのアイソフォームを発現させ野生型と比較したところ、増殖能と下流シグナルの増強を認めた。

審査では、まずスクリーニングとして行ったコロニー解析の実際について質問がなされた。各々の解析は各症例のサンプルが得られた時点で行われており、適切な対照が置かれているかという点に対する指摘がなされた。本来は実験毎に対照を置くべきであるが、定期的に正常人の解析を行い、技術的誤差や、試薬のばらつきがないことを確認しているとの回答がなされた。次にアイソフォームの発現が各MDS患者にどの程度の割合で認められたか、クローナリティに関する質問がなされた。コロニー解析でG-CSFに反応しているのは正常あるいは異常クローンかとの指摘があり、形態的に正常コロニーと異なるため異常である可能性が示唆されるとの回答がなされた。各コロニーの拾い上げや、末梢血単核球での増殖実験とも併せて、single cell sortの後にマーカーや形態の検討が必要であるとの助言がなされた。また患者毎のアイソフォームの発現の頻度がサブクローニングの後にクローン数として表現されていることの適切性について質問がなされた。PCRでは定量性を議論することは出来ず、RNAase protection assayや定量的PCRを検討しているとの回答がなされた。細胞株を用いたG-CSFR遺伝子導入実験において、代表的クローンのみの結果が示されていることの適切性について質問がなされた。これに対し、その他のクローンでも同様の傾向が示されていたとの回答がなされた。また最後に、この新規アイソフォームの有無と臨床経過、G-CSFに対する臨床的な反応性の差異、さらに多くの症例数での検討の必要性など、臨床面でのさらなる検討について助言がなされた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、MDSのクローン性増殖、白血病に移行する分子機構におけるG-CSFのシグナル伝達異常の関与を示した価値ある研究と評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　池田　康夫
先端医科学　河上　　裕　　発生・分化生物学　須田　年生
病理学　坂元　亨宇
学力確認担当者：北島　政樹、河上　裕
審査委員長：河上　裕

試問日：平成16年３月16日

Osseointegration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem

（ハイドロキシアパタイトコートされた多層メッシュステムの骨結合能）

日　下　部　　浩

内容の要旨

人工股関節の長期耐用に最も影響がある骨への固定法は、骨セメントによらず直接骨新生により骨と人工関節を固定させる方法が現在主流になりつつある。骨新生により固定性を得るためには人工関節の表面に骨が侵入する一定の間隙を持つ表面構造が必要である。その構造として金属製の小球や細繊維を焼結したbeads表面・fiber表面、溶射による粗面構造を持つ溶射表面等が一般的であるが、間隙が不規則なこと、骨侵入深度が浅いこと、骨侵入期間を短縮するhydroxyapatite（HA）coatingを施した場合に間隙に塞がりが発生する等の問題があった。今回エッチング処理により規則正しい孔を持つ薄板を作製し、この板をずらして重ねた多層性のメッシュ構造を持つインターフェースを開発した。同構造は立体的に連続した孔構造による間隙を最深部まで持っており、深部にまで新生骨が侵入することにより高い固定強度が得られる。またHA coatingを行った際に孔を塞ぐことなく最深部まで均一なcoatingが可能であり、早期に骨新生による固定性が得られる利点を持つ。これらの利点を実証すべく同構造を人工股関節大腿骨側（ステム）表面に施した人工股関節を作製し動物実験を行い、同構造の骨結合能を力学的及び組織学的に検討した。

人工股関節ステム表面にHA coating多層メッシュ構造を持つ群をM群（30頭）とし、対象として従来型beads表面構造を持つB群（30頭）を設定した。成犬股関節をそれぞれのステムで置換し３、６、10週および６、12ヵ月で屠殺回収した。力学的評価として横断面のステム・骨間でpush-out試験を行い、破断時の剪断強度測定と破断を生じる部位同定を行った。組織学的には表面構造空間内の新生骨量、骨新生の状態を評価した。

剪断強度比較では全時点でM群がB群より高く、３、６週では有意差を認めた。破断部位はB群では骨ー人工関節界面部であったが、M群は12ヶ月時には界面部ではなく周辺骨梁の部分で破断を生じていた。組織学的に評価した新生骨量の比較では６ヵ月を除く全時点でM群がB群より有意に高かった。骨新生はM群では３週と非常に早期にメッシュ空間最深部にまで達しており、12ヵ月時までメッシュ空間内の新生骨梁径の増大が継続していた。B群では骨侵入速度は遅く骨梁径増大も早期に停止していた。

以上の実験結果より、深部に至るまで均一に行われたHA coatingが非常に早期の骨侵入を誘導し、また孔径の大きい層状の構造が持続的な骨成熟を導き、最終的に骨ー人工関節界面部の結合強度は周辺骨梁の力学的強度を超え、界面部でなく界面部外の骨梁部で破断を生じるようになっていた。HAコートされた多層メッシュ表面は従来型beads表面と比較して、迅速かつ強度も高い骨結合能を示し、長期間にわたり強い固定性を維持できることが実証された。

論文審査の要旨

人工股関節の長期耐用には骨ーインプラント間の固定性の強化と維持が重要で、固定性はインプラントのインターフェイス部分の構造、状態に強く影響を受ける。現在主流になりつつある、骨セメントによらず骨新生により固定性を得る一定の間隙を持つ表面構造は、金属製の小球や細繊維を焼結したbeads表面・fiber表面、溶射による粗面構造を持つ溶射表面等が一般的であるが、間隙が不規則なこと、骨侵入期間を短縮するhydroxyapatite（HA）coatingを施した場合に間隙に塞がりが発生する等の問題があった。そこで人工股関節の長期耐用性向上のためのインターフェイス構造として、気孔径0.5～1 mmの孔を持つチタン製薄板を重ねた多層性のメッシュ構造を持つインターフェイス（multilayered mesh＝多層メッシュ）を作製した。同構造および従来型beads表面を人工股関節大腿骨側（ステム）表面に施したチタン合金製人工股関節を作製し動物実験を行い、同構造の骨結合能を力学的及び組織学的に比較検討した。

その結果、孔を塞ぐことなく深部まで均一に行われたHA coatingが早期の骨侵入を誘導し、孔径の大きな構造が持続的な骨成熟を導き、最終的に界面部の結合強度は周辺骨梁の強度を超え、界面部外の骨梁部で破断を生じるようになっていた。以上よりHAコートされた多層メッシュ表面は従来型beads表面と比較して、迅速かつ強度も高い骨結合能を示し、長期間にわたり強い固定性を維持できることが実証された。

審査では、電気分解を用いる方法等その他のHA coating法についての検討が不足しているのではないかとの質問がなされた。それに対して、本研究では取り上げられていないが、液浸によるcoating法を検討中であるとの回答がなされた。次に、気孔径１mmの気孔に骨新生が起こるのか、beads表面でも気孔径が１mmあれば同様の効果が生じるのかとの質問がなされ、１mmの気孔径はHA coating下では骨新生に関しては問題ないことが今回実験で実証されたこと、径を大きくするとbeads表面でも同様に骨梁径は増大するが、金属小球間結合強度が著しく低下するとの回答がなされた。また、多層メッシュ表面が骨融解によるステムのゆるみを解決することが可能であるかとの質問に対しては、骨融解の一因とされる高分子ポリエチレン摩耗粉の界面部への侵入を同部を覆う新生骨が防護するとの報告が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はいるが、新たに開発したHA coatingを施した多層メッシュステムではインターフェイス構造内への新生骨の量的増加だけでなく、太く強い骨梁が形成されることにより人工関節の長期耐用性が向上することが動物実験モデルで実証された点が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　形成外科学　中島　龍夫
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、岡田　保典
審査委員長：岡田　保典

試問日：平成16年３月10日

Hypercapnic Acidosis Attenuates Endotoxin-Induced Nuclear Factor-κB Activation.

（高二酸化炭素性アシドーシスはエンドトキシンによるNuclear Factor-κBの活性化を抑制する）

竹　下　　啓

内容の要旨

【背景】近年permissive hypercapniaに基づく呼吸管理が急性呼吸促迫症候群（ARDS）患者の生命予後を改善することが大規模臨床試験で示された。しかしながら、permissive hypercapniaによりもたらされる高二酸化炭素性アシドーシス（HA）がARDSを中心とする肺傷害に与える影響については十分な検討がなされていない。本研究では、培養肺血管内皮細胞を用いて、HAがエンドトキシンによる肺の炎症に与える影響について検討した。

【材料と方法】ヒト肺動脈血管内皮細胞（HPAEC）を、21% O_2-5% CO_2の正常CO_2濃度環境（pH7.34±0.02、PCO_2 35.5±0.6mmHg）ないし21% O_2-10% CO_2の高CO_2濃度環境（pH7.01±0.01、PCO_2 74.7±2.8mmHg）に曝露した。さらに大腸菌リポポリサッカライド（LPS）を最終濃度1μg/mLとなるように調節しHPAECを刺激した。一部の実験においては、21% O_2-5% CO_2に平衡させた培養液にHClを加え代謝性アシドーシスを作成した（pH7.02±0.02、PCO_2 36.3±1.4mmHg）。また、21% O_2-10% CO_2に平衡させた培養液を$NaHCO_3$で緩衝し高CO_2濃度と正常pHを有する環境を作成した（pH7.32±0.02、PCO_2 75.2±1.5mmHg）。HPAECから核蛋白質を抽出し、NF-κBとAP-1のDNA結合能をゲルシフトアッセイで検討した。またIκB-αとIκB-βの発現をウエスタンブロットで測定した。さらに、HPAEC表面のICAM-1発現をflow cytometry（FCM）で、培養液中のIL-8をELISAで、ICAM-1とIL-8のmRNAをRT-PCRで測定した。培養液中のLDH活性を測定し、HPAEC傷害の指標とした。また、健常人から比重遠心法にて分離した好中球を用いて、好中球上のMac-1の発現をFCMで測定した。内皮細胞と好中球の接着をadhesion assayで検討した。

【結果】HAはHPAECにおいてLPS刺激によるNF-κBの活性化、IκB-αの発現低下、ICAM-1およびIL-8の発現亢進、細胞傷害、好中球の接着増加を抑制した。代謝性アシドーシスおよび正常pHを有する高CO_2ガス環境においてもLPS刺激によるNF-κBの活性化およびIκB-α発現低下が抑制されたが、その程度はHAの場合に比較して軽度であった。一方、HAはLPS刺激によるHPAECにおけるAP-1の活性化、好中球におけるMac-1の発現には影響をおよぼさなかった。

【考察】以上の結果から、HAは内皮細胞のNF-κB-DNA結合活性を抑制することにより、肺の炎症に対して防御的に働く可能性が示唆された。

論文審査の要旨

近年人工呼吸管理によって誘発される肺傷害を予防するために、従来よりも少ない1回換気量を用いた換気方法が考案され、これによりARDS患者の予後を改善しうることが複数の臨床試験で示された。少ない1回換気量による人工呼吸管理でARDS患者の生命予後が改善されたのは、あくまでも肺胞過伸展などの軽減による効果が主であると考えられているが、副産物として発生するhypercapnic acidosisがARDSなどの肺傷害に与える影響については十分な知見がない。本研究では、培養ヒト肺動脈血管内皮細胞を用いて、hypercapnic acidosisがエンドトキシンによる肺の炎症にいかなる影響を与えるかについて検討した。その結果、hypercapnic acidosisが肺血管内皮細胞においてLPS刺激によるNF-κBの活性化、IκB-αの発現低下、ICAM-1およびIL-8の発現亢進、LDHを指標とした細胞傷害、および、好中球の接着増加を抑制することが判明した。以上の結果から、hypercapnic acidosisが血管内皮細胞のNF-κB-DNA結合活性を抑制することにより、肺の炎症に対して防御的に働く可能性が示唆された。

審査ではまず、本研究で用いた実験系と生体内との条件の相違について質問がなされた。本研究で用いられた培養液のpHおよびPCO_2は、少量一回換気法で人工呼吸管理された患者の動脈血で実際に観察され得る値であり妥当と考えられるが、血流や換気のない静止状態であることが生体とは大きく異なると回答された。また、NF-κBの抑制効果がhypercapnic acidosisに比較してbuffered hypercapniaおよびisocapnic acidosisにおいて弱かった機序について説明を求められた。申請者が細胞内pHを検討したところ、内皮細胞をhypercapnic acidosisに曝露すると速やかに細胞内pHが低下しそれが遅延したのに対し、buffered hypercapniaおよびisocapnic acidosisにおいては細胞内pHの低下が一時的にすぎなかったことから、細胞内pHが重要な役割をしていると推測されると回答された。これに対して、CO_2分子そのものがなんらかの作用を有している可能性があり、そのための検討も行うよう要望された。さらに、本研究で認められたhypercapnic acidosisによるNF-κBの抑制効果が、肺血管に特徴的なものなのかと質問がなされた。これに対してヒト臍帯静脈血管内皮細胞でも同様の現象が観察されたことから、必ずしも肺血管に特異的なものではないと回答された。またpH、PCO_2だけでなく、HCO_3^-の関与を明らかにするために、低PCO_2あるいは炭酸脱水酵素阻害剤を加えた条件での検討も加えるべきであると助言された。さらに好中球のadhesion assayにおいて、抗ICAM-1抗体で処理した場合においても好中球の接着が完全には抑制されなかったことについて質問があった。これに対して、抗ICAM-1抗体を添加した場合にhypercapnic acidosisによる好中球接着抑制効果が消失したことから好中球の接着抑制効果が主にICAM-1を介したものであると推測されるものの、好中球の接着自体にはICAM-1以外にVCAM-1やselectinなど他の接着分子の関与も考えられると説明がなされた。最後に、今後は低濃度酸素や高濃度酸素など、実際の人工呼吸管理で高頻度に認められる病態にhypercapnic acidosisが加わった条件についても検討を続けるよう要望がなされた。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき課題を残しているものの、hypercapnic acidosisがエンドトキシンによる肺傷害に対して防御的効果を有することを転写因子レベルから示した点で、価値ある論文と評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　小川　聡
　　医化学　末松　誠　　外科学　小林　紘一
　　臨床麻酔学　武田　純三
学力確認担当者：北島　政樹、末松　誠
　　審査委員長：末松　誠

試問日：平成16年3月15日

Prognostic Significance of Peripheral Monocytosis After Reperfused Acute Myocardial Infarction：A Possible Role for Left Ventricular Remodeling.

(急性心筋梗塞における再疎通後末梢血単球増多の臨床意義：左室リモデリングとの関連)

前川　裕一郎

内容の要旨

心筋梗塞発症後の治癒過程において、梗塞部伸展に引き続き進行性の左室拡大から慢性心不全へと至る現象は左室リモデリングと言われ、左室リモデリングを呈した症例の予後は不良であると報告されている。梗塞部伸展を引き起こす因子として、梗塞サイズ、壁応力の他に心筋細胞自体の梗塞後治癒過程における炎症の関与が考えられている。梗塞部伸展の結果生じる左室瘤の形成及び亜急性期の心破裂が、炎症マーカーである血清C反応性蛋白（CRP）値高値と関連する事が報告されている。CRPは単球及びマクロファージより産生されるサイトカインの刺激により肝臓で産生される。この事から単球が梗塞後治癒過程及び左室リモデリングに何らかの関連を有する事が示唆されるが、その詳細については不明であった。本研究では、末梢血単球数の増加と梗塞後の臨床予後特に左室リモデリングに伴う臨床事象との関連につき検討した。

方法：　発症後24時間以内に経皮的冠動脈形成術（PTCA）による再疎通療法を行った初回Q波梗塞149例を対象とし、入院後連続４日間単球数を測定の上、その最大値と院内及び長期予後との関連を検討した。また、最大クレアチンキナーゼ（CK）及び最大CRP値についてもそれぞれ６時間毎、24時間毎の測定により確定した。膠原病、肝疾患、腎不全、悪性腫瘍、感染症合併症例は除外した。

結果：　対象症例の平均年齢は64±12歳であり、平均最大単球数は711±292/mm^{3}であった。最大CK値及び最大CRP値と最大単球数は各々正の相関を認めたが、特に最大CRP値は最大CK値と比べより強い相関関係にあった。最大単球数のカットオフ値を決定するためReceiver Operating Characteristic Analysisを行い、900/mm^{3}をカットオフ値とした上で、院内合併症であるポンプ失調、左室瘤の予測因子を多変量解析により検討した結果、最大単球数900/mm^{3}以上は、ポンプ失調、左室瘤の独立した予測因子であった。遠隔期予後についてCox比例ハザード解析にて検討した結果、最大単球数900/mm^{3}以上は心不全による再入院、心臓死、再梗塞を含む心事故発生の独立した予測因子であった。対象症例を単球数900/mm^{3}以上の群と900/mm^{3}未満の群の２群に分けたKaplan-Meier生存分析による検討（追跡期間平均33ヶ月）においても、単球数900/mm^{3}以上の群では心事故回避率が有意に低い事が明らかになった。

結論：　本研究は、PTCAによる再疎通療法が施行された初回急性心筋梗塞症例において、末梢血単球数の増加が、梗塞後のポンプ失調の発症、左室瘤の形成、長期予後と関連がある事、心筋梗塞後左室リモデリングの進展に単球が重要な役割を果たしている可能性を明らかにした。

論文審査の要旨

心筋梗塞発症後、梗塞部伸展に引き続き、進行性の左室拡大から慢性心不全へと至る現象は左室リモデリングと呼ばれる。梗塞部伸展を引き起こす因子として、梗塞サイズ、壁応力の他に心筋細胞自体の梗塞後治癒過程における炎症の関与が考えられており、本研究では、炎症の程度を反映すると考えられる末梢血単球数が梗塞後左室リモデリングに伴う臨床事象と関連があるとの仮説を立証することを目的とした。経皮的冠動脈形成術（PTCA）による再疎通療法を行った初回Q波梗塞149例を対象とした。　最大単球数は、最大CK値及び最大CRP値と各々正の相関を認めたが、特に最大CRP値とはより強い相関を認めた。Receiver Operating Characteristic（ROC）Analysisにより、最大単球数900/mm^{3}をカットオフ値とした上で、ポンプ失調の発症、左室瘤の形成および心不全による再入院、心臓死、再梗塞を含む心事故発生の予測因子を多変量解析により検討した結果、最大単球数900/mm^{3}以上は、いずれにおいても独立した予測因子であった。Kaplan-Meier生存分析による検討においては心事故回避率が低い事が明らかになった。これらの結果より、末梢血単球数の増加が、梗塞後左室リモデリングと関連があることが示された。

審査では、まず、末梢血単球数と梗塞後の臨床事象との関係を検討していることについて、末梢血での単球数増加と梗塞部での現象を直接関連づけるのは理論的に無理があるという指摘があった。生存分析にて最大単球数を900/mm^{3}以上と未満の２群に分けて検討しているが、その根拠はという質問に対し、ROC Analysisにより900/mm^{3}をカットオフ値としたと回答された。また、ポンプ失調、左室瘤、長期予後について、最大単球数とともに最大CRP値が予測因子か否か検討すべきであるという助言があった。単球数を総白血球数に対する比率から求めていること、単球数自体に日内変動がある可能性があることから、単球数自体の精度が十分ではない可能性があると指摘された。単球数と冠動脈の炎症、動脈硬化性プラークの不安定化による梗塞発症との関連はという質問に対し、入院時の単球数は有意な上昇を認めず、入院後に上昇していることから冠動脈より梗塞に伴う心筋の炎症を反映している可能性が高いと回答された。抗炎症療法は左室リモデリング抑制に有望かという質問に対し、現在までに行われた抗炎症療法で有効とされたものはなく、その理由として左室リモデリングの過程には様々な因子が関わっており、１因子を抑制しても十分な効果は得られない可能性があると回答された。

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、末梢血単球数の増加と梗塞後左室リモデリングとの関連性について明らかにした点は有意義であり、梗塞後左室リモデリングの病態を把握する上で示唆に富む研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　小川　聡
外科学　四津　良平　　病理学　岡田　保典
内科学　池田　康夫
学力確認担当者：北島　政樹、四津　良平
審査委員長：四津　良平

試問日：平成16年３月22日

Preventive home visits for community-dwelling frail elderly people based on Minimum Data Set-Home Care：Randomized controlled trial.

（無作為化比較対照試験による虚弱在宅高齢者へのMDS-HCを用いた予防訪問の効果検証）

山　田　　ゆ　か　り

内容の要旨

在宅の虚弱高齢者を保健師が定期的に訪問する予防訪問の効果を無作為化比較対照試験により検証した。予防訪問は、過去の文献考察によると、Comprehensive Geriatric Assessment（CGA）に基づく評価と介入を徹底するアプローチと、対人関係を重視するアプローチとに分かれる。本研究の予防訪問は、体系的アプローチとしてCGAに準じた体系的な評価と介入を実施することのできるMinimum Data Set-Home Care（MDS-HC）を用い、同時に対人関係重視のアプローチの長所を生かすため、訪問の目的を信頼関係の構築においたうえで、MDS-HCによる評価と介入の方法を柔軟にする工夫を行った。

1市1町において選挙管理人名簿から無作為に抽出した高齢者に自記入式質問紙郵送調査を実施し、ADLは自立しているがIADLは自立していない高齢者を選定した。さらに無作為に介入群（184名）と対照群（184名）に分け、両群の基本属性および健康状態に差がないことを確認したうえで、介入群の高齢者の自宅を市町村保健師が3ヶ月に一度を基本として訪問した。訪問の目的および方法論についての保健師の理解を深めるため、事前説明会および訪問開始後にカンファレンスを開催した。18ヵ月後に両群の健康状態および保健行動の実施状況を検証したところ、以下の結果を得た。

1．EuroQolのEQ-5D（移動、身の回り、ふだんの活動、痛み、不安）に基づいて算出する一次元の健康度尺度（EQ-5Dスコア）は、終了時および調査期間中の変化ともに、介入群と対照群の間に差は認められなかった。
2．終了時の禁煙および口腔ケアの実施率は、介入群において対照群よりも5％水準で有意に高いことが認められた。
3．開始時に自分の健康状態を良くないと回答した高齢者に限ると、終了時のEQ-5Dスコアは介入群のほうが対照群よりも高かった。
4．対照群のEQ-5Dスコアは調査期間中に悪化したが、介入群のうち保健師の提供した助言を順守した高齢者では改善し、対照群との差は5％水準で有意であった。

以上の結果は、MDS-HCを用いた予防訪問は、部分的ではあるが効果がみられたことを示している。効果が部分的であった要因として、主に予防訪問の方法論と対象者の選定方法のあり方をあげ、今後は予防訪問により適したMDS-HCを開発することと、対象者として主観的健康観が低い高齢者に焦点をあてることにより、より有効な予防訪問の実現が可能であることを考察した。

論文審査の要旨

虚弱高齢者の自宅を定期的に訪問することにより予防的なニーズに応えようとする予防訪問Preventive Home Visitsには、包括的評価によるリスクの把握及びリスクに応じた介入を徹底する体系的アプローチと、訪問の目的を高齢者との信頼関係の構築におく対人関係重視のアプローチとがある。日本では高齢者保健事業における保健師の訪問指導が予防訪問に相当するが、方法論的には確立しておらず、効果についても検証されていない。そこで、本研究では体系的アプローチと対人関係重視のアプローチの長所を融合させた予防訪問を実施し、その効果を無作為化比較対照試験により検証した。体系的アプローチとして在宅高齢者の評価表であるMinimum Data Set-Home Care（MDS-HC）を用い、対人関係重視のアプローチとして、訪問の目的を信頼関係の構築におき、MDS-HCによる評価と介入を予防訪問に適するように工夫して実施した。18ヶ月間の訪問の結果、健康関連QOLの低下の防止については、統計的に有意ではなかったが、傾向はみられ、さらに対象を主観的健康観の当初低い高齢者に限ると有意な関係がみられた（$p<0.05$）。また、保健行動の実施に対する効果も一部認められた。

審査では、まず、対象者の背景について質疑がなされた。対象者の年齢構成と標準偏差は介入群と対照群で同じであったが、さまざまな疾病を有する集団であることが想定されることから、対象者の背景をより細かくみる必要があったのではないかと指摘がなされた。

次に、体系的だけでなく対人関係を重視したことにより、保健師の能力差が大きく影響している可能性について指摘がなされた。これに対し、本研究では、MDS-HCという体系的評価の導入を通じて保健師の標準化を目指したが、訪問記録表の分析から保健師によるばらつきあったことは否定できなかったこと、保健師の能力を評価する適切な指標がなかったので使用できなかったことが回答された。また、対人関係を重視したことによって保健師の助言に対する順守率は高まることが期待されたが、本研究の結果では約50%に留まっていることが指摘された。これに対し、本研究の方法論として、順守の有無を保健師が毎回確認することを敢えてしなかったため、順守状況が不明であった者が40%程度存在していたことが回答された。

さらに、保健師からの助言の内容と終了時の保健行動との関係について質問がなされた。これに対し、禁煙に関する助言と終了時の禁煙の実施との関係を分析したが、明確な関連性はみられなかったと回答された。

最後に、有意な効果がみられたのは、当初の主観的健康観が低い高齢者に限定した場合に留まっていたが、それは全体として終了時において主観的健康観が低い高齢者が対照群に少なかったことが理由として考えられることが指摘された。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残してはいるが、超高齢社会において今後ますます重要になる予防の分野において、包括的評価と介入の効果を日本で初めて体系的に明らかにした点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　医療政策・管理学　池上　直己
衛生学公衆衛生学　大前　和幸　　内科学　猿田　享男
精神神経科学　鹿島　晴雄
学力確認担当者：北島　政樹、大前　和幸
審査委員長：大前　和幸

試問日：平成16年3月19日

Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head.

（線維柱帯細胞と視神経乳頭由来アストロサイトにおける豚オプチニュリンおよびミオシリンの発現機構の解析）

尾羽澤　実

内容の要旨

【目的】豚のオプチニュリンおよびミオシリン遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定し、さらに、ブタ線維柱帯および視神経乳頭部より分離培養された線維柱帯細胞（TMCs）とアストロサイトにdexamethasone（DEX）投与、静水圧負荷、低酸素負荷、さらにブタTMCsでは、伸展刺激をかけ、それぞれのオプチニュリンおびミオシリンの発現量変化を調べた。

【材料・方法】培養ブタTMCsからmRNAを抽出し、既に塩基配列が決定しているヒト、マウス、ラット、およびウシの遺伝子配列から配列が一致する部分でprimer pairを設計し、RT-PCR法を行い、豚オプチニュリンおよびミオシリン遺伝子の一部を増幅した。PCR産物をサブクローニングした後、オートシークエンサーにより塩基配列を決定した。残りの上流および下流の塩基配列は、それぞれ5'/3' RACE法を用いて、同様に決定した。

TMCsおよびアストロサイトをコンフルエントになるまで培養した後、培養液中に500nM DEXを投与し２週間培養、マルチガスインキュベーターにより、酸素濃度を７％に調節し72時間培養、33mmHgの静水圧を負荷し72時間培養した。さらに、ブタTMCsには、専用のチャンバーと装置を用いて10％の伸展刺激を負荷し、24時間培養した。それぞれの培養細胞からTotal RNAを抽出し、豚オプチニュリンおよびミオシリンmRNAの発現レベルを、Real-time quantitative PCR法により測定した。

【結果】豚オプチニュリンおよびミオシリンは、TMCsとアストロサイトの両方に発現し、各アミノ酸配列はヒトと比較して、オプチニュリンで84％、ミオシリンで82％の相同性が認められた。

DEX投与では、オプチニュリンの発現は、TMCsでコントロールの67％、アストロサイトで48％に減少した。ミオシリンの発現は、TMCsで8.02倍、アストロサイトで5.57倍に増加した。

低酸素負荷では、オプチニュリンの発現量に、明らかな変化は認められなかったが、ミオシリンでは、アストロサイトで12時間後にコントロールの44％、72時間後は４％に減少した。TMCsでは、72時間後で11％に減少した。

静水圧負荷では、両培養細胞においてオプチニュリンおよびミオシリンの発現量に、明らかな変化は認められなかった。

伸展刺激では、TMCsで、オプチニュリンおよびミオシリンの発現量に変化は認められなかった。

【結論】今回の実験では、DEX投与、低酸素負荷、静水圧負荷、または伸展刺激など、細胞環境を変えることにより、オプチニュリンとミオシリンは、それぞれ異なる反応を示した。これらの結果により、これら２つの遺伝子の異常により緑内障が引き起こされる際には、それぞれ異なったメカニズムの関与が示唆された。

論文審査の要旨

オプチニュリン（*OPTN*）およびミオシリン（*MYOC*）遺伝子は、開放隅角緑内障の原因遺伝子であるが、両遺伝子の変異による開放隅角緑内障の発症機序は解明されていない。本研究では、豚の眼球を用いて実験を行った。先ず、*OPTN*および*MYOC*遺伝子をクローニングし、cDNAの塩基配列を決定した。さらに、豚の線維柱帯および視神経乳頭部から分離培養して得られた培養線維柱帯細胞と培養アストロサイトを用いて、緑内障発症時に眼球内の組織にかかると考えられる負荷（ステロイド投与、低酸素負荷、静水圧負荷、伸展刺激）による*OPTN*および*MYOC*の発現量の変化をリアルタイム定量PCR法にて検討した。その結果、豚OPTNおよびMYOCタンパクのアミノ酸配列は、ヒトと比較した場合、OPTNで84％、MYOCで82％の相同性を認めた。ステロイド投与では、*OPTN*の発現は減少し*MYOC*の発現は増加した。一方、低酸素負荷では、*OPTN*の発現量に明らかな変化は認められず、*MYOC*の発現は減少した。静水圧負荷および伸展刺激では、両遺伝子の発現に明らかな変化は認められなかった。培養条件を変えることにより、*OPTN*と*MYOC*遺伝子はそれぞれ異なる発現パターンを示すことから、両遺伝子の変異による緑内障の発症機序は、それぞれ異なることが示唆された。

審査では、*OPTN*と*MYOC*の遺伝子変異による緑内障の遺伝形式について質問された。これに対し、いずれも常染色体優性遺伝であると回答された。負荷実験にアストロサイトを用いたことに関して、緑内障との関連について質問され、緑内障の進行に伴い視神経乳頭陥凹が生じ、アストロサイトが強く関与していると回答がなされた。低酸素負荷では、培養細胞の形態に変化が認められ、生残率の問題について質問された。これに対し、負荷時間の経過に伴って浮遊細胞が増えてくるが、通常の培養条件に戻すと再び静着し、増殖し始めたことから生残率に問題はないと回答された。

眼圧上昇による視神経障害は必ずしも視神経への圧迫によるとは限らず、むしろ血管が圧迫されて生じる血流障害などの影響も考慮すべきで、組織から分離された培養細胞で静水圧をかけても、その結果は眼圧上昇を反映したものにならないとの指摘を受けたが、すでに眼球そのままの灌流組織培養を試みてうまくいかなかったので、培養細胞で実験したと回答された。

以上により、本研究は今後なお検討すべき課題が残るものの、*OPTN*と*MYOC*遺伝子の発現調節機構に相違があることを明らかにし、開放隅角緑内障の発症機序を解明する上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　分子生物学　清水　信義
解剖学　仲嶋　一範　　外科学　河瀬　斌
生理学　岡野　栄之
研究指導者：小口　芳久（眼科学）
学力確認担当者：北島　政樹、仲嶋　一範
審査委員長：仲嶋　一範

試問日：平成16年３月31日

Improvement of Skeletal Lesions in Mice with Mucopolysaccharidosis Type VII by Neonatal Adenoviral Gene Transfer.

（ムコ多糖症VII型モデルマウスの骨格異常は生後早期の
アデノウイルスベクター全身投与で改善する）

金　治　　有　彦

内容の要旨

ムコ多糖症VII型（MPSVII）は、リソゾーム酵素の一つであるβ-グルクロニダーゼ（GUSB）蛋白の先天性欠損により発症する常染色体劣性遺伝病である。臨床的には肝脾腫、精神運動発育遅滞、角膜混濁、難聴、骨格異常などの多彩な症状がみられ、病理組織学的にはリソゾームの腫大による空胞変性がほとんどの臓器で認められる。最近、鎌田らは生後早期のMPSVIIモデルマウス（MPSVIIマウス）に対してヒトβ-グルクロニダーゼ遺伝子を発現するアデノウイルスベクター（AxCAhGUS）を静注したところ、特徴的な頭蓋骨変形が改善されたことを報告した。本研究はMPSVIIマウスに対してAxCAhGUSの経静脈的全身投与を行い、骨・関節病変に対する治療効果について生化学的、病理組織学的に評価することを目的とした。

成長終了後のMPSVIIマウスに対する効果を評価する目的で、生後12週齢以上のMPSVIIマウスの尾静脈より１×10^8pfuのAxCAhGUSを投与した。AxCAhGUS静注後７日後に軟骨組織を採取し4-MU法によるGUSB活性の定量を行ったところ、正常B6系マウスの約1.5倍以上に相当する高い活性が関節軟骨に認められた。しかしこのGUSB活性はAxCAhGUSが直接、関節軟骨に導入されたことによるものではなく、マンノース６リン酸受容体を介するcross-correctionによるものであった。次に生後早期のMPSVIIマウスに対する治療の効果を評価する目的で、生後24時間以内のMPSVIIマウスに浅側頭静脈から１×10^7pfuのAxCAhGUSを静注し、以下の検討を行った。１．生化学的検討：AxCAhGUS静注後40日目に関節軟骨のGUSB活性定量を行ったところ、正常値の３倍以上の極めて高い活性が認められた。またPCR法により、ウイルス由来のDNAが関節軟骨に集積していることが明らかとなり、AxCAhGUSが関節軟骨に導入されていることが示された。２．形態学的検討：無治療のMPSVIIマウスでは低身長、平坦な顔貌、長管骨の短縮といった特徴的な骨格異常が認められたが、AxCAhGUS投与後140日目のマウスではこれらの異常はほぼ完全に正常化され、外見では正常のマウスと見分けることは不可能であった。また病理組織学的には生後早期に治療を受けたMPSVIIマウスでは無治療のMPSVIIマウスと比較して、関節軟骨、軟骨下骨、成長軟骨における空胞変性細胞が明らかに減少していた。

以上の検討より、MPSVIIマウスの骨・関節病変は生後早期にアデノウイルスベクターを全身投与することにより改善されることが確認された。この結果から、アデノウイルスベクターを用いた新生仔期の遺伝子治療をヒトムコ多糖症VII型に対して臨床応用することにより、特徴的な成長障害や骨格異常は改善される可能性があることが示唆された。

論文審査の要旨

ムコ多糖症VII型（MPSVII）は、β-グルクロニダーゼ（GUSB）蛋白の先天性欠損により発症する常染色体劣性遺伝病である。本研究はMPSVIIモデルマウス（B6/MPSVII）に対してヒトGUSB遺伝子を発現するアデノウイルスベクター（AxCAhGUS）の経静脈的全身投与を行い、骨・関節病変に対する効果について検討することを目的とした。まず生後12週齢以上のB6/MPSVIIの尾静脈より１×10^8pfuのAxCAhGUSを静注したところ、AxCAhGUS投与後７日目の関節軟骨において正常B6系マウスの約1.5倍に相当するGUSB活性が認められた。しかしこのGUSB活性はAxCAhGUSが直接関節軟骨に導入されたことによるものではなく、マンノース６リン酸受容体を介するcross-correctionによるものであった。次に生後24時間以内のB6/MPSVIIの浅側頭静脈より１×10^7pfuのAxCAhGUSを静注したところ、AxCAhGUS投与後30日目の関節軟骨において正常値の３倍以上に相当する高いGUSB活性が認められた。このGUSB活性はPCR法により、cross-correctionによるものだけでなくAxCAhGUSが直接関節軟骨に導入されたことによる効果であることが示唆された。また病理組織学的評価では、無治療のB6/MPSVIIと比較して、生後早期にAxCAhGUS投与されたB6/MPSVIIでは関節軟骨、成長軟骨、軟骨下骨の空胞変性細胞が明らかに減少していることが明らかとなった。以上の結果から、B6/MPSVIIの骨・関節病変は生後早期にアデノウイルスベクターを全身投与することにより改善されることが確認された。

審査では、生後早期にAxCAhGUSを投与されたマウスで関節軟骨に遺伝子が導入されたとする根拠がPCR法のみの検討で適切かどうかについて質問がなされた。これに対し顕微鏡を用いて厳密に軟骨組織の摘出を行ったため、滑膜など他の組織の混入はないと考えているが、PCR法は鋭敏な検査であるためin situ hybridyzationなど他の手法を用いた検討も行うべきであったと回答された。また単一の酵素活性の評価のみで病理組織学的な改善のメカニズムを説明できるのかと質問された。これに対してMPSVIIはGUSBの先天性欠損により発症するため、骨・関節軟骨病変の改善はGUSB活性の上昇によると考えられるが、改善のメカニズムを解明するという点では他の因子を含めて詳細に検討すべきであったと回答された。最後に骨病変の病理組織学的所見について、もう少し詳細に記載すべきであると指摘された。

以上のように、本研究はさらに検討すべき点を残しているが、MPSVIIの骨・関節病変がアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療により改善されることを証明した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
　　病理学　岡田　保典　　分子生物学　清水　信義
　　先端医科学　河上　　裕
学力確認担当者：北島　政樹、岡田　保典
　　審査委員長：岡田　保典

試問日：平成16年３月29日

転写因子AP-1構成タンパクの内耳支持細胞における発現誘導と感音難聴に対する防御的役割

志津木　健

内容の要旨

感音難聴の代表的モデルである音響外傷では、蝸牛内の血管条でreactive oxygen species（ROS）の産生が確認されている。このROSは有毛細胞を傷害する主要な原因ではないかと疑われている。ROSのような酸化的ストレスで誘導される転写因子のひとつActivator protein-1（AP-1）は、音響外傷の場合にも蝸牛内で誘導され、その一部はc-Fosによることが、既に明らかになっている。本研究では、AP-1が転写制御を介して防御的機能と関連する可能性を考察することを目的とした。そのために、有毛細胞にアポトーシスを生じない可逆的閾値変動temporary threshold shift（TTS）をきたす音響外傷をモルモットに加え、AP-1構成タンパクのコルチ器における発現を検討した。聴覚閾値変動をABRにて確認し、TTSモデル動物を作成。その音響負荷後に蝸牛コルチ器を採取して、AP-1構成タンパクに対する抗体を用いたウェスタンブロット解析と、surface preparation法による蝸牛回転別免疫組織染色を行い、発現の有無と局在を確認した。その結果、少なくともc-Fos，Fra-2，c-Junの発現を、ヘンゼン細胞、クラウディウス細胞、ダイテルス細胞などの支持細胞群の核内に確認した。発現は、蝸牛基底回転から第２回転に認められ、音響負荷の直接的影響を受ける特徴周波数領域よりも広範に生じていた。また、音響負荷後１時間という早期に広範な発現が確認された。より長い５時間音響負荷では、外有毛細胞直下のダイテルス細胞にも発現が確認された。これら支持細胞は、音響外傷によって有毛細胞のようには障害されない上、TTSは有毛細胞にもアポトーシスを生じない。したがって、AP-1の役割は防御的なものであると推測した。ダイテルス細胞は、クラウディウス細胞やヘンゼン細胞に比べると、血管条からの距離が遠いので、より大量のROS産生下や、外有毛細胞に強い負荷が加わった場合にAP-1が誘導されるのだろう。支持細胞が細胞内ROSレベルを低減する能力を持つ可能性が報告されているので、支持細胞には、音響負荷などの酸化ストレス下で、AP-1による転写制御を介してROSスカベンジャーを誘導する機構があるかもしれない。c-Fos，Fra-2，c-Junの発現が急速かつ広範であったことは、支持細胞の持つシグナル伝達の入力系の鋭敏さを示し、期待される蝸牛防御機能の迅速性も予想された。感音難聴を予防するために有毛細胞障害を防ぐべきであることは言うまでもないが、支持細胞機能を維持または賦活化する戦略も、臨床上有用であると予想される。

論文審査の要旨

感音難聴のモデルである音響外傷では、不可逆的音響外傷（permanent threshold shift：PTS）のコルチ器で転写因子Activator protein-1（AP-1）が誘導される。しかし、このAP-1の誘導が細胞障害のためなのか、細胞防御のためなのかが不明であった。本研究では可逆的音響外傷（temporary threshold shift：TTS）モデルを用いて、AP-1構成タンパクであるc-Fos，Fra-2がコルチ器で音響負荷後に発現増強することがウエスタンブロットにより示された。また、免疫組織染色により、c-Fos，Fra-2，c-Junが、音響負荷後のヘンゼン細胞、クラウディウス細胞、ダイテルス細胞などの支持細胞の核に発現することが確認された。TTSでは支持細胞は障害を受けず、有毛細胞障害も限定的で細胞死は生じないことを考慮すると、AP-1は防御的に機能していることが示唆された。また、音響外傷では血管条でROS（reactive oxygen species）が発生するため、これがAP-1を誘導する可能性が考えられ、支持細胞におけるAP-1の役割もROSに対する抗酸化能の誘導が考えられた。また、支持細胞における抗酸化能は、ギャップジャンクション機能を維持し、カリウムを有毛細胞から支持細胞経由で血管条へとリサイクルするのに役立っていると考察した。

審査では、まず、ウエスタンブロットで発現量を比較するために、定量的検討が必要であるとの指摘があった。つぎにc-Fosなどのタンパクが AP-1として機能していると言えるかと質問され、先に行なわれたPTSにおけるスーパーシフトアッセイでc-Fosが構成タンパクとして関与することが示されており、今回の実験でもAP-1として機能していると考えていると回答した。さらに、AP-1が細胞防御に関与していると結論するためには、今後、AP-1のカスケードを阻害、またはAP-1をノックアウトする実験が必要であると回答した。ROSがAP-1を誘導する機序として、チオレドキシンとRef-1によるAP-1発現調節がレドックス調節を受けていること、チオレドキシンは酸化型になるとカスケードのリン酸化が促進される例があること、酸化ストレスで核内異動をきたす例があることを述べ、ROSによるAP-1誘導証明のためには、グルタチオンなどROSスカベンジャーによるAP-1発現抑制を確認することが必要であると回答した。有毛細胞でのAP-1発現の可能性に関する質問に対して、PTSでは負荷直後だけではなく負荷後約15時間にも発現のピークがあり、このときは有毛細胞にもAP-1が発現していることから、有毛細胞障害との関連が疑われると回答した。さらに、ROSによるギャップジャンクションの障害機序についての質問に対して、ROSが細胞内Ca^{2+}の上昇を招くと、Ca^{2+}がギャップジャンクションに結合し、コンダクタンスが低下すると回答した。

以上のように、本研究はなお検討されるべき課題を残しているものの、音響外傷におけるコルチ器内AP-1構成タンパクの発現を明らかにし、支持細胞に蝸牛防御機能が存在する可能性を示した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者　主査　耳鼻咽喉科学　小川　郁
解剖学　仲嶋　一範　　外科学　河瀬　斌
生理学　岡野　栄之
学力確認担当者：北島　政樹、仲嶋　一範
審査委員長：仲嶋　一範

試問日：平成16年３月30日

尋常性天疱瘡モデルマウスを用いた病原性抗デスモグレイン３モノクローナル抗体作製とエピトープ解析

角田　和之

内容の要旨

尋常性天疱瘡（pemphigus vulgaris；PV）は臓器特異的な自己免疫性の水疱性疾患である。皮膚・粘膜角化細胞の細胞接着装置であるデスモゾームに存在する、カドヘリンタイプの細胞接着因子であるデスモグレイン３（desmoglein；Dsg3）に対して自己抗体が産生されることにより、細胞接着障害が生じ水疱が形成される。臨床的に皮膚・粘膜に広範囲な水疱を形成し、治療は免疫系全般を抑制する方法が一般的である。天疱瘡は臓器特異的自己免疫疾患の中でも、最も解明の進んだ疾患であるが、その水疱形成機序についてはいまだ明らかになされていない。最近我々は、Dsg3ノックアウトマウスの脾細胞をRag2ノックアウトマウス（免疫不全マウス）に移植する方法でPVモデルマウスを作製した。このモデルマウスは移植により生着した免疫担当細胞が、病原性を有する抗Dsg3抗体を産生しPVに特徴的な水疱形成、IgGの沈着などの表現型が誘導される。本研究ではPVモデルマウスよりDsg3に特異的に反応する抗Dsg3 IgGモノクローナル抗体（mAb）を単離し、その病原性およびエピトープを解析し、水疱形成機序を明らかにする事を目的とした。

細胞融合法により８クローンの抗Dsg3 mAb（AKシリーズ）を単離し、AK mAbのエピトープをDsg1/Dsg3スワッピング分子を用いた免疫沈降法で解析した。その結果、Dsg3細胞外領域のアミノ末端領域、中央部、カルボキシ末端領域を認識する抗体に大きく分類された。各領域を認識するmAbのハイブリドーマを免疫不全マウス腹腔内に接種し、PVの表現型誘導の有無により病原性を確認したところ、アミノ末端領域を認識するAK23 mAbはPVの表現型を誘導する強い病原性を有する事が確認された。そこでAK23の詳細なエピトープ解析を、Dsg1/Dsg3点変異蛋白を用いた免疫沈降法でおこなった。Dsg3のアミノ末端領域のアミノ酸配列はDsg1との相同性が非常に高い。そこでDsg1分子上にDsg3特異的なアミノ酸V3、K7、P8、D59を導入した点変異蛋白を用いたところAK23はその点変異蛋白に強く反応した。また、興味深い事に、これら４個のアミノ酸は最近明らかになったクラッシックカドヘリンの接着面を形成するアミノ酸とほぼ同一であることが判明した。以上の結果よりAK23 mAbはカドヘリンの接着に重要なアミノ酸を認識し、Dsg3の接着機能を直接的に障害することによって水疱を形成していることが明らかになった。本研究で得られた結果は、細胞間接着機構の解明や抗原特異的な自己抗体除去療法などの研究開発、および臨床応用において有用であると考えられた。

論文審査の要旨

尋常性天疱瘡（以下PV）は臓器特異的な自己免疫性の水疱性皮膚疾患である。皮膚・粘膜角化細胞の細胞接着装置であるデスモゾームに存在する、カドヘリンタイプの細胞接着因子であるデスモグレイン（以下Dsg）に対して自己抗体（抗Dsg3単独またはDsg3およびDsg1抗体）が産生されることがきっかけとなり水疱が形成される。本研究では、PVマウスモデルにおいて、表現型の発現がT細胞とB細胞どちらの自己寛容の破綻によるかを検討するとともに、水疱形成機序を解明するために、PVモデルマウスを用いてDsg3に特異的に反応する抗Dsg3 IgGモノクローナル抗体（mAb）を単離し、その病原性およびエピトープを解析した。その結果、PVモデルマウスの表現系の発現にはT細胞とB細胞の両者をDsg3-/-マウスから得る必要があり、T、Bの両方において自己寛容の破綻が必要であることが示唆された。次に、PVモデルマウス脾細胞から、８クローンの抗Dsg3mAb（AKシリーズ）を単離し、そのなかでアミノ末端領域を認識するAK23 mAbがPVの表現型を誘導する、最も強い病原性を有することを確認した。ついでAK23の詳細なエピトープ解析をDsg1/Dsg3点変異蛋白を用いた免疫沈降法で行った結果、このmAbがカドヘリンの接着に重要なアミノ酸を認識していることがあきらかになり、Dsg3の接着機能を直接的に障害することにより水疱が形成されると考えた。

審査では、まず、Dsg3-/-T細胞とDsg3-/-B細胞コンビネーション移植の系で８匹中３匹に表現型の誘導ができなかった理由が質問されたが、おそらく細胞の活性低下など技術的な問題が原因であると回答された。また、産生IgGがヒト患者ではIgG4であるのにモデルマウスではIgG1 isotypeである理由についても明らかではないが、いずれも補体活性化能が乏しい点が類似していると回答された。AK19とAK23との病原性の差についてはaffinityの差と回答された。モデルマウスのAK23mAbと同じエピトープを認識する抗体がPV患者に存在するかについては可能性を示唆する成績は得られているが、特異的なエピトープを有する点変異蛋白ELISAでは検出されていないと説明された。さらに成熟マウスの腹水形成法で表現型が誘導されたと判定されたマウスではIgG沈着が扁平上皮を有する部位すべてに見られること、また脱毛の機序については休止期毛の係留にDsg3が関与していることと関連してAK23mAbの接着障害を考えると説明された。最後に水疱形成と細胞接着障害とシグナル伝達、炎症反応の関わりについては少なくとも水疱形成の初期段階においては抗体による細胞接着障害を考えたいとの意見が述べられた。

以上のごとく、本研究は更なる検討課題はのこしているものの、自己免疫性水疱症である尋常性天疱瘡の水疱形成機序の解明に寄与す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　皮膚科学　西川　武二
微生物学・免疫学　小安　重夫　　病理学　岡田　保典
先端医科学　河上　　裕
学力確認担当者：北島　政樹、小安　重夫
審査委員長：小安　重夫

試問日：平成16年３月29日

Synaptic Blockade Plays a Major Role in the Neural Disturbance of Experimental Spinal Cord Compression.

（実験的脊髄圧迫モデルの神経障害機序におけるシナプス伝達遮断の重要性）

吉　田　　英　彰

内容の要旨

脊髄圧迫の病態生理は、in vivoおよびin vitroの動物実験により検討され、圧迫により局所血流障害、神経細胞の機械的破壊、神経興奮の機能的障害などが発生することが知られている。しかし、脊髄神経ネットワークレベルでの解析には、多数点における神経活動の同時記録が必要であり、従来の電気生理学的手法では解析が不可能であった。この点、膜電位感受性色素を使用した画像解析は多点同時記録を可能とし、脊髄圧迫の病態生理機構の解析に有用と考えられる。そこで、本法を用いて圧迫脊髄の神経障害機序解明を目的に以下の実験を行った。

25匹の幼若Wistarラットを用い、前・後根を含むC4、C5レベルのスライス標本を作製した。色素（di-4-ANEPPS）を含んだ人工脳脊髄液（以下CSF）中で、前根もしくは後根に電気刺激を加えた。脊髄内神経活動を、MiCAM01を用いて解析し、二次元擬似カラー画像として表示した。圧迫は1.0mm径の金属棒で、脊髄前後径の25%を５分間圧迫した。除圧２分後と30分後には、回復過程の神経活動を記録した。

後根刺激による信号は、fast component（以下fast）とslow component（以下slow）の２つからなり、fastは短い持続時間で鋭的なピークを示し、slowは長い持続時間を持つ漸減性の波形を示した。低Ca・高Mgを含んだCSFによる化学的シナプス遮断時の影響を、圧迫時のものと比較すると類似しており、fast、slowとも減弱したが、slowの方がより減弱した（$p<0.01$）。圧迫直下だけでなく、その外側でもslowはfastに比し減弱した（$p<0.01$）。後根入口部の神経活動が、最も圧迫に対して抵抗した。また、除圧２分後の脊髄の変形がまだ残存している時でも、後角の興奮性には既に部分的な回復が認められた。除圧30分後には形態学的な修復と共に完全に回復した。前根刺激による前角の興奮は、逆行性の刺激のため短い持続時間であり、圧迫による影響は後根刺激のものと同様であった。

本実験により、圧迫による神経活動への影響を画像として描出することに初めて成功した。また、局所血流のないin vitro標本を使用することによって、循環障害の影響を除いた純粋な機械的圧迫の影響を評価することができた。圧迫による後角内神経興奮伝播様式の変化は、化学的シナプス伝達遮断による場合と極めて類似し、slowはfastよりも著明に減弱した。すなわち、シナプス後電位（slow）はシナプス前電位（fast）より圧迫によって減弱しやすく、シナプス伝達の障害は圧迫による脊髄神経伝播の障害機序の中で、重要な役割を演じていることを示すものと考えられた。以上の結果から、循環障害が軽度でかつ組織破壊を伴わない脊髄圧迫臨床例においても、脊髄機能の回復には早期の除圧が重要であることが示唆された。

論文審査の要旨

脊髄神経回路網において脊髄圧迫の病態生理機構を解析するためには、多数点における神経活動の同時記録が必要であり、従来の電気生理学的手法では不可能であった。圧迫脊髄の神経障害機序解明を目的に、多点同時記録を可能とする膜電位感受性色素を使用した光計測法を行った。頸髄標本を色素で染色した後、人工脳脊髄液（CSF）中で、前・後根に電気刺激を加え、蛍光変化を計測した。脊髄前後径の25%を５分間圧迫した時や、除圧２分後と30分後の回復過程の神経活動も記録した。本法により、脊髄圧迫による神経興奮伝播障害過程を視覚化することに初めて成功した。後根刺激による信号は、fast component（fast）とslow component（slow）からなる。低Ca・高Mgを含んだCSFによる化学的シナプス遮断時の影響を、圧迫時のものと比較すると類似しており、fast、slowとも減弱したが、slowの方がより減弱した。すなわち、シナプス後電位（slow）はシナプス前電位（fast）より圧迫によって減弱しやすく、シナプス伝達障害が圧迫による脊髄障害機序の中で、重要な役割を演じていると考えられた。また、局所血流のないin vitro標本を使用することにより、純粋な機械的圧迫の影響を評価することができた。組織学的にも除圧後の標本には神経細胞の破壊を認めなかった。以上の結果から、循環障害および組織破壊を伴わない純粋な機械的圧迫による脊髄機能障害は幼若ラットにおいては早期除圧によりほぼ完全に回復しうると考えられた。

審査では、まず後角で生じている興奮は単シナプス性か多シナプス性かという質問がなされた。それに対して、同じlamina内でも興奮出現に時間差を認めるため、多シナプス性と考えているとの回答がなされた。次に、実際に神経興奮を観察しているのはどれ位の深さであるのかとの質問がなされ、大体５μm～200μmの深さの神経の集まりを計測しているとの回答がなされた。また、幼弱ラットを用いて実験を行っているが、成熟ラットではどうかとの質問に対しては、成熟ラットは低酸素環境に弱いため、困難であるとの回答がなされた。さらに、脊髄を圧迫すると上下方向に盛り上がってくるので、正しい蛍光変化を観察できないのではという質問に対しては、確かに脊髄前後径の25%以上の圧迫を行うと脊髄がめくれ上がってくるので問題があるが、25%程度の圧迫であれば、横方向にも脊髄の逃げるスペースがあるので、表面は水平に保持することが可能であるとの回答がなされた。蛍光による膜電位変化だけでは、実際の電位の大きさがわからず証明が難しいので、電位の記録が必要であるとの示唆を受けた。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残してはいるが、機械的圧迫下での脊髄神経興奮障害過程を初めて画像化することに成功した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
解剖学　仲嶋　一範　　外科学　河瀬　　斌
生理学　岡野　栄之
学力確認担当者：北島　政樹、仲嶋　一範
審査委員長：仲嶋　一範

試問日：平成16年４月20日

Yamanouchi

前立腺肥大症に伴う

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α_1ブロッカー。

- 前立腺・尿道平滑筋に選択的な、α_1ブロッカーです。（イヌ、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%（104／4,724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)重篤な肝機能障害のある患者［血漿中濃度が上昇するおそれがある。］（3)重篤な腎機能障害のある患者［血漿中濃度が上昇するおそれがある。］「薬物動態」の項参照］（4)高齢者［「高齢者への投与」の項参照］
2.重要な基本的注意 (1)本剤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。
(2)その他の副作用

	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、頭痛、眠気	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[注]		瘙痒感、発疹等	蕁麻疹
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、嚥下障害、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（α_1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

製造発売元［資料請求先］山之内製薬株式会社　〒103-8411　東京都中央区日本橋本町2-3-11

03/12作成.A4.A.22