

# 慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

第81卷第4号

平成16年

12月

|   |              |
|---|--------------|
| 綜 説   |              |
| ● スポーツと腰痛   | 若野 絃 (239)   |
| 講 座   |              |
| ● 成人 T 細胞性白血病ウイルス：国際比較疫学から病態機序を探る   | 久田 充絵 (253)  |
| ● 小児科漢方—日常診療における具体的治療—  | 西村 甲 (263)   |
| 原 著   |              |
| ● 介護保険制度の導入前後における市町村の介護サービスに関する研究   | 小池 創一 (271)  |
| ● イヌ心房筋組織における活動電位交代現象と伝導ブロック  | 太田 賢一 (287)  |
| ● 高血糖が腎糸球体血行動態に与える影響の検討   | 本間康一郎 (295)  |
| 話 題   |              |
| ● 民間病院における不整脈の非薬物療法の可能性   | 佐伯 公子 (309)  |
| ● 耳鼻咽喉科における内視鏡診療  | 川井田政弘 (309)  |
| ● 医療業界におけるボーダーレス：経費削減がもたらしたもの?!   | 村上 博 (310)   |
| ● 日本の医療の先にあるもの  | 鈴木 孝明 (311)  |
| 学 会 展 望   |              |
| ● 第 84 回慶應医学会総会・第 12 回慶應フォーラム   | (314)        |
| ● 第 9 回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会  | (318)        |
| 第 81 巻総目次   | (325)        |
| Key Word 索引   | (329)        |
| 著者索引  | (333)        |
| 学 位 論 文   |              |
| ● 生体内 CCD カメラを用いた腎輸入・輸出細動脈の反応性の層差に関する研究                                   | 松田 洋人 (T167) |
| ● 網膜における NO、CO 生成系を介した可溶性グアニル酸シクラーゼの調節                                    | 下山 勝 (T185)  |
| ● 潰瘍性大腸炎および Crohn 病における Nitric Oxide 産生と大腸粘膜の Nitric Oxide Synthase 活性の増加 | 木村 裕之 (T199) |
| ● 抗アレルギー薬トラニラストの糸球体腎炎の進行抑制効果に関する研究  | 力石 昭宏 (T215) |
| ● マウス舌癌同所移植モデルを用いた MMP 阻害剤 ONO-4817 の頸部リンパ節転移抑制効果                         | 山下 拓 (T233)  |
| ● Interleukin-6 に誘導される腎細胞癌の増殖における活性化型 STAT3 の役割                           | 堀口 明男 (T245) |
| ● ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規 NF-B 活性阻害剤の抗腫瘍効果                                      | 菊地 栄次 (T261) |
| ● 膀胱癌患者血清中の IgG 抗体が認識する新しい膀胱癌抗原の同定  | 伊藤 敬一 (T271) |
| 号 外   |              |
| ● 博士 (医学) 学位論文—内容および審査要旨— (第 174 号)                                       | (別頁)         |

# 降圧する。

# 守る。

1999 ELITE II  
Evaluation of Losartan  
in the Elisy Study I

2001 RENAL  
Reduction of Endpoints in RBDOM with  
A-II Antagonist Losartan

2002 LIFE  
The Losartan Intervention For Endpoint  
Reduction in Hypertension Study

2002 OPTIMAL  
Optimal Therapy for Myocardial Infarction  
with the Angiotensin II Antagonist Losartan

# 脳心腎

## ニューロタンの実証

### 【禁忌（次の患者には投与しないこと）】

- (1) 本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者
- (2) 妊婦又は妊娠している可能性のある婦人
- (3) 重篤な肝障害のある患者

### 【効能・効果】 高血圧症

【用法・用量】 通常、成人にはロサルタンカリウムとして25～50mgを1日1回経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減するが、1日100mgまで増量できる。

### 【使用上の注意】

#### 1. 慎重投与（次の患者には慎重に投与すること）

- (1) 両側性腎動脈狭窄のある患者又は片腎で腎動脈狭窄のある患者 (2) 高カリウム血症の患者 (3) 血尿な腎機能障害のある患者 (4) 肝機能障害又はその既往のある患者 (5) 脳血管障害のある患者 (6) 体液量が減少している患者 (7) 高齢者

#### 2. 重要な基本的注意

- (1) 両側性腎動脈狭窄のある患者又は片腎で腎動脈狭窄のある患者においては、腎血流量の減少や糸球体ろ過圧の低下により急速に腎機能を悪化させるおそれがあるので、治療上やむを得ないと判断される場合を除き、使用は避けること。
- (2) 高カリウム血症の患者においては、高カリウム血症を増悪させるおそれがあるので、治療上やむを得ないと判断される場合を除き、使用は避けること。また、腎機能障害、コントロール不良の糖尿病等により血清カリウム値が高くなりやすい患者では、高カリウム血症が発現するおそれがあるので、血清カリウム値に注意すること。
- (3) 本剤の投与によって、一過性の血圧低下（ショック症状、意識喪失、呼吸困難等を伴う）を認すおそれがあるので、そのような場合には投与を中止し適切な処置を行うこと。また、特に次の患者では投与は少量より開始し、増量する場合は患者の状態を十分に観察しながら徐々にすること。  
ア 利尿剤投与中の患者 イ 広範囲な減塩療法中の患者 ウ 血液透析中の患者
- (4) 降圧作用に基づくめまい、ふらつき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機械を操作する際には注意させること。
- (5) 手術前24時間は投与しないことが望ましい。
- (6) 本剤を含むアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬投与中にまれに肝炎等の重篤な肝障害があらわれたとの報告がある。肝機能検査を実施するなど、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を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）

- カリウム保持性利尿剤：スピロラクトン、トリアムテレン等
- カリウム補給剤：塩化カリウム

#### 4. 副作用

##### 臨床試験（治験）

区内で実施された臨床試験で副作用が報告されたのは709例中71例（10.0%）であり、主な副作用は頭痛13件（1.8%）、めまい19件（1.3%）、嘔吐・悪気6件（0.8%）、ほてり5件（0.7%）であった。また、主な臨床検査値異常は、ALT(GPT)上昇19件（2.7%）、AST(GOT)上昇15件（2.1%）、CK(CPK)上昇15件（2.7%）、総コレステロール上昇11件（1.6%）、LDH上昇10件（1.4%）、赤血球減少10件（1.4%）であった。なお、65歳以上の高齢者における副作用発現率は9.6%（156例中15例）で、65歳未満の非高齢者群（553例中56例、10.1%）と同様であり、主な副作用はめまい4件（2.6%）及び頭痛2件（1.3%）であった。

##### (1) 重大な副作用（すべて頻度不明）

- 次のような副作用があらわれることがあるので、症状があらわれた場合には、投与を中止し、適切な処置を行うこと。
- 1) アナフィラキシー様症状：不快感、口内異常感、発汗、蕁麻疹、呼吸困難、全身潮紅、浮腫等が症状としてあらわれることがあるので観察を十分に行うこと。
- 2) 血管浮腫：顔面、口唇、咽頭、舌等の腫脹が症状としてあらわれることがあるので観察を十分に行うこと。
- 3) 急性肝炎または劇症肝炎
- 4) 腎不全
- 5) 失神・意識喪失：血圧低下に伴う一過性のショック症状があらわれることがある。
- 6) 横紋筋融解症：筋肉痛、脱力感、CK(CPK)上昇、血中及び尿中ミオグロビン上昇を特徴とする横紋筋融解症があらわれることがあるので、このような場合には投与を中止し、適切な処置を行うこと。また、横紋筋融解症による急性腎不全の発症に注意すること。
- 7) 高カリウム血症：重篤な高カリウム血症があらわれることがあるので、観察を十分にを行い、異常が認められた場合には、直ちに適切な処置を行うこと。
- 8) 不整脈：心室性期外収縮、心房細動等の不整脈があらわれることがあるので、観察を十分にを行い、異常が認められた場合には、直ちに適切な処置を行うこと。
- 9) 白血球減少、血小板減少、血小板減少：白血球減少、白血球減少、血小板減少があらわれることがあるので、観察を十分にを行い、異常が認められた場合には、直ちに適切な処置を行うこと。

本剤のご使用にあたり、【使用上の注意】等詳細については、製品添付文書をご参照ください。

AA  
NU-LOTAN

A-IIアンタゴニスト

# ニューロタン錠50

(ロサルタンカリウム錠)【薬価基準収載】

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



製造販売元【資料請求先】

万有製薬株式会社

〒103-8416 東京都中央区日本橋本町2-2-3

ホームページ <http://www.banyu.co.jp/>

©Trademark of Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, NJ, U.S.A.

2003年3月作成 01-04CZR03-J-3703J

## 綜 説

### スポーツと腰痛

川崎市立井田病院

わか の こう いち  
若 野 紘 一

Koichi Wakano

Key Words : sports, athlete, low back pain, epidemiology, characteristics of sports club

腰は文字通りヒトの動きの要であり、それだけに身体を激しく動かすスポーツにおいて、腰の外傷や障害による腰痛は珍しくはない。筆者は慶應義塾大学の日吉のキャンパスに近い川崎市立井田病院に勤務し、また慶應義塾大学病院のスポーツ・クリニック（スポクリ）および慶應義塾大学スポーツ医学研究センター（スポ研：日吉）での兼担講師として臨床指導を行ってきた。同時に、プロ野球球団の相談役や大相撲診療所医務委員を務め、体育会運動部のアスリートの諸君をはじめとして腰痛を訴える選手や力士の診療を行う機会に多く恵まれた。

以下は、著者が経験した“スポーツと腰痛”（以下スポーツ腰痛）についてスポーツ現場とスポクリなどの病院で診たアスリートの腰痛の実際について紹介する。更に、アスリートの腰痛の実態を究明するべく若い研究生の諸君を指導して行ったリサーチ・ワークについての概要を述べて、スポーツ腰痛全般についても考案する。

#### スポーツ腰痛の疫学<sup>1)</sup>

##### 1. スポーツ腰痛の定義<sup>2)</sup>

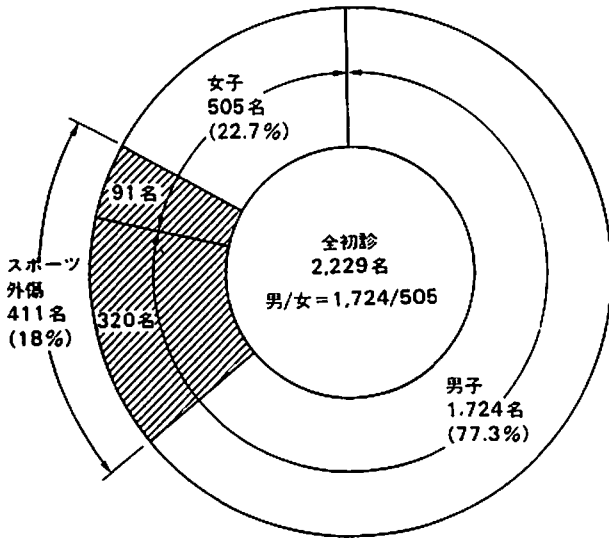
腰を使わぬスポーツ種目は皆無であるといっても過言ではなく、例えば弓道<sup>3)</sup>やアーチェリーのような静的スポーツであっても、姿勢性の腰背筋の疲労から選手は腰痛を訴える。元来、一般の人においても罹患率の高い腰痛<sup>4)</sup>では、原因のどこまでがスポーツの外傷や障害に起因するかを決めることは困難である。実際に、腰の負担の多いボート競技では、ソウル・オリンピックの出発の前日という、疲労の頂点でメディカル・チェックを行ったところ、日本代表チームの全員が激しい筋疲労性の腰痛を訴えていた<sup>5)</sup>。また、筆者がチームのアドバイザーを務めるプロ野球のC球団で見られた年間の障害歴によ

ると、腰痛はプロ野球の年間リーグ戦のスケジュールに沿って季節間変動があり、イン・シーズンの腰痛発生率はシーズン・オフの発生率の約3倍であり、年間を通じて約10%であった<sup>6)</sup>。これらの腰痛は、いずれも、そのスポーツ特有の外傷や障害というよりは、腰の筋疲労とでも言うべき要素が大きく、問題はトレーニングの内容よりは量にあるようである。

さらに、「腰痛あり」の自覚症状の定義の不明確さも腰痛の疫学的調査を複雑にしている。実際に、選手を前にしてのメディカル・チェックでは、体前屈の制限度や腰に診られる圧痛点の有無などの他覚所見や神経学的欠落所見などから、その時点での腰痛の客観的評価が可能である。しかるに、アンケート調査による同様の設問では、「腰痛あり」の調査の目標そのものが曖昧となる。このため、一般人の調査では、その腰痛があるがために日常生活動作に支障をきたすもの、実際には、仕事を休むか、医療機関を受診した程度の腰痛を「腰痛あり」とすることが多い。また、スポーツ現場では、トレーナーや監督が確認した腰痛であって、かつ、腰痛のためにプレイに支障が生じて1～2日程度練習を休まざるを得なかった例を「腰痛あり」と定義している<sup>7)</sup>。

##### 2. スポーツ腰痛の背景

慶應義塾大学運動部のアスリートは<sup>8)</sup>、所属がハイ・レベルの運動部である体育会所属と趣味程度の同好会やサークルに大きく分けられる。1992年度の調査時では、体育会には38競技の運動部があり、1,775名（全学生26,487名中の8.8%）の学生が運動部に所属していた。これに同好会、サークル、理科系や分校の運動部を含むと全部で288団体、所属する学生は15,514名となり、全学生の58.6%に相当した。



第1図 保険管理センター受診のスポーツ外傷

スポーツの種目別人数は、テニス競技が43.4%を占め、断然1位であった。しかし、スポーツ外傷や障害は、必ずしも塾内で相談するとは限らないが、一つの統計として、この年の日吉の保健管理センターを訪れた全初診患者2,229名の中でスポーツ外傷は、411名(18%)であった(第1図)。

第1表 運動部別腰痛有症者率(部員10名以上に限る)

| 運動部     | 部員数 | 有症率 (%) |
|---------|-----|---------|
| 少林寺     | 10  | 0       |
| 弓術      | 19  | 5.3     |
| 水泳      | 17  | 5.9     |
| 野球部     | 51  | 7.8     |
| 柔道      | 22  | 9.1     |
| ゴルフ     | 39  | 10.3    |
| アイスホッケー | 26  | 11.5    |
| サッカー    | 21  | 14.3    |
| 卓球      | 13  | 15.4    |
| アメフト    | 43  | 18.6    |
| 射撃      | 10  | 20      |
| 庭球      | 29  | 20.7    |
| 合気道     | 19  | 21.1    |
| 剣道      | 61  | 21.3    |
| 空手      | 13  | 23.1    |
| 馬術      | 12  | 25      |
| バスケット   | 28  | 25      |
| 洋弓      | 15  | 26.7    |
| ラグビー    | 59  | 28.8    |
| 端艇      | 26  | 34.6    |

まず、医療機関の受診率であるが、比較的慶應義塾大学の学生が多い川崎市立井田病院では、スポーツ関連の初診患者379例中、トップが腰部(27%)であり、以下膝部(16%)、手指(9%)、足関節(8%)等であった。また、慶應義塾大学病院のスポクリでは<sup>9)</sup>、1991年9月～1998年の3月に至る期間の初診患者のうち、腰痛を主訴とする患者は17%(942名/6,975名)に達し、膝痛と並んで多い疾患の一つに数えられた。第1表は慶應義塾大学の運動部別のスポーツ腰痛の発症者数と割合であり、スポ研で行った同一時期の同一様式による、アンケート調査によった。

### 3. スポーツ腰痛の疾患別内訳

スポーツ腰痛の疾患別内訳は、スポーツ現場に近い井田病院では急性期腰痛が大半であり、信濃町の慶應義塾大学病院のスポクリでは慢性期腰痛が多く、内訳も違ってくる。

第2表はスポーツ腰痛の疾患名一覧であるが<sup>9, 10)</sup>、急性期の(1~4)は、打撲(contusion)、捻挫(sprain)、挫傷(strain)、筋・筋膜炎(myofasciitis)、筋腱附着部炎(enthesopathy)が大部分であり、これらの腰痛の治療は、筆者流「三点セット」で

- 1) 消炎鎮痛剤(NSAIDs)を投与しながら、鎮痛剤含有の湿布を貼付する。
- 2) 昼間は軟性コルセットを装着して2~3日のスポーツを休止する。
- 3) 安静できるなら臥床を指示する。

これで80%以上が小康を得る程度のものである。残りの20%の慢性化した腰痛と繰り返して発症する患者達が慶應義塾大学のスポクリを訪れることになる<sup>11, 12, 13)</sup>。

それでは、慶應義塾大学のスポクリを訪れた上記の慢性期または亜急性期のスポーツ腰痛の初診942名の病名の内訳を見てみると、多い順に

第2表 スポーツ腰痛の疾患名

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1 腰部打撲                            |
| 2 腰部捻挫(椎間関節障害)                    |
| 3 腰部筋・筋膜炎(筋疲労, コンパートメント症候群, 肉バナレ) |
| 4 腰部筋・筋腱附着部炎(腸骨稜症候, 棘間靭帯炎)        |
| 5 分離(すべり)症                        |
| 6 椎体終板障害(腰部ショイエルマン病)              |
| 7 腰部椎間板症                          |
| 8 腰部椎間板ヘルニア                       |
| 9 二次性(防御性)筋緊張                     |

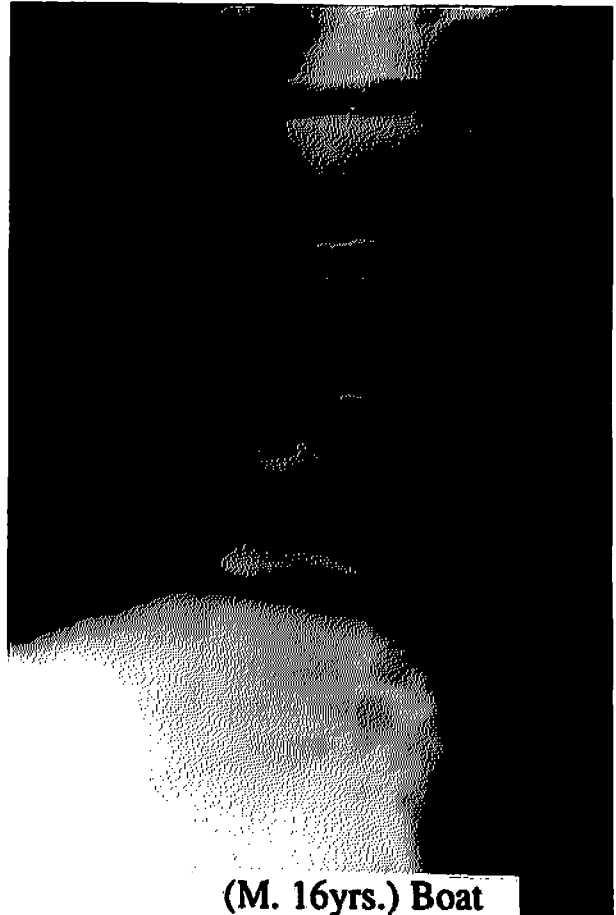
- 1). 椎間板症（障）432名（40%）：X線像で椎間板に狭小化や不安定が見られる。
- 2). 腰部椎間板ヘルニア189名（20%）：神経学的所見とMRIで確認される。
- 3). 腰椎分離症119名（13%）：ほとんどが側面単純X線像でわかる。
- 4). 腰痛症162名（17%）：腰痛の他に神経学的所見や画像所見が見られない。
- 5). その他疾患40名（4%）：その他疾患全部<sup>9)</sup>。この順に沿って、疾患別のスポーツ腰痛の診断<sup>14, 15, 16)</sup>と治療<sup>17, 18, 19)</sup>の特徴について述べる。

1) 腰部椎間板症（障）<sup>20, 21)</sup>

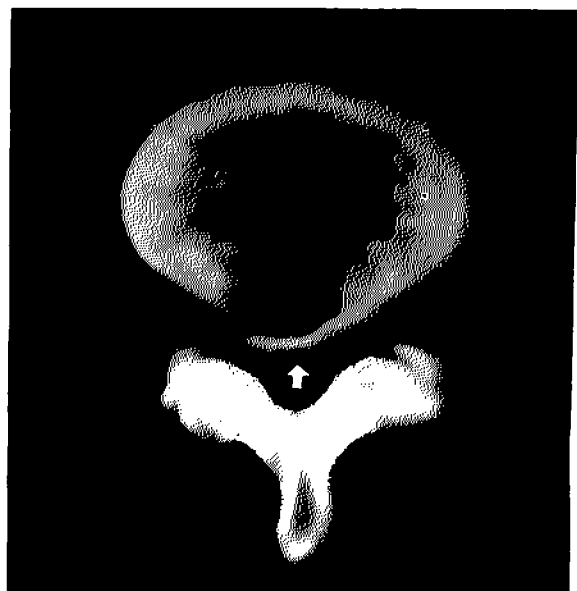
脊椎の成長期に腰椎に過度の負荷が加わると、椎間板に障害が生じる。具体的には、椎体の頭尾を構成する終板が間に挟んでいる椎間板に圧迫されて疲労骨折を起こし、そこに椎間板組織が流入し、以下の病変を呈する。

- a) 椎体辺縁隅分離 (Kantenabtrennung, 独)：椎体の前方の上下縁隅で生じる。
- b) 辺縁部の軟骨剥離 (apophyseal separation) を伴った若年ヘルニア<sup>22)</sup>。
- c) シュモール結節 (Schmorl node)：椎体終板の中央部で陥凹を生じる。
- d) 椎体終板障害：終板が総体的に破綻した結果、不整、椎間板腔狭小を生じる。

さらに、これらが元となって腰椎全長に病変が及ぶものは、特に胸椎部で成長期障害にネーミングされたショイエルマン病 (Scheuermann) とこれを同根と見て「腰椎ショイエルマン病」と呼ぶこともある。いづれにしても、成長期の発生であるので成長後の腰椎の形態に及ぼす影響は大きく、村瀬、井形ら<sup>23)</sup>は病期に沿って3期に分類している。この病変は、腰椎の偏平化、椎間板の狭小化など、X線像では早期に画像上の大きな変化となって現れる（第2図）。しかし、臨床症状は急性期の一部を除いて、腰痛や腰椎の不撓性の増加もわずかな事が多く、もちろんスポーツ続行可能である。近医でX線像の賑やかさに驚いてスポーツ休止宣言をされてから、スポクリへ紹介されることも珍しくはない。一般に、名選手と言われるような人は小学校の低学年からハードなトレーニングをしており、プロの選手で時にびっくりするような変形を腰のX線写真で見ることがあるが、少年の日の椎間板障害に根ざした所見と思われる。ただ、次に述べる椎間板ヘルニアの一部として、スポーツ選手によくある骨端核離断をとまなうような例には手術時に要注意である（第3図）。



第2図 腰椎に多発性病変（腰椎ショイエルマン病）

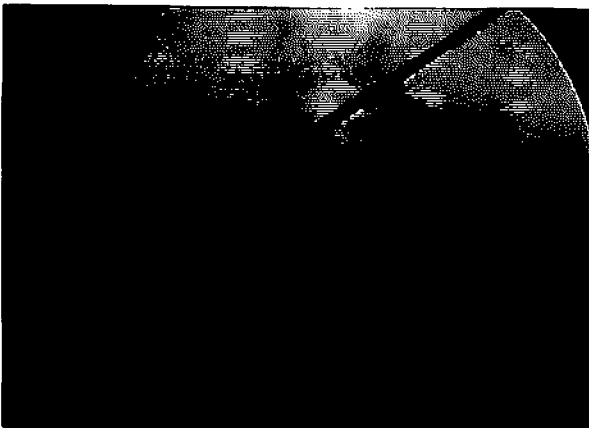
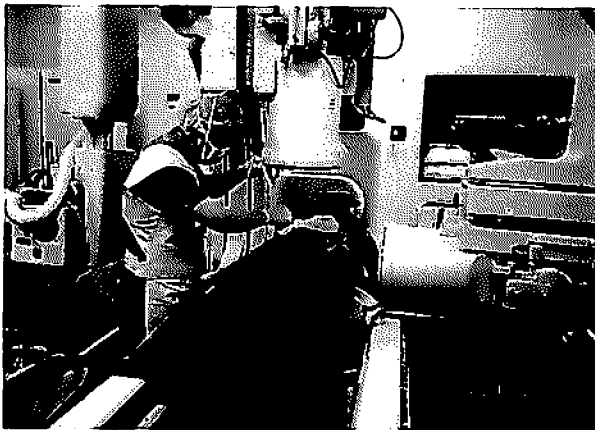


第3図 29歳, 投手 (術前CT, L5ヘルニア矢印)  
高校時代にヘルニアの脱出と共に辺縁軟骨剥離があり、骨性の土手状になったもの。大学時代手術を施行し、術後MLBで活躍した

多くの椎間板障害は椎間板腔が狭くなったり、腰の前屈時に椎間板高位で不安定な所見があったりするものである。この椎間板狭小や不安定の因子は阿部ら<sup>24)</sup>の経験でも、スポーツ腰痛発症と有意に相関する危険因子であり、スポーツ選手のメディカル・チェックとしてX線写真を撮るのであれば、腰椎側面前屈位が不安定の情報が多く有用である。

## 2) 椎間板ヘルニア<sup>25, 26)</sup>

椎間板ヘルニアの診断の必要条件は、a) 下肢伸展挙上テスト陽性を含む臨床所見とb) 明瞭なMRIである。一般にMRI横断像でヘルニア塊の基部から頂点までの前後径が脊柱管前後径の2分の1以内、すなわち50%未満のヘルニアは、保存的に経過を観る事が多い<sup>19)</sup>。しかし、ヘルニアはMRIによる説明でアスリートにも解り易いので、一般には手術適応でないようなサイズでも、



第4図 経皮的髄核摘出手術の実施と術中モニター像  
a 椎間板造影の要領でL4/5に小径パイプを刺入する。  
b 透視下で確認し髄核を摘出する。

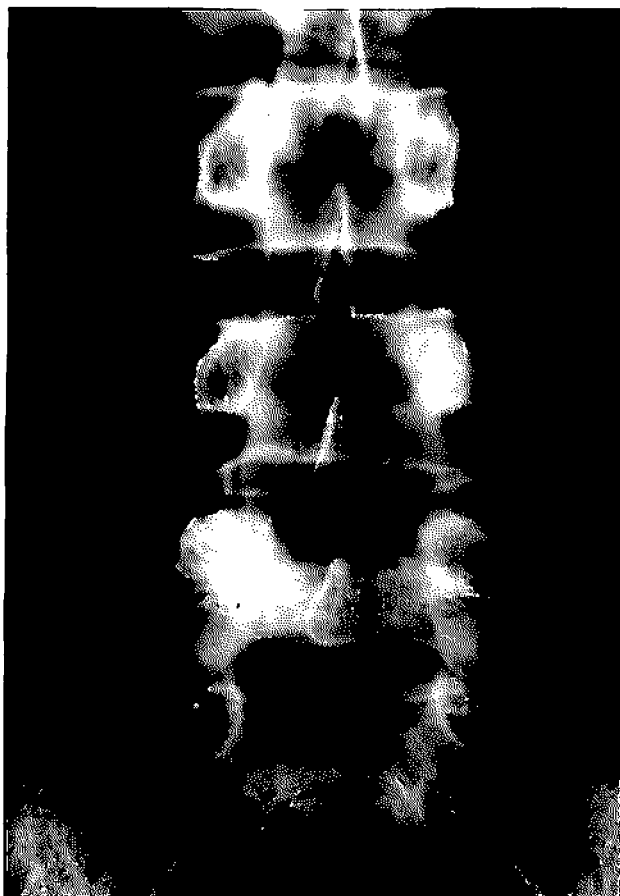
アスリートから手術を希望されることが少なくない。そこへ、術後臥床期間が短く、低浸襲であるからアスリートのヘルニア手術に適しているとして、椎間板ヘルニア手術にレーザー光線を使って経皮的に行う方法を推奨する医療機関が存在する<sup>26)</sup>。この方法の問題点は、ここでは詳しくは述べないが、アスリートにとって経皮的髄核摘出法<sup>27)</sup> (第4図a, b)の利点は魅力的であることは容易に理解ができる。しかし、レーザー蒸散術後の患者をセカンド・オピニオンで拝見すると、将来問題となりかねない点が幾つか指摘されるようである。ヘルニアを適出するのにパンチであろうと、レーザー・メスであろうと、椎間板浸襲後の安静期間は有る程度は必要であり、レーザー手術費用の高額支払いの利はない<sup>26)</sup>。

また、アスリートに発生した軽度のヘルニア症状は、スポーツの成績不良の責任を転嫁される傾向があることを医師は常に念頭に置かねばならない。手術適応を考慮するにあたり、もちろんスポーツの成績は尊重した上で、術後のスポーツ復帰の状況も患者に冷静に理解させることが肝要である。椎間板ヘルニアの診断をMRI<sup>28)</sup>を見せてアスリートに告げるにあたり、この心因的側面<sup>29)</sup>を考慮するべきである。手術後のスポーツ復帰に成功した選手の活躍が報じられ、自分も手術で治りたいと考えることは十分に理解できるが、術後スポーツ復帰に成功した例の何倍ものアスリートが、術後、元のレベルのスポーツに戻っていない現実をインフォームすることを忘れてはいけない。

椎間板ヘルニアの手術方針が決定したら、スポーツ復帰に向けてリハビリ・プログラムを組み、スポーツのスケジュールとマッチさせる。いかに低浸襲であってもヘルニア塊を摘出するには、どのような手段を取っても椎間板の切除を要するので、基本的安静期間は守らねばならない。すなわち、椎間板という軟部組織の修復期間は早くても3週間を要するからである。この期間の安静すら守らせないで早期スポーツ復帰を許すと椎間板腔は急激な狭小化を来し、その結果、椎間関節のかみ合わせ不全から新たな腰痛を来すこととなる。また、ラブ式手術の浸襲による後方軟部組織損傷を危惧するのであれば、鏡視下に行うマイクロ手術が皮切も小さく、優れてスポーツ腰痛の手術に向いている。

## 3) 腰椎分離症<sup>30, 31)</sup>

成長期の脊椎に過度のストレスが加わると腰の脊椎の後方部分、関節突起間から椎弓根部にかけて骨の疲労骨折が生じる。診断には



第5図 第4椎弓根左と第5の右が硬化像あり、光って見えるので pearly pedicle と、脊椎分離を示している。MRI も同様。

- a) 10 歳代に腰痛歴がある。
- b) 腰椎単純 X 線像で分離部のギャップが確認されることである。

ただ、腰痛歴は必ずしも判然としない例も時々見られる<sup>32)</sup>。近医で「分離症はスポーツをやる上で支障とならないから放置する」と説明され、それでもトレーニングを続けると慢性的に腰痛が軽減しないので、セカンド・オピニオンをスポクリに聞きに来る親子連れ少年が少なくない。

診断上問題になるのは、分離の発生の時期である。分離部像は発生初期、進行期、終末期の3型に分けられ、中でも、初期像を見逃さないことである。そのためには、CTによる分離部像の詳細やMRI水平断による椎弓根部のT1高輝度変化(単純写真正面の椎弓根部硬化像：pearly pedicleに相当)(第5図)、さらには、骨シンチ像などにより分離が初期新鮮例とみなされれば、分離部を骨癒合させるチャンスが残っている。

治療は保存療法を原則として行うが、適応は早期発見

の初期例に限られ、それでもX線像での修復は加藤、井形ら<sup>21)</sup>で11%である。保存治療を開始する時は、本人に修復するチャンスは低い確率であることを説明してから開始する。治療の要領は、

- a) 6ヶ月間の体育実技を含んでのスポーツ活動禁止。
- b) 昼間は軟性コルセット着用というものである。

スポクリを訪れる分離症の少年は、成長期にして、既に将来プロとなることを期していることが少なくない。しかし、保存療法の成績は決してよくないし、手術治療は緒家の報告<sup>32, 33)</sup>もハイ・レベルのスポーツ復帰の長期予後まで配慮されているとは思えない。スポクリでは分離症の手術療法は適応がない<sup>34)</sup>。

一方、すべり症を併発して、麻痺の出る例では、手術によってすべりを矯正し、除圧と固定を考える。固定は椎体前方固定または後方のinstrumentationとなるが、いずれの場合も本格的スポーツ復帰は困難である。慶應義塾大学医学部整形外科で手術をした例では、全員前方固定であった。ほとんどの症例は分離症があって、スポーツ継続によってすべったものであり、中年期までスポーツを続けた人に多く見られた<sup>32)</sup>。分離症からすべり症に移行する時期、すなわち、すべり始める時期については、分離発生後の早い時期とする説<sup>21)</sup>があるが、臨床的には分離があって、社会人になってもスポーツを継続する種目に手術例が多い<sup>35)</sup>。追跡調査が今後の検討項目である。いずれにせよ、分離症は決して無症候ではなく、アスリートの敵であることを忘れてはいけない。

#### 4) 腰痛症

上記の神経学的所見や画像上の陽性所見を得て病名をつけられた例を除くと、腰痛の主訴があって、他覚所見のない「腰痛症」なるバスケット・ネームとなる。中には、器質的疾患や神経根痛を和らげるために大脳が二次性(反応性)の防衛反応を腰の筋肉に発して生じる(バイオフィードバック機構)腰椎起立筋の過緊張、さらには、腰背筋のオーバー・トレーニングによるコンパートメント症候<sup>36)</sup>、腰背筋の肉バナレとも言うべき筋・筋膜炎や腰背筋の痙縮、脊椎の棘突起、横突起や腸骨稜に生じた骨の筋腱付着部炎<sup>37)</sup>などはスポーツ特有の腰痛症であり、画像所見に乏しい。治療は

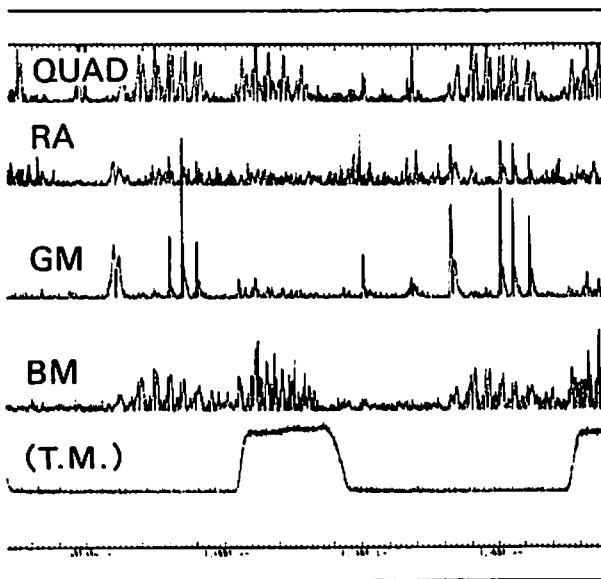
- a) コルセット<sup>38)</sup>を装着させて腰部の安静とアイシング<sup>39, 40)</sup>(急性期)。
- b) 温熱などの理学療法(急性期、亜急性期)。
- c) 腰痛体操<sup>41, 42)</sup>やストレッチなどを組み合わせて予防に努める。(慢性期)

なお、コルセットは運動しながら装着するものであり、

風通しのよいものが望ましい。さらに、スポーツの支障にならないという目的と矛盾した条件が付く。この点を考慮して作られたのがサクロ・スポーツであり、体前屈を妨げない様に腹側のベルクロの丈が短い。このメッシュの装具でも違和感があれば、夏の暑い時以外なら腰部に密着するサーマル・プロテクターを使用する。ウエット・スーツの素材で、フィット感と保温性に優れている。

### スポーツの種目別腰痛の特徴

スポーツ腰痛の意義ある統計として、第1表に示した各種スポーツの種目別(運動部別)腰痛有症者率がある。すなわち、どの種目が腰に負担が多いかの裏付けである。しかし、発表された多くの結果は、関係単独チームのメディカル・チェックによるデータであることが多い。第1表は同一時期の塾体育会全体のアンケート調査で、調査時(2000年)の腰痛の有無を調査したものである。同一集団の種目別腰痛発症率であり、価値は高い。予想通り、重量挙げ部やボート部などの腰に負担の大きいと思われる種目やラグビー、空手などのコンタクト・スポーツでは、腰痛の有症率は高い<sup>4)</sup>。以下、我々がメディカル・チェックを行った主な運動部別腰痛の特徴を挙げる。



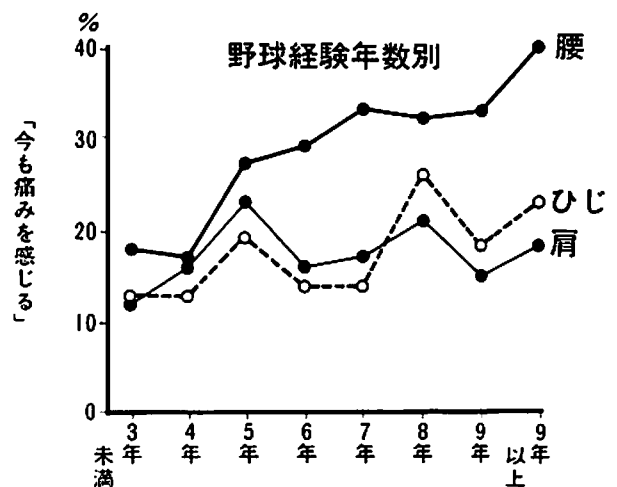
第6図 ローイングの動作筋電図  
上から大腿四頭筋、腹直筋、殿筋、腰背筋の順。  
(TM)はオールにかかる張力。下肢の伸筋と背筋で漕いでいることがわかる。

### 1. 端艇(ボート部門)<sup>5, 43, 44)</sup>

ローイングを動作分析すると、基本はオールで水をキャッチしてから、下肢の伸筋、背筋、上肢屈筋の力で水を漕ぐストローク動作を繰り返して進むことが解る。体幹と四肢に筋電計を付けてローイング・エルゴメーターで筋電動作分析を行うと(第6図)、腰背筋と大腿四頭筋がほぼ同期して活動している。そこで、オールにかかる牽引力を測ると、平均約775Nの力が加わる。この力は主に膝の伸展と腕の屈曲ばかりではなく、腰の伸展力で発揮される。大雑把に一漕ぎ10M進むとして、実際に6000Mのレース(隅田川レガッタ)を漕ぎ通すとすれば、下に置いた50kgの石を、600回連続して胸の高さに持ち上げる動作にも匹敵する。しかし、メディカル・チェックを通じて目立ったことは、合宿初めの頃は、新人に腰痛が多く、二年生、三年生と腰痛の発症率が下がることであった。この事より、背筋のトレーナビリティが高いことと単純に見えてローイング動作に要領が有るという印象であった。

### 2. 野球<sup>6, 45, 46, 47)</sup>

野球選手は多くは小学校低学年から開始し、throwingとbat swingを小児期から専らトレーニングしている。このため、障害は上肢の肩と肘に集中している。腰を痛くするとswingが出来ないばかりではなく練習に参加できず、控えの選手が多い大学レベルではスポーツ活動からdrop outしがちである。塾体育会野球部の



第7図 甲子園球児の腰の障害(レポート「けがと高校野球」第10回少年野球 すでに抱える爆弾 朝日新聞1988年12月13日付に掲載された図表を、許可を得て転載)



腰痛は通年では、46名中12名(26%)であり、ヘルニア疑いと高度の慢性腰痛の2名が要加療であった。

夏の甲子園に集まる高校球児も、腰痛には悩んでおり、1987年朝日新聞調査<sup>48)</sup>では1422人中40%が「今も痛みが有る」と答え、肩、肘の故障より腰は治りにくいと報じている。また、対処法は「バランスのとれた基礎体力づくりが重要」としている。この、バランスのとれた体力は、一般の腰痛対策としても重要である(第7図)。

プロC球団は入団してから選手を左右打ち(スイッチ・ヒッター)に鍛えて育て上げるので有名であるが、この過程を経験した選手は、スイッチ転向後に腰痛は減ったと口を揃えて言う。プロ野球選手の腰痛の有症率は序論でも述べた様に季節変動があるとはいえ、大学生よりはるかに低く、腹斜筋の肉バナレも含めて約10%である。また、野手の腰痛では腸骨稜症候、投手には踏み込み足の梨状筋症候、捕手では坐骨の殿筋附着部炎がスポーツ・パフォーマンスと関連して見られることがある。

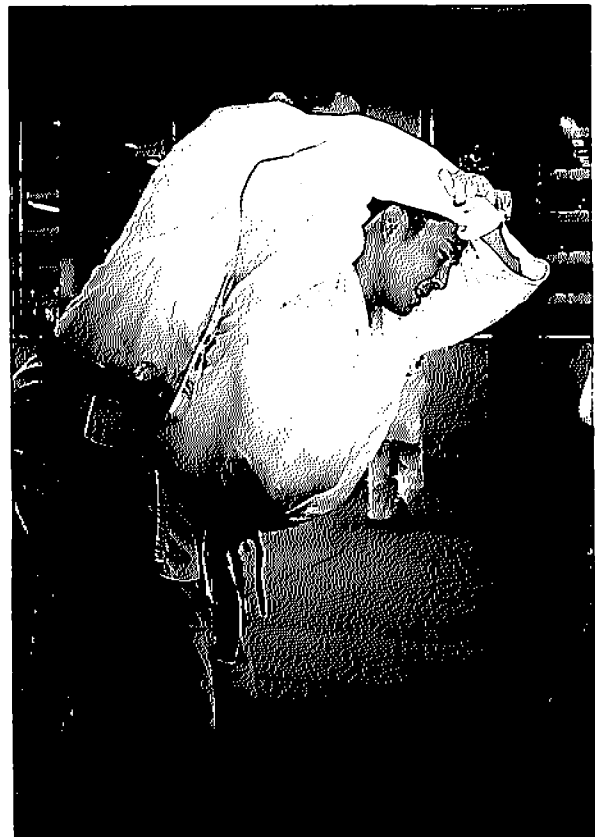
### 3. ゴルフ

同様のことがゴルフ<sup>49)</sup>でも言える。医師が日常の臨床でアマチュアのゴルファーを診ることが多いのは野球選手の比ではない。クラブ・スイングで腰痛に悩むサンデー・ゴルファーは多い。この種の訴えには対策として、練習でも左右打ちを励行することと、コースでは、打順を待つ時間に逆スイングの捻りを意識して腰に加えることで、随分と腰痛からの開放が得られる<sup>49)</sup>。事実、ゴルファーの腰痛の特徴として、右打ち、右腰痛の傾向<sup>10)</sup>がある。上級者、プロでは右の椎間関節に早く関節症変化が来る。スイングのフォロースルーで体幹は横から見て逆C型に反る姿勢が一般的である。この時、左方捻りと後屈姿勢で右椎間関節にグライディング・ストレスが加わる。米国では、この姿勢による腰痛発生の反省から、近年ではI型フィニッシュを選ぶ傾向があると聞く。また、某プロ・ゴルファーが腰痛で悩んで、ゴルフ・コースを後向きに走ることを試みて成功したと語った。この逆向き歩き(走行)は、従来から腰痛治療や予防に有効とされ、試みられていることである。ただ、陸上で後向きに走って危険のないところは広い芝生の上くらいに限られるので、実行が伴わなかった。そこでスポ研では、水中トレッドミルを井田病院のプール<sup>20)</sup>に入れ、時速4kmで動かし、その上で逆向き歩行を行った。慢性腰痛の患者とボランティア10名に行い、結果は好成績であったが、単なる水中運動や順向き歩行との比較が困難であった。また、腰痛治療に用いるMedXマシンで背筋力<sup>50)</sup>を測ったところ、ゴルフの打球の飛距離は、背筋力の強化で伸

びることが、女子ゴルフ部員の背筋力測定と訓練の結果からスポ研大西ら<sup>50)</sup>が明らかにした。その結果は、ゴルフに留まらず、野球部の諸君の注目するところでもある。

### 4. 柔道

塾柔道部<sup>51)</sup>の腰痛の性状は、調査時の寒稽古中に腰痛のあったものは、29名中4名(14%)、また、過去に腰痛のあったもの5名(17%)であった。この頻度は、第1表のアンケート調査時では2名(9%)であり、他の報告施設より相当低い。黒木、田島ら<sup>52)</sup>は、世界チャンピオンを含むA化成の柔道部員には、21名中6名(29%)の過去に腰痛のエピソードがあり、19名(90%)が調査時に腰痛がみられたとしている。また、1993年に至る3年間に7名(3名に1人)に脊椎分離があったが、その間にすべりに移行する選手はいなかった。このことから激しい筋肉のトレーニングは分離症がすべり症に移行するのを防ぐとした。一方、山路、有馬ら<sup>53)</sup>は、大学クラスではトップである東海大柔道部82



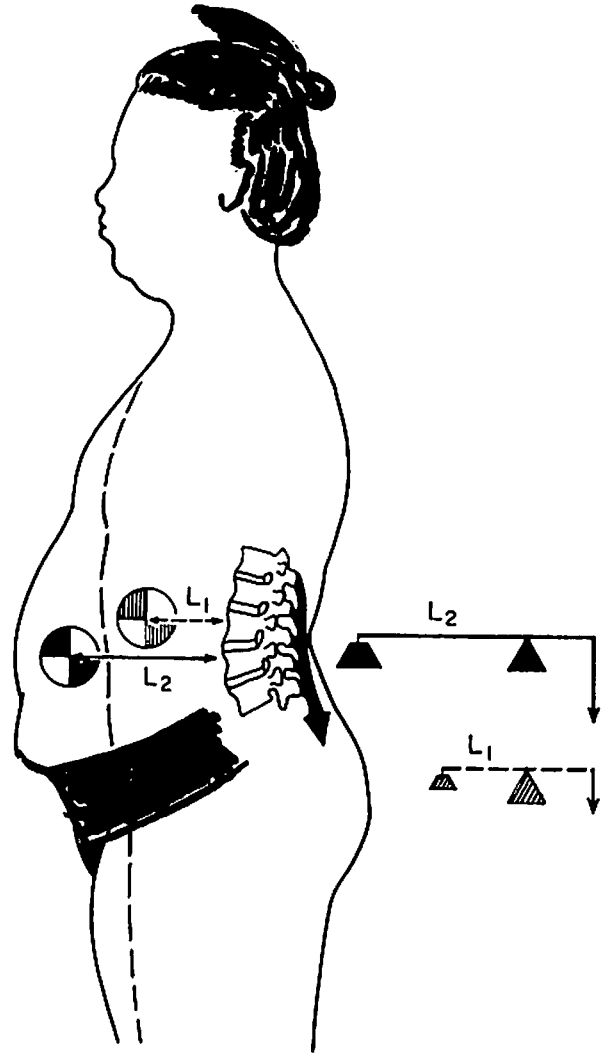
第8図 背負い投げの稽古。腰椎は反っている。これから、一気に回旋と屈曲が加わる。  
(肖像の掲載について被撮影者同意済み)

名を調査して、練習を制限する程度の腰痛の既往者は48名(59%)に及んだとしている。この中で分離は17名(21%)に見られた。また、この中で腰痛の既往者の体重別得意技を分析すると、各クラス共通の得意技は「払い腰」であり、これは技に入るとき腰椎は回旋し、投げる時には回旋しながら屈曲し、投げる後半に伸展する。この運動のシーケンスは「背負い投げ」や「内股」でも同様であり、腰痛発生の相当な原因となっていると分析している。どうやら、柔道の腰痛の発生率はレベルと共に上がり、その原因は投げ技の稽古にありそうである(第8図)。

5. 相撲

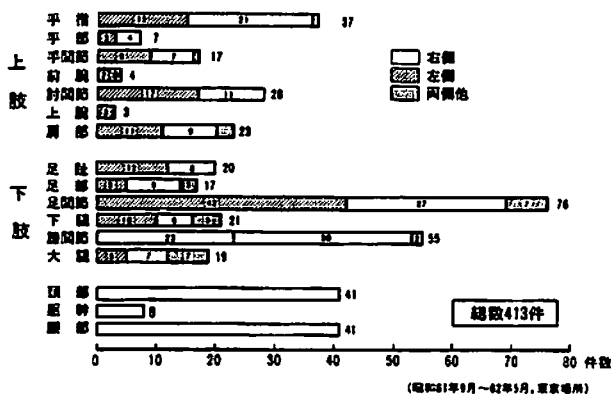
東京の本場所開催中に相撲診療所を訪れた力士の外傷は、1986年の3場所を合計すると、一番多いのが足関節の76件、2番目に多いのが膝関節の55件、そして腰痛は首痛と同じく41件で3番目に多く見られた<sup>54)</sup>(第9図)。腰痛の内容<sup>55)</sup>も、まっすぐ後ろへ倒れてまわしの結び目で腰を打つ序の口の腰痛から、どうしても横綱になれない大関の分離すべり症まで多彩である。力士は平均体重が140kgを超え<sup>56)</sup>、体脂肪も重いほど率が高く、さらに痛風、糖尿病も多く、時には「病気のデパート」と呼ばれたりして健康面からはマイナス・イメージが強調される傾向がある。そこで、せめて力士を怪我から解放するべく、力士の下肢筋力の基礎データを測定した。足関節、膝関節を外傷から守るには膝伸展力が重要とのデータ<sup>56)</sup>から力士の膝筋力をサイベックス・マシンで測定し、同時に肥満の程度をみるために体脂肪を測定した。その結果、力士の体重は180kg以内にすべきであって、体脂肪率が増えると膝の筋力は低下する。そ

して、番付をあげる力士は筋力ことに体重あたりの筋力を示すWBI(体重支持指数)が大きいことを証明した。これより前に、力士の腰背筋は番付が上がると強くなることを先行研究<sup>57)</sup>で知っており、太鼓腹の体重前方移行による、腰のモーメントの変化による腰背筋への負担増となり、やはり体重増加は腰痛にとって自体重による直接効果以上のものがあることを示した(第10, 11図)<sup>58)</sup>。

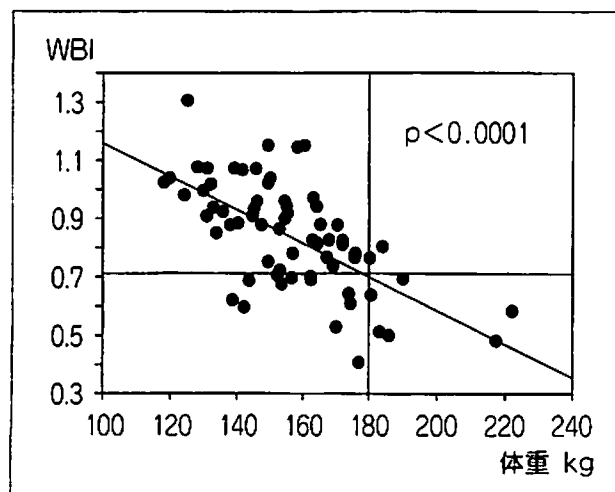


第10図 力士が体重が増えて太鼓腹になると、重心が前方へ移動してモーメントアームがL1からL2に延びる。その分、背筋の応力が増し、筋の負担が増す。

力士外傷部位別頻度



第9図 腰部は最下段の41件。再来も含んだ数字である。



WBIと体重

第11図 縦軸 WBI と横軸体重の関係を見ると、明らかに負の比例関係が見られ、平均+1SDである180 kgを境に WBI 0.7 以上を示した力士は1名だけだった。安全にスポーツするには WBI は0.8 以上が望ましいとされている。

#### 6. アメリカン・フットボール（アメフト）、ラグビー<sup>59)</sup>など

タックルやブロックで激しくぶつかりあうコンタクト・スポーツであり、かつまたスクラムで押し合うアメフトやラグビー競技は、頸髄損傷がクローズアップされるが、腰痛も多い。

北里研究所病院スポクリでは、阿部<sup>60)</sup>を中心に慶應義塾大学を含む多くの大学・高校のチームのメディカル・チェックを行ってきた。その膨大な結果は高校、大学のアメフト、ラグビー選手における腰痛発生と腰椎 X 線所見の関係を見るのに十分な数字によって裏付けられたデータとしてまとめられ、その成果は Am J Sports Med 誌<sup>33)</sup>にも採択された。そこでは、高校から大学の選手1820名中、一日以上プレイを中断するような腰痛を経験したのは、610例(45%)であった。これらの種目の選手は腰椎分離や椎間板障害などの発生率は高校、大学では一般と変わらず、ただ、所見の見られた選手には、間違いなく腰痛の発生が有意に多かった。すなわち、特に脊椎分離は時には無症候性であるから分離発生初期から治療を放棄する根拠とされるが、この研究の成果を踏まえて、本格的スポーツをやれば腰痛必発であることを医師やスポーツの指導者は忘れてはいけない。

#### 考案：スポーツ腰痛の原因の探求

腰痛の原因がスポーツにあったり、患者がアスリートであっても、予防と治療は原則として一般の腰痛と変わりはない。ただ、治療の目的がスポーツ復帰であり、時には腰痛の原因が目標（ゴール）と重なることがある。ただ、スポーツ腰痛の原因の多くが運動不足と対極にあるので、一般の腰痛の原因を探るのにもスポーツ腰痛は絶好の半面教師となり得る。以下、スポーツ腰痛の予防と治療について、疫学的調査<sup>61)</sup>や研究者の諸君と行ったリサーチ・ワークの結果を紹介し、腰痛の原因を探り考案とする。

##### 1. 腰部の解剖とバイオメカニクス

腰痛の原因を体幹部や腰椎の解剖学的破綻として捉えることが、スポーツ腰痛では解り易い。すなわち、体幹や腰椎にスポーツ腰痛の原因や治療となる状況を設定し、バイオメカニカルに評価する手法<sup>62)</sup>である。具体的に解剖学的に腰痛に関与する最小単位は椎間板であると思われる。

若野<sup>63)</sup>はスポーツ選手の腰部椎間板ヘルニアの治療に用いられ、本邦でも某女子プロ・ゴルファーが米国で治療を受けて成功し、一躍有名になったバパイア療法の効果について *in vitro* と *in vivo* に検討し、臨床応用の道を開いた。続いて小柳<sup>64)</sup>は、アナフィラキシー反応の少ない collagenase を使用して椎間板内酵素注入療法をまとめた。一方で高畑<sup>65)</sup>は腰部椎間板の有限要素法による力学的解析の検討を行った。腰椎椎間板を高さ10 mmの4分の1モデルとし、このモデルに圧縮荷重と前屈荷重を加えて、髄核部の挙動をみた。すなわち、体幹の動きと椎間板症の発現様式をモデルに与えた。スポーツ腰痛ではボートのローイングやバットイング時の前屈み姿勢など、椎間板ヘルニアを誘発するという動きが多く見られる。しかるに、本研究では前屈位では髄核は後方脱出、すなわちヘルニア脱出を促さないとの結果であった。

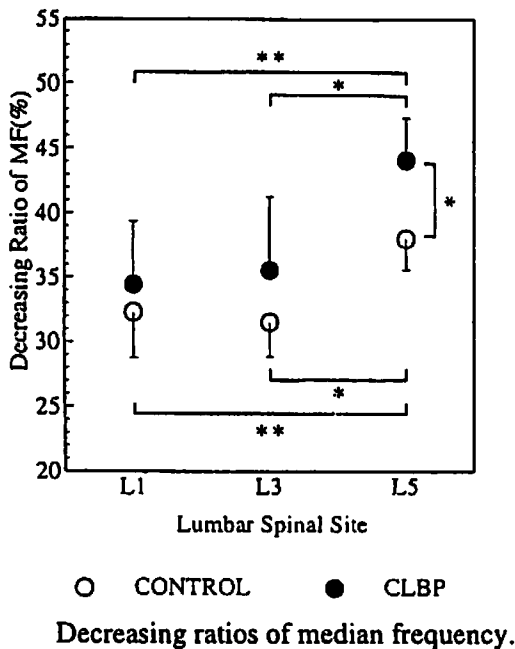
##### 2. 筋横断面積と筋力

腰の解剖学的構造を知るのに MRI を利用する方法がある。名倉<sup>66)・67)</sup>は井田病院の MRI を使いアスリートを対象にして大腰筋・体幹筋のモーメント・アーム及び筋断面積について検討した。成人男子12名の第4腰椎高位の横断 MRI を撮り、腹直筋、腹斜筋群（内・外腹斜筋+腹横筋）、背筋群（脊柱起立筋+腰方形筋）をトレー

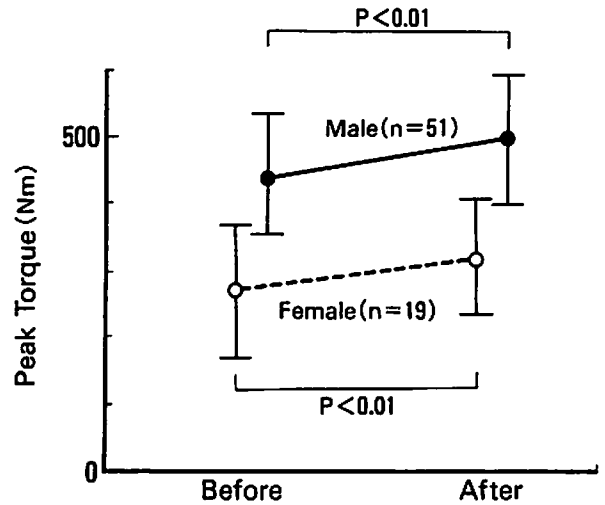
スし、各筋横断面積を求め筋力とし、各筋重心点から横断位の重心までの距離をモーメント・アームとして算出し、体前屈および後屈のモーメント筋力の比を筋別に求めた。その結果、後屈の背筋に拮抗するのは、腹斜筋群であって、腹直筋ではない。大腰筋は腰椎柱を仙椎・骨盤ユニットに引き付けて一体化さず stabilizer であると結論した。この結果は、アスリートの腰背筋トレーニングや筋力測定<sup>68)</sup>、水中歩行<sup>69)</sup>、逆歩行、MedX マシンによる筋力増強プログラム<sup>70)</sup>、腰背部痛治療、腰痛体操<sup>71, 72)</sup>、腰痛学校<sup>73, 74)</sup>などのリハビリテーション・プログラムに共通する腰背筋中心の考え方の基礎となった。

さらに、理工学部の李<sup>75, 76)</sup>は、腰背筋の疲労を表面筋電の中間周波数から導出し、慢性腰痛のあるアスリートは、対照に比し、有意に筋疲労を起こすとの結論を得て、腰痛の原因というブラック・ボックスを覗いた(第12図)。このように、一連のバイオメカニカルな研究は解剖学的見地からスポーツ腰痛の成因や治療のヒントを得た<sup>77, 78)</sup>。

腰痛の原因を外傷学的見地からのみ見ていると、痛い腰は、どこかが傷んだ結果であり、痛い間は安静をとってスポーツ禁止との対策となる。スポーツを中止すれば痛くないことは選手がよく知っていることであり、スポーツ禁止の治療法なら、わざわざスポクリを受診する必要



第12図 L1, L3, L5高位における腰背筋の中間周波数(MF)の低下率の比較。L5高位で群間差がみられる  
○正常対照群●慢性腰痛群(n=19), \*p<0.001



第13図 MedX マシンによるトレーニング効果  
男女共に背筋力は増し、腰痛は軽減した(スポクリ)

がない。以上はスポクリ担当整形外科医の痛い所でもある。

その点で、慢性の腰痛を訴える腰の起立筋は疲労しやすく、筋疲労は適度な運動を与える事によって軽減しうることを知った。その結果、腹斜筋、背筋の作用を見直して、実際には、腰痛体操の種目の追加を行い、Medx マシンでのトレーニングの適応の間口を広げ(第13図)、分離症も適応とした。スポーツすると痛い慢性腰痛をより能動的に対処できるようになったのである。

### 3. スポーツと腰痛

学生時代に腰に負担の多い種目を運動部員として行った人は腰に不可逆的な損傷や変性を蒙っているのか?言い換えると、学生時代にスポーツで腰を痛めると、その腰痛は卒業後の半生に影響するか?運動習慣の有無と健康の相関は?スポーツは腰痛の危険因子<sup>79)</sup>か?スポーツ腰痛の抱える大きな問題である。

筆者の塾卒業30年の機に塾全科卒業生の住所録を作製し、その住所録を基に昭和43年度卒業塾員と塾ポート部の協力を得て<sup>79, 80)</sup>、「学生時代のスポーツによる腰の負担が卒業後30年に与える影響についての後向きコホート研究」を行っている。卒業後多くの人がホワイトカラーとして長年勤める集団(塾員)を対照として、腰の負担の多い、従って学生時代はスポーツ腰痛の強かったポート部OBの卒業30年後の腰痛発症率の比較である。これはEBM的興味を引く命題<sup>81)</sup>でもあり、現在統計処理を行っている。結果からは、腰痛を含む運動のも

たらずもの<sup>82, 83)</sup>, 言い換えればスポーツの意義<sup>84)</sup>の一端が垣間見えるようである。

## 謝 辞

本稿は筆者が長年携わってきたスポーツ医学, 中でも腰痛の traumatology ならびに腰痛の原因の解明に繋がるリサーチワークの一端をまとめたものである。ご指導いただいた慶應義塾大学医学部スポーツ・クリニック 竹田 毅助教授, 岩本 潤博士, 慶應義塾大学スポーツ医学研究センター 山崎 元教授, 大西洋平教授その他スタッフの方々に深甚なる謝意を捧げます。

## 文 献

- 1) 若野絃一：スポーツ医学の目的, 三田評論, 897: 44~45, 1988
- 2) 若野絃一：スポーツによる損傷・障害, あいみっく, 9: 10~15, 1988
- 3) 長田夏哉, 若野絃一, 平林尚：大学体育会運動部におけるメディカルチェック（第一報）弓術部員の上肢・腰部障害について, 第9回よこはまスポーツ整形外科フォーラム抄録, 2001
- 4) Cassidy JD, Wedge JH: 腰痛のマネジメント 1 腰痛および脊椎変性の疫学と自然経過, (Kirkaldy-Willis, WH. 監修, 辻 陽雄 監訳), 医学書院, p. 2-11, 1990
- 5) 若野絃一, 山崎 元：ボート選手の腰痛, 臨床スポーツ医学, 7: 205~209, 1992
- 6) 若野絃一, 小林保範, 山崎 元他：野球の外傷の特徴と対策, 臨床スポーツ医学, 7: 21~24, 1990
- 7) 辻 陽雄：外来レベルでの急性・慢性腰痛診断へのアプローチ, 脊椎脊髄, 3: 669~680, 1990
- 8) 若野絃一, 小林保範, 星野達：学生スポーツ選手の関節障害後のスポーツ復帰, 関節外科, 12: 305~314, 1993
- 9) 若野絃一：スポーツ腰痛のリハビリテーション, リハビリテーション医学, 38: 628~630, 2001
- 10) 若野絃一：腰の外傷・障害, スポーツ医学 [基礎と臨床] (日本体力医学会学術委員会 監修), 朝倉書店, p. 344~350, 1998
- 11) 若野絃一：腰痛とスポーツ, 九州スポーツ医・科学会誌, 4: 195~203, 1992
- 12) 若野絃一, 山崎 元：腰痛症とは—その臨床診断—, スポーツ外傷・障害とリハビリテーション (福林 徹編集), 文光堂, p. 54~58, 1994
- 13) 若野絃一, 山崎 元：腰部 病院での診断と治療, アスレチックリハビリテーション〜競技復帰までのプロミラミグ〜 (福林 徹他編集), 南江堂, p. 15~21, 1998
- 14) 若野絃一, 平林 冽：腰痛の画像診断, メディカルコンパニオン, 4: 1141~1145, 1984
- 15) 若野絃一：'99 日本臨床スポーツ医学会学術委員会シンポジウム スポーツ医学と運動療法 腰痛と運動療法, 臨床スポーツ医学, 16: 943~950, 1999
- 16) 若野絃一：腰椎 b. 腰椎分離 (すべり) 症, スポーツ医学における MR 画像の応用—診断と最新の研究—展望を中心に—, 臨床スポーツ医学, 17 (臨時増刊号): 238~242, 2000
- 17) 田島直也, 帖佐悦男：腰のスポーツ外傷・障害に対する診療, 日医雑誌, 130: 425~427, 2003
- 18) 若野絃一, 小林保範, 星野 達：腰部脱出型ヘルニアの術前診断と臨床的意義, 日整会誌, 66: 1992
- 19) Micheli LJ: How I manage low-back pain in athletes. The Physician and Sportsmedicine 21: 183~194, 1993
- 20) 若野絃一：外来診療・小外科マニュアル V, 腹部・腰部腰痛, 坐骨神経痛, 臨床外科, 52 (増刊号): 171~173, 1997
- 21) 加藤真介, 井形高明, 西良浩一：発育期におけるスポーツと腰痛—腰椎分離症と終板障害の病態と治療—, 脊椎脊髄, 13: 496~506, 2000
- 22) Macnab I: Backache 1 Anatomy, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, p. 5, 1977
- 23) 村瀬正昭, 井形高明：スポーツによる成長期腰椎椎体終板の障害, 臨床スポーツ医学, 7: 187~180, 1990
- 24) 阿部 均：アメリカンフットボールおよびラグビー選手の腰痛発生と腰椎 X 線所見, 慶應医学, 74: 317~381, 1997
- 25) 若野絃一：II 部位別・疾患別アスレチック リハビリテーション 腰部の障害に対するリハビリテーション, 整形外科 アスレチック リハビリテーション 実践マニュアル (福林 徹編集), 全日本病院出版会, p. 53~59, 1998
- 26) 若野絃一：4. 腰部椎間板ヘルニア, スポーツ外傷・障害の理学診断 理学療法ガイド, 臨床スポーツ医学, 18 (臨時増刊号): 126~133, 2001
- 27) 土方貞久, 山岸正明：経皮的髄核摘出法について, 東京電力医報, 5: 5~15, 1975
- 28) 若野絃一：事例解説 腰部椎間板ヘルニア, スポーツ外傷・障害の理学診断 理学療法ガイド (臨床スポーツ医学編集委員会 編集), 文光堂, p. 176~184, 2003
- 29) 若野絃一, 平林 冽他：腰痛における心因的要因, 整形・災害外科, 28: 1027~103, 1985
- 30) 若野絃一, 平林 冽：脊椎分離・すべり症, 臨床整形外科, 23: 879~883, 1988
- 31) 岩原寅猪：第 5 章 脊椎分離症および脊椎すべり症の手術, 日本外科手術全書, 同刊行会, p. 217~229, 1961
- 32) 若野絃一：脊椎分離すべり症, スポーツ リハビリテーション プログラム (市川宣恭編集), 文光堂, p. 148~151, 1991
- 33) Iwamoto J, Wakano K, et al: Relationship between radiographic abnormalities of lumbar spine and incidence of low back pain in high school and college football players: A prospective study. Am J Sports Med 32: 781-786, 2004
- 34) Iwamoto J, Takeda T, Wakano K: Returning athletes with severe low back pain and spondylolysis to original sporting activities with conservative treatment. Scand J Med Sci Sports 2004 (in press)
- 35) 平林 冽, 若野絃一他：脊椎分離・すべり症に対する手

- 術的治療の問題点. 整・災害, 2: 379~388, 1983
- 36) 菊地臣一: 腰椎背筋群におけるコンパートメント症候群の病態と治療. リハビリテーション医学, 32: 531~541, 1995
- 37) 若野絃一: スポーツ腰痛の保存療法. 整形外科有痛性疾患保存療法のコツ 下 局所別保存療法のコツ(有痛性腰部・股関節・膝関節・足部疾患)(室田景久・矢部裕編集), 全日本病院出版会, p. 54~56, 2000
- 38) 若野絃一: 部位別スポーツ用装具の実際 4. 腰部. 臨床スポーツ医学, 17: 93~96, 2000
- 39) 若野絃一, 山崎 元, 今井友子他: スポーツ外傷と障害に対する局所冷凍療法の経験. 日整外スポーツ医誌, 10: 393~395, 1991
- 40) 若野絃一, 山崎 元, 大西祥平他: Cryotherapy の作用機序. 体力医学, 40: 969, 1991
- 41) 若野絃一: ワンポイントアドバイス 腹筋の王朝. 臨床スポーツ医学, 13: 412, 1996
- 42) 若野絃一: 腹筋か背筋かー腰痛と運動療法. 整形外科治療のコツと落とし穴(山内 裕雄他編集), 中山書店, p. 140, 1997
- 43) 若野絃一, 山崎 元他: ローイングの動作分析ー腰痛の発生機序についてー. 日整外スポーツ医会誌, 11: 309~302, 1992
- 44) 若野絃一, 山崎 元: スポーツ医学におけるプライマリケア ポート. 臨床スポーツ医学, 12(臨時増刊号): 356~359, 1995
- 45) 若野絃一: スイッチヒッターに腰痛はいない. 整形外科治療のコツと落とし穴(山内裕雄 他編集), 中山書店, p. 112, 1997
- 46) 若野絃一: 部位別野球障害 腰. 野球 障害予防ガイドライン(日本臨床スポーツ医学会整形外科学術部会編集), 文光堂, 東京, p. 109~126, 1998
- 47) 若野絃一, 石橋秀幸, 河崎文恵他: 野球の外傷と障害. 第12回横浜スポーツ整形外科フォーラム抄録集, 40, 2004
- 48) 朝日新聞: リポート けがと高校野球 ⑬腰痛 回転に向かぬ構造. 12月16日号, 1988
- 49) Askinas JK: Relieving golfers' back pain. Pearls. The physician and Sportsmedicine 22: 8, 1994
- 50) 大西祥平, 若野絃一他: 腰痛症に関する筋生理の基礎知識と筋トレーニング対策. 慶應義塾大学スポーツ医学研究センター紀要, 1~12, 1995
- 51) 若野絃一, 長田夏哉: 柔道選手における体幹部の損傷と障害. 臨床スポーツ医学, 19: 247~253, 2002
- 52) 黒木俊政, 田島直也, 樋口潤一: Lumbar disorders of judo players. 日整外スポーツ医誌, 14: 387~340, 1995
- 53) 山路修身, 有馬 亨他: 大学柔道部員における腰部障害. 臨床スポーツ医学, 5: 1015~1918, 1988
- 54) 若野絃一, 小林保範, 山田公男, 他: 大相撲力士の外傷. 日本整形外科スポーツ医学会誌, 16: 63~69, 1989
- 55) 若野絃一, 山田公雄: 力士の脊椎疾患. 臨床スポーツ医学, 16: 139~143, 1999
- 56) 土屋正光, 大西祥平, 若野絃一他: 大相撲力士の膝筋力・体脂肪の現況. 臨床スポーツ医学会誌, 11: 469~475, 2003
- 57) 黄川昭雄他: スポーツ障害予防のための下肢筋力評価. 日本整形外科スポーツ医学会誌, 6: 141~145, 1987
- 58) White AA, Panjabi MM: Clinical Biomechanics of the Spine. JB Lippincott Co, Philadelphia, p. 336, 1978
- 59) 福井康之, 阿部 均, 若野絃一他: 当院における高校ラグビー選手の腰部障害について. 日本整形外科スポーツ医学会誌, 11: 371~373, 1991
- 60) 阿部 均: 競技スポーツと腰痛 ーメディカルチェックにおける疫学調査ー. 脊椎脊髄, 13: 489~495, 2000
- 61) 柳田 洋, 中村好一: 体力科学における疫学研究の意義とその活用. 体力科学, 50: 375~380, 2001
- 62) 若野絃一: 脊椎のバイオメカニクス. 臨床整形外科, 23: 879~884, 1988
- 63) Bradford DS, Oegema YR J, Wakano K., et al: Chymopapain, chemonucleolysis, and nucleus pulposus regeneration. A biochemical and biomechanical study. Spine 9: 135~147, 1984
- 64) 小柳貴裕, 若野絃一, 平林 冽: コラゲナーゼ注入椎間板の生体力学的変化ーキモバインと比較してー. 臨床外, 22: 958~964, 1987
- 65) 高畑武司, 若野絃一, 平林 冽: 腰部椎間板の有限要素法による力学的解析の検討. 整形外科バイオメカニクス, 6: 23~26, 1984
- 66) 名倉武雄, 矢部裕, 若野絃一他: MR画像を用いた大腰筋の3次元モデル解析. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 18: 131~135, 1997
- 67) 名倉武雄, 矢部 裕, 若野絃一他: 有限要素法による腰椎の応力解析ー腰椎周囲筋作用及び椎間板変性による変化についてー. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 19: 27~31, 1998
- 68) Wakano K, Tsuji S, et al: The resistance training on back muscles in athletes-Preliminary report-. The 2nd Japan-Korea Joint Meeting of Orthopaedic Sports Medicine (Yokohama), 1992
- 69) 若野絃一: 水中歩き. 安心, 9: 184~185, 1999
- 70) 大西祥平, 高畑武司: 腰痛の運動療法の新しいアプローチとその効果判定について. (連載) 臨床スポーツ医学, 13(7)~14(2), 1996
- 71) 若野絃一: 筋肉痛や関節痛の対策. スポーツ医学のすすめ II Action(山崎 元監修). 慶應義塾大学出版会株式会社, p. 166~182, 1997
- 72) Smidt G, Lehmann T, et al: Assessment of abdominal and back extensor function A quantitative approach and results for chronic low-back patient. Spine 8: 211~219, 1983
- 73) White AH: Back school. Instructonal Course Lectures 18: 184~189, 1979
- 74) 若野絃一: 慶應腰痛学校. 慶應医学, 61: 89, 1984
- 75) Lee C, Wakano K, et al: On special analysis of lumbar muscles electromyogram in patients with low-back pain during dynamic trunk exercise. Neuro-Orthopedics 20: 121~132, 1997
- 76) Lee CG, 若野絃一, 大西祥平他: 筋電図解析による腰椎起立筋の疲労と腰痛に関する研究. 臨床スポーツ医学, 15: 653~656, 1998

- 77) 若野絏一, 今本雅彦, Lee CG 他: 脊柱の動きと腰椎起立筋 - 筋電図学的検討 -. 臨床スポーツ医学, 13: 435~438, 1996
- 78) 若野絏一: ゴールドスタンダード整形外科 薬物療法と運動・理学療法 III (落合直之他編集), 疾患別各論 A. 脊椎, 6 いわゆる腰痛症: 252~257, 南江堂, 2003
- 79) 片岡嗣和, 若野絏一, 大西洋平: スポーツ活動と腰痛発生に関する疫学調査. 第12回日本臨床スポーツ医学会学術集会抄録, 2001
- 80) 若野絏一: Researchers Eye スポーツと腰痛. 三田評論, 1046: 45, 2002
- 81) 白井康正, 宮本雅史, 伊藤博元: EBM に基づいた治療の進め方 17 急性腰痛症. 日医雑誌, 127: EB 66~68, 2002
- 82) 市川宣恭他: スポーツマンの腰痛とその対策. 腰痛のスポーツ医学 (柄田幸徳編). 朝倉書店. P. 103~119, 1984
- 83) 大井淑雄, 渋谷 聡: スポーツによる腰痛の保存療法. 臨床スポーツ医学, 8: 773~779, 1986
- 84) Picavet HSJ, Schuit AJ: Physical inactivity: a risk factor for low back pain in the general population? J of Epidemiology and Community Health 57: 517~518, 2003
-

講 座

成人 T 細胞性白血病ウイルス：国際比較疫学から病態機序を探る

米国立衛生研究所がんセンター遺伝疫学部門

ひさ だ みち え  
久 田 充 絵

Viral Epidemiology Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute,  
National Institutes of Health, The United States Department of Health and Human Services

Key Words : human T-lymphotropic virus type I, adult T-cell leukemia/lymphoma, HTLV-I-associated  
myelopathy, epidemiology, international comparison

はじめに

ヒト T 細胞性白血病ウイルス (Human T-cell lymphotropic virus type I, HTLV-I) は本邦で主に四国、九州、沖縄に流行するレトロウイルスで、国外ではカリブ海、西アフリカ、南米、オセアニアにも感染地が存在する。母集団内でのウイルス伝播と関連疾患発症の実態は、1980年代来西日本とカリブ海で施行されてきたコホート研究により、次第に明らかになって来た。本稿では HTLV-I の自然史を概説し、著者らによる最新の研究の一部を紹介すると共に、分子マーカーを用いた国際比較疫学が病態機序の解明に果たす役割について言及する。

国際疫学と悪性腫瘍関連ウイルス

悪性腫瘍の罹患率は民族によって、また同一民族でも居住地によって異なることが知られている。例えば、欧米に移住した日本人の胃癌の発症率は先住の欧米人よりは著明に高いが、在日邦人よりは低くなる<sup>1)</sup>。悪性腫瘍の発症が遺伝と環境の両方によって決定するとされる所はここにある。ウイルス感染関連悪性腫瘍もこの例にもれないが、その発症機序には、感染株の病原性の地域的な違いも貢献すると考えられ、さらに複雑な様相を呈することが多い。

ウイルス関連悪性腫瘍は、癌全体のほぼ 20% を占め

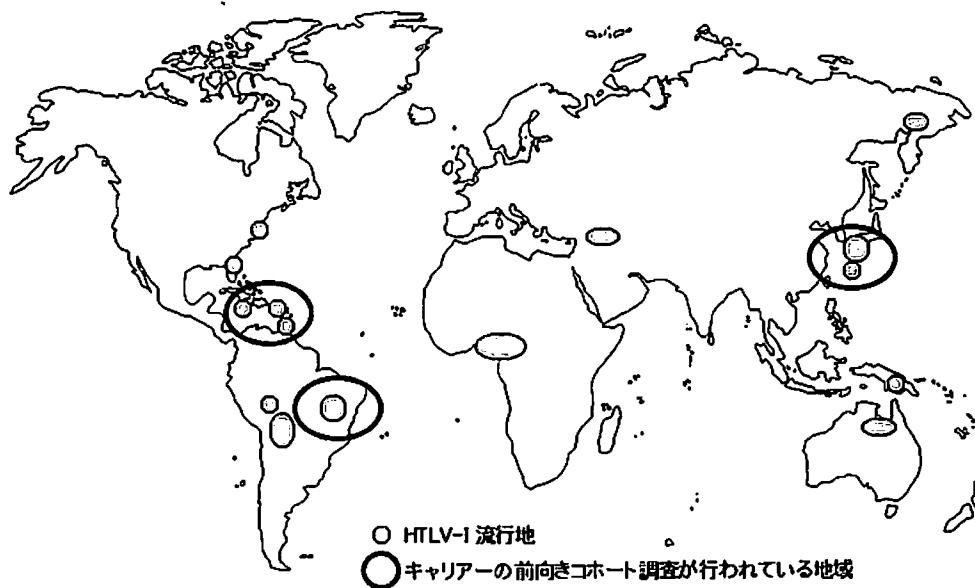
るといわれる<sup>2)</sup>。2004年8月現在、International Agency for Research on Cancer によって腫瘍関連ウイルスに認定されているのは Epstein-Barr virus (EBV)、エイズウイルス (HIV)、HTLV-I、ヒトパピローマウイルス (HPV)、B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV) で、さらにカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV または HHV-8) が加えられる可能性がある<sup>3-6)</sup>。これらは主に検出技術の進歩に伴い 1980 年代以降に発見されたウイルスで、今後も新たな腫瘍関連ウイルスが発見される可能性は高い。また、感染性の起源が疑われながら原因が同定されていない腫瘍に既知のウイルスが関与している可能性もある。腫瘍関連ウイルスは単に発癌の必要条件としての直接的役割のみならず、他の因子との干渉作用による間接的役割も果たしうる。ウイルス抗原を標的としたワクチンの開発などによる一次予防が理論上可能である点で、ウイルス関連悪性腫瘍は予防医学上異色な位置を占めている。

HTLV-I

HTLV-I が腫瘍関連ウイルスの疫学モデルとして適する理由は、ウイルス構造が単純であること、感染が機序の異なる複数の疾患を誘発する (Pleiotropism) こと、また 80 年代から南西日本とカリブ海で追跡調査されている感染者のコホートが、疫学的比較対照研究に必要な土壌を提供していることの 3 つが挙げられる。HTLV-I

本稿の内容は Public Health Service grant 2R01-CA38450 並びに National Cancer Institute Research Contract N01-CP-40548 による研究の一部で、その主旨は国際レトロウイルス学会 (2001 年ダブリン、2003 年サンフランシスコ) で発表した。著者は宮崎コホートと NCI-HTLV プログラムに貢献した共同研究者各位 [註 1] に深謝する。





第1図 HTLV-Iの地理的分布

は1980年に日米の研究者によって相次いで発見・分離された最初のヒト発癌性レトロウイルスである<sup>7, 8)</sup>。CD4, CD25陽性Tリンパ球の悪性腫瘍である成人T細胞性白血病 (adult T-cell leukemia, ATL) と慢性進行性のHTLV-I関連脊髄症 (HTLV-I-associated myelopathy, HAM/TSP) の原因で<sup>9, 10)</sup>、近年ではこの他にぶどう膜炎 (HTLV-I-associated uveitis, HU) や小児の感染性皮膚炎 (infective dermatitis, ID) 等、各種の免疫学的疾患にも関連していることが明らかになった<sup>4, 11, 12)</sup>。これらの疾患の生涯罹患率は感染者のうち5%未満であるとされる<sup>4)</sup>。長期感染者ではツ反の陰性化や日和見感染など、細胞性免疫の低下がしばしば認められるが<sup>13-15)</sup>、HIV感染と比べると免疫抑制は緩和である。主感染経路は乳幼児期には授乳を通じた母子感染、大人では性感染である。細胞成分を含む輸血による感染は、献血者のHTLV-I抗体スクリーニングで現在ではほぼ消滅した<sup>4)</sup>。

#### 流行地の分布と感染経路

HTLV-I感染者は全世界で1500~2000万人いると推定される。その地理的分布を第1図に示した。抗体保有率は一般に若年者より高齢者、また男性より女性で高い。本邦では九州の一部で地域人口の30パーセント近くが抗体陽性であった集落が報告されている<sup>16)</sup>。カリブ海諸国での抗体保有率は平均3~5%程度、高齢者では

約10~15%に及ぶ。その他の地域での抗体保有率はさらに低い<sup>4)</sup>。このような微小蔓延地域の分布はウイルスの伝播率と母集団内での再生産率が低いこと、また家族内伝播が存在することを反映していると思われる<sup>17)</sup>。

#### 分子構造とトロピズム

HTLV-Iは主にCD4陽性細胞に感染し、宿主ゲノムに挿入されて「プロウイルス」となる<sup>18)</sup>。約9kbのゲノムには両端にLong terminal repeats (LTR)、その間に構造遺伝子 (*gag, env*)、逆転写酵素遺伝子 (*pol*) と調節遺伝子 (*tax, rex*) が配列している<sup>19)</sup>。Tax調節遺伝子は、細胞分裂サイクル、宿主遺伝子発現、ウイルス複写増殖 (replication) などを幅広く制御する<sup>19, 20)</sup>。HTLV-I自体には癌遺伝子 (oncogene) の配列がなく、ATL細胞でも特定のウイルス挿入部位がないことから、*tax* が癌遺伝子の役割を果たすと考えられている。

#### 感染と疾患発症のマーカー

HTLV-I感染は血清反応でウイルス抗原蛋白に対する抗体を検出することで診断する。ウイルス構造遺伝子蛋白に対する抗体価、Tax調節蛋白に対する抗体の検出は、ともに宿主内で複写増殖によってウイルス蛋白の発現が持続していることを示唆する。一般に抗体価とプロウイルス量には強い正の相関関係があるが<sup>21, 22)</sup>、母集団に

おける HTLV-I の遺伝子配列の突然変異率が一世紀あたりわずか 0.1%程度と極めて低いことから<sup>23)</sup>、プロウイルス量は、エラー確率が高い逆転写 (reverse transcription) ではなく、むしろ有糸分裂によるクローン性の分裂拡張に依存して決定されていると考えられている<sup>24, 25)</sup>。生体内ではプロウイルスを含め宿主遺伝子に突然変異が比較的高頻度で起こるが<sup>26)</sup>、母集団全体として見かけ上ウイルスの遺伝子配列が非常に安定しているのは、変異していないウイルスに感染した細胞が選択的に増殖・伝播していると仮定すると説明がつく。

ATL のように潜伏期間が長く罹患率の低い疾患を対象とする疫学研究では、生物学的マーカーを中間指標として用いることが多い。中でもプロウイルス量、HTLV-I 抗体価、Tax 調節蛋白に対する抗体の三つは大量測定が比較的簡単に行えるためしばしば用いられる。プロウイルス量は、これまでのことろ ATL と HAM/TSP の発症を最も忠実に反映する指標であるとされているが、ATL が感染細胞の明らかな単クローン性拡張であるのに対し、HAM/TSP はウイルス抗原に対する宿主の免疫反応過剰を特徴とする多クローン性の疾患であることから、各疾患の発症にいたる複雑な過程はプロウイルス量の測定だけでは正確に予測できないことが容易に推察できる。

ATL の発症に Tax が主要な働きを果たす一方、すでに悪性細胞となったクローンは Tax の活性に依存しなくなるといわれている<sup>27)</sup>。この仮説を裏付ける証拠として、ATL 患者では通常プロウイルス量と抗体価は高いが、抗 Tax 抗体を持たないことが多く<sup>28)</sup>、Tax 遺伝子のメッセンジャー RNA の発現も低いことが挙げられる。また HTLV-I 特有の細胞障害性リンパ球免疫 (cytotoxic T-lymphocyte mediated immunity, CTL) は主に Tax 蛋白が標的であるため、CTL が低い宿主では ATL 細胞が免疫サバイランスによって破壊されず長期生存し、発癌に必要な他の遺伝子変異が蓄積しやすくなる<sup>26)</sup>。一方、HAM/TSP 患者ではプロウイルス量、抗体価が共に高いのに加え、Tax 抗体保有率と Tax 特異的 CTL も高いことが ATL と異なる特徴とされる<sup>29, 30)</sup>。

### 関連疾患

ATL は母子感染後数十年の潜伏期を経て成人期に発症する<sup>4)</sup>。結節・紅斑などの皮膚症状を伴うことが多く、皮膚病変の生検上、白血球細胞の組織浸潤がみられる。末梢血には白血球の核が切れ込んだ「花びら細胞」(flower cells) と呼ばれる特徴的な異常リンパ球がみら

れる。異常リンパ球はしかし、ATL の患者だけではなく HAM/TSP の患者や、無症候性感染者の末梢血でも低頻度だけ見られることがある。日本人無症候性感染者では実に三人に一人がこのような異常リンパ球を 0.6%以上 (500 白血球中 3 個以上) 持っていた<sup>31)</sup>。一方、HAM/TSP は潜伏期が短かく、輸血や性感染によって成人になって感染した者に数ヶ月から数年の潜伏期で発症する。症状は主に錐体路障害だが、感覚路異常も起こりうる。三大徴候は痙性麻痺、失禁、筋力の低下で、症状は慢性進行性である。ID は小児 HTLV-I 感染症で、後耳介部や尾翼周辺部のブドウ球菌や連鎖球菌の感染を伴った皮膚病変を主徴とする。皮膚病変は抗生物質に反応するが、治療を中断すると頑固に再発する。症状は思春期までには寛解する。ぶどう膜炎は成人と小児のいずれにも報告がある。小児で発症した症例が成人期まで増悪、寛解を繰り返しながら継続するかについては議論の余地がある。

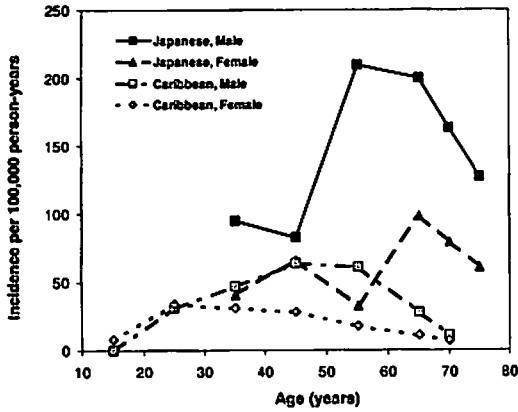
### 関連疾患の国際比較疫学

HTLV-I 関連疾患の疫学には本邦とカリブ海の母集団で明らかな相違がある。高プロウイルス量、特にウイルスコピー数が全末梢単核球中 5%以上の感染者はカリブ海母集団では感染者全体の 20-25%、日本の母集団では 5-10%と報告されている。第 2 図に日本とカリブ海に於ける ATL と HAM/TSP の年齢・性別罹患率を示した<sup>32-35)</sup>。ATL 罹患率は日本人で人口 10 万人あたり 86 で 60 歳代の発症が最も多く、また男性で 3 倍高い<sup>36, 37)</sup>。カリブ海では人口 10 万人あたり 20 で、40 歳代に発症のピークがあり、明らかな男女差がない<sup>38)</sup>。一方 HAM/TSP 罹患率は日本人で 10 万人あたり 3、カリブ海で 10 万人あたり 20 と、後者では 10 倍高い。HAM/TSP は両母集団とも女性で頻度が高い。ID はジャマイカ、ブラジル、アフリカなどの熱帯地域の小児感染者ではごく一般的に見受けられるが、日本では殆ど報告がない。

両母集団で感染ウイルス株に殆ど差がないため<sup>19)</sup>、疾患罹患率の違いは感染株の病原性の違いではなく、概ね宿主因子によるものと考えられている。初期感染時の年齢、感染経路、ウイルス暴露量、基礎疾患、栄養状態、社会環境、さらには遺伝的背景などが複雑に貢献しているものと予測される。

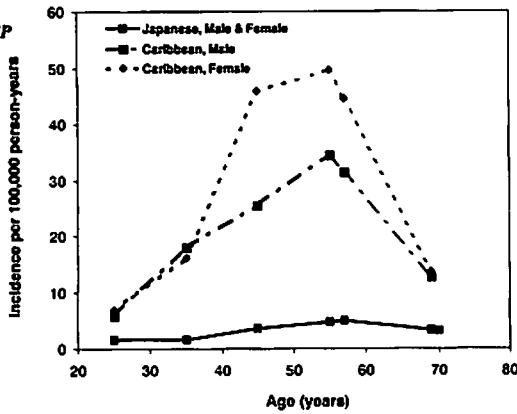
最近我々は、母集団による HTLV-I 関連疾患罹患率の違いが、生物学的中間マーカーのパターンの違いに反映しているという仮説を検証するため、日本とカリブ海

ATL



<sup>1</sup> (Kondo et al., 1989). <sup>2</sup> Jamaica & Trinidad/Tobago (Murphy et al., 1989).

HAM/TSP



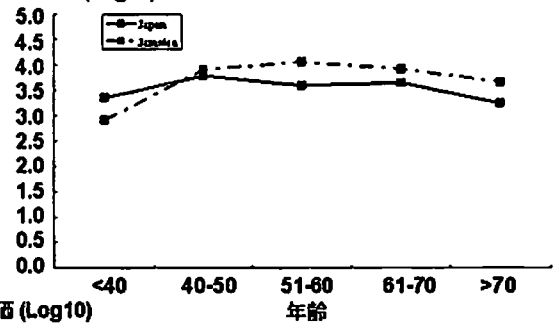
<sup>1</sup> (Kaplan et al., 1990). <sup>2</sup> Jamaica & Trinidad/Tobago (Maloney et al., 1998).

第2図 日本とカリブ海における HTLV-I 感染者の年齢、性別成人 T 細胞性白血病 (ATL) と HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) 罹患率 [註 4]

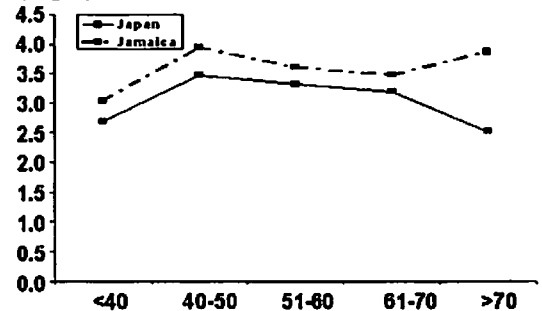
の両母集団から年齢・性を調整して選んだ感染者 51 ペア 102 名 (日本人 51 名 [註 2], ジャマイカ人 51 名 [註 3]) について, 血清と凍結保存リンパ球内のウイルスマーカーを分析した (第 3 図)。ELISA で測定した抗体価は, ジャマイカ人で平均 1 : 28,800 (1 : 6 ~ 1 : 390,625) に対して日本人では平均 1 : 7,290 (1 : 18 ~ 1 : 108,030) と前者で有意に高いことがわかった ( $P=0.03$ )。抗 Tax 抗体の検出も<sup>39)</sup>40 歳未満をのぞく各年齢群でジャマイカ人の方が日本人よりも高く, 全体では 59% 対 39% であった ( $P=0.002$ )。リアルタイム PCR で測定した<sup>40)</sup>末梢リンパ球中のプロウイルス量は, 対象者 102 名中 96 名 (94%) で検出されたが, その平均値には両母集団で有意差がなかった ( $P=0.26$ )。

ウイルスマーカー間の相関を母集団別に調べると, プ

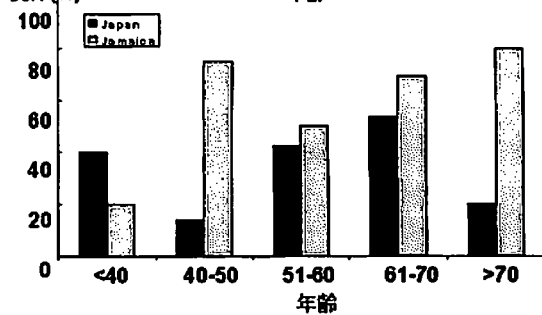
プロウイルス量(Log10)



抗体価 (Log10)



抗Tax抗体(%)



第3図 年齢, コホート別 HTLV-I プロウイルス量, 抗体価, 抗 Tax 抗体の分布 [註 4]

ロウイルス量と抗体価の相関と抗体価と抗 Tax 抗体陽性率との相関は共にジャマイカ人感染者で強かった ( $P=0.02$ ,  $P=0.06$ )。線形モデルを用いた多変数解析でプロウイルス量と年齢, 性別, 母集団との関連を調べると (第 1 表 A), 母集団でプロウイルス量に有意差がないことが定量的に示された ( $\beta = -0.19 \log_{10}$ , 95% CI  $-0.60-0.22$ )。また, 年齢によるプロウイルス量の変化は日本人よりジャマイカ人で顕著であった。ジャマイカ人で 50 歳代にプロウイルス量ピークがある点は, この母集団で HAM/TSP 罹患率がこの年齢群で最も高いことと一致しており (第 2 図, 第 3 図), プロウイルス量が HAM/TSP のリスクを反映するという臨床報告とも矛盾しない<sup>41)</sup>。一方同じく年齢と性を調整した線形モデルで比較した抗体価はやはり日本人で有意に低いことが

第1表 年齢・性別・対象集団が HTLV-I プロウイルス量と抗体価に与える影響：線形モデルによる日本人とジャマイカ人 HTLV-I 感染者 51 ペア 102 人の解析

| A. プロウイルス量 |                    |                    |                   |
|------------|--------------------|--------------------|-------------------|
|            | 全対象者               | 日本人                | ジャマイカ人            |
| 年齢         |                    |                    |                   |
| 51-60 才    | 0.43 (-0.16-1.02)  | 0.14 (-0.60-0.89)  | 0.84 (-0.16-1.85) |
| 61-70 才    | 0.37 (-0.24-1.00)  | 0.15 (-0.63-0.93)  | 0.74 (-0.33-1.81) |
| >70 才      | 0.07 (-0.69-0.82)  | -0.21 (-1.19-0.76) | 0.46 (-0.77-1.69) |
| 男性         | 0.04 (-0.53-0.61)  | -0.02 (-0.77-0.74) | 0.18 (-0.74-1.09) |
| 日本人        | -0.19 (-0.60-0.22) | -                  | -                 |
| B. 抗体価     |                    |                    |                   |
| 変数         | 全対象者               | 日本人                | ジャマイカ人            |
| 年齢         |                    |                    |                   |
| 51-60 才    | 0.12 (-0.42-0.66)  | 0.18 (-0.44-0.80)  | 0.10 (-0.86-1.06) |
| 61-70 才    | 0.11 (-0.46-0.68)  | 0.10 (-0.55-0.75)  | 0.14 (-0.88-1.15) |
| >70 才      | -0.28 (-0.96-0.40) | -0.60 (-1.41-0.22) | 0.06 (-1.12-1.23) |
| 男性         | 0.13 (-0.38-0.65)  | 0.05 (-0.57-0.68)  | 0.22 (-0.65-1.09) |
| 日本人        | -0.43 (-0.80-0.06) | -                  | -                 |

\*推定値  $\beta$  (95%信頼区間) は HTLV-I プロウイルス量または抗体価の変化を示す。標準カテゴリーは 50 才以下、女性、ジャマイカ人とし、モデルは表内に示された全変数を調整した。年齢はカテゴリー変数 (<50, 51-60, 61-70, 70+才)として扱った。抗体価とプロウイルス量 [10<sup>5</sup>細胞あたりのコピー数] は log<sub>10</sub> 変換し、検出限界以下のプロウイルス量 (10<sup>5</sup>細胞あたり 10 コピー未満) は 0 とみなした。抗 Tax 抗体検出は陽性または陰性で判定。

示された ( $\beta = -0.43 \log_{10}$ , 95%信頼区間 -0.80 - -0.06) (第1表 B)。また、70 歳以上の日本人感染者で抗体価に有意な低下が見られた。年齢による抗体価低下の理由は明らかではない。

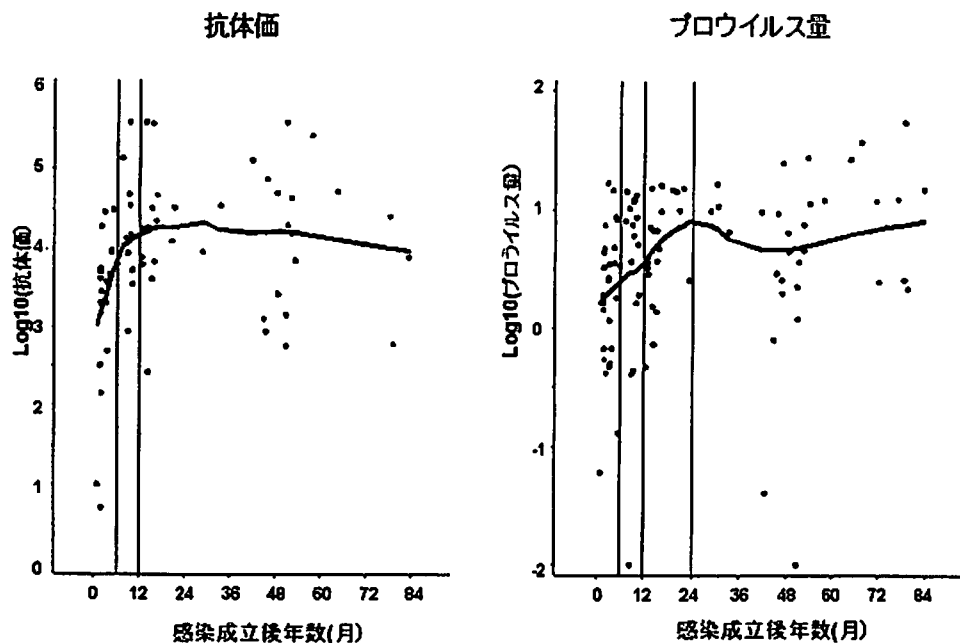
## 考 察

プロウイルス量は生体内でウイルス複写増殖と感染細胞クローン拡張の二つの機序で規定されると考えられる。宿主の遺伝的要因や環境因子がこの二つ機序のバランスに影響する。カリブ海母集団でみられるプロウイルス量と HTLV-I 抗体反応との強い相関関係は宿主内での活発な複写増殖とそれにとまなうウイルス抗原抗体反応が持続的に起こっていることを示す。この集団で HAM/TSP の罹患率が高く、抗体価とプロウイルス量に強い正の相関関係があること、また *in vitro* の実験で HAM/TSP 患者に強い *tax* mRNA の発現がみられることは、HAM/TSP の発症背景にウイルスの複写増殖と HTLV-I 抗原に対する宿主の強い免疫反応があることを示唆している。CTL の高いこの母集団では、CTL が感染細胞を攻撃し破壊する際ウイルスが細胞外に出て、これに対して抗体が産生されるため、抗体価、抗 Tax 抗

体保有率が持続的に高くなる。逆に ATL 罹患率の高い日本人母集団でプロウイルス量に比較して抗体反応が弱い感染者がいること、また *in vitro* で ATL 患者に *tax* mRNA 発現の欠落がしばしば報告されていることは、ATL の病態背景が主に感染細胞の有糸分裂による単クローン性の拡張であることを予想させる。40 歳以下のジャマイカ人で抗 Tax 抗体保有率が予想外に低かったことは (第3図)、この母集団で 40 歳以下の若年 ATL が多く見られることと「高プロウイルス量、高抗体価、抗 Tax 抗体の欠如」が ATL 発症マーカーであるという以前の我々のデータ<sup>28)</sup>と一致して興味深い。

## 今後の展望

今後の課題は HTLV-I の発症予測モデルに他のマーカーを加え、ATL と HAM/TSP の発症機序をより明確にすることである。宿主の血清・DNA を用いて免疫、代謝、サイトカイン関連遺伝子の発現や遺伝子多型、また他の分子疫学マーカーを測定することが望ましい。著者らは現在、母集団間で Th1・Th2 サイトカイン関連免疫マーカーの比較を試みている。さらに Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time-of-



第4図 母子感染したジャマイカ人28人における抗体価とプロウイルス量の経時的変化

Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) を用い、カリブ海母集団に発症した ATL 患者、HAM 患者、健康人に於ける蛋白発現パターンを比較分析中である<sup>42)</sup>。ATL に特徴的な蛋白のピークの特性が近々明らかにされることが期待される。

さらに無症候性感染者については、各母集団で HTLV-I 感染細胞クローンの数と多様性、Tax 遺伝子の発現 (mRNA) を経時的に比べるのも一案である。母子感染したジャマイカ人小児 28 人について抗体価とプロウイルス量の経時的変化を追跡すると、抗体価は感染成立後 12 ヶ月上昇を続けた後一定レベルに達して安定するが、プロウイルス量は感染後 24 ヶ月にわたって上昇を続け、初期ピークを見た後、数年後から再び上昇することがわかる (第4図)。また IL-PCR を用いて観察した小児感染者の HTLV-I クローンの増殖の経時変化では、感染後わずか 10 年未満で単クローン又は多クローン性の増殖が出現することがわかった。プロウイルス量が 2.2% から 8.3% に漸増すると共に単クローン性の強い増殖が見られたジャマイカ人小児例では 2 歳で脂漏性皮膚炎を併発した他、リンパ節腫脹・異常リンパ球出現を繰り返しており、将来 ATL の発症が懸念される。ジャマイカ人で若年発症の ATL が稀ではないことを考慮すると、若年者におけるクローンの発現はきわめて興味深い現象である。また、母子感染と成人感染では、

異物抗原である HTLV-I に対する宿主免疫反応が異なる可能性もあり、成人感染後、ウイルスマーカーやクローンの増殖に小児期同様な経時変化がみられるかどうかにも興味を持たれる<sup>43, 44)</sup>。また、糞線虫 (*S. stercoralis*) などの寄生虫感染が、HTLV-I 感染細胞クローンの分裂を促してプロウイルス量の増加につながることが報告されている<sup>15)</sup>。寄生虫感染が熱帯地方で HTLV-I 感染の経過におよぼす影響についても検討が必要である。

#### おわりに

発癌レトロウイルス HTLV-I の疫学について、感染の伝播と関連疾患の発症の自然史を概説した。HTLV-I の病態機序の解明は感染者の罹患予測や、予防的治療対象者を選定するために重要な課題である。罹患率推定のために提唱された「自然史モデル」を今後さらに充実したものに拡張するためには各母集団からの比較データを的確に解析する疫学的手法と、臨床医学・分子生物学・免疫学・ウイルス学さらには民族学を総合した柔軟な立場から仮説にアプローチするため、綿密な共同研究計画が必要不可欠である。

註1: 共同研究者一覧 (敬称略) - Nancey E. Mueller (Harvard University), Sherri O. Stuver (Boston

University), 岡山昭彦 (宮崎大学), Hongchuan Li (National Cancer Institute), 澤田高志 (エイザイツクばラボラトリー), Barrie Hanchard (University of the West Indies).

註2：日本人対象者は宮崎コホート研究参加者より選んだ。宮崎コホートは1984年にHTLV-Iの自然史調査を目的として設立された前向きコホートで<sup>16)</sup>、宮崎県2市町村在住の40歳以上を対象に地方自治体が無料で施行している定期健診に参加した住民のうち、定期的な質問表、身体検査、採血を承諾した住民(全人口の約60%)を対象とし、2000年11月まで追跡調査した。対象者の27%がHTLV-I感染者であった。

註3：ジャマイカ人対象者はNCIのフードハンドラー(食品取り扱い業者)コホート研究参加者から選んだ。1985年3月から1986年5月にかけてジャマイカ全土で食品取り扱い免許を申請した11歳から83歳までの計13260名を対象に行った血清調査を出発点とし、1994年までに一部参加者に対し質問表と採血による計2回の追跡調査を行った<sup>45-47)</sup>。HTLV-I感染率は3-5%であった。

註4：第2図の一部はMueller NE, Birman BM, Parsonnet J, Shiffman M, Stuver SO. Infectious Agents. In: Shottenfeld D, Fraumeni JF, Jr., eds. Cancer Epidemiology and Prevention, 3rd edition, 2004よりOxford University Pressの許可を得て転載。表1、第3図はHisada M, Stuver SO, Okayama A, Li Hong-Chuan, Sawada T, Hanchard B, Mueller NE. A Persistent Paradox of HTLV-I Natural History: Parallel Analyses of Japanese and Jamaican Carriers. J Infect Dis, 190 (November 1), 2004よりUniversity of Chicago Pressの許可を得て転載。

#### 文 献

- 1) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Schistosomes, Liver Flukes, and Helicobacter Pylori. Vol. 61, (Ed) International Agency for Research on Cancer, IARC, Lyon (France), p. 177-240, 1994
- 2) Pisani P, Parkin DM, Munoz N, Ferlay J: Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 6: 387-400, 1997
- 3) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Vol. 67, (Ed) International Agency for Research on Cancer, IARC, Lyon (France), p. 1-524, 1997
- 4) Manns A, Hisada M, La Grenade L: Human T-lymphotropic virus type I infection. Lancet 353: 1951-1958, 1999
- 5) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human Papilloma Viruses. Vol. 64, (Ed) International Agency for Research on Cancer, IARC, Lyon (France), p. 1-409, 1995
- 6) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Hepatitis Viruses. Vol. 59, (Ed) International Agency for Research on Cancer, IARC, Lyon (France), p. 1-253, 1994
- 7) Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 77: 7415-7419, 1980
- 8) Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraiishi Y, et al: Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T-cells. Nature 294: 770-771, 1981
- 9) Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al: Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet 2: 407-410, 1985
- 10) Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al: HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet 1: 1031-1032, 1986
- 11) LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W: Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. Lancet 336: 1345-1347, 1990
- 12) Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, et al: HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. Jpn J Cancer Res 83: 236-239, 1992
- 13) Tachibana N, Okayama A, Ishizaki J, Yokota T, Shishime E, Murai K, et al: Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. Int J Cancer 42: 829-831, 1988
- 14) Murai K, Tachibana N, Shioiri S, Shishime E, Okayama A, Ishizaki J, et al: Suppression of delayed-type hypersensitivity to PPD and PHA in elderly HTLV-I carriers. J Acquir Immune Defic Syndr 3: 1006-1009, 1990
- 15) Mortreux F, Gabet AS, Wattel E. Molecular and cellular aspects of HTLV-I associated leukemogenesis *in vivo*. Leukemia 17: 26-38, 2003
- 16) Mueller N, Okayama A, Stuver S, Tachibana N: Findings from the Miyazaki cohort study. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 13 (Suppl 1): S2-S7, 1996

- 17) Stuver SO, Tachibana N, Okayama A, Romano F, Yokota T, Mueller N : Determinants of HTLV-1 seroprevalence in Miyazaki Prefecture, Japan : a cross-sectional study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5 : 12-18, 1992
- 18) Cann AJ, Chen ISY : Human T-cell leukemia virus type I and II. *Fields Virology* (Ed) Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Philadelphia (PA) : Lippincott Raven p. 1849-1880, 1996
- 19) Johnson JM, Harrod R, Franchini G : Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukemia-lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int J Exp Path* 82 : 135-147, 2001
- 20) Jeang K-T : Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein : cellular signaling through NF-kappa B. *Cytokine Growth Factor Reviews* 12 : 207-217, 2001
- 21) Ishihara S, Okayama A, Stuver S, Horinouchi H, Shioiri S, Murai K, et al : Association of HTLV-I antibody profile of asymptomatic carriers with proviral DNA levels of peripheral blood mononuclear cells. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7 : 199-203, 1994
- 22) Shioiri S, Tachibana N, Okayama A, Ishihara S, Tsuda K, Essex M, et al : Analysis of anti-Tax antibody of HTLV-I carriers in an endemic area in Japan. *Int J Cancer* 53 : 1-4, 1993
- 23) Gessain A, Gallo RC, Franchini G : Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift *in vivo* as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* 66 : 2288-2295, 1992
- 24) Furukawa Y, Fujisawa J, Osame M, Toita M, Sonoda S, Kubota R, et al : Frequent clonal proliferation of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1)-infected T cells in HTLV-1-associated myelopathy (HAM-TSP). *Blood* 60 : 1012-1016, 1992
- 25) Wattel E, Vartanian J-P, Pannetier C, Wain-Hobson S : Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 69 : 2863-2868, 1995
- 26) Mortreux F, Lechercq I, Gabet A-S, Leroy A, Westhof E, Gessain A, et al : Somatic mutation in human T-cell leukemia virus type I provirus and flanking cellular sequences during clonal expansion *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst* 93 : 367-377, 2001
- 27) Hisada M, Okayama A, Shioiro S, Spiegelman DL, Stuver SO, Mueller NE : Risk factors for adult T-cell leukemia among carriers of human T-lymphotropic virus type I. *Blood* 92 : 3557-3561, 1998
- 28) Yokota T, Cho MJ, Tachibana N, McLane MF, Takatsuki K, Lee TH, et al : The prevalence of antibody to p42 of HTLV-I among ATLL patients in comparison with healthy carriers in Japan. *Int J Cancer* 43 : 970-974, 1989
- 29) Kubota R, Nagai M, Kawanishi T, Osame M, Jacobson S : Increased HTLV type I tax specific CD8+ cells in HTLV type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis : correlation with HTLV type I proviral load. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16 : 1705-1709, 2000
- 30) Nagai M, Kubota R, Greten TF, Schneck JP, Leist TP, Jacobson S : Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax 11-19-specific memory and effector CD8+ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis : Correlation with HTLV-I provirus load. *J Infect Dis* 183 : 197-205, 2001
- 31) Hisada M, Okayama A, Tachibana N, Stuver SO, Spiegelman DL, Tsubouchi H, et al : Predictors of level of circulating abnormal lymphocytes among human T-lymphotropic virus type I carriers in Japan. *Int J Cancer* 77 : 188-192, 1998
- 32) Kondo T, Kono H, Miyamoto N, Yoshida R, Toki H, Matsumoto I, et al : Age- and sex-specific cumulative rate and risk of ATLL for HTLV-I carriers. *Int J Cancer* 43 : 1061-1064, 1989
- 33) Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, et al : The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3 : 1096-1101, 1990
- 34) Murphy EL, Hanchard B, Figueroa JP, Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M, et al : Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* 43 : 250-253, 1989
- 35) Maloney EM, Cleghorn FR, Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Cranston B, Jack N, et al : Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17 : 167-170, 1998
- 36) Hisada M, Okayama A, Spiegelman D, Stuver S, Mueller N : Sex-specific mortality from adult T-cell leukemia/lymphoma among carriers of human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* 91 : 497-499, 2001
- 37) Arisawa K, Soda M, Endo S, Kurokawa K, Katamine S, Shimokawa I, et al : Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin's lymphoma incidence in southwestern Japan. *Int J Cancer* 85 : 319-324, 2000
- 38) Cleghorn FR, Manns A, Falk R, Hartge P, Hanchard B, Jack N, et al : Effect of human T-lymphotropic virus type I infection on non-Hodgkin's lymphoma incidence. *J Natl Cancer Inst* 87 : 1009-1014, 1995
- 39) Sawada T, Tohmatsu J, Obara T, Koide A, Kamihira S, Ichimaru M, et al : High risk of mother-to-child transmission of HTLV-I in p40<sup>ant</sup> antibody-positive mothers. *Jpn J Cancer Res* 80 : 506-508, 1989

- 40) Manns A, Miley WJ, Wilks RJ, Morgan OS, Hanchard B, Wharfe G, et al : Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. *J Infect Dis* 180 : 1487-1493, 1999
- 41) Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Goto I, Yamamoto N, et al : Increased HTLV-I proviral DNA in HTLV-I-associated myelopathy : a quantitative polymerase chain reaction study. *Ann Neurol* 29 : 194-201, 1991
- 42) Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, et al : Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 62 : 3609-3614, 2002
- 43) Okayama A, Stuver S, Iga M, Okamoto M, Mueller N, Matsuoka M, et al : Sequential change of virus markers in seroconverters with community-acquired infection of human T lymphotropic virus type I. *J Infect Dis* 183 : 1031-1037, 2001
- 44) Etoh K, Tamiya S, Yamaguchi K, Okayama A, Tsubouchi H, Ideta T, et al : Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells *in vivo*. *Cancer Res* 57 : 4862-4867, 1997
- 45) Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Holding-Cobham M, Cranston B, Malley K, et al : Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am J Epidemiol* 133 : 1114-1124, 1991
- 46) Murphy EL, Wilks R, Hanchard B, Cranston B, Figueroa JP, Gibbs WN, et al : A case-control study of risk factors for seropositivity to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica. *Int J Epidemiol* 25 : 1083-1089, 1996
- 47) Van Veldhuisen PC, Walters M, Sawada T, Levine PH, Wilks R, Hanchard B, et al : Seroincidence of HTLV-I infection and characterization of seroconverters in Jamaican food handlers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33 : 387-392, 2003
-



講 座

小児科漢方—日常診療における具体的治療—

永寿総合病院小児科

にしむら 西村 甲

Pediatric Kampo medicine : treatment of common diseases

Ko Nishimura

Department of Pediatrics, Eiju General Hospital

Key Words : Kampo medicine, pediatrics

緒 言

日本の伝統医学である漢方医学に基づく治療の特徴は「随証治療にあるといえる」<sup>1)</sup>。ここでいう証とは、個々の病人にどのような治療を施すべき確証があるかという意味の証である。例えば、病人の現す各種症状を漢方医学的診察によってその病人に葛根湯で治る確証があれば、その病人に葛根湯の証があると診断するわけである。この証に従って治療することを随証治療という。随証治療の相手は病気一般ではなく、病める個人である。個人には個人差が存在する。よって、漢方治療においては西洋医学的には同じ疾患でも個人個人の体質に応じて用いる方剤が異なる(同病異治)。一方、異なった疾患であっても、体質が同じであれば用いる方剤も同じになることもある(異病同治)。西洋医学が個人はもとより集団にも目を向けて予防医学にも取り組むのに対し、漢方医学は目前の個人のための治療に集中するのである。このように、治療に取り組む姿勢は漢方医学と西洋医学とは大きく異なっている。

本稿では、日常の小児科診療において対応する頻度の高い疾患について著者の拙い経験例を取り上げて具体的な漢方治療を提示する。近年、漢方薬を処方した経験のある医師は全体の7割に上るといわれているが、小児科医においては少なく、約2割との報告もある<sup>2)</sup>。著者の周りでも漢方薬を処方する小児科医はほとんどいない。本稿が漢方薬を処方するきっかけになってもらえれば幸いである。

日常診療における小児科疾患の漢方治療

1. 気管支喘息

症例：3歳6カ月 女児

処方：麻杏甘石湯<sup>3)</sup>

主訴：喘鳴

既往歴：1歳時からアトピー性皮膚炎

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：2歳時から気管支喘息を発症し、テオフィリン製剤、抗アレルギー剤の投与およびクロモグリク酸ナトリウム(DSCG)による吸入療法を受けていたが、喘息発作のコントロールが不良であった。外来治療に反応せず、入院治療を計3回行っている。

現代医学的所見：発育発達に異常なし。咽頭発赤なし。肺野清～わずかにwheezingを聴取する。心音清、心雑音なし。腹部平坦軟、腫瘤を触知せず。皮膚軽度湿潤。肘部、膝窩部に湿疹を認める。血算、血液生化学検査で異常なし。胸部X線検査で肺気腫像を認める。

漢方医学的所見：舌は乾燥し白苔あり。脈は浮数。腹証は腹力充実し、腹壁緊張良好。

経過：平成10年8月28日、麻杏甘石湯エキス2.2g(成人量7.5g)分3を開始した。服薬可能であったため、8月29日からこれまで投与されていたテオフィリン、ケトチフェンを中止した。なお、DSCGによる吸入療法は保護者の希望により併用した。10月27日咳嗽出現し、夜になり症状が悪化したが、サルブタモールおよびDSCGの吸入により軽快した。以後喘息発作を認めなくなり、平成11年3月24日治療を終了した。

治療終了後も喘息発作を認めていない。

解説：本症例は自汗があり、体表の熱はないが、鬱熱が肺にある病態と考え、麻杏甘石湯を投与した。『傷寒論』(中国で漢時代に著された急性熱性疾患に関する解説書)には「発汗後、喘家(日頃喘鳴を認めている者)ニハ、更ニ桂枝湯ヲ行ルベカラズ。汗出デテ喘シ、大熱(体表の熱)ナキ者ハ、麻黄杏仁甘草石膏湯(麻杏甘石湯)ヲ與ウベシ。」とあり、麻杏甘石湯は小児気管支喘息に使用される。

喘鳴、咳嗽の鑑別処方としては、麻黄湯、小青竜湯、麦門冬湯、柴朴湯、神秘湯、五虎湯、苓甘姜味辛夏仁湯などが挙げられる。麻黄湯は自然発汗なく、発熱、悪寒、頭痛、関節痛、脈浮緊などの所見のある場合に、小青竜湯は泡沫性水様性喀痰、水様性鼻汁、くしゃみを伴う場合に、麦門冬湯は激しい咳で、痰の切れが悪く、顔面紅潮を伴う場合に、柴朴湯は気分がふさぎ、咽喉部異物感があり、胸脇苦満(肋骨弓下縁にかかる緊張をいう。脇は側胸部と肋骨弓に沿う部分とを含んでいる。圧重感、疼痛として現れることもある。小児において腹部診察でくすぐったがる場合にもこの所見があると判断することがある。)を伴う場合に、神秘湯は抑鬱的で、軽度の胸脇苦満を認める場合に、五虎湯は麻杏甘石湯証より咽頭痛、咳嗽が強い場合に、苓甘姜味辛夏仁湯は冷え性で喀痰が多い場合に用いられる。

## 2. アレルギー性紫斑病

症例：3歳8カ月 女児

処方：桂枝茯苓丸

主訴：腹痛、紫斑

既往歴 特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：平成10年10月10日腹痛が出現し、近医で胃腸炎と診断された。腹痛は改善せず、10月8日から下肢に紫斑が出現した。アレルギー性紫斑病と診断され、紹介受診した。

現代医学的所見：両側下肢全体に紫斑を認める。肺野清、心音正常、心雑音なし。腹部平坦軟、全体に圧痛を認める。関節痛なし。末梢血血小板数、PT、APTT、出血時間、一般検尿に異常所見なし。便潜血反応陰性。

漢方医学的所見：やや虚弱体質。逆上しやすい性格。便秘傾向。下肢の冷え性。色黒。脈は沈細。舌は白苔あり、軽度乾燥。舌下静脈怒張なし。腹部は腹直筋緊張軽度あり、全体に圧痛あり。

経過：ベッド上安静とし、トラニラストを投与した。腹痛、紫斑は消失、再出現を繰り返すため、11月6日

から小建中湯エキスを開始した。症状は改善せず、11月12日から腹痛が増強し、便潜血も陽性化した。翌13日からプレドニゾロンを開始し、症状は改善した。26日にプレドニゾロンを中止したが、29日から再度紫斑が出現し、症状が持続するため、12月8日から桂枝茯苓丸エキス3.0g(成人量7.5g)分3を開始した。以後新たな紫斑の出現を認めず、4カ月間投与を継続した後断薬した。

解説：本症例では、出血斑を瘀血(血流の停滞を起し、血行障害が発生した状態)によるものと判断し、逆上しやすい性格、便秘傾向、下肢の冷え性、腹部全体の圧痛を認めることから、桂枝茯苓丸を投与した。『金匱要略』(中国で漢時代に著された慢性疾患に関する解説書)には「婦人、宿(元々)瘕病(瘀血が停滞凝結して痞塊を形成する病)有り、経(月経)断チテ未ダ三月ニ及バズ、而も漏下(生殖器出血)ヲ得テ止マズ、胎動膈上ニ在ル者ハ、瘕瘕ノ害ト為ス。妊娠六月ニシテ動ク者、前三月(妊娠前の三カ月間)経水利スル(月経が正常である)時ハ胎也。血下ル者、後三月断ツハ(月経が停止して三カ月経っていると、その下血は)瘀(暗紫色の瘀血)也(妊娠ではないということ)。血止マザル所以ノ者ハ、其ノ瘕去ラザルガ故也。当ニ其ノ瘕ヲ下スベシ。桂枝茯苓丸之ヲ主ル。」とあり、本剤は駆瘀血剤の標準的方剤である。

アレルギー性紫斑病の鑑別処方としては、小柴胡湯、柴胡桂枝湯、温清飲、小建中湯、当帰芍薬散が挙げられる。小柴胡湯は白黄舌苔、悪心、嘔吐、胸脇苦満を認める場合に、柴胡桂枝湯は急激に発する心窩部あるいは臍周辺の疼痛、心下支結(腹直筋が上腹部で緊張しているもの)を認める場合に、温清飲は暑がり顔で赤ら顔、逆上しやすい性格、下肢の冷え性、皮膚乾燥を認める場合に、小建中湯は虚弱児で腹痛を訴えることが多く、下痢しやすく、顔色不良、腹直筋緊張を認める場合に、当帰芍薬散は色白で四肢の冷え性で腹部が軟弱無力な場合に用いられる。

## 3. 虚弱児

症例：2歳5カ月 女児

処方：黄耆建中湯

主訴：易感染性

既往歴：1歳時 川崎病

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：川崎病に罹患後、気管支炎、肺炎、化膿性頸部リンパ節炎等のため入院加療を繰り返している。慢性気管支炎に準じて、マクロライド系抗生剤少量投与およ

び去痰剤，気管支拡張剤投与を行ってきている。感染時には，39℃前後に体温が上昇し，水分摂取不良となる。母親が患児の易感染性，免疫不全を心配し来院した。

現代医学的所見：成長，発達に異常所見なし。咽頭発赤なし。リンパ節腫脹なし。肺野清。心音正常。心雑音なし。腹部平坦軟，肝脾触知せず。末梢血，血液生化学，免疫学的検査に異常を認めない。

漢方医学的所見：色白。体格は良いが，皮膚緊張が弱い。汗をかきやすい。舌は湿潤，薄白苔あり。脈は沈弱。腹部は腹力軟弱で，その他特記すべき腹証なし。

経過：マクロライド系抗生剤少量投与および去痰剤，気管支拡張剤投与に加え，平成14年3月12日から黄耆建中湯エキス6.0g（成人量18g）分3を開始した。3月17日に38.4℃の発熱を認めたが，翌日には自然に下熱した。以後，3～4カ月に1回程度，数日で軽快する感冒に罹患するものの発熱を認めることはない。抗生剤少量投与および去痰剤，気管支拡張剤投与は，平成14年4月以降中止している。約6カ月服用後，断薬した。

解説：本症例では易感染性，色白，皮膚緊張の弱いことから虚勞の状態と判断し，黄耆建中湯を投与した。「金匱要略」には「虚勞（慢性衰弱性疾患）裏急（腹直筋緊張），諸ノ不足ハ黄耆建中湯之ヲ主ル。」とあり，本剤は身体虚弱で，疲労しやすいものに投与される。

易感染性の虚弱児に対する鑑別処方としては，麻杏甘石湯，小青龙湯，小柴胡湯，柴胡清肝湯，柴胡桂枝湯が挙げられる。前2者は黄耆建中湯と同様，乳幼児期に適應することが多く，麻杏甘石湯は咳嗽喘鳴が強く，口渇と自汗を認める場合に，小青龙湯は喘鳴とともに水様性鼻汁やくしゃみを伴う場合に使用される。小柴胡湯，柴胡清肝湯は幼児期から学童期前半に適應することが多く，小柴胡湯は扁桃肥大，リンパ節腫脹，胸脇苦満を認める場合に，柴胡清肝湯は扁桃肥大，リンパ節腫脹の他，鼻出血，浅黒く乾燥した皮膚，胸脇苦満，腹直筋緊張を認める場合に，柴胡桂枝湯は学童期後半に消化器症状を伴い，心下支結を認める場合に投与される。

#### 4. 胃腸炎

症例：1歳7カ月 男児

処方：半夏湯

主訴：下痢

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：兄が胃腸炎で入院を繰り返した。

現病歴：1歳頃から胃腸炎を月に1回程度繰り返し，

整腸剤，止痢剤の投与を受けていた。平成12年10月14日から水様の下痢が1日に6～7回認められるようになり，10月16日受診した。

現代医学的所見：成長，発達に異常所見なし。咽頭発赤なし。眼瞼結膜貧血なし。肺野清。心音正常。心雑音なし。腹部軽度膨満軟，肝脾触知せず。四肢浮腫なし。

漢方医学的所見：色白。体格は良いが，皮膚緊張が弱く，活気なし。唾液流出が目立つ。舌は湿潤，薄白苔あり。脈は沈弱。腹部は腹力軟弱，心下痞硬（上腹部の張りが自覚的に存在するのみの心下痞硬と同時に心下部腹壁が緊張しているもの）軽度，振水音（胃液分泌過多と胃壁アトニーのため胃液が胃内に停滞した状態を意味する。腹壁に振動をあたえることにより，胃液が波打つ音として証明される。）あり。

経過：整腸剤，止痢剤に加え，人參湯エキス2.5g（成人量7.5g）分3を開始した。10月19日，泥状便となり，回数も日に4～5回に減少した。10月26日，有形軟便になり，回数も日に3回となった。止痢剤を中止し，整腸剤，人參湯を継続した。11，12月に1度ずつ下痢が出現し，母親の希望もあり一時的に止痢剤を追加投与したが，数日で軽快した。その後経過良好で平成13年4月25日人參湯投与を終了した。5月1日から下痢が出現し，整腸剤，止痢剤のみの投与（他医が担当）で症状が悪化し，5月3日から7日まで入院加療した。退院後も，断続的に下痢が出現したため，6月8日から人參湯を再開した。4～5日で症状は軽快した。以後，2月に1回程度下痢が出現したが，すぐ人參湯を投与することにより症状が軽快した。転居のため，平成14年3月18日終診となった。

解説：本症例では，活気がなく下痢があること，唾液が多いことなどから人參湯を投与した。「傷寒論」には，「大病差エテ後，喜唾（しばしば唾液を吐く）久シク了了タラザル（さっぱりしない）者ハ，胸上ニ寒アリ。当ニ丸薬ヲ以テ之ヲ温ムベシ。理中丸（人參湯の丸剤）ニ宜シ。」，また「金匱要略」には，「胸痺（胸部が痞えて脹満し，あるいは胸部に疼痛が生じる疾患），心中痞シ，留気（陰寒の邪）結シテ胸ニアリ。胸満シテ脇下ヨリ心ヲ逆槍（気が上衝する）スルハ，枳実薤白桂枝湯之ヲ主ル。人參湯モ亦之ヲ主ル。」とあり，本剤は虚弱体質の胃腸炎症状に対して投与される。

胃腸炎（下痢）の鑑別処方としては，半夏瀉心湯，黄連湯，真武湯，小建中湯，六君子湯などが挙げられる。半夏瀉心湯は嘔気，腸鳴，心下痞硬を認める場合に，黄連湯は心窩部痛が強い場合に，真武湯は冷え性，めまい，動悸，臍上悸（腹部大動脈の拍動が亢進していること

をいう。通常臍上部が最も著明であるが、臍傍、臍左下のこともある。なお、厳密には拍動が他覚的にも触知しえることを動といい、自覚的にのみ感じられる場合は悸という。)を認める場合に、小建中湯は疲労感が強く、腹直筋緊張を認める場合に、六君子湯は食欲不振、食後の膨満感、白苔舌、心下痞、振水音を認める場合に使用される。

## 5. 便秘症

症例：4歳11カ月 女児

処方：大建中湯

主訴：便秘

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：乳児期から便秘が続く、各種内服薬を使用した。改善しなかった。グリセリン浣腸でようやく排便できる状態である。平成16年3月4日初診した。

現代医学的所見：成長、発達に異常所見なし。咽頭発赤なし。肺野清。心音正常、心雑音なし。腹部やや膨脹軟、肝脾触知せず。左下腹部に便塊を触知する。

漢方医学的所見：色白。舌は軽度湿潤、淡白色、白苔あり。脈は沈細。腹部は腹力中等度、軽度腹直筋緊張あり。

経過：ラクツロース内服で経過観察とした。3月11日、症状全く改善なし。小建中湯エキスを処方。3月19日、改善せず。腹部やや膨満し、手足が冷える傾向があることから、大建中湯エキス5.0g(成人量15g)分3に変更した。3月25日、毎日排便があるようになった。さらに30日分処方し、断薬した。

解説：本症例では、当初小建中湯が有効と思われたが、腹部が冷えることによる便秘と判断し、大建中湯の投与で症状が改善した。『金匱要略』には「心胸中大イニ寒痛シ、嘔シテ飲食スル能ワズ、腹中寒エ、上衝シテ皮起リ(皮膚を突き上げる)、頭足有リテ見ワレ出デ(腹壁に頭や足のような塊状物が出現する)、上下痛ミテ触レ近ズクベカラザルハ、大建中湯之ヲ主ル。」とあるように、腸管の蠕動不穏、腹痛などがあり、所謂サブイレウスの状態によく用いられる。

便秘の鑑別処方としては、承気湯類他様々であるが、小児においては小建中湯が重要である。小建中湯は虚弱で腹痛を訴えることが多く、下痢しやすく、顔色不良、腹直筋緊張を認める場合に用いられる。

## 6. アトピー性皮膚炎

症例：5歳5カ月 男児

処方：温清飲

主訴：発疹

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：父がアレルギー性鼻炎。

現病歴：2歳頃から肘部に発疹が出現し、近医でアトピー性皮膚炎と診断された。抗アレルギー剤、ステロイド軟膏等により治療を受けたが、症状が改善しなかった。民間療法も行ったが、効果がなかった。漢方治療を希望し、平成13年2月7日入院した。

現代医学的所見：成長、発達に異常所見なし。咽頭発赤なし。肺野清。心音正常、心雑音なし。腹部平坦軟、肝脾触知せず。皮膚は全体に乾燥しており、胸腹部、四肢に掻破傷を認める。肘部、膝下部に苔癬化が著しい。頸部には色素沈着を認める。IgE RIST 360 IU/ml、RAST ダニ3+、ハウスダスト3+。

漢方医学的所見：色黒。舌は軽度乾燥、軽度紅色、白～黄苔あり。脈は沈細。腹部は腹力中等度、軽度腹直筋緊張、軽度下腹部抵抗圧痛あり。

経過：これまで使用していた抗アレルギー剤、ステロイド軟膏を継続しながら、温清飲エキス3.5g(成人量7.5g)分3を処方した。2月21日、皮膚の乾燥が改善してきた。3月7日、皮膚乾燥度がさらに改善し、苔癬化も軽減してきた。抗アレルギー剤を中止した。5月2日、皮膚に軽度乾燥が認められるが、肘部、膝下部の苔癬化がほぼ軽快した。ステロイド軟膏を中止し、ワセリン、時に非ステロイド軟膏のみで皮膚ケアが維持できるようになった。以後軽度の皮膚乾燥を認めるが、症状は悪化せず経過した。同年12月28日終診。

解説：本症例を黒く乾燥した皮膚を呈したアトピー性皮膚炎と判断し、温清飲を投与した。『万病回春』(中国で明時代に著された疾病治療の解説書)には「婦人経水住マラス(月経血がだらだらと出る)、或ハ豆汁ノ如ク、五色相雜エ、面色痿黄(貧血)、臍腹刺痛、寒熱往来シ、崩漏(大量の月経血)止マザルヲ治ス。」とあるように、本剤は血虚(人体を構成する血が量的あるいは機能的に低下した病態)と血熱(血が熱を帯びた病態)が共存する病態に対する基本方剤である。月経不順、月経困難などの婦人科疾患の他、アトピー性皮膚炎に頻用されている。

アトピー性皮膚炎の鑑別処方としては、消風散、治頭瘡一方、十味敗毒湯、白虎加人参湯、柴胡清肝湯などが挙げられる。消風散は分泌物があり、痂皮形成し、掻痒感が強く、夏に悪化傾向がある場合に、治頭瘡一方

は消風散と同様の症状で、特に顔面部に発疹を認める場合に、十味敗毒湯は散発性の発疹で、時に化膿を伴う場合に、白虎加入参湯は紅斑性発疹で、口渴、多汗を認める場合に、柴胡清肝湯は温清飲と同様の症状で、疳が強く、虚弱体質、扁桃腺やリンパ節の腫脹を伴い、腹直筋緊張、胸脇苦満を認める場合に投与される。

## 7. アレルギー性鼻炎

症例：12歳8カ月 女児

処方：小青竜湯

主訴：鼻汁、鼻閉

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：10歳頃から水様性鼻汁、鼻閉が出現し、近医で通年性アレルギー性鼻炎と診断された。抗ヒスタミン剤、抗アレルギー剤を処方されたが、眠気等のため内服を控えていた。平成16年4月19日初診した。

現代医学的所見：成長、発達に異常所見なし。咽頭発赤なし。肺野清。心音正常。心雑音なし。腹部平坦軟。肝脾触知せず。IgE RIST 580 IU/ml, RAST グラニ2+, ハウスダスト2+, スギ3+, ブタクサ2+。

漢方医学的所見：色黒。舌は軽度湿潤。淡紅色。白苔あり。脈は沈細。腹部は腹力中等度。軽度胸脇苦満。心下痞。軽度腹直筋緊張あり。臍上悸あり。下腹部圧痛なし。

経過：抗ヒスタミン剤とともに小青竜湯エキス9.0g（成人量）分3を処方した。4月26日、抗ヒスタミン剤のみの内服よりも症状が改善した。5月10日、鼻汁がほとんど気にならなくなった。症状が強くなった時のみ抗ヒスタミン剤を使用するように指示した。7月30日、抗ヒスタミン剤の使用は月に数日程度になり、授業にも集中できるようになったと実感できている。

小青竜湯を継続中である。

解説：本症例では水様性鼻汁、心下痞を認めることなどから、小青竜湯を投与した。『傷寒論』には「傷寒表解せず心下ニ水気有り、乾嘔（からえずき）、発熱シテ欬シ、或ハ渴シ、或ハ利（下痢）シ、或ハ噎（むせぶ）シ、或ハ小便利せず、小腹満シ、或ハ喘スル者ハ、小青竜湯之ヲ主ル。」とあるように体質的に水分過剰で、発熱悪風を認める場合に用いられる。

アレルギー性鼻炎の鑑別処方としては、麻黄附子細辛湯、葛根湯加川芎辛夷、辛夷清肺湯、荊芥連翹湯が挙げられる。麻黄附子細辛湯は虚弱体質で、めまい、四肢の冷感がある場合に、葛根湯加川芎辛夷は体力中等度で慢性に膿性鼻汁、鼻閉を認める場合に、辛夷清肺湯は

粘調な痰を伴った膿性鼻汁、鼻閉を認める場合に、荊芥連翹湯は皮膚が浅黒く、副鼻腔、外耳、中耳、扁桃腺に炎症を起こしやすく、膿性鼻汁が著明で、腹直筋緊張を認める場合に使用される。

## 8. 片頭痛

症例：10歳2カ月 男児

処方：呉茱萸湯

主訴：頭痛

既往歴：5歳から気管支喘息に罹患、年に数回軽度の発作あり。平成10年頃から発作は消失している。

家族歴：両親がアレルギー性鼻炎。母が片頭痛。

現病歴：平成13年10月3日早朝から右側頭痛が出現した。明らかな前兆は認められないが、嘔気、吃逆を伴っていた。症状が改善しないため、同日受診した。

現代医学的所見：成長、発達に異常所見なし。咽頭発赤なし。肺野清。心音正常。心雑音なし。腹部平坦軟。肝脾触知せず。圧痛なし。意識清明。対光反射正常。嚥下障害なし。運動失調なし。頭部CT異常なし。

漢方医学的所見：体格やや虚弱。舌は湿潤。淡白色。軽度白苔あり。脈は沈細。腹部は腹力弱。心下痞。軽度胸脇苦満。振水音を認める。軽度腹直筋緊張。軽度下腹部抵抗圧痛あり。

経過：呉茱萸湯エキス7.5g（成人量）を分3で1日分処方し、翌日の来院を指示した。10月4日、頭痛はかなり軽減したという。さらに、1週分処方した。10月11日来院、頭痛はなく体調はよいという。さらに1週分処方し、以後頭痛を認めないため、治療を終了した。平成14年7月11日、前回と同様の頭痛を訴え来院した。診察所見は以前と同様であったため、呉茱萸湯を1週分処方した。以後頭痛を認めていない。

解説：本症例では、臨床症状より片頭痛と判断し、嘔気、吃逆、心下痞、振水音を認めることから呉茱萸湯を投与した。『傷寒論』には「穀ヲ食シテ嘔セント欲スルハ陽明（経絡の陽明胃経）ニ属スル也。呉茱萸湯之ヲ主ル。」、「小陰病（傷寒において表裏ともに寒虚の病期にあるもの）、吐利シ、手足逆冷シ、煩躁死セント欲スル者ハ、呉茱萸湯之ヲ主ル。」、「乾嘔シテ涎沫（唾液、胃液）ヲ吐シ、頭痛スル者ハ、呉茱萸湯之ヲ主ル。」とあるように、呉茱萸湯は手足の冷え性があり、悪心、嘔吐を伴う習慣性頭痛によく用いられる。

頭痛の鑑別処方としては、五苓散、半夏白朮天麻湯、桃核承気湯、桂枝人参湯などが挙げられる。五苓散は体質として冷え性はなく、口渴、尿量減少があり、水分を欲しがりますが、すぐに嘔吐する水逆が認められる場合

に、半夏白朮天麻湯は頭痛自体あまり激しくなく、持続性で、冷え性、めまい、腹痛を伴う場合に、桃核承気湯は月経困難、月経不順などがあって、小腹急結(下腹部が急に激しくつれるという意味で、深在性の所見も含まれる。左側腸骨窩において擦過性の圧に対して急迫的な痛みを感じる索状物を証明することである。)を認める場合に、桂枝人参湯は人参湯の証があり、かつ頭痛を伴う場合に用いられる。

### 9. アセトン血性嘔吐症

症例：8歳 男児

処方：五苓散

主訴：嘔吐

既往歴：4歳 キャンピロバクター腸炎で入院。年に数回嘔吐下痢症で加療している。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：平成15年5月1日嘔吐1回、5月2日未明から嘔吐4回(咽が渇き、水分を摂取するが、すぐ嘔吐する)、下痢、38.5℃の発熱が出現したため、受診した。

現代医学的所見：発育、発達異常なし。咽頭発赤軽度。肺野清。心音正常、心雑音なし。腹部平坦軟、肝脾触知せず、心窩部および右上腹部に圧痛あり。項部硬直なし。Kernig 徴候なし。皮膚ツルゴールやや低下。末梢血、血液生化学検査に異常所見なし。一般検尿でケトン(4+)。

漢方医学的所見：口渇あり、小便不利あり、水逆あり。舌は軽度紅色、白苔あり。脈は浮数滑。腹部は腹力中等度、心下痞あり、振水音なし、臍上悸を軽度認める。

経過：五苓散エキス2.5gを外来で投与した。20分後、悪心は改善し、スポーツ飲料を摂取できた。このため、五苓散エキス6.0g(成人量7.5g)を分3で4日処方。5月6日、来院。5月3日には症状軽快し、以後経過良好とのことである。

解説：本症例では、口渇、小便不利、水逆が認められたことから、五苓散を投与した。『傷寒論』に、「太陽病、(傷寒において発症初期で表に外邪があるもの)発汗後、大イニ汗出デ、胃中乾キ、煩燥眠ルヲ得ズ、水ヲ飲ムヲ得ント欲スル者ニハ少々與エテ之ヲ飲マシメ、胃氣ヲシテ和セシムレバ即チ癒ユ。若シ脈浮、小便利セズ、微熱、消渴(咽が渇いて水を飲んでも、その割に尿のでないもの)ノ者ハ五苓散之ヲ主ル。」、「発汗シ已リ、脈浮数、煩渴スル者ハ五苓散之ヲ主ル。」、「中風(軽症の感冒)、発熱六七日解セズシテ煩シ、表裏ノ証在リ、渴シテ水ヲ飲マント欲スレド、水口ニ入ッテ吐ク者

ハ、名ツケテ水逆トイウ。五苓散之ヲ主ル。」とあるように、五苓散は口渇、小便不利、水逆に対する方剤である。

嘔吐症に対する鑑別処方としては、桂枝人参湯、小半夏加茯苓湯、呉茱萸湯、苓桂朮甘湯などが挙げられる。桂枝人参湯は本症例の如くアセトン血性嘔吐症の予防に対して、小半夏加茯苓湯は嘔吐、悪心が激しく、飲食物も薬も受け付けない状態の場合に、呉茱萸湯は激しい発作性の頭痛に伴って出現する嘔吐に対して、苓桂朮甘湯は逆上せ、めまい、身体動揺感が強く、尿量減少、口渇、嘔吐の症状は顕著でない場合に用いられる。

### 10. 膀胱炎

症例：11歳10カ月 男児

処方：猪苓湯

主訴：頻尿、排尿痛

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：平成16年7月22日から10~30分毎に尿意が出現し、軽度排尿痛も認められたため、翌7月23日初診した。

現代医学的所見：発育、発達異常なし。咽頭発赤なし。肺野清。心音正常、心雑音なし。腹部平坦軟、肝脾触知せず、圧痛なし。龟头、尿道口、包皮に軽度発赤あり、排膿認めず。末梢血白血球10,100/μl、CRP 0.18 mg/ml。補体、免疫グロブリンも含め血液検査に異常を認めない。一般検尿 蛋白(1+)、潜血(3+)、沈査赤血球35-49/HPF、白血球1-4/HPF、円柱認めず。尿細菌培養陰性。

漢方医学的所見：口渇軽度あり。小便不利なし。舌は軽度紅色、白苔あり。脈は浮数。腹部は腹力中等度、その他特記すべき所見なし。

経過：猪苓湯エキス7.5g(成人量)分3を開始した。翌7月24日、頻尿、排尿痛を認めなくなり、一般検尿所見は正常化した。7月29日、症状を認めず、同日の検尿所見も異常ないため、断薬した。

解説：本症例では、口渇、小便難、膀胱刺激症状を認めることから、猪苓湯を投与した。猪苓湯は、『傷寒論』に、「若シ脈浮、発熱シ、渴シテ水ヲ飲マント欲シ、小便利ノ者ハ、猪苓湯之ヲ主ル。」とあるように、下腹部の濕熱(人体を構成する気血水のうち、水が過剰となりさらに熱を帯びている病態をいう。)による下痢、尿量減少、排尿異常に用いる。

膀胱炎の鑑別処方としては、五淋散、竜胆瀉肝湯、清心蓮子飲が挙げられる。五淋散は虚弱体質で、冷え性

を伴う場合に、<sup>りょうたんしゅかんとう</sup>竜胆瀉肝湯は体力中等度で膀胱、尿道、生殖器に比較的急性炎症症状が顕著の場合に、<sup>せいしんりんし</sup>清心蓮子飲は全身倦怠感があり、不眠、動悸、胃腸虚弱を伴う場合に用いられる。

## 11. 小児疳症

症例：1歳10カ月 男児

処方：抑肝散

主訴：思い通りにならないと泣き止まない

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：平成15年2月20日、思い通りにならないと歯をくいしばって、背を反らせてキーキーと泣いて、なかなか泣き止まなくなった。その後も同様の症状が続くため、3月6日受診した。

現代医学的所見：発育異常なし。体重は3パーセントイル。運動発達異常なし。言語発達では、意味のある単語発声が5つのため、やや発達遅延あり。咽頭発赤なし。肺野清。心音正常。心雑音なし。腹部平坦軟。肝脾触知せず。

漢方医学的所見：落ち着きなし。舌は軽度紅色。白苔あり。脈は浮弱。腹部は腹力中等度、<sup>しんかぶく</sup>心下痞硬軽度あり。腹直筋緊張軽度あり、<sup>さいじょうき</sup>臍上悸なし。その他特記すべき腹証なし。

経過：抑肝散エキス2.0g（成人量7.5g）を分3で14日分投与した。3日後には、泣き止まない症状が軽減し、5日には、両親もほとんど気に留めない程度まで改善した。3月19日、来院。経過良好のため、服薬終了とした。以後、症状の再燃を認めていない。

解説：本症例では、虚弱傾向の体格、神経がたかぶり、泣き止まないことから、<sup>よくかんさん</sup>抑肝散を投与した。『保嬰撮要』（中国で明時代に著された小児科専門書）に、「<sup>かんじ</sup>肝経ノ虚熱、<sup>はつちく</sup>発搐（けいれん）シ、或ハ発熱咬牙（歯を食いしばる）、或ハ驚悸（驚いたり、恐れたり）寒熱シ、或ハ木土ニ乗ジテ（五行の相乗、木乗土のこと、木に属する肝が土に属する脾を病的に抑制すること）痰涎（粘液）ヲ嘔吐シ、腹張少食、睡臥安ラザルヲ治ス。」とあるように、<sup>よくかんさん</sup>抑肝散は虚弱体質で神経がたかぶるもので、神経症、不眠症、小児夜泣き、小児疳症に適応がある。本剤は、児の治療のために児が内服するものと同様の漢方薬を母親も服用するという母子同服を指示した最初の薬剤である。本症例では行わなかったが、母子同服は小児科漢方の大きな特徴の1つであり、児の治療効果を高めることが確認されている<sup>3)</sup>。

小児夜泣き、小児疳症の鑑別処方としては、<sup>よくかんさんか</sup>抑肝散加

<sup>ちんぴはんげ</sup>陳皮半夏、<sup>けいしかりゅうこつほれいとう</sup>桂枝加竜骨牡蛎湯、<sup>さいかりゅうこつほれいとう</sup>柴胡加竜骨牡蛎湯、<sup>かんぼくたいそうとう</sup>甘麦大棗湯、<sup>しよくやくかんぞうとう</sup>芍薬甘草湯などが挙げられる。<sup>よくかんさん</sup>抑肝散加陳皮半夏は<sup>よくかんさん</sup>抑肝散と同様の症状が慢性化して、腹壁が軟弱となり、<sup>さいじょうき</sup>臍上悸、<sup>しんすいおん</sup>振水音などが認められる場合に、<sup>けいしかりゅうこつほれいとう</sup>桂枝加竜骨牡蛎湯は比較的虚弱体質で、<sup>さいじょうき</sup>下腹直筋緊張、<sup>さいじょうき</sup>臍上悸が認められ、安眠できずに騒いだり、飛び出したりする場合には、<sup>さいかりゅうこつほれいとう</sup>柴胡加竜骨牡蛎湯は比較的体力があり、腹力は中等度あり、<sup>きょうさうくまん</sup>胸脇苦満、<sup>しんかひ</sup>心下痞、<sup>さい</sup>著明な<sup>さいじょうき</sup>臍上悸を認める場合に、<sup>かんぼくたいそうとう</sup>甘麦大棗湯は時に<sup>さいじょうき</sup>腹直筋緊張、<sup>さいじょうき</sup>臍上悸を伴い、甚だしい興奮状態、<sup>さいじょうき</sup>急迫性けいれん症状（<sup>しよくやくかんぞうとう</sup>憤怒けいれん）が認められ、あくびを頻発する場合には、<sup>しよくやくかんぞうとう</sup>芍薬甘草湯は腹痛が原因と考えられるような夜泣き、疳症に対して用いられる。

## 12. 不登校

症例：12歳 女児

処方：大柴胡湯去大黄

主訴：頭痛、腹痛、胸痛、動悸（不定愁訴）

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：平成11年5月から友人関係のトラブルから学校を休みがちであった。平成12年6月から頭痛、腹痛、階段を登る時に胸痛、動悸を訴えるようになった。鎮痛剤で経過をみたが、改善しないため平成12年10月受診した。

現代医学的所見：咽頭発赤なし。肺野清。心音正常。心雑音なし。腹部平坦軟。肝脾触知せず。末梢血、血生化学検査に異常所見なし。心電図、心エコー検査に異常所見なし。起立性調節障害に関して、問診で大症状2、小症状2、起立試験で異常なし。

漢方医学的所見：物静かな印象。舌は軽度紅色。白苔あり。脈は沈弦。腹部は腹力中等度、<sup>しんかぶく</sup>胸脇苦満著明、<sup>しんかひ</sup>心下急（<sup>しんかぶく</sup>心下痞硬よりさらに緊張度、<sup>しんかぶく</sup>圧痛が強いもの）あり。その他特記すべき腹証なし。

経過：<sup>だいさいこうとう</sup>大柴胡湯エキス7.5g（成人量）を2週間処方した。頭痛、腹痛、胸痛、動悸は改善傾向を示したが、<sup>だいさいこうとう</sup>下痢が認められるようになった。<sup>だいさいこうとう</sup>大柴胡湯の構成生薬である<sup>だいさいこうとう</sup>大黄が原因と考えられたため、<sup>だいさいこうとう</sup>大柴胡湯去大黄エキス9.0g（成人量）分3に変更した。これにより、<sup>だいさいこうとう</sup>下痢も改善し、不定愁訴も軽快した。不定愁訴については経過良好で、3カ月後断薬した。平成13年2月から精神的ストレス、不登校についてカウンセリングも開始したが、4カ月後には来院しなくなり、不登校の経過は不明である。

解説：本症例では、体力が充実しており、ストレスを

起因として症状が出現しており、著明な胸脇苦満、心下急を認めることから大柴胡湯を投与した。大黄による下痢のため、大柴胡湯去大黄とした。大柴胡湯は、『傷寒論』に「太陽病、経ヲ過グルコト十余日、(太陽病から少陽病に変化したことをいう。少陽病は外邪が半表半裏にある病期のもので、和解清熱により治療される。)反テニ、三之ヲ下ス(少陽病であるのに、陽明病と誤認して下剤を投与した。陽明病は外邪が裏に侵入した病期のもので、下すことで治療される。)、後四、五日、柴胡ノ証乃在ル者ハ、先ズ小柴胡湯ヲ與ウ、嘔止マズ、心下急、鬱鬱微煩スル者ハ、未ダ解セストナス也。大柴胡湯ヲ與エ、之ヲ下セバ則チ愈ユ。」とあるように、少陽から陽明病を治す方剤である。慢性疾患においては胆石症、肝炎、高血圧、糖尿病、不眠症などに適応がある。便秘傾向のない場合には去大黄として用いる。

不定愁訴に対する鑑別処方としては、柴胡加竜骨牡蛎湯、四逆散、柴胡桂枝湯、抑肝散、加味逍遙散、小建中湯、桂枝茯苓丸、当帰芍薬散が挙げられる。柴胡加竜骨牡蛎湯は腹力中等度あり、胸脇苦満、心下痞、著明な臍上悸を認める場合に、四逆散は抑鬱性の神経症状、四肢の冷感、胸脇苦満、腹直筋緊張を認める場合に、柴胡桂枝湯は心窩部あるいは臍周辺の疼痛、心下支結を認める場合に、抑肝散は易興奮性で心下痞、腹直筋緊張を認める場合に、加味逍遙散は心気症的傾向、虚弱、月経不順、胸脇苦満を認める場合に、小建中湯は疲労感が強く、腹直筋緊張を認める場合に、桂枝茯苓丸は冷え性、逆上せ、便秘傾向、下腹部の圧痛を認める場合に、当帰芍薬散は冷え性で腹部が軟弱無力な場合に用いられる。

## 結 語

近年、漢方医学の教育、研究が急速に進行している。2002年、文部科学省から医学教育モデル・コア・カリキュラムに「和漢薬が概説できる」という到達目標が提示され、全国の医学部学生に漢方医学教育が行われている。国が漢方医学教育の重要性を初めて認め、医学教育

に漢方医学を正式に取り入れたのである。日本東洋医学会も漢方医学の入門教科書を発行するとともに、evidence-based medicine (EBM) について調査、報告を行っている<sup>4)</sup>。個人を重視した漢方医学とEBMは相反するところもあるが、現代医療においてEBMを無視することはできない<sup>5)</sup>。一方で、和文の入門教科書の英文化作業を行うなど、日本の伝統医学である漢方医学を世界に発信すべく、様々な努力が続けられている<sup>6)</sup>。

このような状況からして、他科の臨床医はもとより小児科医も漢方治療を行えることは大変重要になってくると思われる。漢方薬の処方において、病名投与で十分効果を上げる場合もあるが、逆に副作用が問題となることもある。漢方医学的診断に基づいて治療を行うことが大切であり、このためには、漢方医学の基礎理論を修得しなければならない。現代医学において小児漢方治療を充実させるためには、小児科漢方の得意分野を把握することも必要である<sup>7)</sup>。そして、小児の治療においては成長・発達が順調であるか否かに視点を持つことを忘れてはならない。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御助言を賜りました伝統医学研究会あきば病院院長 秋葉哲生先生に深謝致します。

## 文 献

- 1) 大塚敬節：東洋医学の治療。大塚敬節著作集1。存陽堂、東京、p. 29-50, 1980
- 2) 崎山武志：漢方治療のすすめ。日児誌、108：1019-1026, 2004
- 3) 西村 甲、渡邊賢治：小児の漢方療法 III。疾患各論 母子同服。小児科診療、67：1514-1518, 2004
- 4) 日本東洋医学会 EBM 委員会編：漢方治療における EBM。日東医誌、53 別冊、2002
- 5) 秋葉哲生：漢方医学における EBM (Evidence-based medicine) の現状。慶應医学、80：125-129, 2003
- 6) 渡邊賢治：漢方をめぐる国際的な動向について。日東医誌、55：437-445, 2004
- 7) 広瀬滋之：これからの小児医療の在り方—伝統医学の視点から—。日児誌、107：438-448, 2003



原 著

## 介護保険制度の導入前後における市町村の介護サービスに関する研究

慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室

(指導:大前和幸教授)

こ いけ そう いち  
小 池 創 一

(平成16年7月5日受付)

### ABSTRACT

Long-term care services for the elderly in municipalities before and after the introduction of Long-term Care Insurance

*Soichi Koike*

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

The purpose of this study was to compare the long-term care services in municipalities before and after the introduction of Long-term Care Insurance for the elderly (LTCI) in April 2000. Questionnaires were sent to all municipalities in Japan in November 1999 (before the introduction of LTCI) and in 2001 (after the introduction of LTCI). The questions included the level of care needed for the elderly, the type of service (home or institution-based), and other factors related to the implementation of LTCI. Two hundred and sixty-five municipalities responded to both questionnaires were analyzed in this study. The proportion of elderly who needed care, the proportion of elderly at care need level 5, and the average care-need level among certified increased and became less variable after the introduction of LTCI. In addition, there was a higher correlation between the proportion of elderly who needed care and the number of beds for long-term care per elderly population after the introduction of LTCI. The standardization of eligibility criteria and the changes in the financing system for care for the elderly served as background of these changes. These findings demonstrate that the introduction of LTCI had a significant impact on care for the elderly in municipalities in Japan.

**Key Words** : Long-term Care Insurance for the elderly, certification of care needs, service, municipalities

平成12年に導入された介護保険制度も既に第2期に入り、制度導入の効果や影響について分析することも可能となってきた。近藤らは、平成11年から平成13年の3年間にわたり全国の全市町村および特別区に対して質問票調査を実施し、市区町村の保健・福祉サービスの時系列変化を明らかにしてきた<sup>1)4)</sup>が、本研究では、さらにこの研究を進めて、介護保険導入前後の平成11年と平成13年の双方に回答した市町村を対象として、要介護認定状況の変化とその特徴などについて明らかにす

ることを目的として、利用可能なデータを用いて探求的に解析を行った。

### 研究方法

質問票は、平成11年および平成13年の11月に全国の全市区町村の介護保険担当者に郵送で送付し、郵送で回収を行った。両年とも調査票は6ページで、人口、マンパワー、介護保険の準備状況(実施状況)に関する幅

広い項目に関し、平成11年は16項目、平成13年は19項目について調査を行った。回答市区町村数と回収率は、平成11年が1,097市区町村(323市12区614町148村)で回収率33.7%、平成13年調査が1,452市区町村(439市16区800町197村)で回収率44.6%であった。平成11年と平成13年の両年とも回答したのは636市区町村(242市10区306町78村)であり、このうち、両年とも要介護度の記載がある265市町村(80市、142町、43村、全市区町村に対する割合8.1%)を本研究の分析対象とした。

分析にあたっては、調査票から市町村ごと(介護保険を広域で実施している場合については、当該市町村分のみ)の要介護度別要介護者数(平成11年10月1日現在、平成13年9月30日現在:在宅、施設入所別)、介護保険料(平成13年度第1号被保険者の保険料基準額(月額)、衛生費、民生費、一般歳出(以上3項目は平成10年度予算総額)、介護老人福祉施設待機者数(平成10年度末:平成13年9月30日現在)、介護保険業務専従職員数(平成10年度末:職種、勤務形態の別を問わず、勤務時間内に介護保険関連業務のみに従事する職員数)、老人福祉施設入所者数、老人保健施設入所者数(以上2項目は、それぞれ平成10年度末、平成12年度末)を用いた。総人口、老年人口(65歳以上人口)、老年人口割合については、平成12年の国勢調査結果<sup>9)</sup>、一般病床および療養型医療施設(医療型を含む)の病床数については、平成11年<sup>6)</sup>、平成13年<sup>7)</sup>の医療施設調査結果(各年とも10月1日現在)を用いた。以上のように、調査時点は項目別に異なっているものの、便宜上、以下、平成10年度末から平成11年10月1日までのデータは平成11年、平成12年度末から平成13年10月1日までのデータは平成13年と表記することとした。

介護老人福祉施設入居者1人あたり介護老人福祉施設待機者数を単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数、老年人口千人あたり介護保険業務専従職員数を単位老年人口あたり介護保険業務専従職員数、老年人口千人あたり施設入居者数または病床数を、単位老年人口あたり施設入居者数または病床数として用いた。

また、本研究では市町村の要介護認定状況の指標の一つとして、要支援を0、要介護1~5をそれぞれ1~5にスコア化し平均値を求めた平均要介護度を用いた。要介護度自体は、連続した値をとるものではないが、要介護1から要介護5が要介護認定等基準時間を20分間で等間隔に設定している<sup>8)</sup>ものであることを踏まえ、このような指標を用いた。

調査票の設計上、要介護認定を受けている者のうち、

特定疾患により要介護者となっている65歳未満の者は除外できていない。しかしながら、全国データ<sup>9)</sup>からは特定疾患により要介護者となっている者の割合は0.1%と極めて少ないことから、分析への影響は無視しうるものとして扱った。

統計分析には、SPSS Japan社のSPSS for Windows Ver.10.0Jを使用した。分析したデータの分布には正規性がないため、相関係数についてはSpearmanの順位相関、群間の平均値の比較は、関連2群についてはWilcoxonの符号付順位和検定を、独立2群についてはMann-Whitney検定を、独立3群以上についてはKruskal Wallis検定を使用した。市町村人口を5群に分けて群間の多重比較を行う際にはGames-Howell法を使用した。

## 研究結果

### 1. 分析対象となった市町村の特徴

分析対象となった265市町村の総人口、老年人口割合、介護保険料の平均±標準偏差および範囲は、それぞれ46,659±83,802 [885~485,878]人、21.3±5.90 [9.0~39.4]%, 2,756.9±414.3 [1,533~3,841]円であった。

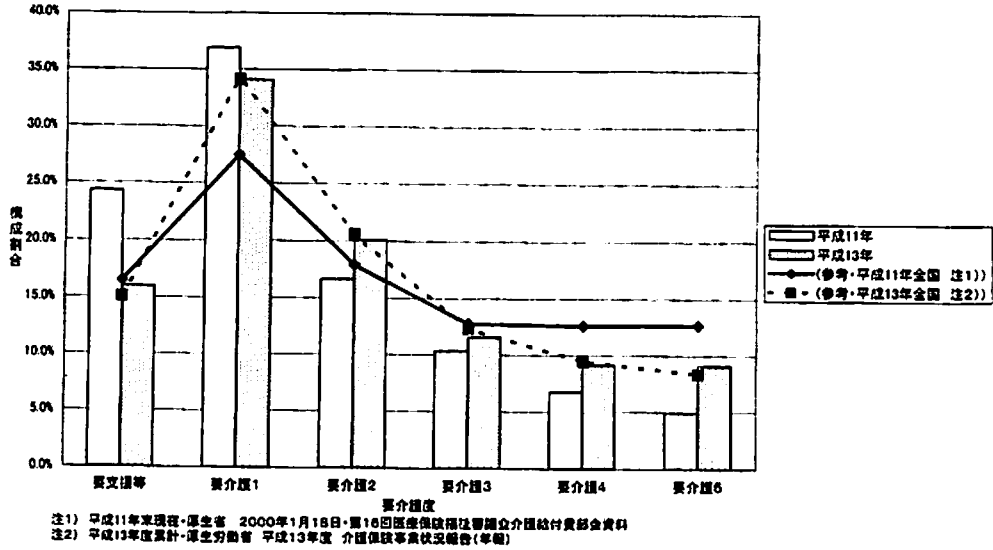
これらの数値を、全国<sup>9)</sup>および平成13年調査に回答した1,452市区町村から265市町村を除いた1,187市区町村と比較したところ、老年人口割合が全国の24.1±7.2%、1,187市区町村の23.1±7.2%に比較して265市町村は有意に低かった(有意水準5%)ものの、総人口、介護保険料に関しては有意な差を認めなかった。

### 2. 平成11年と平成13年の要介護認定状況(第1表、第1~7図)

平成11年と平成13年の要介護認定状況を第1表に、うち、平成11年と平成13年の要介護度別分布の変化を在宅、施設別にそれぞれ第1図、第2図に示す。第1表のすべての項目において、平成11年に比較して平成13年は有意(有意水準5%)に平均値が高くなっていった。要介護度別の分布をグラフで視覚化した場合(第1~2図)にも、在宅、施設ともに平成13年には要介護度がより重度の方に分布が変化していることが確認された。

老年人口に占める要介護者割合、平均要介護度、在宅および施設入所要介護者に占める要介護5割合は、平成11年に対し平成13年の方が標準偏差は縮小し(第1表)、その分布(第3~6図)は、平成13年の方が全

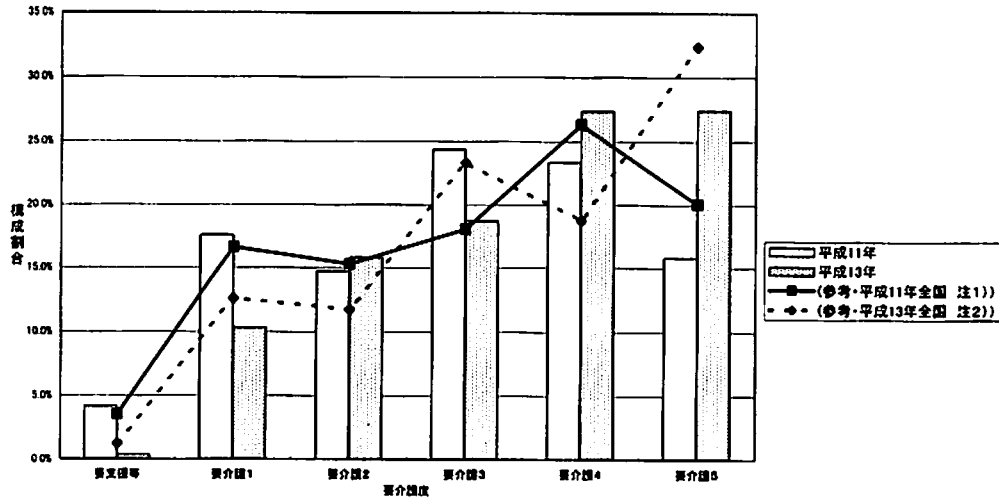
小池：介護保険制度導入と介護サービスの变化



第1図 要介護度別分布の変化（在宅）

注1) 平成11年末現在、在宅入所要介護者等 207,664 名、施設入所要介護者等 82,042 名に関する厚生省調査<sup>24)</sup>結果を参考値として掲載。

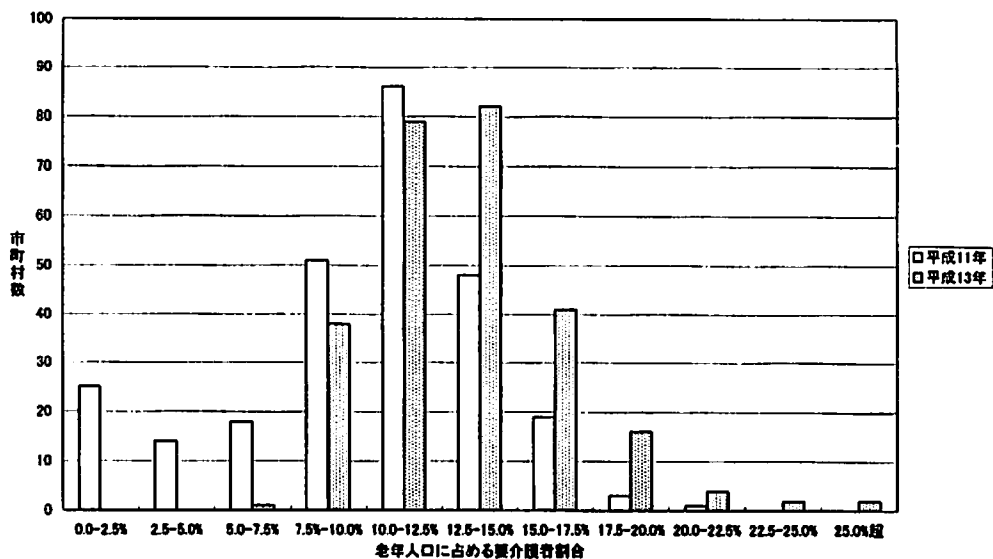
注2) 平成13年度累計（平成13年3月サービス分から平成14年2月サービス分までの累計）、18,241,085 名に関する厚生労働省調査<sup>25)</sup>結果を参考値として掲載。



第2図 要介護度別分布の変化（施設）

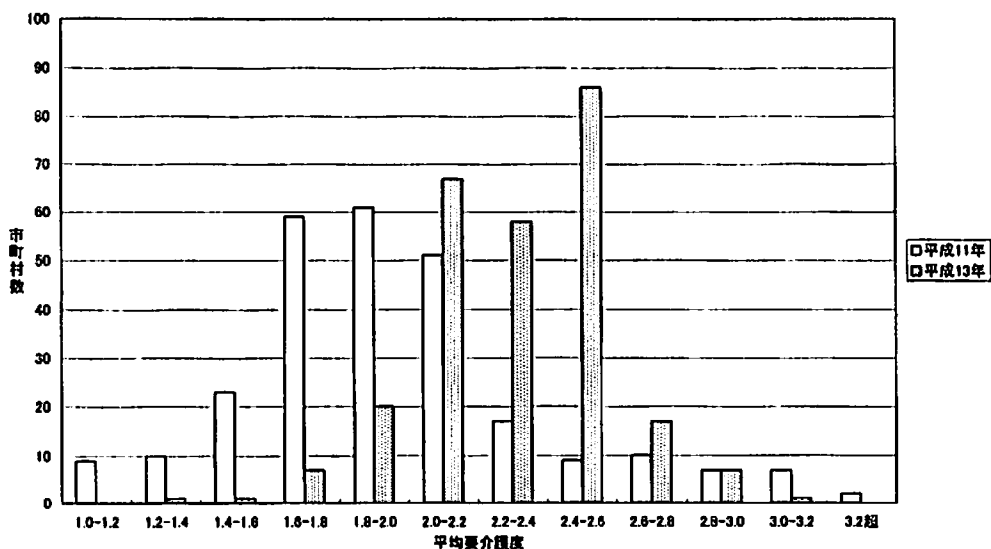
注1) 平成11年末現在、在宅入所要介護者等 207,664 名、施設入所要介護者等 82,042 名に関する厚生省調査<sup>24)</sup>結果を参考値として掲載。

注2) 平成13年10月末現在、推計介護保険施設入所者 642,964 名に関する厚生労働省調査<sup>26)</sup>結果を参考値として掲載。



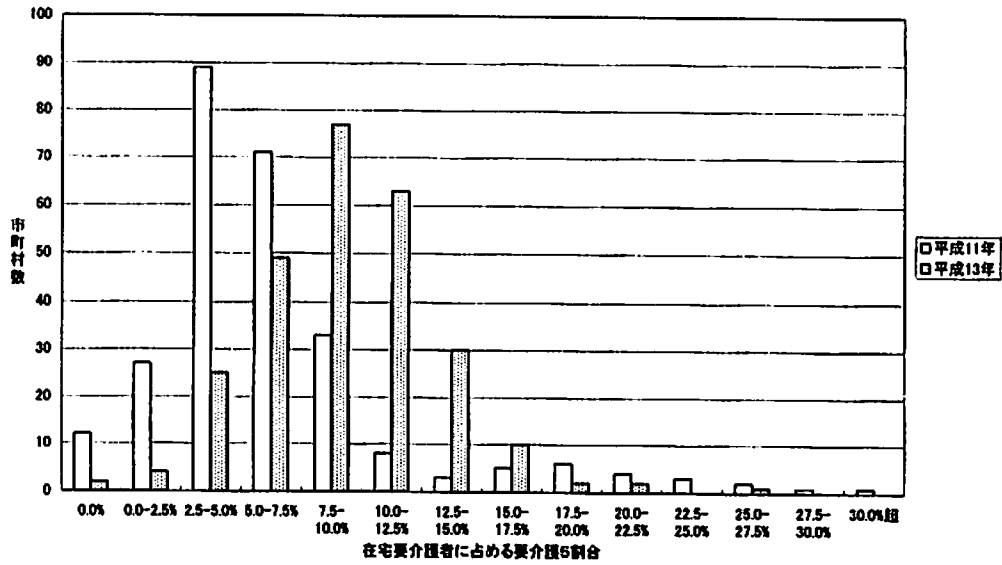
第3図 老年人口に占める要介護者割合の市町村別分布

注) 区分は上限を含み, 下限は含まない。

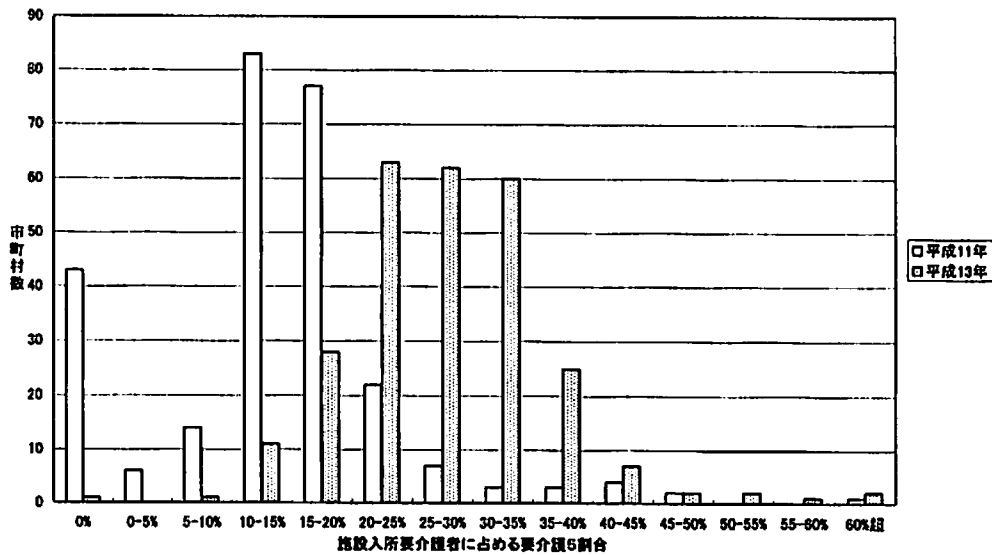


第4図 平均要介護度の市町村別分布

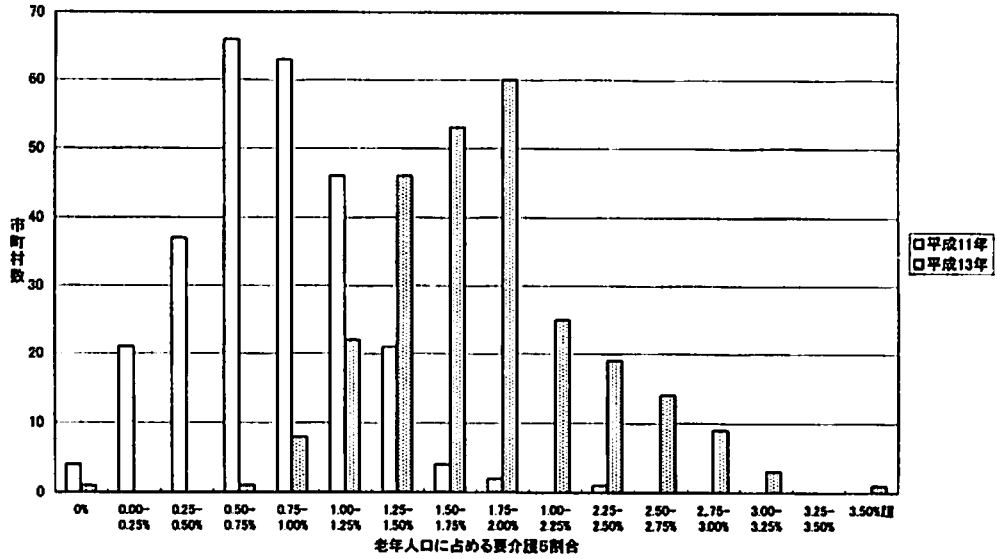
注) 区分は上限を含み, 下限は含まない。



第5図 在宅要介護者に占める要介護5割合の市町村別分布  
注) 区分は上限を含み、下限は含まない。



第6図 施設入所要介護者に占める要介護5割合の市町村別分布  
注) 区分は上限を含み、下限は含まない。



第7図 老年人口に占める要介護5割合の市町村別分布  
注) 区分は上限を含み, 下限は含まない。

第1表 平成11年と平成13年の要介護認定状況の比較結果

|                       | 平均値   | 標準偏差  | 最小値  | 25パーセント<br>ンタイル値 | 中央値   | 75パーセント<br>ンタイル値 | 最大値    | 最大値-<br>最小値 |
|-----------------------|-------|-------|------|------------------|-------|------------------|--------|-------------|
| 老年人口に占める要介護者割合(%)     | 10.05 | 4.16  | 0.82 | 8.37             | 10.72 | 12.67            | 21.48  | 21.48       |
|                       | 13.25 | 3.27  | 6.62 | 10.94            | 12.84 | 14.97            | 30.61  | 30.61       |
| 平均要介護度                | 1.96  | 0.43  | 1.06 | 1.69             | 1.92  | 2.13             | 3.23   | 3.23        |
|                       | 2.31  | 0.27  | 1.33 | 2.14             | 2.32  | 2.51             | 3.16   | 3.16        |
| 在宅要介護者に占める要介護5割合(%)   | 6.40  | 5.26  | 0.00 | 3.82             | 4.70  | 5.17             | 33.33  | 33.33       |
|                       | 9.33  | 3.64  | 0.00 | 7.71             | 5.09  | 8.70             | 25.76  | 25.76       |
| 施設入所要介護者に占める要介護5割合(%) | 14.49 | 10.71 | 0.00 | 10.79            | 14.37 | 17.95            | 100.00 | 100.00      |
|                       | 27.63 | 8.54  | 0.00 | 22.58            | 27.03 | 32.08            | 75.00  | 75.00       |
| 老年人口に占める要介護5割合(%)     | 0.78  | 0.38  | 0.00 | 0.52             | 0.77  | 1.04             | 2.39   | 2.39        |
|                       | 1.83  | 0.62  | 0.00 | 1.44             | 1.76  | 2.06             | 6.17   | 6.17        |

上段 平成11年 下段 平成13年

第2表 人口規模と介護保険実施状況

|                         | Spearman の<br>順位相関係数 | 人口区分      |         |                 |                   |                   |           | Kruskal Wallis<br>検定結果<br>漸近有意確率 | Games-Howell 法による多重比較結果 <sup>1)</sup> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|-------------------------|----------------------|-----------|---------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------|----------------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
|                         |                      | 全体        | 0~4,999 | 5,000~<br>9,999 | 10,000~<br>19,999 | 20,000~<br>49,999 | 50,000~   |                                  | 0-1                                   | 0-2 | 0-3 | 0-4 | 1-2 | 1-3 | 1-4 | 2-3 | 2-4 | 3-4 |   |
| 総人口                     |                      | 46,658.5  | 3,074.5 | 7,367.1         | 14,142.8          | 31,789.5          | 161,788.8 | 0.000 **                         | *                                     | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   |   |
| 老年人口割合(%)               | -0.710 **            | 21.30     | 27.90   | 24.26           | 21.65             | 18.91             | 15.41     | 0.000 **                         | *                                     | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   | *   |   |
| 平均要介護度                  | 平成11年                | 0.057     | 1.96    | 1.76            | 2.02              | 2.06              | 2.05      | 1.65                             | 0.002 **                              | *   | *   |     |     |     |     |     |     | *   | * |
|                         | 平成13年                | 0.099     | 2.31    | 2.20            | 2.33              | 2.33              | 2.36      | 2.31                             | 0.087                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 増加(差)                | 0.047     | 0.35    | 0.43            | 0.31              | 0.27              | 0.31      | 0.46                             | 0.185                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| 老年人口に占める要介護5割合(%)       | 平成11年                | 0.060     | 10.05   | 10.14           | 10.06             | 9.81              | 9.12      | 11.02                            | 0.191                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 平成13年                | -0.103    | 13.25   | 14.77           | 12.83             | 13.60             | 12.30     | 13.09                            | 0.011 *                               |     | *   |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 増加(差)                | -0.104    | 3.20    | 4.63            | 2.77              | 3.79              | 3.19      | 2.07                             | 0.319                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| 老年人口に占める要介護5割合(%)       | 平成11年                | 0.046     | 0.78    | 0.66            | 0.83              | 0.83              | 0.76      | 0.79                             | 0.333                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 平成13年                | -0.072    | 1.83    | 1.95            | 1.84              | 1.91              | 1.72      | 1.73                             | 0.579                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 増加(差)                | -0.078    | 1.05    | 1.30            | 1.01              | 1.08              | 0.97      | 0.94                             | 0.334                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| 在宅要介護者に占める要介護5割合(%)     | 平成11年                | 0.092     | 6.40    | 3.81            | 7.07              | 7.52              | 7.76      | 5.25                             | 0.000 **                              | *   | *   | *   |     |     |     |     |     |     | * |
|                         | 平成13年                | 0.041     | 9.33    | 8.85            | 9.65              | 9.21              | 9.76      | 9.08                             | 0.591                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 増加(差)                | 0.014     | 2.93    | 5.04            | 2.58              | 1.69              | 2.00      | 3.83                             | 0.010 **                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| 施設入所要介護者に占める要介護5割合(%)   | 平成11年                | -0.030    | 14.49   | 13.60           | 15.75             | 15.81             | 14.08     | 12.93                            | 0.818                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 平成13年                | -0.066    | 27.83   | 28.49           | 28.68             | 28.68             | 27.22     | 26.23                            | 0.307                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 増加(差)                | -0.031    | 13.34   | 14.89           | 12.93             | 12.87             | 13.14     | 13.29                            | 0.970                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| 単位老年人口あたり介護保険専従職員数      | -0.208 **            | 0.86      | 1.37    | 0.93            | 0.77              | 0.80              | 0.56      | 0.035 *                          |                                       |     |     | *   |     |     |     | *   |     |     |   |
| 衛生費と民生費の和が一般歳出に占める割合(%) | 0.555 **             | 25.67     | 20.66   | 22.35           | 25.67             | 28.02             | 30.54     | 0.000 **                         |                                       | *   | *   | *   | *   | *   | *   |     |     | *   |   |
| 単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数    | 平成11年                | 0.186 **  | 0.319   | 0.229           | 0.310             | 0.289             | 0.313     | 0.420                            | 0.028 *                               |     |     |     | *   |     |     |     |     |     |   |
|                         | 平成13年                | 0.133     | 0.682   | 0.668           | 0.604             | 0.641             | 0.651     | 0.840                            | 0.258                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 増加(差)                | 0.020     | 0.376   | 0.484           | 0.301             | 0.365             | 0.331     | 0.420                            | 0.776                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| 介護保険料                   | 0.115                | 2,757     | 2,850   | 2,658           | 2,711             | 2,683             | 2,903     | 0.006 **                         |                                       |     |     |     |     |     |     | *   |     | *   | * |
| 単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数   | 平成11年                | -0.380 ** | 0.016   | 0.022           | 0.018             | 0.016             | 0.012     | 0.012                            | 0.000 **                              |     |     | *   | *   |     | *   | *   | *   | *   | * |
|                         | 平成13年                | -0.404 ** | 0.017   | 0.023           | 0.020             | 0.017             | 0.013     | 0.013                            | 0.000 **                              |     |     | *   | *   |     | *   | *   | *   | *   | * |
| 単位老年人口あたり介護法人保健施設入居者数   | 平成11年                | 0.142 *   | 0.008   | 0.007           | 0.006             | 0.008             | 0.011     | 0.008                            | 0.246                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 平成13年                | 0.365 **  | 0.011   | 0.009           | 0.008             | 0.011             | 0.012     | 0.013                            | 0.000 **                              |     |     |     |     | *   | *   | *   |     |     |   |
| 単位老年人口あたり一般病床数          | 平成11年                | 0.621 **  | 0.038   | 0.010           | 0.025             | 0.027             | 0.053     | 0.067                            | 0.000 **                              |     | *   | *   |     | *   | *   | *   | *   | *   | * |
|                         | 平成13年                | 0.347 **  | 0.001   | 0.000           | 0.001             | 0.002             | 0.001     | 0.002                            | 0.000 **                              |     |     | *   |     | *   |     | *   | *   | *   | * |
| 単位老年人口あたり療養型医療施設病床数     | 平成11年                | 0.479 **  | 0.007   | 0.004           | 0.007             | 0.004             | 0.010     | 0.009                            | 0.000 **                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|                         | 平成13年                | 0.496 **  | 0.011   | 0.005           | 0.010             | 0.010             | 0.015     | 0.016                            | 0.000 **                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |

| 市町村数 | 市   | 町  | 村  | 合計 |
|------|-----|----|----|----|
| 80   |     |    |    |    |
| 142  | 14  | 42 | 57 | 29 |
| 43   | 27  | 16 |    |    |
| 合計   | 265 | 41 | 58 | 57 |

注) 紙面の都合上、多重比較の組合せは、以下の区分を示す数字を用いている。(例: 0-1: 0~4,999区分と 5,000~9,999区分の比較)  
 0: 0~4,999      1: 5,000~9,999      2: 10,000~19,999  
 3: 20,000~49,999      4: 50,000~

\*\* 有意水準1%  
 \* 有意水準5%

体として市町村格差が縮小する方向にあることが確認された。一方、老年人口に占める要介護5割合では平成11年に対し平成13年の方が標準偏差は拡大(第1表)し、その分布(第7図)は、平成13年の方が全体として市町村格差が拡大する方向にあることが確認された。

### 3. 市町村規模と介護保険制度運営の関係(第2表)

市町村人口規模別の特徴、および介護保険運営上の最適人口規模について検討するため、市町村人口と各種指標間の Spearman の順位相関係数を算出するとともに、人口規模によって市町村を5群(人口0~4,999区分、人口5,000~9,999区分、人口10,000~19,999区分、人口20,000~49,999区分、人口50,000~区分)に分け、5群間で各種指標の平均値の比較を行った。

市町村人口と各種指標との間の Spearman の順位相関係数において、有意水準1%で有意な項目を以下に示す。衛生費と民生費が一般歳出に占める割合、平成11年および平成13年の単位老年人口あたり一般病床数、平成11年および平成13年の単位老年人口あたり療養型医療施設病床数について比較的強い正の相関が、平成13年の単位老年人口あたり介護老人保健施設入居者数、平成11年の単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数について弱い正の相関が認められた。また、老年人口割合について強い負の相関が、平成11年および平成13年の単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数について比較的弱い負の相関が、単位老年人口あたり介護保険専従職員数について弱い負の相関が認められた。

人口規模によって分類した5群間の平均値を比較すると、有意水準1%で有意差が認められたのは、総人口、老年人口割合、平成11年の平均要介護度、平成11年の在宅要介護者に占める要介護5割合、在宅要介護者に占める要介護5割合の平成11年と平成13年の差、衛生費と民生費の和が一般歳出に占める割合、介護保険料、平成11年と平成13年の単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数、平成13年の介護老人保健施設入居者数、平成11年と平成13年の単位老年人口あたり一般病床数、平成11年と平成13年の単位老年人口あたり療養型医療施設病床数であった。有意水準5%で有意差が認められたのは、平成13年の老年人口に占める要介護者割合、単位老年人口あたり介護保険専従職員数、平成11年の単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数であった。

人口規模によって分類した場合の各群の平均値を比較すると、Kruskal Wallis 検定の結果からは、老年人口割合、単位老年人口あたり介護保険専従職員数、単位老

年人口あたり介護老人福祉施設入居者数(平成11年、平成13年)については、人口規模が大きい群ほど小さい傾向が認められた。一方、衛生費と民生費の和が一般歳出に占める割合、平成11年の単位老年人口あたり一般病床数、平成13年の単位老年人口あたり療養型医療施設病床数については、人口規模が大きい群ほど大きい傾向が認められた。

人口2万以上5万未満の群において、平成11年の在宅要介護者に占める要介護5割合および平成11年の単位老年人口あたり療養型医療施設病床数については最も高く、平成13年の老年人口に占める要介護者割合では最も低いという傾向が認められた。

Games-Howell 法による多重比較を行ったところ、いずれも有意水準5%で衛生費と民生費の和が一般歳出に占める割合では人口0~4,999区分、人口5,000~9,999区分が他の区分に比較して低く、平成11年の平均要介護度では人口10,000~19,999区分、人口20,000~49,999区分に比較して人口0~4,999区分が低く人口50,000~区分が高かった。平成11年の在宅要介護者に占める要介護5割合では人口0~4,999区分が人口5,000~9,999区分、人口10,000~19,999区分、人口20,000~49,999区分に比較して低く、単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数(平成11年、平成13年)では人口20,000~49,999区分、人口50,000~区分が他の人口区分に比較して低かった。平成13年の単位老年人口あたり介護老人保健施設入居者数は人口5,000~9,999区分が他の人口区分に比較して低かった。平成11年単位老年人口あたり一般病床数は人口20,000~49,999区分、人口50,000~区分が他の人口区分に比較して高かった。

### 4. 施設整備状況との関係(第3表)

介護保険制度に関連する施設整備状況と介護保険制度の実施状況との関係を検討するため、平成11年の単位老年人口あたり施設入居者数または病床数および平成13年の単位老年人口あたり施設入居者数または病床数について、各種指標との間の Spearman の順位相関係数を算出した。以下に有意水準1%で有意な項目を示す。

平成11年の単位老年人口あたり介護老人福祉施設、介護老人保健施設、療養型医療施設(医療型を含む)の3施設類型の入居者数・病床数の和(以下、3施設類型の和)に関して、老年人口に占める要介護5割合および老年人口に占める要介護者割合と弱い正の相関が認められた。また、単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数に関しては、老年人口に占める要介護5割合に対し



第3表 平成11年と平成13年の介護施設整備状況と要介護認定状況との Spearman の順位相関係数

| 平成11年                | 単位老年人口あたり施設入居者・病床数 |              |             |             |         |
|----------------------|--------------------|--------------|-------------|-------------|---------|
|                      | 介護老人<br>福祉施設       | 介護老人<br>保健施設 | 療養型<br>医療施設 | 3施設<br>類型の和 | 一般病床    |
| 平均要介護度               | 0.119              | 0.035        | -0.005      | 0.080       | 0.093   |
| 老年人口に占める要介護者割合       | 0.069              | 0.090        | 0.198 **    | 0.234 **    | 0.107   |
| 老年人口に占める要介護5割合       | 0.169 **           | 0.180 **     | 0.147 *     | 0.308 **    | 0.107   |
| 在宅要介護者に占める要介護5割合     | -0.032             | -0.015       | -0.101      | -0.132 *    | 0.020   |
| 施設入所要介護者に占める要介護5割合   | -0.005             | 0.060        | -0.028      | 0.039       | -0.001  |
| 単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数 | 0.046              | 0.154 *      | 0.133 *     | 0.123       | 0.158 * |

| 平成13年                | 単位老年人口あたり施設入居者・病床数 |              |             |             |          |
|----------------------|--------------------|--------------|-------------|-------------|----------|
|                      | 介護老人<br>福祉施設       | 介護老人<br>保健施設 | 療養型<br>医療施設 | 3施設<br>類型の和 | 一般病床     |
| 平均要介護度               | -0.194 **          | -0.063       | -0.080      | -0.251 **   | -0.103   |
| 老年人口に占める要介護者割合       | 0.447 **           | 0.199 **     | 0.067       | 0.435 **    | 0.146 *  |
| 老年人口に占める要介護5割合       | 0.336 **           | 0.089        | -0.018      | 0.229 **    | 0.056    |
| 在宅要介護者に占める要介護5割合     | -0.208 **          | -0.105       | -0.107      | -0.296 **   | -0.144 * |
| 施設入所要介護者に占める要介護5割合   | 0.128 *            | -0.114       | -0.051      | -0.030      | -0.006   |
| 単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数 | -0.230 **          | -0.076       | -0.063      | -0.214 **   | -0.038   |

\*\* 有意水準1%  
\* 有意水準5%

て正の相関が、単位老年人口あたり介護老人保健施設入居者数に関しては、老年人口に占める要介護5割合に対して正の相関が、単位老年人口あたり療養型医療施設(医療型を含む)病床数に関しては、老年人口に占める要介護者割合と正の相関が、それぞれ認められた。

平成13年の単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数に関しては、老年人口に占める要介護者割合と比較的強い正の相関が、老年人口に占める要介護5割合と弱い正の相関が、在宅要介護者に占める要介護5割合、単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数と弱い負の相関が、平均要介護度と負の相関が認められた。単位老年人口あたり介護老人保健施設入居者数に関しては、老年人口に占める要介護者割合と正の相関が認められた。単位老年人口あたり3施設類型の和に関しては、老年人口に占める要介護者割合と比較的強い正の相関が、老年人口に占める要介護5割合と弱い正の相関が、平均要介護度、在宅要介護者に占める要介護5割合と単位老人福祉施設入所者あたり待機者数と弱い負の相関が、それぞ

れ認められた。

5. 平成11年時点の要介護認定の状況に着目した分析結果(第4～6表)

市町村の介護保険制度導入前後(平成11年と平成13年)における要介護認定の状況などの変化を検討するため、平成11年調査における要介護認定を受けた者の割合、平均要介護度および老年人口に占める要介護5割合が分析対象市町村の中で「小さい(低い)」、「中程度」、「大きい(高い)」かどうかという点に着目して、各群に含まれる市町村数が同数(85市町村)となるように3群に分類し、各群での各種指標の平均値を比較した。

平均要介護度に加えて、老年人口に占める要介護5割合も分類対象としたのは、①全体としては平均要介護度が高い方にシフトしていても、個々の自治体を見た場合、要介護5割合が高くなる場合も低くなる場合もあると考えられること、②平均要介護度と、老年人口に占める要介護5割合との間の Spearman の順位相関係

数は0.107 (p=0.083)と、双方の指標には明らかな相関は認められないことから、特に要介護度5の割合が増えている市町村と、全体的に要介護度が高い方向に変化している市町村との違いを見ることで、要介護認定者の状況をより詳細に分析することができると考えたからである。

1) 平成11年時点の老年人口に占める要介護認定を受けた者に着目した分析 (第4表)

平成11年の老年人口に占める要介護認定を受けた者の割合が小さい群、中程度の群、大きい群の3群を比較した場合、平成11年および平成13年の平均要介護度、平成11年および平成13年の老年人口に占める要介護者割合、平成11年の老年人口に占める要介護5割合、平成11年および平成13年の在宅要介護者に占める要介護5割合、介護保険料に関して有意水準1%で有意差が認められた。また平成11年の施設入所要介護者に占

める要介護5割合に関して有意水準5%で有意差が認められた。平成11年では3群間で差があるとされた老年人口に占める要介護5割合、施設入所要介護者に占める要介護5割合に関して、平成13年では3群間に有意差を認めなかった。

2) 平成11年の平均要介護度に着目した分析 (第5表)

平成11年時点の平均要介護度が低い群、中程度の群、高い群の3群を比較した場合、平成11年の平均要介護度、平成11年の老年人口に占める要介護者割合、平成11年および平成13年の老年人口に占める要介護5割合、平成11年および平成13年の在宅要介護者に占める要介護5割合、平成11年の施設入所要介護者に占める要介護5割合、平成11年および平成13年の単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数に関して有意水準1%で有意差が認められ、また平成13年の平均要介護度に関して有意水準5%で有意差が認められた。平成

第4表 平成11年時点の要介護認定を受けた者の割合に着目した分析

|                                   |       | H11 認定者 | H11 認定者 | H11 認定者 | 合計     | Kruskal Wallis 検定 |
|-----------------------------------|-------|---------|---------|---------|--------|-------------------|
|                                   |       | 割合小さい   | 割合中程度   | 割合大きい   |        | 漸近有意確率            |
| 総人口                               |       | 27,508  | 42,599  | 67,425  | 46,659 | 0.208             |
| 老年人口                              |       | 4,946   | 7,170   | 10,448  | 7,632  | 0.262             |
| 老年人口 (%)                          |       | 21.92   | 20.95   | 21.05   | 21.30  | 0.430             |
| 平均要介護度                            | 平成11年 | 2.19    | 1.87    | 1.83    | 1.96   | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 2.38    | 2.32    | 2.24    | 2.31   | 0.000 **          |
| 老年人口に占める要介護者割合 (%)                | 平成11年 | 5.22    | 10.48   | 13.98   | 10.05  | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 12.57   | 12.79   | 14.28   | 13.25  | 0.000 **          |
| 老年人口に占める要介護5割合 (%)                | 平成11年 | 0.52    | 0.79    | 1.01    | 0.78   | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 1.86    | 1.74    | 1.87    | 1.83   | 0.153             |
| 在宅要介護者に占める要介護5割合 (%)              | 平成11年 | 9.76    | 5.26    | 4.41    | 6.40   | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 10.67   | 8.94    | 8.48    | 9.33   | 0.000 **          |
| 施設入所要介護者に占める要介護5割合 (%)            | 平成11年 | 15.77   | 12.32   | 15.29   | 14.49  | 0.021 *           |
|                                   | 平成13年 | 28.54   | 27.50   | 27.50   | 27.83  | 0.885             |
| 衛生費と民生費の合計が一般歳出に占める割合 (%) (平成11年) |       | 24.36   | 26.57   | 26.04   | 25.67  | 0.111             |
| 単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数              | 平成11年 | 0.28    | 0.32    | 0.36    | 0.32   | 0.642             |
|                                   | 平成13年 | 0.67    | 0.71    | 0.67    | 0.68   | 0.758             |
| 単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数             | 平成11年 | 0.015   | 0.015   | 0.017   | 0.016  | 0.687             |
|                                   | 平成13年 | 0.016   | 0.016   | 0.019   | 0.017  | 0.626             |
| 単位老年人口あたり介護保険専従職員数 (平成11年)        |       | 0.95    | 0.79    | 0.84    | 0.86   | 0.427             |
| 介護保険料                             |       | 2581.6  | 2714.3  | 2951.9  | 2756.9 | 0.000 **          |

\*\* 有意水準1%  
\* 有意水準5%

第5表 平成11年時点の平均要介護度に着目した分析

|                                   |       | H11 平均 | H11 平均 | H11 平均 | 合計     | Kruskal Wallis 検定 |
|-----------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|-------------------|
|                                   |       | 要介護度低い | 要介護中程度 | 要介護度高い |        | 漸近有意確率            |
| 総人口                               |       | 48,783 | 56,584 | 35,657 | 46,659 | 0.234             |
| 老年人口                              |       | 7,813  | 8,769  | 6,427  | 7,632  | 0.171             |
| 老年人口 (%)                          |       | 21.64  | 20.62  | 21.61  | 21.30  | 0.606             |
| 平均要介護度                            | 平成11年 | 1.54   | 1.90   | 2.39   | 1.96   | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 2.26   | 2.31   | 2.36   | 2.31   | 0.027 *           |
| 老年人口に占める要介護者割合 (%)                | 平成11年 | 11.20  | 11.31  | 7.85   | 10.05  | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 12.91  | 13.35  | 13.47  | 13.25  | 0.572             |
| 老年人口に占める要介護5割合 (%)                | 平成11年 | 0.58   | 0.87   | 0.88   | 0.78   | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 1.66   | 1.82   | 1.99   | 1.83   | 0.000 **          |
| 在宅要介護者に占める要介護5割合 (%)              | 平成11年 | 3.23   | 5.36   | 10.21  | 6.40   | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 8.65   | 9.13   | 10.12  | 9.33   | 0.005 **          |
| 施設入所要介護者に占める要介護5割合 (%)            | 平成11年 | 10.59  | 14.73  | 17.80  | 14.49  | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 27.07  | 27.58  | 28.76  | 27.83  | 0.330             |
| 衛生費と民生費の合計が一般歳出に占める割合 (%) (平成11年) |       | 25.75  | 26.42  | 24.88  | 25.67  | 0.516             |
| 単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数              | 平成11年 | 0.33   | 0.31   | 0.32   | 0.32   | 0.972             |
|                                   | 平成13年 | 0.78   | 0.65   | 0.62   | 0.68   | 0.196             |
| 単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数             | 平成11年 | 0.015  | 0.015  | 0.017  | 0.016  | 0.006 **          |
|                                   | 平成13年 | 0.016  | 0.016  | 0.019  | 0.017  | 0.005 **          |
| 単位老年人口あたり介護保険専従職員数 (平成11年)        |       | 101.64 | 76.84  | 79.77  | 85.83  | 0.460             |
| 介護保険料                             |       | 2744.9 | 2790.7 | 2736.0 | 2756.9 | 0.699             |

\*\* 有意水準1%

\* 有意水準5%

11年では3群間で差があるとされた老年人口に占める要介護者割合、要介護者に占める要介護5割合、平成11年施設入所要介護者に占める要介護5割合に関しては、平成13年では3群間に有意差を認めなかった。

3) 平成11年の老年人口に占める要介護5割合に着目した分析 (第6表)

平成11年時点の老年人口に占める要介護5割合が小さい群、中程度の群、大きい群の3群を比較した場合、平成11年の平均要介護度、平成11年および平成13年の老年人口に占める要介護者割合、平成11年および平成13年の在宅要介護者に占める要介護5割合、平成11年の施設入所要介護者に占める要介護5割合、平成11年および平成13年の単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数、平成11年の単位老年人口あたり介護保険専

従職員数、介護保険料に関して有意水準1%で有意差が認められた。また、平成13年の平均要介護度、平成11年および平成13年の在宅要介護者に占める要介護5割合に関して有意水準5%で有意差が認められた。平成11年では3群間で差があるとされた施設入所要介護者に占める要介護5割合に関しては、平成13年では3群間に有意差を認めなかった。

## 考 察

### 1. 市町村規模と介護保険の運営に関する考察

本研究の本来の目的は市町村の適正な総人口規模を求めることではない。しかし、この問題は効率的な介護保険制度運営のための議論の基礎として重要であるので、利用可能なデータを用いて探求的に検討した。

第6表 平成11年時点の老年人口に占める要介護5割合に着目した分析

|                                   |       | H11 要介護5 | H11 要介護5 | H11 要介護5 | 合計     | Kruskal Wallis 検定 |
|-----------------------------------|-------|----------|----------|----------|--------|-------------------|
|                                   |       | 割合小さい    | 割合中程度    | 割合大きい    |        | 漸近有意確率            |
| 総人口                               |       | 34,684   | 58,120   | 46,988   | 46,659 | 0.104             |
| 老年人口                              |       | 5,773    | 8,803    | 8,222    | 7,632  | 0.106             |
| 老年人口 (%)                          |       | 21.53    | 20.14    | 22.12    | 21.30  | 0.065             |
| 平均要介護度                            | 平成11年 | 1.85     | 1.99     | 2.02     | 1.96   | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 2.34     | 2.36     | 2.25     | 2.31   | 0.012 *           |
| 老年人口に占める要介護者割合 (%)                | 平成11年 | 7.01     | 9.93     | 12.81    | 10.05  | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 12.70    | 12.12    | 14.73    | 13.25  | 0.000 **          |
| 老年人口に占める要介護5割合 (%)                | 平成11年 | 0.35     | 0.75     | 1.18     | 0.78   | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 1.76     | 1.71     | 1.99     | 1.83   | 0.002 **          |
| 在宅要介護者に占める要介護5割合 (%)              | 平成11年 | 6.28     | 6.88     | 6.07     | 6.40   | 0.021 *           |
|                                   | 平成13年 | 9.48     | 10.06    | 8.55     | 9.33   | 0.019 *           |
| 施設入所要介護者に占める要介護5割合 (%)            | 平成11年 | 11.65    | 14.01    | 17.40    | 14.49  | 0.000 **          |
|                                   | 平成13年 | 27.92    | 27.26    | 28.27    | 27.83  | 0.187             |
| 衛生費と民生費の合計が一般歳出に占める割合 (%) (平成11年) |       | 24.51    | 26.43    | 26.03    | 25.67  | 0.154             |
| 単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数              | 平成11年 | 0.29     | 0.28     | 0.39     | 0.32   | 0.105             |
|                                   | 平成13年 | 0.73     | 0.72     | 0.61     | 0.68   | 0.129             |
| 単位老年人口あたり介護老人福祉施設入居者数             | 平成11年 | 0.016    | 0.013    | 0.018    | 0.016  | 0.002 **          |
|                                   | 平成13年 | 0.017    | 0.014    | 0.019    | 0.017  | 0.001 **          |
| 単位老年人口あたり介護保険専従職員数 (平成11年)        |       | 1.07     | 0.75     | 0.77     | 0.86   | 0.006 **          |
| 介護保険料                             |       | 2678.9   | 2641.1   | 2928.9   | 2756.9 | 0.000 **          |

\*\* 有意水準1%  
\* 有意水準5%

市町村規模とその効率性に関する過去の研究では、財政支出を極小化するという観点から最適人口規模として20万程度<sup>11)</sup>、29万程度<sup>12)</sup>とする研究がある。また、介護分野に関して地方自治体および専門家からの聴取を元に、適正な運営には少なくとも人口規模5万人程度が必要だとする研究<sup>13)</sup>などもあるが、介護保険の運営上の最適人口規模を求めるための指標については、その存在の有無を含めて明らかではない。なお、人口そのものの以外にも、面積や人口の集中の問題など、考慮すべき課題は多い<sup>14)</sup>点にも留意する必要がある。

仮に市町村に適正規模が存在するとすれば、①単位老年人口あたり資源投下量、②提供サービス量、③介護の必要の程度やサービスを必要とする者の数について、人口規模と何らかの関係が見いだされることが期待される。本研究のデータからは、単一の目的変数を見いだせないため、各種指標について、まず人口規模との相関を調べ、

次に、人口規模別に5群に分けて各群の平均値を比較することにより、探求的に市町村の適正規模に関する知見を得ようと試みた。

資源投下量を反映する指標としては、老年人口あたり介護保険専従職員数、衛生費と民生費の和が一般歳出に占める割合、介護保険料が、提供サービス量を反映する指標としては、単位老年人口あたり施設整備状況(介護老人福祉施設入居者数、介護老人保健施設入居者数など)が、介護の必要の程度やサービスを反映する指標としては、老年人口に占める要介護5割合や平均要介護度が、それぞれ考えられるが、本研究結果からは、市町村規模と介護保険制度運営に関する関係について一定の知見が得られたものの、市町村の適正規模を明らかにするにはいたらなかった。

人口2万以上5万未満の群において、平成11年の在宅要介護者に占める要介護5割合および平成11年の単

位老年人口あたり療養型医療施設病床数については最も高い、という傾向が認められたが、第2表下段で、人口2万以上5万未満の群では町と市の双方が含まれている点も考慮すると、この区分の特徴が人口規模という観点のみから他の区分と異なった特徴を有するかどうかについては結論を得ることができなかった。

## 2. 介護保険制度の導入が市町村に及ぼした影響とその背景

### 1) 介護保険制度の導入が市町村の介護サービスの差に及ぼした影響

市町村の要介護認定状況において、本調査対象となった265市町村全体では、在宅、施設ともに要介護度がより重度の方向にシフト（第1表、第1～2図）する一方、老年人口に占める要介護者割合、平均要介護度、在宅および施設入所要介護者に占める要介護5割合に関して、標準偏差が縮小し、分布がより大きい（高い）方向にシフトすると同時にばらつきも小さくなっていった（第1表、第3～6図）。さらに、老年人口に占める要介護認定を受けた者の割合、平均要介護度、老年人口に占める要介護5割合により市町村を3群に分類し、平成13年の各種指標を比較した結果（第4～6表）から、介護保険制度導入により、市町村の格差が平準化されたと考えられる。この傾向は、特に平均要介護度で3群に分類した場合（第5表）で顕著であった。これには、以下のような市町村格差をより少なくするためのシステムが導入された点が背景として考えられる。①介護保険制度導入以前の福祉制度における措置決定は、「市町村が『本人の介護の必要性のほか、家族や経済的な状況、地域のサービス状況等を総合的に判定する行為』であり、市町村に裁量が認められて」<sup>15)</sup>いたが、介護保険制度の導入後は、要介護認定制度が設けられたことによって、介護の必要の程度という概念が「要介護認定等基準時間」という形で一元的に整理された。②市町村別に第1号被保険者から保険料を集めることに加え、第2号被保険者から集めた保険料を全国レベルでいったんプールし、市町村に介護給付費交付金を交付するという制度が設けられた。③調整交付金制度により、公費からの支援部分に関して後期高齢者加入割合および所得段階別加入割合に基づく調整がなされた。

ただし、これらのシステムでは調整しきれないリスクや、市町村独自の取り組みによる結果も反映されていること、また、老年人口に占める要介護5割合については標準偏差が逆に大きくなっている点などにも注意する必要がある。

### 2) 介護保険制度の導入と施設整備状況

介護保険制度導入前後で、単位老年人口あたり施設入居者数・病床数という市町村の施設整備状況を表す指標と、要介護者の状況を表す各種指標との間の相関分析（第3表）の結果を見ると、有意な相関を示す項目が介護保険制度導入後に増加すると同時に、相関を示している項目に関して、介護保険制度からみた施設類型別の機能と矛盾していない点は、介護保険制度導入の効果を示唆する結果として注目される。

具体的には、以下の点が挙げられる。①老年人口に占める要介護者割合は、平成11年には、単位老年人口あたり療養型医療施設病床数と相関を示し、介護老人福祉施設や介護老人保健施設とは明らかな相関を示さなかったが、介護保険制度導入後は、介護老人福祉施設、介護老人保健施設といった、より介護サービスに特化した施設の整備状況と相関を示し、療養型医療施設の整備状況とは明らかな相関を示さなくなった。②介護保険制度導入後に、介護老人福祉施設の整備の進んでいる市町村では、平均要介護度、在宅要介護者に占める要介護5割合、単位介護老人福祉施設入居者あたり待機者数が少なくなるという傾向が示唆された。③介護保険制度導入後、要介護者のうち介護度の高い（要介護5の）者が多い市町村ほど3施設類型のうち特に介護老人福祉施設の整備状況と相関が強いという傾向が示唆された。

ただし、本研究結果では、療養型医療施設の病床数を介護型と医療型に分類していない点、また、介護予防その他の施設整備以外の活動の影響については明らかにできない点には注意する必要がある。

### 3) 介護保険制度導入後の変化とその要因に関する考察

介護保険制度の導入後の市町村の格差の平準化について、平成11年時点の老年人口に占める要介護認定を受けた者の割合（第4表）、老年人口に占める要介護5割合（第6表）に着目して考察する。

平成11年の時点で要介護認定を受けた者の割合が多い市町村では、平成11年の老年人口に占める要介護5割合が高いにもかかわらず、平成11年の平均要介護度は低い。すなわち、介護の程度が高い者と低い者の双方ともサービスの対象者になっているものの、よりサービスの程度の低い者にサービス提供が行われていると考えられる。また、平成11年の在宅要介護者に占める要介護5割合は低い。これは、要介護度が高い者が施設に集中し、介護の程度の低い者は在宅で介護を受けているという実態を示しているものと考えられる。

平成11年時点の老年人口に占める要介護5割合に着目した分析からは、平成11年における老年人口に占め

る要介護5割合の大小に基づく3分類に基づく平成11年時点での各種指標の傾向と、平成13年時点での各種指標の傾向が若干異なっている点が注目される。たとえば、平均要介護度は、平成11年には、老年人口に占める要介護5割合が多い市町村ほど高い傾向にあったが、平成13年には、老年人口に占める要介護5割合が大きい市町村の伸びが他に比較して小さかった。また、老年人口に占める要介護5割合も、平成11年には、老年人口に占める要介護5割合が多い市町村ほど高い傾向にあったが、平成13年には、老年人口に占める要介護5割合が低い市町村が大きく上昇した。

全国の要介護者の真の出現率に地域差がそれほどないと仮定すれば、老年人口に占める要介護5割合は、介護サービスへのアクセスを表す指標となりうるものと考えることができる。平成11年時点の老年人口に占める要介護5割合が大きい市町村において平均要介護度が他の群に比べて大きく上昇しなかったことはサービスへのアクセスが確保されていた市町村の介護保険制度導入による効果を示唆する所見として注目される。老年人口に占める要介護5割合が、平成11年における老年人口に占める要介護5割合が小さい市町村で増加が大きかったのは、介護保険制度の導入によって、従来はアクセスが少なかった市町村でのアクセスが改善したという解釈も可能であろう。

介護保険導入前後の変化の背景としては、①高齢者の健康状態が全体として急激に変化した、②介護サービス利用のための認定基準が変化した、③これまで病院に入院していた者が、介護保険制度導入に伴って、医療サービスから介護サービスにシフトした、④介護保険制度の導入に伴ってサービスへのアクセスが容易になり、申請増につながった、といった可能性が考えられる。

このうち、高齢者の健康状態が全国レベルで急激に変化するということは通常は考え難く、また、死亡統計や疾病統計からもこのような事象は観察されていない。また、認定基準の変化については、仮に制度導入時点で市町村において不慣れな部分があったとしても、全体としては一律の基準で行われたと考える方が自然である。

医療サービスから介護サービスへのシフトについては、医療の必要の程度と介護の必要の程度とが必ずしも一致せず、医療費と介護費に関する個別データの入手も困難であることから直接的な証明は難しい。一方、申請増に関しては、仮に、もし介護サービスの利用拡大が、申請増によるものが主であったとすれば、より要介護度の低い者の割合が増加するはずである。本調査対象の265市町村では平均要介護度は制度の導入前後でより高くなっ

ているものの、全国的には要介護度の低い者の割合が制度導入後に高まってきている<sup>16)</sup>ことから、サービスの利用の裾野の拡大が示されているものと考えられる。

今後のサービス利用量の予測を行う上では、介護サービスの利用状況が、地域におけるサービス供給体制に加えて家族の状況が影響を与えているとする研究<sup>17)~19)</sup>や、介護保険制度によるサービスを利用するにあたっては、まず私的支援が活用され、私的支援の限界を超えて初めて公的サービスの使用が行われるとの報告<sup>20)</sup>もあることから、本研究では取り上げることができなかった様々な要因についての考慮が必要であると考えられる。

#### 4. 本研究の限界

最後に、本研究の限界について3点触れておきたい。

第1に、分析対象となった265市町村が全国の傾向を正確に反映していない可能性がある。分析対象となった265市町村は、質問票を送付した3252市町村の8.1%であり、総人口、老年人口割合、介護保険料について分析対象とそれ以外の市区町村で比較検討したところ、265市町村の老年人口割合は全国平均に比較して有意に低かった。また、265市町村では介護保険制度の導入後に平均要介護度が上昇しており、全国と逆の傾向を示していた。さらに、全国データでは平成11年10月末における要介護認定者数は8.7万<sup>21)</sup>、平成13年調査で報告を求めている平成13年9月末の要介護認定者数は275.9万人<sup>22)</sup>となっており、この数値に比較すると、本研究の265市町村における認定者数の拡大は極めて小さかった。本研究は、2年の間隔をおいて行った2回の調査にどちらも回答し、かつ、平成11年時点で要介護認定を開始している市町村であることから、介護対策がより進んでいる市町村の状況を反映した結果となっている可能性がある。

第2に、本研究では平成11年と平成13年の結果を比較しているが、介護保険の導入の効果が現れるためには、平成13年では早すぎた可能性がある。これには、平成12年4月の制度開始以降にも、保険料の徴収猶予や、短期入所サービスの限度枠の扱いの変更などがあった影響も含まれる。また、要介護認定は介護保険導入に伴って新たに導入されたシステムであるため、特に平成11年に関しては要介護認定システムへの慣れの問題が生じた可能性がある。要介護認定にあたっては、異なる評定者間で一致した結論を得ることが重要であるが、そのためには十分な研修が必要<sup>23)</sup>である点にも留意が必要である。

第3に、介護保険制度の効果について検証するにあつ

では、介護サービスの利用によって利用者の要介護度の改善、または維持にどのような効果があったかを評価することも重要であるが、本研究では検討されていない。今後の研究の発展がさらに待たれる分野であるが、介護保険制度の導入によって、今後は、要介護度という全国一律の尺度が定期的に測定されることとなり、ケアプランの分析ともあわせて、高齢者の自然経過、介護サービスによる介入と機能予後に関しての前向き研究が可能となるなど、いっそう研究が進むことが期待される。

## 総 括

介護保険導入前後での要介護認定状況の変化とその特徴などについて明らかにすることを目的として、平成11年および平成13年の11月に全国の全市区町村の介護保険担当者に対して行った質問票調査の結果を分析した。分析対象となったのは双方に正しく回答した265市町村(8.1%)である。調査票から得られた市町村ごとの要介護認定状況に関するデータに加え、医療施設調査など既存の調査データも分析に用いた。その結果、平成11年に対して平成13年では、要介護者の状況に関して市町村格差が縮小する傾向を示した。また、単位老年人口あたり施設入居者数・病床数と要介護者の状況を表す各種指標との相関が、介護保険制度導入後により強まるなど、介護保険制度からみた施設類型別機能がより明確になってきたことを示唆する所見が得られた。これらの背景には、介護の必要の程度という概念が「要介護認定等基準時間」という形で一元的に整理されたこと、介護給付費交付金制度が設けられたこと、などの制度的な背景が考えられる。さらに、介護保険制度の導入によって、従来は介護関連サービスの利用が少なかった市町村におけるサービスへのアクセスが改善した可能性が示唆された。以上の結果より、介護保険制度導入前後の市町村の変化と、制度導入の効果の一端を示すことができたものと考えられる。

## 謝 辞

本研究は、平成11年度～平成13年度厚生科学研究費補助金健康科学総合研究事業「介護保険導入による市区町村の保健福祉サービスの変容に関する行政学的研究」(主任研究者 近藤健文)の成果を利用している。

また、本稿の作成にあたっては、慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室の近藤健文客員教授、大前和幸教授、島田直樹専任講師、福岡大学経済学部白鞘康嗣講師

に御指導を頂いた。ここに深く謝意を表するものである。

## 文 献

- 1) 近藤健文：介護保険導入による市区町村の保健福祉サービスの変容に関する行政学的研究。平成11年度～13年度 厚生科学研究費補助金 健康科学総合研究事業 総合研究報告書、平成14年3月
- 2) 近藤健文：介護保険導入による市区町村の保健福祉サービスの変容に関する行政学的研究。平成11年度 厚生科学研究費補助金 健康科学総合研究事業 総括研究報告書、平成12年3月
- 3) 近藤健文：介護保険導入による市区町村の保健福祉サービスの変容に関する行政学的研究。平成13年度 厚生科学研究費補助金 健康科学総合研究事業 総括研究報告書、平成14年3月
- 4) 白鞘康嗣、島田直樹、中原俊隆、潮見重毅、里村一成、武村真治、近藤健文：介護保険導入による市区町村の保健福祉サービスの変容。日本公衆衛生雑誌、50：959-969、2003
- 5) 総務省統計局。平成12年国勢調査市町村別主要指標。国勢調査。 <http://www.stat.go.jp/data/kokusei/2000/kihon1/zuhyou/shihyo2.xls>
- 6) 厚生省：平成11年医療施設調査
- 7) 厚生労働省：平成13年医療施設調査
- 8) 厚生省：要介護認定等に係る介護認定審査会による審査及び判定の基準等に関する省令(平成十一年厚生省令第58号)。平成11年4月30日
- 9) 厚生労働省：認定者の年齢階級別・要介護度別状況(H13年11月5日)給付費分科会資料、平成13年11月5日
- 10) 厚生労働省：「介護サービス量等の見込み(6月値)について」、184-187。全国介護保険担当課長会議資料、平成14年8月29日
- 11) 吉村弘：都市規模と行政サービス 227-253(第9章)。最適都市規模と市町村合併。東洋経済新報社、1999、東京
- 12) 生安衛、鄭小平：市町村歳出構造と最適規模に関する研究。日本都市計画学界学術研究論文集、33：13-18、1998
- 13) 堀江洪：新しいガバナンスの前提としての市町村のあり方について。15-17。地方政府のガバナンスに関する研究。総合研究開発機構。東京、1999
- 14) 金沢史男：市町村合併促進と住民サービスのあり方—合併推進論の再検討—。都市問題、90：39-53、1999
- 15) 厚生省高齢者介護対策本部事務局監修：ケアマネジメント方式と現行の措置制度の比較。新たな高齢者介護システムの確立について—老人保健福祉審議会中間報告—、pp 35。ぎょうせい1995 東京
- 16) 要介護認定はどうか：介護保険情報、3：40-49、2002
- 17) 尾ノ井美由紀、小林京子、伊藤美樹子、三上洋：介護保険施行半年後の在宅サービス。癌と化学療法 28(Supple.)：184-187、2001
- 18) 山田ゆかり、石橋智昭、西村昌記、堀田陽一、若林健市、

- 古谷野直. 高齢者住宅ケアサービスの利用に対する態度に関連する要因. 老年社会科学, 19: 22-28, 1997
- 19) 高橋正人. 老夫婦の社会福祉サービス利用を規定する要因. 老年社会科学, 10: 60-74, 1988
- 20) 杉澤秀博, 深谷太郎, 杉原陽子ら: 介護保険制度下における在宅介護サービス過小利用の要因. 日本公衆衛生雑誌, 49: 425-435, 2002
- 21) 厚生省. 医療保険福祉審議会老人保健福祉部会・介護給付費部会合同部会 (第20回) 資料, 平成11年12月6日
- 22) 厚生労働省: 介護保険事業状況報告 (暫定) (平成13年9月分)
- 23) 長沢紀美子: 要介護認定調査における評定者間一致率および効果的な研修手法に関する検討. 新潟青陵女子短期大学研究報告, 30: 77-80, 2000
- 24) 厚生省 第16回医療保険福祉審議会介護給付費部会資料 (保福審一介067 12.1.17) 2000年1月17日 [http://www1.mhlw.go.jp/topics/kaigo99\\_4/kaigo54.html](http://www1.mhlw.go.jp/topics/kaigo99_4/kaigo54.html)
- 25) 厚生労働省 平成13年度 介護保険事業状況報告 (年報) 2003年5月7日 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kaigo/jokyo01/index.html>
- 26) 厚生労働省 平成13年介護サービス施設・事業所調査の概況. 2002年11月21日 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kaigo/service01/index.html>
-



原 著

## イヌ心房筋組織における活動電位交代現象と伝導ブロック

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：小川 聡教授)

おお た けん いち  
太 田 賢 一

(平成 16 年 7 月 5 日受付)

### ABSTRACT

Relationship between action potential alternans and conduction block in anisotropic canine atrial tissues ; a novel mechanism for the transition from concordant to discordant alternans ; investigation of the optical recording system

*Kenichi Ota*

Department of Medicine, School of Medicine, Keio University

Discordant alternans has the potential to produce reentrant arrhythmia than concordant alternans, but its mechanism is unknown. Right atrial free wall was dissected from 22 dogs (6-10 years old). Using a voltage sensitive dye and high-resolution video imaging (5400 pixels, 300 fr/sec), action potential propagation was mapped in a small area (2.8×4.2 mm) of the atrial epicardium where fiber orientation was parallel, during pacing with a thin unipolar electrode (100 μm in diameter). Concordant repolarization alternans was observed when cycle length (CL) was reduced to 200ms. At shorter CLs, depolarization alternans also appeared. Transverse block was observed during concordant alternans with rapid pacing at CLs less than 150 ms. When transverse block occurred, it took a long time for the sites distal to the block line to be excited due to the detour propagation. At the next beat, diastolic interval and action potential duration at the sites proximal to the block line were long, while they were short at the sites distal to the line. Thus, discordant alternans was initiated. In anisotropic atrial tissues, conduction block occurred during concordant alternans, and the occurrence of conduction block initiated discordant alternans.

**Key Words :** action potential alternans, concordant alternans, conduction block, discordant alternans, optical mapping

心電図上の T 波形が一心拍毎に変化する現象は、心室細動等の重症心室性不整脈の発生に先行することから、その電気生理学的意義が注目されている<sup>1-6)</sup>。この T 波交代現象は、心筋活動電位波形の一心拍毎の変化、特に不応期を規定する活動電位持続時間 (action potential duration : APD) の変化、すなわち活動電位の交代現象によって発生すると考えられており、これに伴う心室筋局所の不応期不均一性の増大が不整脈発生につながる

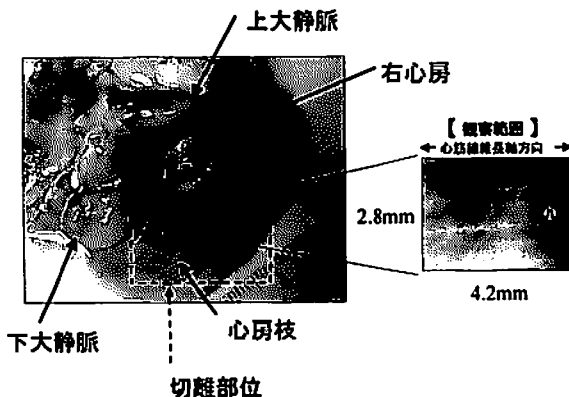
ものと推測されている。この活動電位交代現象は活動電位の空間的分布から 2 種類に分類される。すなわち、観察領域全体に APD の長短交代が同じ時相で認められる concordant alternans と観察領域において異なる時相で認められる discordant alternans が存在する。特に concordant alternans から discordant alternans への移行も観察され、その際に生ずる局所心筋における不応期不均一性が伝導ブロックを誘発しリエントリー性不

整脈発生につながると説明されている<sup>13)</sup>。しかしながら、concordant alternans から discordant alternans への移行機序については明確に言及されていない<sup>12-14)</sup>。一方、心房筋組織においても高頻度心房刺激中に心筋線維走行に関連した伝導ブロックが生じるが、この際にも心室筋と同様に活動電位の交代現象が観察されることが明らかにされている<sup>15)</sup>。この現象は心房細動の発生機序として注目されている。

そこで本研究では、イヌ心房筋単離灌流標本において電位感受性色素を用いた高分解能光計測法により、活動電位波形の変化と興奮伝播様式を同時解析し、活動電位交代現象と伝導ブロック発現の関連を検討した。さらにこれまで明らかでなかった concordant alternans から discordant alternans へ移行する機序の解明も目的とした。

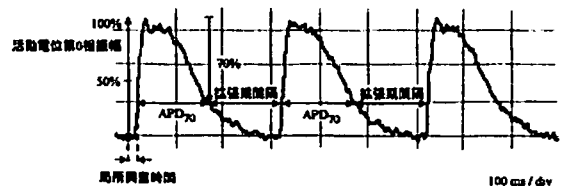
## 方 法

ビーグル犬22頭(生後6~10年)をベントバルビタールナトリウム(30 mg/kg 静脈内投与)で麻酔後に心臓を剔出し、右冠動脈心房枝灌流域の右心房自由壁約3 x 4 cm 範囲を切離し、灌流槽内に固定した。この際、心筋の線維方向を肉眼的に確認し長軸が左右方向と一致するように固定した(第1図)。表面および心房枝から36℃のタイロード液(NaCl 131 mmol/L, KCl 4 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 18 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.7 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mmol/L, glucose 5.5 mmol/L)で灌流した。心房枝より電位感受性色素 di-



第1図 心房筋標本。左図に右冠動脈心房枝を含む右心房自由壁を示す。点線で囲まれた心房組織を約30×40 mmの大きさに切除し使用した。右図に2.8×4.2 mmの実際の観察領域を示す。画面は心筋線維走行の長軸と平行にセットし刺激部位は右端とした(①)。

4-ANEPPS (10 μmol/L, 20 ml, 20分)を灌流し心房筋組織を蛍光染色した。心房筋収縮による蛍光シグナルの散乱を軽減するため、筋収縮抑制剤である cytochalasin D (25 μmol/L) を心房枝より持続灌流した。安定化DC電源 (PD35-20, Kenwood) とタングステンハロゲンランプ (250 W; Oriel, Stratford, CT) より得られた光源をフィルター (excitation filter; λ=520±20 nm) を通して波長 520±20 nm を励起光とした。心外膜面約2.8×4.2 mmの範囲に励起光を照射し、得られた蛍光をロングパスフィルター (λ>610 nm) を通過させ、活動電位に応じた610 nmを超える波長の蛍光強度変化を蛍光顕微鏡 (Optiphot-2-UD, 4倍対物レンズ: Plan Apo, NA 0.20, Nikon) にマウントさせた高速 CCD カメラ MiCAM01 (BrainVision, 理化学研究所) を用いて捉えた。60×90点の活動電位波形を時間解像度 2 msec, 空間解像度 45 μm で記録し、興奮伝播を MiCAM01 ソフトウェア (BrainVision, 理化学研究所) により画像化した。標本の右端の心外膜面にタングステン単極電極を接触させ、刺激装置 (SEN-7103, 日本光電) により心房筋組織の興奮閾値をまず測定し、その1.5倍の電圧で1 msecの持続時間でスクエア波パルス刺激を行った。周期 (CL) 500 msec から 150 msec の定常基本刺激を順次行い、興奮伝播様式の観察および活動電位測定を行った。各刺激周期の持続は30秒間とし、2分間の回復時間をおいた。活動電位立ち上がりの第0相が最大振幅の50%に達した時間をその局所の興奮時間と定義し2 msec毎の等時線図を作製して、伝播様式の解析に用いた。活動電位の第0相が50%に満たない場合は、その局所への興奮が到達しない伝導ブロックと定義した。APDは、活動電位の立ち上がりから再分極が終了し基線へ復する終末点と定義したが、終末点を明確に決めることが困難なこと



第2図 測定基準。高分解能光計測法 (MiCAM01) で得られた活動電位波形を示す。縦軸は蛍光強度の変化率 (%) を、横軸は時間 (msec/div) を示す。基線からの活動電位第0相の最大振幅を100%とし70%再分極した時点で活動電位持続時間を計測した (APD<sub>70</sub>)。拡張期間隔は APD<sub>70</sub> と同じレベルでの計測値を採用した。

が多く、活動電位の最大振幅が70%再分極した時点でAPD計測を行なった (APD<sub>70</sub>)。拡張期間隔はAPD<sub>70</sub>と同じ電位レベルで測定した (第2図)。拡張期間隔およびAPD<sub>70</sub>は、それぞれのサンプル部位において用手的に計測した。活動電位交代現象はAPD<sub>70</sub>に10 msec以上の変動を認めた場合と定義した。

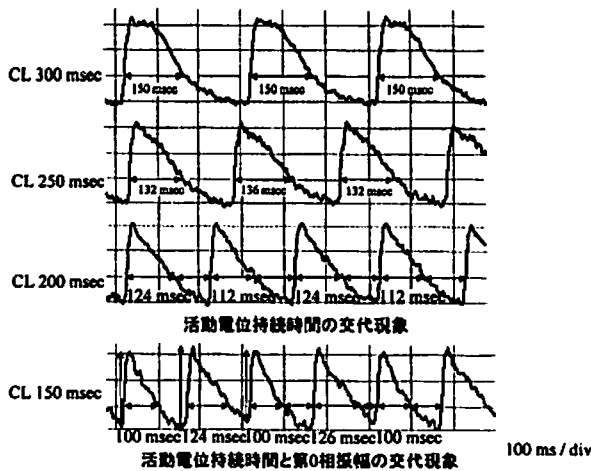
## 結 果

### 1. 刺激頻度増加に伴う活動電位交代現象

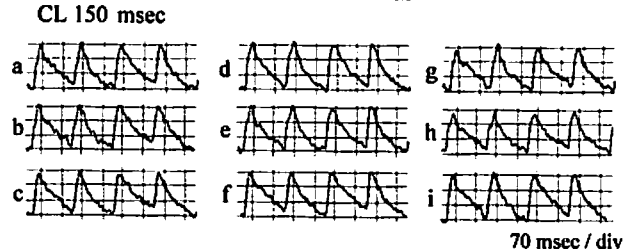
CL 200 msec 未満の高頻度刺激下で活動電位交代現象が観察された。22頭すべての標本においてCL 200 msecでAPD交代現象を認め、CL 150 msecではAPD交代現象に加え、活動電位第0相の振幅の交代現象も認められた (第3図)。拡張期間隔は長いAPD後は短く、短いAPD後は延長した。これに伴い短い拡張期間隔後の活動電位第0相の振幅は小さく、APDは短縮した。

### 2. Concordant alternans

第4図にCL 150 msecでの定常高頻度刺激下で認められたconcordant alternansの典型例を示した。上段



第3図 高頻度心房刺激中の活動電位交代現象。CL300 msecから150 msecの定常周期刺激下における光計測法で得られた活動電位波形を示す。APD交代現象はCL 200 msec以下の定常周期刺激下で認められた。CL 150 msecでは、APD交代現象が著しくなるに加え、活動電位第0相の振幅の交代現象も観察された。交代現象の特徴として、APDが短い心拍では拡張期間隔が延長し、次心拍ではAPDは延長している。APD交代現象が過大になるに伴い活動電位第0相の振幅の交代現象が出現していることが理解できる。



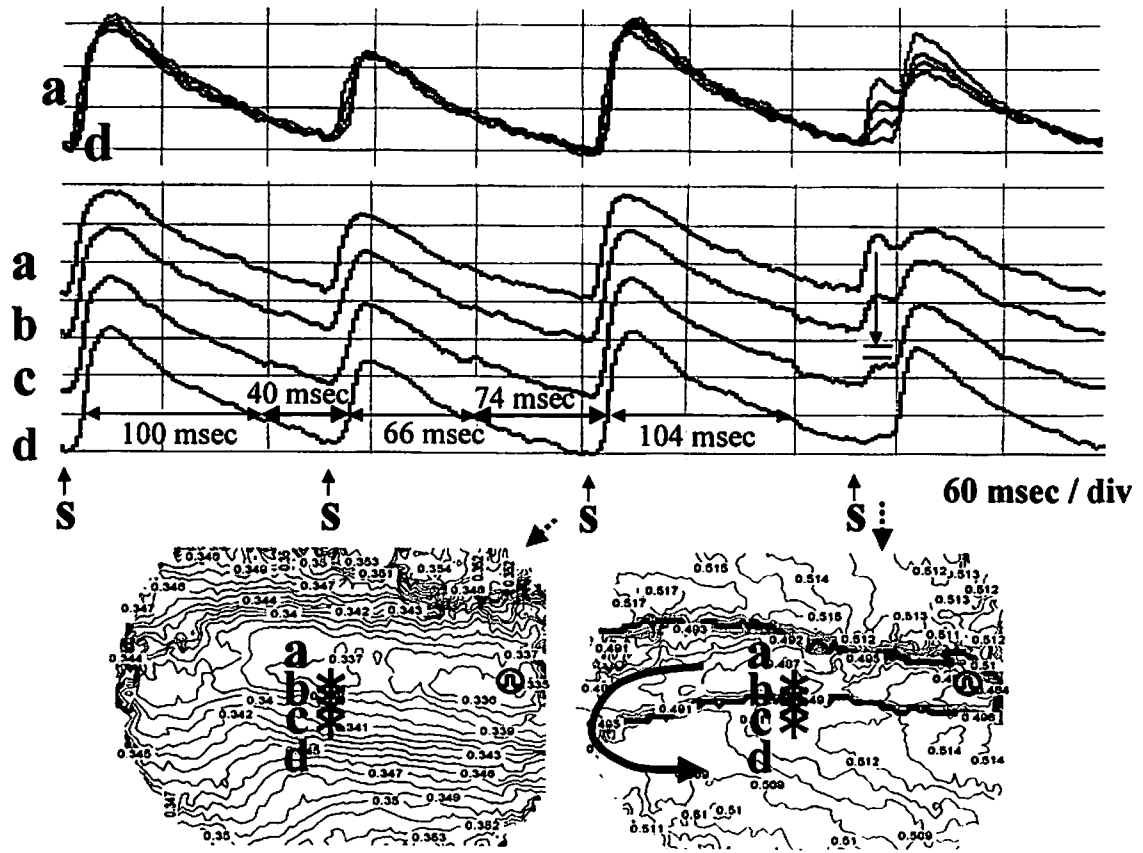
第4図 concordant alternansの典型例。CL150 msecの定常周期刺激下におけるconcordant alternansの例を示す。上段に実際の心筋線維走行とa~i点の活動電位波形の採取部位を示す。代表的な9点からの活動電位波形を下段に示す。観察領域全体に同じ時相で第1拍から第4拍までAPDの長・短・長・短を繰り返すconcordant alternansが認められる。

に実際の心筋線維走行と代表的活動電位波形のサンプル部位を示し、画面上のa~i点より得られた活動電位波形を下段に示した。この9点以外にも観察領域全ての点で活動電位波形は心拍毎に一致した。いずれの部位でも第1拍と第3拍のAPDは長く、第2拍と第4拍のAPDは短くconcordant alternansを示した。

### 3. Concordant alternansの出現と伝導ブロック

Concordant alternansが観察された際に出現する伝導ブロックは常に心筋線維走行に直行する方向で生じていた。ブロックは短い拡張期間隔後の心拍で出現しており、活動電位第0相の振幅は小さかった。第5図はCL 140 msecでの高頻度刺激中のa~d点の4点から得た活動電位波形と等時線図を示す。4箇所の活動電位記録を重ねた上段で明らかごとく、第1から第3拍でAPD及び活動電位第0相の振幅のconcordant alternansを認め、第4拍で2相性の活動電位が認められた。第4拍で振幅の50%に満たない小さな立ち上がりがあり、c, d点で認められa~b点へと伝導した興奮がc点には達せず、b~c点間で伝導ブロックが生じたことが示されていた。下段右の等時線図でも、等時線が密集した太線が2本横方向に描出された。すなわち下段左は第3拍の等時線図で、右端の刺激部位から発した興奮は心筋線維走行と平行に標本の中1/3領域を右から左へ早く伝導していた (等時線間隔が広い)。この

# CL 140 msec



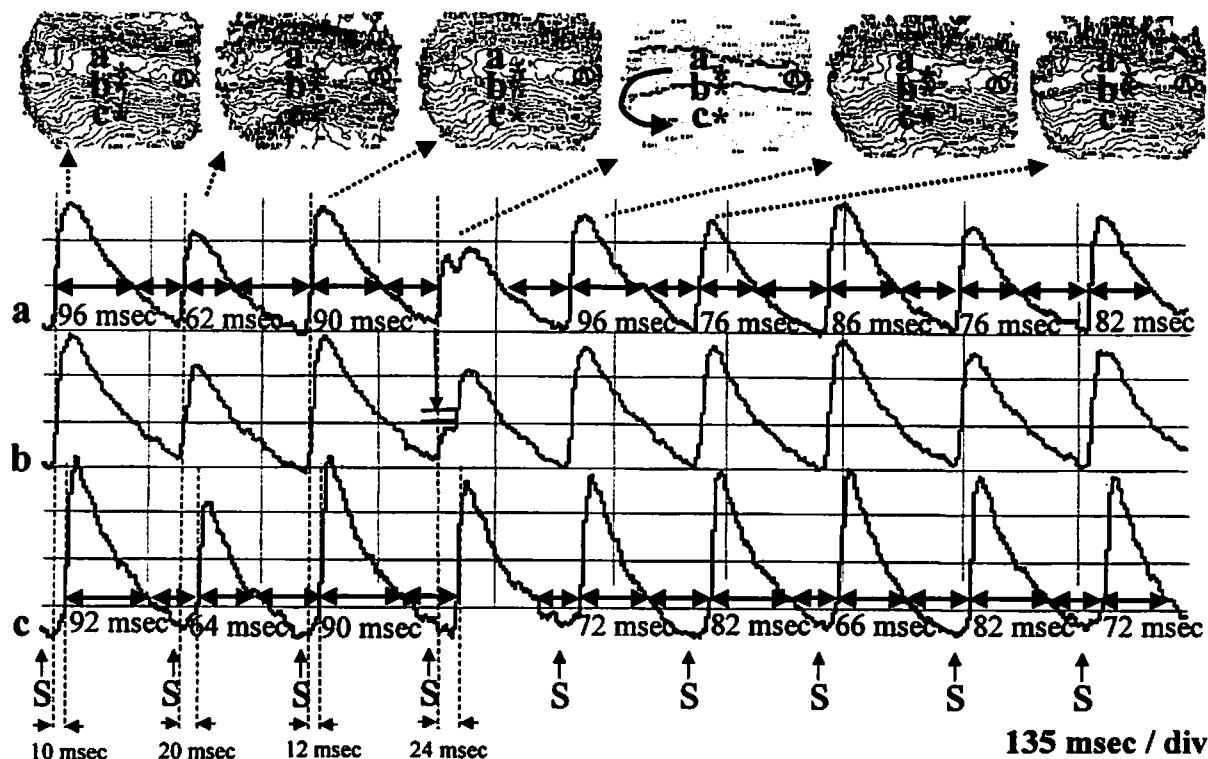
第5図 活動電位交代現象と伝導ブロック。Concordant alternans中に生じた伝導ブロックの例を示す。CL 140 msec での高頻度刺激下で、心筋線維走行に直行する4点(a~d点)から得られた連続した活動電位波形を上中段に示す。第1拍から第3拍までは長・短・長のAPD交代現象と活動電位第0相振幅の交代現象が認められる。第4拍目に心筋線維走行に直行する方向で伝導ブロックが生じている。下段は2 msec 毎の等時線図で興奮伝播様式を示している。第3拍では伝導ブロックは生じておらず、心筋線維長軸方向(右→左方向)への等時線の間隔は粗であり、短軸方向(上下方向)では等時線間隔は密である。これらより心筋線維長軸方向への伝導が短軸方向に比較し速いことが理解できる。第4拍ではブロックラインに一致して等時線が密となり太いラインとして示されている。心筋線維走行に直行する方向で、等時線図上は上下方向へ伝導ブロックが生じている。伝導ブロックは第4拍のb~c点間で生じている。第4拍の活動電位は、長いAPDの心拍後で、拡張期間隔は短く、活動電位第0相の振幅は小さく、APDは短縮している。活動電位波形を重ねた上段に示すとおりブロックライン前後で活動電位持続時間のばらつきは認められない。

中央領域から上下各々1/3の領域への伝播は心筋線維走行と直行するもので、等時線間隔は狭く、伝導速度が遅いことが示されていた。一方、下段右図の太い2本の等時線の密集は、上下の領域への心筋線維走行に直行する方向で伝導がブロックされたことを示していた。ブロック直前の第3拍では全領域で活動電位波形の再分極過程は一致しており(第5図上段第3拍)、ブロック発生に再分極の不均一性は関与しなかった。

## 4. 伝導ブロック発生に伴う concordant alternans から discordant alternans への移行

心筋線維走行に直行する方向で伝導ブロックが誘発された10頭中6頭で discordant alternans が誘発された。discordant alternans は伝導ブロック発生と無関係に観察されることはなかった。第6図の上段は連続する6拍の等時線図で、第4拍において2本の平行なブロックラインが出現し、心筋線維方向に直行する上下

CL140 msec

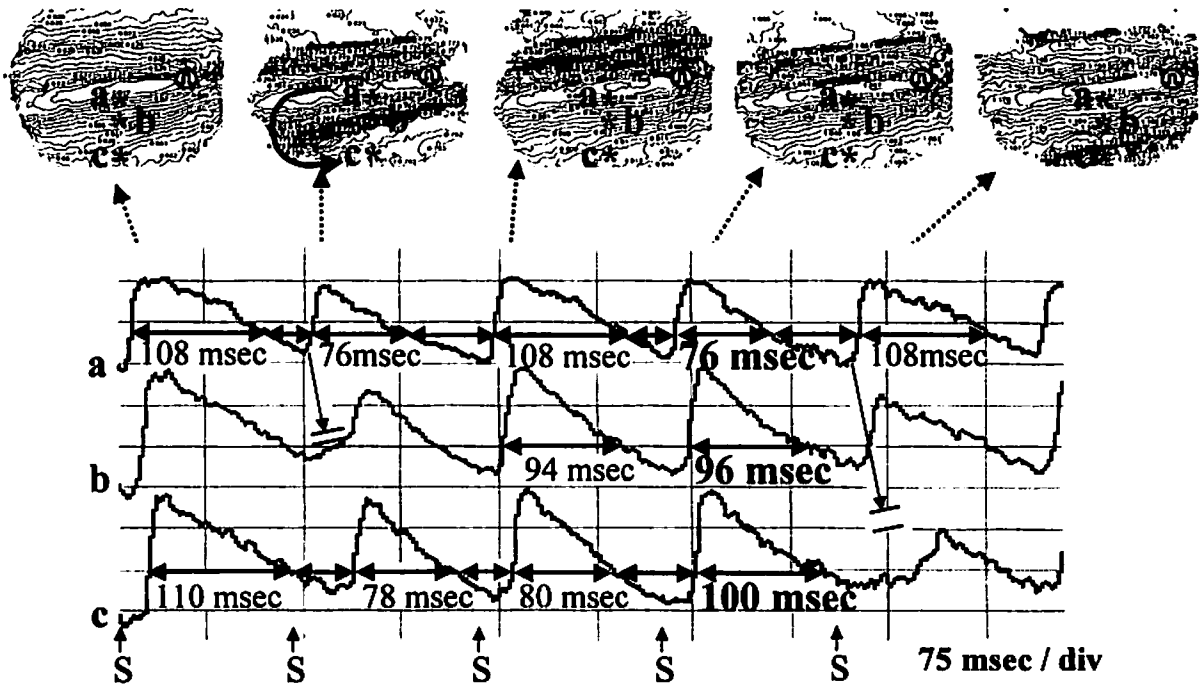


第6図 心筋線維走行に関連した伝導ブロック発生に伴う concordant alternans から discordant alternans へ移行. Concordant alternans から discordant alternans へ移行した例を示す. 上段は連続する6拍の等時線図である. 第4拍で心筋線維方向に直行する上下方向への伝導ブロックが生じている. 下段はブロックラインをはさむ3点 (a, b, c) の活動電位波形を示す. a 点はブロックラインの近位部, b 点はブロックライン上, c 点はブロックラインの反対側である. 第3拍までは3点ともに長・短・長の concordant alternans を示している. 短い拡張期間後, すなわち長い APD 後の第4拍において心筋線維走行に直行する方向で伝導ブロックが生じている. 伝導ブロックが生じると a 点から c 点間の局所興奮時間は第2拍では 18 msec に対し, 第4拍では 24 msec へ延長していることから明らかなごとく, 興奮伝播はブロックラインを回りこんで遅れて c 点に到達するため第4拍に引き続き拡張期間隔は短縮し第5拍の APD は短縮する. それゆえ第5拍で伝導ブロックが生じない場合, a 点では APD は長・短・長・短・長・短と交代現象が続くのに対して, c 点では長・短・長・短・短・長・短となり交代現象の時相がリセットされ discordant alternans が成立した.

方向への伝導ブロック出現を示していた. 下段は等時線図上に示したブロックラインをはさむ3点 (a, b, c) における活動電位波形を示す. 第1拍から第3拍では a, b, c 点のいずれも APD の長・短・長の交代現象, すなわち concordant alternans を示していた. 先行する拡張期間隔の短い第4拍で伝導ブロックが生じた. a ~ c 点間の局所興奮時間の差は第1拍 10 msec, 第2拍 20 msec, 第3拍 12 msec であるが (第6図下段), a ~ c 点間でブロックの生じた第4拍では 24 msec と

増大していた. この時間差の増大は, 上段の第4拍の等時線図で明らかなごとく, a ~ b 点間の伝導ブロックのため線維方向へ沿って左方向へ伝播した興奮が, 標本の左端で U ターンし, 左→右へと逆方向へ伝播して c 点に遅れて到達したために生じた (第6図上段第4拍の矢印方向). この結果, c 点での第4から第5拍の拡張期間隔が短縮し, 第5拍の APD が短縮した. ブロックライン近位部 a 点ではブロック後の第5拍以後の APD は長・短・長・短・長の交代現象が続いていた.

CL 140 msec



第7図 discordant alternans による新たな伝導ブロックの発生. Discordant alternans 中に concordant alternans 中の伝導ブロックとは異なる機序でブロックが生じた例を示す. CL 140 msec の高頻度刺激中で, 上段に連続する5拍の等時線図を, 下段にブロックラインをはさんだ a ~ c 点の活動電位波形を示す. a 点では, APD は長・短・長・短・長を示している. 一方, c 点では APD は長・短・短・長・短を示している. 第2拍で心筋線維走行に直行する方向で上下方向へ伝導ブロックが生じている. Concordant alternans 中であるため第1拍の APD は長く, 先行する拡張期間隔が短く活動電位第0相の振幅が小さい第2拍に伝導ブロックが生じている. ブロックラインの反対側 c 点では興奮伝播がブロックラインの遠位端を緩徐に迂回し到達するため交代現象の時相がリセットされ第3拍より discordant alternans が生じている. Discordant alternans が発生したことにより4拍目では APD は a 点の 76 msec に対して c 点の 100 msec と差が明らかなごとく延長しており, 新たな伝導ブロックが生じるのに十分な空間的な勾配を生じている. 第5拍では第2拍と異なり a ~ b 点へ興奮は伝播しているが c 点では拡張期間隔が短く, b ~ c 点間で別の部位に新たな伝導ブロックが生じている. 上段の等時線図でも明らかなごとくブロックラインが下方ヘシフトしている.

一方, ブロック遠位部 c 点は, 第5拍以後は a 点とは異なり, 短・長・短・長・短の交代となり, a 点と c 点で discordant alternans を示していた. ブロックラインにはほぼ一致した b 点では, 第5拍以後, 交代現象が消失していた.

5. Discordant alternans 中の新たな伝導ブロック

第7図に discordant alternans 中に再分極過程の空間的なばらつきが生じ, 新たな伝導ブロックが発生した例を示した. CL 140 msec の高頻度刺激中で, 上段に等時線図を, 下段にブロックラインをはさんだ a ~ c

点の活動電位波形を示す. Concordant alternans 中で先行する拡張期間隔が短く活動電位第0相の振幅が小さい第2拍で心筋線維走行に直行する a ~ b 点への伝導ブロックが生じた. ブロックラインの遠位側 c 点では標本の左端で伝導が U ターンし, 左から右へと伝播して c 点に遅れて到達したために時相のリセットが生じたため, 第3拍から a 点と c 点で discordant alternans が発生した. この際, 第4拍では APD の短い a 点と長い c 点での差が増大し (76 msec vs 100 msec, 24 msec), 第5拍で a ~ b 点へと伝播した興奮が c 点に達した段階で, c 点では第4拍からの拡張

期間隔が短く、b～c点間で新たな伝導ブロックが生じた。上段の等時線図においても第2拍と比較して明らかにブロックラインが下方にシフトしていた。

## 考 察

本研究では、高分解能光計測法によりイヌ心房組織での活動電位波形と興奮伝播様式を同時解析した結果、以下の所見を明らかにすることができた。すなわち心筋線維走行に直行する方向の伝導ブロックは活動電位波形のconcordant alternans中に発生し、さらにそれに二次的discordant alternansが誘発され、それが新たな伝導ブロックをもたらした。

体表面心電図上において、T波形が一心拍毎に変化する交代現象の出現は重症心室性不整脈発生との関連性が報告されてきた<sup>16)</sup>。T波交代現象は、心筋活動電位の一心拍毎の変化、特にAPDの空間的勾配が大きくなった際に生じるとされている。すなわちdiscordant alternansの結果生ずる心室筋局所のAPD不均一性の増大が伝導ブロックを誘発しリエントリー性不整脈発生につながる。

本研究では心房筋標本において、APD交代現象がCL 200 msec未満の定常周期刺激下で認められることが示された。さらにCLを短縮すると、活動電位第0相の振幅の交代現象も認められた。先行する心拍においてAPDが長く引き続く拡張期間隔が短くなると、次心拍では不応期の残る再分極終了前に興奮が到達するため活動電位第0相は小さく、APDは短くなる。

本研究では、concordant alternans中に生じた心筋線維走行に関連する伝導ブロックは、心筋線維走行に直行する方向、すなわち本論文の図中(第5図、第6図)では上下方向に起きた。これは、老犬の心房組織を用いたKouraらの観察と一致している。Kouraらは、加齢に伴い興奮伝播様式がelliptical型からsquare型へと変化し、心筋線維走行に関連する伝導ブロックが伝導安全性の低い心筋線維走行に直行する方向でより生じ易くなることを報告している。これらの機序として加齢による心筋細胞形態の変化、ギャップ結合の分布の変化および間質線維組織の増生が挙げられている<sup>16)</sup>。本研究においては心筋線維走行に直行する方向での伝導ブロックはすべてconcordant alternans中に発生し、ブロック直前の心拍はAPDが長く、引き続く拡張期間隔が短いがゆえ、活動電位第0相が小さくAPDが短い心拍で伝導ブロックが生じることを明らかにし、直行方向の伝導ブロックの機序の1つとして再分極過程の不均一性を示

した。活動電位第0相の減少が伝導速度の低下をもたらし、加齢に伴う組織的变化と相加的に作用しブロックをもたらしたと理解される。

一方、discordant alternansの電気生理学的意義は明確にされておらず、特にconcordant alternansからdiscordant alternansへの移行のメカニズムは明らかにされていなかった<sup>12-14)</sup>。本研究において、concordant alternans中に誘発される伝導ブロックの際にdiscordant alternansへの移行が観察されたが、それに先行してブロックライン近位部および遠位部の活動電位波形においてAPDのばらつきは認められなかった(第5図)。すなわち、活動電位再分極過程の空間的不均一性がdiscordant alternansの発生機序とする説<sup>13)</sup>には否定的結果である。心筋線維走行に直行する方向で伝導ブロックが生じた結果、ブロックラインの遠位端を興奮伝播が迂回するために生じた極端な局所興奮時間の遅れが原因となって、ブロックラインの反対側で、交代現象の時相がリセットされdiscordant alternansが成立することが明らかにされた。

Discordant alternansの出現と同時にブロックラインを境にしたAPDの長短が逆転し、APDの空間的な差が生じ、この結果concordant alternans中に生じたブロックラインとは別の部位に新たな伝導ブロック誘発が観察された。以上より本研究では興奮伝播過程と活動電位波形を同時に解析することにより、concordant alternansからdiscordant alternansに移行する新たなメカニズムを解明しえた。Concordant alternans自体がリエントリー性不整脈発生に必要な再分極過程の不均一性をもたらすのみならず、さらにこれがdiscordant alternansを二次的に誘発し、さらなる伝導ブロックの形成に関与することが明らかとなった。本研究においては老犬の心房組織を用いており、ここで示された所見が臨床の現場における高齢者での心房細動発症率の増大に関わっている可能性が示唆された。

## 結 論

本研究では、高分解能光計測法を用いてイヌ心房組織の伝導特性を活動電位波形と対比して検討した。心筋線維走行に直行する方向での伝導ブロックは必ずconcordant alternans中に発生し、伝導ブロックは長いAPDを示す心拍後の短い拡張期間隔で出現する次心拍で生じた。

心筋線維走行に直行する方向で伝導ブロックが生じた結果、ブロックラインの遠位側では興奮伝播が遅れるこ

とで活動電位交代現象の時相がリセットされ, discordant alternans が誘発された. Discordant alternans に伴う APD の空間的勾配が原因となって, 新たな伝導ブロックが誘発された.

高齢者における心房細動などのリエントリー性不整脈発生メカニズムに関与している可能性が示唆された.

本稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室小川聡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, 直接御指導を賜りました国立埼玉病院循環器科原幹先生, 多大なる御協力, 御指導を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室岡田泰昌講師, 横浜市立市民病院循環器科小浦貴裕先生に深謝致します.

本研究の一部は, 第16, 17回心電学会(1999年, 甲府, 2000年, 東京), 第64回日本循環器学会総会(2000年, 大阪), 第74回米国心臓病学会議(2001年, アナハイム)等において発表した.

#### 文 献

- 1) Nearing BD, Huang AH, Verrier RL : Dynamic tracking of cardiac vulnerability by complex demodulation of the T wave. *Science* 252 : 437-440, 1991
- 2) Rosenbaum DS, Jackson LE, Smith JM, Garan H, Ruskin JN, Cohen RJ : Electrical alternans and vulnerability to ventricular arrhythmias. *N Engl J Med* 330 : 235-241, 1994
- 3) Verrier RL, Nearing BD : Electrophysiologic basis for T wave alternans as an index of vulnerability to ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5 : 445-461, 1994
- 4) Armoundas AA, Osaka M, Mela T, Rosenbaum DS, Ruskin JN, Garan H, Cohen RJ : T-wave alternans and dispersion of the QT interval as risk stratification markers in patients susceptible to sustained ventricular arrhythmias. *Am J Cardiol* 82 : 1127-1129, A9, 1998
- 5) Euler DE : Cardiac alternans : mechanisms and pathophysiological significance. *Cardiovasc Res* 42 : 583-590, 1999
- 6) Nearing BD, Verrier RL : Analysis of complex T-wave oscillations for prediction of ventricular fibrillation. *J Electrocardiol* 36 Suppl : 199-203, 2003
- 7) Kouta T, Ikeda K, Yamaki M, Nakamura K, Honma K, Kubota I, Yasui S : Significance of discordant ST alternans in ventricular fibrillation. *Circulation* 82 : 2185-2189, 1990
- 8) Rubenstein DS, Lipsius SL : Premature beats elicit a phase reversal of mechano-electrical alternans in cat ventricular myocytes : a possible mechanism for reentrant arrhythmias. *Circulation* 91 : 201-214, 1995
- 9) Tachibana H, Kubota I, Yamaki M, Watanabe T, Tomoike H : Discordant S-T alternans contributes to formation of reentry : a possible mechanism of reperfusion arrhythmia. *Am J Physiol* 275 : H116-H121, 1998
- 10) Pastore JM, Girouard SD, Laurita KR, Akar FG, Rosenbaum DS : Mechanism linking T-wave alternans to the genesis of cardiac fibrillation. *Circulation* 99 : 1385-1394, 1999
- 11) Cao JM, Qu Z, Kim YH, Wu TJ, Garfinkel A, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS : Spatiotemporal heterogeneity in the induction of ventricular fibrillation by rapid pacing: importance of cardiac restitution properties. *Circ Res* 84 : 1318-1331, 1999
- 12) Qu Z, Garfinkel A, Chen PS, Weiss JN : Mechanisms of discordant alternans and induction of reentry in simulated cardiac tissue. *Circulation* 2000 102 : 1664-70
- 13) Pastore JM, Rosenbaum DS : Role of structural barriers in the mechanism of alternans-induced reentry. *Circ Res* 87 : 1157-13, 2000
- 14) Watanabe MA, Fenton FH, Evans SJ, et al : Mechanisms for Discordant Alternans. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12 : 196-206, 2001
- 15) Koura T, Hara M, Takeuchi S, Ota K, Okada Y, Miyoshi S, Watanabe A, Shiraiwa K, Mitamura H, Kodama I, Ogawa S : Anisotropic conduction properties in canine atria analyzed by high-resolution optical mapping preferential direction of conduction block change from longitudinal to transverse with increasing age. *Circulation* 105 : 2092-2098, 2002



原 著

## 高血糖が腎系球体血行動態に与える影響の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

ほん ま こういちろう  
本 間 康一郎

(平成16年8月6日受付)

### ABSTRACT

Effect of hyperglycemia in renal glomerular hemodynamics

*Koichiro Homma*

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

Elevated renal perfusion pressure (RPP) elicits constriction of renal afferent arterioles (AFF), which comprises two mechanisms, myogenic response and tubuloglomerular feedback (TGF). This study examined whether pressure-induced AFF constriction was impaired in acute and chronic hyperglycemia. Intravital CCD camera was used to visualize the renal microcirculation. In normoglycemic rats, elevated RPP caused  $17.5 \pm 2.0\%$  AFF constriction. Acute hyperglycemia by infusion of high glucose solution elicited AFF vasodilation, and blunted the pressure-induced constriction ( $-8.7 \pm 1.0\%$ ). In contrast, the same elevation in plasma osmolality with mannitol failed to alter the basal diameter or the pressure-induced constriction of AFF. In acute hyperglycemic rats, both gadolinium (a myogenic response inhibitor) and furosemide (a TGF inhibitor) inhibited the pressure-induced AFF constriction. During the inhibition of myogenic tone by gadolinium, the inhibition of nNOS by S-methyl-L-thiocitrulline (L-SMTC) restored the acute hyperglycemia-induced impaired AFF constriction, but this ameliorating action was absent during the TGF inhibition by furosemide, suggesting selective activity of nNOS-associated NO on TGF. Similarly, in chronic hyperglycemic (Zucker obese) rats, myogenic response and TGF were blunted, and L-SMTC ameliorated the blunted TGF response. In conclusion, hyperglycemia causes impaired pressure response in both acute and chronic hyperglycemia. The blunted response is attributed to impairment in myogenic and TGF-mediated AFF constriction; the latter effect is caused by enhanced activity of nNOS.

**Key Words :** afferent arterioles, myogenic response, tubuloglomerular feedback (TGF), hyperglycemia, nNOS

近年、わが国では慢性腎不全のために維持透析を受ける患者は増加の一途をたどっている。それに伴い、透析に要する医療費は膨大な額となり、費用総額は年間1兆2千億円に達し、わが国の総医療費の約3%を占めるようになった<sup>1)</sup>。なかでも糖尿病性腎症による透析導入患者が顕著に増加しており、透析導入患者の原疾患のなか

で、糖尿病性腎症の比率は1998年以降慢性糸球体腎炎を抜き第一位となっている<sup>2)</sup>。このような糖尿病性腎症患者数の増加のみならず、糖尿病性腎症による透析導入患者の予後は不良であること、ならびに高齢者が多く生活の質の低下が認められ、医療面、医療経済面のみならず社会的な面からも重要な課題とされている。したがっ

て、糖尿病による透析導入を回避あるいは遅延させることが急務であり、その目的のためには糖尿病性腎症の成因ならびに進展機序を明らかにすることが極めて重要であると考えられる。

糖尿病による臓器障害の成因には、血糖上昇に伴う代謝異常が直接あるいは間接的にプロテインキナーゼC、酸化ストレスなどの因子を活性化させたり<sup>3,4)</sup>、内皮由来一酸化窒素の合成低下<sup>5)</sup>を介して、血管収縮による血流障害や血圧上昇ならびに血管肥厚などをきたすことが示されている。一方、他の臓器と異なり、腎臓では血流増加が認められ糸球体濾過機能が亢進していることが知られている。このような腎特異的な血流異常反応は、主として血液濾過の場である糸球体の前に存在する輸入細動脈の拡張ならびに腎灌流圧の上昇に伴う細動脈収縮の不全によることが、糖尿病モデル動物や<sup>6)</sup>、人<sup>7)</sup>において確認されており、その結果過剰の腎灌流圧が加わり腎障害を増悪させることが示唆されている。すなわち、大動脈から糸球体にいたる循環経路において、輸入細動脈が血管抵抗の重要な役割を担っていることより<sup>8)</sup>、輸入細動脈の拡張が糸球体過剰濾過をもたらすのみならず糸球体内圧の上昇をきたし、メサングウム細胞など糸球体固有細胞が機械的に伸展され transforming growth factor- $\beta$  などの各種サイトカインの発現を亢進させると考えられている<sup>9)</sup>。さらに、上皮に障害が及ぶと高分子物質に対する選択的透過性が亢進し蛋白尿の出現や、内皮障害により血管作動物質の異常や血管壁への脂質沈着、毛細血管内血栓を生じることが報告されている<sup>10)</sup>。この結果、糸球体硬化が進行し機能ネフロン数が次第に減少する。一方、残存ネフロンは失われたネフロンの機能を代償する反応が起こり、糸球体高血圧がさらに増悪しネフロン数が次第に減少する結果、末期腎不全に至ると考えられている<sup>11)</sup>。したがって、血行動態面から見て、輸入細動脈の抵抗調節障害が糖尿病性腎症の進展に重要な役割を果たしていることが推察されるが、いかなる機序が輸入細動脈の拡張反応をもたらすか、他の臓器における細動脈との差異を形成するかは明らかでない。さらに、慢性高血糖で代表される糖尿病の腎輸入細動脈の異常が、血糖自体により影響するか否かについては検討されていない。

腎輸入細動脈の抵抗調節には、他の臓器細動脈にも共通する筋原性収縮反応と、腎に特異的な尿管系糸球体フィードバック機構（以下、TGFと略）が関与しており、この両者が腎灌流圧の変化に呼応して腎血流量を一定に保持する腎自動調節能を維持している。とくに、TGFはヘンレ尿管に流れる塩化ナトリウム（以下、NaClと

略）の量により輸入細動脈の血管抵抗調節を行い、糸球体濾過量を一定の値に維持しようとする機序であるが、この機序はヘンレ上行脚に存在する緻密班が管腔内のNaClの変化を感知することが重要な因子とされている。しかしながら緻密班と輸入細動脈とを連絡する介在因子について一酸化窒素（以下、NOと略）などの因子が想定されているが、いまだ一定の見解が得られていない。さらに、糖尿病などの高血糖状態がこれらの機序に与える影響の詳細な検討はなされていない。

以上の背景を鑑みて、本研究では急性ならびに慢性高血糖状態が腎輸入細動脈の圧収縮に与える影響を、その収縮機序である筋原性収縮ならびにTGFの二つの機序の観点から検討を加えた。さらに緻密班に密に分布する神経型一酸化窒素合成酵素（以下、nNOSと略）<sup>12)</sup>の影響を評価した。これらの作用を生体内で直接観察する目的で、生体内 charge-coupled device（以下、CCDと略）カメラ<sup>13-16)</sup>を用い、輸入細動脈の動態を、正常血糖ラットに急性高血糖状態を作成した状況下、ならびに慢性高血糖状態である Zucker 肥満ラットにおいて検討を行った。

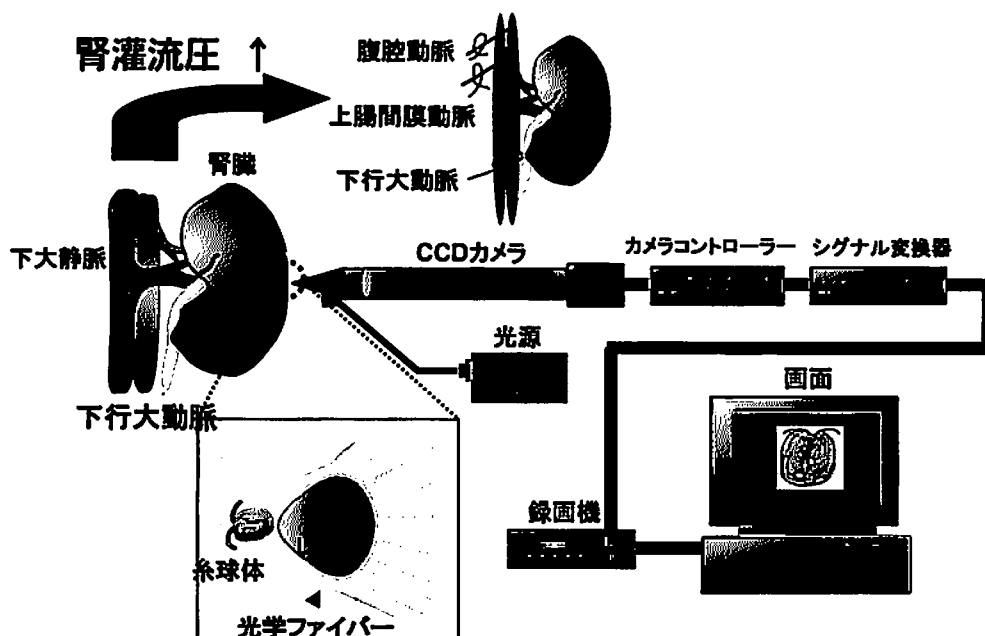
## 方 法

本研究では生体内ペンシルプローブ型 CCD カメラを用いて、生体内における腎輸入細動脈の血管特性を検討した（第1図）。雄性 Sprague-Dawley ラット（以下、SD ラットと略；Charles-River Japan）ならびに Zucker 肥満ラット（Charles-River Japan）を用いペントバルビタール麻酔、気管内挿管、右内頸動脈、両側大腿静脈にカテーテルを挿入した。十分な麻酔を確認後開腹し、腎皮質部に直接 CCD カメラプローブの先端を接触させることにより腎糸球体に隣接する輸入細動脈の直径を評価観察した<sup>15, 16)</sup>。得られた画像はビデオカセットレコーダー（ソニー、EVO-9850）にて録画し、後日コンピューターにて輸入細動脈径の自動解析を行った。内頸動脈から弓部大動脈に挿入したカテーテルの先端の圧を圧トランスデューサー（日本光電、TP-4009）を用いて測定し、その圧を腎灌流圧と見なした。

### 実験プロトコール

1. 腎灌流圧上昇に伴う輸入細動脈の圧収縮反応の検討  
9-11 週齢の SD ラット (n=10) を用い、以下の検討を行った。

1) 腎輸入細動脈の灌流圧上昇に対する変化  
腹腔動脈、上腸間膜動脈の2箇所を同時にクランプす



第1図 実験システム模式図。Charge-coupled device (CCD) カメラのプロープ先端を腎皮質に挿入し腎微小循環の画像を評価する。得られた画像はアナログ・デジタルシグナル変換器を通してコンピュータに入力される。腹腔動脈、上腸間膜動脈、腎動脈より末梢レベルの下行大動脈をクランプすることにより腎灌流圧を上昇させる。

ること、ならびに腹腔動脈、上腸間膜動脈、腎動脈より末梢レベルの下行大動脈の3箇所を同時にクランプすることにより、腎灌流圧を段階的に上昇させた。腎灌流圧上昇前、上昇後2分後の時点で、輸入細動脈径を測定した。

## 2) 筋原性収縮ならびに TGF の直接的観察

圧収縮における筋原性収縮ならびに TGF の役割を検討する目的で、おのおのの抑制薬であるガドリニウムクロライド (Sigma Chemical, Co), およびフロセミド (Sigma Chemical, Co) を用いて評価した。すなわち、血圧に影響を与えない用量 (ガドリニウム 5, 10 mg/kg; フロセミド 10, 16  $\mu$ g/kg/min) を静脈内に投与し、5分後に基礎輸入細動脈血管トヌスに与える影響を検討したのち、腎灌流圧を上昇させ輸入細動脈の圧上昇に対する収縮反応を評価した。さらにガドリニウム 10 mg/kg, フロセミド 16  $\mu$ g/kg/min 同時投与5分後に、腎灌流圧を上昇させ輸入細動脈径を測定した。

## 2. 急性高血糖状態における検討

9-11週齢の雄性SDラット (n=10) を用い、以下の検討を行った。

### 1) 急性高血糖に伴う腎輸入細動脈の圧収縮に与える影響

50%グルコースを2 ml/時の速度で40分間大腿静脈より持続投与することにより、急性高血糖の状態を作成した。血糖値上昇前後で輸入細動脈径を測定し、高血糖による影響を評価した。血糖値は尾静脈血より簡易血糖測定器 (三和科学研究所, グルテストエース) を用いて測定した。

次に、急性高血糖状態を作成後、腎灌流圧を上昇させ2分後に輸入細動脈径を測定した。さらに急性高血糖が筋原性収縮反応ならびに TGF に与える影響を個別に検討するため、急性高血糖状態下でおのおのフロセミド (16  $\mu$ g/kg/min) あるいはガドリニウム (10 mg/kg) を投与後、腎灌流圧上昇に対する輸入細動脈反応を検討した。

### 2) 腎輸入細動脈圧収縮反応に対する浸透圧の影響

急性高血糖状態での腎灌流圧上昇における輸入細動脈の反応性の変化が血漿浸透圧の上昇と関連しているか否かを検討した。すなわち、20%マニトールを経静脈的に投与し浸透圧を上昇させた状態において、腎灌流圧の上昇に対する輸入細動脈の反応を評価した。血漿浸透圧

の測定にはマイクロ浸透圧計 (Advanced Instrument, Inc, model 3MO) を使用した。

### 3) 急性高血糖下における圧収縮反応に対する nNOS の役割

急性高血糖状態での圧収縮反応の変化に対する nNOS の関与を検討する目的で、nNOS の阻害薬である S-methyl-L-thiocitrulline (L-SMTC; Sigma Chemical) の持続投与下 (0.3 mg/時) で圧収縮反応の変化を検討した。さらに筋原性収縮反応、TGF における nNOS の関与を個別に検討するため、おのおのフロセミド (16  $\mu$ g/kg/min) あるいはガドリニウム (10 mg/kg) 投与下で L-SMTC (0.3 mg/時) を同時投与し、腎灌流圧上昇前後で輸入細動脈径を測定した。

### 3. 慢性高血糖状態における検討

慢性高血糖モデルラットである 13 週齢の雄性 Zucker 肥満ラットを用いて検討した。まず、腎灌流圧上昇に対する輸入細動脈の反応を評価した後、ガドリニウム (10 mg/kg) あるいはフロセミド (16  $\mu$ g/kg/min) 投与下で同様の圧収縮反応を検討した。

次に、ガドリニウム (10 mg/kg) あるいはフロセミド (16  $\mu$ g/kg/min) に加え、L-SMTC (0.3 mg/時) を同時投与し、腎灌流圧上昇に対する輸入細動脈収縮反応を評価した。

### 4. 統計解析

各結果は平均±標準誤差で表した。統計学的検討は、1 群あるいは 2 群分散分析法を用いて行い、有意差を認めた場合には Fisher's post hoc tests を用いて各項目間における有意差につき検討した。p<0.05 をもって有意差ありと考えた。

## 結 果

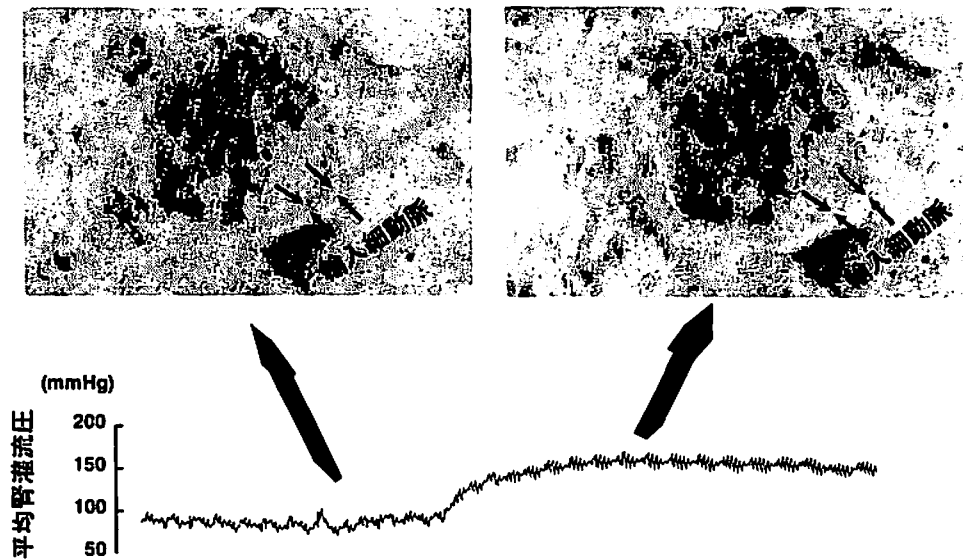
### 1. 輸入細動脈圧収縮反応における検討

#### 1) 腎輸入細動脈の灌流圧上昇に対する変化

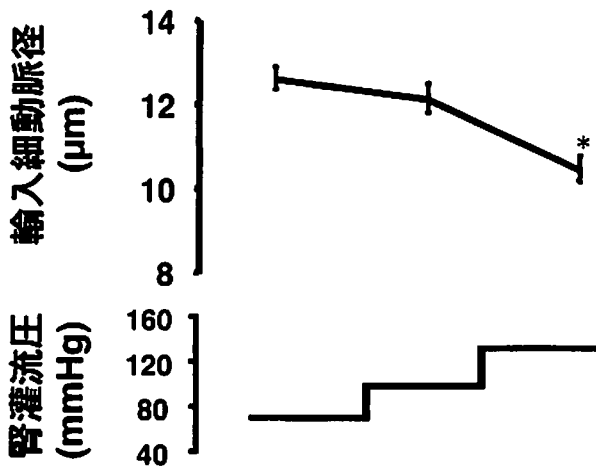
第2図に、SD ラットにおける腎灌流圧上昇に対する輸入細動脈の反応の代表例を示す。腎灌流圧を 80 から 140 mmHg に上昇させると、輸入細動脈はただちに 12.8 から 10.2  $\mu$ m へと血管径の減少を示した。合計 10 匹のラットにおける検討では、腎灌流圧を 70±4 から 104±6 mmHg へと上昇させることにより、輸入細動脈径は 12.6±0.5  $\mu$ m (n=10) から 12.0±0.5  $\mu$ m へと収縮傾向にとどまったが、さらなる灌流圧の上昇 (132±4 mmHg) により 10.6±0.4  $\mu$ m (p<0.05 vs.灌流圧上昇前) へと、17.5±2.0%の収縮反応を示した (第3図)。

#### 2) 筋原性収縮反応ならびに TGF の直接的観察

輸入細動脈基礎血管径はガドリニウム (5, 10 mg/kg)、フロセミド (10, 16  $\mu$ g/kg/min) 投与後共に有意な変



第2図 Charge-coupled device カメラを用いた腎微小循環の観察。平均腎灌流圧 (下段) を変化させると腎輸入細動脈の収縮反応が観察される (上段)。



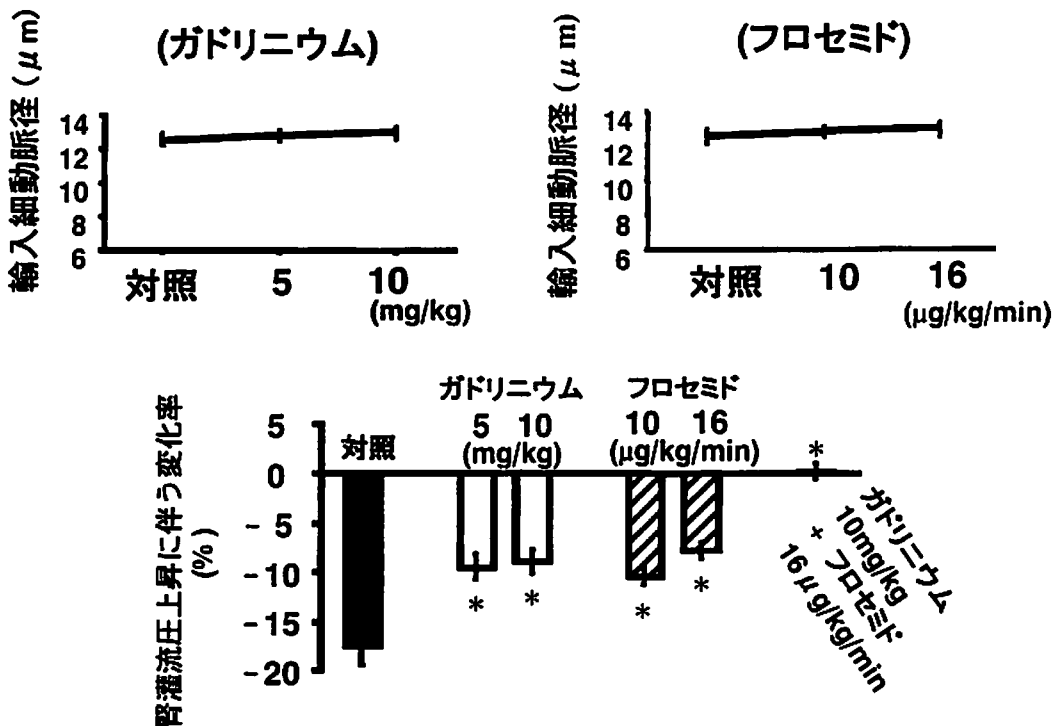
第3図 腎灌流圧上昇に対する輸入細動脈の収縮反応。上図は輸入細動脈径の変化、下図は腎灌流圧の変化を示す。結果は平均±標準誤差で示す。\*、 $p < 0.05$  vs. 腎灌流圧上昇前。

化を示さなかった(第4図, 上段)。その後腎灌流圧を上昇させると、ガドリニウム (5 mg/kg,  $-9.0 \pm 1.2\%$ ; 10 mg/kg,  $-9.5 \pm 1.2\%$ ), フロセミド (10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $-10.4 \pm 0.9\%$ ; 16  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $-7.8 \pm 0.8\%$ ) とともに圧収縮反応の減弱をもたらした(第4図, 下段)。なお、ガドリニウム 10 mg/kg, フロセミド 16  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  の同時投与により、圧収縮反応は完全に消失した。

## 2. 急性高血糖状態における検討

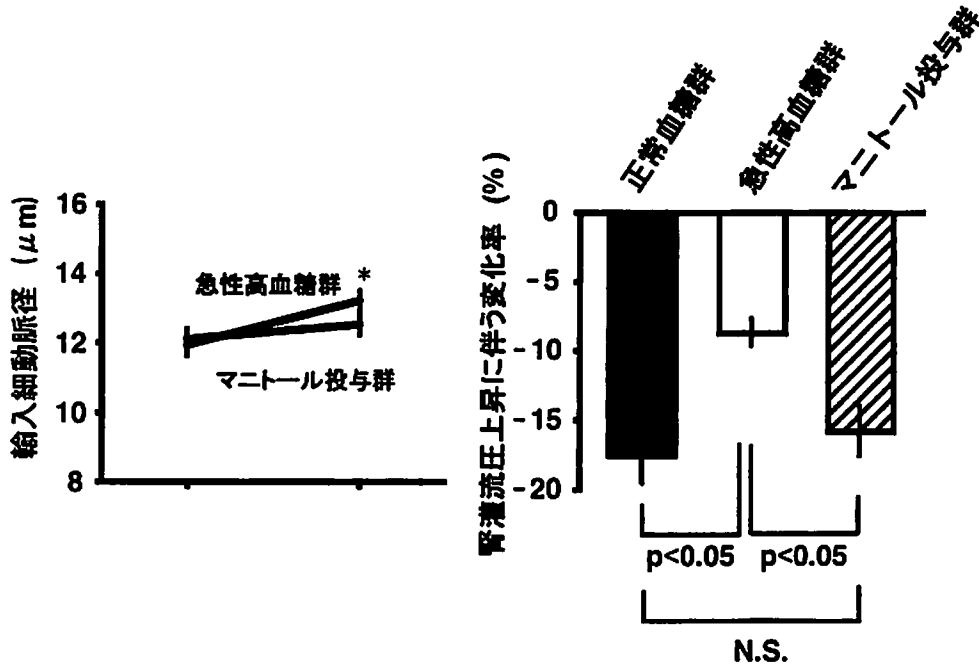
### 1) 急性高血糖に伴う腎輸入細動脈の圧収縮に与える影響

50%グルコースを大腿静脈より持続投与することにより血糖値は  $98 \pm 8$  より  $445 \pm 6 \text{mg}/\text{dl}$  に上昇し ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ), 血漿浸透圧も  $283 \pm 5 \text{mOsm}/\text{kg}$  より  $300 \pm 6 \text{mOsm}/\text{kg}$  に上昇した。これに伴い基礎輸入細動脈径はグルコース投与前  $11.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$  より、血糖上昇後  $13.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$  と有意の拡張反応を示した ( $11.7 \pm 1.6\%$ ,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ , 第5図左)。一方、20% マニトールの投与でも同程度の浸透圧の上昇が認められ



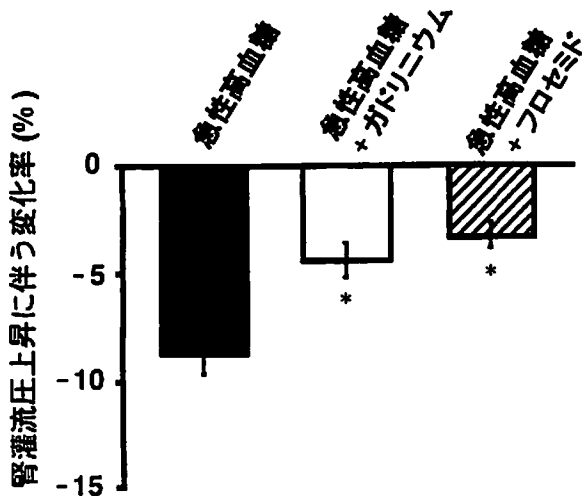
第4図 ガドリニウムならびフロセミドの輸入細動脈基礎血管径および圧収縮反応に与える影響。上段はガドリニウムならびにフロセミド投与時の輸入細動脈基礎血管径の変化を示す。下段はガドリニウムならびにフロセミドの圧収縮反応に与える抑制作用を基礎血管径からの変化率で示す。結果は平均±標準誤差で示す。

\* ;  $p < 0.05$  vs. 対照。



第5図 急性高血糖およびマニトールの基礎輸入細動脈径、圧収縮反応に与える影響。血糖値を  $98 \pm 8$  より  $445 \pm 6$  mg/dl へ上昇させると血漿浸透圧は  $283 \pm 5$  から  $300 \pm 6$  mOsm/kg に上昇した。その際、輸入細動脈は  $8.7 \pm 1.0\%$  の収縮を示した。一方、マニトールにて同様の血漿浸透圧上昇 ( $281 \pm 7$  から  $296 \pm 2$  Osm/kg) を誘発したが、細動脈収縮を抑制しなかった。結果は平均±標準誤差で示す。

\* ;  $p < 0.05$  vs 血糖上昇前。N.S., 有意差なし。



第6図 急性高血糖の筋原性収縮反応、尿細管糸球体フィードバックに与える影響。急性高血糖時におけるガドリニウム、フロセミド投与後における輸入細動脈収縮反応の比較を基礎血管径からの変化率で示す。結果は平均±標準誤差で示す。

\* ;  $p < 0.05$  vs 急性高血糖。

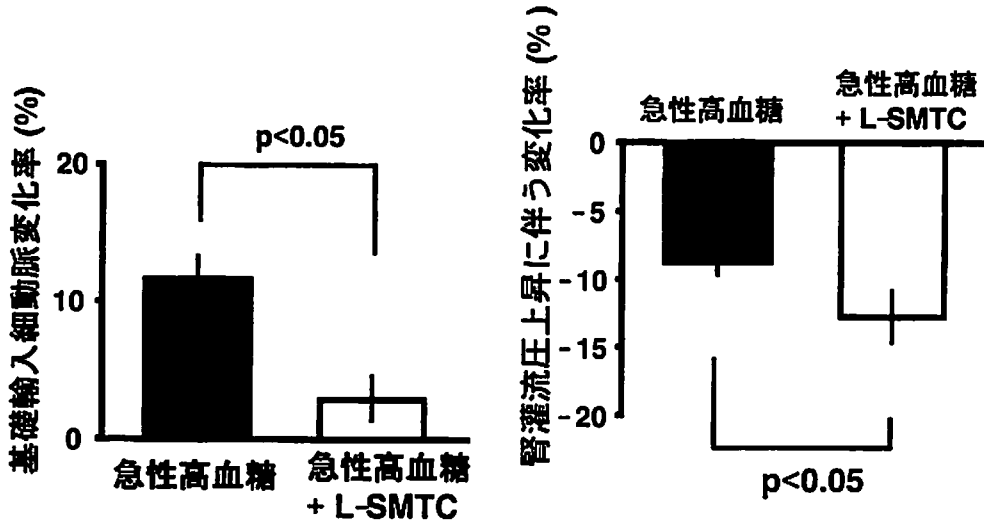
たが ( $281 \pm 7$  mOsm/kg から  $296 \pm 2$  mOsm/kg), 輸入細動脈径は有意な変動を示さなかった。

血糖上昇後腎灌流圧を上昇させると、輸入細動脈は  $-8.7 \pm 1.0\%$  の収縮にとどまり、正常血糖群の反応 ( $-17.5 \pm 2.0\%$ ) に比し有意に減弱していた ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ) (第5図右)。マニトールによる浸透圧上昇では、輸入細動脈の圧収縮は正常血糖群と有意差を認めなかった。

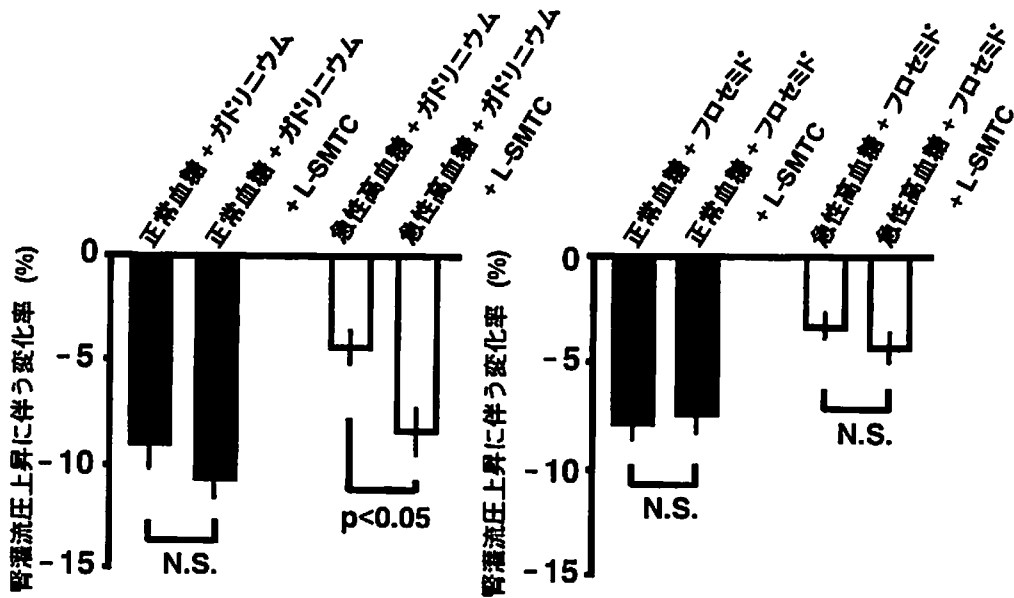
さらに、ガドリニウム ( $10$  mg/kg) 存在下では、圧収縮反応は減弱した ( $-4.4 \pm 0.8\%$ ,  $p < 0.05$  vs. 急性高血糖群) (第6図)。同様の結果が、フロセミド ( $16$  μg/kg/min) 存在下においても観察された ( $-3.3 \pm 0.6\%$ ,  $p < 0.05$  vs. 急性高血糖群)。

2) 急性高血糖状態における圧収縮反応に対する nNOS の関与

全身血圧は、nNOS の抑制薬である L-SMTC の投与により有意な変動を認めなかった。一方、急性高血糖に伴う輸入細動脈の血管径の増加 ( $11.7 \pm 1.6\%$ ) は、L-SMTC により著明に抑制された ( $2.9 \pm 1.7\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ) (第7図左)。さらに、高血糖により減弱した腎



第7図 急性高血糖の基礎輸入細動脈径、収縮反応の変化に対する神経型一酸化窒素合成酵素の関与。左図は急性高血糖による基礎輸入細動脈拡張に与える神経型一酸化窒素合成酵素の阻害薬である S-methyl-L-thiocitrulline (L-SMTC) の作用を示す。右図は急性高血糖による腎輸入細動脈収縮反応の抑制に与える L-SMTC の作用を示す。基礎血管径からの変化率を示す。結果は平均±標準誤差で示す。



第8図 尿管系球体フィードバック、筋原性収縮反応に対する神経型一酸化窒素合成酵素の影響の正常血糖、急性高血糖における比較。ガドリニウム存在下で灌流圧を上昇させることにより、尿管系球体フィードバック機構を介する輸入細動脈収縮を誘発した（左図）。神経型一酸化窒素合成酵素阻害薬である S-methyl-L-thiocitrulline (L-SMTC) は急性高血糖による収縮反応の減弱を改善した。一方、フロセミド存在下での収縮反応は主として筋原性収縮を示すが、急性高血糖による抑制は L-SMTC で回復しなかった。基礎血管径からの変化率で示す。結果は平均±標準誤差で示す。N.S.、有意差なし。

灌流圧の上昇に伴う輸入細動脈の圧収縮反応 ( $-8.7 \pm 1.0\%$ ) は、L-SMTC により増強した ( $-12.8 \pm 1.9\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ) (第7図右)。

L-SMTC による圧収縮の回復作用が、筋原性収縮あるいは TGF のいずれかに作用しているかを検討するため、フロセミドあるいはガドリニウム存在下で評価を行った。まず、ガドリニウムを投与することにより TGF による圧収縮機序に対する影響を検討した。その結果、L-SMTC は正常血糖下では有意な影響を与えなかったが ( $-9.0 \pm 1.2\%$  vs.  $-10.6 \pm 1.0\%$ ,  $p > 0.2$ ,  $n = 10$ )、高血糖下では減弱した収縮反応を回復させた。 ( $-4.4 \pm 0.8\%$  vs.  $-8.4 \pm 1.1\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ) (第8図左)。

次に筋原性収縮に対する L-SMTC の作用を評価するため、フロセミド存在下での反応を検討したが、正常血糖状態ならびに高血糖状態のいずれにおいても L-SMTC は輸入細動脈の変化率に有意な変動を与えなかった (第8図右)。

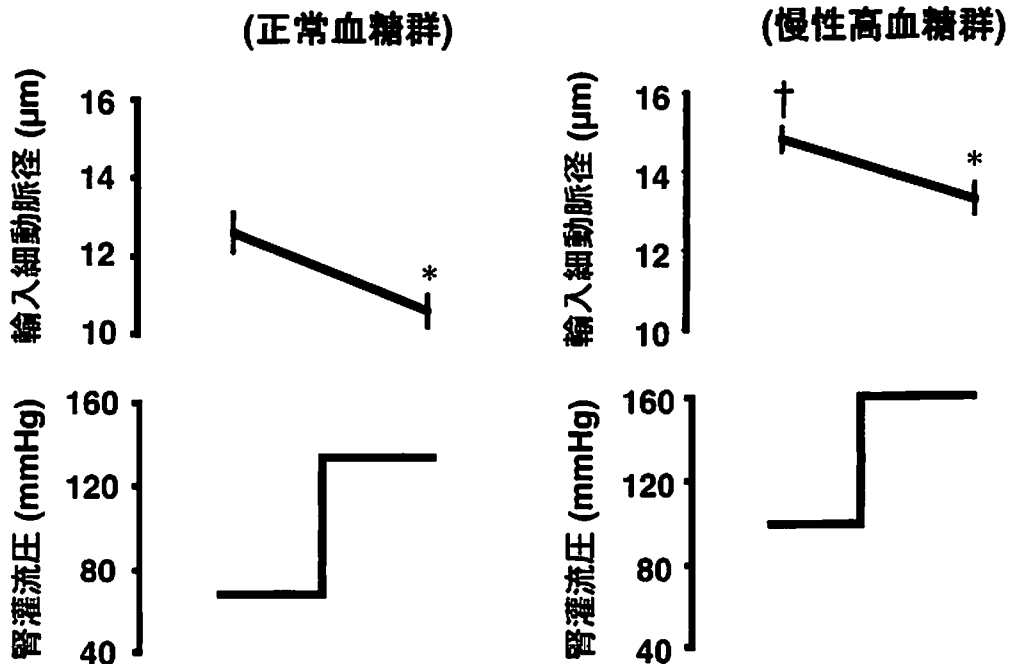
### 3. 慢性高血糖状態における検討

Zucker 肥満ラットの血糖値は、SD ラットに比し有

意に高値であった ( $161 \pm 7$  mg/dL,  $n = 10$  vs.  $98 \pm 8$  mg/dL,  $n = 10$ ,  $p < 0.01$ )。基礎輸入細動脈径は  $14.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.05$  vs. 正常血糖群) であり、SD ラットに比し有意に増大していた ( $p < 0.01$ ) (第9図)。腎灌流圧上昇に伴い、Zucker 肥満ラットの輸入細動脈は有意に収縮したが ( $14.8 \pm 0.3$  より  $13.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ )、SD ラットに比し収縮率は減弱していた (SD ラット,  $-17.5 \pm 2.0\%$ ; 肥満ラット,  $-10.6 \pm 1.1\%$ ,  $p < 0.05$ )。

ガドリニウム ( $10$  mg/kg) ならびにフロセミド ( $16 \mu\text{g/kg/min}$ ) の投与は、基礎輸入細動脈径に影響を与えなかった。一方、ガドリニウム存在下での腎灌流圧上昇による細動脈収縮は減弱し ( $-4.8 \pm 1.1\%$ ,  $n = 10$ ) (第10図)、その程度は正常血糖ラットのガドリニウム存在下での反応よりも低値であった ( $-9.5 \pm 1.2\%$ ,  $p < 0.05$ )。同様にフロセミド存在下における圧収縮は抑制され ( $-3.9 \pm 0.7\%$ ,  $n = 10$ )、正常血糖ラットのフロセミド存在下の反応よりも低値であった ( $-7.8 \pm 0.8\%$ ,  $p < 0.05$ )。

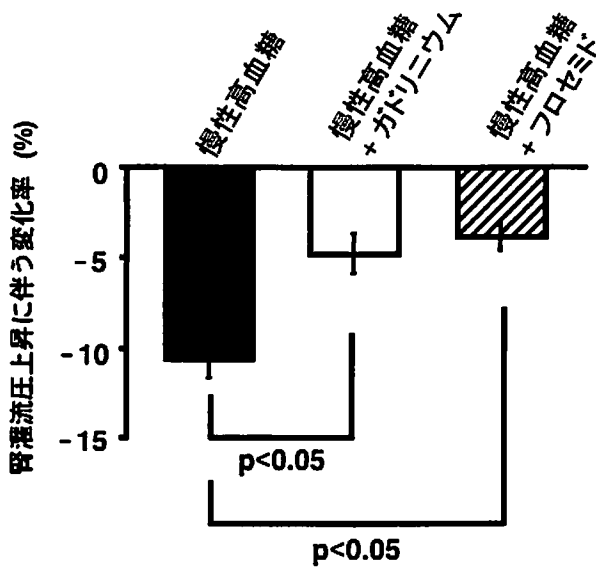
つぎに、ガドリニウムと L-SMTC を同時投与した後、



第9図 輸入細動脈圧収縮反応の正常血糖、慢性高血糖における比較。左図は正常血糖群、右図は慢性高血糖群における腎灌流圧上昇に対する輸入細動脈径の変化を示す。結果は平均±標準誤差で示す。

\* ;  $p < 0.05$  vs. 腎灌流圧上昇前。† ;  $p < 0.05$  vs. 正常血糖群腎灌流圧上昇前。



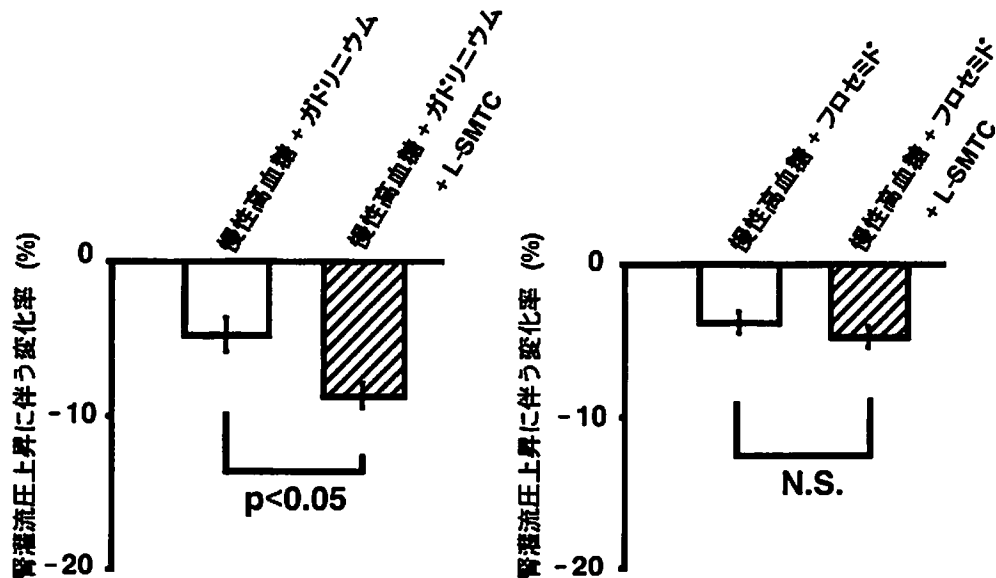


第 10 図 慢性高血糖における筋原性収縮反応ならびに尿細管系球体フィードバックの変化。慢性高血糖状態における腎灌流圧上昇に対する筋原性収縮（フロセミド存在下）、尿細管系球体フィードバックの反応（ガドリニウム存在下）を示す。基礎血管径からの変化率を示す。結果は平均±標準誤差で示す。

腎灌流圧を上昇させた際の輸入細動脈収縮率はガドリニウム単独投与群に比し有意に増強した（ガドリニウム単独投与群 $-4.8 \pm 1.1\%$ 、ガドリニウム、L-SMTC 同時投与群 $-8.7 \pm 0.8\%$ ,  $n=10$ ）（第 11 図左）。一方、フロセミドと L-SMTC 同時投与後腎灌流圧を上昇させると輸入細動脈の収縮率は L-SMTC 非存在下と比し有意差を認めなかった（フロセミド単独投与群 $-3.9 \pm 0.7\%$ 、フロセミド、L-SMTC 同時投与群 $-4.8 \pm 0.7\%$ ,  $n=10$ ）（第 11 図右）。

### 考 察

腎臓は灌流圧の変化にも関わらず、腎血流量を一定に保持する自動調節能を有している。この恒常性を維持する機構の大部分は、糸球体の前に存在する輸入細動脈の灌流圧に対する収縮が関与しており、その機序として血管壁に内在する筋原性収縮反応と尿細管からのシグナルを介する TGF の両者が協力しながら作動すると考えられている。しかしながら、両機序の作用を生体内で直接観察することは極めて困難であり、従来腎臓や<sup>17, 18)</sup>血管を単離するなどの比較的侵襲的な手法<sup>19~21)</sup>が用いられていた。本研究で用いた生体内 CCD カメラは、麻酔下



第 11 図 慢性高血糖状態における筋原性収縮、尿細管系球体フィードバックに対する神経型一酸化窒素合成酵素の関与。図は慢性高血糖状態での尿細管系球体フィードバックの反応および神経型一酸化窒素合成酵素の関与。右図は慢性高血糖状態での筋原性収縮反応の反応および神経型一酸化窒素合成酵素の関与を示す。L-SMTC, S-methyl-L-thiocitrulline。基礎血管径からの変化率を示す。結果は平均±標準誤差で示す。

で腎臓に挿入するのみで観察可能であり、比較的非侵襲的に反応を評価できる手技と考えられる<sup>15, 16)</sup>。実際、Yamamotoら<sup>16)</sup>はイヌ腎動脈内に高張食塩水を注入することにより、輸入細動脈が収縮することを報告している。本研究では、腎灌流圧の上昇が輸入細動脈収縮をもたらすことを生体内で観察し得た(第2, 第3図)。さらに、おのおの筋原性収縮、TGF抑制薬であるガドリニウムならびにフロセミドを用いることにより、両機序がともに作動していることを明らかにした(第4図)。

興味深いことに、SDラットの基礎輸入細動脈径はガドリニウム、フロセミドともに有意な変化を与えなかった。この結果より、定常状態では筋原性収縮反応、TGFともに輸入細動脈緊張に大きな影響を与えていないことが推察された。一方、高血圧モデルラットのひとつである高血圧自然発症ラットでは、筋原性収縮反応、TGF共に亢進していることが報告されており<sup>22-24)</sup>、著者らも高血圧自然発症ラットでガドリニウム、フロセミド投与により輸入細動脈基礎血管径が拡張反応を示し、圧収縮反応も増強していることを報告した<sup>25)</sup>。したがって、筋原性収縮反応ならびにTGFの反応性の亢進が、全身血圧高値にも関わらず糸球体高血圧を生じにくい一因と考えられる。

本研究では、腎臓の微小循環系で重要な役割を担っている輸入細動脈が急性高血糖状態で拡張し、さらに圧上昇に伴う細動脈収縮反応が障害されていることが明らかになった(第5図)。一方、高血糖に伴う浸透圧の変化自体が血管反応に影響を与えるか否かをマニトールにより同程度の浸透圧上昇を誘発することにより検討したが、血管拡張反応は認められなかった。さらに、灌流圧上昇に伴う収縮機序として筋原性収縮とTGFの二つの機序が関与しているが、高血糖状態では両者ともに障害を受ける事が示唆された(第4図, 第6図)。

血管緊張の調節にNOが重要な役割を果たしていることが多くの研究により明らかにされている。本研究では急性高血糖による細動脈拡張の機序として、腎ヘンレ尿管に密に存在するnNOS由来のNOが関連するかを評価した。その結果、L-SMTCの前処置により、高血糖による輸入細動脈拡張反応が抑制され(第7図左)、さらに高血糖による圧収縮の減弱が回復した(第7図右)。これらの結果より、nNOS由来のNOが高血糖に伴う輸入細動脈異常に関与することが明らかとなった。つぎに、nNOS由来のNOが急性高血糖による輸入細動脈の圧収縮異常をもたらす機序として、筋原性収縮あるいはTGFのいずれの機序に作用しているかを、ガドリニウムならびにフロセミドを用いて検討した。すなわち、

ガドリニウムにより筋原性収縮を抑制した状況ではTGFによる輸入細動脈が、逆にフロセミドによりTGFを抑制した状況では筋原性収縮が圧収縮を誘発させると考えられるが、急性高血糖による圧収縮抑制作用に対するL-SMTCの作用が、ガドリニウム存在下で回復した(第8図)。一方、フロセミドの存在下では、L-SMTCの回復作用は認めなかった(第9図)。これらの結果より、急性高血糖による輸入細動脈の圧収縮障害は、nNOS由来のNOが主としてTGF機構を抑制することにより生じるものと考えられた。この点に関して、Arimaらは高血糖により内皮由来NOはむしろ減少し、輸入細動脈が収縮反応を示すことをウサギ腎から取り出した単離輸入細動脈を用いて示した<sup>26)</sup>。これらの結果の差異は明らかでないが、実験系の相違などが考えられる。すなわち、本研究では高血糖誘発とともに比較的早期に輸入細動脈の拡張反応が見られたのに対し、Arimaらの検討では時間単位での経過を要した。さらに、本研究で用いた生体内CCDカメラは筋原性収縮ならびにTGFの両者の収縮機序が作動するが、単離輸入細動脈モデルではTGFの関与がなく主として血管壁に内在する反応と考えられた。

本研究は、さらに慢性高血糖モデルであるZucker肥満ラットにおける輸入細動脈の圧収縮の検討を行い、糖尿病における腎微小循環異常を評価した。その結果、急性高血糖における結果と同様に慢性高血糖を示すZucker肥満ラットの腎細動脈においても基礎血管緊張の減弱が見られ、腎灌流圧上昇に対する圧収縮反応も低下していた(第10図)。古くより糖尿病状態では腎血流量が増加しており、糸球体濾過率も増大することが示されている。その機序として、輸入細動脈の比較的選択的な拡張が腎血行動態の異常に関与することが単離輸入細動脈<sup>27)</sup>や単離水腎症モデル<sup>6)</sup>などの*in vitro*の実験系で示されており、その結果糸球体高血圧をきたし、糸球体硬化へと導くことが推察されている。本研究は急性高血糖と同様、慢性高血糖においても、糸球体血行動態の異常が輸入細動脈を中心とした細動脈抵抗調節障害に由来することを生体内で明らかにした。

さらに本研究では、慢性高血糖による圧収縮反応の減弱を、筋原性収縮とTGFによる収縮に分けて評価した。その結果、慢性高血糖状態では両機序とも障害されていることが明らかとなった(第10図)。慢性高血糖における筋原性収縮の異常に関連して、Hayashiら<sup>6)</sup>はTGFによる反応が欠落した単離水腎症モデルを用いて、Zucker肥満ラットの輸入細動脈における圧収縮反応が減弱しており、本研究結果と合致する結果であった。さ

らに、streptozotocin 誘発糖尿病ラットにおいても、輸入細動脈の収縮反応が障害されており、その機序として血管拡張性のプロスタグランジンが関与することが報告されている<sup>28)</sup>。一方、Carmines ら<sup>29)</sup>は streptozotocin 誘発糖尿病ラットの輸入細動脈では、電位依存性カルシウムチャネルのアゴニストである BAYK8644 による輸入細動脈収縮が減弱していることを報告しており、輸入細動脈の筋原性収縮反応が電位依存性カルシウムチャネルを刺激して血管収縮をもたらすことを考え合わせると、糖尿病におけるカルシウムチャネルの異常が慢性高血糖による収縮障害の成因に一部関与することが示唆される。さらに、Ikenaga ら<sup>30)</sup>は糖尿病ラットから取り出した単離傍髄質ネフロンにおいて、ATP 感受性カリウムチャネルの刺激薬である pinacidil もしくは PCO-400 による輸入細動脈の拡張が正常血糖ラットに比し増強しており、逆に ATP 感受性カリウムチャネル抑制薬である glibenclamide が輸入細動脈の収縮を起こすが正常血糖ラットでは有意な変化をもたらさないことを報告している。したがって、慢性高血糖状態では ATP 感受性カリウムチャネルの活性化に伴う輸入細動脈の膜電位の過分極が電位依存性カルシウムチャネルの抑制の一因として推測される。

本研究では、慢性高血糖状態では TGF の抑制も輸入細動脈の収縮反応の障害に関与することを明らかにした (第 10 図)。糖尿病では近位尿細管におけるナトリウム再吸収が亢進していることがヒト<sup>31)</sup>ならびに動物<sup>32)</sup>で報告されており、Na<sup>+</sup>/glucose co-transport の増加と関連する可能性が示唆されている<sup>33)</sup>。その結果、緻密斑に達する NaCl が減少し TGF が減弱することが推測される。一方、本研究では上記の機序以外に TGF の作用を調節する因子<sup>34)</sup>である NO の役割について検討を行った。その結果、nNOS 抑制薬である L-SMTC により慢性高血糖に伴う TGF の抑制が解除された (第 11 図左)。したがって、慢性高血糖では緻密斑で過剰産生される NO が TGF の機構に抑制的に作用していることが示唆された。近年、緻密斑には nNOS が豊富に存在し TGF を介する輸入細動脈の収縮に対し抑制的に働く事が報告されており<sup>35)</sup>、糖尿病では nNOS 由来の NO 活性が亢進し糸球体濾過量を増加させているとの報告がされている<sup>36)</sup>。本研究では、nNOS による NO 活性亢進の結果 TGF を選択的に抑制することが示された。一方、筋原性収縮に対しては NO の作用は認められず (第 11 図右)、筋原性収縮が NO ならびにサイクリック GMP を介する拡張作用に抵抗性を示すとの従来の結果と合致した<sup>37, 38)</sup>。以上の結果より、慢性高血糖による輸入細動脈の抵抗調

節異常ならびにその病態機序が、急性高血糖に伴う変化とおおむね一致しており、糖尿病に伴う高血糖自体がその一因と考えられた。

慢性高血糖では、血糖値の変化以外にも種々のホルモンやサイトカインなどの変化をきたすことが知られている。心房性ナトリウム利尿ペプチド (以下、ANP と略) は糖尿病動物<sup>39)</sup>ならびにヒト<sup>40)</sup>において上昇することが知られており、輸入細動脈を拡張させ輸出細動脈を収縮させる<sup>41)</sup>ことにより、糸球体濾過率を増加させることが推測される。実際、Zhang ら<sup>42)</sup>は ANP 受容体に特異的な拮抗薬を投与することにより、糖尿病ラットの糸球体過剰濾過を改善することを報告し、糖尿病における輸入細動脈の拡張作用に ANP が寄与している可能性を示した。さらに、ANP は TGF を抑制することが報告されている<sup>43, 44)</sup>反面、筋原性収縮を抑制しないことも示されている<sup>45)</sup>。したがって、ANP が糖尿病における腎微小循環異常のすべてを説明できないが、少なくとも一部に関与している可能性が考えられる。また、糖尿病ラットでは TGF- $\beta$  産生が亢進し<sup>46)</sup>、さらに糸球体高血圧によりメサンギウム細胞が過伸展刺激を受けることよって TGF- $\beta$  産生が亢進する事が報告されている<sup>9)</sup>。加えて、Sharma ら<sup>47)</sup>の傍髄質ネフロンを用いた研究では、灌流液に TGF- $\beta$  を加えることにより輸入細動脈の収縮反応を抑制することを報告している。したがって、本研究で確認された高血糖による輸入細動脈自動調節能の障害の原因の一部に TGF- $\beta$  の作用が関与している可能性も考えられた。

高血糖に代表される糖尿病の腎微小循環異常は、全身高血圧を認めない状況においても糸球体高血圧が存在することが示されており、糸球体内圧の程度と全身血圧とは必ずしも相関しないことが報告されている<sup>48)</sup>。本研究での慢性高血糖のみならず急性高血糖状態において既に輸入細動脈の収縮反応は障害されていることを考慮すると、より早期からの適切な血糖コントロール、厳格な血圧の管理が糸球体高血圧、糸球体硬化を伴う糖尿病性腎症進展の阻止に極めて重要なことが示唆される。しかしながら、糸球体内圧を決定するもう一つの抵抗血管である輸出細動脈の検討は十分ではない。輸出細動脈には筋原性収縮反応が存在しないことが示されているが<sup>49)</sup>、TGF に関しては一定の見解が得られていない<sup>50)</sup>。したがって、急性高血糖、慢性高血糖状態における輸出細動脈の反応については今後の検討が必要である。

総 括

生体内 CCD カメラを用いてラット腎輸入細動脈を直接観察し、急性ならびに慢性高血糖状態における腎輸入細動脈の圧収縮反応を、筋原性収縮反応ならびに尿細管糸球体フィードバック機構 (TGF) の二つの面から検討し、以下の結果を得た。

1. 急性高血糖状態では、輸入細動脈の拡張反応が認められ、この反応は nNOS 抑制により消失した。
2. 急性高血糖状態では、腎灌流圧上昇に対する腎輸入細動脈の圧収縮反応は有意に減弱していた。この変化は浸透圧非依存性であり、nNOS の抑制により一部回復した。
3. 急性高血糖状態において、筋原性収縮反応、TGF の作用が共に減弱していた。nNOS の抑制薬は筋原性収縮反応の減弱には影響を与えなかったが、TGF の減弱反応を改善した。
4. 慢性高血糖状態においても、筋原性収縮反応、TGF による収縮反応が共に減弱していた。
5. 慢性高血糖状態における TGF の減弱には、一部 nNOS による NO の産生亢進が関与することが示唆された。

以上の結果より、急性高血糖状態においても、慢性高血糖状態においても腎微小循環異常が認められ、その機序として輸入細動脈における筋原性収縮反応の低下ならびに緻密班 nNOS 由来の NO の過剰産生による TGF の抑制が関与することが示唆された。これらの異常が糸球体高血圧を誘発することになり、長期的には糸球体障害の一因あるいは増悪因子となりうる事が考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、懇切な御指導と御校閲を賜りました。慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深謝いたします。また、本研究に際して直接御指導いただきました。慶應義塾大学医学部内科林兎一講師に心より感謝いたします。さらに御協力いただいた研究室員各位に心から感謝いたします。

文 献

- 1) 飯野 靖彦：腎疾患の予後とプライマリケアの意義。日本内科学会雑誌, 90 ; 1220-1223, 2001
- 2) 日本透析医学会統計調査委員会：わが国の慢性透析療法の実況。(2002年12月31日現在) 透析医学会雑誌, 37 ; 1-24, 2004
- 3) Sharma K, Danoff TM, DePiero A, Ziyadeh FN : Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels : possible median via protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 207 ; 80-88, 1995
- 4) Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS : Oxidative stress and nitric oxide synthase in the rat diabetic nephropathy : effect of ACEI or ARB. *Kidney Int* 61 ; 186-194, 2002
- 5) Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M : Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108 ; 1341-1348, 2001
- 6) Hayashi K, Kanda T, Homma K, Tokuyama H, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Kumagai H, Saruta T : Altered renal microvascular response in Zucker obese rats. *Metabolism* 51 ; 1553-1561, 2002
- 7) Osterby R, Hartmann A, Bangstad HJ : Structural changes in renal arterioles in Type I diabetic patients. *Diabetologia* 45 ; 542-549, 2002
- 8) Maddox DA, Bennett CM, Deen WM, Glasscock RJ, Knutson D, Daugharty TM, Brenner BM : Determinants of glomerular filtration in experimental glomerulonephritis in the rat. *J Clin Invest* 55 ; 305-318, 1975
- 9) Riser BL, Cortes P, Heilig C, Ladson-Wofford S, Patterson D, Narins RG : Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor-beta isoforms in cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 148 ; 1915-1923, 1996
- 10) Chavers BM, Bilous RW, Ellis EN, Steffes MW, Mauer SM : Glomerular lesions and urinary albumin excretion in type I diabetes without overt proteinuria. *N Engl J Med* 320 ; 966-970, 1989
- 11) Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC : Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 74 ; 1143-1155, 1984
- 12) Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt MHHW : Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 ; 11993-11997, 1992
- 13) Hiramatsu O, Goto M, Yada T, Kirnura A, Tachibana H, Ogasawara Y, Tsujioka K, Kajiyama F : Diameter of subendocardial arterioles and venules during prolonged diastole in canine left ventricles. *Circ Res* 5 ;

- 393-397, 1994
- 14) Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, Yamamori S, Ohno K, Hosaka H, Kajiya F : In vivo observation of subendocardial microvessels of the beating porcine heart using a needle-probe videomicroscope with a CCD camera. *Circ Res* 72 : 939-946, 1993
  - 15) Yamamoto T, Tomura Y, Tanaka H, Kajiya F : In vivo visualization of characteristics of renal microcirculation in hypertensive and diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 281 : F571-577, 2001
  - 16) Yamamoto T, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Tanaka H, Ogasawara Y, Nakamoto H, Suzuki H, Saruta T, Kajiya F : In vivo visualization of angiotensin II-and tubuloglomerular feedback-mediated renal vasoconstriction. *Kidney Int* 60 : 364-369, 2001
  - 17) Steinhausen M, Kucherer H, Parekh N, Weis S, Wiegman DL, Wilhelm KR : AngiotensinII control of the renal microcirculation : Effect of blockade by saralasin. *Kidney Int* 30 : 56-61, 1986
  - 18) Loutzenhiser R, Epstein M, Hayashi K, Takenaka T, Forster H : Characterization of the renal microvascular effects of angiotensinII antagonist, DuP 753 : Studies in isolated perfused hydronephrotic kidneys. *Am J Hypertens* 4 : 309S-314S, 1991
  - 19) Edwards RM : Segmental effects of norepinephrine and angiotensinII on isolated renal microvessels. *Am J Physiol* 244 : F526-F534, 1983
  - 20) Yuan BH, Robinette JB, Conger JD : Effect of angiotensinII and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol* 258 : F741-F750, 1990
  - 21) Ito S, Johnson CS, Carretero OA : Modulation of angiotensinII-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 87 : 1656-1663, 1991
  - 22) Ito S and Juncos LA, Carretero OA : Pressure-induced constriction of the afferent arteriole of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 11 : 11164-11167, 1992
  - 23) Brannstrom K, Morsing P, Arendshorst BM : Exaggerated tubuloglomerular feedback activity in genetic hypertension is mediated by ANGII and AT1 receptors. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 270 : F749-F755, 1996
  - 24) Welch WJ, Tojo A, Lee JU, Kang DG, Schnackenberg CG, Wilcox CS : Nitric oxide synthase in the JGA of the SHR : expression and role in tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 277 : F130-F138, 1999
  - 25) Homma K, Hayashi K, Kanda T, Matsuda H, Wakino S, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Saruta T : In vivo observation of myogenic and tubuloglomerular feedback mechanism in renal microcirculation by CCD video microscopy (Abstract) . *J Am Soc Nephrol* 13 : 154A, 2002
  - 26) Arima S, Ito S, Omata K, Takeuchi K, Abe K : High glucose augments angiotensinII action by inhibiting NO synthesis in *in vivo* microperfused rabbit afferent arterioles. *Kidney Int* 48 : 683-689, 1995
  - 27) Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM : Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77 : 1925-1930, 1986
  - 28) Hayashi K, Epstein M, Loutzenhiser R, Forster H : Impaired myogenic responsiveness of the afferent arteriole in streptozotocin-induced diabetic rats : role of eicosanoid derangements. *J Am Soc Nephrol* 2 : 1578-1586, 1992
  - 29) Carmines PK, Ohnishi K, Ikenaga H : Functional impairment of renal afferent arteriolar voltage-gated calcium channels in rat with diabetes mellitus. *J Clin Invest* 98 : 2564-2571, 1996
  - 30) Ikenaga H, Bast JP, Fallet RW, Carmines PK : Exaggerated impact of ATP-sensitive K channels on afferent arteriolar diameter in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 11 : 1199-1207, 2000
  - 31) Hannedouche TP, Delgado AG, Gniosahe DA, Boitard C, Grufeld JP : Renal hemodynamics and segmental tubular sodium reabsorption in early type 1 diabetes. *Kidney Int* 37 : 1126-1133, 1990
  - 32) Vailion V, Blantz RC, Thomason SC : Homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback is reduced in established diabetes mellitus in rats. *Am J Physiol* 269 : F876-F883, 1995
  - 33) Bank N, Aynedjian HS : Progressive increases in luminal glucose stimulate proximal sodium absorption in normal and diabetic rat. *J Clin Invest* 86 : 309-316, 1990
  - 34) Ren YL, Gravin JL, Carretero OA : Role of macula densa nitric oxide and cGMP in the regulation of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int* 58 : 2053-2060, 2000
  - 35) Ren YL, Gravin JL, Ito S, Carretero OA : Role of neuronal nitric oxide synthase in the macula densa. *Kidney Int* 60 : 1676-1683, 2001
  - 36) Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Allison KM, Anderson S : Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 279 : F573-F583, 2000
  - 37) Hayashi K, Suzuki H, Saruta T : Nitric oxide modulates but dose not impair myogenic vasoconstriction of the afferent arteriole in spontaneously hypertensive rats : Studies in the isolated perfusion hydronephrotic kidney. *Hypertension* 25 : 1212-1219, 1995
  - 38) Hoffend J, Caverape A, Endlich K, Steinhausen M : Influence of endothelium-derived relaxing factor on renal microvessels and pressure-dependent vasodila-

- tion. *Am J Physiol* 265 : F285-F292, 1993
- 39) Ortola FV, Ballerman BJ, Anderson S, Mendez RE, Brenner BM : Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. *J Clin Invest* 80 : 670-674, 1987
- 40) Laragh JH, Atlas SA : Atrial natriuretic hormone : a regular of blood pressure and volume homeostasis. *Kidney Int* 34 : S64-S71, 1988
- 41) Martin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M : Atrial natriuretic peptide causes preglomerular vasodilation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 324 : 473-476, 1986
- 42) Zhang PL, Mackenzie HS, Troy JL, Brenner BM : Effect of an atrial natriuretic peptide receptor antagonist on glomerular hyperfiltration in diabetic rat. *J Am Soc Nephrol* 4 : 1564-1570, 1994
- 43) Huang CL, Cogan MG : Atrial natriuretic factor inhibits maximal tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 252 : F825-828, 1987
- 44) Margulies KB, Burnett JC Jr : Atrial natriuretic factor modulates whole kidney tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 259 : R97-R101, 1990
- 45) Wang X, Salevsky FC, Cupples WA : Nitric oxide, atrial natriuretic factor, and dynamic renal autoregulation. *Can J Pharmacol* 77 : 777-786, 1999
- 46) Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA : Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 1814-1818, 1993
- 47) Sharma K, Cook AK, Inscho EW : TGF- $\beta$  inhibits pressure-induced afferent arteriolar autoregulatory behavior (Abstract) . *J Am Soc Nephrol* 13 : 20A, 2002
- 48) Imanishi M, Yoshioka K, Konishi Y, Okumura M, Okada N, Sato T, Tanaka S, Fujii S, Kimura G : Glomerular hypertension as one cause of albuminuria in type II diabetic patient. *Diabetologia* 42 : 999-1005, 1999
- 49) Steinhausen M, Blum M, Fleming JT, Holz FG, Parekh N, Wiegman DL : Visualization of renal autoregulation in the split hydronephrotic kidney of rats *Kidney Int* 35 : 1151-1160, 1989
- 50) Ren Y, Garvin JL, Carretero OA : Efferent arteriole tubuloglomerular feedback in the renal nephron. *Kidney Int* 59 : 222-229, 2001
-

## 民間病院における不整脈の 非薬物療法の可能性

研究室の時代から不整脈一筋に研究に取り組み、それを臨床に応用したい一心で、7年前に半年間外国で集中的に臨床電気生理学とカテーテルアブレーションを勉強した。それ以後臨床不整脈の治療に取り組み、現在までカテーテルアブレーションを400例以上施行してきた。電気生理学検査を基本に、頻拍症の発生機序と起源部位を同定した上で、高周波電流を使用し、カテーテルの先端に50~60℃の熱を出し、不整脈の起源部位を加熱してアブレーションを行う。既知の房室結節リエントリー性頻拍症、WPW症候群以外に、従来未知の分野であった心房頻拍、特発性心室頻拍症の機序と起源部位などはこの治療法によって、新しい知見がたくさん得られてきた。最近、症状が強い発作性心房細動の治療には、4本の肺静脈隔離術が方法論としてほぼ確立されたが、手技の困難さ、術者の経験と熟練さがかなり要求される一方、根治的治療法ではなく現段階では、熟練の薬物療法によるリズムコントロールが基本的治療と考えられる。一方心筋梗塞後や心臓手術後の癒痕により生じたmacro旋回路が原因で発生する頻拍の治療は従来では部位を同定するには困難のため、治療はきわめて困難であった。しかし、新しいマッピングシステム“CARDO”を用いて、旋回路のcritical pathwayの同定、さらにそこへのアブレーションにより、頻拍を停止することが可能となった。とくに術後の癒痕による頻拍は90%の成功率が得られた。患者は3泊の入院で一生病院から解放される。循環器の分野でも唯一の根治手術であり、医師にとっても大変有効な治療法である。一方、植え込み型除細動器(ICD)もペースメーカーなみに内科医でも簡単に植え込むことができるようになり、Brugada症候群と特発性心室細動に対する治療法として大変注目されるようになった。難治性心不全に対しては両心室ペースング療法が有効であり、Insyncペースメーカーが使えるようになったことにより、不整脈療法の領域を一層拡大することになった。

これらの療法は斬新な治療法ではないが、慶應の関連病院でも本格的にカテーテルアブレーションあるいは突然死を予防する植え込み型除細動器(ICD)を施行できる施設は皆無といってよく、ましてや地方では認知されていない状況にある。高価な設備と訓練されている専門家が必須条件であることに、関連病院が理解してくれ

ないことは非常に残念である。せっかく研究室で熱心に不整脈の勉強をしても、出張病院では生かすところがなく、途中で方向転換せざるを得ず誠に残念なことである。2年前、虚血性心疾患の治療は充実しているが更に不整脈の専門医が必要と考えた現在の民間病院に転職した。患者は東葛と広範囲な千葉県北部地域であるが、不整脈専門医がおらず、ましてカテーテルアブレーション、ICD、両心室ペースング療法などの先進医療の治療には全く無縁な地域であった。努力した甲斐あり、今年病院では更に高性能なEP Lab、CARDOの機械を購入した。2名のEP専門MEスタッフとともに、年間EPSは130例(アブレーションは90例)、ICDは10例を施行している。これからは更に難治性心不全に対し、両心室ペースング療法を取り組んでいくことを考えている。先進的な不整脈治療を受けることができたと喜ぶ患者の姿がとっても印象的であった。

佐伯 公子(千葉西総合病院循環器科)

## 耳鼻咽喉科における内視鏡診療

私は耳鼻咽喉科医であるが、耳鼻咽喉科診療では耳や鼻の中、のどの奥をのぞき込んでみるということが必要であり、病態を評価するためには必須のことである。真っ暗闇の中をのぞき込む訳であるから外から照明を導く必要がある。世間一般ではお医者様といえば、白衣に聴診器を首に掛け、額帯鏡姿というのがイメージされることが多い。聴診器は確かに内科医を始め、医師全般の必須医療器具であるが、額帯鏡は耳鼻咽喉科医のトレードマークであり、他科の医師が使用することはほとんどない。電球の照明を額帯鏡で反射・集光し、耳鏡や鼻鏡などの管状鏡を介して対象物を照らし出すためのものである。喉頭や下咽頭は間接喉頭鏡に反射させて観察を行う。

日々、医学の進歩はめざましいものがある。軟性・硬性の各種内視鏡が耳鼻咽喉科領域にも応用され、ビデオ機器と組み合わせられるようになった。さらなる鮮明さと高画質が求められ、再生と記録性に優れたビデオ内視鏡システムは喉頭疾患の診療になくしてはならないものとなっているが、CCDなどの半導体技術の医療分野への応用が大きな革命を起こしたといえる。その技術の進歩により、高速の声帯振動の観察には特殊な光源装置である喉頭ストロボスコープと組み合わせることにより、声帯振動のスローモーション動画像のビデオ記録も可能となった。これは喉頭ビデオストロボスコープと呼ばれる。最

後の課題ともいえた鼻咽喉用スコープを用いた電子内視鏡システムの喉頭ビデオストロボスコープも臨床応用されるに至ったのはほんの数年前の出来事である。今は最低でも軟性鼻咽喉ファイバースコープがなくては耳鼻咽喉科の一般臨床は成り立たないといっても過言ではなく、3～4時間の外来診療で軟性鼻咽喉ファイバースコープの使用件数は数十件に及ぶことも稀ではない。耳鼻咽喉科医の象徴ともいえる額帯鏡を使用する頻度は著しく減少し、片手に軟性鼻咽喉ファイバースコープを持つことが多くなってきている。

確かに内視鏡の本体や技術は革新的な進歩がみられているが、決まった診療時間内で内視鏡検査件数が増えてくると、内視鏡の消毒・滅菌という問題が出てくる。SARSや鳥インフルエンザ、HIV、MRSAによる院内感染も話題となってきている現在、この問題は大変重要であるが、耳鼻咽喉科領域では、科学的にはあまり顧みられていないことは残念である。今は自動洗浄機の使用がなされているが、1分間の流水洗浄後、フタラールやグルタラールなどの消毒薬に約5～10分浸し、2分間程度の流水洗浄を行うのがよいとされる。ただし、消毒薬に浸した後の流水洗浄は消毒薬を洗い流すのが目的であり、スコープに消毒薬が残存してこれを使用すると粘膜障害を起こして問題となることもある。これでも多数の件数をこなすには時間がかかるといわざるを得ない。流水にまさる洗浄は今のところ考えつかないが、滅菌に関しては消毒薬に代わる何らかの画期的な方法の開発が望まれる。磁気やオゾン、静電気、活性炭、超音波、紫外線など意外に身近なものが強力な滅菌作用を持っているのではないかと考えられるが、なかなか研究の時間も予算もないのが現状の今日この頃である。

川井田政弘(荻窪病院耳鼻咽喉科)

## 医療業界におけるボーダーレス —経費削減がもたらしたもの?!

昨今巷では日本の景気の状態を雇用の改善なき景気回復などと呼ぶ向きがあります。バブルがはじけ少子化がそれに追い討ちをかけ、構造的に需要の大幅な拡大が見込めない状況では、健全な企業経営のためには如何に上手に経費削減をするかが経営者の腕の見せどころです。ずっと以前より安い労働力を求めて日本の企業が海外に工場などを建設し国際的な競争力を維持しているのは周知の事実ですが、ある最大手の米国の製造会社の中には、ここ数年もてはやされているIT部門についても、それが企業にとって不可欠で有用性は十二分に認めるものの、非生産部門であり利益を生まず費用が掛かり過ぎるとの

経営的判断から、早や採算面での負担に耐えかねて、機密性の高いIT部門のいろいろなソフト面の仕事でさえもインドに外注する傾向が出てきました。これはいろいろな情報がどんどんデジタル化されていく中での必然の副産物とも言えます。デジタル化された情報が自動車の海外生産などとは異なり、税金などを払うことなしにタダ同然で容易に瞬時にインターネットで国境を超えるようになったという条件に加え、①米国の1/10程の安くて豊富なインドの労働力、②世界的なComputer Scienceの先進国であるインド人の能力、③英語が堪能なインド人の語学力などによるものです。

病院も相次ぐ診療報酬改定により経営が苦しくなり、このような世の中の動きに呼応するかのように、健全な病院経営のために如何に経費削減をするかが、良かれ悪しかれ必須のテーマであるように見えます。米国のある大きな病院では、患者さんにMRIやCTの検査をすると、すぐにデジタル化された画像をインドに転送します。インドでは時差の関係から午後から夜間に放射線科の医師が読影解析し米国へ結果を返送します。すると米国では翌日には悠々その結果を入手できます。それにより放射線技師のみを残し、放射線科医師の殆どを解雇して経費削減を計っています。患者の個人情報ネット上を飛び交うため、病院にとっては守秘義務のある患者情報が漏れる可能性があり、Securityの面で問題がありとして医師側の強い反対があるにも拘らず、採算面のメリットからこのような“海外アウトソーシング”は各病院に拡がりつつあるといえます。米国の患者の画像診断がインドで行なわれているわけです。日本の病院にとっても、行く行くはこれが単に文字通りの対岸の出来事では済みそうもない話です。

日本の病院でも経費削減は事務部門から始まり、患者さんに食事を提供する栄養科などの間接部門は病院外の人員(派遣)が目立つようになりました。このような傾向はパラメディカルとして臨床側には欠くことのできない検査部門にまで及んでいます。その形態は‘ブランチ’や‘FMS’などいろいろですが、要は検査技師や検査機器が病院外の大手の検査会社の所有となる“国内アウトソーシング”に他なりません。データの信頼性、迅速性、守秘の問題、レセプトの査定の問題、検査当直の問題などのいろいろなデメリットがあるにも拘らず、検査室全体のコストを削減できるとして、主に200床以下の病院を中心に採用しているところがあります。検査会社は病院からの安定した検査受注が得られる上に、医師がオーダーするすべての検査についてレセプトの査定と無関係に病院側に請求書を出すことができます。その上病院の熟練した技師の代わりに、検査会社は未熟な



安い労働力を病院に派遣し経費を下げ、更に利益をあげることができます。このシステムですと重症患者がいて規定以上に検査をすると減額査定されますので、病院側は検査依頼について十分に医師を教育した上でないと、保険診療のレセプト額以上を検査会社から請求されることになり、病院としては検査で赤字が出る可能性が出てきます。特に入院患者を多く診ている若い医師は未だコストに対する意識が乏しく無駄な検査や頻回採血をするために、病院から検査会社への支払いが病院に入ってくるレセプトベースの検査収入を上回る事態になります。検査会社を太らせるために医師が検査オーダーしているようなもので何やら割り切れません。

米国にはNP（ナースプラクティショナー）と呼ばれるナースの上級専門職があることは良く知られています。一般には通常のナースの資格を得て病院で何年も仕事をしているうちに、より専門性の高い仕事をしたいというナースのために、一時職場を離れ数年間大学で特別なコースを修得すればその資格を得られます。（最近、ナースの資格をとってそのまま連続して臨床経験を経ずにNPの資格を得ることができるコースが新設されましたが、現場からは疑問の声が強いです。）NPはある条件下では医師と全く同様の仕事を任せられます。例えば血液疾患のNPであれば、血液病棟あるいは幹細胞移植ユニットで骨髄穿刺や生検、腰椎穿刺などの検査はもとより、抗がん剤を含むすべての処方（注射と経口薬）と処置、輸血やドナーからの幹細胞の導入などの治療に至るまで行ないます。治療計画については週1回の大きい臨床カンファレンスで、レジデントと同様に自分の受け持ち患者をプレゼンテーションし一週間のプランを立て、その上で毎朝7:30 AMにアテンダントの回診があり、そこで再び検査や治療内容などを患者の状態の変化にあわせて微調整します。多くのNPが既婚で子持ちのために週3回（多くて4回）勤務にしている場合が多く、その代わり夜の9:00ごろまで働くのが常です。一般にはレジデントよりもその病棟にいる年数が長いので、入院があるとその患者の性質は〇〇で、家族が〇〇で、前回の治療は〇〇だったなどとレジデントに教えています。このシステムは当然のことながらコスト面でも病院にはメリットがあり、ある意味で医師職の“病院内アウトソーシング”とも言えます。15年前と今とを比べるとNPの数が増え、その上仕事の質が比較にならないほど医師の仕事に近くなってきているのを見せられると、恐らく初めはすぐれたナースのモチベーションを維持するために考えられたこのNPという制度は、今では医師部門のマンパワーを補いつつ人件費削減に大きく貢献しているようです。日本の医師の給料は、大学病院や公立系の

大病院では一般に卒業年度のみで決まりますが、米国では医師の給料は主にその役割で差をつけています。外科と内科で給料が異なるどころか、内科の中でも心臓内科と消化器内科で異なります。日本ではもう何年も前から、より忙しくない場へより多くの医師が集まり、より忙しい場へより少なく医師が集まる傾向が見られ、医師の適正配置が崩れつつあります。その上今年から新研修医制度が導入されたために、益々マンパワーの不足に拍車がかかり、忙しい現場は悲鳴をあげています。NPは我々の国でこそ真剣に検討すべきかもしれません。

さて以上のように日本の病院においても今後経費削減とボーダーレスは密接に関連し着実に浸透していくと考えられます。医師の患者に対する基本的な役割は変わりませんが、医師と病院のスタンスは徐々に変化していくのではないのでしょうか？いわゆる“大きな病院”ではパラメディカルの仕事はどんどん広がり、それに呼応して医師の仕事はさらに特化して行くでしょう。病院側はその地域の需要に応じた専門医をいかにして集めるか、あるいは医師を必要な場所に適正配置できるのか（あるいはさらに崩れるのか？）それが医師一人一人の自発的な意思と自覚のみで達成されるのか、あるいは米国のように医師の待遇に差をつけてインセンティブを付加することにより成されるのか？何やら示唆に富む話題ではないのでしょうか。

村上 博（国家公務員共済組合連合会立川病院  
内科/中央検査科）

## 日本の医療の先にあるもの

今年のアテネオリンピックでは日本選手の記録的なメダルラッシュに驚き、感動し、寝不足の日が続いてしまいました。日本選手の活躍の理由について色々解析がなされましたが、一つ興味を引かれたのは日本もスポーツ選手をサポートするためにお金をかけるようになったという記事でした。トレーニング設備の充実や海外遠征の費用、選手の育成システムの構築などに積極的に投資するようになってきたようです。ほぼプロ化した選手の所属する企業が積極的に援助を行えるようになったのも一因と考えられます。海外でのトレーニング、遠征試合と日本国外へ出てゆく機会が増え、海外での生活に慣れ、世界のレベルと自分の力を知り、自信をつけてきたこともあるのでしょうか。

私は昨年7月に帰国するまで2年間という短い間でしたが米国で暮らし働く機会を得ることができました。サッカーコートが何面も取れる広大なグラウンド、屋内コートを多く備えたテニススクール、安い料金で利用できる

ゴルフコースやアイスアリーナ、どこにでもあるバスケットゴール、と町の郊外にはスポーツをするのに恵まれた環境を備え、一流のコーチがジュニア達を安い料金を教えてスポーツ人口の裾野を広げる米国。まずはスポーツの楽しさを教え、さらに上を目指したいと希望する者、選ばれた者には科学に基づいた効率のよいトレーニングを行い一流選手を育て、選手層を厚くしていく。だから米国は世界で活躍する超一流選手を多く輩出することができるのだと納得できました。国土の狭い日本、スポーツの主体が学校の日本では永久に米国にかなわないと思って帰国しました。しかし今年のオリンピックを見ていてまた希望がわいてきました。医療に関係のないことを長々と書いてまいりましたが、実は米国の臨床に携わって同じようなことを感じ、私が不勉強であったせいもあるのでしょうか、これまで漠然としかわからなかった米国と日本の医療の違いというものがかなりはっきりと見えるようになったのです。

私は University of Michigan の Division of Pediatric Cardiovascular Surgery に所属し、Medical Center 内にある Mott Children's Hospital で Clinical Fellow として2年間仕事をすることができました。小児心臓外科手術が年間に800例を超えるトップレベルの施設です。日本では平均的な施設で100例ほどですからかなり多い手術数と言えます。私が携わったのが小児心臓外科という極めて専門性の高い診療部門であったこともあるのですが、まず驚かされたのは病院内に働く医療従事者が多いことです。米国と日本の病院を比較した資料を見ると、ベッド一床あたりの人数はおおよそ10倍で、医師、看護師以外に多くの職種が設けられ、分業化が進み、非常に効率よく仕事が行われています。例えば Respiratory therapist という職種があるのですが、人工呼吸器の操作、管理を担当し、患者さんの呼吸管理を専門に行う職種です。日本では医師の仕事です。どのような呼吸のサポートが一番患者さんの呼吸状態に適しているかを分析して医師や看護師にアドバイスもしてくれます。また ICU technician や Anesthesiology technician といった医師や看護師のサポートをしてくれる職種も豊富です。Physician's assistant と呼ばれる人たちは日本では医師がやる仕事、例えば手術の助手、退院記事の記載などを数多くこなしています。元はといえば米国でも医師や看護師の人件費が高いことから、医療費を抑えるために生まれてきた職種ですが、結果として多くの人手を得ることとなり、医療の現場に余裕が生まれました。日本では医師と看護師しかいないのではほぼ全ての医療行為をこの2つの職種で行っています。さらにその人数も米国に比較して少ないのですから皆疲弊して間

違いも起こり易い環境と言えるでしょう。各々の部門が責任と自信、誇りをもって持ち場を全うし、対等に意見を出し合い、みな楽しそうに働いているのが印象的でした。各職種間には良好な信頼関係が築かれ、綿密な連絡をとって基本的な治療方針は統一されています。一人の主治医の考えだけで方針が決められるようなことはなく、より多くの視点から客観的に患者さんの治療が行われることとなります。また、検査部門、薬剤部門もほぼ昼夜変わらないサービスを提供できますので24時間クオリティーの落ちないサービスを提供できるようになっています。

次に驚かされたのは Medical center の規模です。日本では考えられないような広さの敷地に、General Hospital, Women's Hospital, Children's Hospital, Cancer Center, Medical School, Nursing School その他の施設が隣接して建っています。私の専門は小児心臓外科なので働いていたのは主として Children's Hospital でしたが、隣接する Women's Hospital とともに母子周産期センターを形成し、37床の NICU, 8室の手術室、総ベッド数31の3つの ICU を備え、小児の高度先進医療を行っていました。共用できる施設や人員は General Hospital と共有して効率よく運営され、出生前から高齢に至るまで一貫した診療ができる体制が出来ていました。General Hospital は550床のベッド数ですが、5つの ICU と30室の手術室を備えていました。またヘリコプターを3機所有し、24時間いつでも患者や医療スタッフを全米各地に送り迎えできる体制を備えていました。一大学のものとは思えないような充実した施設と設備です。

このようにハード面で圧倒されてしまったのですが、教育や医療の実践においても学ぶべきことが多くありました。医学部学生の教育方針として臨床能力を高めることがその根幹に強くあります。ご存知のように米国の医学部は4年のカレッジを卒業してからさらに4年間学びます。その初期のうちから臨床の現場に出て行かされます。学生は診療チームの一員として患者の診療に実際に参加し、ディスカッションを重ね、attending の医師とともに問題解決をして臨床の勉強をしていきます。OSCE (Objective Structured Clinical Examination) という模擬患者を相手にした問診、診察、カルテの作成といった臨床の技能を評価する試験もあります。このようなことをやるためには教育に充分時間の取れる医療スタッフが必要になります。専門医を育てるための卒後教育もカリキュラムがしっかりと定められています。全米内での人の交流は盛んで、学生の教育も医師の卒後教育も米国のどこへ行ってもほぼ同じカリキュラムで行われ

るようになっていきます。多くの医師は卒業した大学では卒業研修を受けていません。医療の内容も教育も標準化されていると言ってよいでしょう。少し本題からはずれませんが、薬品名や手技の略語は日本と同様によく使われるのですが、これも全米どこへ行っても同じのようです。日本でもおなじみとなりましたテレビドラマのERの中でも、実際の現場で使われている略語がそのまま使われています。これから米国で臨床をやってみたいと思っている方はERを英語のcaptionつきで見て医学用語を勉強するとよいかもしれません。話がそれてしまいましたが、基礎的な部分での標準化は医療をよりシンプルにすることにつながり、医療過誤を防ぐ意味でもまたコストの削減という意味でも役立つことと思います。実際に働いてみると、治療方針は常に科学的根拠に基づいて計画され、医療行為が非常に単純化されている事がとても印象的でした。また、病院のセンター化が進んでおり、専門医療を必要とする患者さんはセンター病院に集められるので、私の所属した小児心臓外科でも年間の手術症例数は日本の平均的な施設の10倍近くになります。これだけの症例数をこなしていると、自分の施設の症例だけでかなり大掛かりなprospective studyができてしまうということに驚きました。医療統計の専門化が協力し、studyの計画も非常に正確かつ綿密に立てられ、その結

果はすぐに臨床にフィードバックされ、医学が科学であることを改めて思い出させてくれました。

米国の医療費が高いことはよく知られています。これだけの設備と人手を医療現場に投入しているのだから当然でしょう。総額でもGDP比でも世界一です。医療保険の制度は最悪ですが、それだけの資金を投入し、環境、設備を整え、多くの人材を投入し、常に先を見越して進んでいく米国の医療は、先に述べたスポーツの世界と同じで日本のずっと先を進んでいます。日本は患者一人当たりの医療費でみると世界でも最下位のレベルです。もう少し医療の技術料を上げ、医療費を効率よく運用し、施設ごとの医療従事者の数を増やし、医師や看護師の負担を減らしてほしいものです。それが患者さんにとっては、より安全で質の高い医療を受けることができることにつながるのですから。また若い先生方にはぜひ海外で臨床を勉強してきて欲しいと思います。個々の医療のレベルで見ると確かに米国を追い越している分野も多いと思います。しかし学ぶことはまだまだ多くあるはずで、海外で臨床経験を積んだ若い医師たちが増えてくれば、アテネオリンピックのように日本の医療のさらなる躍進があるはずで、今後は私もこの経験を活かし、少しでも日本の医療の発展に役立てればと考えております。

鈴木孝明（都立清瀬小児病院心臓血管外科）

## 学会展望

### 第 84 回慶應医学会総会 第 12 回慶應ライフフォーラム

日 時：平成 16 年 11 月 12 日（金）午後 3 時～午後 6 時 30 分

場 所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階大会議室

主 催：慶應医学会

共 催：慶應義塾大学理工学部・医学部

3：00 開会の辞 会 長 北島 政樹医学部長

3：05～3：40 総会議事，三四会奨励賞授与式

司 会 副会長 相磯 貞和（慶應義塾大学医学部解剖学）

4：00～6：30 シンポジウム『ベンチからビジネスへ』

司 会 富田 豊（慶應義塾大学理工学部生命情報学科）

4：00～4：30

I. 非接触・無拘束呼吸モニタリングシステムの開発

中島真人（慶應義塾大学理工学部電子工学科）

4：35～5：05

II. 疾患治療薬開発を志向した細胞生物学研究

井本正哉（慶應義塾大学理工学部生命情報学科）

5：05～5：20 休憩

司 会 松岡正明（慶應義塾大学医学部薬理学教室）

5：20～5：50

III. バイオベンチャー成功の条件－成功・失敗事例からの教訓

矢作恒雄・中村 洋（慶應義塾大学大学院ビジネス・スクール）

5：55～6：25

IV. 難治性神経疾患に対する治療法の開発と実用化へ向けて

戸田正博（慶應義塾大学医学部外科学教室）

## 1. 非接触・無拘束呼吸モニタリングシステムの開発

慶應義塾大学理工学部電子工学科 中島真人

### 1. 背景

#### ➤社会的背景

##### ◇睡眠時無呼吸症と交通事故

- 高速道路での大型トラック事故
- 新幹線運転手、航空機パイロットの居眠りなど

##### ◇その他の事故

- チェルノブイリ原発事故、NASA チャレンジャー事故など

#### ➤中島研究室における研究の推移

##### ◇救急対応画像センシングプロジェクトの実施

- ベッドルーム監視装置、トイレ、バスルーム監視装置
- スポンサー：住友大阪セメント（株）、総合警備保障（株）

##### ◇睡眠時呼吸モニタリングシステムの開発

- 動機、そしてスタート時の医療機関との関係
  - ・救急対応画像センシングシステムの開発における問題点 → バイタルサイン取得の必要性
  - ・FG 視覚センサによる呼吸情報の取得成功 → 臨床用実験装置完成
  - ・医療機関からのコンタクト
  - ・ケアプラザ見附青木広市施設長
  - ・独立行政法人国立病院機構徳島病院小児科多田羅勝義副院長
- パイロットシステムの完成&技術移転準備
  - ・医療機器メーカーへの売り込み
  - ・アロカ（株）他に打診開始
  - ・塾医学部へのコンタクト
    - 放射線科久保敦司教授に相談
    - 内科山口佳寿博、同仲村秀俊助手（現東電病院内科副科長）と共同研究を開始
- その他
  - ・虎ノ門呼吸器科成井浩司医師および郡山の太田記念病院へ、アロカ（株）経由でパイロットシステム貸し出し

## 2. 非接触・無拘束呼吸モニタリングシステム

#### ➤ファイバースコーピング（FG）3 視覚センサ

- ◇400点程度のマトリクス状赤外線輝点群を被験者の上半身に照射し、腹部、胸部、また身体全体の

動き情報を3次元的に取得

◇各輝点の動きを統計的に処理し、呼吸波形、換気量を算出

◇自動診断アルゴリズムにより、無呼吸、呼吸異常、胎動信号などを取得

#### ➤システムの概要

◇装置の構成

◇取得データ

- 呼吸波形と診断画面

#### ➤本システムの効果

◇フィールドテスト

- 各病院で得られた結果（データ）
- パイロットシステム試用者（医師）の見解

## 3. 現状と将来

#### ➤商品化

◇2年後の予定

#### ➤エキスパートシステムの開発

◇バラックシステムを完成

- 被験者の体の様子と呼吸信号を同時描画

・閉塞性無呼吸、中枢性無呼吸の違いを可視化

#### ➤自動診断アルゴリズムの高機能化

#### ➤他の部位への応用を検討中

## II. 疾患治療薬開発を志向した細胞生物学研究

慶應義塾大学理工学部生命情報学科 井本 正哉

我々はこれまでに微生物二次代謝産物から細胞内情報伝達経路に作用する薬剤を探索し、これらの薬剤と変異遺伝子を駆使して、細胞応答機能の解析研究を行ってきた。これらの薬剤や変異遺伝子は細胞応答機能を解析する上での有用なプローブとなるだけでなく、潜在的に疾患治療薬としての可能性を秘めている。今回は、我々の見出したゲルフェリンとBAXIPについての細胞生物学研究結果と疾患治療薬への可能性について概説する。

### 1) ゲラニルゲラニル基合成酵素阻害剤ゲルフェリン

癌の浸潤や転移に関わる Rho, Rac, cdc42はゲラニルゲラニル化される事によって活性化される。従って、ゲラニルゲラニル化を抑制する薬剤は抗転移剤として期待され、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼの阻害剤は癌の分子標的治療薬として多くの製薬企業で開発されている。一方、ゲラニルゲラニル化の基質であるゲラニルゲラニル二リン酸（GGPP）を合成する酵素、GGPP

合成酵素の阻害剤は知られていなかったことから、我々は微生物二次代謝産物からGGPP合成酵素の阻害剤を探索した。その結果、新規化合物ゲルフェリンを発見した。ゲルフェリンは細胞レベルにおいて、LPA刺激によりゲラニルゲラニル化に伴うRhoAの膜移行とストレスファイバーの形成を抑制した。さらに、トランスウエルチャンバーを用いた浸潤アッセイの結果、ゲルフェリンはマウス黒色腫B16細胞の浸潤を濃度依存的に阻害した。

## 2) BAX 特異的阻害ペプチド BAXIP

アルツハイマー症などの神経変性疾患や虚血性疾患の発症にBAXの発現上昇や活性化が密接に関与していることが報告されている。我々は、アポトーシス誘導機構の解析研究を行う過程で、あるタンパク質中の一部配列がBAX誘導性アポトーシスを阻害する可能性を見出した。そこで、この配列のcDNAを細胞に導入したところ、実際にBAX過剰発現によるアポトーシスが特異的に抑制された。近年、BAX誘導性アポトーシスの阻害ペプチドとしてヒューマニン(HN)やKu70が報告されているが、我々の見出した配列はこれらペプチドとは由来も配列も全く異なることから、我々の見出した配列をペプチド化することにより神経変性疾患や虚血性疾患のペプチド治療薬(進行抑制薬)としての応用の可能性を検討した。その結果、構築したペプチドBAXIP(Bax inhibitor peptide)はBAXのミトコンドリア移行を阻害することにより、BAX誘導性アポトーシスを選択的に阻害した。

## Ⅲ. バイオベンチャー成功の条件

### ー成功・失敗事例からの教訓

慶應義塾大学大学院ビジネス・スクール 矢作恒雄  
中村 洋

一流の研究者が、自身の研究成果を基にベンチャー企業を作るのはさほど困難ではない。しかし、ビジネスとして成功させようと考えた途端、その困難度は全く違う世界に入ったかのように異なる。これまで多くの研究者が自ら生み出したシーズを基に起業したが、ビジネスとしての成功例は数%に過ぎない。

ビジネスの成功を高めるカギは、バイオベンチャー企業を取り巻く外部環境が悪い中で、いかに自社に経営資源を取り込むか、そして企業外の経営資源をいかに活用するかということにある。

この講演では、日本におけるバイオベンチャー企業の多くの成功事例・失敗事例を基に、ビジネスの成功という視点から研究者が強く認識しておくべき教訓について整理する。特に、我々は、以下の3点に注目する。

- ・臨床(現場)重視
- ・発展性のあるビジネスモデル提示
- ・海外経営資源の活用

さらに、ビジネス成功のために望ましい研究者像、ならびに製薬企業、ベンチャーキャピタルとの上手な付き合い方について考察する。

## Ⅳ. 難治性神経疾患に対する治療法の開発と実用化へ向けて

慶應義塾大学医学部外科学教室 戸田正博

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

第一は、中枢神経再生を目指した免疫治療アプローチである。免疫制御に最も重要である樹状細胞を損傷部に移植する治療法であり、神経新生が起きないと考えられていた成熟哺乳類の脊髄において、本治療法により神経細胞が新生しうることが証明することができた。現在、臨床応用を目指して、サルモデルでの実験を進めている。第二は、単純ヘルペスウイルス(HSV)を用いた癌ワクチン療法である。腫瘍内にHSVを投与すると、樹状細胞を強く活性化して、癌に対するワクチンとして働くことが明らかになった。さらに、脳腫瘍をはじめとする様々なマウス腫瘍モデルにおいて本治療法の有効性が明らかになり、現在、臨床応用へ向けたウイルスの作製を開始している。第三は、疾患特異的な抗原分子を用いた免疫治療アプローチである。これまでに、脳腫瘍に特異的な抗原を同定し、抗原特異的な免疫療法へ応用可能であることを明らかにした。現在、同定した抗原を用いて、

新たな治療法、治療薬の実用化を目指した研究を進めている。

これらの研究は、慶應義塾大学医学部学内から初めて設立されたバイオベンチャー企業（株式会社 GBS 研究所）との産学連携研究体制を基本に、研究成果の特許化、実用化という明確な方向性のもと、大学内における横断的な研究協力体制を構築することにより、目標の達成を目指している。ベンチャー企業としてのビジネスサイドの業務は、現在、経営側スタッフにより行われているが、我々の研究成果に基づいて申請された特許を、知的資産センターを通じて慶應義塾より譲り受け、医薬品企業と

の提携収入や特許実施権の付与による対価を得るというものである。また慶應義塾との間では、特許に関する権限を譲り受ける対価として、会社が慶應義塾に対して株式引受権を付与するという、新しいスタイルの契約が締結されている。

我々は、臨床医学へ応用される研究を推進させるために、自ら産業界との接点を形成し、研究成果が広く認知されるよう努力を続けている。本発表では、ベンチャー設立からこれまでの経緯を紹介し、大学発ベンチャーとしての問題点を含め、今後の展望についても考察する。

## 学会展望

### 第9回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会

日時：平成16年7月10日（土）午後2時00分～5時00分

場所：慶應義塾大学 新教育棟4階 講堂3

主催：慶應義塾大学医学部形成外科学教室同窓会

事務局：慶應義塾大学医学部形成外科学教室内

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

|             |                 |           |
|-------------|-----------------|-----------|
| 14：00～14：32 | 症例報告            | 座長 高野 淳治  |
| 14：32～15：22 | 特別講演「骨髄細胞と再生医療」 | 座長 中嶋 英雄  |
| 15：22～15：30 | －休憩－            |           |
| 15：30～15：54 | 臨床Ⅰ             | 座長 陳 建穎   |
| 15：54～16：18 | 研究              | 座長 田中 宝   |
| 16：18～16：50 | 臨床Ⅱ             | 座長 佐々木 克己 |



## 14:00~14:32 症例報告

座長：埼玉社会保険病院形成外科 高野淳治

### 1. ワセリンの自己注射による陰茎異物の一例

埼玉社会保険病院形成外科

○高野淳治

同泌尿器科 滝本泰彦, 石井泰憲

44歳男性、陰茎の腫脹と潰瘍、および疼痛を訴え近医より紹介された。以前からビー玉、歯ブラシの柄を球状に加工したものを陰茎に埋入していたが、約1年前から数回にわたり過熱した液状のワセリンを自分でインスリン用の注射器を用いて陰茎の皮下に注入していた。陰茎の中央にワセリンの注入による絞扼変形、絞扼部から亀頭にかけて発赤をともなう腫脹と皮膚潰瘍を認めた。異物切除とZ形成術による絞扼部の解除を施行した。異物の完全切除は困難で創の治癒は遅延した。組織病理像は異物肉芽腫であった。症状および治療の経過に若干の考察を加え報告した。

(質疑応答)

Q 福積：蜂窩織炎の原因は

A 高野：浅い場所への注射が原因と思われる。

Q 田中宝：ステロイドのパルス療法は行わなかったか。

A 高野：行わなかった。

### 2. 歯槽骨骨延長を応用した広い顎裂幅を示す片側性唇顎口蓋裂患者の一例

東京歯科大学歯科矯正学講座

坂本輝雄, 一色泰成

【目的】片側性唇顎口蓋裂患者における第1期矯正治療で前歯反対咬合を改善すると、上顎前歯部が前方へ拡大され、顎裂幅が広がりすぎてしまうことがある。このような症例では、骨移植を行っても良好な骨架橋が得られず、顎裂部へ隣在歯を移動することができない。その結果、上顎欠損部に義歯を装着することになり、咬合のみならず審美性の回復に難渋することがある。今回、顎裂幅の縮小と上顎正中の改善を目的に、上顎骨歯槽骨骨延長術と矯正治療を行ったので、その概要について報告する。

【方法】症例は12才9ヶ月の女兒の左側唇顎口蓋裂患者で、正被蓋を呈するが上顎歯列の正中が顔面正中に対し右方へ14mm偏位し顎裂幅が20mmであった。

延長器はデントラム社製矯正用ファンタイプ拡大スクリューを矯正用バンドに緻着することにより作製した。また、唇側部に.045インチの矯正用ワイヤーを用いて延長方向のガイドとした。

骨切り部位は両側第1大臼歯の近心部で、1週間の待機期間のあと、1日1mmの速度で延長した。骨延長は2回に分けて行った。1回目は右側第2小臼歯から左側中切歯の部

分を左方へ14mm、左側犬歯から第2小臼歯の部分から右方へ6mm延長し、偏位した上顎正中線の是正と顎裂幅の縮小を行った。その後矯正治療を開始したが、1年後、上顎歯列の正中がなお右方へ7mm偏位し顎裂幅が6mm残存していたので、右側第1小臼歯から左側中切歯の部分から左方へ7mm移動した。

【結果および考察】1) 上顎歯列の正中を顔面の正中に一致させることと、顎裂部を閉鎖することができた。2) 顎裂部を閉鎖することで、欠損補綴が不要となった。3) 上顎歯列に空隙を作ることで、口蓋側転位していた右側第2小臼歯を歯列内に取り込むことが可能となった。問題点としては延長器の工夫が必要と思われる。

(質疑応答)

Q 中嶋：顎裂を閉鎖するという観点で骨延長を行っているが、歯芽の移動により美容的問題はないのか。

A 坂本：術後、歯に対して操作を加えて形態を調整を行っている。

Q 中嶋：再生医学の技術を応用すれば広い顎裂も埋められるのではないかと。

A 坂本：理論的には可能であると思われるが、患者が骨延長を希望した。

### 3. 上下顎癒合症(先天性顎関節強直症)の治療経験

国立成育医療センター形成外科

○金子 剛, 松田就人, 小山太郎

慶應義塾大学形成外科

森 文子, 木村章子, 緒方寿夫,

中島龍夫

大田原赤十字病院形成外科

佐久間恒

上下顎癒合症(先天性顎関節強直症)は極めて稀とされ、その治療経過の詳細な症例報告は少ない。我々の経験した症例は2回の下顎骨延長術後に、両側顎関節形成を行い、術後6ヶ月現在良好な結果を得ている。その治療経過を供覧し、若干の文献的考案を加えて報告する。

(質疑応答)

Q 佐藤：骨延長して部分を切っているか？もし延長部位を切っているなら骨は形成されていたか教えてほしい。

A 金子：延長部位は切除していない。

Q 中嶋：かつて同様の症例に対して有茎皮弁をもといたことがある。FREE GRAFTを使用するよりはその方がよいのでは？

A 金子：本症例においては利用可能な適切な組織はなかった。

4. 健側からの皮下茎皮弁を用いた唇裂外鼻の二次修正  
慶應義塾大学形成外科

○玉田一敬, 中島龍夫, 緒方寿夫,  
大西文夫

唇裂外鼻二次修正術の適応となる外鼻変形には、鼻柱の患側への偏位・患側鼻孔の狭小化・患側の鼻腔底陥凹などが含まれる。これら鼻孔周囲の変形に対し、既報の外鼻形成術に加えてさらに何らかの修正が必要な症例はまれではなく、そのような症例に対しては従来、Z形成術や局所皮弁、さらには全層植皮や耳介軟骨移植、硬口蓋粘膜移植などが用いられてきた。

今回われわれは計11例の唇裂外鼻術後変形に対して健側鼻孔周囲の余剰の組織を皮下茎皮弁として患側に移行する手術を行い、良好な外鼻の左右対称性を獲得することができ、鼻柱の患側への偏位・患側鼻孔の狭小化・患側の鼻腔底陥凹などの変形も改善された。

本法は手技的にも比較的容易であり、既報の Reverse-U incision 法や Inverted Trapezoid Suturing, Box Suturing と組み合わせて用いることにより、唇裂外鼻の二次修正において効果的な術式であると思われる。

われわれの分類した3種の皮下茎皮弁の解剖及び手術手技につき解説し、代表的な症例を供覧する。

(質疑応答)

Q 福積：健側の人中が陥没しているように見えるがどうか。

A 玉田：直接本手技とは関係がないと思う。

Q 中嶋：実際には口唇の変形を伴う場合もあり、一部の捨てる組織を使用することもある。この手術はそのような場合にも行うか？

A 玉田：そのような場合も行う。

14:32~15:22

特別講演「骨髓細胞と再生医療」

座長：慶應大学 形成外科 中嶋英雄  
国立成育医療センター生殖医療研究部部長  
梅澤明弘

15:22~15:30 【休憩】

15:30~15:54 臨床I

座長：川崎市立病院 形成外科 陳 建穎

5. 肩甲骨付き広背筋皮弁による顔面の再建

静岡赤十字病院形成外科

○田中 宝

慶應義塾大学形成外科

玉田一敬, 服部典子

遊離肩甲骨皮弁は肩甲回旋動脈と胸背動静脈角枝の二つの

血管系をもち、どちらか一方のみを使用しても安定した血行を有する。また広背筋皮弁、肩甲骨皮弁のいずれとも組み合わせることができ、顔面の再建には適した素材である。この中で角枝と広背筋皮弁の組み合わせは長い血管茎を有し自由な位置関係をとることができるため有用性が高い。一方で広背筋皮弁の萎縮が高度に進む、肩甲骨は薄く強度が弱いなどの問題点も有する。今回、当施設にて顔面部悪性腫瘍切除後に肩甲骨付き広背筋皮弁により再建を行った症例を提示し同皮弁の有用性、欠点について検討する。

(質疑応答)

Q 中嶋：眼位、軟部組織の術後形態を正確に得るためには狙いを定めた手術を行う必要あると思う。

A 田中：反省材料にしたいと思う。

Q 金子：V字型の部分の血行についてはどうか。

A 田中：感染や萎縮を認めていないので問題ないと考えている。

6. 広背筋移植による上腕二頭筋再建の一例

川崎市立病院形成外科

○陳 建穎

同整形外科

矢部寛樹, 木原未知也, 堀内行雄

同リハビリテーション科

永井朝子, 近藤国嗣

【目的】上腕二頭筋欠損に対し有茎広背筋弁による動的再建術を行い、良好な結果を得たので報告する。

【方法】症例：76歳、男性。左上腕二頭筋内より発生す5×3×7cm大の悪性神経鞘腫に対し、平成16年1月30日、腫瘍縁より3cm離れた拡大腫瘍切除術(上腕二頭筋全摘、皮膚合併切除)を施行。同日、有茎広背筋皮弁による肘屈筋の動的再建(上腕二頭筋再建、上腕皮膚再建)を施行した。術後3週間は肘関節90度固定として、術後4週日より肘関節屈伸のリハビリを開始。

リハビリテーション医による肘関節屈曲増強訓練を行い、経時的に筋電図による移植広背筋の評価を行った。

【結果】術後2ヶ月目では、肘関節屈曲運動は腕撓骨筋力のみで行われている状態であった。同時期の筋電図では、移植広背筋は一時的にdenervation potentialを認めたが、随意運動でMUAP(Motor Unit Action Potential)の出現が見られたため、移植筋収縮の訓練効果が期待できると判断した。引き続き広背筋の本来の動きを意識した筋収縮訓練を継続し、術後5ヶ月目では、筋電図上、移植広背筋のdenervation potentialは消失し、MUAPも出現した。肘関節屈曲運動に移植広背筋が参加し始めていると考えられた。術後15ヶ月目では、腕撓骨筋が主力筋であることに変わりはないが、移植広背筋力も参加し、筋力はMMT4+となった。肘関節のROMは自動的にも他動的にも0°~120°であり、

日常生活では何の不自由なく過ごすことができている。

【まとめ】上腕二頭筋欠損に対し、広背筋弁による動的再建を行った。移植広背筋の筋活動を筋電図で記録・評価しながら、訓練プログラムを考案し、併せて筋電図で経過を観察することによりプログラムの再考を行うことで、有効な機能回復が得られた。

(質疑応答)

Q 中嶋：上腕二頭筋の残存部分の機能は存在するのか。

A 陳：若干存在すると思われる。

Q 金子：拮抗筋で置換することにつき戦略上問題はいいのか。

A 陳：文献によれば拮抗筋で置換しても訓練により合目的筋使用が可能になるとされている。

## 7. The Dorsal Intercostal Perforator (DIP) Flap

杏林大学形成外科

○三鍋俊春, 波利井清紀

慶應義塾大学形成外科

中嶋英雄

同大学解剖学

今西宣晶

メルボルン大学形成外科

G. Ian Taylor

背部は、有用な皮弁の宝庫と言ってよく、広背筋皮弁、僧帽筋皮弁、肩甲皮弁など現在の first choice flap をはじめとし、Nakajima & Fujino らの報告にも種々の筋膜皮弁を見出すことができる。演者は、動物ならびに人間の angiosome の研究 (Taylor & Minabe) をもとに背部正中部に恒常的に存在する Posterior Intercostal Artery の Dorsal Perforator に新たに注目するに至った。今西らと施行した新鮮死体を用いた解剖から第4から11肋間動脈に存在する事を確認し、これらを Dorsal Intercostal Perforator (DIP) と呼称した。今回、DIP 穿通枝を茎とする皮弁を開発し、最大径 31×13 cm を含む 10 例 11 皮弁に適応して良好な成績をおさめた。その解剖と代表的な臨床例を報告する。

(質疑応答)

Q 原料：同様の内容について 30 年前に発表したことがある。

A 三鍋：参考にしたいと思う。

15:54~16:18 研究

座長：静岡赤十字病院  
形成外科 田中 宝先生

## 8. VEGF および b-FGF を用いた移植母床への血管誘導の試み

栃木県立がんセンター形成外科

○矢澤真樹

慶應義塾大学形成外科

緒方寿夫, 中島龍夫

慶應義塾大学病理学教室

森泰昌

東京大学大学院医学系研究科

樋谷宏平

国立循環器病センター研究所生体工学部

中山泰秀

【目的】近年、再生医療の発達に伴い組織移植の可能性が大きく広がりつつある。しかしながら、移植先母床に関しては、臨床的に移植組織への早期血流再開の期待から、豊富な血流を伴った母床であることが移植組織の生着過程において重要であるとされる一方で、予め積極的に移植母床の作成を行って組織移植を検討した報告はほとんどない。我々は予め移植母床を整える目的で血管誘導を試み検討したので報告する。

【方法】血管誘導を担う成長因子 (VEGF・FGF) の担体として、UV照射によって架橋形成するコラーゲン素材光反応性ゲルを用いた。このゲルに成長因子を封入し、三次元スペーサー (シリコンブロック) 表面に塗布して成長因子徐放型スペーサーを作製した。これらをウサギ背部皮下に移植し、移植後 2・3・4 週間目にスペーサー周囲に形成された組織をカプセル状被膜を含めて採取し、血管走行状況の評価ならびに血管形成状況の組織学的評価から、血管誘導性移植母床としての可能性評価を行った。

【結果】成長因子付加群では、コントロール群と比較しスペーサー周囲に形成された組織は、どの時期においても優位な血管増生がみられた。

【考察】成長因子付加により、移植母床に血管導入できることが確認できた。今後、この移植床に組織を移植した場合に有利な生着を得られるかどうか、今後の統計学的検討が必要と考えられた。

## 9. 口蓋裂・顎裂を有する上顎の構造解析

慶應義塾大学形成外科

○永竿智久, 木村章子, 中島龍夫

国立成育医療センター

金子 剛

【目的】口蓋裂患者における裂のパターンが、咬合により上顎に発生する応力に対して与える影響を研究する。

【材料および方法】乾燥上顎骨モデルに対して CT スキャンを行いそのデータから CAD モデルを作成した。さらにそれぞれの上顎モデルをモディファイし、顎裂および口蓋裂を作

成する。こうして一つの正常上顎モデルから、顎裂のみを有するモデル・口蓋裂のみを有するモデル・それらの両者を有するモデルが作成されたが、それぞれのモデルタイプを NORM, ALVEO, PALATAL, COMPLETE と命名した。これを7体の乾燥上顎骨に対して行うことにより、計28個のCADモデルを作成した。それぞれの臼歯部にインプラントを装着し、300Nの垂直方向負荷および50Nの水平方向負荷をそれぞれ与えた。この結果発生する応力を有限要素解析を用いて計算し、裂のタイプと応力パターンとの関係を検討した。

【結果】口蓋裂を有するモデルグループ(PALATAL および COMPLETE) と有さないグループ(NORM および ALVEO) において異なる応力発生パターンが認められた。

垂直方向負荷：インプラント周辺で最大応力の発生する部位は、両者でほぼ共通していたが、その大きさは後者において有意に大きかった。

水平方向負荷時：インプラント周辺において最大ひずみが発生する点が両者において全く異なっていた。前者においてはインプラントの舌側に圧縮力により最大ひずみが発生したが、後者においてはインプラントの頬側の点に、伸展力により最大ひずみは発生した。

【結論】臼歯部インプラントに負荷が作用した場合、上顎に発生する応力のパターンは口蓋に裂が存在するかにより大きく影響される。したがって口蓋裂患者においてはインプラント治療において健常人とは異なった配慮が必要であると考えられる。顎裂の有無は大きな影響は与えない。

(質疑応答)

Q 中嶋：CT からでなくてはデータをインプットできないのか。

A 永竿：既存のソフトを用いて、3次元座標が容易に測定できるのでCTを用いている。座標さえ測定できるのなら、超音波など他のメディアでもよいと思う。

10. 多血小板血漿糊の皮膚縫合創・分層皮膚採取創への応用

慶應義塾大学形成外科

○緒方寿夫, 中島龍夫, 木村章子

栃木県立がんセンター形成外科

矢沢真樹

【目的】第7回同門会学術集会において、多血小板血漿(PRP: platelet rich plasma)の皮膚縫合創への影響をラット縫合創モデルの病理組織所見および抗張力について報告した。その後、ヒト縫合創にPRPをPRP GLUEとして被覆適応したので所見を報告する。

【対称と方法】手術創肥厚性瘢痕の切除・縫合創に3例(頸部1例, 前胸部1例, 背部1例), 腹直筋皮弁採取後のドナーサイト縫合創に1例, 分層皮膚採取創2例を対象と

した。PRPは末梢血40mlより作成し、トロンビンおよび塩化カルシウムを同時撒布することでゲル化させ創部を被覆した。対照は創を半分に分割した残りの部とし、乏血小板血漿(PPP: platelet poor plasma)にトロンビンおよび塩化カルシウムを同時撒布してゲル化させて創を被覆した。その後、創はフィルムドレッシングで保護し、一週間後にフィルムを除去、通常の創処置に変更した。

【結果】肥厚性瘢痕切除後縫合創の3例は、いずれも術後半年で若干の肥厚を示したが、いずれも対照に比してPRP適応部の瘢痕形成が軽度であった。皮弁採取後縫合創では術後1週間目で対照部に見られる創縁のecchymosisがPRP部では見られなかった。分層採皮創では、術後1週および2ヶ月目ともに、紅斑・色素沈着の程度に対照との差を認めた。

【考察】今回の臨床検討例は、創への術後1週間のPRP Glue貼付がその後の長期にわたる瘢痕形成に影響を及ぼすことを示した。その機序として、術直後の創内および皮内でのecchymosis抑制、その後の創部血管増生促進、などが関与していることが推察された。

11. 当院における口蓋裂患者の鼻咽閉鎖既納検査～X線造影透視検査について～

済生会宇都宮病院形成外科

○大原博敏, 曾根清昭

慶應義塾大学形成外科

緒方寿夫

同大学耳鼻科

浅野和海, 松中絵美

国立成育医療センター形成外科

金子 剛

口蓋裂患者特有の言語障害、すなわち口蓋裂言語の主体は鼻咽閉鎖不全であり、その診断・評価は口蓋裂治療の中でも重要な位置を占める。鼻咽閉鎖不全の検査は一般に視診、音声言語的聴覚判定、ブローイング検査、鼻息鏡などの非侵襲的検査と、鼻咽腔ファイバースコープ、X線規格写真、X線造影透視検査等の侵襲的検査が行われている。

今回我々は、当院に於いて行われている鼻咽閉鎖機能検査の一つ、X線造影透視検査について紹介するとともに、X線被曝量の測定を行った。

X線造影透視検査は軟口蓋の長さ、厚さや、咽頭後壁及び側壁の運動、接触時間が観察でき、鼻咽閉鎖機能の評価に非常に有用であり、当院では1991年7月より導入している。

X線被曝量の測定結果は平均で1回の検査につき約15mGyであった。これは日本放射線技師会医療被曝ガイドラインで定めた低減目標値と比べると、胸部レントゲン撮影の15倍、頭部レントゲン撮影の5倍、注腸やアンギオに比べると1/10～1/100であった。

(質疑応答)

Q 金子：cephalogram に比較しての利点は？

A 大原：動的機能が観察できる点が利点である。

Q 金子：レントゲン線量に関して留意する必要がある。

16：18～16：50 臨床Ⅱ

座長：大城クリニック 佐々木克己

12. 広範囲刺青レーザー治療の副作用と問題点

慶光会大城クリニック

○佐々木克己、藤井俊史、大城貴史

日本医用レーザー研究所

大城俊夫

【はじめに】第5回慶應義塾形成外科同門会学術集会にて、複合レーザー治療の刺青への応用を報告した。今回18例の広範囲刺青患者の長期経過観察を行い、当初予想できなかった副作用や新たな問題について検討を加えたので若干の知見を交え報告する。

【症例及び方法】6ヶ月以上経過観察できた18例の広範囲刺青を対象とした。内訳は、男性11名女性7名で平均年齢は23.1歳であった。使用したレーザーは、ウルトラパルス炭酸ガスレーザー：ULTRAPULSE ENCORE™ (Lumenis, USA) 波長10600 nm, 40 W, 225mj/cm<sup>2</sup>, CPG 使用とQスイッチNd：YAGレーザー：Medlite (Continuum Biomedical, USA) 波長1064 nm, 10～12J/cm<sup>2</sup>, 532 nm, 6～8J/cm<sup>2</sup>またはQスイッチアレキサンドライトレーザー (Candela, USA) 波長755 nm, 8～10 J/cm<sup>2</sup>の3種類を使用した。

【結果】18症例は平均治療回数4.2回平均27ヶ月の経過観察を行なった。治療途中の症例もあるが、刺青の色素は複数のレーザーを使用した。治療方針は患者の希望を最優先とした。患者の希望は①傷が残っても良いからできるだけ早く刺青除去する：13症例、②時間がかかっても良いからできるだけ傷にならないように刺青を除去する：5症例であった。治療方針により①は23.8ヶ月、②は36.2ヶ月の治療期間に有意差が出た。治療回数は、①2.6回②7.8回と有意差が見られた。副作用は、肥厚性癬痕8例(①7例②1例)、色素沈着7例(①6例②1例)、色素脱1例(②1例)、皮膚紅斑6例(①5例②1例)であった。

【まとめ】刺青の治療は、除去する理由(就職、結婚など)により治療方法を変えて、できる限り副作用を減少させている。今回、副作用について報告しその原因について検討したので報告する。

(質疑応答)

Q 原料：治療費はどうしているか。

A 佐々木：モニター制度などを利用してできるだけ低額に抑えている。

Q 中嶋：刺青の形どおり切除を行っても意味がないのではないか。

Q 佐々木：できるだけ形が異なるように心がけている。

13. 「外来処置(レーザー治療など)における乳幼児の簡易抑制固定法」

慶光会大城クリニック

○大城貴史、佐々木克己、藤井俊史

日本医用レーザー研究所

大城俊夫

乳幼児、小児の挫創の処置や小手術を行なう際には、看護師や他の医師などの介助者が患児を抑制固定し、安全に処置を行なうことが重要である。特に、眼周囲、前額部などの顔面の処置においては、不用意な患児の動きで副損傷を招かぬように、動かない体位をしっかりと保つことが必要となる。

当院では、レーザー治療を施行している小児に対し、陰圧式固定具(Magic bed および Magic cast 日光ファウンズ工業株式会社製)を用いて、治療、処置を行なっている。対象となるのは、表面麻酔のみで治療のできる比較的小範囲の治療面積の乳幼児、小児である。あらかじめ陰圧式固定具を載せた処置台の上に、患児をのせ、体位を固定する。固定具をフィットさせた後、吸引ポンプで固定具を固定させる。頭位の固定には Magic cast を用い、体幹の保持には Magic bed や従来の体幹保持器を用いる。ドレッシング終了後、固定を解除する。

今回使用した陰圧式固定具は、乳幼児の処置の際、短時間で安全な体位を保持でき、少ない人数で治療が可能であるといった点で、非常に優れていた。この固定具自体は、決して新しいものではないが、外来処置における乳幼児の抑制固定に有用であるため、利用する価値は大きいと思われた。

(質疑応答)

Q 中嶋：採血用のものは市販されているのか。

A 大城：市販はされていない。

14. 患者情報の2次利用、特に小児の顔写真の使用について

国立成育医療センター形成外科

○松田就人、金子 剛、小山太郎

診療過程で患者から得られた情報を、診療目的以外に用いることは診療情報の2次利用と定義される。これには患者のプライバシーにかかわる情報が多く含まれることから、学会発表、論文掲載等においても、承諾を得ること、個人情報を含めないなど一定のルールに基づき使用されている。

形成外科では患部が顔面であることが多く、顔写真を用いることが少なくない。特に患者が小児の場合は、一層の配慮

が必要と思われるが、明解な指針は無いのが現状である。  
今回、話題提供として、インターネット上で得られる情報を  
収拾、整理し、小児の顔写真を用いる際配慮すべき問題につ  
いて考察を加えたい、同窓諸先生方のご意見を賜れば幸いで  
ある。

(質疑応答)

Q 大城：出版物と学会発表の取り扱いの相違は、ガイドライ  
ンが明文化されているのか。

A 松田：統一した見解はないので今後明確にしてゆきたい。

17:00 閉会

---

慶 應 医 学

第 81 卷 総 目 次

平 成 16 年

Journal of The Keio Medical Society

Volume 81

2004

## 第 1 号

### 綜 説

- 角膜の再生医療 .....坪田 一男.....( 1)  
アルツハイマー病における神経細胞死機序と細胞死抑制因子 Humanin .....新倉 貴子・西本征央.....( 9)

### 講 座

- 足アーチ構造の機能 .....橋本 健史.....( 17)  
慢性閉塞性肺疾患 (COPD) と喫煙感受性規定遺伝子 .....山口佳寿博.....( 23)

### 原 著

- 統合失調症における視覚表象の形成と経過に関する精神病理学的研究 .....森本 陽子.....( 31)  
コラーゲンゲルサンドイッチ法が初代培養肝細胞の機能・分化機構に及ぼす影響 .....井口 清香.....( 49)

### 話 題

- 閩学と漢方医学 .....秋葉 哲生.....( 61)  
思考力を持つ医師 .....木山 秀哉.....( 62)  
多段階発がん過程における DNA メチル化の変化 .....金井 弥栄.....( 63)  
乳癌診療における病理診断の役割 .....津田 均.....( 64)  
エクソ/エンドサイトーシスによる生体機能調節 .....山口 和彦.....( 64)  
プロトン伝達物質になり得る .....金子 章道.....( 66)  
ヘモグロビンの遺伝子改変—呼吸不全の治療法— .....本間 生夫.....( 67)  
地域医療支援病院 .....大蔵 幹彦.....( 68)

### 学 位 論 文

- 体内凝血の凝固線溶系に及ぼす影響と再出血発現機序に関する検討 .....山本 裕.....(T 1)  
1 型糖尿病の発症予知に関する研究：動物モデルを用いた基礎的検討 .....山田 悟.....(T11)  
内側膝蓋大腿靭帯の機能解剖学および臨床的研究 .....野村 栄貴.....(T27)

### 号 外

- 博士 (医学) 学位論文—内容および審査要旨— (第171号) .....(別頁)

## 第 2 号

### 綜 説

- 機能応答性蛍光プローブの開発とバイオイメーjingへの応用  
—システム生物学のためのバイオイメーjing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— .....木曾 一誠.....( 93)  
てんかんの神経病理学 .....富永 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高齢者の頻尿                        | 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 隼朗 | (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 <i>Notch4</i> およびヒト <i>Notch1</i> 遺伝子の子宮内膜癌における発現異常 | 鈴木 貴士 | (T51)  |
| 急性広範性肺動脈血栓塞栓症 52 剖検例の法医学病理学的研究                         | 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             | 阪笠 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) |
|---------------------------------|--|------|

## 第 3 号

## 綜 説

|                 |                |       |
|-----------------|----------------|-------|
| C 型慢性肝炎の診断と治療   | 齋藤英胤・石井裕正・日比紀文 | (171) |
| 慢性閉塞性肺疾患        | 市瀬 裕一          | (189) |
| 胃酸関連疾患治療のストラテジー | 鈴木秀和・日比紀文      | (195) |

## 講 座

### 細胞内寄生体感染症に対する T 細胞ワクチン手法の開発

|                     |      |       |
|---------------------|------|-------|
| —細胞内寄生原虫感染症をモデルとして— | 宮平 靖 | (207) |
|---------------------|------|-------|

## 話 題

|                                 |       |       |
|---------------------------------|-------|-------|
| タクロリムス (FK506) 軟膏によるアトピー性皮膚炎の治療 | 河原 由恵 | (221) |
| 内視鏡的処置術の役割—縮小手術に向けて—            | 神谷 知至 | (221) |
| コラーゲン異常症                        | 西村 玄  | (222) |
| 頭部外傷の神経病理について                   | 女屋 光基 | (223) |
| 色覚異常は劣性遺伝か?                     | 村上 元彦 | (224) |
| フードと持続送気を併用した下咽頭ファイバースコープの考案    | 磯貝 豊  | (226) |

## 学位論文

### 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 | (T115) |
| 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  | (T127) |
| $\gamma$ -GTP 活性上昇を規定する因子の臨床的検討; 飲酒およびインスリン抵抗性の関与 | 森谷 晋  | (T137) |
| 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 | (T145) |
| 転写共役因子 p54 <sup>lba</sup> による男性ホルモン受容体転写制御機構の解析   | 石谷 健  | (T157) |

号 外

博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第173号).....(別頁)

第 4 号

綜 説

スポーツと腰痛 .....若野 絃一.....(239)

講 座

成人T細胞性白血病ウイルス：国際比較疫学から病態機序を探る .....久田 充絵.....(253)

小児科漢方—日常診療における具体的治療— .....西村 甲.....(263)

原 著

介護保険制度の導入前後における市町村の介護サービスに関する研究 .....小池 創一.....(271)

イヌ心筋組織における活動電位交代現象と伝導ブロック .....太田 賢一.....(287)

高血糖が腎糸球体血行動態に与える影響の検討 .....本間康一郎.....(295)

話 題

民間病院における不整脈の非薬物療法の可能性 .....佐伯 公子.....(309)

耳鼻咽喉科における内視鏡診療 .....川井田政弘.....(309)

医療業界におけるボーダーレス：経費削減がもたらしたもの?! .....村上 博.....(310)

日本の医療の先にあるもの .....鈴木 孝明.....(311)

学 会 展 望

第84回慶應医学会総会・第12回慶應ライフフォーラム .....(314)

第9回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会 .....(318)

第81巻総目次.....(325)

Key Word 索引 .....(329)

著者名索引 .....(333)

学 位 論 文

生体内 CCD カメラを用いた腎輸入・輸出細動脈の反応性の層差に関する研究 .....松田 洋人.....(T167)

網膜における NO, CO 生成系を介した可溶性グアニル酸シクラーゼの調節 .....下山 勝.....(T185)

潰瘍性大腸炎および Crohn 病における Nitric Oxide 産生と大腸粘膜の

Nitric Oxide Synthase 活性の増加 .....木村 裕之.....(T199)

抗アレルギー薬トラニラストの糸球体腎炎の進行抑制効果に関する研究 .....力石 昭宏.....(T215)

マウス舌癌同所移植モデルを用いた MMP 阻害剤 ONO-4817 の

頭部リンパ節転移抑制効果 .....山下 拓.....(T233)

Interleukin-6 に誘導される腎細胞癌の増殖における活性化型 STAT3 の役割 .....堀口 明男.....(T245)

ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規 NF-B 活性阻害剤の抗腫瘍効果 .....菊地 栄次.....(T261)

膀胱癌患者血清中の IgG 抗体が認識する新しい膀胱癌抗原の同定 .....伊藤 敬一.....(T271)

号 外

博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第174号).....(別頁)

# Key Word 索引

第 81 卷 2004

## A

action potential alternans.....(4) 287  
 activator protein-1 .....(3) T145  
 adult T-cell leukemia/lymphoma .....(4) 253  
 afferent arterioles .....(4) 295  
 Alzheimer's disease.....(1) 9  
 androgen receptor .....(3) T157  
 angiotensin II .....(4) T167  
 angiotensin receptor antagonist.....(4) T167  
 anticancer .....(4) T261  
 anti-Thy 1.1 nephritis .....(4) T215  
 apoptosis .....(4) T245  
 apoptosis .....(4) T261  
 appraisal .....(2) 135  
 arch .....(1) 17  
 athlete.....(4) 239  
 autoantibody .....(2) T101  
 autoimmunity .....(3) T115  
 autopsy .....(2) T63

## B

biohybrid artificial liver .....(1) 49  
 biomechanics .....(1) 17  
 bladder cancer antigen .....(4) T271  
 body cavity coagula .....(1) T1  
 bradykinin .....(4) T167

## C

carbon monoxide .....(4) T185  
 cathepsin S .....(1) 23  
 CD8陽性 T 細胞.....(3) 207  
 cell adhesion.....(3) T115  
 cerebral blood flow.....(2) T39  
 cerebral oxygenation .....(2) 109  
 certification of care needs .....(4) 271  
 characteristics of sports club .....(4) 239  
 claim scheduling period .....(2) 135  
 cloning .....(2) T73

cochlea .....(3) T145  
 collagen gel sandwich configuration .....(1) 49  
 concordant alternans .....(4) 287  
 conduction block.....(4) 287  
 COPD .....(1) 23  
 corneal transplantation.....(1) 1  
 cortical dysplasia .....(2) 99  
 Crohn's disease .....(4) T199  
 CYP2A6.....(1) 23  
 cytokeratin-18 .....(2) T101

## D

danazol .....(3) T127  
 deep vein thrombosis.....(2) T63  
 delusion .....(2) 117  
 desmoglein .....(3) T115  
 discordant alternans .....(4) 287  
 dislocation.....(1) T27  
 DNA mismatch repair gene .....(2) T87

## E

ego disorder .....(1) 31  
 endometrial cancer .....(2) T51  
 endometrium .....(2) T51  
 epidemiology .....(4) 239  
 epidemiology .....(4) 253  
 epilepsy .....(2) 99  
 ethanol consumption .....(3) T137  
 extracellular signal-regulated kinases .....(4) T245  
 eye bank .....(1) 1

## F

fibrinolytic activity .....(1) T1  
 flatfoot .....(1) 17  
 fluorescent probes .....(2) 79  
 focal cortical dysplasia .....(2) 99  
 foot .....(1) 17  
 functional anatomy .....(1) T27  
 FUSE-binding protein .....(2) T101

| G                       |          |
|-------------------------|----------|
| $\gamma$ -GTP .....     | (3) T137 |
| $\gamma$ synergin ..... | (2) T101 |
| gene .....              | (2) T73  |
| gene polymorphism ..... | (1) 23   |

| H  |          |
|--|----------|
| head and neck squamous cell carcinoma            | (4) T233 |
| hearing loss .....                               | (3) T145 |
| <i>Helicobacter pylori</i> (ヘリコバクターピロリ)<br>..... | (3) 195  |
| hepatic differentiation .....                    | (1) 49   |
| higher brain function .....                      | (2) T39  |
| hippocampalsclerosis .....                       | (2) 99   |
| histopathology .....                             | (2) T63  |
| <i>hMLH1</i> .....                               | (2) T87  |
| <i>hMSH2</i> .....                               | (2) T87  |
| hormone-refractory .....                         | (4) T261 |
| HTLV-I-associated myelopathy .....               | (4) 253  |
| human T-lymphotropic virus type I .....          | (4) 253  |
| Humanin .....                                    | (1) 9    |
| hyperglycemia .....                              | (4) 295  |

| I  |          |
|--|----------|
| imaging techniques .....                     | (2) 79   |
| implantation failure .....                   | (3) T127 |
| in vitro fertilization?embryo transfer ..... | (3) T127 |
| insulin resistance .....                     | (3) T137 |
| integrinavb3 .....                           | (3) T127 |
| interleukin-6 .....                          | (4) T245 |
| international comparison .....               | (4) 253  |

| K                        |          |
|--------------------------|----------|
| kampo medicine .....     | (4) 263  |
| kelch-like protein ..... | (4) T271 |

| L  |          |
|--|----------|
| lateral specification .....              | (2) T51  |
| lipoic acid synthetase .....             | (4) T271 |
| Long-term Care Insurance for the elderly | (4) 271  |
| low back pain .....                      | (4) 239  |
| lymph node metastasis .....              | (4) T233 |

| M  |          |
|--|----------|
| macrophage .....                         | (1) T11  |
| MALDI-TOF/MS .....                       | (3) T157 |
| matrix metalloproteinase inhibitor ..... | (4) T233 |
| medial patellofemoral ligament .....     | (1) T27  |
| medical lawsuit .....                    | (2) 135  |
| mesangial cell .....                     | (4) T215 |
| microdysgenesis .....                    | (2) 99   |
| Microsatellite instabilit .....          | (2) T87  |
| MMP-9 .....                              | (1) 23   |
| monitoring .....                         | (2) 109  |
| monoclonal antibody .....                | (3) T115 |
| monocyte chemoattractant protein-1 ..... | (4) T215 |
| mouse .....                              | (2) T73  |
| municipalities .....                     | (4) 271  |
| myogenic response .....                  | (4) 295  |

| N                                |          |
|----------------------------------|----------|
| near-infrared spectroscopy ..... | (2) 109  |
| neural stem cell .....           | (2) 125  |
| neurodegeneration .....          | (1) 9    |
| neuronal cell death .....        | (1) 9    |
| neuroprotective factor .....     | (1) 9    |
| NF-kB .....                      | (4) T261 |
| nitric oxide .....               | (4) T167 |
| nitric oxide .....               | (4) T185 |
| nitric oxide .....               | (4) T199 |
| nitric oxide synthase .....      | (4) T199 |
| nNOS .....                       | (4) 295  |
| noise .....                      | (3) T145 |
| <i>Notch1</i> .....              | (2) T51  |
| <i>Notch4</i> .....              | (2) T51  |
| nuclear factor-kB .....          | (4) T215 |

| O                                   |          |
|-------------------------------------|----------|
| ONO-4817 .....                      | (4) T233 |
| OPCAB .....                         | (2) 93   |
| orthotopic implantation model ..... | (4) T233 |

| P                |          |
|------------------|----------|
| paranoia .....   | (2) 117  |
| patella .....    | (1) T27  |
| pediatrics ..... | (4) 263  |
| pemphigu .....   | (3) T115 |

peroxynitrite .....(4) T199  
 perturbation technique .....(2) 79  
 prediction .....(1) T11  
 primary cultured hepatocyte .....(1) 49  
 procedures for evidence collection .....(2) 135  
 prolongation .....(2) 135  
 prostate cancer .....(4) T261  
 pseudo-hallucination .....(1) 31  
 psychasthenia .....(2) 117  
 psychopathology .....(2) 117  
 pulmonary thromboembolism .....(2) T63

R

rat .....(2) 125  
 re-bleeding .....(1) T1  
 reconstruction .....(1) T27  
 regenerated cornea .....(1) 1  
 renal cell carcinoma .....(4) T245  
 renal hemodynamics .....(4) T167  
 retina .....(4) T185  
 Revised Amsterdam Criteria .....(2) T87  
 rheumatoid arthritis .....(2) T101

S

schizophrenia .....(1) 31  
 schizophrenia .....(2) 117  
 SEREX .....(4) T271  
 service .....(4) 271  
 signal transducer and activator of transcription 3  
 .....(4) T245  
 signal transduction .....(2) 79  
 smoking .....(2) T39  
 smoking sensitivity .....(1) 23  
 soluble guanylate cyclase .....(4) T185  
 spinal cord injury .....(2) 125  
 sports .....(4) 239  
 stem cell .....(1) 1  
 sudden death .....(2) T63  
 supporting cell .....(3) T145  
 system biology .....(2) 79

T

tranilast .....(4) T215  
 transcriptional coactivator .....(3) T157  
 transcripion-splicing coupling .....(3) T157

transplantation .....(2) 125  
 triglycerides .....(3) T137  
 tubuloglomerular feedback (TGF) .....(4) 295  
 tumor reactive T cell .....(4) T271  
 type 1 diabetes .....(1) T11

U

ulcerative colitis .....(4) T199  
 unexplained infertility .....(3) T127  
 unruptured cerebral aneurysm .....(2) T39

V

V1a vasopressin receptor .....(2) T73  
 V1b vasopressin receptor .....(2) T73  
 visual hallucination .....(1) 31  
 visual representation .....(1) 31

あ

イオンチャネル .....(2) 105  
 胃食道逆流症 (GERD) .....(3) 195  
 インターフェロン .....(3) 171  
 ウイルス性慢性肝炎 .....(3) 171  
 炎症性腸疾患 .....(2) 85

か

壁細胞 .....(3) 195  
 換気画像 .....(2) 105  
 径事変化 .....(3) 189

さ

細径気管支鏡 .....(3) 189  
 細胞内寄生体感染症 .....(3) 207  
 施設基準 .....(2) 93  
 シミュレーション .....(2) 105  
 消化性潰瘍 .....(3) 195  
 専門医制度 .....(2) 93

た

大腸癌 .....(2) 85  
 治療効果の予測 .....(3) 171  
 低侵襲手術 .....(2) 85  
 トリパノソーマ .....(3) 207

な

内視鏡外科(2) 85

| は   |          |     |                    |
|---|----------|-----|--------------------|
| 肺循環   | .....(3) | 189 |                    |
| 肺静脈隔離術                                      | .....(2) | 93  | 弁形成術 .....(2) 93   |
| 腹腔鏡下大腸切除                                    | .....(2) | 85  |                    |
| 不整脈   | .....(2) | 105 | マ                  |
| プロトンポンプ阻害薬<br>(proton pump inhibitor ; PPI) | .....(3) | 195 | マラリア .....(3) 207  |
| 分子薬物相互作用                                    | .....(2) | 105 | ら                  |
| ベグインターフェロン                                  | .....(3) | 171 | リバビリン .....(3) 171 |
|   |          |     | わ                  |
|   |          |     | ワクチン .....(3)207   |

# 著者名索引

第 81 卷 2004

|          |          |         |
|----------|----------|---------|
| <b>A</b> |          |         |
| 秋葉 哲生    | .....(1) | 61      |
| <b>B</b> |          |         |
| 阪埜 浩司    | .....(2) | T87     |
| <b>C</b> |          |         |
| 力石 昭宏    | .....(4) | T215    |
| <b>F</b> |          |         |
| 福永 篤志    | .....(2) | T39     |
| <b>H</b> |          |         |
| 濱田 秀伯    | .....(2) | 117     |
| 橋本 健史    | .....(1) | 17      |
| 日比 紀文    | .....(3) | 171,195 |
| 久田 充絵    | .....(4) | 253     |
| 本間 生夫    | .....(1) | 67      |
| 本間 康一郎   | .....(4) | 295     |
| 堀口 明男    | .....(4) | T245    |
| <b>I</b> |          |         |
| 市来崑 潔    | .....(2) | 109     |
| 市瀬 裕一    | .....(3) | 189     |
| 井口 清香    | .....(1) | 49      |
| 石井 裕正    | .....(3) | 171     |
| 石谷 健     | .....(3) | T157    |
| 磯貝 豊     | .....(3) | 226     |
| 伊藤 敬一    | .....(4) | T271    |
| 岩本 潤     | .....(2) | 141     |
| <b>K</b> |          |         |
| 神谷 知至    | .....(3) | 221     |
| 金井 弥栄    | .....(1) | 63      |
| 金子 章道    | .....(1) | 66      |
| 河原 由恵    | .....(3) | 221     |

|          |          |      |
|----------|----------|------|
| 川井田 政弘   | .....(4) | 309  |
| 菊池 信太郎   | .....(2) | T73  |
| 菊地 栄次    | .....(4) | T261 |
| 木村 裕之    | .....(4) | T199 |
| 岸川 剛     | .....(2) | 144  |
| 木曾 一誠    | .....(2) | 93   |
| 北岡 裕子    | .....(2) | 105  |
| 木山 秀哉    | .....(1) | 62   |
| 小池 創一    | .....(4) | 271  |
| 倉智 嘉久    | .....(2) | 105  |
| <b>M</b> |          |      |
| 松田 洋人    | .....(4) | T167 |
| 松尾 聿朗    | .....(2) | 146  |
| 宮平 靖     | .....(3) | 207  |
| 森本 陽子    | .....(1) | 31   |
| 森谷 晋     | .....(3) | T137 |
| 村上 博     | .....(4) | 310  |
| 村上 元彦    | .....(3) | 224  |
| <b>N</b> |          |      |
| 長塚 行雄    | .....(2) | 135  |
| 中村 雅也    | .....(2) | 125  |
| 中野間 隆    | .....(2) | 141  |
| 新倉 貴子    | .....(1) | 9    |
| 西本 征央    | .....(1) | 9    |
| 西村 玄     | .....(3) | 222  |
| 西村 甲     | .....(4) | 263  |
| 野島 崇樹    | .....(2) | T101 |
| 野村 栄貴    | .....(1) | T27  |
| <b>O</b> |          |      |
| 小川 祐人    | .....(2) | 125  |
| 岡 浩太郎    | .....(2) | 79   |
| 岡野 栄之    | .....(2) | 125  |
| 女屋 光基    | .....(3) | 223  |
| 大蔵 幹彦    | .....(1) | 68   |
| 太田 賢一    | .....(4) | 287  |

|          |          |      |
|----------|----------|------|
| <b>R</b> |          |      |
| 呂 彩子     | .....(2) | T63  |
| <b>S</b> |          |      |
| 佐伯 公子    | .....(4) | 309  |
| 齋藤 英胤    | .....(3) | 171  |
| 斎藤 良一    | .....(2) | 109  |
| 島田 直樹    | .....(2) | 135  |
| 下山 勝     | .....(4) | T185 |
| 志津木 健    | .....(3) | T145 |
| 鈴木 秀和    | .....(3) | 195  |
| 鈴木 慎悟    | .....(2) | 105  |
| 鈴木 孝明    | .....(4) | 311  |
| 鈴木 貴士    | .....(2) | T51  |
| <b>T</b> |          |      |
| 田中 葉子    | .....(2) | 145  |
| 鄭 智誠     | .....(3) | T127 |
| 富永 格     | .....(2) | 99   |
| 戸山 芳昭    | .....(2) | 125  |
| 坪田 一男    | .....(1) | 1    |
| 津田 均     | .....(1) | 64   |
| 角田 和之    | .....(3) | T115 |
| <b>W</b> |          |      |
| 若野 絃一    | .....(4) | 239  |
| 渡邊 昌彦    | .....(2) | 85   |
| <b>Y</b> |          |      |
| 山田 充彦    | .....(2) | 105  |
| 山田 悟     | .....(1) | T11  |
| 山口 和彦    | .....(1) | 64   |
| 山口 佳寿博   | .....(1) | 23   |
| 山本 裕     | .....(1) | T1   |
| 山下 拓     | .....(4) | T233 |
| 矢内原 仁    | .....(2) | 142  |
| 横井 秋夫    | .....(2) | 146  |

## 雜 報

### 慶應医学会例会第 1366 回

日 時 平成 16 年 8 月 24 日 (火) 午後 6 時  
場 所 総合医科学研究棟 2 階会議室  
演 題 People, plants, and drugs : an introduction to ethnopharmacology  
演 者 Dennis McKenna, PhD  
Center for Spirituality and Healing Academic Health Center University of Minnesota Minneapolis, MN USA  
担 当 ツムラ東洋医学寄付講座

### 慶應医学会例会第 1367 回

日 時 平成 16 年 8 月 27 日 (金) 午後 6 時  
場 所 本館臨床講堂  
演 題 Potential mechanisms of probiotics in the treatment of IBD  
演 者 Eugene B. Chang, MD  
Martin Boyer Professor of Medicine Associate Director for Academic Programs and Training in Gastroenterology Director Martin Boyer Laboratories University of Chicago Chicago, IL USA  
担 当 内科学教室

### 慶應医学会例会第 1368 回

日 時 平成 16 年 8 月 31 日 (火) 午後 3 時  
場 所 総合医科学研究棟 5 階 会議室 5  
演 題 Inducing axon regeneration and plasticity for repair in the damaged CNS  
演 者 James Fawcett, MD, PhD  
Professor Deputy Director Institute for Cell and Molecular Therapies Griffith University Cambridge University Centre for Brain Repair Cambridge UK  
担 当 生理学教室

### 慶應医学会例会第 1369 回

日 時 平成 16 年 9 月 4 日 (土) 午後 2 時  
場 所 東校舎講堂  
演 題 Prosthetically-driven implant placement and techniques  
演 者 Federico Brugnami, DDS  
Lecturer, Department of Peridontics Nova Southeastern University Roma, Italy  
担 当 歯科・口腔外科学教室

### 慶應医学会例会第 1370 回

日 時 平成 16 年 9 月 14 日 (火) 午後 5 時  
場 所 新棟 11 階大会議室  
演 題 The rights of identity for aid children and adults  
演 者 Mr. Bill Cordray  
Project Architect, Pioneer of Movement for the Rights of Aid People Salt Lake City, UT USA  
担 当 小児科学教室

### 慶應医学会例会第 1371 回

日 時 平成 16 年 9 月 9 日 (木) 午後 5 時  
場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
演 題 The origin and evolution of vertebrate mineralized skeleton  
演 者 Kazuhiko Kawasaki, PhD  
Research Associate Department of Anthropology Pennsylvania State University University Park, PA USA  
担 当 分子生物学教室

### 慶應医学会例会第 1372 回

日 時 平成 16 年 9 月 22 日 (水) 午後 6 時  
場 所 新教育棟 4 階 講堂 3  
演 題 Anti-aging therapy  
演 者 Terry Grossman, MD  
Medical Director Frontier Medical Institute 2801 Youngfield St - Suite 117 Lakewood, CO 80401 USA  
担 当 眼科学教室



慶應医学会例会第 1373 回

日時 平成 16 年 9 月 24 日 (金) 午後 5 時  
場所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
演題 Critical role of Presenilin in Cadherin/PI3K/  
Akt/GSK3 cell survival signaling pathway and  
its implication in Alzheimer's disease  
演者 Junichi Shioi, PhD  
Assistant Professor Department of Psychiatry  
Mount Sinai School of Medicine New York, NY  
USA  
担当 分子生物学教室

慶應医学会例会第 1374 回

日時 平成 16 年 9 月 29 日 (水) 午後 5 時  
場所 新教育研究棟 3 階  
演題 Hallux valgus  
演者 Michael J. Coughlin, MD  
Professor Oregon Health Science University  
Department of Orthopaedic Surgery Portland,  
OR USA  
担当 整形外科教室

慶應医学会例会第 1375 回

日時 平成 16 年 9 月 29 日 (水) 午後 5 時  
場所 新教育研究棟 4 階 講堂 3  
演題 Genetic control of autoimmunity in NOD mice  
演者 William M. Ridgway, MD  
Assistant Professor Division of Immunology  
and Rheumatology University of Pittsburgh  
School of Medicine Pittsburgh, PA USA  
担当 内科学教室

慶應医学会例会第 1376 回

日時 平成 16 年 9 月 29 日 (水) 午後 6 時  
場所 新棟中会議室  
演題 Altering the natural course of Crohn's disease :  
benefit/risk assessment of infliximab therapy  
演者 Scott Eric Plevy, MD  
Division of Gastroenterology, Hepatology and  
Nutrition Inflammatory Bowel Disease Center  
University of Pittsburgh School of Medicine,  
Pittsburgh, PA USA  
担当 内科学教室

慶應医学会例会第 1377 回

日時 平成 16 年 9 月 28 日 (火) 午後 6 時  
場所 新教育研究棟 講堂 1  
演題 How to handle or motivate medical students  
演者 Gordon Greene, PhD  
Director of International Education Director,  
Program for Medical Education in East Asia  
University of Hawaii at Manoa John A. Burns  
School of Medicine, Office of Medical Educa-  
tion Honolulu, Hawaii, USA  
担当 医学教育統轄センター

慶應医学会例会第 1378 回

日時 平成 16 年 10 月 9 日 (土) 午後 3 時 30 分  
場所 総合医科学研究棟 6 階会議室 6  
演題 A novel human sperm specific JNK interacting  
protein SPAG9-JIP3 $\gamma$  protein involved in  
Human Sperm egg interaction  
演者 Anil Suri, PhD  
Chief, Genes and Protein Laboratory National  
Institute of Immunology New Delhi India  
担当 先端医科学研究所

慶應医学会例会第 1379 回

日時 平成 16 年 10 月 17 日 (日) 午前 10 時  
場所 新棟 11 階 大会議室・中会議室  
演題 2004 歯科インプラント Update 学術大会  
①インプラント表面とイミューディエートローディ  
ング  
②ヨーロッパ最新のインプラント臨床  
演者 ①Bilal Al-Nawas, PD. Dr. med. Dr. med. dent  
Assistant Professor, Department of Oral and  
Maxillofacial surgery, University Mainz  
Mainz, Germany  
②Wilfried Wagner, Prof. Dr. med. Dr. med. dent  
Chairman and Professor, Department of Oral  
and Maxillofacial surgery, University Mainz  
Mainz, Germany  
担当 歯科口腔外科教室

慶應医学会例会第 1380 回

日 時 平成 16 年 10 月 23 日 (土) 午後 2 時 30 分  
場 所 新研究棟一階 ラウンジ  
演 題 Bridging brain function and structure with MRI  
演 者 Denis Le Bihan, MD, PhD  
Director, Federative Institute of Research on Functional Neuroimaging Orsay France  
担 当 外科学教室

慶應医学会例会第 1381 回 (開催中止)

日 時 平成 16 年 10 月 25 日 (月) 午後 2 時  
場 所 新教育研究棟 2 階 講堂 1  
演 題 Complete concept for dental implant treatment  
演 者 Dr-med. Dent. Hans Jurgen Hartmann  
Lecturer, Charite Hospital Berlin Germany  
担 当 歯科・口腔外科学教室

慶應医学会例会第 1382 回

日 時 平成 16 年 11 月 2 日 (火) 午後 6 時  
場 所 総合医科学研究棟 1F ラウンジ  
演 題 Shedding Light on Cancer : Tailoring Antibodies for Imaging and Therapy of Cancer  
演 者 Anna M. Wu, PhD  
Associate Professor Department of Molecular and Medical Pharmacology Geffen School of Medicine at UCLA Los Angeles, CA USA  
担 当 分子生物学教室

慶應医学会例会第 1383 回

日 時 平成 16 年 11 月 9 日 (火) 午後 4 時  
場 所 新教育研究棟講堂 3  
演 題 International Dermatology Update  
① Challenging cases from Keio  
② A transgenic model of pemphigoid  
③ Immature B cells in the circulation of patients with pemphigus : early observations and hypothesis for epitope spread  
④ What is your diagnosis? : ten interesting cases from St. John's Institute of Dermatology  
演 者 ① Senior residents  
Dermatology Department, Keio University School of Medicine  
② Kim Yancey, MD  
Professor & Chairman, Department of Dermatology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, US  
③ Russell P Hall, III, MD  
Professor & Chairman, Division of Dermatology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA  
④ John A. McGrath, MD  
Professor, Department of Cell and Molecular Pathology, St. John's Institute of Dermatology, Guy's, King's and St. Thomas's Hospital, London, UK  
担 当 皮膚科学教室

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

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

### 論文の受付

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

原稿はオリジナルとコピーを一部ずつ下記あてに届けて下さい。

〒160-0016

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

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9：00～午後 5：00

(土曜日は受付をしません)

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

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

### 論文原稿の作成上の注意

1. **原稿** 文章は現代かなづかいにしたがって平仮名混じりとする。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。手書は受け付けない。大きさは原則として横幅 8 cm もしくは 16 cm、縦（最長）23 cm 以内のものを用意する。電子顕微鏡写真および光学顕微鏡写真は倍率を明示すること。原図の裏に著者名・図番号・天地の指示（矢印）を鉛筆書きし、A4判の紙に貼付する。特に大きさや配置に希望のある場合は明記すること。原寸大として図に書き込まれている字の大きさは、最低 1.5 mm の高さが必要である。これ以下の大きさは印刷不可。

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

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

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

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

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

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

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

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

20. その他 詳細に関しては事務局に問い合わせ下さい。(2003年1月)

# 「学位申請論文」投稿の手引き

## 「学位申請論文」について

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

### 1. 学位取得の十分条件ではない。

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

### 2. 二重投稿が回避できる。

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

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

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

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

### 3. プライオリティを主張することはできない。

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

## 論文作成上の注意

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

ある。

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT）は不要である。

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

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

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

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

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

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

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

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

なお、ご不明の点については事務局にお問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

## 編集後記

今年も後少しとなりました。大学病院の大きな変革が行われ臨床の場が一変しましたが、「医学部」業務との錯綜が続いているような気がする今日この頃です。

さて、「慶應医学」の役割が問われて久しいのですが、毎号多くの貴重な論文が掲載されており、まだまだこの雑誌の存在意義が大きいのではないかと思います。思えば学位論文などは、自分の専門外のことで比較的インパクトファクターの高い英文雑誌に掲載された論文を日本語で読める貴重なものです。英語に弱い者にとって広い知識をつけるには格好の読み物となります。また総説・講座は力作も多いので、すぐにゴミ箱行きはもったいないですよ、みなさん。(齋藤 英胤)

## 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  
櫻庭了 上田政和 梅澤明弘 鹿島晴雄  
齋藤英胤 林松彦 村田満 村松太郎

平成 16 年 12 月 18 日 印刷

平成 16 年 12 月 25 日 発行

編集者 北島政樹

発行者

印刷所 学術図書出版株式会社

電話 (3948) 7516 番

印刷者 富田進

発行所 慶應医学

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

慶應義塾大学医学部企画室

電話(3353)1211(大代)内線62766

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

### 複写される方へ

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

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル (中法) 学術著作権協会  
電話(03)-3475-5618 FAX(03)3475-5619 E-mail: jaacc@mtd.biglobe.ne.jp

著作物の転載・翻訳のような、複写以外の許諾は、直接本会へご連絡下さい。

アメリカ合衆国における複写については、次に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

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

### Notice about photocopying

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

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

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

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

In the USA Copyright Clearance Center, Inc.

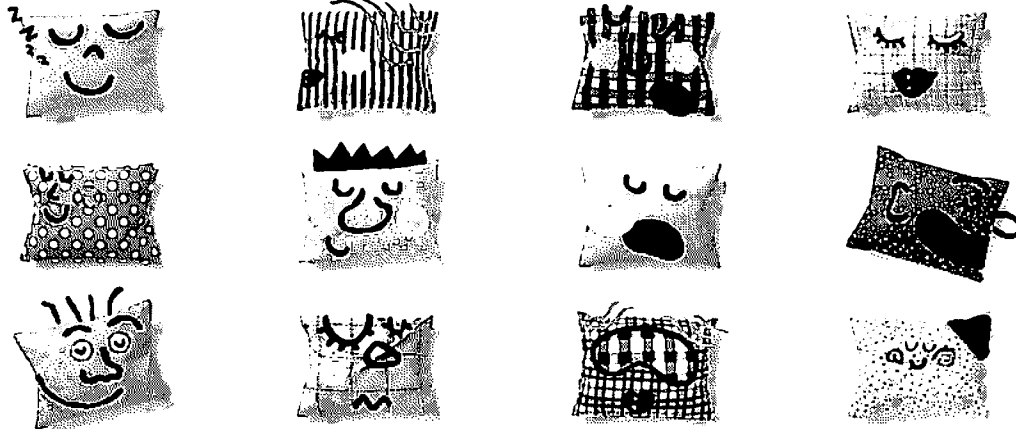
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

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


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



**Fujisawa**



入眠剤

 **マイスリー<sup>®</sup>錠 5・10 mg** 薬価基準収載  
**Myslee<sup>®</sup> Tablets** (酒石酸ソルピデム錠) 向精神薬・習慣性医薬品<sup>注1)</sup>・指定医薬品・要指示医薬品<sup>注2)</sup>  
注1) 注意—習慣性あり 注2) 注意—医師等の処方せん・指示により使用すること

効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意につきましては、製品添付文書をご参照下さい。

販売 資料請求先

藤沢薬品工業株式会社  
大阪市中央区道徳町3-4-7 〒541-8514  
(Fujisawa Medical Site) <http://med.fujisawa.co.jp>

製造

静岡フジサワ株式会社  
静岡県富士市中河原88番地

提携

藤沢サノフィ・サンテラボ株式会社  
東京都港区虎ノ門1-26-5  
登録商標者 sanofi-synthelabo・フランス

作成年月 2003年10月

慶應医学 第81卷第4号別頁  
平成16年12月25日

# 学位論文

慶應医学会

学位論文

生体内 CCD カメラを用いた腎輸入・輸出細動脈の  
反応性の層差に関する研究

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

まつ ば ひろ と  
松 田 洋 人

(平成 15 年 9 月 5 日受付)

Key Words : angiotensin II, nitric oxide, angiotensin receptor antagonist, renal hemodynamics, bradykinin

生体の内部環境の恒常性維持に種々の液性因子の関与が示されてきたが、なかでもレニン・アンジオテンシン系は、全身血圧の調整や腎機能の保持に重要な内分泌調節系である<sup>1, 2)</sup>。レニンならびにアンジオテンシン II が腎臓内に豊富に存在し<sup>3, 4)</sup>、腎糸球体・細動脈レベルには、アンジオテンシン II 受容体が密に分布すること<sup>5)</sup>、レニン-アンジオテンシン系が腎臓内できわめて重要な役割を担っていることを示唆している。実際にアンジオテンシン II が糸球体の前後に存在する輸入・輸出細動脈の血管緊張に影響を与え、腎臓の主要な機能である血液濾過を制御している。さらに、生体内では、腎微小血管壁ならびにその周囲の腎間質が一酸化窒素（以下、NO と略）などの種々の液性因子をオートクライン・パラクラインとして分泌し<sup>6, 7)</sup>、これらの液性因子が相互に影響を与え合うことが報告されている<sup>8, 9)</sup>。これまでの摘出腎、あるいは単離腎微小血管標本などの種々の研究手法により、アンジオテンシン II に対する輸入・輸出細動脈の血管反応性が異なり、その収縮機序にも差異が見られることが報告されてきた<sup>10~13)</sup>。しかし種々の因子の影響を受ける生体内で、輸入・輸出細動脈へのアンジオテンシン II の作用が NO に対していかなる作用を示すかには検討されていない。近年アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬ならびにアンジオテンシン受容

体拮抗薬などのアンジオテンシン II 作用抑制薬が腎障害進展阻止薬として有用であることが確立してきたが<sup>14~17)</sup>、これらの阻害薬の生体内における腎微小循環ならびに腎内 NO に与える影響の詳細は明らかでない。

腎臓内において糸球体の存在部位がその機能に大きな影響を与えている。すなわち、糸球体の約 9 割が皮質表層部に存在し<sup>18)</sup>、近傍の尿細管への血液の供給を行っている。一方、残りの 1 割の糸球体は腎髄質に近い傍髄質部に存在し、血液濾過の他に直血管を經由して髄質乳頭部に血液を供給し、水・ナトリウム代謝に影響をおよぼしている。このような腎臓内における糸球体の存在部位の差異が腎機能にことなる影響を与えるが、一方腎皮質・髄質のおおのこの層において種々の液性因子の濃度環境も異なることが知られている<sup>19)</sup>。とくに、NO は血管拡張因子として働いており、アンジオテンシン II との相互作用が血管の存在部位で異なることが推察される<sup>20, 21)</sup>。しかしながら、従来の研究方法は、腎皮質表層部<sup>22)</sup>あるいは傍髄質部の糸球体微小循環のみ<sup>10, 23)</sup>を評価する研究手技や、目的とする血管を生体より単離するといった侵襲的な方法<sup>11, 24)</sup>がとられていた。腎微小血管周囲の環境を損なわずに観察することが重要であるが、これまでそのような研究はない。

以上の背景をふまえ、本研究は生体内における腎皮質

本論文は、Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Kubota E, Honda M, Naito M, Matsumoto A, Suzuki H, Yamamoto T, Kajiji F, Saruta T : Zonal heterogeneity in action of angiotensin-converting enzyme inhibitor on renal microcirculation : role of intrarenal bradykinin. Journal of American Society of Nephrology 10 (11) : 2272-2282 ; 1999 の一部、および Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Kubota E, Honda T, Tokuyama H, Suzuki H, Yamamoto T, Kajiji F, Saruta T : Distinct modulation of superficial and juxtamedullary arterioles by prostaglandin *in vivo*. Hypertension Research 25 (6) : 901-910, 2002 の一部を含む。

表層部ならびに傍髄質部の輸入・輸出細動脈に対するアンジオテンシン II の作用を、比較的低侵襲操作で直接観察できるニードル型生体内 CCD カメラ<sup>25-27)</sup>で検討した。さらに、各層の輸入・輸出細動脈へのアンジオテンシン II の作用と腎実質内 NO との関連を、アンジオテンシン II の投与により直接的に観察するとともに、アンジオテンシン受容体拮抗薬ならびにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬の投与下で、内因性のアンジオテンシン II の作用および両薬剤の NO 産生への作用の差異について検討した。

## 方 法

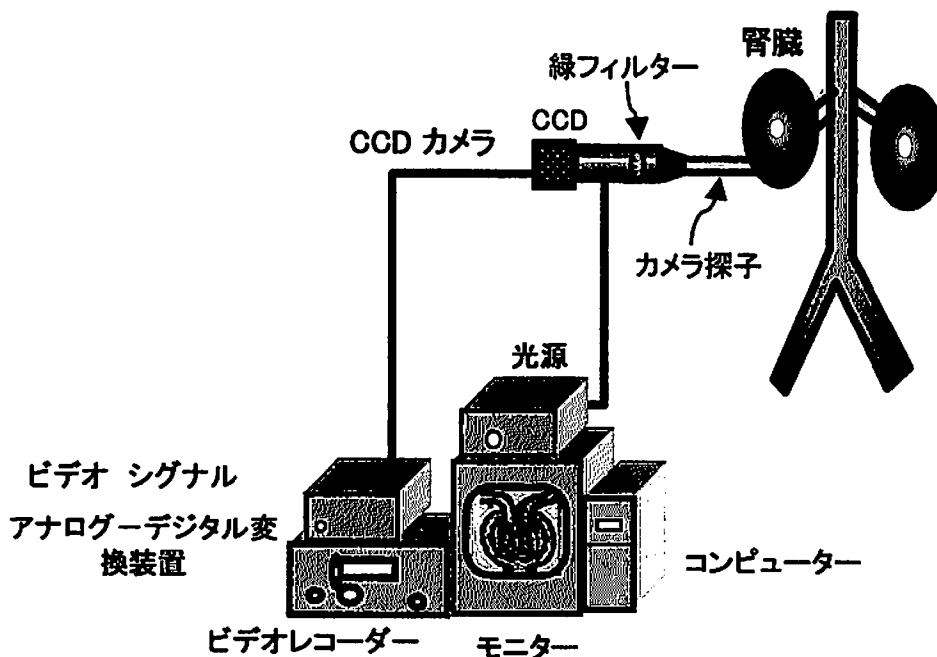
### 1. 血圧、心拍数ならびに腎血行動態の観察

実験は雄生犬 (n=65) を用いた。実験 1 は雑犬 (10-17 kg) を、実験 2 から 4 は、ビーグル犬 (体重 4-8 kg) を使用した。すべての実験は慶應義塾大学医学部の実験動物委員会ガイドラインにしたがい、外科的処置はペントバルビタール (30 mg/kg, 静注) 麻酔下で無菌的に行った。各実験は人工呼吸器による呼吸管理下で行った。体温は 37°C に保持した恒温ブランケットで管理した。右大腿動脈に挿入したカテーテル (Tygon,

U.S. Stoneware, オハイオ, U.S.A.) を血圧トランスデューサー (TP-400T, 日本光電, 東京) に接続し、平均血圧、心拍数を測定した。後腹膜切開により左腎を露出し表在化させた。腎門部を剥離し、腎血漿流量測定のために、電磁血流計 (日本光電: プロブ径 5 mm) を腎動脈に装着した。血圧、脈拍、腎血流量は、アナログ-デジタル変換装置 (Macintosh Laboratory System; Analog Digital Instruments Pty., Ltd. キャスルヒル, オーストラリア) でデジタル化したデータを、コンピューターにて評価した。膀胱内にバルーンカテーテル (7-Fr, クリエイトメディック, 横浜) を経尿道的に挿入し、パラミノ馬尿酸を用いて腎血漿流量、インスリンを用いて糸球体濾過率を測定した。濾過係数は腎血漿流量と糸球体濾過率との比から算出した。

### 2. 腎実質内 NO ならびにキニン濃度の測定

腎実質内の NO の測定は、腎微小透析法を用いて行った<sup>25, 28)</sup>。すなわちポリスルホン製の半透膜 (エイコム社, 孔径 0.5 mm, カットオフ値 10 Kd) からなる直線型中空糸を腎皮質表面より 2 mm ならびに 10 mm の深度で挿入し、透析液としてリンゲル液 (147 mEq/L Na, 4 mEq/L K, 5 mEq/L Ca, 156 mEq/L Cl) を 2  $\mu$ l/分



第1図 ニードル型生体内 CCD カメラシステムの説明。表在化した腎にニードル型 CCD カメラを挿入し、細動脈の画像情報をデジタル信号からアナログ信号 (NTSC) に変換し、コンピューターにて解析した。

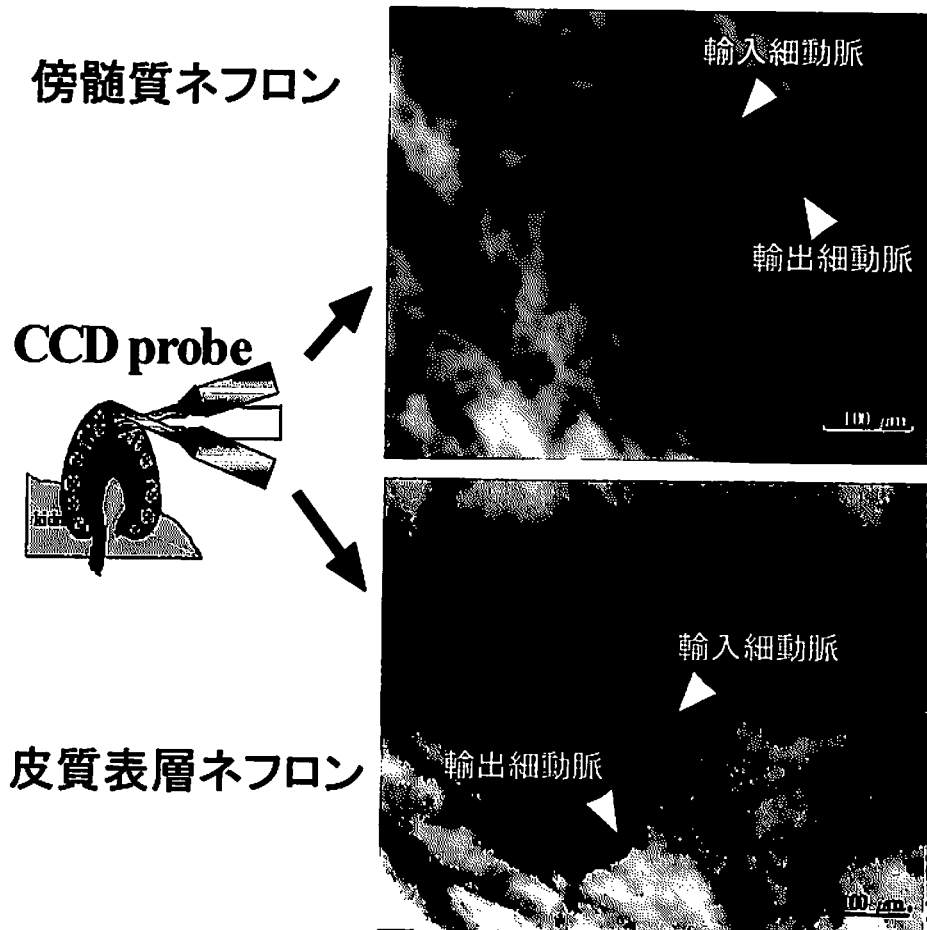
で灌流し、おのおの皮質部、髄質部の灌流と見なした。灌流液は $-80^{\circ}\text{C}$ で直ちに凍結し、後日測定に供した。腎 NO 活性の指標として、NO 代謝物である  $\text{NO}_2$  ならびに  $\text{NO}_3$  の総和（以下、 $\text{NO}_x$  と略）を用いた、Griess 法に基づき  $\text{NO}_2$  および  $\text{NO}_3$  を分光光度計（ENO-10、エイコム社、東京）を用い、波長  $540\text{ nm}$  で測定した。

腎実質内キニン濃度の測定には、腎生検法<sup>25)</sup>を用いた。腎表面より深度が一定になるよう直角に生検し、すみやかに検体を皮質ならびに髄質部にわけ、インヒビターカクテル（100% ethanol, trichloroacetic acid (100 mol/L), EDTA (3.5 mol/L), 1, 10-phenanthroline (0.5 mol/L), p-hydroxymercurbenzoate sodium salt (1 mmol/L), および pepstatin (0.12 mmol/L) の入った容器にいれ、液体窒素で凍結させた。薬品はシグマ社（セントルイス）より購入し実験前に調合した。その後

$-80^{\circ}\text{C}$ に保存し、後日 RIA 法により組織キニンを測定した<sup>25)</sup>。

### 3. 腎微小血管の評価

腎微小血管を直接観察するため、ニードル型生体内 CCD カメラを用いた（第 1 図）<sup>25~27, 29)</sup>。本システムは、ニードル型 CCD カメラ装置とビデオ記録装置から成り、CCD カメラ装置先端部の CCD カメラ探子は Gradient-Index レンズ（直径  $4.5\text{ mm}$ 、倍率 700 倍）とその外環を取り巻く 18 本の光ファイバーにより構成されている。外部のハロゲンランプ（150W）から光ファイバーを介して先端周囲にある対象を照射し、写し出された血管像を光学的に 700 倍に拡大し、単板 CCD 素子（電荷結合素子、約 38 万画素）に結像させ、出力信号を電気信号に変換した。この電気信号をテレビ信号に変換し、実験



第 2 図 腎皮質表層部ならびに傍髄質部糸球体における輸入—輸出細動脈の描出方法。腎後極に CCD プローブを穿刺し、平行から上方にプローブを振ることで皮質表層糸球体を、また下方に振ることで傍髄質部糸球体の描出を行った。（Matsuda H et al : J Am Soc Nephrol. 10 (11) : 2272-2282, 1999 の Fig 1 を許可をえて転載）

中は15インチテレビモニター上に映像化すると同時に、画像情報はHi-8ビデオカセットレコーダーに録画した。

CCDカメラ探子は、左側腹部切開部より左腎後極皮質部に挿入した。腎皮質表層部の糸球体の観察は、CCDカメラ探子を上方に向けることで行い、また傍髄質部の糸球体は下方に向けることにより行った(第2図)。糸球体描出後は、CCDカメラ探子を数 $\mu\text{m}$ ずつ手前に引き血管イメージが安定し、かつ糸球体血流が明瞭に得られる部位に固定した。糸球体の描出後は、最低60分間は観察し安定が得られた後に実験開始とした。実験中に視野内に再出血がみられた場合には観察を中止した。

腎輸入・輸出細動脈径は、録画された画像をコンピューター(Power Mac8500/120AV)に経時的にピクト情報として取り込み、フォトショップ(Ver. 2.5J, アドビ社)にてグレースケール化(8ビット256階調)した後、NIH-Image(Ver. 1.57)を用いて評価した。すなわち、糸球体の近傍で血管と考える箇所において、血管壁に直交する線に沿って約15 $\mu\text{m}$ の幅で画像濃度を平均化し血管内腔を示唆するプロットプロファイルを出し、その平均値の最小値と最大値の差の4分の1を最小値に加えた値に交わる点を血管径とみなした<sup>26, 29)</sup>。

実験に供したアンジオテンシンII, nitro-L-arginine methylester (L-NAME), L-arginine, ならびに N-adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp3, Thi5, 8, D-Phe7]-bradykinin (NAAB) は、シグマ社(セントルイス)より購入し、ACE阻害薬であるシラザプリラートおよびアンジオテンシンII受容体拮抗薬であるE4177は、おのおの日本ロッシュ株式会社(東京)、エーザイ株式会社(大阪)より供与された。

#### 4. 実験計画

##### 1) 皮質表層・傍髄質部NOのアンジオテンシンII作用に与える影響

体循環の血行動態の観察下で、経静脈的にアンジオテンシンII(1, 3, 10ならびに30ng/kg/分)を持続注入し、表層部および傍髄質部糸球体の輸入、輸出細動脈の反応を観察した。さらに、腎微小透析法により、基礎状態ならびにアンジオテンシンII投与後の透析膜灌流液中のNOx濃度を、皮質部ならびに髄質部にかけて測定した。

次に、L-NAME(1mg/kg)投与後の腎細動脈径の変化を観察し、腎内NOが、基礎腎血管抵抗に与える影響を検討した。L-NAME投与15分後に全身ならびに腎循環の安定が得られたのち、アンジオテンシンII(1, 3, 10ならびに30ng/kg/分)を持続静注し、両

層の腎輸入・輸出細動脈の反応を観察し、L-NAME非存在下における反応と比較検討した。

##### 2) アンジオテンシンII受容体拮抗薬(E4177)の腎微小循環作用

アンジオテンシン受容体拮抗薬であるE4177(3, 10, 30ならびに100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )を静注し、細動脈の拡張反応を検討した。さらに、腎微小透析法を用い、E4177の各投与量における腎内NOx濃度を測定した。次に、E4177(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )投与後にアンジオテンシンII(3, 10, 30, 100ng/kg/分)を投与し、細動脈の血管収縮反応の抑制の程度ならびに、腎微小透析法により腎内NO産生に与える影響を検討した。

##### 3) ACE阻害薬の腎微小循環作用

シラザプリラートを、3, 10ないし30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で静脈投与し、全身循環、腎循環、ならびに腎微小循環の反応を観察した。ACEはその分子構造の一部にキナーゼII活性を有し、ACE阻害薬によりブラジキニンが増加することが報告されている<sup>30)</sup>。したがって、ACE阻害薬により亢進したキニン活性の関与を検討する目的で、ブラジキニン(B2)受容体拮抗薬であるNAAB(0.5nmol/kg/分)を追加投与し、細動脈径の変化を観察した。一方、内因性ブラジキニンの腎微小循環に与える影響を評価する目的で、基礎状態におけるNAAB(0.5nmol/kg/分)の影響も検討した。

ACE阻害薬投与に伴う腎内ブラジキニン濃度の変化を検討する目的で、各用量のシラザプリラート投与30分後に、腎生検を施行し、後日ブラジキニンの測定に供した。さらに、腎微小透析法を用い各投与量における腎内NOxを測定した。

##### 4) ACE阻害薬のキニン増強作用

ACE阻害薬による腎微小血管拡張へのブラジキニンの関与が、輸入・輸出細動脈で異なるか、あるいは皮質表層・傍髄質で異なるか否かを検討する目的で、E4177(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )の存在下でシラザプリラート(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )を投与した。さらに、NAAB(0.5nmol/kg/分)を追加投与し、各層ならびに細動脈における差異を検討した。

#### 5. 統計学的処理

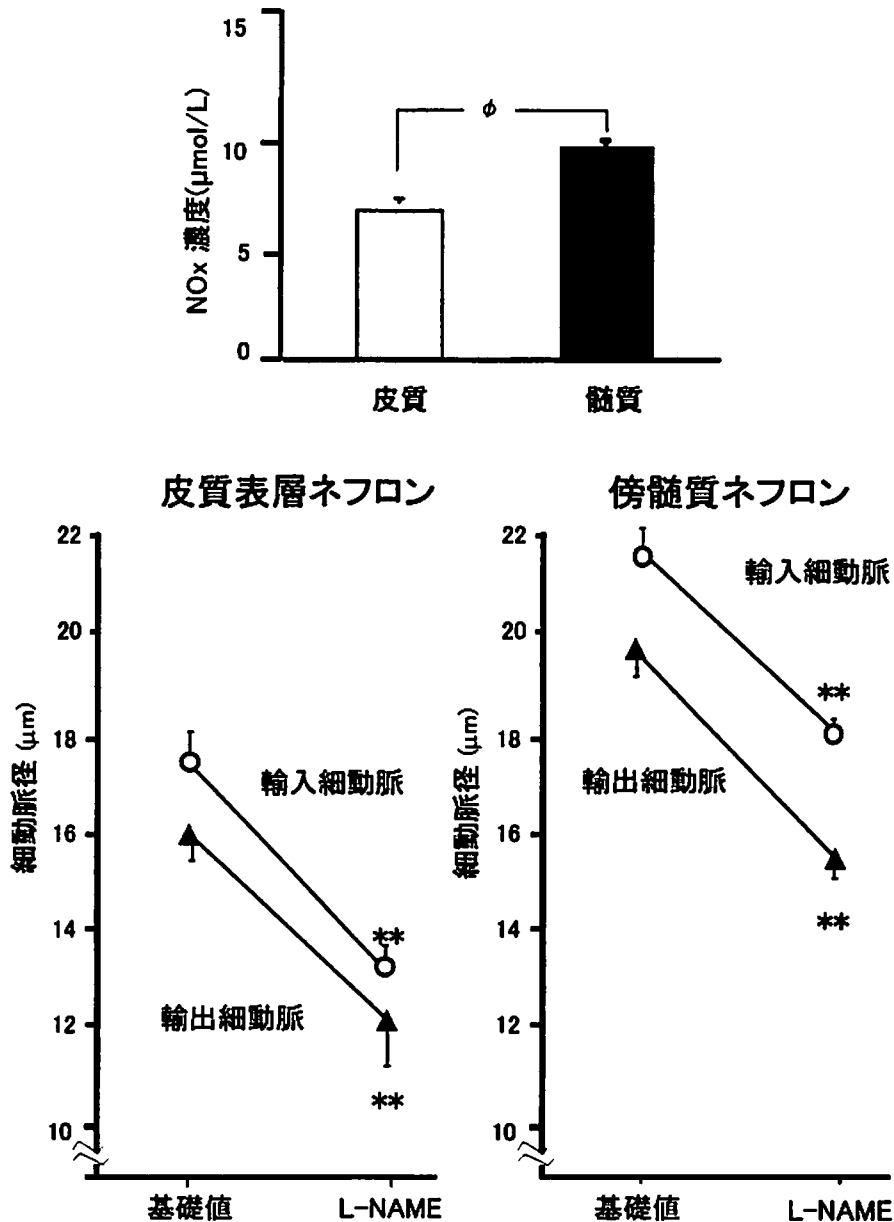
本文中の数値および図表中の数値は特に記載のある場合を除いては、平均値標準誤差で表した。統計解析は2元配置分散分析法を用い、危険率5%未満の場合を統計学的有意差ありとした。各群間有意差検定には、Bonferroniのpost-hoc testを使用し危険率5%未満の場合を統計学的有意差ありとした。

結 果

1. 皮質表層・傍髄質部 NO のアンジオテンシン II 作用に与える影響

始めに、基礎状態における腎内 NOx 濃度は、皮質 ( $6.5 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ ,  $n=12$ ) に比し髄質 ( $9.0 \pm 0.5$

$\mu\text{mol/L}$ ,  $n=13$ ) で有意に大であった ( $p<0.01$ ; 第3図, 上段). 腎内 NO が基礎状態での腎微小循環に与える影響を検討するため、L-NAME ( $1 \text{ mg/kg}$ ) を投与したところ、表層部輸入・輸出細動脈は各々  $24 \pm 3\%$  ( $17.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$  から  $13.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ,  $p<0.05$ ,  $n=11$ ),  $23 \pm 3\%$  ( $16.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$  から  $12.3 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ,  $p<0.05$ ,



第3図 腎皮質表層部と髄質部の NOx 濃度と L-NAME による表層部ならびに傍髄質部細動脈径の変化。基礎状態における NOx 濃度は、表層部より傍髄質部の方が高値を示した (上段)。L-NAME の投与では、いずれの細動脈径も減少がみられた (下段)。\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  vs. 基礎値。φ $p<0.05$  皮質部 vs. 髄質部 (Matsuda H et al: Hypertens Res; 25 (6): 901-910, 2002 の Fig 3 を許可をえて一部改変後に転載)

第1表 アンジオテンシンII投与による全身ならびに腎血行動態の変化

|              | 平均血圧<br>(mmHg)     | 心拍数<br>(beats/min) | 腎血漿流量<br>(ml/min)  | 糸球体濾過量<br>(ml/min) | 濾過係数       |
|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| 基礎値 (n=17)   | 110±2              | 109±2              | 153±2              | 35±2               | 0.21±0.01  |
| 生理食塩水        | 110±3              | 109±3              | 153±3              | 35±2               | 0.21±0.01  |
| アンジオテンシンII   |                    |                    |                    |                    |            |
| 1 ng/kg/min  | 110±2              | 108±2              | 147±2              | 31±2               | 0.22±0.01  |
| 3 ng/kg/min  | 114±2              | 109±3              | 133±5**            | 31±3               | 0.26±0.02* |
| 10 ng/kg/min | 121±2*             | 110±2              | 117±5**            | 29±2               | 0.24±0.01* |
| 30 ng/kg/min | 136±3**            | 110±3              | 97±5**             | 21±2**             | 0.23±0.02* |
| 基礎値 (n=17)   |                    |                    |                    |                    |            |
| L-NAME       | 118±3 <sup>n</sup> | 99±5 <sup>n</sup>  | 123±4 <sup>n</sup> | 31±1               | 0.24±0.01  |
| アンジオテンシンII   |                    |                    |                    |                    |            |
| 1 ng/kg/min  | 121±2              | 100±5              | 107±4*             | 27±1               | 0.26±0.01  |
| 3 ng/kg/min  | 122±2              | 101±6              | 100±5*             | 23±3*              | 0.25±0.02  |
| 10 ng/kg/min | 130±2              | 103±7              | 89±5**             | 19±1**             | 0.25±0.01  |
| 30 ng/kg/min | 138±3**            | 108±6              | 80±5**             | 18±1**             | 0.23±0.01  |

L-NAME, nitro-L-arginine methylester

<sup>n</sup>, p<0.05 ; <sup>n</sup>, p<0.01 vs. 基礎値

<sup>\*</sup>, p<0.05 ; <sup>\*\*</sup>, p<0.01 vs. 生理食塩水あるいはL-NAME.

n=11)の収縮反応を示した(第3図, 下段)。\*傍髄質部の腎細動脈も収縮反応を示し, 輸入細動脈は, 17±2% (21.9±0.6 μm から 18.0±0.4 μm, p<0.05, n=13) 輸出細動脈は, 20±3% (19.6±0.5 μm から 15.6±0.5 μm, p<0.05, n=13)の収縮を示した。その程度は皮質表層部の細動脈より減弱傾向であった。

アンジオテンシンIIの経静脈投与は, 1ならびに3 ng/kg/分の用量では平均血圧に影響を与えなかったが, 10 ng/kg/分より上昇が見られ, 30 ng/kg/分では136±3 mmHg (p<0.05, n=17)へと上昇した(第1表)。腎血漿流量は, 3 ng/kg/分の用量より減少が見られ(p<0.01, n=17), 以後用量依存性に減少した。一方, 糸球体濾過率は, 10 ng/kg/分の投与量までは不変であったが, 30 ng/kg/分の投与量で有意に減少した。濾過係数は, 3 ng/kg/分より増加し, 以後高用量においても増加を維持した(p<0.05, 第1表)。

表層部糸球体の輸入細動脈径は, 1 ng/kg/分のアンジオテンシンIIにより17.2±0.7から10±3%減少し15.6±0.9 μm (p<0.05, n=15)となり, 30 ng/kg/分では49±5% (8.7±0.9 μm, p<0.01)の収縮を示した(第4図, 左)。同様に輸出細動脈も1 ng/kg/分の投与量で14±4%減少し15.8±0.5から13.2±0.6 μm (p<0.01, n=15)と血管径の減少を示し, 30 ng/kg/分では, 53±3% (7.5±0.3 μm, p<0.01)の収縮が認め

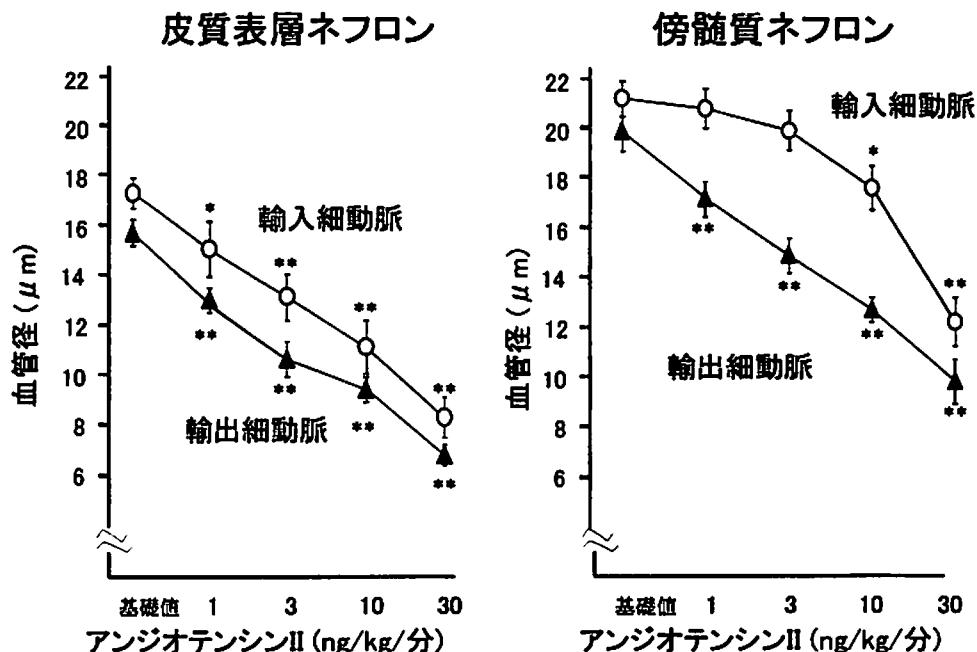
られた。いずれのアンジオテンシンIIの投与量においても, 輸入と輸出細動脈径との間に有意差を認めなかった。

傍髄質部の輸入, 輸出細動脈は, おおの21.1±0.7 μm (n=17), 19.5±0.5 μm (n=17)と, いずれも表層部の細動脈径より大であった(p<0.01)(第4図, 右)。1 ng/kg/分のアンジオテンシンIIにより, 輸出細動脈は, 11±4% (17.0±0.6 μm, p<0.01)の収縮がみられ, 30 ng/kg/分では52±3% (9.2±0.6 μm, p<0.05)まで収縮した。一方, 輸入細動脈は, 1ならびに3 ng/kg/分では有意の収縮を認めず, 10 ng/kg/分により17±4% (17.9±0.9 μm, p<0.05)の収縮を示した。30 ng/kg/分で, 44±4% (12.1±1.0 μm, p<0.05)となり輸出細動脈と同等になった。

アンジオテンシンII各投与量による腎各層におけるNOx濃度は, 髄質部では10 ng/kgで11±1.0 μmol/L (p<0.05, n=13)と有意に上昇したのに比し, 表層部では30 ng/kg/分で8.3±0.4 μmol/L (p<0.05, n=12)の上昇に留まった(第5図)。

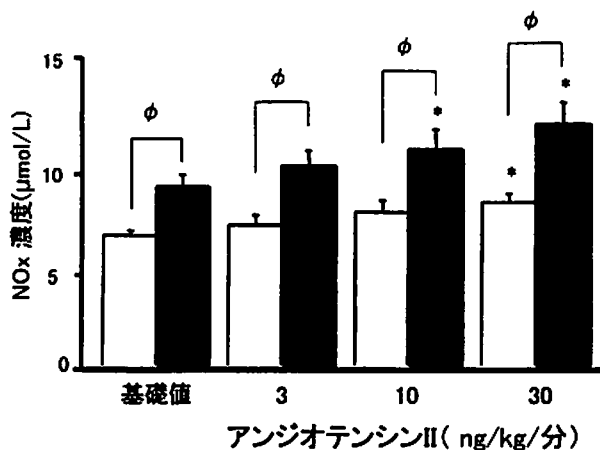
L-NAME存在下では, アンジオテンシンIIによる腎細動脈の収縮は増強したが, その程度は腎各層で異なっていた(第6図)。すなわち, 表層部輸入・輸出細動脈では, L-NAMEは1 ng/kg/分のアンジオテンシンII投与量でのみ収縮を増強した(p<0.05)。一方, 傍髄質





第4図 外因性アンジオテンシン II による腎微循環の反応。腎皮質表層部ネフロン (左図) では、輸入・輸出細動脈ともに同様の収縮反応を示した。一方、傍髄質部ネフロン (右図) では、輸出細動脈に比し輸入細動脈の反応が減弱していた。\*\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs. 基準値。(Matsuda H et al: Hypertens Res; 25 (6): 901-910, 2002 の Fig 1 の一部改変後, 許可をえて改変後転載)

部では、輸入細動脈で 1, 3, ならびに 10 ng/kg/分、輸出細動脈で 1 および 3 ng/kg/分のアンジオテンシン II 濃度で収縮の増強を認めた。

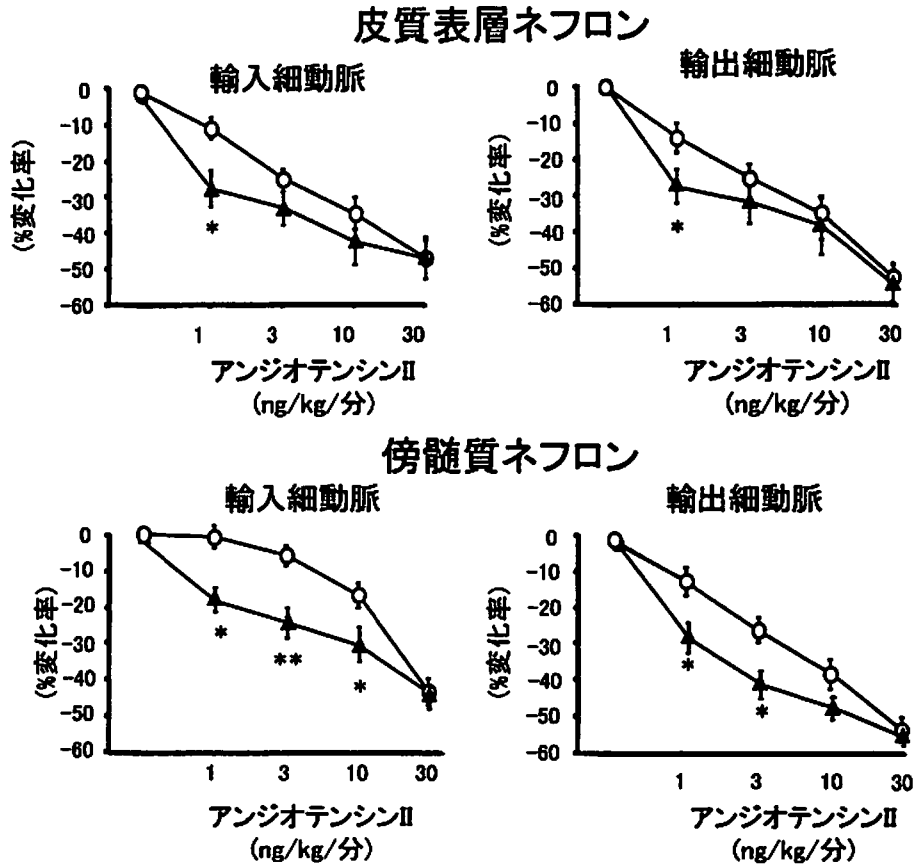


第5図 外因性のアンジオテンシン II による腎内一酸化窒素濃度の変化。皮質部 (□) に比べ傍髄質部 (■) は 10 ng/kg/min より一酸化窒素代謝物の増加がみられた。\* $p < 0.05$  vs. 基準値;  $\phi p < 0.05$  皮質部 vs. 傍髄質部 (Matsuda H et al: Hypertens Res; 25 (6): 901-910, 2002 の Fig 2 を許可をえて転載)

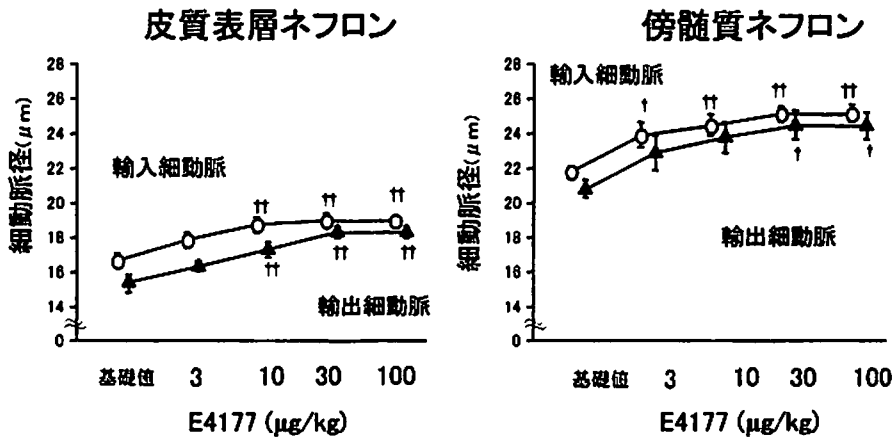
## 2. アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (E4177) の腎微循環作用

E4177 は、3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ならびに 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の投与量で平均血圧は、各々  $84 \pm 1$  から  $76 \pm 2$  mmHg ( $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) および  $72 \pm 2$  mmHg ( $p < 0.01$ ,  $n = 12$ ) へと下降したが、30 ならびに 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ではさらなる低下は認めなかった。同様に、腎血漿流量の変化も、3 ならびに 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の投与量でおおの 136  $\pm 3$  ml/分から 156  $\pm 3$  ml/分 ( $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) および 159  $\pm 6$  ml/分 ( $p < 0.01$ ,  $n = 12$ ) に増加し、以後 30 ならびに 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  で増加が持続した。

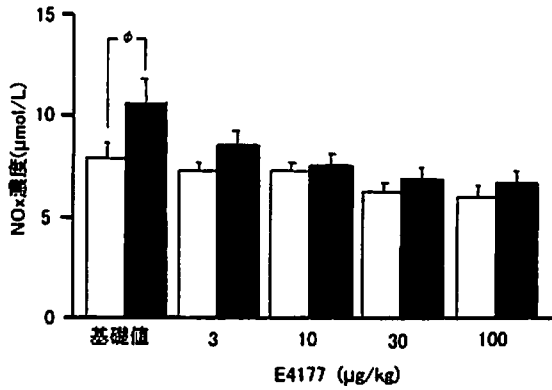
腎皮質表層部の腎細動脈は、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の E4177 の投与により、輸入細動脈は  $16.3 \pm 0.4$  から  $18.3 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) に、輸出細動脈も  $15.4 \pm 0.5$  から  $17.3 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) と拡張し、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  では各々  $18.6 \pm 0.2$   $\mu\text{m}$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 7$ ) ならびに  $18.3 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 7$ ) まで拡張した (第7図)。傍髄



第6図 アンジオテンシンII収縮における腎内一酸化窒素の役割. コントロール (○) に比べ、L-NAMEの前投与 (▲) により表層部 (上段) はアンジオテンシンIIの1 ng/kg/minで、傍髄質部 (下段) は輸入細動脈が1から10 ng/kg/minで、輸出細動脈が、1, 3 ng/kg/minで収縮は増強した. \*p<0.05; \*\*p<0.01vs. L-NAMEなし (Matsuda H et al : Hypertens Res ; 25 (6) : 901-910, 2002 の Fig 4 を許可をえて転載)



第7図 E4177投与による皮質部、髄質部の輸入、輸出細動脈の拡張反応. 表層部 (左図) は、輸入一輸出細動脈ともに10 µg/kgより拡張し、傍髄質部 (右図) は、ともに3 µg/kgより拡張した. †p<0.05; ††p<0.01 vs. 基準値. (Matsuda H et al : J Am Soc Nephrol. 10 (11) : 2272-2282, 1999 の Fig 4 を、許可をえて転載)

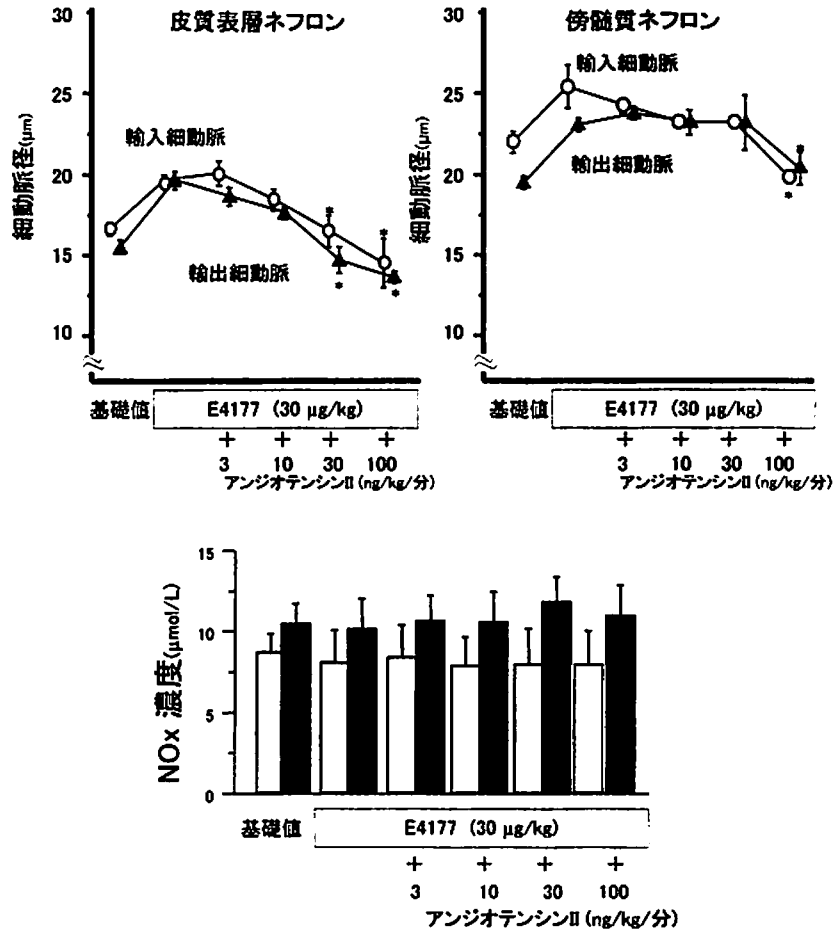


第8図 E4177 投与による皮質部、髄質部における一酸化窒素の反応。皮質部 (□)、髄質部 (■) とともに、一酸化窒素代謝物の増加はみられなかった。φp<0.05 皮質部 vs. 髄質部 (Matsuda H et al: J Am Soc Nephrol. 10 (11): 2272-2282, 1999 の Fig 9 を、許可をえて転載)

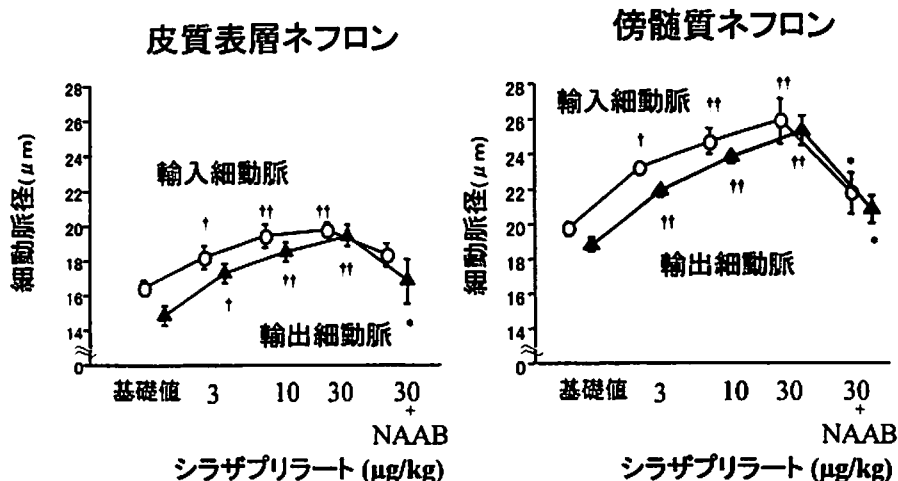
質部においても、3 μg/kg より輸入細動脈が  $21.8 \pm 0.3$  から  $23.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) に、輸出細動脈も 30 μg/kg より  $20.7 \pm 0.5$  から  $24.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) に拡張した。30 μg/kg 以上の投与ではさらなる拡張は認めなかった。

腎皮質部の NOx 濃度は、E4177 投与により影響を受けなかった (第8図)。髄質部 NOx 濃度は、E4177 により減少傾向を認めたが、有意でなかった。

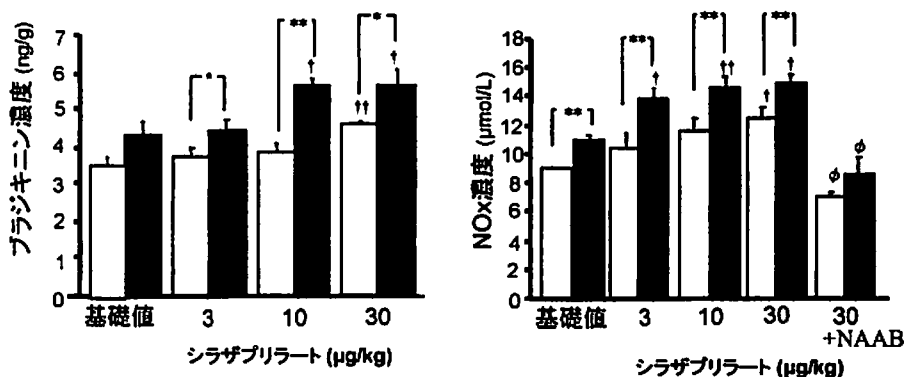
さらに、1型アンジオテンシン II 受容体遮断薬である E4177 投与後、アンジオテンシン II による細動脈の収縮反応の抑制の程度ならびに、腎微小透析法による腎実質の NO 産生を検討した。E4177 (30 μg/kg) の投与により表層部と傍髄質部ともに両細動脈を拡張させた。この条件下でアンジオテンシン II の投与は、表層部で



第9図 E4177 によるタイプ1レセプターブロックにおける外因性アンジオテンシン II の反応。皮質表層の両細動脈 (上段左) はアンジオテンシン II の 30 ng/kg/min で輸入細動脈 (○)、輸出細動脈 (▲) が収縮し、傍髄質部 (上段右) では 100 ng/kg/min でともに収縮した。また NOx 濃度 (下段) では、皮質部 (□)、髄質部 (■) とともに増加はみられなかった。\*p<0.05 vs. 基準値。



第10図 シラザプリラートによる表層部、傍髄質部における輸入細動脈と輸出細動脈の反応。シラザプリラートは輸入(○)、輸出細動脈(●)の両細動脈を表層、傍髄質部において拡張させた。その拡張反応はNAABで減弱した。†p<0.05; ††p<0.01 vs. 基準値。\*p<0.05 vs. シラザプリラート30 μg/kg。(Matsuda H et al : J Am Soc Nephrol. 10 (11) : 2272-2282, 1999のFig 4を、許可をえて転載)



第11図 シラザプリラートによる組織キニン濃度と一酸化窒素の変化。組織キニン(左図)は、シラザプリラート投与にともない10 μg/kgで髄質部(■)に、30 μg/kgで皮質部(□)に増加を認めた。また一酸化窒素代謝物(右図)は、3 μg/kgより髄質部(■)で30 μg/kgで皮質部(□)は増加した。†p<0.05; ††p<0.01 vs. 基準値。\*p<0.05 皮質部 vs. 髄質部。φp<0.05 シラザプリラート vs. シラザプリラート+NAAB (Matsuda H et al : J Am Soc Nephrol. 10 (11) : 2272-2282, 1999のFig 8を、許可をえて転載)

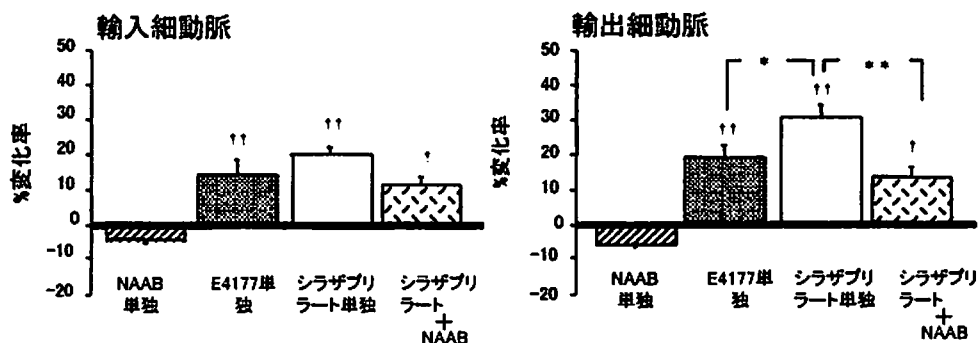
は、30 ng/kg/分で輸入細動脈が19.7±0.5から16.5±1.0 μm (p<0.05, n=7)に、輸出細動脈は19.5±0.6から14.4±0.8 μm (p<0.05, n=7)へと収縮した(第9図, 上段)。また、傍髄質部では、細動脈の収縮に100 ng/kg/分の投与量を要し、輸入細動脈、25.3±1.4から19.7±0.3 μm, (p<0.05, n=7)に、輸出細動脈、22.3±0.6から20.7±1.1 μm (p<0.005, n=7)となっ

た。このときの各層におけるNOx濃度は、表層部および、髄質部ともに変化はみられなかった(第9図, 下段)。

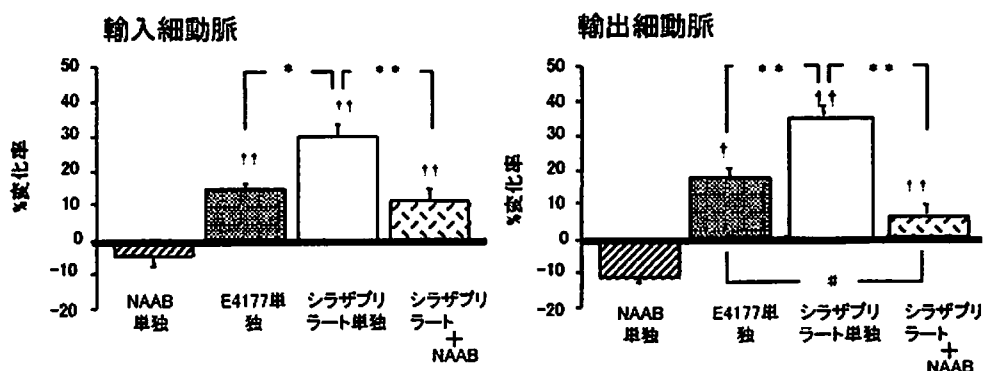
### 3. ACE阻害薬の腎微小循環作用

シラザプリラートは、10 μg/kgの投与量により平均血圧を85±1 mmHgから69±4 mmHg (p<0.01, n=11)へと低下させた。腎血漿流量は、3 μg/kgの投

### 皮質表層ネフロン



### 傍髄質ネフロン



第 12 図 単独 E4177 とシラザプリラート投与結果からの細動脈の拡張率の比較。NAAB 単独は拡張率の変化は認めなかった。表層部の輸入細動脈（上図左）では、E4177 とシラザプリラートの拡張率は同等であった。表層部輸出細動脈（上図右）、および傍髄質部の両細動脈（下段）の拡張率は、シラザプリラートのほうが有意に高く NAAB で減弱した。† $p < 0.05$ ; †† $p < 0.01$  vs. 基礎値。\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  シラザプリラート vs. E4177 あるいは NAAB 追加後。# $p < 0.05$  E4177 vs. シラザプリラート+NAAB. (Matsuda H et al: J Am Soc Nephrol. 10 (11): 2272-2282, 1999 の Fig 5 を、許可をえて転載)

与量により  $140 \pm 3$  から  $156 \pm 5$  ml/分 ( $p < 0.05$ ,  $n = 11$ ) に増加し、以後濃度依存性に増加し、 $30 \mu\text{g/kg}$  では  $171 \pm 2$  ml/分 ( $p < 0.01$ ,  $n = 11$ ) に達した。

シラザプリラートによる輸入、輸出細動脈反応の観察では、皮質表層糸球体は  $3 \mu\text{g/kg}$  より、輸入細動脈は  $16.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$  から  $18.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ )、輸出細動脈  $15.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$  から  $17.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) と拡張した (第 10 図)。さらに  $30 \mu\text{g/kg}$  では、輸出細動脈の拡張率は  $30 \pm 3\%$  ( $19.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) に達し、輸入細動脈  $20 \pm 2\%$  ( $19.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) より顕著であった ( $p < 0.05$ )。一方、傍髄質部の糸球体は、 $3 \mu\text{g/kg}$  のシラザプリラートにより、輸入細動脈は  $19.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$  から  $23.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) に、輸出細動脈も  $18.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$

から  $21.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) の拡張を示し、 $30 \mu\text{g/kg}$  では輸入は  $25.8 \pm 1.3 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) に、輸出細動脈は  $24.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) に拡張した。これらの輸入・輸出細動脈の拡張反応は NAAB の追加投与により減弱した。

腎組織ブラジキニン濃度は、髄質部は  $4.3 \pm 0.4 \text{ ng/g}$  ( $n = 13$ ) で、皮質部は  $3.6 \pm 0.3 \text{ ng/g}$  ( $n = 11$ ) であり差異を認めなかった (第 11 図, 左)。一方、シラザプリラートの投与により、髄質部では  $10 \mu\text{g/kg}$  の投与量で  $5.7 \pm 0.2 \text{ ng/g}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 13$ ) に上昇したが、皮質部では  $30 \mu\text{g/kg}$  になり  $4.6 \pm 0.1 \text{ ng/g}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 11$ ) に上昇した。いずれの腎ブラジキニン含有量もシラザプリラート投与により髄質部が皮質部を上回っていた。

第2表 アンジオテンシン受容体拮抗薬投与による全身ならびに腎血行動態の変化

| (n=7)          | 平均血圧<br>(mmHg) | 心拍数<br>(beats/min) | 腎血漿流量<br>(ml/min) | 糸球体濾過量<br>(ml/min) |
|----------------|----------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| 基礎値            | 84±1           | 115±5              | 133±4             | 27±1               |
| E4177          | 71±2'          | 104±6              | 159±2             | 34±2               |
| E4177+CLZ      | 70±3'          | 105±6              | 175±5**           | 32±3               |
| E4177+CLZ+NAAB | 73±2'          | 100±2              | 153±4'            | 31±2               |

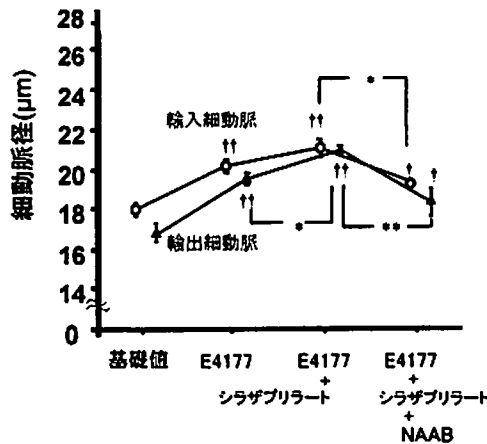
NAAB, (N<sub>ε</sub>-adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>, Thi<sup>5,6</sup>-D-Phe<sup>7</sup>]-bradykinin; CLZ, cilazaprilat. ', p<0.05 vs. 基礎値; ", p<0.01 vs. 基礎値; \*, p<0.05 vs. E4177

シラザプリラートによる腎髄質部組織の NO<sub>x</sub> 濃度は、3 μg/kg より有意に上昇し、以後用量依存性の増加を認め 30 μg/kg では、15.1 ± 0.7 nmol/L (p<0.01, n=14) に達した (第 11 図, 右)。一方、皮質部では 30 μg/kg になって 12.5 ± 0.9 nmol/L (p<0.05, n=12) と有意に上昇した。これらの変化は、NAAB (0.5 nmol/kg/分) の追加投与により消失した。

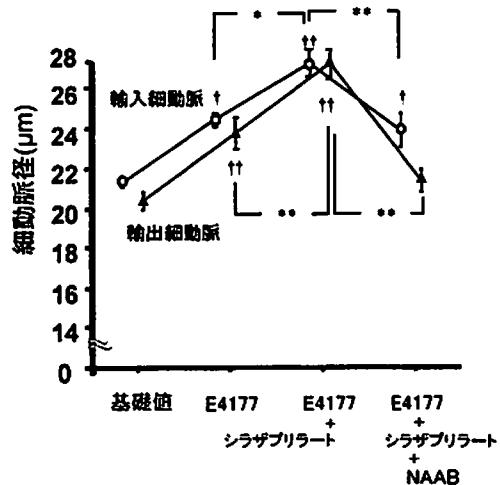
そこで、各 E4177, シラザプリラート単剤使用による拡張反応を拡張率から再評価した (第 12 図)。NAAB (0.5 nmol/kg/分) の単独投与では、平均血圧ならびに腎血漿流量は不変であり、腎微小循環においても、皮質表層部、傍髄質部の輸入・輸出細動脈径の有意

な変化は認めなかった。皮質表層部ではシラザプリラート (30 μg/kg) による拡張率は、輸入細動脈では E4177 (30 μg/kg) と同等であったが (シラザプリラート, 20 ± 2%; E4177, 15 ± 4%; p>0.2), 輸出細動脈ではシラザプリラートの作用が上回っていた (30 ± 3% vs. 19 ± 3%, p<0.05)。傍髄質部においてもシラザプリラートによる拡張率は E4177 に比し、輸入細動脈 (31 ± 4% vs. 16 ± 1%, p<0.05), 輸出細動脈 (35 ± 3% vs. 18 ± 3%, p<0.005) とともに大であった。これらの拡張率の増強を認めた細動脈において、シラザプリラート存在下における NAAB の投与は、拡張反応の減弱をきたし、E4177 による拡張の程度と同程度にまで低下した

皮質表層ネフロン



傍髄質ネフロン



第 13 図 E4177 の前投与下でのシラザプリラートの拡張反応について、E4177 の 30 μg/kg 前投与下で、シラザプリラート 30 μg/kg は表層部の輸出細動脈 (左図▲)、傍髄質部の輸入 (右図○)、輸出細動脈 (右図▲) をさらに拡張をさせた。その拡張は、NAAB の使用により消失した。† p<0.05; †† p<0.01 vs. 基準値。\* p<0.05; \*\* p<0.01 E4177 + シラザプリラート vs. E4177 単独、あるいは NAAB 追加後。(Matsuda H et al: J Am Soc Nephrol. 10 (11): 2272-2282, 1999 の Fig 6 を、許可をえて改変後転載)

(皮質表層輸出細動脈,  $13 \pm 3\%$ ; 傍髄質輸入細動脈,  $12 \pm 4\%$ ; 傍髄質輸出細動脈,  $73\%$ ).

#### 4. ACE 阻害薬のキニン増強作用

拡張率の差より E4177 ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) 存在下におけるシラザプリラート ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) の全身ならびに腎循環作用を検討した。シラザプリラートの追加投与では、さらなる降圧を認めなかったが、腎血漿流量は有意の増加を示した ( $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ; 第 2 表)。その際の腎微小循環の反応は、皮質表層部の輸入細動脈 ( $18.6 \pm 0.3$  から  $19.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$  ( $n = 8$ )) では有意な拡張を示さなかったが、皮質表層輸出細動脈 ( $18.3 \pm 0.3$  から  $19.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ )、傍髄質部輸入細動脈 ( $25.1 \pm 0.4$  から  $28.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 8$ )、傍髄質輸出細動脈 ( $24.4 \pm 0.7$  から  $28.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 8$ ) ではさらなる拡張を認めた (第 13 図)。これらの拡張は、NAAB の投与により、E4177 投与時のレベルまで減弱した。

## 考 察

本研究は、ニードル型 CCD カメラ探子を生体腎に穿刺し直接腎細動脈の観察を可能とした手法を用い、アンジオテンシン II の腎微小循環作用ならびに腎内 NO との関連を検討した。著者の研究グループは、すでにこの実験システムを用いて腎皮質表層部細動脈のアンジオテンシン II に対する反応を直接可視しうることを報告し<sup>26)</sup>、さらに腎微小循環調節に必須の構成成分である尿細管-糸球体フィードバック機構が保持されていることを示した<sup>26)</sup>。したがって、細動脈の単離などの人為的な操作を加えることなく、また細動脈周囲の環境を保持したままの状態で、生体内における細動脈の反応を観察可能である。さらに、本実験システムは、従来の観察手法では困難であった腎皮質表層部ならびに傍髄質部の糸球体・細動脈の反応性の評価を、同一実験条件下で観察が可能である点においてもきわめて有用であると考えられた<sup>25, 27)</sup>。

この実験システムを活用し、本研究では基礎状態における腎内 NO の腎微小循環への寄与を検討し、つぎに外因性アンジオテンシン II の腎細動脈に対する反応性を評価した。その結果、腎内 NO は、基礎状態で腎細動脈の血管緊張を調節しており、その関与は、輸入・輸出細動脈間ではほぼ同等であった (第 3 図)。以前の単離腎ならびに単離微小細動脈を用いた研究での報告では、NO は輸入・輸出細動脈に対してほぼ同等の寄与<sup>9)</sup>、あるいは輸入細動脈優位の関与 (11) が示唆されていた

が、これらの結果の差異は、実験条件に依存する可能性が考えられた。さらに、傍髄質・皮質表層部ネフロン間の比較では、有意ではないものの NO 合成阻害に対し傍髄質部細動脈が抵抗性である傾向が認められた。この結果は、髄質部の腎 NO 濃度が皮質に比し高値であることと関連すると推測された。

アンジオテンシン II に対する反応では、輸入・輸出細動脈はともに収縮反応を示し (第 4 図)、その反応は全身血圧に影響を与えない投与量においても認められた。さらに、その作用は腎臓内で産生された NO により修飾され、とくに傍髄質部で大きいことが明らかとなった (第 6 図)。すなわち、L-NAME による NO 合成阻害によりアンジオテンシン II による収縮がすべての細動脈において増強することより、腎臓内で産生された NO が腎血流量を温存させる役割をはたすが、その作用は傍髄質部細動脈で大きかった。さらに、腎微小透析法を用いた腎各層における NO 産生量の差異 (第 5 図) は、Zou ら<sup>19)</sup>の成績と一致し、皮質に比し髄質部で高値であったが、腎皮質内において髄質により近い傍髄質部の細動脈が、皮質表層部に比しより強く NO の影響を受ける結果、腎各層による細動脈反応の不均一性をもたらすことが推察された。この結果は、傍髄質部の輸出細動脈が髄質血流を供給するとする腎微小循環の特性を考慮すると、脱水などの病態時に認められる皮質から髄質への腎血流の再分布<sup>31, 32)</sup>の機序を一部アンジオテンシン II が担っているものと考えられた。

一方、傍髄質部の輸入細動脈は、輸出細動脈に比しアンジオテンシン II による収縮反応が減弱しており、その現象は L-NAME の存在下においても認められた (第 4, 6 図)。すなわち、傍髄質部の輸入・輸出細動脈の間で認められた反応性の差異は、NO に起因するものではないことが示された。この点に関して、著者ら<sup>27)</sup>は、インドメサシンによるプロスタグランジン合成抑制下で、傍髄質部のアンジオテンシン II による輸入・輸出細動脈作用の差異が消失することを見出しており、この部位における細動脈反応性の差異に血管拡張性のプロスタグランジンが関与することを示した。したがって、アンジオテンシン II による腎微小循環に及ぼす影響は、アンジオテンシン II 自体による収縮作用と、アンジオテンシン II により活性化された各ネフロンの存在部位の周囲の液性因子環境との相互作用により決定され、とくに後者の影響が傍髄質ネフロンの血管反応性に強く影響を与えることが示唆された。

本研究は、さらに内因性のアンジオテンシン II の腎血行動態に与える役割を検討した。腎臓では、組織アンジ

オテンシン II が血液中よりも高濃度で存在しており<sup>3, 4)</sup>, 組織レニン-アンジオテンシン系が腎局所で何らかの役割を担っていることが推察されている。そこで, アンジオテンシン II 受容体拮抗薬である E4177 を投与したところ, 傍髄質, 皮質表層部ともに輸入・輸出細動脈がほぼ同程度に拡張することが示された(第7, 12図)。その際, アンジオテンシン II 受容体遮断は, 腎 NO 産生に対して有意な影響を与えなかった(第8図)。すなわち, 外因性のアンジオテンシン II の収縮反応では NO の産生が皮質表層部, 髄質部に層差を示し, それと平行して各々の層における細動脈の反応差を生じたのに対し, 内因性アンジオテンシン II 作用の拮抗では, 層差は生じないという結果が得られた。これらの結果より, 本実験の基礎状態では, 内因性アンジオテンシン II は NO 産生刺激とならないことを示唆するものと考えられた。この点に関して, 近年アンジオテンシン II 受容体拮抗薬が NO 産生をもたらすことが指摘されており<sup>8, 33, 34)</sup>, その機序としてアンジオテンシン I 型受容体の遮断により, 遊離したアンジオテンシン II が 2 型受容体の刺激となり, NO 産生をもたらすと推測されている<sup>6, 34)</sup>。しかしながら, E4177 の 1 型/2 型受容体拮抗作用の選択性は高く<sup>35)</sup>, E4177 存在下でのアンジオテンシン II の投与によっても NO 産生が起こらなかったことは(第9図)。本研究システムにおいて 2 型受容体を介する NO 産生機序の活性はきわめて弱いものと考えられた。単離輸入細動脈における検討でも, アンジオテンシン II 作用に NO が関連するもの<sup>11)</sup>, この機序にアンジオテンシン II の 2 型受容体は関与しないことが報告されており<sup>36)</sup>, 本研究結果と矛盾しないものと思われた。

内因性アンジオテンシン II の作用を遮断する手法として, 従来より ACE 阻害薬が用いられている。ACE 阻害薬は, アンジオテンシン I から II への変換を阻害し, その結果アンジオテンシン II 産生を抑制するが, ACE の分子構造上同時にキナーゼ活性を有するため<sup>30)</sup>, ACE 阻害薬によりブラジキニンの蓄積が生じ, それに伴い NO 産生が刺激されることが明らかにされている<sup>37, 38)</sup>。腎臓における検討でも, リシノプリルによる腎血漿流量の増加が NO 合成阻害薬により抑制されることより, ACE 阻害薬の腎血流量増加作用に NO が関与することが示唆されている<sup>37)</sup>。しかしながら, ACE 阻害薬により産生されたブラジキニンならびに NO が, 腎微小循環, とくに皮質表層部・傍髄質部のおおの部位において, 細動脈に与える影響は検討されていない。そこで, 本研究は, 腎各層のネフロンにおける ACE 阻害薬の作用にブラジキニンならびに NO が関与するか

否かを, 生体内 CCD カメラを用いて, アンジオテンシン II 受容体拮抗薬との比較を行った。その結果, ACE 阻害薬もアンジオテンシン II 受容体拮抗薬と同様に, 各層の輸入・輸出細動脈を拡張させたが(第10図), その程度は, 傍髄質輸入・輸出細動脈ならびに皮質輸出細動脈で有意にアンジオテンシン II 受容体拮抗薬による拡張作用を上回っていた(第12図)。さらに, アンジオテンシン II 受容体拮抗薬(E4177)の存在下でシラザプリラートを投与したところ, 全身血圧の変動は認めずに(第2表), 上記の細動脈で追加拡張が観察された(第13図)。これらの増強したあるいは追加拡張反応は, ブラジキニン受容体(B2)拮抗薬である NAAB により抑制された。したがって, 基礎状態の腎臓に対し NAAB は細動脈径に影響を与えないことを考慮すると(第12図), ACE 阻害薬によって増加したブラジキニンが腎細動脈拡張作用に寄与すると考えられた。実際, 腎組織ブラジキニン濃度は, シラザプリラートの投与量依存性に増加し, それとともに腎 NO 濃度も上昇を示した(第11図)。さらに, ACE 阻害薬により増加した NO がブラジキニン受容体(B2)拮抗薬により減少したことをあわせると, ACE 阻害薬はアンジオテンシン II 産生抑制作用のみならず, ブラジキニンによる NO 産生を促し, 細動脈拡張作用をもたらすものと考えられた。これらの結果は, ACE 阻害薬により増加したブラジキニンが腎髄質乳頭部血流の増加を促すとする報告<sup>38, 39)</sup>に矛盾しない所見であった。

本研究で注目すべき点は ACE 阻害薬によるブラジキニンならびに NO の細動脈拡張作用の様式が, 傍髄質部と皮質表層部とで異なった反応を示したことである。すなわち, ACE 阻害薬投与に伴うブラジキニンによる拡張が, 傍髄質部では輸入・輸出細動脈ともに見られるのに対し, 皮質表層部では輸出細動脈にのみ観察された(第12図)。これに関して, Edwards ら<sup>40)</sup>は腎単離輸入・輸出細動脈を用いて, キニンによる細動脈拡張作用は輸出細動脈にのみ認められることを報告し, さらに Kon ら<sup>41)</sup>も, 腎微小穿刺法により ACE 阻害薬による亢進したキニン活性が皮質表層部輸出細動脈を選択的に拡張させることを示した。これらの一見矛盾する結果の原因は明らかでないが, 腎各層におけるキニン濃度と関連する可能性が考えられた。すなわち, ブラジキニンは輸出細動脈拡張を主体とするが, 高濃度のキニン下では輸入細動脈も拡張しうるものと推察された。一方, Thomas ら<sup>42)</sup>は腎微小穿刺法を用いて, ブラジキニンの腎動脈投与が輸入細動脈優位であるものの両細動脈の拡張が見られると報告しているが, この現象は深層部ネフロンに限



定される可能性を示唆した。したがって、ACE 阻害薬に対する反応性の差異は、輸入・輸出細動脈固有の反応性の差異とともに、傍髄質・皮質表層といった細動脈周囲の環境因子によっても決定される可能性が示唆された。

腎臓内におけるアンジオテンシン II 産生系は、ACE を介する経路のみならず、キマーゼを代表とする他の経路も存在することが示唆されている<sup>43)</sup>。キマーゼは ACE と同様にアンジオテンシン I から II への変換に関与し、心不全などの病態でキマーゼ活性が亢進すると報告されている<sup>44)</sup>。しかしながら、Murakami<sup>45)</sup>は、イヌの腎臓において、ACE を介さない非 ACE の経路でのみアンジオテンシン II に変換されるアンジオテンシン I 基質である[Pro<sup>11</sup>, D-Ala<sup>12</sup>]-アンジオテンシン I を用い、非 ACE 経路を介するアンジオテンシン II 産生は ACE 経路の約 10 分の 1 程度の関与であると結論している。本研究結果も、ACE 阻害薬の腎血行動態作用が、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬のそれよりも大であったことより、非 ACE 経路によるアンジオテンシン II 産生系が亢進しているとの結果は得られなかった。しかしながら、IgA 腎症<sup>46)</sup>や虚血腎<sup>47)</sup>などで、その役割が大きいとの報告があり、腎障害を伴う場合のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬と ACE 阻害薬の有用性の優劣に関しては明らかでない。この点に関して、著者ら<sup>48)</sup>は、慢性腎障害患者におけるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬ならびに ACE 阻害薬の尿蛋白減少効果と尿中 NO<sub>x</sub> 排泄量におよぼす影響を検討した。その結果、投与後 6 ヶ月までは同等の降圧効果にも関わらず、ACE 阻害薬群の尿蛋白減少効果が有意に大であり、それと平行して尿中 NO<sub>x</sub> の増加を認めた。したがって、すくなくとも ACE 阻害薬投与の早期には、キニン作用に伴う NO が誘導され蛋白尿減少作用と関連し、キマーゼなどの非 ACE 経路の関与は少ないと推察された。

最後に、本研究で用いた生体内ニードル型 CCD カメラによる微小循環研究における有用性について言及したい。本実験システムは、従来の研究システムでは行うことが困難であった生体内における腎深部の傍髄質部ネフロンと表層部ネフロンの評価を、同一条件下でしかも比較的侵襲的に行うことを可能にした。一般に、臓器循環は、大動脈から分岐した血管が臓器入口部から徐々に血管径を狭小化しながら細動脈、毛細血管となり、再び体循環へと帰還するが、とくに実質臓器である腎臓や心臓では表層部と深層部とで微小循環の様相が異なることが示唆されている<sup>25, 27, 29, 49)</sup>。すなわち、心臓では心拍に伴う心循環の反応が、心外膜直下と心内膜下とで異なることが指摘されていたが<sup>29)</sup>、近年、肥大心で両層にお

ける細動脈が異なる反応を示すことが、本研究で用いられた生体内 CCD カメラにより明らかにされた<sup>49)</sup>。同様に、腎において、傍髄質部と皮質表層部ネフロンとで機能ならびに細動脈の構造が異なり、また当該部における灌流圧も異なることより、微小循環における多様性が推定されていた。したがって、本研究システムの特徴を生かして、腎内における微小循環の多様性とその部位における機能解析の研究が発展するものと考えられる。

## 総 括

腎臓内局所微小循環を直接評価が可能であるニードル型生体内 CCD カメラを用いて、腎細動脈血管緊張に与えるアンジオテンシン II ならびに腎内 NO の関連を検討し、以下の結果を得た。

1. ニードル型生体内 CCD カメラにより、細動脈ならびに血管の存在する周囲の環境を損ねることなく、腎皮質表層部ならびに傍髄質部ネフロンの観察が可能であった。
2. 腎内 NO は基礎状態における腎細動脈血管緊張の調節を行ない、さらに外因性アンジオテンシン II による輸入・輸出細動脈収縮を傍髄質部ネフロン優位に抑制した。
3. アンジオテンシン受容体拮抗薬を用いた内因性アンジオテンシン作用の抑制により、皮質表層部ならびに傍髄質部の輸入・輸出細動脈はともに同等の拡張反応を示した。この拡張反応に、腎内 NO 関与は認めなかった。
4. ACE 阻害薬の投与により、腎内ブラジキニンならびに NO 活性が亢進し、この反応はとくに髄質で大であった。
5. ACE 阻害薬を用いたアンジオテンシン II 作用の抑制はアンジオテンシン受容体拮抗薬に比し、傍髄質部輸入・輸出細動脈ではともに大であった。一方、皮質表層部輸出細動脈では過大反応を示したが、皮質表層部輸入細動脈ではアンジオテンシン受容体拮抗薬による反応と同等であった。これらの過大反応に腎内ブラジキニンならびに NO による拡張作用が関与していた。

以上の結果より、腎微小循環は、従来から指摘されていた輸入・輸出細動脈自体の反応性の差異のみならず、細動脈の存在する層の液性因子の環境によっても影響を受け、これらの因子がアンジオテンシン II やアンジオテンシン変換酵素阻害薬といったホルモンや薬剤の作用を修飾するものと考えられた。この層による反応性の多様性は、皮質表層部や傍髄質部ネフロンの機能に影響を与える可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、懇切な御指導と御校閲を賜りました。慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深く感謝いたします。また、本研究に際して直接御指導いただきました。慶應義塾大学医学部内科学教室林晃一講師に心より感謝します。さらに、本研究に多大の御協力と御助言をいただきました研究室員各位、本実験システムの開発・改良にあたり岡山大学大学院医歯学総合研究科・医学部システム循環生理学講座梶谷文彦教授・名古屋大学大学院泌尿器科教室山本徳則講師に感謝します。なお、本論文の要旨の一部は、第40回日本腎臓学会総会(新潟, 1997年)、第41回日本腎臓学会総会(東京, 1998年)、および第30回アメリカ腎臓学会(1998年, フィラデルフィア)において発表した。

文 献

- 1) Peart WS : Renin-angiotensin system. *N Engl J Med* 292 : 302-306, 1975
- 2) Hollenberg NK, Swartz SL, Passan DR, Williams GH : Increased glomerular filtration rate after converting-enzyme inhibition in essential hypertension. *N Engl J Med* 301 : 9-12, 1979
- 3) Siragy HM, Howell NL, Ragsdale NV, Carey RM : Renal interstitial fluid angiotensin. Modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion, and renin inhibition. *Hypertension* 25 : 1021-1024, 1995
- 4) Navar LG, Imig JD, Zou L, Wang CT : Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol* 17 : 412-422, 1997
- 5) Kimura K, Inokuchi S, Sugaya T, Suzuki N, Yoneda H, Shirato I, Mise N, Oba S, Miyashita K, Tojo A, Hirata Y, Goto A, Sakai T, Murakami K, Omata M : Location and action of angiotensin II type 1 receptor in the renal microcirculation. *Kidney Int Suppl* 63 : S201-S204, 1997
- 6) Zhuo J, Dean R, Maric C, Aldred PG, Harris P, Alcorn D, Mendelsohn FA : Localization and interactions of vasoactive peptide receptors in renomedullary interstitial cells of the kidney. *Kidney Int Suppl* 67 : S22-S28, 1998
- 7) Hayashi K, Loutzenhiser R, Epstein M, Suzuki H, Saruta T : Multiple factors contribute to acetylcholine-induced renal afferent arteriolar vasodilation during myogenic and norepinephrine- and KCl-induced vasoconstriction. Studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Circ Res* 75 : 821-828, 1994
- 8) Siragy HM, Carey RM : The subtype 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100 : 264-269, 1997
- 9) Ikenaga H, Fallet RW, Carmines PK : Basal nitric oxide production curtails arteriolar vasoconstrictor responses to ANG II in rat kidney. *Am J Physiol* 271 : F365-F373, 1996
- 10) Carmines PK, Navar LG : Disparate effects of Ca channel blockade on afferent and efferent arteriolar responses to ANG II. *Am J Physiol* 256 : F1015-F1020, 1989
- 11) Ito S, Arima S, Ren YL, Juncos LA, Carretero OA : Endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide modulates angiotensin II action in the isolated microperfused rabbit afferent but not efferent arteriole. *J Clin Invest* 91 : 2012-2019, 1993
- 12) Takenaka T, Suzuki H, Fujiwara K, Kanno Y, Ohno Y, Hayashi K, Nagahama T, Saruta T : Cellular mechanisms mediating rat renal microvascular constriction by angiotensin II. *J Clin Invest* 100 : 2107-2114, 1997
- 13) Nagahama T, Hayashi K, Ozawa Y, Takenaka T, Saruta T : Role of protein kinase C in angiotensin II-induced constriction of renal microvasculature. *Kidney Int* 57 : 215-223 ; 2000
- 14) Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD : The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329 : 1456-1462, 1993
- 15) Mann JF, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S : Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril : the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med* 134 : 629-636, 2001
- 16) Brenner BM, Cooper ME, De Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S : Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345 : 861-869, 2001
- 17) Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I, Collaborative Study Group : Renoprotective effect of angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345 : 851-860, 2001
- 18) Ulfendahl HR, Wolgast M : Renal circulation and lymphatics (Chapter 30). In the *Kidney : Physiology and Pathophysiology*, eds by Seldin DW & Giebisch G, Raven Press Ltd, New York, 1992, pp 1017-pp 1047
- 19) Zou AP, Cowley AW, Jr. : Nitric oxide in renal cortex and medulla. An *in vivo* microdialysis study. *Hypertension* 29 : 194-198, 1997
- 20) Zou AP, Wu F, Cowley AW, Jr. : Protective effect of angiotensin II-induced increase in nitric oxide in the renal medullary circulation. *Hypertension* 31 : 271-276, 1997

- 21) Madrid MI, Garcia-Salom M, Tornel J, De Gasparo M, Fenoy FJ : Interactions between nitric oxide and angiotensin II on renal cortical and papillary blood flow. *Hypertension* 30 : 1175-1182, 1997
- 22) Baylis C, Brenner BM : Modulation by prostaglandin synthesis inhibitors of the action of exogenous angiotensin II on glomerular ultrafiltration in the rat. *Circ Res* 1978 ; 43 : 889-898.
- 23) Casellas D, Carmines PK, Navar LG : Microvascular reactivity of *in vitro* blood perfused juxtamedullary nephrons from rats. *Kidney Int* 28 : 752-729, 1985
- 24) Edwards RM : Segmental effects of norepinephrine and angiotensin II on isolated renal microvessels. *Am J Physiol* 244 : F526-F534, 1983
- 25) Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Naitoh M, Kubota E, Honda M, Matsumoto A, Suzuki H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T : Zonal heterogeneity in action of angiotensin-converting enzyme inhibitor on renal microcirculation : role of intrarenal bradykinin. *J Am Soc Nephrol* 10 : 2272-2282, 1999
- 26) Yamamoto T, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Tanaka H, Ogasawara Y, Nakamoto H, Suzuki H, Saruta T, Kajiya F : In vivo visualization of angiotensin II- and tubuloglomerular feedback-mediated renal vasoconstriction. *Kidney Int* 60 : 364-369, 2001
- 27) Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Kubota E, Honda M, Tokuyama H, Suzuki H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T : Distinct modulation of superficial and juxtamedullary arterioles by prostaglandin *in vivo*. *Hypertens Res* 25 : 901-910, 2002
- 28) Ohta K, Araki N, Shibata M, Hamada J, Komatsumoto S, Shimazu K, Fukuuchi Y : A novel *in vivo* assay system for consecutive measurement of brain nitric oxide production combined with the microdialysis technique. *Neurosci Lett* 176 : 165-168, 1994
- 29) Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, Yamamori S, Ohno K, Hosaka H, Kajiya F : In vivo observation of subendocardial microvessels of the beating porcine heart using a needle-probe videomicroscope with a CCD camera. *Circ Res* 72 : 939-946, 1993
- 30) Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F : Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II) . Studies with bradykinin and other natural peptides *J Biol Chem* 268 : 9496-503, 1993
- 31) Hope A, Tyssebotn I : The effect of water deprivation on local renal blood flow and filtration in the laboratory rat. *Circ Shock* 11 : 175-186, 1983
- 32) Kundel H L, Schlakman B, Joseph PM, Fishman JE, Summers R : Water content and NMR relaxation time gradients in the rabbit kidney. *Invest Radiol* 21 : 12-17, 1986
- 33) Munoz-Garcia R, Maeso R, Rodrigo E, Navarro J, Ruilope LM, Casal MC, Cachofeiro V, Lahera V : Acute renal excretory actions of losartan in spontaneously hypertensive rats : role of AT2 receptors, prostaglandins, kinins and nitric oxide. *J Hypertens* 13 : 1779-1784, 1995
- 34) Siragy HM, Carey RM : Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 33 : 1237-1242, 1999
- 35) Okunishi H, Song K, Oka Y, Kobayashi T, Kawamoto T, Ishihara H, Mori N, Miyazaki M : In vitro pharmacology of a novel non-peptide angiotensin II-receptor antagonist, E4177. *Jpn J Pharmacol* 62 : 239-244, 1993
- 36) Arima S, Endo Y, Yaoita H, Omata K, Ogawa S, Tsunoda K, Abe M, Takeuchi K, Abe K, Ito S : Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 100 : 2816-2823, 1997
- 37) Hajj-Ali AF, Zimmerman BG : Nitric oxide participation in renal hemodynamic effect of angiotensin converting enzyme inhibitor lisinopril. *Eur J Pharmacol* 212 : 279-281, 1992
- 38) Mattson DL, Cowley AW, Jr. : Kinin actions on renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension* 21 : 961-965, 1993
- 39) Fenoy FJ, Scicli G, Carretero O, Roman RJ : Effect of an angiotensin II and a kinin receptor antagonist on the renal hemodynamic response to captopril. *Hypertension* 17 : 1038-1044, 1991
- 40) Edwards RM : Response of isolated renal arterioles to acetylcholine, dopamine, and bradykinin. *Am J Physiol* 248 : F183-F189, 1985
- 41) Kon V, Fogo A, Ichikawa I : Bradykinin causes selective efferent arteriolar dilation during angiotensin I converting enzyme inhibition. *Kidney Int* 44 : 545-550, 1993
- 42) Thomas CE, Bell PD, Navar LG : Influence of bradykinin and papaverine on renal and glomerular hemodynamics in dogs. *Ren Physiol* 5 : 197-205, 1982
- 43) Urata H, Strobel F, Ganten D : Widespread tissue distribution of human chymase. *J Hypertens Suppl* 12 : S17-S22, 1994
- 44) Su X, Wei CC, Machida N, Bishop SP, Hanks GH, Dillon RA, Oparil S, Dell'Italia LJ : Differential expression of angiotensin-converting enzyme and chymase in dogs with chronic mitral regurgitation. *J Mol Cell Cardiol* 31 : 1033-1045, 1999
- 45) Murakami M, Matsuda H, Kubota E, Wakino S, Honda M, Hayashi K, Saruta T : Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int Suppl* 63 : S132-S135, 1997
- 46) Ehara T, Shigematsu H : Contribution of mast cells to the tubulointerstitial lesions in IgA nephritis.

- Kidney Int 54 : 1675-1683, 1998
- 47) Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, Wakino S, Saruta T : Differential regulation of elevated renal angiotensin II in chronic renal ischemia. Hypertension 40 : 34-40, 2002
- 48) Matsuda H, Hayashi K, Saruta T : Distinct time courses of renal protective action of angiotensin receptor antagonists and ACE inhibitors in chronic renal disease. J Hum Hypertens 17 : 271-276, 2003
- 49) Yada T, Goto M, Hiramatsu O, Tachibana H, Toyota E, Nakamoto H, Ogasawara Y, Matsuda H, Arakawa K, Hayashi K, Suzuki H, Kajiya F : In vivo visualization of subendocardial arteriolar response in renovascular hypertensive hearts. Am J Physiol 284 : H1785-H1792, 2003
-

学位論文

網膜における NO, CO 生成系を介した  
可溶性グアニル酸シクラーゼの調節

慶應義塾大学医学部眼科学教室

(指導: 小口芳久教授)

しも やま まさる  
下 山 勝

(平成 15 年 12 月 12 日受付)

Key Words : soluble guanylate cyclase, carbon monoxide, nitric oxide, retina

可溶性グアニル酸シクラーゼ (以下 sGC) は、血管内皮細胞や神経組織など多くの組織において cyclic GMP (以下 cGMP) 依存性のシグナル伝達装置として重要な役割を果たしており生物界に広く分布する酵素である<sup>1-4)</sup>。sGC は $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖二つのサブユニットからなるヘテロダイマーで構成され、一酸化窒素 (以下 NO) や一酸化炭素 (以下 CO) などのガス状モノオキシドと結合することによって活性化される。両鎖の C 末端側は、共にアデニル酸シクラーゼと相同性が高いアミノ酸配列をもっており、GTP を cGMP に変える触媒部位と考えられている。一方、 $\beta$ 鎖の N 末端側にはヘム結合部位があり、ガスメディエーターによる酵素活性の調節部位となっている。 $\beta$ 鎖のヒスチジン残基 (105-His) がヘム鉄の第 5 配位子と考えられており、sGC は休止状態においては 2 価のヘム鉄を有している。NO がこのヘム鉄に結合するとヘム鉄を引っ張り上げる効果により対側軸配位子であるヒスチジン残基との結合が切断されシクラーゼ部位が活性化される。CO も NO と同様にヘム鉄に結合し sGC を活性化させるが、*in vitro* におけるその効果は NO に比べはるかに弱いとされている<sup>5-7)</sup>。

*in vivo* において、NO 依存性の sGC 活性化に CO が調節的な役割を果たしているのか否か多くの議論がある。抗血小板薬である YC-1 が CO による sGC 活性化を 100 倍程度増強させるとの報告があるが、生体内においても未知の内因性低分子リガンドが CO による酵素活性化においてアロステリック効果を起こしている可能性が

ある<sup>8)</sup>。これまで神経型 NO 合成酵素 (以下 nNOS) や CO 生成酵素であるヘムオキシゲナーゼ (以下 HO) などガス産生酵素が欠損したノックアウトマウスを用いた実験において、CO は NO と協調して sGC を活性化することが報告されている<sup>9-11)</sup>。一方、*in vitro* の実験において CO が NO による sGC 活性化に対して抑制的に働いているという報告もある<sup>12)</sup>。このように CO による cGMP の調節については不明な点が多く残されている。

神経組織における cGMP の生成部位については、その単クローン抗体を用いた免疫組織学的手法により調べた報告がある<sup>13, 14)</sup>。しかし、cGMP の局在は sGC による調節のみならず NO や CO の調節を受けない膜結合型のグアニル酸シクラーゼ (以下 pGC) やホスホジエステラーゼ (以下 PDE) の働きによっても影響を受けている。このように生体内における NO や CO などのガス生成系を介した sGC の調節機構は、その臓器内局在や *in vivo* における酵素自身へのアロステリック効果の有無に関して未解決な問題が多く残されている。

本研究では、ラット網膜組織を用いて sGC の局在を免疫組織学的に調べるとともに、*in vivo* においてガス生成系に影響を与える薬剤を用いてその生成系を調節し、sGC の活性化に伴う構造変化を認識できるモノクローナル抗体を用いて網膜組織での NO, CO による sGC の活性化状態を調べた。内因性ガスによる sGC 活性化機構において、CO と NO の相互作用を調べることを目的とした。

この論文は Kajimura M, Shimoyama M, et al : Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in the rat retina. The FASEB Journal express article 2003 ; 10.1096/fj.02-0359fje. published online の一部を含む。

## 対象および方法

### 1. 動物および網膜組織採取方法

以下の実験動物の取り扱い、慶應義塾大学医学部の動物実験ガイドラインに従った。雄の Sprague-Dawley rats (体重 280~350 g, 埼玉実験動物供給所) に sodium pentobarbital (50 mg/kg) を腹腔下注射し麻酔を行った。灌流固定するために胸腔を開き、右心房を切開した後に左心室に 18G 針を刺入し、リン酸緩衝液 (以下 PBS) を注入して血液を洗い流し、4%パラホルムアルデヒドを用いて 10 分間灌流固定を行った。眼球組織切片作成時のオリエンテーションのために眼球摘出時に絹糸にて眼球背部側にマーキングを行った。摘出した眼球は角膜輪部後方にて切開し、角膜・水晶体を含む前部と、強膜・網膜を含む後部組織とに 2 分割した。分離した後部組織に含まれる硝子体をセッシンにて注意深く除去した後、網膜組織を水上にてさらに 1 時間、4%パラホルムアルデヒド固定を行った。固定後、6%、12%、18%、24%、30% ショ糖溶液に段階的に浸しクライオプロテクションを行い、OCT compound (Miles Laboratories, Elkhart, IN) で包埋した。クライオスタットにて耳側一鼻側の方向で視神経を含むように厚さ 12 μm の網膜切片を作成した。

### 2. 抗 sGC 抗体の特徴と免疫染色方法

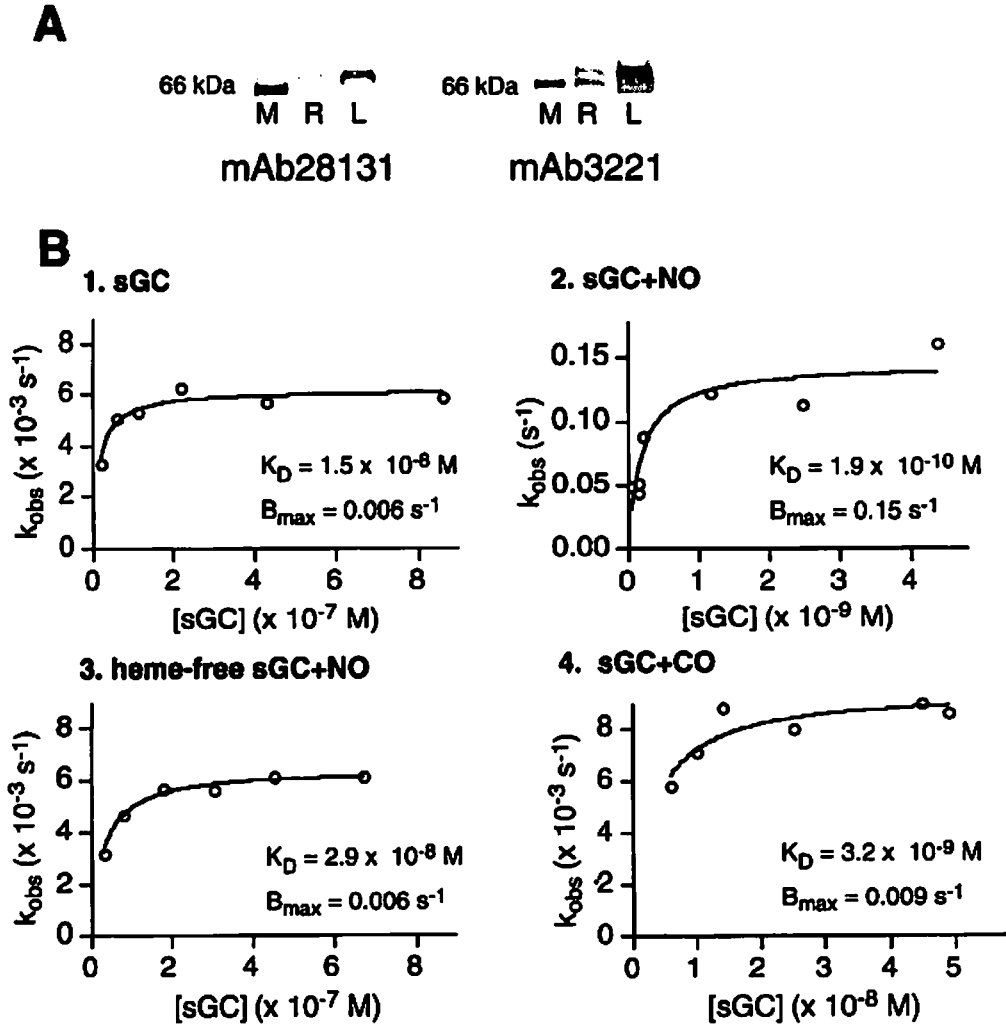
抗 sGC 抗体は、Tsuyama らの報告した抗ウシ sGC モノクローナル抗体 mAb28131 と mAb3221 を用いた<sup>15)</sup>。これらの抗体と精製 sGC との親和性を、resonant mirror biosensor (IASys, Fisons Applied Sensor Technology, Cambridge, UK) を用いて調べた。速度定数 ( $K_{on}$ ) はコンピュータープログラム (Fast Fit, Fisons) により求めた。解離定数と最高結合分子数をそれぞれ  $K_d$ 、 $B_{max}$  で表すと、速度定数  $K_{on}$  と sGC 濃度  $[sGC]$  の関係は  $K_{on} = B_{max} \cdot [sGC] / (K_d + [sGC])$  で表すことができる。この二つの係数  $K_d$  と  $B_{max}$  は、interacting curve fitting program (Igor Pro 3.12, Wave-Metrics, Oregon) により求めた。これらのシステムを用いて、NO および CO 存在下におけるモノクローナル抗体と sGC の親和性の変化を調べた。酵素活性における補欠分子ヘムの関与を調べるために必要に応じてウシ sGC からヘムを除去した。NO または CO 溶解液は過去の報告に基づいて作成した<sup>16)</sup>。NO 溶解液は NO を窒素飽和 PBS 溶液中でバブリングして溶解し、必要な濃度に希釈した。過去の報告<sup>15)</sup> や後述の第 1 図で示すように、mAb3221 は NO の作用により sGC に対する親和性が

増加したが、mAb28131 ではこの変化はみられなかった。

網膜組織における sGC 活性の変化をみるために、これらのモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。凍結切片を 2% 正常ウマ血清/PBS 中で 30 分間インキュベートした後に、mAb28131, mAb3221 をそれぞれ 50 μg/ml, 30 μg/ml の濃度で反応させた。これらの抗体は 1% ウシ血清アルブミン、0.1% TritonX-100 を含む PBS (以下 PBST) で溶解し 4°C で一晩反応させた。これらの 1 次抗体を洗浄後、切片は 2 次抗体 biotinylated anti-mouse Ig-G (Vecstain Elite ABC kit; Vector Laboratories Inc.) で 30 分間、室温にてインキュベートした。内因性ペルオキシダーゼ活性は 0.3%  $H_2O_2$  処理にてブロックした。洗浄後、abidin-biotin HRP で 30 分間インキュベートし、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (0.2mg/ml) にて発色を行った。sGC の免疫染色における発色時間については 11 分間に固定した。ネガティブコントロールとしては非特異的マウス免疫グロブリン (nonimmune mouse IgG) を使用した。発色後、20%ホルマリン/PBS で 20 分間再固定し、PBS で洗浄後、4%メチルグリーン (E.Merck, Darmstadt, Germany) にて核染色を行った。

網膜におけるガス生成系酵素の発現についても同様に免疫染色を行った。CO 生成系酵素である HO については、抗ラット HO-1, HO-2 モノクローナル抗体である GTS-1, GTS-2 をそれぞれ使用した<sup>17, 18)</sup>。抗 nNOS 抗体および抗内皮型 NOS (以下 eNOS) 抗体は、それぞれ抗ラット nNOS, eNOS モノクローナル抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) を使用した。さらに、ビリルビン IX $\alpha$  (以下 BRIX $\alpha$ ) を認識する抗体として、モノクローナル抗体 24G7 を使用した<sup>19, 20)</sup>。BRIX $\alpha$  は、HO の特異的な分解産物であるビリベルジン IX $\alpha$  がビリベルジン還元酵素により還元されたものである。24G7 抗体陽性反応を、生体内において HO によるヘム分解と CO 生成が行われていたことの傍証とした<sup>19)</sup>。

ラット網膜組織から蛋白サンプルを集め、これらモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。HO は小胞体に存在するため HO-1, HO-2 に対してはマイクロソーム分画を、sGC については可溶性分画を電気泳動用に用意した。脾臓と精巣から用意したマイクロソーム分画はそれぞれ HO-1, HO-2 のポジティブコントロールとして使用した。sGC のポジティブコントロールとしては肺組織の可溶性分画を用いた。



第1図 抗ウシ sGC 抗体の特徴。A：ラット網膜の可溶性分画と sGC モノクローナル抗体 mAb28131, mAb3221 との反応。mAb28131 と mAb3221 の双方とも免疫反応が認められる。mAb28131 では 76kDa に有意なバンドを認める。mAb3221 においては更に sGC の  $\alpha$  鎖に相当する 66-68kDa にもバンドを認める。M：分子量マーカー、R：網膜、L：肺。B：IASys resonant mirror biosensor による mAb3221 と sGC の結合定数の決定。sGC のそれぞれの濃度における速度定数  $K_{obs}$  を Fast Fit プログラムを用いて調べた。sGC 濃度に対する  $K_{obs}$  の結合曲線は次の式に適合させた。 $K_{obs} = B_{max} [sGC] / (K_D + [sGC])$ 。  $B_{max}$  と  $K_D$  の二つの係数は interacting fitting program により求めた。(1) sGC と mAb3221 との相互作用。(2) NO 存在下での sGC と mAb3221 との相互作用。(3) NO 存在下におけるヘムフリー sGC と mAb3221 との相互作用。(4) CO 存在下での sGC と mAb3221 との相互作用。(Kajimura M, Shimoyama M, et al：FASEB J express article：10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003 の第1図を、許可を得て転載)

3. レーザー共焦点顕微鏡による sGC 発現細胞の同定  
 sGC と HO の発現細胞を同定するためにレーザー共焦点顕微鏡を用いて免疫二重染色を行った。抗体として抗ヒト carbonic anhydrase II 抗体 (以下 CAII 抗体)、CAH-II (1：1000；Serotec Ltd., Oxford, UK) と抗ウ

シ protein kinase C (以下 PKC)  $\alpha$  抗体、MC5 (1  $\mu$ g/ml；Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) を PBST で溶解し、4  $^{\circ}$ C で一晚網膜切片と反応させた。抗 CAII 抗体と抗 PKC $\alpha$  抗体はそれぞれミユラー細胞とオン型双極細胞のマーカーとして知られている<sup>13, 21-23)</sup>。

PBST と PBS にて数回洗浄の後、室温にて 60 分間二次抗体を作用させた。二次抗体は、CAII に対してはフィコエリスリン (以下 PE) で標識したロバ抗ヒツジ IgG 抗体 (1 : 400 ; Chemicon International, Inc., Temecula, CA) を、PKC $\alpha$  に対しては PE 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1 : 400 ; Leinco Technologies, Inc., Ballwin, MO) を用いた。二重染色用に sGC 抗体 (mAb28131) をフルオレセインイソチアネート (以下 FITC) で標識した (50  $\mu$ g/ml ; 持田蛋白精製工業, 群馬), Nikon Diaphot 300 倒位型蛍光顕微鏡 (油浸対物レンズ ; 開口数 1.4, 60 $\times$ Nikon PlanApo oil) にアルゴンレーザー (Omnichrome, Carlsbad, CA) を用いたレーザー共焦点システム, line-scan laser confocal imager (Insight/TMD300 ; Meridian Instruments, Inc., Okemos, MI) を取り付け、切片の共焦点画像を観察した。励起波長 488 nm のアルゴンレーザー光落射下に intensified charge-coupled device color video camera (C5810 ; 浜松ホトニクス, 浜松) を通して FITC と PE を同時に可視化して観察した<sup>17, 24)</sup>。

#### 4. In vivo 網膜における NO, CO 生成系への薬剤刺激

In vivo における sGC 活性の変化を免疫組織学的に捕らえるため、NO や CO 生成に影響を及ぼす薬剤を投与し、mAb28131 と mAb3221 による染色性の変化を観察した。麻酔下でラットの大腿静脈にカテーテルを挿入し、滅菌 PBS で希釈した薬剤を 1 ml, 約 60 秒かけて投与した。コントロール群のラットには同様の方法で基剤を投与した。薬剤投与後に胸腔を開き心臓から灌流固定を行った。薬剤は、L-および D-アルギニン 70  $\mu$ mol/kg body wt., N<sup>o</sup>-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (以下 L-NAME) 85  $\mu$ mol/kg body wt.を用いた。L-アルギニンは NO 合成酵素の基質であり、L-NAME はその競合阻害剤である。HO に対する競合阻害剤として亜鉛プロトポルフィリン IX (以下 ZnPP) を、阻害効果をもたない銅プロトポルフィリン IX (以下 CuPP) をコントロールとして使用した<sup>18)</sup>。これらの使用濃度は 86 nmol/kg body wt. とした。

#### 5. 網膜組織における sGC 免疫組織活性の半定量的解析

薬剤投与群の各グループ間における mAb28131 と mAb3221 の免疫反応の違いを形態学的に解析するため、網膜の連続切片を用意し、それぞれの抗体を作用させた後 avidin-biotin HRP 反応を用いて染色し半定量的解

析を行った。1つの切片において3つの視野 (幅 325  $\mu$ m) を写真に記録した。3つの観察視野は、視神経乳頭から上方、下方それぞれ 200  $\mu$ m 離れた部位と、上方 600  $\mu$ m 離れた部位である。3つの切片から合計 9 視野をエクリプス E600 顕微鏡 (Nikon, 40 $\times$ Nikon Plan Fluor 対物レンズ, 開口数 0.75) を用いて Nikon FDX-35 カメラで撮影した。視野絞りは 0.6 とし、露出時間は Nikon U-III Multi-point sensor system によりコントロールした。

網膜細胞層における sGC 活性の部位特異的变化を評価するために二つのプロトコールを施行した。最初に mAb28131 と mAb3221 の顕微鏡写真をデジタル化してコンピューターに取り込み (Image 1.62/Macintosh G3, Sankei Inc., 東京), 染色性の強さを 256 段階のグレイスケールに換算した。それぞれの画像において、神経線維層 (optic-fiber layer, 以下 OpFL), 内網状層 (inner plexiform layer, 以下 IPL) そして外境界膜 (external limiting membrane, 以下 ELM) の 3 ヶ所でグレイレベルを測定した。これらの層ではメチルグリーンで染色された核が存在しないため、取り込んで換算されたグレイレベルは sGC の免疫反応を反映しているものと考えられた。さらに、神経線維層の内側はミュラー細胞の足突起と神経線維を含んでいるが、双極細胞の神経突起は含んでいない。これに対して内顆粒層はミュラー細胞や双極細胞の細胞体を含んでいる。このように、それぞれの層における染色性の変化を比較することにより、どの細胞が sGC 活性化に関与しているかを調べた。組織の存在しない部位をグレイレベルの背景 ( $G_{BG}$ ) とした。それぞれの層において少なくとも 20 ヶ所の異なる部位の値からグレイレベルの平均値を求めた。測定した値からこの  $G_{BG}$  を差し引くことにより部位特異的な免疫反応の強さを決定した。OpFL, IPL そして ELM の 3 層でそれぞれ  $G_{OpFL}$ ,  $G_{IPL}$ ,  $G_{ELM}$  を求めた。4~8 回の別々の実験から得られた  $G_{OpFL}$ ,  $G_{IPL}$ ,  $G_{ELM}$  の平均値をそれぞれ比較した。

次に、内顆粒層 (inner nuclear layer, 以下 INL) においてはメチルグリーンによる核染色のためグレイレベルを用いた染色性強度の解析はできず、sGC 陽性細胞密度の違いをグループ間で比較することにした。この層には、双極細胞、アマクリン細胞、ミュラー細胞など幾つかの異なった種類の細胞体が存在している。細胞体全周の 4 分の 3 以上がリング状に染色されている細胞を陽性細胞としてカウントした。それぞれのサンプルにおいて幅 150  $\mu$ m の異なった 18 ヶ所の領域を選び陽性細胞数の平均値を求めた。解剖学的な部位による差が生じ



ないように、切片は常に耳側-鼻側を含む面で視神経乳頭が中心にくるように作成した。INLの厚さの平均は $33 \pm 2 \mu\text{m}$ で、この研究に用いた眼球はどれもほぼ同じサイズの大きさであった。これらのことからINLに存在する総細胞数がグループ間で似通っていて、細胞の割合も似ていると考えられた。よって内顆粒層の総細胞数は求めずに陽性細胞数をカウントすることにより免疫反応の強さを比較検討することにした。

## 6. sGC活性化に対するCOとNOの相互作用

NOによるsGC活性化に対するCOの影響を調べるため、ウシ肺から精製したsGCを用いて産生されたcGMPをenzyme-linked immunosorbent assay (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて測定した<sup>16)</sup>。反応液は、5 mM MgCl<sub>2</sub>、3 mM dithiothreitol、1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、1 mM GTP、2.5 nM sGCを含む40 mM TEA-HCL buffer (pH7.4)を用いた。酵素は37°Cで10分間反応させ、30%の酢酸を総量1 mlになるように加えて反応を止めた。NO供与体としてS-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン（以下SNAP）、(Inter Medical, 東京)を用い、pH7.4のPBSで実験30分前に調整した。濃度を調整したCO溶液は過去の報告に基づいて作成し酵素反応に対する効果を調べた<sup>16, 25)</sup>。

## 7. 統計処理

測定値から平均値±標準偏差を求め、群間の分散検定をANOVAを用いて解析し、平均値の差の検定をFisher's multiple comparison testを用いて行った。P<0.05をもって統計学的有意差とした。

# 結 果

## 1. mAb3221のsGCに対する親和性の検討

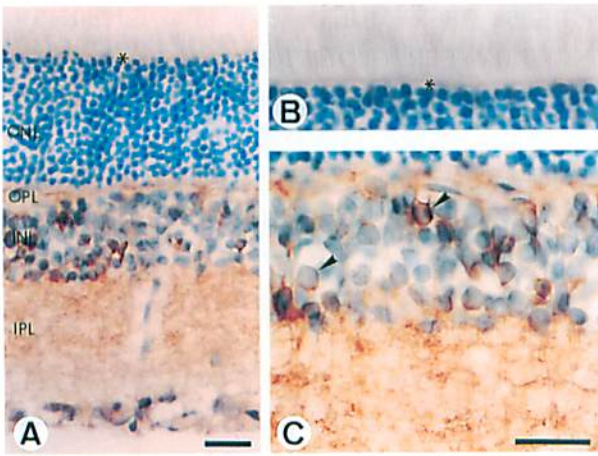
第1図に抗ウシsGC抗体mAb3221とmAb28131の特徴を示した。Panel Aのごとくウェスタンブロット解析で、両抗体はラット網膜組織に免疫陽性反応を示すが、両者は違ったパターンを示している。mAb28131は76kDaに主要なバンドを1つ示している。これはsGCのβ鎖に対する反応を示している。これに対し、mAb3221は76kDaの他に66-68kDaと2つの陽性バンドを認める。これは、サンプルの蛋白質を調整した後でもα鎖とβ鎖の両方に反応することを示している<sup>15)</sup>。ペプチドマッピング解析の結果、mAb3221の認識に関与するエピトープは、α鎖の

S361-K368 (SSRVMDLK) とβ鎖のG128-K151 (GKGLILHYYSEREGLODIVIGIHK)であった<sup>15)</sup>。

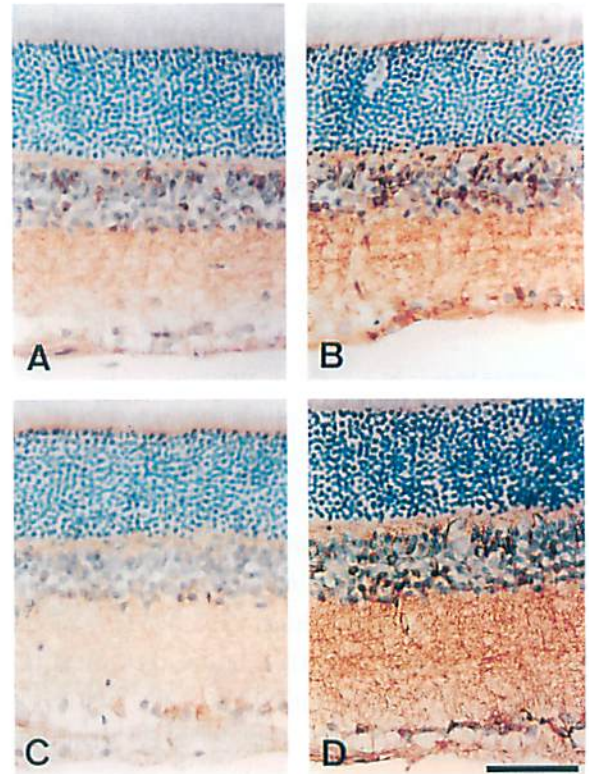
以上のことからmAb3221はsGC蛋白の二つのサブユニットによって決定される特異的な蛋白構造を認識している可能性が示唆された。sGC酵素とmAb3221との反応を定量化するため、精製したsGCと固相化したmAb3221を用いてバイオセンサーテクノロジーを用いて解析した。第1図のPanel Bは、0.05-860 nMのsGC濃度に対する結合分子数 $K_{obs}$ を示している。解離定数 $K_d$ と最大結合値 $B_{max}$ はNOもCOも存在しないコントロール状態では、 $K_d$ は $1.5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $B_{max}$ は $0.006 \text{s}^{-1}$ であった(Part 1)。充分なNO存在下では $B_{max}$ は $0.15 \text{s}^{-1}$ と著明に上昇し、 $K_d$ 値は $1.9 \times 10^{-9} \text{M}$ と2桁減少した(Part 2)。このことはmAb3221のsGCに対する親和性は、NO存在下にて増大することを示している。ヘムを除去したsGCにおいてはNOによる明らかな結合能上昇は認められなかった(Part 3)。このことはNOによる抗体の結合能増加が、sGCの補欠分子であるヘムとNOとの反応に伴うコンフォメーション変化を反映していることを示している。COの添加にてもsGCに対するmAbの親和性が増したが、 $K_d$ は $3.2 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $B_{max}$ は $0.009 \text{s}^{-1}$ であり、その強さはNOに比して弱かった。これらの結果は、NOとCOとでは構造変化を引き起こす強さに違いはあるが、これらガスモノオキシドがヘムに結合することによって活性化した時のsGCの蛋白構造変化を伴うエピトープをmAb3221が認識していることを示唆している。ZnPPやCuPPそのものが結合能に与える変化についても調べたが、これらによって解離定数の変化は認められなかった。一方mAb28131においては、これらのガス分子による親和性の変化を認めなかった<sup>15)</sup>。

## 2. 網膜におけるsGC発現細胞の同定

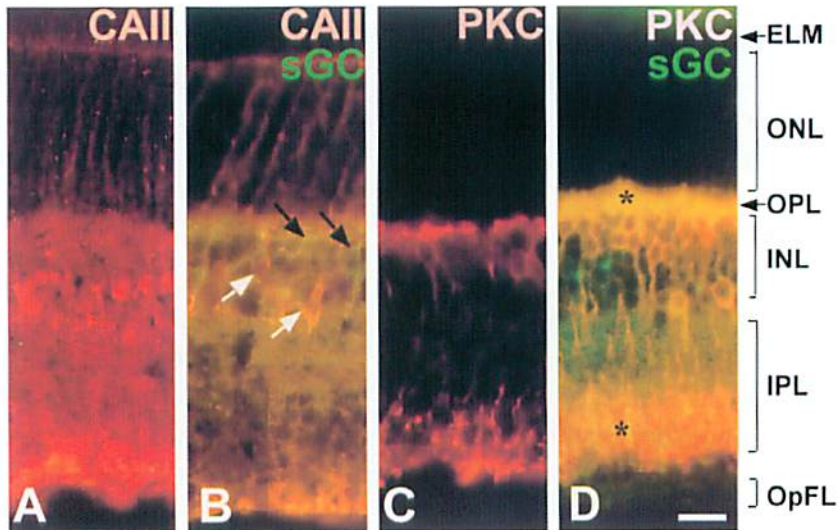
第2図は、β鎖のみを認識するmAb28131抗体を用いた染色によりsGCの分布を示したものである。陽性細胞はELMからOpFLまでの幾つかの層にまたがって認められる(Panel A)。これに対し視細胞の細胞体の存在する外顆粒層(outer nuclear layer, 以下ONL)にはほとんど反応が見られなかった。Panel Bにみられるようにミュラー細胞の微絨毛が視細胞内節と接着帯を形成しているELM部位に免疫反応陽性を示した。INLには細胞体を取り囲まれるように強陽性に染色される細胞を認めた。経静脈的に過剰なL-NAMEを投与した場合においても、mAb28131の染色性の変化は認められなかった。



第2図 ラット網膜におけるsGC免疫染色. A: mAb28131抗体による染色. 外網状層 (OPL), 内顆粒層 (INL), 内網状層 (IPL) に陽性所見を認める. ONL: 外顆粒層. B: 外境界膜 (ELM) の強拡大所見. C: OPL, INL, IPLにおける強拡大所見. INLにおいて細胞体を囲むように強陽性の細胞体が認められる (矢印). \*: ELM. スケールバーは A, B, Cともに 20  $\mu$ m. (Kajimura M, Shimoyama M, et al: FASEB J express article: 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003 の第2図を, 許可を得て転載)



第4図 NOおよびCO産生系を変化させた時のsGCの染色性変化. mAb3221による染色. A: 基剤を用いたコントロール. B: L-アルギニン投与. OPL, INL, IPL, ELMにおいて染色性が増している. C: L-NAME投与. OPL, INL, IPLにおいて染色性の減弱がみられる. D: ZnPP投与. L-アルギニン投与の時と同様に染色性の増強がみられる. スケールバーは 20  $\mu$ m. (Kajimura M, Shimoyama M, et al: FASEB J express article: 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003 の第4図を, 許可を得て転載)



第3図 ラット網膜におけるsGCの局在. A: carbonic anhydrase II (CAII)による染色. ELMからOpFLにまでCAIIの染色性が見られる. B: CAII (赤)とsGC (緑)の二重染色. 両者が共に存在する細胞ではオレンジ色~黄色に染色されている (白矢印). CAIIが存在しないsGC陽性細胞は緑色の細胞として観察される (黒矢印). C: PKC $\alpha$ による染色. オン型双極細胞が赤く染色され, 神経節細胞層の近くの分葉状終末から外網状層OPLまで突起を伸ばしている. D: PKC $\alpha$ とsGCとの二重染色. 外網状層にある幾つかの双極細胞の細胞体が両者に染色され黄色を呈している. スケールバーは 20  $\mu$ m. (Kajimura M, Shimoyama M, et al: FASEB J express article: 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003 の第3図を, 許可を得て転載)

網膜に存在する細胞を特異的に染色するマーカーと mAb28131 抗体との二重染色を行うことにより、どの細胞が sGC 発現に関与しているか調べた。第 3 図の Panel A にミュラー細胞の特異的マーカーである CAII の染色性を示した。解剖学的にミュラー細胞の分布と一致して OpFL から ELM まで染色されているのが確認された。Panel B に sGC と CAII の染色をそれぞれ緑と赤で二重染色したものを示した。多くの細胞が、sGC と CAII の両者に反応し、ミュラー細胞の突起がオレンジ色の発色を呈している。しかしながら、INL に小さいがいくつもの細胞が緑色に染色されている。これはミュラー細胞以外にも sGC 陽性細胞が存在することを示している。それらの細胞を特定するために、オン型双極細胞のマーカーである PKC $\alpha$  抗体を用いて mAb28131 との二重染色を試みた。第 3 図の Panel C に示すように、PKC $\alpha$  の染色性はオン型双極細胞の解剖学的局在と一致して神経節細胞に接する小葉状の終末から視細胞とのシナプスを形成する外網状層 (outer plexiform layer, 以下 OPL) にまでの細胞が染色されていた。Panel D に sGC と PKC $\alpha$  の二重染色を示す。幾つかの細胞が sGC と PKC $\alpha$  とに二重染色されるが、はっきりと緑色に単染色されている細胞は IPL, INL から OpFL まで分布しており、Panel B のごとくミュラー細胞の発現を示していると思われる。以上のことから、ラット網膜における主要な sGC 発現細胞は、ミュラー細胞とオン型双極細胞とであることが確認された。

### 3. mAb3221 抗体を用いた網膜 sGC 活性化の識別

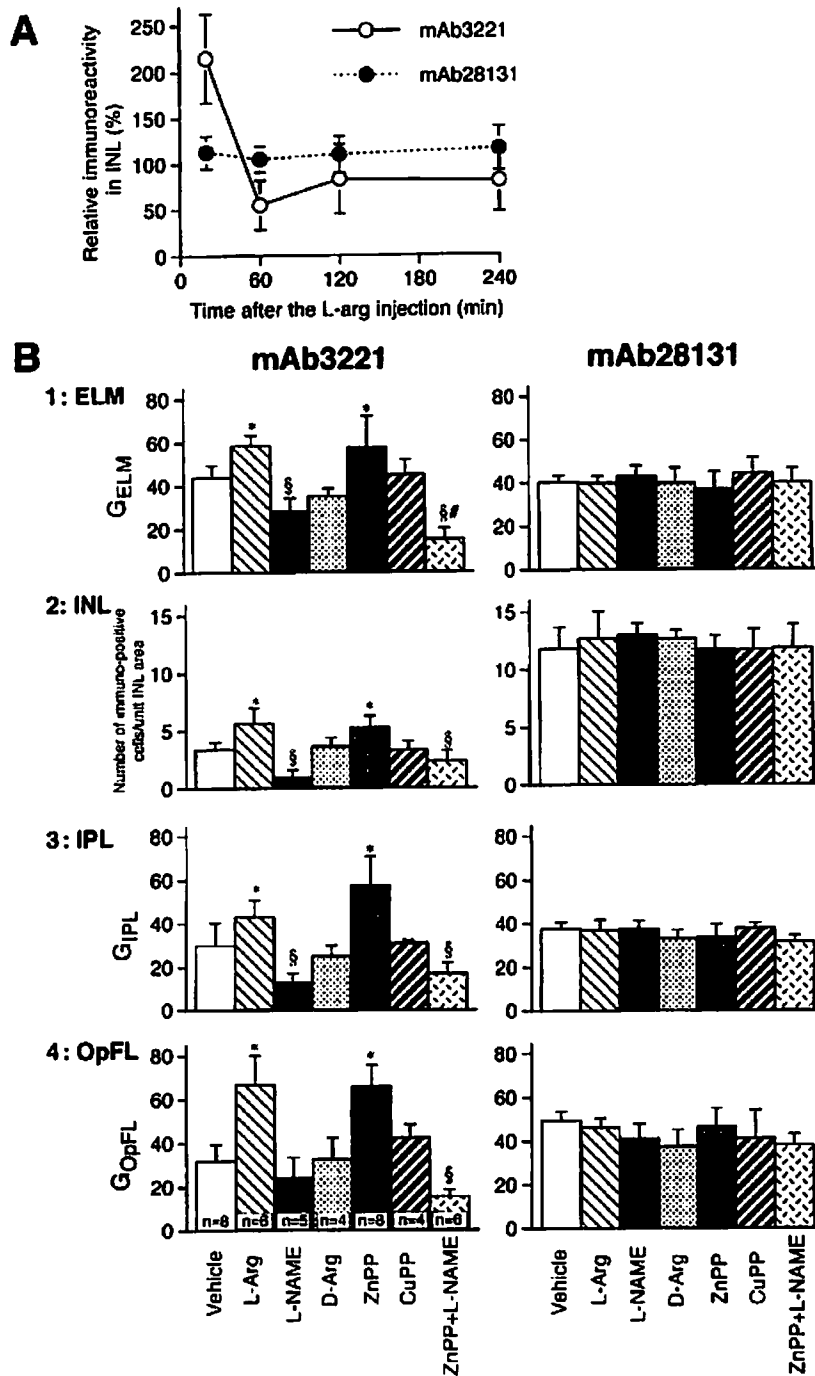
第 1 図に示したように mAb3221 は sGC の活性化による蛋白構造変化を認識することができる。様々な条件下で生体内の sGC 活性を変化させ、網膜切片を mAb3221 で免疫染色することにより sGC 活性化の状態を視覚化した。第 4 図の Panel A の定常状態における sGC の染色性は、Panel B に示すように L-アルギニン投与することによって増強が見られた。この増強は、網膜の OPL, INL, IPL など幾つかの層において認められた。L-NAME によって内因性の NO 産生を抑制すると、今度は全ての細胞層において染色性の減少が認められた。(Panel C)。mAb28131 による染色性はこれらの薬剤によって変化しなかった。ラット網膜組織におけるこのような mAb3221 による染色性の変化は、この抗体がガスによる sGC 活性の変化を識別できることを示している。興味深いことに、Panel D に示すように HO 阻害剤である ZnPP 投与により内因性の CO 産生を抑制すると mAb3221 の染色性が著明に増加すること

が確認された。またこのような染色性の変化はアセトン固定、ホルマリン固定を施した標本では検出できないため、ここに示した固定法であれば sGC の活性を反映した変化をひろえるものと判断した。

mAb3221 の免疫反応の形態学的解析に移る前に、L-アルギニン投与から組織固定までの時間が染色強度に影響するか調べた。第 5 図の Panel A に L-アルギニン投与後固定までの時間を横軸に、INL における mAb3221 陽性細胞数の増加率を縦軸にプロットした。細胞密度は L-アルギニン投与 20 分後に最大になった。この L-アルギニン投与による陽性細胞数の増加は mAb28131 による染色、または D-アルギニンに投与では認められなかった。これらのことから二つの sGC 抗体の染色性の変化を比較することによって、sGC 活性化の状態を調べるのが組織標本上でも可能と考えられた。

網膜組織において内因性に産生されている NO および CO が、部位特異的に sGC 活性を調節しているかについて調べた。INL の mAb3221 陽性細胞数を解析するのに加えて、ELM, IPL, OpFL の 3 つの異なる部位においてグレイレベルを解析し、それぞれ  $G_{ELM}$ ,  $G_{IPL}$ ,  $G_{OpFL}$  として数値化した。第 5 図の Panel B に網膜の各層における mAb3221 および mAb28131 の染色性の違いを示した。網膜組織の 4 つの部位における mAb3221 の染色性変化のパターンはどれも似た傾向を示していた。例えば、Panel B-1 のように ELM 上の部位において、mAb3221 の染色性は、L-アルギニンによって増強されるが、D-アルギニンによっては増強が見られていない。これに対し、L-NAME 投与によって内因性の NO を抑制すると染色性の強度は減少した。さらに HO 阻害剤の ZnPP 投与によって内因性 CO 産生を抑制すると、mAb3221 の染色性は著明な増強がみられた。この変化は HO 阻害作用のない CuPP 投与群では認められなかった。ZnPP 投与による染色性増強が NO を介した反応であるか否か調べるために HO 阻害剤と L-NAME とを両方同時に投与した。ZnPP 単独投与の時に認められた染色性の増強は、NO 産生を阻害することにより打ち消された。

興味深いことに ZnPP による mAb3221 染色性増強が L-NAME によって抑制されたが、その効果は網膜の層によって明らかな違いがみられた。4 つの部位のうち L-NAME 単独の時に比較して、ZnPP と L-NAME の同時投与の方が mAb3221 染色性を顕著に減少させた部位は、ELM であった。同様に、統計学的な有意差は認めなかったが ( $p=0.09$ )、OpFL においても同様の減弱が認められた。このことは網膜上の特異的な部位に



第5図 ラット網膜の各層における sGC 免疫染色の半定量的解析。A：縦軸には、INL における mAb28131 と mAb3221 の染色性の変化を、基剤コントロール群の染色性に対する割合として示した。L-アルギニン投与 20 分後に mAb3221 の染色性は最大となった。B：縦軸に染色性の強さをグレイレベルで示した。INL においては陽性細胞数を示した。L-arg と ZnPP 投与によって mAb3221 抗体の染色性は著しく増加しているが、L-NAME 投与では減少がみられる。L-NAME と ZnPP とを同時に投与すると ZnPP 単独投与の時にみられた mAb3221 の増強は認められなかった。これら mAb3221 においてみられた染色性の変化は mAb28131 においては認められなかった。\* $p < 0.05$ ；コントロールに対する増加。○：基剤投与と比べた減少。#：L-NAME 単独と比べた減少。網膜における各部位は左に表示した。平均値±SD。(Kajimura M, Shimoyama M, et al : FASEB J express article : 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003 の第5図を、許可を得て転載)

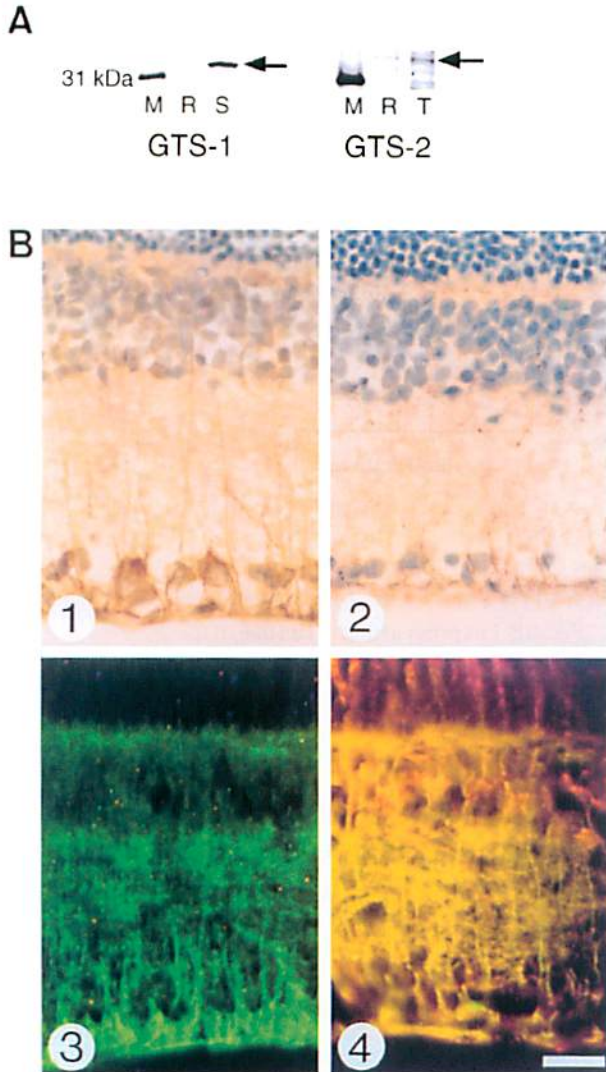
においては、NOの非存在下でも基礎的なsGC活性化の維持においてCOがその役割を担っていることを示唆している。これに対し、INLおよびIPLにおいては両薬剤同時投与群は、L-NAME単独で処理した群と比較しても有意差を認めず、これらの部位においては基礎的レ

ベルにおけるsGC活性化は主にNO依存的に行われていると考えられた。一方、これらの結果に対しmAb28131抗体による染色では、同様の薬剤投与によってグレイレベルに変化は認められなかった。

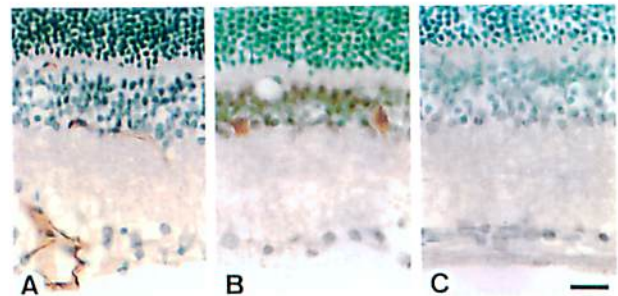
#### 4. 網膜におけるガスモノオキシド産生部位の免疫組織学的検討

ZnPPによる内因性COの抑制がsGCの活性化を引き起こすことから、どの細胞がCO産生に関与しているかを調べた。ウェスタンブロット解析(第6図, Panel A)にみられるように、抗ラットHO-1抗体, GTS1は網膜組織ライゼートに検出可能な反応を示さなかったのに対し、抗ラットHO-2抗体, GTS2は36kDaにおいて反応がみられた。このことは網膜組織においてはHOの主要なアイソザイムはHO-2であることを示している。CO産生系を探るためにGTS-2による免疫染色を行った。第6図のPanel B, Part 1に示すように、OpFLから伸びた突起がELMまで及んでおり、解剖学的にミュラー細胞の染色性を示している。抗ビリルビンIX $\alpha$ モノクローナル抗体, 24G7で染色した時にも同様の染色パターンが認められた。このことはHOによるヘムの分解とそれに続くCOの産生がこの部位において行われていることを示している。次に、二重染色することによりどの細胞がHO-2陽性細胞かを調べた。CAIIとHO-2の二重染色において、共に陽性の細胞が確認され、HO-2陽性細胞の多くはミュラー細胞であることが判明した。これらのことからミュラー細胞はプロトヘムをCOに分解するHO-2発現の主要な細胞であることが確認された。

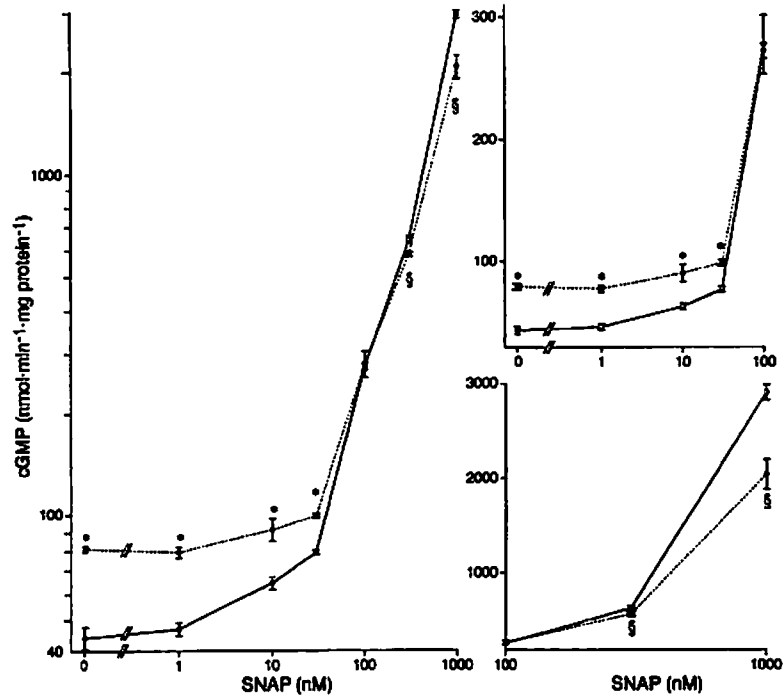
第7図にラット網膜におけるNO産生系についての染色結果を示す。抗eNOS抗体では硝子体腔寄りの比



第6図 A:ラット網膜ミクロソーム分画のウェスタンブロット解析。左に抗HO-1モノクローナル抗体, GTS-1, 右に抗HO-2モノクローナル抗体, GTS-2の反応を示す。脾臓(S)においてHO-1を示す32kDaに有意なバンドを認めるが、網膜(R)においては認められていない。一方、36kDaバンドは網膜(R)および精巣(T)の双方において認められる。M:分子量マーカー。B:ラット網膜におけるCO産生酵素, GTS-2によるHO-2単染色像(1), 抗ビリルビンモノクローナル抗体24G7染色像(2), GTS-2による蛍光単染色像(3), CAIIとGTS-2の蛍光二重染色像(4)。スケールバーは20 $\mu$ m。(Kajimura M, Shimoyama M, et al: FASEB J express article: 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003の第7図を, 許可を得て転載)



第7図 ラット網膜におけるNO産生細胞の分布。eNOS(A), nNOS(B), mouse IgG(C)。スケールバーは20 $\mu$ m。(Kajimura M, Shimoyama M, et al: FASEB J express article: 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003の第8図を, 許可を得て転載)



第8図 *in vitro*におけるsGCに対するCOの効果。SNAP投与により濃度依存的にsGCが活性化された。反応液にCOがある場合を黒丸で、ない場合を白丸で示した。データは3回の実験の平均値を示した。(Kajimura M, Shimoyama M, et al: FASEB J express article: 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003の第9図を、許可を得て転載)

較的大きな血管内皮細胞に強い染色性が認められた。IPLとINLの血管内皮も染色が確認されたが、その頻度は多くはなかった。ONL、ELMは染色されなかった(Panel A)。これに対し、nNOS抗体においては、INLの低い部位に染色されている細胞が所々認められたが(Panel B)、これは解剖学的特徴からアマクリン細胞と思われた。他の細胞にはほとんど染色性を示さなかった。これらの結果は、過去の報告とも一致しており<sup>26, 27)</sup>、OpFL、IPL、INLなどの部位と比べてELMがもっともNO産生部位から解剖学的に遠位に位置していることが確認された。

#### 5. *In vitro*におけるsGC活性化に対するCOとNOの相互作用の検討

上述の結果からNOによるsGC活性化にCOが干渉しているか、*in vitro*の実験を組んで確認した。第8図に示すように、精製したウシsGCをSNAPにより活性化させ、産生されたcGMP量を縦軸にプロットすると、30 μMのCO存在によりベースラインより約2倍の

sGC活性化を示した。100nM以下の濃度のSNAPであればCOはsGCを軽度活性化していた。これに対し、SNAPが大量に存在した時には、COはsGCの過剰な活性化を減弱させる効果を示した。第8図の右側にリニアスケールにてプロットし直すと、COは基礎的レベルのsGC活性化を250%増加させ、1 μM SNAPによって酵素が活性化された場合は約40%の抑制効果を示した。CO濃度を10 μMに変えた実験でも同様の効果が認められた。

#### 考 察

今回の研究において、sGCがミューラー細胞およびオン型双極細胞に存在することをモノクローナル抗体を用いて証明した。これは過去の報告におけるsGCのmRNAの発現分布とも一致している<sup>28)</sup>。さらに本研究は、sGC活性が内因性のNOおよびCOによってコントロールされていることを免疫学組織学的手法を用いて示した初めての報告である。また、これらのガスによる

sGC 活性調節は網膜上で一様に行われるのではなく、異なった細胞層で部位特異的に行われていることも示された。定常状態で産生されている CO 濃度を ZnPP 投与により抑制すると、全ての網膜細胞層において NO 依存性の sGC 活性化の増強が認められた。これに対し、OpFL, ELM においては、NO 抑制状態でさらに内因性の CO 産生を抑制すると、sGC 活性は NO 単独抑制よりさらに強い抑制作用がみられた。即ち網膜の特定部位において CO はそれ自身が sGC を活性化させているだけではなく、別の部位においては NO による sGC 活性化を抑制する働きをもち、CO が sGC 活性を微調整している可能性が示された。

今回の研究において、内因性ガスモノオキシド産生を調節することによって、sGC 活性が網膜の層によって不均一に制御されていることが示された。このことは、*in vivo* における局所 sGC の活性化が NO のみならず CO による調節も受けていることを示唆している。ミュラー細胞に的を絞って述べると、定常状態における sGC は層特異的に調節を受けていると考察できる。網膜の縦軸方向における酸素分圧勾配の存在を考慮に入れると<sup>29)</sup>、本研究で局所の NO, CO 濃度のバランスにより、なぜ sGC 活性化の程度が不均一になったのかを考察することが可能となる。即ち、HO-2 や BRIX $\alpha$  の免疫染色にみられるように、ミュラー細胞は網膜のどの層においても CO を産生していることが分かる。これに対し、NO 濃度はその産生細胞の存在部位、拡散速度および半減期などを考慮すると<sup>30)</sup>、各細胞層によって異なっていると推察される。いくつかの要因を考慮すると、IPL と INL は OpFL および ELM よりも NO 濃度が高いと考えられる。まず、毛細血管に発現している eNOS やアマクリン細胞に発現している nNOS のなど網膜における NO 産生系が、IPL や INL においては ELM と異なり解剖学的にすぐ近傍に存在していることが分かる。次に、OpFL は他に比べ眼底血管から比較的十分な酸素を享受できると考えられ、そのような環境が、この層において血管内皮が eNOS を豊富に発現しているにもかかわらず NO の生理学的活性を低めに維持していると考えられる<sup>30)</sup>。3 番目に、ELM は前述の様に NO 産生細胞とは解剖学的に遠隔にあり、この部位においては HO-2 と BRIX $\alpha$  が陽性所見を示していることより HO-2 を介して局所的なヘム分解を構成的に行っていると思われる。言い換えればこの層においては、CO に比して NO の生理学的な影響力は INL や IPL よりも低いものと考えられる。

網膜組織における sGC 活性が不均一な反応を示した

メカニズムを解明する上で、*in vitro* の実験において NO 依存性の sGC 活性化に対し CO が抑制効果を示したことは、生理学的に重要な意義を有している。例えば、OpFL や ELM のように局所的に NO 濃度が低い部位においては、CO は sGC を軽度活性化しているため、L-NAME で NO を抑制した状態でさらに CO も抑制することにより、mAb3221 の染色性が L-NAME 単独投与より減少したと考えることができる。これに対し INL や IPL など十分な NO の存在が予想できる部位では、L-NAME 存在下で ZnPP がほとんど影響を及ぼさないことから、NO が十分存在する状態では、定常状態の CO レベルは mAb3221 の染色性について影響を及ぼさなかったものと考えられる。このように NO, CO による sGC 活性化を組織の部位特異的に使い分けることには生理学的に意義があると思われる。仮に ELM 領域の cGMP が NO で制御された場合、低酸素状態において NO の寿命が延長することを考えると、このラジカル分子によってオキシラジカルに感受性のある視細胞内のレチノイドが分解されてしまう危険性がある。このように NO に代わって非ラジカルの sGC アゴニストである CO が定常状態における cGMP を維持しているものと仮説を立てることは不合理なことではない。NO に代わって CO が cGMP を維持する機構は、NO により障害を受けてしまう DNA が豊富に貯蔵されている精祖細胞における精子形成の調節や<sup>31)</sup>、同じくオキシラジカルによって分解されてしまうビタミン A を豊富に蓄えている肝臓の伊東細胞における sGC の活性化においても示されている<sup>25, 31)</sup>。

ZnPP により HO を阻害し内因性 CO 産生を抑制したことは、一見非生理学的処置のように思えるが、光照射実験と似て生理的状态に近い状態かもしれない。NO, CO や酸素分子などのガス状分子がヘム蛋白に結合する能力は光感受性であることはよく知られている<sup>32)</sup>。これらのガスのなかでも CO はミオグロビンなどのヘム鉄に結合に関し、量子収量 ( $\Phi$  値) が他者に比してはるかに大きい。このことは、CO は光照射により用意にヘム蛋白から分離することを意味している<sup>32)</sup>。これに対し NO の  $\Phi$  値は CO の約 0.1% でしかない。さらに光による CO の解離はヘム蛋白固有の性質である。これらのことから以下のような想定が可能である。ミュラー細胞やオン型双極細胞において、これらの細胞が可視光線にさらされると sGC は結合していた CO を解離し NO がこれに取って替わり sGC 活性を増加させる。この種のメカニズムがシナプス後の光情報伝達の微調整に貢献している可能性もある。

cGMPは網膜の光刺激による情報伝達において中心的な役割を担っているが、双極細胞における働きについてCOおよびNOによる調節の観点から以下に述べる。暗時において視細胞は脱分極しておりグルタミン酸を放出している。光刺激によって視細胞外節においてロドプシンが活性化されると、続く一連の反応を経てPDEが活性化され、cGMPが分解される。cGMP依存性の陽イオンチャネルが閉じることになり視細胞は過分極する。この視細胞におけるcGMP調節は通常pGCに支配されており、ガス状メディエーターを介したsGCによる調節を受けていない<sup>39)</sup>。一方オン型双極細胞においては、暗時にグルタミン酸代謝型受容体(mGluR6)を介してPDEが活性化されているが、光刺激により視細胞からのグルタミン酸放出が減少すると、今度はPDEが抑制されることになりcGMP濃度上昇をきたし、陽イオンチャネルの開口により脱分極が起こると考えられている。今回、オン型双極細胞においてsGCの発現が確認されたが、光情報伝達における脱分極を引き起こすのに十分なcGMPを、この細胞では自らのsGCを介して供給している可能性が考えられる。光刺激によってCOがsGCから解離してNO依存性にsGC活性を増加させることは、光刺激に即応したcGMPの供給系として重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究では双極細胞における光刺激に伴うsGCの活性化と細胞機能の関連を十分に調べられなかったが、網膜の光情報伝達におけるギャップジャンクションの役割を勘案すると極めて興味深い可能性が提示できる<sup>34, 35)</sup>。ギャップジャンクションはcGMPによって調節を受けることが知られており、オン型錐体双極細胞においては、光刺激により増加したcGMPがAIIアマクリン細胞とのギャップジャンクションを閉じて杆体双極細胞への伝達を制限し、中心窩における視覚情報解像度を上げている可能性が示唆されている<sup>35)</sup>。従って実際には光刺激に伴う本細胞でのcGMPレベルはPDEによってもCOの光解離によっても制御されている可能性があり、今後のさらなる検討が待たれる。

最後に、今回*in vivo*で確認された様に、ガスによるsGC活性が組織内で不均一に調節を受けている様式は、網膜のみならず他の器官においても観察されるかもしれない。肝臓においては類洞内皮細胞から産生されるNOは、クッパー細胞などで生成されるスーパーオキシドによって消去されてしまうため、定常状態においては低く保たれている。このため肝臓においては肝細胞から産生される内因性のCOが主要な循環制御因子として働いている<sup>25)</sup>。また、NOによるsGC活性化に対するCOの抑

制効果は、HO-1を血管内皮細胞に特異的にトランスフェクトした高血圧症を引き起こすトランスジェニックマウスにおいて認められている<sup>36)</sup>。sGC調節における酸化還元反応について最近の報告をみても<sup>37, 38)</sup>、*in vivo*における局所sGC調節機構の全容解明については更なる研究が必要であろう。

## 総括

網膜におけるNOおよびCOによるsGCの調節機構について調べるため、これらのガス生成系とsGCの分布を免疫組織学的に調べ、*in vivo*においてガス生成系を制御する薬剤を投与した時のsGC活性の変化を、抗sGCモノクローナル抗体、mAb3221を用いて解析し以下の結果を得た。

1. sGCはミュラー細胞とオン型双極細胞に発現していた。
2. 網膜における主要なHO-2陽性細胞はミュラー細胞であることが分った。
3. HO阻害剤であるZnPP投与により内因性のCO産生を抑制するとmAb3221の染色性が著明に増加し、COが内因性NOに対し抑制的に働いていることが示された。
4. 外境界膜はNO産生部位から比較的遠位に位置しており、L-NAME単独投与の時に比較して、ZnPPとL-NAMEの同時投与の方がmAb3221染色性を顕著に減少させ、NOの非存在下でも基礎的なsGC活性化の維持においてCOがその役割を担っていることが示唆された。一方、内顆粒層および内網状層においてはNO依存性にsGCが活性化されており、COがこれに対し抑制的にコントロールしていた。sGCが網膜の各層によって部位特異的に内因性ガスの調節を受けていることが示唆された。
5. *In vitro*の実験においてCOはNO濃度が低い時にはsGCを軽度活性化しているが、NO濃度が高くなるとsGC活性に対し抑制的に作用していることが確認された。

稿を終えるにあたり、御指導、御高閣を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導くださった慶應義塾大学医化学教室末松誠教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに御協力、御指導いただきました慶應義塾大学医化学教室梶村眞弓先生に深謝いたします。

本研究の一部は第105回日本眼科学会総会シンポジ



ウムにおいて報告した。

文 献

- 1) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524-526, 1987
- 2) Ignarro LJ : Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide : a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol* 67 : 1-7, 1990
- 3) Denninger JW, Marletta MA : Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411 : 334-350, 1999
- 4) Yoshikawa S, Miyamoto I, Aruga J, Furuichi T, Okano H, Mikoshiba K : Isolation of a *Drosophila* gene encoding a head-specific guanylyl cyclase. *J Neurochem* 60 : 1570-1573, 1993
- 5) Koesling D, Friebe A : Soluble guanylyl cyclase : structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135 : 41-65, 1999
- 6) Hobbs AJ : Soluble guanylate cyclase : the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci* 18 : 484-491, 1997
- 7) Sharma VS, Magde D : Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and nitric oxide : a mechanistic model. *Methods* 19 : 494-505, 1999
- 8) Friebe A, Mullershausen F, Smolenski A, Walter U, Schultz G, Koesling D : YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol* 54 : 962-967, 1998
- 9) Brnett AL, Johns DG, Kriegsfeld LJ, Klein SL, Calvin DC, Demas GE, Schramm LP, Tonegawa S, Nelson RJ, Snyder SH, Poss KD : Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nat Med* 4 : 84-87, 1998
- 10) Poss KD, Thomas MJ, Ebralidze AK, O'Dell TJ, Tonegawa S : Hippocampal long-term potentiation is normal in heme oxygenase-2 mutant mice. *Neuron* 15 : 867-873, 1995
- 11) Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH : Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 : 14848-14853, 1997
- 12) Ingi T, Cheng J, Ronnett GV : Carbon monoxide : an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 16 : 835-842, 1996
- 13) Johansson K, Bruun A, deVente J, Ehinger B : Immunohistochemical analysis of the developing inner plexiform layer in postnatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 305-313, 2000
- 14) Cao L, Blute TA, Eldred WD : Localization of heme oxygenase-2 and modulation of cGMP levels by carbon monoxide and/or nitric oxide in the retina. *Vis Neurosci* 17 : 319-329, 2000
- 15) Tsuyama S, Yamazaki E, Tomita T, Ihara H, Takenaka S, Kato K, Kozaki S : Characterization of a novel monoclonal antibody that senses nitric oxide-dependent activation of soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett* 455 : 291-294, 1999
- 16) Suzuki T, Suematsu M, Makino R : Organic phosphates as a new class of soluble guanylate cyclase inhibitors. *FEBS Lett* 507 : 49-53, 2001
- 17) Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M : Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 101 : 604-612, 1998
- 18) Ozawa N, Goda N, Makino N, Yamaguchi T, Yoshimura Y, Suematsu M : Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J Clin Invest* 109 : 457-467, 2002
- 19) Yamaguchi T, Shioji I, Sugimoto A, Komoda Y, Nakajima H : Epitope of 24G7 anti-bilirubin monoclonal antibody. *Biochim Biophys Acta* 1289 : 110-114, 1996
- 20) Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, Kyokane T, Goda N, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Suematsu M, Ishimura Y : Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 277 : G1088-1096, 1999
- 21) Guidry C : Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 740-752, 1996
- 22) Vardimon L, Fox LE, Moscona AA : Developmental regulation of glutamine synthetase and carbonic anhydrase II in neural retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 9060-9064, 1986
- 23) de la Villa P, Kurahashi T, Kaneko A : L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *J Neurosci* 15 : 3571-3582, 1995
- 24) Kyokane T, Norimizu S, Tani H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M : Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 120 : 1227-1240, 2001
- 25) Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y : Carbon monoxide : an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 96 : 2431-2437, 1995
- 26) Chun MH, Oh SJ, Kim IB, Kim KY : Light and electron microscopic analysis of nitric oxide synthase-like immunoreactive neurons in the rat retina. *Vis*

- Neurosci 16 : 379-389, 1999
- 27) Hangai M, Miyamoto K, Hiroi K, Tujikawa A, Ogura Y, Honda Y, Yoshimura N : Roles of constitutive nitric oxide synthase in postischemic rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 450-458, 1999
- 28) Ahmad I, Barnstable CJ : Differential laminar expression of particulate and soluble guanylate cyclase genes in rat retina. *Exp Eye Res* 56 : 51-62, 1993
- 29) Haugh LM, Linsenmeier RA, Goldstick TK : Mathematical models of the spatial distribution of retinal oxygen tension and consumption, including changes upon illumination. *Ann Biomed Eng* 18 : 19-36, 1990
- 30) Lancaster JR Jr : Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 8137-8141, 1994
- 31) Suematsu M, Oda M, Suzuki H, Kaneko H, Watanabe N, Furusho T, Masushige S, Tsuchiya M : Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. *Microvasc Res* 46 : 28-42, 1993
- 32) Antonini E, Brunori M : North-Holland Research Monographs : Frontiers of Biology. In : Neuberger A, Tatum EL eds. The derivatives of ferrous hemoglobin and myoglobin : Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam : North-Holland Publishing Company 13-39, 1971
- 33) Dizhoor AM : Regulation of cGMP synthesis in photoreceptors : role in signal transduction and congenital diseases of the retina. *Cell Signal* 12 : 711-719, 2000
- 34) Guldenagel M, Ammermuller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Sohl G, Willecke K, Weiler R : Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J Neurosci* 21 : 6036-6044, 2001
- 35) Mills SL, Massey SC : Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells. *Nature* 377 : 734-737, 1995
- 36) Imai T, Morita T, Shindo T, Nagai R, Yazaki Y, Kurihara H, Suematsu M, Katayama S : Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circ Res* 89 : 55-62, 2001
- 37) Wolin MS, Burke-Wolin TM, Mohazzab-H KM : Roles for NAD (P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir Physiol* 115 : 229-238, 1999
- 38) Kajimura M, Shimoyama M, Tsuyama S, Suzuki T, Kozaki S, Takenaka S, Tsubota K, Oguchi Y, Suematsu M : Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in the rat retina. *FASEB J express article* 10.1096/fj.02-0359fje. published online, 2003

学位論文

潰瘍性大腸炎および Crohn 病における Nitric Oxide 産生と  
大腸粘膜の Nitric Oxide Synthase 活性の増加

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

木村裕之

(平成 15 年 12 月 14 日受付)

Key Words : nitric oxide, ulcerative colitis, Crohn's disease, nitric oxide synthase, peroxynitrite

生物学的活性を有する低分子化合物の一つである nitric oxide (NO) は、マクロファージや好中球のメディエーターとして炎症性反応において重要な役割を行っていることが知られている<sup>1)</sup>。NO は nitric oxide synthase (NOS) を介して L-arginine より合成される。NOS のアイソザイムにはカルシウム依存型の構成型 (constitutive NOS, cNOS) とカルシウム非依存型の誘導型 (inducible NOS, iNOS) の 2 種類がある<sup>2)</sup>。cNOS は、さらに eNOS と nNOS の 2 つの isozyme に分類されるが、少量の NO を産生し心血管系や神経系のホメオスターシスに重要な役割を果たしていると考えられている<sup>3)</sup>。一方で iNOS はより多くの NO を産生し、細胞内病原体や腫瘍細胞に対する宿主の防衛機能に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>4)</sup>。しかし、高濃度の NO は健常な組織に対しても毒性があり、傷害を与える可能性があると考えられている。さらに炎症組織にて活発に産生される NO とスーパーオキシドアニオンが反応すると、強い細胞毒性を有する peroxynitrite が産生され、それが組織傷害をさらに引き起こす可能性がある<sup>5)</sup>。

小腸および大腸の慢性炎症には、NO 代謝異常が関係していることが実験動物やヒトの両者にて徐々に明らかとされてきた<sup>6-11)</sup>。NO 合成は慢性炎症性腸疾患にて増

加し、病態の進行に影響を及ぼす可能性がある。活動期の Crohn 病 (CD) や潰瘍性大腸炎 (UC) において、炎症のある腸管粘膜には多くの活性化されたマクロファージや顆粒球の浸潤がみられる<sup>12)</sup>。これらの細胞による高濃度の NO の産生と分泌は局所組織の損傷を強く誘導する。UC 患者より生検された直腸粘膜にて、NOS により同時に産生される citrulline の濃度の増加が Middleton らにより報告されている<sup>7)</sup>。Rachmilewitz ら<sup>13)</sup>は、大腸の NO 産生と NOS 活性は活動期の UC および CD 患者にて増加していることを報告している。また一方では、Crohn 病の大腸粘膜での NOS 活性は増加していないという結果の報告もみられる<sup>10)</sup>。UC においては、本質的に炎症は粘膜を主体としており、び漫性で、持続的な出血と著明な好中球の浸潤により特徴づけられている。CD においては、炎症は区域性で腸管全層に及び、縦走するアフタ様潰瘍、リンパ球の集積と肉芽腫の形成が特徴とされる<sup>12)</sup>。それゆえに、これらの 2 つの疾患はその病因を異にしており、炎症腸管の NO 産生において違いがある可能性がある。しかしながら、この 2 つの疾患において NO の動態につき詳しく検討した成績はみられない。

本研究において著者は、UC および CD 患者における末梢血清中の NO 濃度と大腸粘膜における NO 産生を

本論文は、Kimura H, Miura S, Shigematsu T, Ohokubo N, Tsuzuki Y, Kurose I, Higuchi H, Akiba Y, Hokari R, Hirokawa M, Serizawa H, and Ishii H : Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis and Sci* 42 : 1047-1054 ; 1997 の一部、および Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, Kurose I, Higuchi H, Fujimori H, Tsuzuki Y, Serizawa H, Ishii H : Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 42 : 180-187 ; 1998 の一部を含む

測定した。同時に、UC および CD 患者において大腸粘膜の NOS 活性と UC・CD の活動性の関係を研究した。また著者は、UC および CD 患者における炎症部および非炎症部の大腸粘膜における NOS 活性を測定し、特に UC と CD の NO 産生の違いに注目した。さらに活動性 UC の大腸炎症において NO が主にどこから産生され、その反応物の peroxynitrite がどこで産生されているかについて免疫組織化学的に評価し、iNOS の活性と比較した。

## 対象と方法

### 1. 検討1

#### 1) 対象患者

36名の潰瘍性大腸炎患者(男性25名,女性11名;平均年齢38.5歳,18-62歳)および18名のクローン病患者(男性15名,女性3名;平均年齢32.2歳,21-40歳)を対象とした。

潰瘍性大腸炎は臨床的,放射線学的,そして病理組織学的特徴を基準に<sup>12)</sup>診断し,既報<sup>14)</sup>に従って活動性スコアを計算した。すなわち,排便回数,体温,脈拍数,粘血便の存在,腹痛の有無にてスコア計算を行った。潰瘍性大腸炎の活動性に関して28名は活動期であり,うち8名は中等症,20名は軽症であり,残り8名は寛解期であった。13名が直腸S状結腸型で,15名が左半結腸型,そして8名が全結腸型であった。大腸鏡施行の時点で,18名の患者がprednisolone(10-40mg/日)服用中で,26名がsulfasalazine(2-6g/日)を,そして10名が6-mercaptopurine(30mg/日)服用中であった。2名は局所的にステロイド剤を投与されていた。13名はこれら薬剤の投薬を2種類以上受けていた。

クローン病の診断は臨床像,放射線学的,内視鏡的,そして病理学的診断基準により行った。クローン病の活動性はCrohn's disease activity index(CDAI)により判断した<sup>15)</sup>。病変の広がりには内視鏡的および2年以内の小腸造影にて確認した。2名の患者は腸切除の既往があった。7名の患者は大腸型で,11名は小腸大腸型であった。これらの対象の中で,6名はCDAI150以上の臨床的に活動期にある状態であった。14名はprednisolone(10-30mg/日)服用中で,18名はsulfasalazine(3-6g/日),そして10名は6-mercaptopurine(30mg/日)を大腸鏡施行の時点で服用中であった。14名はこれら薬剤の投薬を2種類以上受けていた。

コントロール群は20名の(14名男性,6名女性,平均42.1歳)大腸ポリープ患者とした。その大腸健常部

粘膜のバイオプシーでは,組織学的には正常であった。

患者はニフレック<sup>TM</sup>にて前処置後大腸鏡を施行した。炎症の重症度はRutegard<sup>16)</sup>らおよびWardle<sup>17)</sup>らの内視鏡的診断基準にて1)肉眼的に正常2)血管透過性不良・粘膜浮腫・顆粒状粘膜・易出血性3)発赤粘膜・表層性潰瘍形成4)白苔を伴った深い潰瘍形成という4段階に分類した。35名のUC患者のうち8名は内視鏡的に正常(grade1)粘膜で粘膜への炎症性細胞浸潤像は見られなかった。これらの症例は非活動期の症例とした。全てのクローン病患者は,内視鏡的gradeにて3から4の活動性病変を有していた。潰瘍性大腸炎のそれぞれの患者は,内視鏡的に活動性のある遠位部の粘膜及び,肉眼的には健常(非病変部)な上行または横行結腸にあたる近位部の粘膜のバイオプシーを施行した。クローン病患者においては,肉眼的に炎症のある部分および病変と病変の間の肉眼的に炎症のみられない粘膜よりバイオプシーを施行した。通常の大腸鏡よりも微小病変を検出するため0.1%インジゴカルミンを使ったスプレー散布による着色も行った。本研究は学内倫理委員会の承認に基づき,全対象についてインフォームドコンセントを取得して行った。

#### 2) 血漿 NO<sub>2</sub>・NO<sub>3</sub>(NO<sub>x</sub>) およびサイトカインの測定

血液検体は空腹時の34名のUC患者および18名のCD患者より採取した。血漿NO<sub>2</sub>・NO<sub>3</sub>(NO<sub>x</sub>)濃度はGrangerら<sup>18)</sup>の方法を改変し,全てのNO<sub>2</sub>を*E.Coli*のNO<sub>2</sub>還元酵素によりNO<sub>3</sub>に還元し測定した。即ち,0.3Mのアンモニウムformateと0.05単位のNO<sub>2</sub>還元酵素(シグマ社製)を100μlの血漿に添加し,この混合液を37℃にて4時間インキュベーションした。インキュベーションの最後に2倍のGriess試薬を加え,室温にて10分間インキュベーションし,さらに1mlのGriess試薬を加え,543nmでの吸光度を測定し,NO<sub>3</sub>レベルを標準曲線より求めた。

Interleukin(IL)-1β,IL-6およびtumor necrosis factor-α(TNF-α)の血漿濃度は28名の活動性UCと18名のCD患者にて測定をした。EDTA採血にて採取した血漿を用い,サンプル中のIL-1β,IL-6およびTNF-αをenzymed-linked immuno sorbent assay(ELISA)法(Quantikine HS kit,R&D Systems,Inc.,Minneapolis,Minesota)にて測定した。尚,血漿中の最低感度は,(IL)-1βにおいて0.1pg/ml,IL-6において0.094pg/ml,TNF-αにおいて0.18pg/mlである。

### 3) 大腸粘膜の NOS 活性の測定

NOS 活性は大腸生検検体を用いて L-arginine アナログの存在下に L-arginine から citrulline への変換能を算定することにより測定した<sup>19)</sup>。簡単に述べると、組織を 1mM EDTA, 1mM DTT, 10 µg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF の入った 50 mM Tris buffer (pH 7.0) に入れてホモジェナイズし、さらにこれを 30000 rpm にて遠心する。上清は <sup>14</sup>C-L-arginine から <sup>14</sup>C-citrulline への変換を阻害する N<sup>ω</sup>-monomethyl-L-arginine を用いて測定を行った。すなわち、0.05 ml の上清を 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM L- [<sup>14</sup>C] arginine, 1 µM L-citrulline ([<sup>14</sup>C] citrulline の異化防止のため), 10 mM L-valine (非特異的な arginase 活性阻害のため), 1 µM FAD, 0.1 mM NADPH を含んだ 50 mM HEPES 液 (pH 7.2) に加え、この反応液が全部で 200 µl となるようにした。この反応液を 37°C にて 60 分間インキュベーションを行い、その後 Dowex (AG 50W-8) レジンと buffer の 1 対 1 の懸濁液を、分解されていない L- [<sup>14</sup>C] arginine を結合して取り除くために 1 ml 加えた。バックグラウンドの citrulline 生成を減ずるために 1 mM の L-NMMA を使用した。この測定法により Ca<sup>2+</sup> 依存型の構成型 iNOS と Ca<sup>2+</sup> 非依存型の誘導型のアイソザイムを測定することができる。1mM EGTA の存在下に (すなわち Ca<sup>2+</sup> のない状態にて) 測定された活性が iNOS 活性を示すように、EGTA を加えてのインキュベーションも同時に行った。

### 4) ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的検討

大腸生検標本は、10%のホルマリン溶液にて固定し、脱水後パラフィン包埋した。4 µm の連続切片にてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。組織学的炎症 grade は Riley らの方法<sup>20)</sup> に従い炎症性細胞の浸潤と組織破壊の程度を以下の 5 段階にわけた：1. 正常粘膜；2. 組織破壊のない軽度の慢性炎症細胞の浸潤；3. 組織破壊のない中等度の慢性炎症細胞の浸潤；4. 軽度の組織破壊のある著明な慢性炎症細胞の浸潤；5. 明かな組織破壊のある著明な慢性炎症細胞の浸潤

## 2. 検討 2

### 1) 対象患者

潰瘍性大腸炎患者を対象にして大腸粘膜での iNOS 活性と iNOS および nitrotyrosine の免疫組織学的検討を施行した。33 名の活動性潰瘍性大腸炎患者 (24 名の男性, 9 名の女性; 平均年齢 37.3 歳; 18-57 歳) を対象とした。潰瘍性大腸炎は標準的な診断基準を基に診断さ

れ、活動性は検討 1 と同様にスコアを計算した。スコアは 0 から 8 までであった。3 以上のスコアの患者は活動性とした。疾患活動性は 16 名にて中等度から重度、そして 17 名にて軽度であった。12 名が直腸 S 状結腸型で、13 名が左半結腸型、そして 8 名が全結腸型であった。大腸鏡施行時点で、16 名の患者が predonisolone (10-30mg/日) 服用中で、26 名が sulfasalazine (2-6 g/日) を、そして 8 名が 6-mercaptopurine (20-30 mg/日) 服用中であった。3 名は局所ステロイド剤を投与されていた。13 名はこれら薬剤の投薬を大腸鏡検査時点で 2 種類以上受けていた。

コントロール群は 18 名の (10 名男性, 8 名女性, 平均 40.8 歳) 大腸ポリープ患者とした。その大腸健常部粘膜のバイオプシーでは、組織学的には正常であった。

患者は標準的な前処置後大腸鏡を施行した。潰瘍性大腸炎のそれぞれの患者は、内視鏡的に炎症のある粘膜と、内視鏡的には正常な粘膜のバイオプシーを施行した。

### 2) 大腸粘膜の iNOS 活性の測定

検討 1 での腸粘膜の NOS 活性の測定に準拠して行った。

### 3) iNO 合成酵素と nitrotyrosine の免疫組織学的検討

iNOS および nitrotyrosine の大腸粘膜での免疫活性は標識 streptavidin biotin 法にて免疫組織化学的に検討した。採取した大腸生検組織は periodate/lysine/paraformaldehyde 溶液にて固定し、ドライアイスとアセトンで凍結する前に optimum cutting temperature (OCT) コンパウンド (Miles Inc, Elkhart, IN, USA) に包埋した。6 µm の厚さのクリオスタット切片を作成しゼラチンコートのスライドに移し、20°C にて 1 時間乾燥した。pH7.4 で、1% Triton X-100 を含む燐酸バッファー生食 (PBS) で 5 分間洗浄した後、1% ヤギ血清含有の PBS 内にてインキュベートした。iNOS (macNOS) および nitrotyrosine (mouse IgG; Update Biotechnology Inc, Lake Placid, NY, USA) に対するモノクローナル抗体は、PBS にて 50 から 100 倍に薄め、一晚 4°C で切片上にて反応させた。それぞれの検体は 2 次抗体 (biotinylated anti-mouse IgG class 抗体; Amersham International plc Amersham, Bucks, UK) とともに 37°C 1 時間インキュベートし、さらに streptavidin 標識 fluorescein isothiocyanate (Streptavidin-fluorescein; Amersham International plc) にて 30 分間室温にてインキュベートした。各ステップにて 1% ウシ血清アルブミン含有 PBS にて洗浄を行った。

標本はグリセリンゼリーにて封入し、蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) 下にて観察した。尚、1次抗体を除いて同様の操作を施行した標本をネガティブコントロールとした。

#### 4) 免疫沈降法およびウェスタンブロット解析

本検討で用いた iNOS 抗体の特異性を検証するために、iNOS 活性の免疫沈降法および大腸粘膜組織でのウェスタンブロット解析を行った。

免疫沈降法では、大腸生検組織をホモジェナイズしたサンプルの蛋白を Nonidet P40 (1%) で処理して短時間ソニケーションした。可溶性蛋白 (500 µg) はトータルで 500 µl の免疫沈降バッファー (10 mM Tris/HCL, pH 7.4, 1% Nonidet P40, 1 mM EDTA, 0.5% BSA, 0.2 mM phenylmethanesulphonyl fluoride) 内で 4°C にて 10 時間、抗 iNOS (mac-NOS) (mouse IgG2a; Transduction Laboratories) (5 µg) モノクローナル抗体とともにインキュベーションした。5 µg のウサギ抗マウス IgG 抗体を加えた後、vortex にて攪拌し、さらに 4°C にて 1 時間インキュベーションを継続した。この混合液に固定された *Staphylococcus aureus* (Zymed Co., South San Francisco, AC, USA) の 10% 懸濁液 100 µl を加え、30 分インキュベーションの後 2500 g にて 20 分遠心をした。上清に残った iNOS 活性については上述のごとく測定した。

ウェスタンブロット解析では生検組織を 15 ml の typeB blender ホモジェナイザーを用いて 1 分間 2000 回転で 10 ストロークを 5 倍の煮沸分解バッファー (1% sodium dodecyl sulphate, 10 mM Tris/HCL, pH 7.4) 内でホモジェナイズし、10-15 秒間マイクロウェーブをかけた。サンプルの一部 (100 µg protein) を sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis (12% gel (Protogel); National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) にて溶解し、免疫電気泳動にてニトロセルロース膜上に固定した。非特異的結合部位をブロックするために 20 分間室温にて 3% の non-fat ドライミルクにてインキュベーションした。この膜を 4°C にて一晩攪拌しながら iNOS に対するモノクローナル抗体でインキュベーションし、さらに PBS/3% non-fat ドライミルクにて 30 分間室温にて攪拌しながら金コロイド結合 2 次抗体 (ヤギ抗マウス IgG; 1:200 希釈) とインキュベートした。この抗体が結合した膜を silver enhancing kit (Bioclin, UK) を用いて検出した。

## 統計的検討

全ての結果は平均および平均誤差にて表現した。群間差は ANOVA および Fisher's post hoc テストを使用した。血漿 NOx レベルおよび大腸粘膜 iNOS 活性の関係は直線回帰分析を使用した。p<0.05 をもって有意差とした。

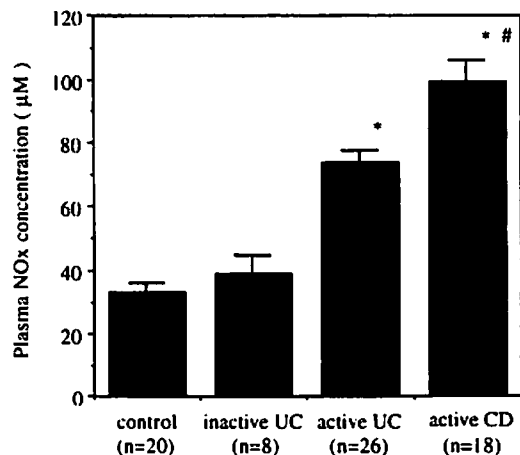
## 結果

### 1. 検討 1

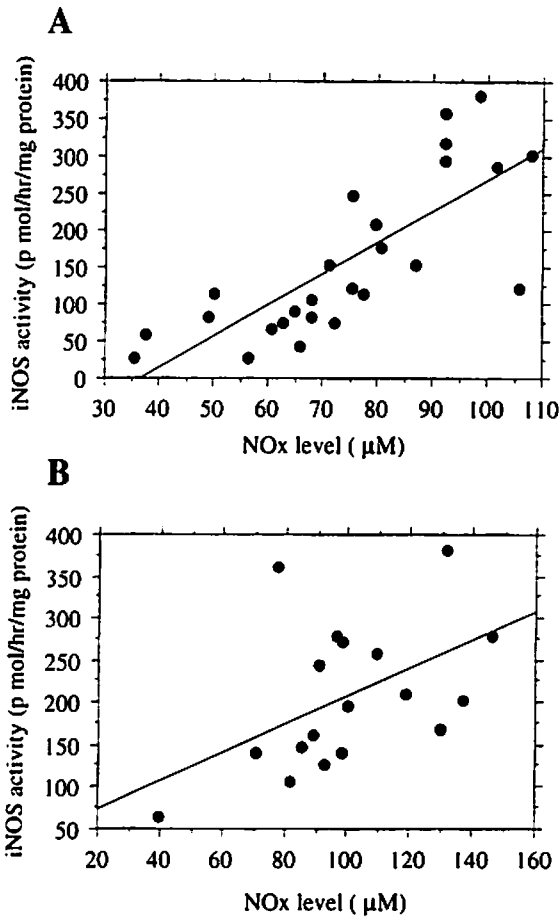
血漿 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>・NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NOx) およびサイトカインの測定

第 1 図は UC と CD 患者の血漿中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NOx) 濃度を示している。活動期の UC と CD 患者はコントロールと比較して平均血漿中 NOx 濃度が著明に増加していた。これらの NO 代謝産物測定値は活動期 UC よりも CD 患者にて著明に増加していた。非活動期 UC 患者においてはコントロールと比較して血漿中 NOx 濃度は増加を示さなかった。

第 2 図は活動期 UC および CD 患者の血漿中 NOx 値と炎症を有する大腸粘膜の iNOS 活性値の関係を示したものである。著明な正の相関が NO 代謝産物および両群患者の活動性粘膜における iNOS 活性の間に認められた。しかしながら、CD よりも UC にてより強い相関が認められた。(UC : r=0.78, p<0.001 CD : r=0.51,



第 1 図 UC と CD 患者の nitrite と nitrate (NOx) の血漿濃度。値は平均±標準偏差。\* p<0.05: コントロールと非活動期 UC と比較。# p<0.05: 活動期 UC と比較。(Kimura H et al: Dig Dis Sci 42: 1047-1054. 1997 の第 1 図を許可を得て転載、改変)



第2図 血漿 nitrite/nitrate (NOx) 濃度と (A) 活動期 UC および (B) CD 患者の大腸粘膜における iNOS 活性の相関。(A) 活動期 UC 患者の NOx 濃度と iNOS 活性には強い相関がみられた。  $r=0.78$ ,  $P<0.001$ ,  $y=156.646+4.258x$  ;  $R^2=0.0604$  (B) UC ほどの相関ではないが、CD 患者の NOx 濃度と iNOS 活性にも有意な相関が見られた。  $r=0.51$ ,  $P<0.05$ ,  $y=42.036+1.667x$  ;  $R^2=0.265$  (Kimura H et al : Dig Dis Sci 42 : 1047-1054. 1997 の第2図を許可を得て転載、改変)

$p<0.05$ ) サイトカインの血漿濃度の比較では、血漿 IL-6 値は活動期の CD 患者にてコントロールに比べて著明に上昇していた (CD :  $18.5\pm 3.6$  pg/ml コントロール :  $1.6\pm 1.3$  pg/ml,  $p<0.05$ )。しかし、活動期 UC ではコントロールに比べ、血漿 IL-6 値の著明な上昇は見られなかった (UC :  $4.6\pm 2.8$  pg/ml)。また、活動期 UC および CD 患者における血漿中 IL- $1\beta$  および TNF- $\alpha$  濃度は、コントロールに比べ有意な上昇はなかった。

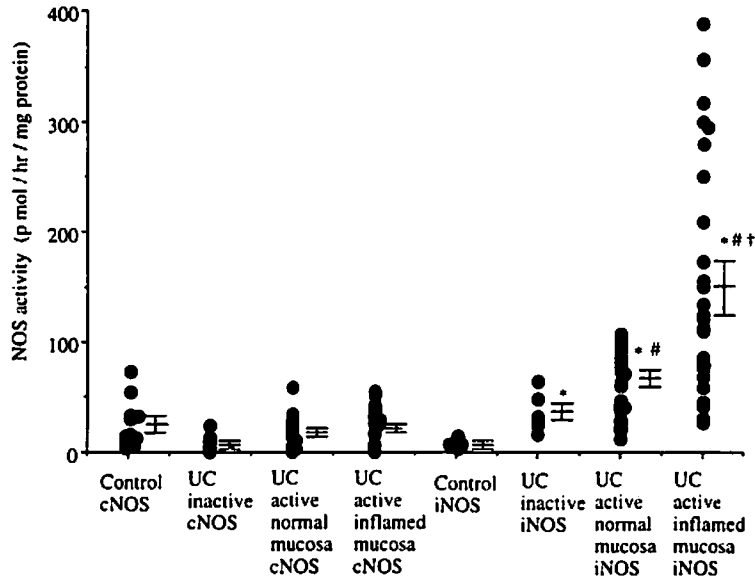
#### 大腸粘膜の NOS 活性の測定

第3図は UC 患者における大腸粘膜の NOS 活性を示

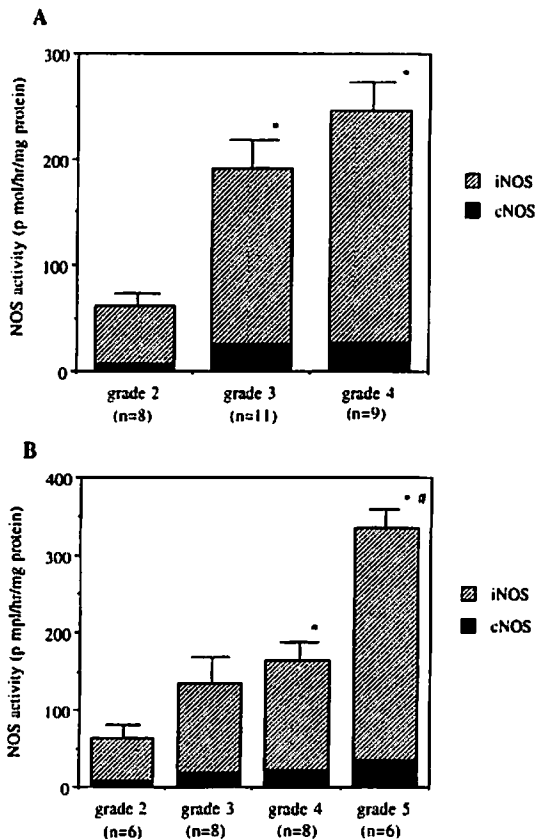
している。コントロールにおける正常大腸粘膜においては、cNOS 活性は  $24.5\pm 4.0$  pmol/hr/mg protein であり、iNOS 活性は 15 pmol/hr/mg protein 以下であった。非活動期の UC 患者では、炎症の見られない粘膜から採取された生検組織にて cNOS 活性は 25 pmol/hr/mg protein 以下であった。一方 iNOS 活性はコントロールに比してわずかながら、しかしながら有意差をもって上昇していた。活動期の UC 患者において、cNOS および iNOS 活性を正常 (非炎症部) 粘膜および炎症部位の粘膜の両者にて測定した。組織学的には、活動期 UC 患者より採取した非炎症部における組織では炎症細胞性浸潤の明らかな増加は見られなかった。コントロールに比べ、活動期 UC 患者の炎症部および非炎症部の粘膜においては cNOS 活性の増加は認められなかった。しかしこれとは対照的に、活動期 UC 患者の大腸粘膜の iNOS 活性は著明に上昇しており、この iNOS 活性の上昇は炎症部と非炎症部の粘膜の両者において認められた。ただし非炎症部の粘膜では上昇はより軽度にとどまった。また大腸粘膜の iNOS 活性増加は非炎症部よりも炎症部位の粘膜でより著明に認められた。

第4図は活動期 UC 患者の病変粘膜の NOS 活性と内視鏡的および組織学的に判定した炎症グレードとの関係を図示したものである。大腸 iNOS 活性は内視鏡的にも組織学的にも軽度の炎症粘膜よりも、高度の炎症粘膜においてより著明に上昇していた。即ち第4図 A に示すごとく内視鏡的グレード3または4の大腸より採取された大腸組織 iNOS 活性はグレード2における同活性よりも有意に増加していた。同様に、iNOS 活性は UC 患者の組織学的炎症グレードにも良く相関し、第4図 B に示すように炎症の重症度の増加とともに段階的に iNOS 活性は上昇した。

第5図は CD 患者における大腸 NOS 活性を示している。これらの活動期 CD 患者において、炎症の活動性が高い粘膜の cNOS 活性はコントロールに比較して有意に上昇していた。またこれらの患者の肉眼的に正常な粘膜部位においても、cNOS 活性は統計学的には有意差はないものの若干上昇しているように見える。活動期 CD 患者の炎症粘膜における iNOS 活性は、コントロールに比べ著明に上昇していた。しかしながら、組織学的炎症 grade 2 または 3 の患者と 4 または 5 の患者を比較した場合には、iNOS 活性は有意な差は認められなかった。CD 活動期患者の肉眼的に正常な大腸粘膜における iNOS 活性が、炎症粘膜における活性と有意差なく著明に上昇していたことは、特に注目すべき点である。組織学的には CD 患者の肉眼的に正常の粘膜での HE 染色で

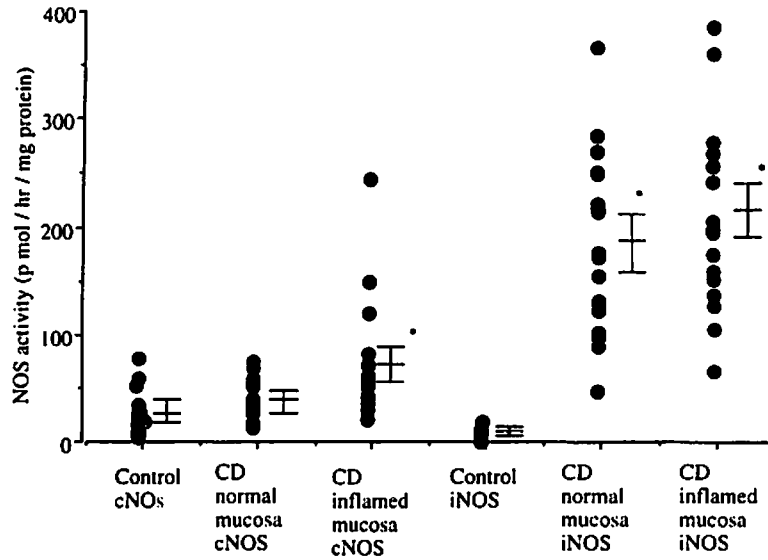


第3図 UC患者の大腸NOS活性. コントロール: コントロール対象者からの正常大腸粘膜非活動期 UC: 非活動期 UC患者からの大腸粘膜活動期 UC 正常粘膜: 活動期 UC患者からの非炎症部位の大腸粘膜活動期 UC 炎症粘膜: 活動期 UC患者の組織学的に活動性のある大腸粘膜 cNOS: constitutive (カルシウム依存性) NOS 活性; iNOS: inducible (カルシウム非依存性) NOS 活性 \*P<0.05 コントロール iNOS と比較. #P<0.05 非活動期 UC の iNOS と比較. †P<0.05 活動期 UC の正常な非炎症部粘膜の iNOS と比較 (Kimura H et al: Dig Dis Sci 42: 1047-1054, 1997 の第3図を許可を得て転載, 改変)

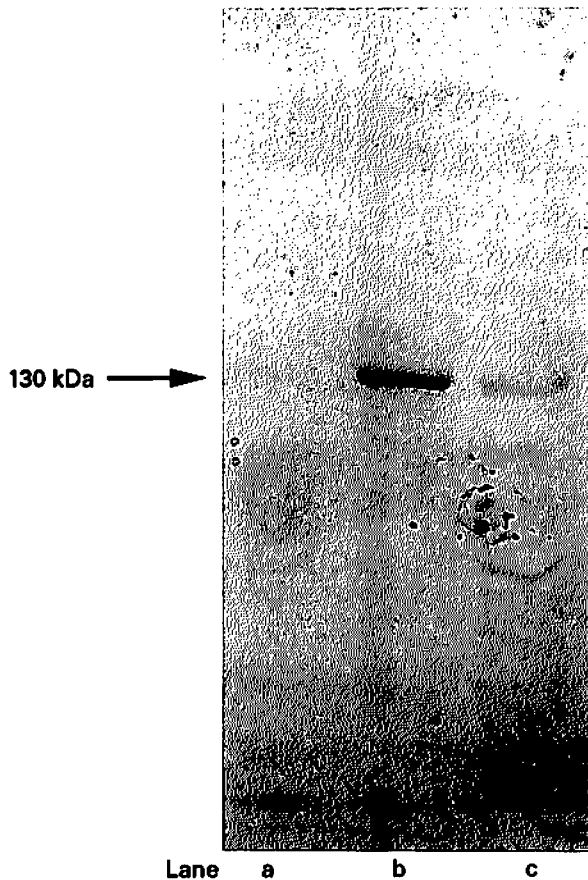


第4図 活動期 UC患者における大腸粘膜のNOS活性と内視鏡的 (A) または炎症の組織学的 grade (B) の関係. 炎症の重症度は方法に記載したように4段階からなる内視鏡的診断基準および5段階からなる組織学的診断基準を用いて grade 分類を行った. cNOS: constitutive (カルシウム依存性) NOS 活性; iNOS: inducible (カルシウム非依存性) NOS 活性 \*P<0.05 grade2 と比較. #P<0.05 grade4 と比較. (Kimura H et al: Dig Dis Sci 42: 1047-1054, 1997 の第4図を許可を得て転載, 改変)





第 5 図 CD 患者の大腸 NOS 活性コントロール：コントロール対象からの正常大腸粘膜 CD 正常粘膜：活動期 CD 患者の大腸非炎症部粘膜，CD 炎症粘膜：活動期 CD 患者の組織学的炎症のある大腸粘膜 cNOS：constitutive (カルシウム依存性) NOS 活性；iNOS：inducible (カルシウム非依存性) NOS 活性 \*P<0.05 コントロール cNOS または iNOS と比較 (Kimura H et al：Dig Dis Sci 42：1047-1054. 1997 の第 5 図を許可を得て転載，改変)



第 6 図 抗 iNOS 抗体を用いての Western blotting 法による大腸粘膜生検標本の inducible NOS (iNOS) の検出。Lane a, iNOS はコントロール対象からの組織学的正常粘膜のホモジェネートでは検出できなかった。Lane b, 重度 (grade4) の炎症を有する活動期 UC 粘膜にて、抗 iNOS 抗体は 130kDa の位置に明瞭なバンドを検出できた。Lane c, 軽度 (grade2) の炎症を有する UC 粘膜では弱いバンドのみが検出された。(Kimura H et al：Gut 42：180-187, 1998 の第 1 図を許可を得て転載，改変)

は、炎症性細胞浸潤の明かな増加は認められなかった。

2. 検討2

検討に用いた抗 iNOS 抗体が iNOS 蛋白を特異的に検出していることを検証するために、抗 iNOS 抗体を用いた iNOS 活性の免疫沈降および Western blotting による検討 (第6図) を正常大腸組織と活動性 UC の病変部組織にて行った。免疫沈降法では非炎症部粘膜および炎症部粘膜の両者において抗体と反応後に上清に残った活性は5%以下であり、本抗体が iNOS 活性を検出していることが示された。

Western blotting による検討では、正常大腸にては iNOS は検出されなかった (lane a)。強い炎症のある活動性 UC 粘膜においては (grade 4)、抗 iNOS 抗体は、130 kDa に位置するバンドとして明瞭に検出された (lane b)。一方で、軽度の炎症粘膜では (grade2) かすかなバンドが検出されたのみであった (lane c)。

UC 患者の大腸組織における iNOS の免疫組織化学的検討では、iNOS 蛋白の局在は粘膜固有層と同様に粘膜上皮においてもその発現の増強が観察された。一方コントロール症例では iNOS 陽性の免疫反応は粘膜上皮でも粘膜固有層でも検出されなかった。第1表は活動期の UC 患者の炎症を有する大腸組織にて iNOS 染色陽性の割合を示したものである。iNOS の局在を組織学的に軽度から中等度の炎症を有する患者 (grade2 または 3) と高度の炎症を示す患者 (grade4 または 5) とで比較をした。grade2 または 3 の炎症を示す大腸粘膜の 54% しか iNOS は免疫染色で陽性ではなかった。これらの患者では iNOS 免疫反応は主に粘膜固有層でのみ観察され、19% が粘膜上皮にても iNOS 免疫反応を示した。これらの患者の肉眼的に正常な粘膜においては iNOS 免疫反応はほとんどみられず、一例で粘膜固有層に陽性を

示したのみであった。一方で、組織学的に高度の炎症を有する (grade4 または 5) 大腸粘膜での iNOS 分布には重要な相違があった。すなわち iNOS 陽性反応は全ての炎症粘膜において観察され、また grade4 または 5 の炎症粘膜では第7図に示すように粘膜固有層 (grade2 または 3 では 19% で grade4 または 5 では 81%;  $p < 0.05$ ) と同様に大腸粘膜の粘膜上皮にて著明な増加を呈していた。Grade4 または 5 の活動性炎症粘膜のある2名の患者では、iNOS 陽性反応は第8図に示すように粘膜上皮のみであった。また grade4 または 5 の炎症のある患者でも、iNOS 免疫反応は1例を除いては正常粘膜では明らかには検出できなかった。

第9図は活動性 UC 患者の炎症粘膜における iNOS 酵素活性と iNOS の陽性部位の関係を示すものである。iNOS 免疫反応陽性を示す粘膜は陰性粘膜よりも、有意に高い iNOS 活性を呈していた。さらに、粘膜固有層と粘膜上皮細胞両者において iNOS 免疫反応を呈している炎症粘膜は、iNOS が粘膜固有層のみに局限している粘膜よりも有意に高い iNOS 酵素活性を呈していた。

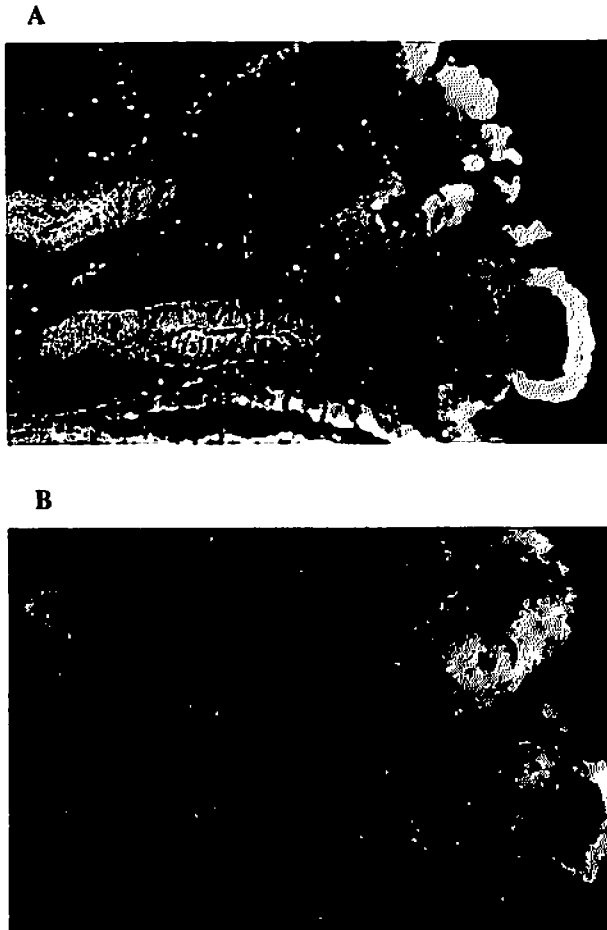
第2表は活動性 UC 患者の大腸組織における nitrotyrosine 染色陽性の割合を示したものである。大腸組織の nitrotyrosine 染色はチロシンのニトロ化の存在を示すもので、この染色を組織学的に軽度から中等度の炎症 (grade2 または 3) と高度の炎症 (grade4 または 5) を示す患者群にて比較した。コントロール症例では、nitrotyrosine 免疫反応は粘膜上皮と粘膜固有層の両者にて検出されなかった。grade2 または 3 の炎症と分類された患者にては nitrotyrosine 免疫反応陽性は常に粘膜固有層において、41% の割合で観察された。第10図は grade4 または 5 患者からの大腸粘膜の粘膜固有層にて認められた典型的な nitrotyrosine 免疫反応陽性を示すものである。これら高度の炎症粘膜を示す患者

第1表 活動性 UC 患者の大腸組織の iNOS 免疫反応の局在と陽性率

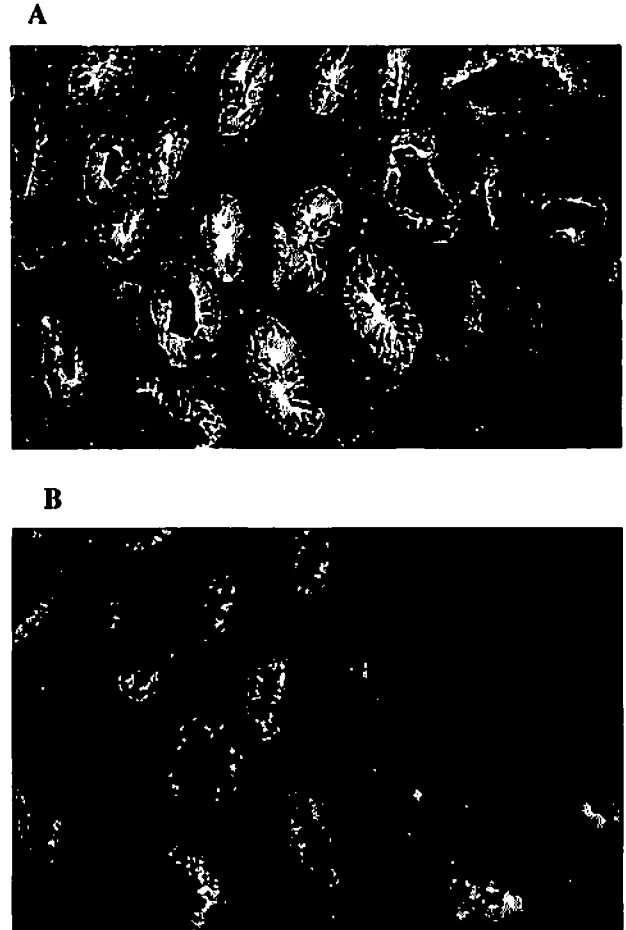
括弧内の値はパーセントを示す。

iNOS の染色は UC 患者の沈静化および活動性の炎症大腸粘膜を比較した。組織学的 grade は軽度及び中等度 (grade2 または 3) と重度の炎症 (grade4 または 5) に分けた。(Kimura H et al : Gut 42 : 180-187, 1998 の表1を許可を得て転載、改変)

|                                    | Grades 2 and 3 (n=17) |                          | Grades 4 and 5 (n=16) |                          |
|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
|                                    | Quiescent mucosa      | Actively inflamed mucosa | Quiescent mucosa      | Actively inflamed mucosa |
| Negative                           | 16 (94)               | 8 (47)                   | 15 (94)               | 0 (0)                    |
| Epithelium only                    | 0 (0)                 | 0 (0)                    | 0 (0)                 | 2 (12)                   |
| Lamina propria only                | 1 (6)                 | 6 (35)                   | 0 (0)                 | 3 (19)                   |
| Both epithelium and lamina propria | 0 (0)                 | 3 (19)                   | 1 (6)                 | 11 (69)                  |



第7図 UC 活動期炎症粘膜の iNOS の免疫組織化学的検討。iNOS 免疫反応の局在は iNOS (macNOS) に対する抗体を用いたラベルされた streptavidin-biotin 法にて検出した。活動性の高い (grade4) 炎症粘膜のより得られた生検標本 (A) 著明な iNOS 陽性反応が粘膜固有層と同様に大腸粘膜の粘膜上皮にて観察された (B) 1次抗体を反応させないネガティブコントロール写真を示す (拡大率 ×100)



第8図 UC 活動性炎症粘膜における iNOS 活性の免疫組織化学的検討。iNOS 免疫反応の局在は iNOS (macNOS) に対する抗体を用いたラベルされた streptavidin-biotin 法にて検出した。バイオプシー片は grade5 の非常に活動性野高い炎症粘膜より得られた。この症例では iNOS 反応は大腸粘膜の粘膜上皮にて確認された (A) 1次抗体のないネガティブコントロール写真を示す (B) (拡大率 ×100) (Kimura H et al : Gut 42 : 180-187, 1998 の第4図を許可を得て転載, 改変)

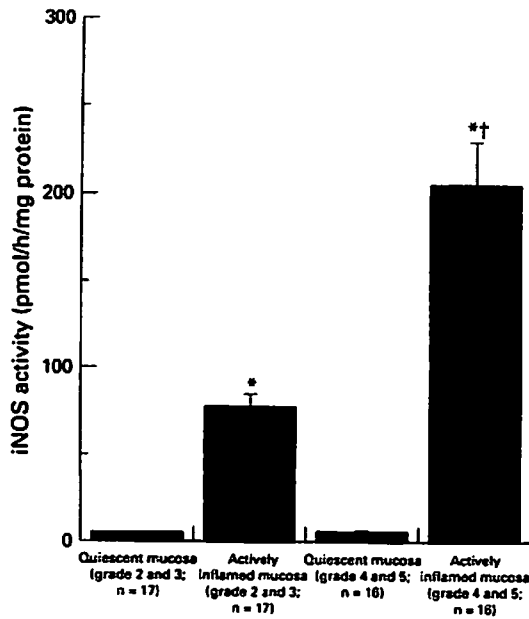
第2表 活動性 UC 患者の大腸組織のニトロタイロシン免疫反応の局在と陽性率

括弧内の値はパーセントを示す。

Nitrotyrosine の染色は UC 患者の非炎症部および活動性の炎症部大腸粘膜を比較した。

組織学的 grade は軽度及び中等度 (grade2 または 3) と重度の炎症 (grade4 または 5)。 (Kimura H et al : Gut 42 : 180-187, 1998 の表2 を許可を得て転載, 改変)

|                                    | Grades 2 and 3 (n=17) |                          | Grades 4 and 5 (n=16) |                          |
|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
|                                    | Quiescent mucosa      | Actively inflamed mucosa | Quiescent mucosa      | Actively inflamed mucosa |
| Negative                           | 17 (100)              | 10 (59)                  | 16 (100)              | 0 (0)                    |
| Epithelium only                    | 0 (0)                 | 0 (0)                    | 0 (0)                 | 1 (6)                    |
| Lamina propria only                | 0 (0)                 | 7 (41)                   | 0 (0)                 | 12 (75)                  |
| Both epithelium and lamina propria | 0 (0)                 | 0 (0)                    | 0 (0)                 | 3 (19)                   |



第9図 活動期 UC 患者の炎症大腸粘膜における iNOS 酵素活性と iNOS 免疫反応の部位の関係。値は平均と標準偏差で表されている。\*P<0.05 iNOS 免疫反応のない大腸粘膜と比較。†P<0.05 粘膜固有層と上皮細胞両者にて iNOS 免疫反応が観察された大腸粘膜と比較 (Kimura H et al: Gut 42: 180-187, 1998 の第5図を許可を得て転載、改変)

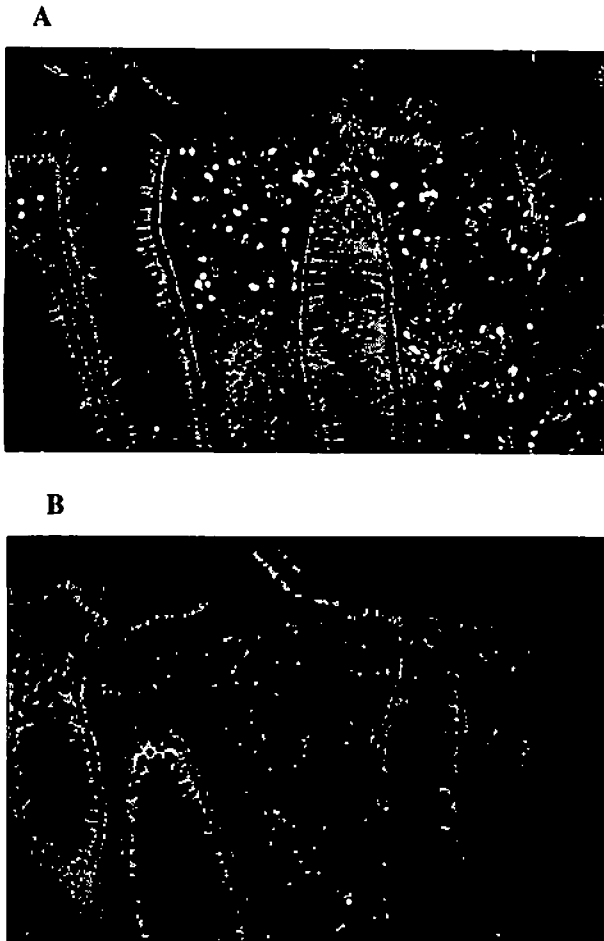
においては、全ての生検標本において nitrotyrosine 免疫反応が陽性を示しており、この nitrotyrosine 反応の75%は粘膜固有層のみで認められた。一方、その他においては nitrotyrosine の反応は第7図に示すように粘膜上皮においても認められた。

### 考 察

活動性炎症性腸疾患患者の腸管においては、NOの産生増大が慢性炎症に伴う組織傷害機序に何らかの役割を果たしていると考えられている<sup>8, 9, 13)</sup>。本研究において著者は血漿 NOx 値と UC および CD 患者の炎症性粘膜における誘導型 NOS (iNOS) 活性との間に正の相関を見出した<sup>21)</sup>。この相関は UC 患者においてより明瞭なものであった。さらに、血漿 NOx 濃度は、非活動性 UC の患者に比べ、活動性 UC 患者において著明に上昇していた。この所見に一致して、UC 患者の大腸粘膜における NOS 活性の上昇は、組織学的や内視鏡的なスコアによる疾患の活動性に良く相関することも証明した。

従って増加した全身の NO は、炎症を生じている腸粘膜における NO 産生増大を主に反映しているということ、少なくとも UC においては示唆していると思われる。活動期の UC 患者において、上昇した腸粘膜 NOS 活性はほとんどがカルシウム非依存性の誘導型タイプ (iNOS) であり、カルシウム依存性の構成型タイプ (cNOS) はあまり変化がないということも今回の検討で明らかとなった。したがって、これらの炎症時に cNOS によって産生される NO の、全身の NO に対する貢献度は少ないものであると考えられる。免疫組織学的には、組織的に高度の炎症を有する患者の大腸粘膜は、より軽度の grade の炎症を有する組織よりも iNOS 免疫反応陽性をより高率に呈していたことを今回の検討で示した<sup>22)</sup>。増大した NO 産生は活動性炎症粘膜に限られており、iNOS 免疫反応はこれらの患者の肉眼的に正常な非炎症部粘膜にては事実上検出されなかった。また、Miller らは<sup>23)</sup>iNOS を阻害するアミノグアニジンを含んだ飲料の摂取はモルモットにおけるトリニトロベンゼンスルホン酸惹起性腸炎の炎症反応を用量依存的に抑制したと報告している。これらの所見より、炎症が存在する腸管においては iNOS による NO 産生の異常な増加は炎症の更なる増悪において重要な因子となり、組織傷害の進行の鍵を握るかもしれないと想定される。実際、iNOS 欠損マウスを用いた実験では dextran sulfate sodium による実験的大腸炎の発症や程度が抑制される成績が得られている<sup>24, 25)</sup>。

大腸粘膜における増大した NO 産生源は、今まで確認されていない。しかしながら、炎症粘膜に集積した食細胞系の白血球 (好中球, 単球, マクロファージ) が潜在的に傷害性のフリーラジカルの重要な発生源となっているといういくつかの証拠がある<sup>11, 12)</sup>。Grisham らは<sup>26)</sup>循環血流内でなく、血管外に遊走した好中球が iNOS の酵素活性によって非常に大量の NO を産生するというを示した。炎症性腸疾患における小腸または大腸の炎症は leukotrieneB4 や platelet-activating factor のような炎症性メディエーターの放出と同様に組織由来のサイトカインの増大に関係している<sup>27)</sup>。さらには、これらのサイトカインのいくつかは食能のある白血球 NOS の誘導因子として知られている<sup>1, 2)</sup>。内皮細胞、線維芽細胞や肥満細胞も炎症が生じた組織における NO 産生に貢献しているであろう。これらの活性の主な部分は一般的にカルシウム依存性であるとされている<sup>2)</sup>。しかしながら近年、小腸上皮細胞自身が NO の重要な産生源であるという証拠が示されており、エンドトキシンやさまざまなサイトカインに対しての反応として、培



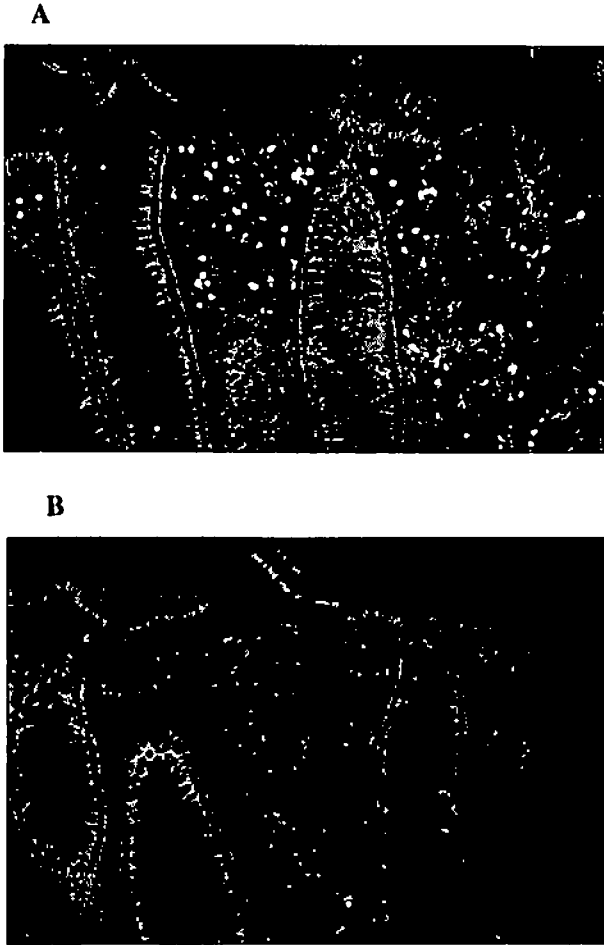
第 10 図 UC の活動期炎症粘膜における nitrotyrosine の免疫組織化学。免疫反応の局在は nitrotyrosine に対する抗体を用いて、ラベルされた streptavidin-biotin 法にて検出した。生検標本は grade4 の活動性炎症を示す粘膜より得られた。Nitrotyrosine 免疫反応は大腸粘膜の粘膜固有層にて観察された (A) 1 次抗体を反応させないネガティブコントロール写真を示す (B) (拡大率 ×400) (Kimura H et al : Gut 42 : 180-187, 1998 の第 6 図を許可を得て転載、改変)

養小腸上皮細胞において、iNOS 活性および NOx 産生は増大することが示された<sup>28, 29)</sup>。さらに、炎症性腸疾患患者の炎症性の大腸粘膜にて iNOS が誘導されうとの報告がみられる<sup>30, 31)</sup>。これらの知見や今回の著者の潰瘍性大腸炎の高度の活動性炎症のみられる粘膜上皮で高率に iNOS 免疫反応が見られたことは、粘膜上皮が慢性炎症時に重要な NO 産生源となっていること、および上皮での NO 産生が強く関わっていることを示唆している。尚、本研究において、腸炎患者からの活動性炎症粘

膜において iNOS 活性が酵素学的手法にて検出されたが、iNOS 免疫反応が観察されない場合がみられた。この食い違いの理由は不明であるが、iNOS に対する特異抗体での組織学的な検討はより感度が低いという可能性、および低い活性は非特異的なバックグラウンド染色との区別ができないことが考えられる。

炎症性腸疾患において過剰に産生された NO が如何にして組織傷害と関連するかという機序については不明な点が多い。炎症が生じている腸管の微小血管内皮では傷害により NO への反応性が変化しているという報告もみられる<sup>32)</sup>。NO の過剰産生が炎症を促進することによる一つのメカニズムとしては、多核白血球と単球の遊走能を起こさせる能力が考えられる<sup>33, 34)</sup>。NO が組織傷害と炎症を促進する他のメカニズムは、細胞内鉄の放出、ミトコンドリア機能の抑制そして DNA 合成の抑制に関係している<sup>35-37)</sup>。NO は酸素分子と速やかに反応し、さまざまな酸化及び窒素化合物を産生するという能力により間接的に組織傷害を起こしている可能性も考えられる<sup>6)</sup>。炎症性腸疾患の活動性粘膜では細胞上皮や細胞間領域の細胞骨格を構成するタンパク質に酸化ストレスやニトロ化が生じていると報告されている<sup>38)</sup>。Weitzman ら<sup>39)</sup>や Thomas ら<sup>40)</sup>は白血球由来の oxidant が毒性を示さない濃度においても *in vitro* にて突然変異性があり、大腸における慢性炎症と悪性新生物発生に関係している可能性を指摘している。さらに、N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> のような NO の自動的な酸化産物は *in vitro* においてニトロ化や変異性の能力がある<sup>41, 42)</sup>。細菌により多量に産生される 1 次または 2 次アミン類とともに UC の管腔の低い pH コンディションは N-ニトロソ化合物の産生に促進的である<sup>43)</sup>。また、腸内細菌をリファマイシンなどの抗生剤により抑える事により、サイトカイン産生や NO 産生の減少により大腸炎モデルが改善する事から、大腸細菌叢が NO 代謝を介して腸炎の病態に大きい影響を与えている可能性も考えられた<sup>44)</sup>。また本研究に示したような大腸粘膜における著しい NO 産生の存在は、特に慢性的に炎症の存在する大腸において NO 依存性のニトロソ化合物および酸化化合物の寄与を通して、潰瘍性大腸炎における悪性変異化を促進する可能性があると思われる。

Peroxynitrite ion はスーパーオキシドと NO の速やかな反応により産生される反応性のある酸化物である<sup>5, 45)</sup>。Peroxynitrite は蛋白と反応してチロシンの水酸基のとなりの 3 位にニトロ基がつくことで安定した産生物である nitrotyrosine となる。二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) のような他の NO 類による生体内でのチロシンのニトロ化は理論的には可能であるが実際には少ないも



第 10 図 UC の活動期炎症粘膜における nitrotyrosine の免疫組織化学。免疫反応の局在は nitrotyrosine に対する抗体を用いて、ラベルされた streptavidin-biotin 法にて検出した。生検標本は grade4 の活動性炎症を示す粘膜より得られた。Nitrotyrosine 免疫反応は大腸粘膜の粘膜固有層にて観察された (A) 1 次抗体を反応させないネガティブコントロール写真を示す (B) (拡大率 ×400) (Kimura H et al: Gut 42: 180-187, 1998 の第 6 図を許可を得て転載, 改変)

養小腸上皮細胞において、iNOS 活性および NOx 産生は増大することが示された<sup>28, 29)</sup>。さらに、炎症性腸疾患患者の炎症性の大腸粘膜にて iNOS が誘導されうとの報告がみられる<sup>30, 31)</sup>。これらの知見や今回の著者の潰瘍性大腸炎の高度の活動性炎症のみられる粘膜上皮で高率に iNOS 免疫反応が見られたことは、粘膜上皮が慢性炎症時に重要な NO 産生源となっていること、および上皮での NO 産生が強く関わっていることを示唆している。尚、本研究において、腸炎患者からの活動性炎症粘

膜において iNOS 活性が酵素学的手法にて検出されたが、iNOS 免疫反応が観察されない場合がみられた。この食い違いの理由は不明であるが、iNOS に対する特異抗体での組織学的な検討はより感度が低いという可能性、および低い活性は非特異的なバックグラウンド染色との区別ができないことが考えられる。

炎症性腸疾患において過剰に産生された NO が如何にして組織傷害と関連するかという機序については不明な点が多い。炎症が生じている腸管の微小血管内皮では傷害により NO への反応性が変化しているという報告もみられる<sup>32)</sup>。NO の過剰産生が炎症を促進することによる一つのメカニズムとしては、多核白血球と単球の遊走能を起こさせる能力が考えられる<sup>33, 34)</sup>。NO が組織傷害と炎症を促進する他のメカニズムは、細胞内鉄の放出、ミトコンドリア機能の抑制そして DNA 合成の抑制に関係している<sup>35-37)</sup>。NO は酸素分子と速やかに反応し、さまざまな酸化及び窒素化合物を産生するという能力により間接的に組織傷害を起こしている可能性も考えられる<sup>6)</sup>。炎症性腸疾患の活動性粘膜では細胞上皮や細胞間領域の細胞骨格を構成するタンパク質に酸化ストレスやニトロ化が生じていると報告されている<sup>38)</sup>。Weitzman ら<sup>39)</sup>や Thomas ら<sup>40)</sup>は白血球由来の oxidant が毒性を示さない濃度においても *in vitro* にて突然変異性があり、大腸における慢性炎症と悪性新生物発生に関係している可能性を指摘している。さらに、N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> のような NO の自動的な酸化産物は *in vitro* においてニトロ化や変異性の能力がある<sup>41, 42)</sup>。細菌により多量に産生される 1 次または 2 次アミン類とともに UC の管腔の低い pH コンディションは N-ニトロソ化合物の産生に促進的である<sup>43)</sup>。また、腸内細菌をリファマイシンなどの抗生剤により抑える事により、サイトカイン産生や NO 産生の減少により大腸炎モデルが改善する事から、大腸細菌叢が NO 代謝を介して腸炎の病態に大きい影響を与えている可能性も考えられた<sup>44)</sup>。また本研究に示したような大腸粘膜における著しい NO 産生の存在は、特に慢性的に炎症の存在する大腸において NO 依存性のニトロソ化合物および酸化化合物の寄与を通して、潰瘍性大腸炎における悪性変異化を促進する可能性があると思われた。

Peroxynitrite ion はスーパーオキシドと NO の速やかな反応により産生される反応性のある酸化物である<sup>5, 45)</sup>。Peroxynitrite は蛋白と反応してチロシンの水酸基のとなりの 3 位にニトロ基がつくことで安定した産生物である nitrotyrosine となる。二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) のような他の NO 類による生体内でのチロシンのニトロ化は理論的には可能であるが実際には少ないも

のである<sup>46)</sup>。Peroxynitriteの免疫反応の著明な増大は急性のエンドトキセミアによるラットの動脈と肺にて報告されている<sup>47, 48)</sup>。Kooyら<sup>49)</sup>は窒素由来酸化物はヒトでの急性肺傷害において産生されることを示し、peroxynitriteは炎症性肺疾患において重要な酸化物質であるかもしれないと示唆している。実験的なモルモットの腸炎では、Millerら<sup>23)</sup>は免疫組織化学的にnitrotyrosineとiNOSは同じ場所に局在しており、NO産生阻害はnitrotyrosine産生を防ぐということを示している。今回著者はnitrotyrosineに対する特異的な抗体を用いて、活動性UC患者の炎症粘膜の傷害においてperoxynitriteのようなNO由来の酸化物質の影響を証明することにより、チロシンの窒素化が活動性UC患者の大腸粘膜においてin situに生じていることを示した。Nitrotyrosine染色の陽性率も疾患の活動性の増大とともに増加し、活動性UC患者の不可逆的な組織傷害に関係していると考えられた。しかしながら、nitrotyrosine染色は主に粘膜固有層にて観察された。これはNO自体がチロシンのニトロ化を起こすのではないので、貪食性白血球からのスーパーオキシドアニオンが簡単に到達し得ない粘膜上皮にては産生されにくいためと考えられた。

クローン病では、炎症粘膜において増大したiNOS活性を観察できた。UC患者におけるNOS活性が、活動性のCD患者の活性よりも2倍高いという以前の論文<sup>13)</sup>とは異なり、本研究では、CD患者での炎症粘膜におけるiNOS活性の上昇の程度は、活動性UC患者のそれと相違はなかった。一方で、CD患者の炎症粘膜でのcNOS活性は、UC患者においては見られないような著明な上昇を認めた。正確な原因は分からないが、この相違はおそらく炎症組織でのcNOS活性に影響を与えるような、貪食性の白血球ではない例えば内皮細胞などの違いによるものではないかと考えられる。さらに、CD患者の炎症の無いまたは「沈静化した」粘膜においても著明にiNOS活性が上昇し、炎症粘膜のiNOS活性とそれほど違いがない値を示したことは着目すべき点である。UCおよびCD患者の血漿IL-6の違いと同様に、酵素活性の違いはこれらの疾患の病態の重要な違いと関連しているかもしれない<sup>12)</sup>。CD非炎症粘膜におけるiNOS活性の上昇を説明するいくつかの可能性は存在する。一つの可能性は、正常粘膜に覆われながらもこのような場所では粘膜固有層へのマクロファージやリンパ球の集積を伴った早期の粘膜炎症性変化があるというものである<sup>50)</sup>。もう一つの可能性として、沈静化した粘膜も異常な量の炎症性メディエーターを放出するように感作され

ている可能性があるということである。Wardkeらは<sup>17)</sup>大腸粘膜バイオプシーの培養にて、CD患者の一見正常な粘膜が正常人よりも多くのエイコサノイドを産生する事を発見した。炎症細胞の著明な反応能力の増大はBaldassano<sup>51)</sup>や著者らのグループ<sup>52)</sup>によっても証明されている。第3の可能性は、CDにおけるiNOS活性の増加は炎症細胞からだけでなく、性質が変化した上皮細胞や腸管平滑筋、粘膜下ニューロンからの由来もあるということである<sup>50)</sup>。

本研究の対象患者の多くが、炎症性メディエーターの放出を抑制するとされる副腎皮質ステロイドやサラゾピリンを投与されていたという点は考慮すべき点である。特に、副腎皮質ステロイドはiNOS活性の抑制剤として知られている。それゆえに、本検討結果がサイトカインを含めこれらの影響によりバイアスがかかったものであると想像はできる。しかしながら、血漿NOx濃度や粘膜NOS活性と患者群が服用している薬剤との間に(データは示してはいないが)何の関連性も見い出せなかった。さらには、そのような治療は炎症反応を最小化するものと期待されているもので、ステロイド治療は腸管粘膜固有層のマクロファージの数を直接増加させるという可能性は残るが、従って治療薬剤は著者が観察したNO産生増大の原因とはならないと考えられた。

以上のことよりiNOSを介するNO合成はUCおよびCD患者の炎症を起こしている大腸粘膜において有意に増加しているものと結論した。特にUC患者においては増加したiNOS活性は末梢血のNO濃度や大腸の炎症の程度に良く相関し、NOとくに大腸上皮のそれが病態の増悪と密接に関係する可能性が考えられた。一方、CD患者においてはcNOSを介したNO合成は炎症粘膜において上昇しており、炎症粘膜での炎症性細胞のみがNO産生の増加の原因ではないことを示すものと思われる。さらにiNOS活性の著明な上昇が非炎症部の粘膜においても観察された。このようなUCやCDにおけるNOの違いはこれらの疾患における特徴的な臨床像の違いと関連する可能性があると考えられた。

## 総 括

1. 腸粘膜におけるnitric oxideの産生増大は、炎症性腸疾患の増悪因子となっている可能性がある。本研究では、潰瘍性大腸炎患者およびCrohn病患者における血中のnitric oxideと大腸粘膜のNO合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)活性を測定し、病変の活動性との関連性を検討した。さらに潰

瘍性大腸炎患者の大腸粘膜において、炎症の程度と誘導型 NOS (iNOS) 発現およびペルオキシナイトライト (peroxynitrite) 産生との関連につき組織学的に検討した。

2. 活動期の潰瘍性大腸炎患者および Crohn 病患者の血清中 NOx 濃度は著明に上昇し、患者大腸粘膜の NOS 活性と血清 NOx 濃度には正の相関が認められた。
3. 活動期潰瘍性大腸炎患者においては、iNOS 活性は病変部において著明に上昇がみられたが、非病変部の粘膜においてもわずかに上昇がみられた。この iNOS 活性の増加は内視鏡的及び組織学的な炎症の grading と相関していた。iNOS 免疫染色では粘膜固有層のみならず粘膜上皮にての強い発現を認めた。一方、構成型 NOS (cNOS) 活性の増大は潰瘍性大腸炎患者においては認められなかった。また、peroxynitrite の産生は活動性のある炎症粘膜の粘膜固有層にて観察された。
4. それに対して、Crohn 病患者では病変部のみならず非病変部の肉眼的に正常な粘膜においても iNOS 活性の著明な増大を認めた。さらに cNOS 活性に関しても病変部において上昇が認められた。
5. 以上の結果より、炎症性腸疾患患者の血中の NOx 濃度上昇は腸管の炎症を反映している可能性が考えられた。粘膜内で産生される iNOS 由来の nitric oxide およびその代謝産物は炎症性腸疾患の大腸粘膜における炎症と組織障害に密接に関係している可能性を明らかにしえた。しかし一方潰瘍性大腸炎と Crohn 病においては腸管病変における nitric oxide に両者で差異がみられる可能性があると考えられた。

稿を終えるに当たり、御指導・御校正を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に感謝いたします。また、直接御指導下さいました防衛医科大学校内科学第二講座三浦総一郎教授に感謝いたします。また、研究に御協力いただいた慶應義塾大学医学部消化器内科研究室内の諸先生方に感謝いたします。

#### 文献

- 1) Moncada S, Higgs A : The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329 : 2002-2012, 1993
- 2) Nathan C : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 : 3051-3064, 1992
- 3) Stuehr DJ, Nathan CF : Nitric oxide : A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory in-

hibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169 : 1543-1555, 1989

- 4) Kurose I, Miura S, Fukumura D, Yonei Y, Saito H, Tada S, Suematsu M, Tsuchiya M : Nitric oxide mediates Kupffer cell-induced reduction of mitochondrial energization in hepatoma cells : A comparison with oxidative burst. *Cancer Res* 53 : 2676-2682, 1993
- 5) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1620-1625, 1990
- 6) Roediger WEW, Lawson MJ, Radcliffe BC : Nitrite from inflammatory cells : A cancer risk factor in ulcerative colitis? *Dis Colon Rectum* 33 : 1034-1036, 1990
- 7) Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO : Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 341 : 465-466, 1993
- 8) Miller MJS, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, Kakkis JL, Clark DA : Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 264 : 11-16, 1993
- 9) Yamada T, Sartor RB, Marshall S, Specian RD, Grisham MB : Mucosal injury and inflammation in a model of granulomatous colitis in rats. *Gastroenterology* 104 : 759-777, 1993
- 10) Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJR, Moncada S : Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 342 : 338-340, 1993
- 11) Grisham MB, Specian RD, Zimmerman TE : Effects of nitric oxide synthase inhibition on the pathophysiology observed in a model of chronic granulomatous colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 271 : 1114-1121, 1994
- 12) Kirsner JB, Shorter RG : *Inflammatory Bowel Disease*, ed 3. Philadelphia, Lea & Febiger, 1988
- 13) Rachmilewitz D, Stampler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK : Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 36 : 718-723, 1995
- 14) Hibi T, Ohara M, Kobayashi K, Brown WR, Toda K, Takaishi H, Hosoda Y, Hayashi A, Iwao Y, Watanabe M, Aiso S, Kawai Y, Tsuchiya M : Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoprecipitation studies on anti-goblet cell antibody using a mucin producing cell line in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 35 : 224-230, 1994
- 15) Best WR, Beckett JM, Singelton JW, Kern F Jr : Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70 : 439-444, 1976
- 16) Rutegard I, Ahsgren L, Stenling R, Nilsson T : A sim-



- ple index for assessment of disease activity in patients with ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 37 : 110-112, 1990
- 17) Wardle TD, Hall L, Turnberg LA : Use of coculture of colonic mucosal biopsies to investigate the release of eicosanoids by inflamed and uninfamed mucosa from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 33 : 1644-1651, 1992
- 18) Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT : Metabolic fate of L-arginine in relation to microbostatic capacity of murine macrophages. *J Clin Invest* 85 : 264-273, 1990
- 19) Knowles RG, Merrett M, Salter M, Moncada S : Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 270 : 833-836, 1990
- 20) Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Herd ME, Dutt S, Turnberg LA : Comparison of delayed release 5-aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut* 29 : 669-674, 1988
- 21) Kimura H, Miura S, Shigematsu T, Ohokubo N, Tsuzuki Y, Kurose I, Higuchi H, Akiba Y, Hokari R, Hirokawa M, Serizawa H, and Ishii H : Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis and Sci* 42 : 1047-1054, 1997
- 22) Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, Kurose I, Higuchi H, Fujimori H, Tsuzuki Y, Serizawa H, Ishii H : Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 42 : 180-187, 1998
- 23) Miller MJS, Thompson JH, Zhang X-J, et al. role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 1995 ; 109 : 1475-83.
- 24) Hokari R, Kato S, Matsuzaki K, Kuroki M, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, Miyahara T, Itoh K, Sekizuka E, Nagata H, Ishii H, Miura S. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to chronic colitis. *Free Radic Biol Med* 31 : 153-63, 2001
- 25) Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen : divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 194 : 1207-1218, 2001
- 26) Grisham MB, Miles AM, Owens M, Johnson GG : Molecular, biochemical and cellular characterization of the inducible nitrite oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes (PMNs). *Gastroenterology* 106 : A693, 1994
- 27) Sartor RB : Cytokines in intestinal inflammation : Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 106 : 533-539, 1994
- 28) Tepperman BL, Brown JF, Whittle BJR : Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *Am J Physiol* 265 : G214-G218, 1993
- 29) Dignass AU, Podolsky DK, Rachmilewitz D : NOx generation by cultured small intestinal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 40 : 1859-1865, 1995
- 30) Reynolds PD, Middleton SJ, Hunter JO, Facer P, Bishop A, Evans T, Polak JM : High expression of iNOS in colonic mucosa in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 108 : A903, 1995
- 31) Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stinson WF : Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111 : 871-885, 1996
- 32) Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, Gutterman DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease : Loss of nitric oxide-mediated vasodilation. *Gastroenterology* 125 : 58-69, 2003
- 33) Belenky SN, Robbins RA, Rennard SI, Gossman GL, Nelson KJ, Rubinstein I : Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. *J Lab Clin Med* 122 : 388-394, 1993
- 34) Belenky SN, Robbins RA, Rubinstein I : Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J Leukoc Biol* 53 : 498-503, 1993
- 35) Granger DL, Taintor RR, Cook JL, Hibbs JB : Injury of neoplastic cells by murine macrophages leads to inhibition of mitochondrial respiration. *J Clin Invest* 65 : 357-370, 1980
- 36) Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z : Iron depletion : Possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 123 : 716-723, 1984
- 37) Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF : Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 174 : 761-767, 1991
- 38) Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y, Fields JZ. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 52 : 720-728, 2003
- 39) Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer : role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76 : 655-63, 1990
- 40) Thomas EL, Jefferson MM, Bennett JJ, Learn DB : Mutagenic activity of chloramines. *Mutat Res* 188 : 35-43, 1987
- 41) Nguyen T, Brunson D, Crespit C : DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 3030-4, 1992
- 42) Grisham MB, Yamada T : Neutrophils, nitrogen oxide, and inflammatory bowel disease. *Ann NY*

- Acad Sci 664 : 103-10, 1992
- 43) Roediger WEW, Lawson MJ, Radcliffe BC : Nitrite from inflammatory cells : a cancer risk factor in ulcerative colitis? *Dis Colon Rectum* 33 : 1034-6, 1990
- 44) Stefano F, Eleonora D, Andrea M : Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifazimin modulates lamina propria monocytic cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. *Digestion* 66 : 246-256, 2002
- 45) Huie RE, Padmaja S : The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18 : 195-9, 1993
- 46) Beckman JS, Crow JP : Pathological implications of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* 21 : 330-4, 1993
- 47) Szabo C, Salzman AL, Ichiroopoulos H : Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta *in vivo*. 363 : 235-8, 1995
- 48) Witzemann TM, Gardner CR, Laskin JD : Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 56 : 159-68, 1994
- 49) Kooy NW, Royall JA, Ye YZ : Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 151 : 1250-4, 1995
- 50) Sankey EA, Dhillon AP, Anthony A, Wakefield AJ, Sim R, More L, Hudson M, Sawyerr AM, Pounder RE : Early mucosal changes in Crohn's disease. *Gut* 34 : 375-381, 1993
- 51) Baldassano RN, Schreiber S, Johnston RB Jr, Fu RD, Muraki T, MacDermott RP : Crohn's disease monocytes are primed for accentuated release of toxic oxygen metabolites. *Gastroenterology* 105 : 60-66, 1993
- 52) Suematsu M, Suzuki M, Kitahora T, Miura S, Suzuki K, Hibi T, Watanabe M, Nagata H, Asakura H, Tsuchiya M : Increased respiratory burst of leukocytes in inflammatory bowel diseases --- The analysis of free radical generation by using chemiluminescence probe. *J Clin Lab Immunol* 24 : 125-128, 1987
-

学位論文

抗アレルギー薬トラニラストの糸球体腎炎の進行抑制効果に関する研究

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

ちから いし あき ひろ  
力 石 昭 宏

(平成 16 年 2 月 18 日受付)

Key Words : tranilast, monocyte chemoattractant protein-1, anti-Thy 1.1 nephritis, nuclear factor- $\kappa$ B, mesangial cell

今日我が国の透析患者は 20 万人に達し、新規透析導入患者も年間約 3 万人に及び、その増加傾向が留まる兆しは認めていない。透析導入の原疾患としては慢性糸球体腎炎と糖尿病性腎症がその原因の約 3 分の 1 ずつを占めている<sup>1)</sup>。糸球体腎炎の根本的な原因は現時点で未解明ではあるが、一度糸球体での炎症サイクルが始まれば、それが糸球体硬化に向かうプロセスはほぼ共通の経路をたどると考えられている。糸球体腎炎において、腎糸球体及び間質領域へのマクロファージの浸潤は病変の活動性を示唆する重要な所見であり、炎症の進展にマクロファージが関与する一連のプロセスは以下のように説明される<sup>2)</sup>。当初、何らかの誘因（例えばウィルス感染や免疫学的な機序など）を契機として糸球体に浸潤したマクロファージは種々のプロテアーゼや活性酸素により係締壁を障害して蛋白尿を生じさせるとともに、多種多様なサイトカインや増殖因子を放出して糸球体構成細胞、特にメサンギウム細胞を活性化し、活性化により形質転換したメサンギウム細胞は過剰な増殖と細胞外基質を産生させると同時に、サイトカインや走化活性化因子を分泌してさらにマクロファージを呼び寄せる<sup>3)</sup>。このような糸球体内の炎症サイクルは間質領域にも波及し、サイトカインや尿蛋白により刺激を受けた尿細管細胞が、サイトカインや走化活性化因子を分泌して尿細管間質領域にもマクロファージの浸潤や筋線維芽細胞の増生を認めるようになる<sup>4)</sup>。このような炎症の増幅サイクルが遷延することにより、最終的に糸球体硬化・腎間質の線維化へ

至ると考えられている。以上から糸球体腎炎の進展機序において、マクロファージの浸潤とそれに引き続くメサンギウム細胞の活性化という一連の過程が共通のプロセスとして重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに近年では糸球体腎炎のみならず、糖尿病腎症の進展過程にもマクロファージが深く関与していることも明らかに becoming<sup>5)</sup>。

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は白血球走化活性化因子である C-C ケモカインサブファミリーの一種で主に単球/マクロファージの炎症部位への誘導・活性化の中心的役割を担っている<sup>6)</sup>。ヒト腎疾患では炎症糸球体・間質領域において MCP-1 の発現増加が認められ、これはマクロファージの浸潤の程度とよく相関する<sup>7, 8)</sup>。また糸球体腎炎患者の尿中 MCP-1 排泄量は炎症活動性をよく反映し、さらに治療反応性の指標としての有用性も指摘されている<sup>9, 10)</sup>。細胞実験では、interleukin-1 $\beta$ をはじめとするサイトカインや lipopolysaccharide によりメサンギウム細胞・尿細管上皮細胞において MCP-1 の産生・分泌が誘導されるが<sup>8)</sup>、これは、腎実質を構成する細胞が炎症に直接関与するとの考えを支持するものである。さらに、腎炎の実験モデルにおける検討では、抗 MCP-1 中和抗体の投与によりマクロファージ浸潤と糸球体硬化が抑制されることが報告されている<sup>11-13)</sup>。以上から腎炎局所で産生される MCP-1 がマクロファージの浸潤・活性化を介して炎症の進展に重要な役割を果たしていることが示唆される。

本論文は Chikaraishi A, Hirahashi J, Takase O, Marumo T, Hishikawa K, Hayashi M, Saruta T : Tranilast inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat mesangial cells. Eur J of Pharmacol 427 : 151-158, 2001 の一部を含む。

このように MCP-1 が新たな治療法の標的として注目されつつあるにも関わらず、MCP-1 の発現抑制効果を有する実用的な薬剤は極めて限定されているのが現状である<sup>7)</sup>。

トラニラスト、(N-(3,4-demethoxycinnamoyl)-anthranilic acid) は、従来、アトピー性皮膚炎、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患の治療に広く臨床的に用いられてきた薬剤である。トラニラストは、線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生を抑制することから、過剰な皮膚の癬痕やケロイド形成を予防する目的でも使用されている<sup>11)</sup>。さらに、近年では、経皮的冠動脈形成術 (PTCA) 後の著明な再狭窄抑制効果が報告され (TREAT)<sup>12)</sup> 注目されている。この効果を説明する機序としては、platelet derived growth factor (PDGF) や transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) による血管平滑筋細胞の基質産生・増殖・遊走作用などを抑制する効果<sup>16, 17)</sup>、血管病変におけるマクロファージ由来のサイトカインや活性酸素の放出を抑制する作用<sup>18, 19)</sup>などが想定されている。しかしながら、現時点でトラニラストの腎疾患への応用を検討した報告例は極めて限られている。In vitro では当教室の Hishikawa らがメサンギウム細胞において PDGF による細胞増殖を当薬剤が抑制することを示したのが最初の報告例であり<sup>20)</sup>、メサンギウム細胞・尿細管細胞など腎実質細胞における MCP-1 の産生・分泌に対する影響を検討した報告はなされていない。動物実験モデルにおいても当薬剤の糸球体腎炎に対する投与効果は検討されていないのが現状である。

抗 Thy 1.1 抗体メサンギウム増殖性腎炎 (以下 Thy 1.1 腎炎) はラットメサンギウム細胞に発現する Thy 1.1 抗原に対する抗体を投与することにより惹起されるメサンギウム増殖性腎炎のモデルである<sup>21)</sup>。ラットに経静脈的に抗 Thy 1.1 抗体を投与すると、同抗体が補体依存性にメサンギウム細胞を融解し (mesangiolytic)、その後、反応性にメサンギウム細胞の増殖・基質産生が過剰に生じて、メサンギウム増殖性腎炎に近似した組織像を呈するようになる。この初期段階の mesangiolytic は、抗体投与の直後から 2, 3 日目にかけて認められ、この時期にはメサンギウム細胞数は著明に減少し、糸球体内にはマクロファージや好中球の浸潤を伴うようになる。この時期を過ぎるとメサンギウム細胞が再出現し、5 日目から 10 日目頃には活性化して形質転換したメサンギウム細胞による反応性の過剰な増殖像や細胞外基質の蓄積を認めるようになる。このメサンギウム細胞の活性化の過程にマクロファージなどから放出されるサイトカインや増殖因子、特に PDGF や TGF- $\beta$  が重要である

ことが明らかとなっている<sup>3)</sup>。この Thy 1.1 腎炎において、抗 MCP-1 中和抗体の投与により糸球体内浸潤マクロファージの減少のみならず最終的な糸球体硬化が抑制され<sup>11, 12)</sup>、かつ糸球体での MCP-1 産生の主要な起源がメサンギウム細胞であることも報告されている<sup>22)</sup>。従って同モデルではメサンギウム細胞由来の MCP-1 が腎臓における炎症進展の鍵であり、MCP-1 の抑制作用に基づく糸球体腎炎の改善効果を確認する上で最適な実験モデルと考えられる。

以上を踏まえて今回我々はメサンギウム細胞・尿細管細胞における MCP-1 の誘導・分泌に対するトラニラストの影響・その作用機序につき検討する<sup>23)</sup>とともに、ラット Thy 1.1 腎炎に対してトラニラストを投与して、腎障害改善効果の有無、炎症局所へのマクロファージ浸潤に対する効果、さらに MCP-1 発現への影響につき検討した。

## 材料と方法

### 1. 腎実質細胞の MCP-1 誘導に対するトラニラストの作用の検討・機序の解明

#### 1) 細胞培養

ラット糸球体メサンギウム細胞は Sprague-Dawley ラットの腎臓より既報の方法に従って採取した<sup>24)</sup>。実験には第 5-12 代のメサンギウム細胞を使用し、37°C、5% の CO<sub>2</sub> の状況下で 10% 新生仔牛血清と Insulin-Transferrin-Selenium Supplements を含む RPMI 1640 培地で培養した。細胞が 70% から 80% の密度となった後、培養液を維持培地 (0.5% 新生仔牛血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) に交換し、48 時間培養した。

ラット尿細管上皮細胞 NRK52E 細胞<sup>25)</sup> (American Type Culture Collection, Rockville, MD) は成長培地として 5% 新生仔牛血清を含む DMEM を維持培地として無血清の DMEM を使用して同様に培養した。

以下のいずれの実験においてもトラニラストは interleukin-1 $\beta$  添加 1 時間前より添加した。

#### 2) MCP-1 発現に対するトラニラストの影響

MCP-1 蛋白分泌量は ELISA 法により測定した。48 穴プレートに培養したメサンギウム細胞 (あるいは NRK 52E 細胞) に 0.2nM の濃度の interleukin-1 $\beta$  (以下 IL-1 $\beta$  と略す; Genzyme, MNPS, MN) を加え、12 時間培養を続けた。その後培養上清を採取し、MCP-1 測定用 ELISA kit (Biosource International, Camarillo, SA) を使用し MCP-1 蛋白濃度を測定した。

MCP-1 mRNA の発現量はノザンプロット法により検討した。10 cm ディッシュに培養したメサングウム細胞（あるいはNRK 52E細胞）に0.2nMのIL-1 $\beta$ を6時間（NRK 52E細胞は4時間）作用させた後、RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて細胞からtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNA (10  $\mu$ g) を変性ホルムアデヒドゲルで電気泳動後、hybond N' nylon membrane (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK) に転写した。マウスMCP-1 (Dr. Rollins (Boston, MA) より供与) およびヒトglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Clontech, Palo Aito, CA) に対する特異的cDNAに対してPrime a Gene labeling system (Clontech) を用いてランダムプライマー法により<sup>32</sup>P 標識を行った。転写後のメンブレンをプローブとハイブリダイズし洗浄した後、BAS 2000 (Fuji Film Institution, Tokyo, Japan) システムを用いて放射活性を測定した。MCP-1 mRNA 発現量はMCP-1 とGAPDHの放射活性比を求め定量した。

### 3) NF- $\kappa$ B 活性化に対するトラニラストの影響

核転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B (以下NF- $\kappa$ B) 依存性の転写活性はルシフェラーゼ活性測定系により検討した。24穴プレートに培養したメサングウム細胞に0.5  $\mu$ gのpNF- $\kappa$ B-Luc (Dr. Schmid (Ulm, German) より供与) をSuperfect kit (Qiagen) を用いてトランスフェクトした。トランスフェクション効率を標準化する目的で0.16  $\mu$ gのpRL-TK ベクター (Promega, Madison, WI) も同時にトランスフェクトした。トランスフェクション24時間後、細胞をIL-1 $\beta$ で6時間刺激し、細胞溶解液のルシフェラーゼ活性をdual luciferase assay system (Promega) を用いて測定した。NF- $\kappa$ B 依存性転写活性は $\kappa$ Bルシフェラーゼ活性とpRL-TKルシフェラーゼ活性の比を算出して補正した。

NF- $\kappa$ BのDNA結合能はelectromobility shift assay (以下EMSAと略す)により検討した。6cmディッシュに培養したメサングウム細胞をIL-1 $\beta$ で1, 3, 6時間刺激した後、細胞から既報の方法<sup>24)</sup>に従い核蛋白成分を抽出した。Gel shift assay core system kit (Promega) を用いて5'ラベリング法によりNF- $\kappa$ B結合領域を含むオリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>P標識しプローブを作成した。核蛋白(6  $\mu$ g)と標識プローブ(3000カウント)を室温で20分間結合反応させた後、6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ゲルを吸引乾燥後、X線フィルムに露光した。競合アッセイとして標識プローブ添加前に予め100倍濃度の非標識オリゴヌクレオチドを核蛋白と10分間反応させたものを使用した。また、スー

パーシフト解析のために予め1  $\mu$ gの特異的抗p65抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) もしくは抗p50抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を核蛋白に添加し4°Cで12時間反応させたものを、標識プローブとの結合反応に用いた。

### 4) MAP kinaseの活性化に対するトラニラストの影響

Mitogen-activated protein (MAP) kinaseの主要3経路 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, Jun N-terminal kinase (JNK) 経路の活性化はそれぞれ抗リン酸化ERK, p38, JNK抗体を用いたウェスタンプロット法により検討した。6穴プレートに培養したメサングウム細胞(各穴当り5 $\times$ 10<sup>5</sup>の細胞数)をIL-1 $\beta$ で刺激後0, 15, 30分の時点で既報の方法に従い全細胞蛋白溶解液を調整した<sup>25)</sup>。20  $\mu$ gの蛋白溶解液を12.5% SDS ポリアクリルアミドゲルで泳動後、Hybond ECL (Amersham) に転写した。転写後のメンブレンはブロッキング後、1000倍希釈の抗リン酸化MAP kinase一次抗体(抗リン酸化ERK抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗リン酸化p38抗体 (New England Biolabs, Beverly, MA), 抗リン酸化JNK抗体 (Promega)) に室温で一晩反応させた。洗浄後、100倍希釈のhorseradishペロキシダーゼ結合二次抗体と室温で1時間結合反応を行い、化学冷光法(ECL; Amersham) で目的のバンドを発色させX線フィルムに感光させた。リン酸化MAP kinaseの検出後のメンブレンは抗体を除去した後、1000倍希釈の抗MAP kinase抗体(抗ERK抗体 (Santa Cruz), 抗p-38抗体 (New England Biolab), 抗JNK抗体 (New England Biolab)) を一次抗体として再度ハイブリダイズを行った。

## 2. 糸球体腎炎モデル(ラットThy-1.1腎炎)に対するトラニラストの投与効果の検討

### 1) モデル動物の作成・トラニラストの投与方法

メサングウム増殖性腎炎の動物モデルであるThy-1.1腎炎は6週齢の雌Wistarラット(Charles River社)にモノクローナル抗体1-22-3(新潟大学腎研河内裕先生より供与<sup>26)</sup>)250  $\mu$ g / 100g体重を尾静脈から投与することにより作成した。トラニラストは腎炎惹起2日前よりトラニラスト原末(キッセイ製薬より供与)400 mg/kg体重を粉末状の餌(CA-1, 日本クレア)に混じて連日投与した。コントロール群に対しては腎炎惹起時に生理食塩水0.4 mlを尾静脈より投与した。コントロール群、腎炎未治療群、腎炎トラニラスト治療群の各群6

匹ずつの動物は代謝ケージで飼育し、連日蓄尿を行い、尿中排泄アルブミンを定量した。腎炎惹起後7日目にtail-cuff 血圧測定器(夏目 KW210)にて血圧を測定後、麻酔下にて腎臓ならびに血液を採取し、腎炎の治療効果の評価のため以下に示す項目について解析を行った。

動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドを遵守して施行した。

## 2) PAS 染色標本の評価

生理食塩水で灌流後に摘出した腎臓は10%ホルマリンで固定後にパラフィン包埋し、periodic acid-Schiff (PAS) 染色した。各検体の糸球体障害の程度は既報の方法に基づき、メサンギウム細胞と細胞外基質の領域拡大の程度により以下の基準に従って半定量的にスコア化した<sup>27)</sup>；0=糸球体内細胞数、基質沈着とも正常、1=細胞数増多・基質過剰沈着を認める領域が糸球体面積の25%以下、2=細胞数増多・基質過剰沈着を認める領域が糸球体面積の25%以上50%以下、3=細胞数増多・基質過剰沈着を認める領域が糸球体面積の50%以上75%以下、4=細胞数増多・基質過剰沈着を認める領域が糸球体面積の75%以上。各ラットより得られた腎臓の50以上の糸球体のスコアの平均値を算出し、この値より各群の平均スコアを算出した。

## 3) 腎臓の免疫組織染色

マクロファージの浸潤ならびに活性化メサンギウム細胞と間質筋線維芽細胞を評価する目的で、ED-1 抗原および $\alpha$ -smooth muscle actin (以下 $\alpha$ -SMA) の免疫組織染色を行った。腎臓組織をED-1 染色用にperiodate-lysine-paraformaldehyde液で、 $\alpha$ -SMA 染色用に4%パラホルムアルデヒド液にそれぞれ浸し4°Cで一晩固定し、濃度勾配をつけたシュークロス液で洗浄後、液体窒素にてOCT (optimal cutting temperature) 包埋した。6  $\mu$ m の薄切切片は洗浄、内因性ペロキシダーゼの失活化、ブロッキングを行った後、一次抗体として100倍希釈のマウスモノクローナル抗ラットED-1 抗体(Pharmingen, San Diego, CA) もしくは50倍希釈のマウスモノクローナル抗 $\alpha$ -SMA 抗体(DAKO, Glostrup, Denmark))にて室温で1時間反応させた。3回洗浄をくり返した後、1000倍希釈のビオチン化抗マウス二次抗体を室温で30分間結合させ、さらにアビジン-ビオチン-ペロキシダーゼ試薬(DAKO)に30分間反応させた。洗浄後、diaminobendine chromogen 含有ペロキシダーゼ発色色素にて発色反応を行った。

糸球体および腎間質のED-1 発現は、各検体につき30以上の糸球体もしくは20視野以上の高倍率(200倍)の腎皮質の間質領域に観察されるED-1 陽性細胞数

を数え、1糸球体当たり、もしくは間質領域の1視野当りの陽性細胞数の平均値を算出することにより評価した。

活性化メサンギウム細胞の指標である糸球体の $\alpha$ -SMA 発現は既報の方法に従って以下のように0から4の5段階のスコアに半定量的に分類した<sup>27)</sup>；0=染色されず、1=糸球体当たり25%以下の陽性率、2=糸球体当たり25%以上50%以下の陽性率、3=糸球体当たり50%以上75%以下の陽性率、4=糸球体当たり75%以上の陽性率。腎間質筋線維芽細胞の指標である間質領域の $\alpha$ -SMA 発現は以下に示す基準に基づいて0から3の4段階のスコアに分類した；0=染色されず、1=間質領域5%以下の陽性率、2=間質領域5%以上10%以下の陽性率、3=間質領域10%以上の陽性率。各検体につき30以上の糸球体および20視野以上の高倍率(200倍)の間質領域のスコアの平均値を算出した。

## 4) 尿 MCP-1 の定量

蓄尿検体のMCP-1 濃度はELISA kit (Biosource) を使用して測定を行い、一日当たりの排泄量は尿中濃度に一日尿量を乗ずることにより算出した。

## 3. 統計

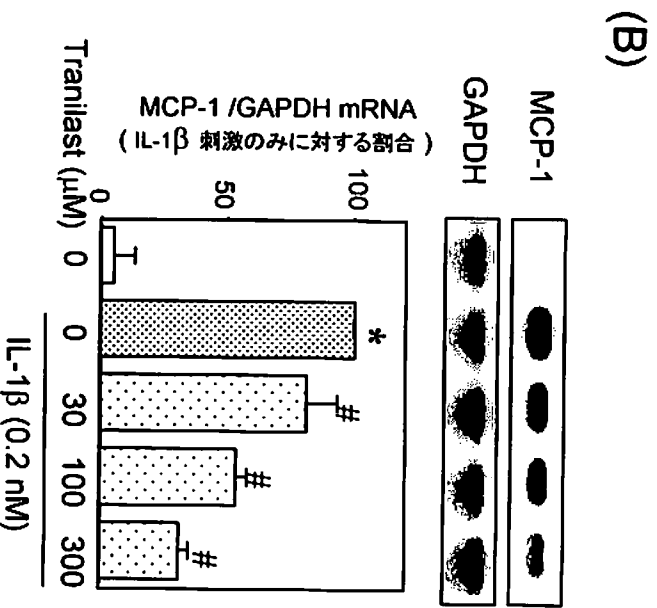
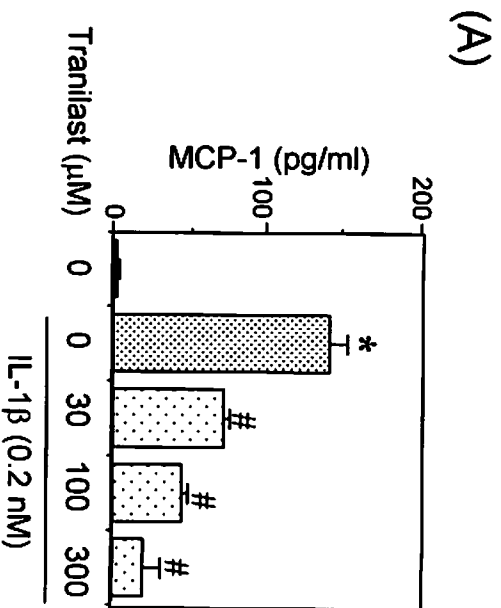
数値は平均値標準誤差で表した。2群の比較にはpaired-t テストを、3群以上の比較にはone-way analysis of variance (ANOVA) を用い、有意差を認めた場合にはFisherのpost hoc テストによる多重比較を行った。P<0.05を有意差ありと判断した。

## 結 果

### 1. 腎実質細胞のMCP-1 誘導に対するトラニラストの作用の検討・機序の解明

#### 1) メサンギウム細胞におけるinterleukin-1 $\beta$ によるMCP-1 発現誘導に対するトラニラストの影響

培養メサンギウム細胞の培養上清中のMCP-1 蛋白量をELISA法で測定した。IL-1 $\beta$ はMCP-1の発現誘導を介して腎障害の進展過程に重要な役割を担うことが明らかとなっている<sup>8)</sup>。非刺激条件下のメサンギウム細胞は極少量のMCP-1 分泌を認めたのみであったが、IL-1 $\beta$ 刺激により著明なMCP-1の分泌増加を認めた。MCP-1 分泌量はIL-1 $\beta$  0.2nMでピークに達したため、以後全ての実験においてこの濃度のIL-1 $\beta$ を使用した。種々の濃度(30  $\mu$ Mから300  $\mu$ M)のトラニラストを添加しIL-1 $\beta$  刺激12時間後の培養上清中のMCP-1 分泌の変化を比較したところ、トラニラストは濃度依存的にMCP-1 分泌量を抑制した(第1図A)。なお、細胞のバ



第1図 マンギウム細胞における interleukin-1β (IL-1β) 刺激による monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 分泌量 (A), mRNA 発現量 (B) に対するトラニラストの抑制効果. (A) マンギウム細胞を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度 (30 μM から 300 μM) のトラニラスト添加条件下で刺激し, 12時間後の培養上清中の MCP-1 分泌量を ELISA 法にて計測し比較した. 数値は平均値±標準誤差を表す (n=4). \* P<0.05 コントロール群と比較; # P<0.05 IL-1β刺激単独群と比較. (B) マンギウム細胞を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度 (30 μM から 300 μM) のトラニラスト添加条件下で刺激し, 6時間後の MCP-1 mRNA 発現量をノザンブロット法にて比較した. 数値は平均値±標準誤差を表す (n=4). \* P<0.05 コントロール群と比較; # P<0.05 IL-1β刺激単独群と比較. (Chikaraishi A et al: Eur J Pharmacology 427: 151-158, 2001) の第1図を許可を得て転載)

イアピリチナーをみるためにトリパンブルー染色にて生細胞数と死細胞数の割合を求めたところ, 本実験で用いたトラニラスト濃度では細胞のバイアピリチナーには影響を認めなかった.

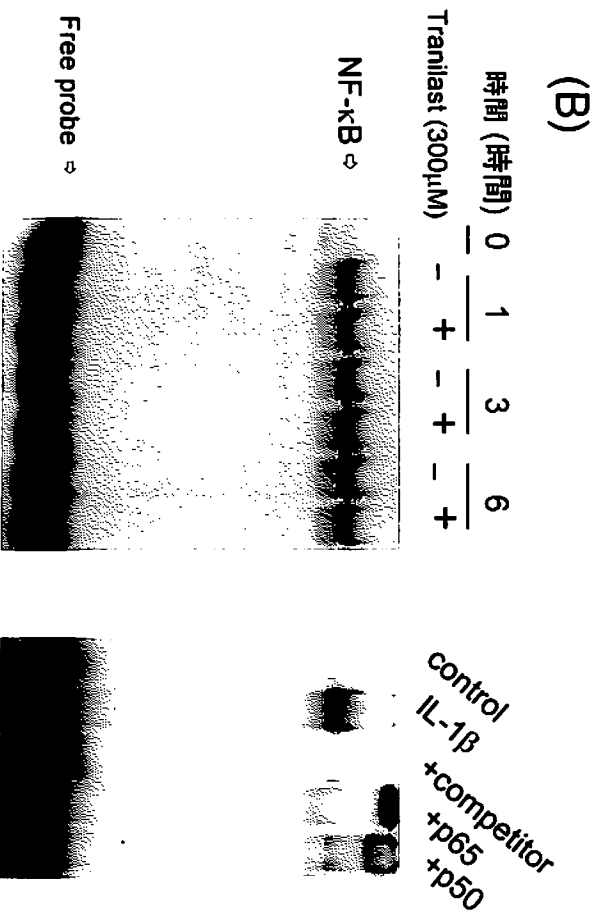
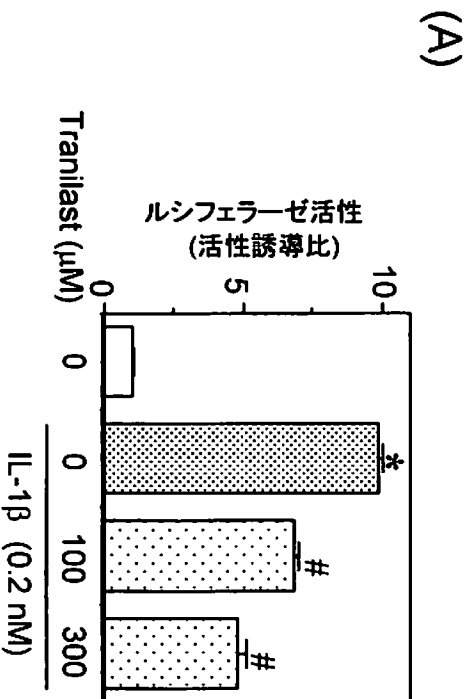
ノザンブロット法を用いたマンギウム細胞の IL-1β 刺激による MCP-1 mRNA 発現誘導の検討では, IL-1β 刺激 6 時間後に MCP-1 mRNA の発現量が最大となることから明らかとなった. IL-1β 刺激 6 時間後の MCP-1 mRNA の発現はトラニラストの添加により濃度依存性に抑制された (第1図B). アクチノマイシンDの存在下で新たな mRNA の転写を抑制し, トラニラスト添加の有無による IL-1β 刺激後の MCP-1 mRNA の分解速度を比較検討した実験では, トラニラストは MCP-1 mRNA の分解速度に影響せず, トラニラストの MCP-1 mRNA 発現抑制は主に転写レベルへの作用によるものであることが示唆された.

## 2) IL-1β刺激による NF-κB 活性化に対するトラニラストの影響

マンギウム細胞において IL-1β 刺激による MCP-1 の発現誘導に核転写因子 NF-κB の活性化が重要であることが報告されている<sup>28, 29)</sup>. まず, IL-1β 刺激による NF-κB 依存性の転写活性化をルシフェラーゼアッセイ法で検討した. 第2図Aに示すようにトラニラストは IL-1β 刺激後 6 時間の NF-κB 依存性のルシフェラーゼ活性を有意に抑制した. トラニラストが IL-1β 刺激による NF-κB 活性化を抑制することが明らかとなったため, 次にトラニラストが NF-κB の DNA 結合能に影響するか否かを EMSA 法で検討した. 第2図Bに示すように IL-1β は NF-κB の DNA 結合能を著明に増強し, この効果は刺激 6 時間まで持続した. トラニラストは NF-κB の DNA 結合能に対する抑制効果を示さなかった. EMSA における NF-κB のバンドの特異性は過剰量の非標識オリゴヌクレオチドを用いた競合アッセイによる目的バンドの消失により確認した. また特異的抗 p-65 抗体および抗 p-50 抗体を核蛋白と前処置することにより目的バンドのスーパーシフトを認め, 目的バンドが p65 と p50 サブユニットのヘテロダイマーにより形成されていることが示唆された.

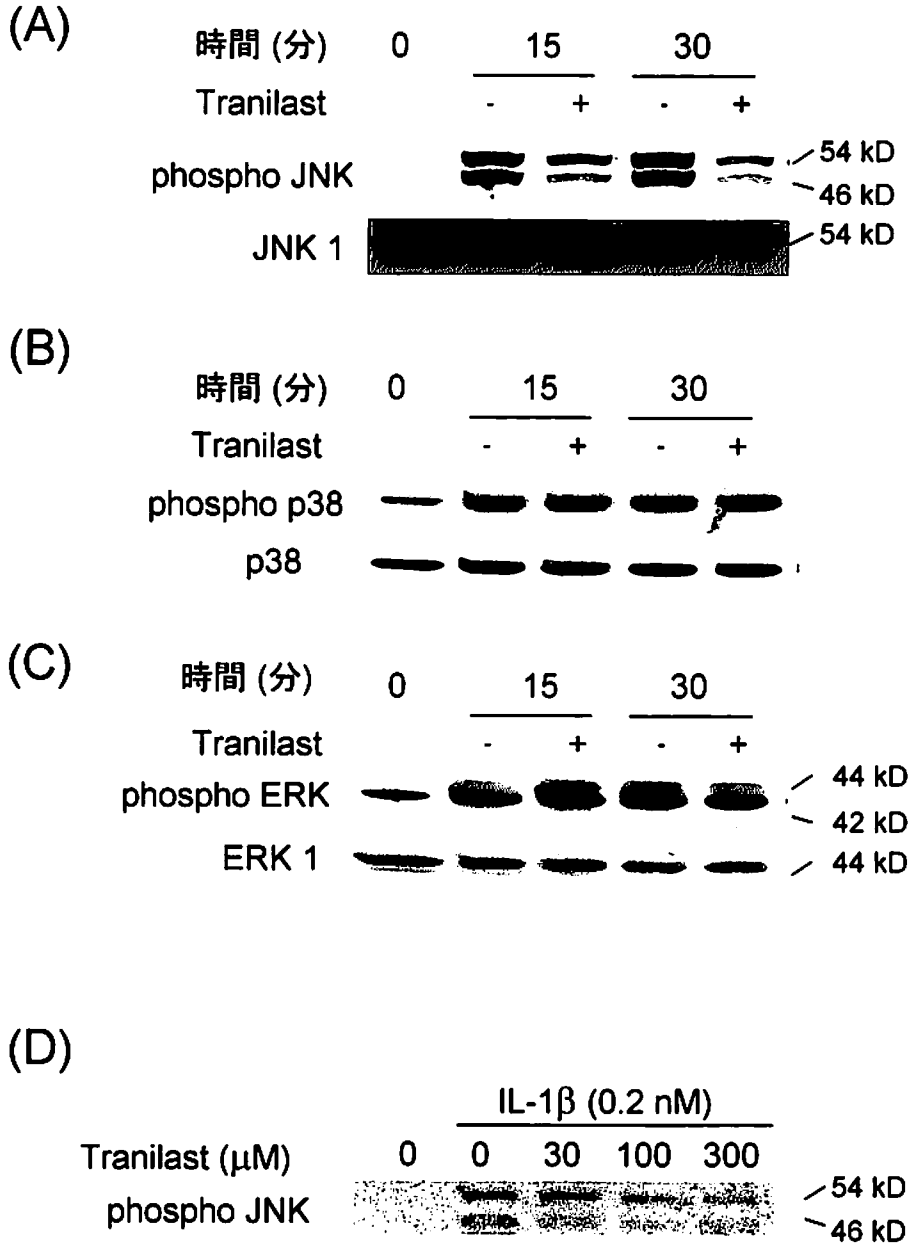
## 3) IL-1β 刺激による MAP kinase の活性化に対するトラニラストの影響

MAP kinase の 3 つの主要な経路 (ERK, p38, JNK) はいずれも NF-κB 依存性の転写活性化に関与していることが明らかとなっている<sup>30-32)</sup>. 今回, MAP kinase の活性化に及ぼすトラニラストの影響をウェスタンブロット法でリン酸化 MAP kinase を検出することにより検討



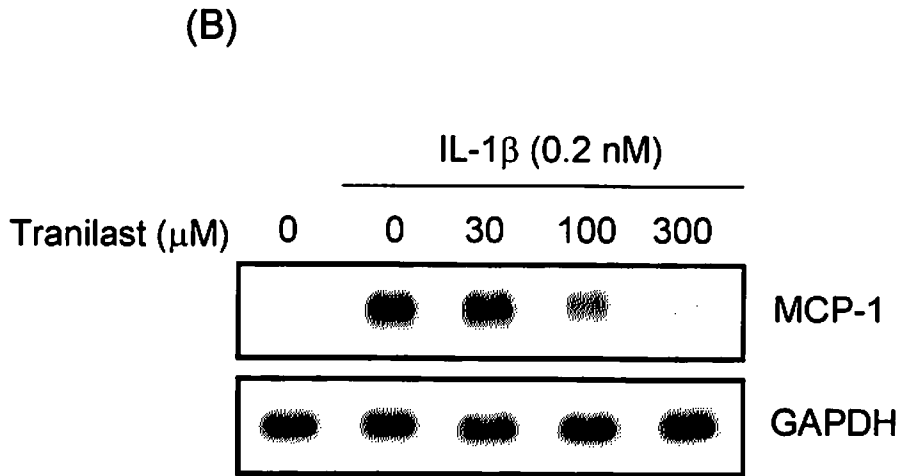
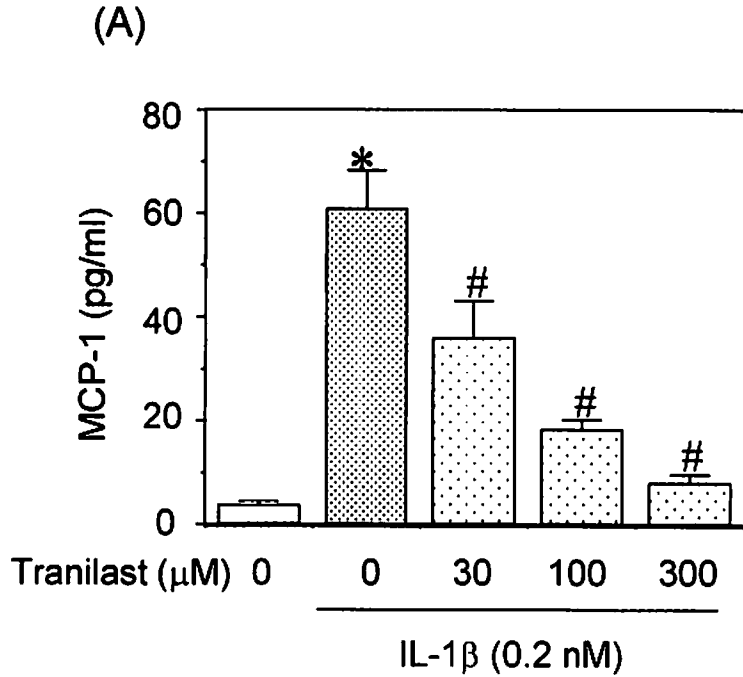
第2図 メサンギウム細胞における interleukin-1β (IL-1β) 刺激による核蛋白 nuclear factor-κB (NF-κB) 依存性の転写活性化 (A), DNA 結合能の誘導 (B) に対するトランスクリプトの影響の検討. (A) メサンギウム細胞に pNF-κB-Luc と PRL-TK ベクターをトランスフェクト後, IL-1β (0.2nM) あるいはトランスクリプト (100, 300 nM) 添加条件下で 6 時間刺激し, 細胞核溶解のルンフェラーゼ活性を測定した. NF-κB 依存性転写活性はκB ルンフェラーゼ活性と PRL-TK ルンフェラーゼ活性の比を算出して補正した. 数値は平均値±標準誤差を表す (n=5). \*P<0.05 コントロール群と比較; #P<0.05 interleukin-1β刺激単独群と比較. (B) メサンギウム細胞を IL-1β 単独あるいはトランスクリプト (300 nM) 添加条件下で 1, 3, 6 時間刺激した後, 核蛋白成分を抽出し, NF-κB の DNA 結合能を electromobility shift assay により解析した. 同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプリングを用いて 4 回行ったが結果は同様であった. 右図は競合解析 (100 倍濃度の非標識オリゴヌクレオチドを使用) およびスーパーシフト解析 (抗 p65 抗体, 抗 p50 抗体を使用) の結果を示す. (Chikaraishi A et al: Eur J Pharmacology 427: 151-158, 2001) の第3図を許可を得て転載)





第3図 メサングウム細胞における interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 刺激による3つの主要な mitogen-activated protein kinase (MAP kinase (Jun N-terminal kinase (JNK : A), p38 kinase (B), extracellular signal-regulated kinase (ERK : C))) の活性化に対するトラニラストの影響と、トラニラストの濃度を変化させた時の JNK の活性化に対する影響 (D) の検討。

(A, B, C) メサングウム細胞を IL-1 $\beta$  (0.2nM) 単独あるいはトラニラスト (300  $\mu\text{M}$ ) 添加条件下で刺激し、0, 15, 30 分の時点で蛋白溶解液を調整し、抗リン酸化 MAP kinase 一次抗体 (抗リン酸化 ERK 抗体, 抗リン酸化 p38 抗体, 抗リン酸化 JNK 抗体) を使用してウェスタンブロット法により解析した。リン酸化 MAP kinase の検出後のメンブレンは抗体を除去した後、抗 MAP kinase 抗体 (抗 ERK 抗体, 抗 p-38 抗体, 抗 JNK 抗体) を一次抗体として再度ウェスタンブロット法を行い、蛋白量を確認した。同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて3回行ったが結果は同様であった。(D) メサングウム細胞を IL-1 $\beta$  (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度 (30  $\mu\text{M}$  から 300  $\mu\text{M}$ ) のトラニラスト添加条件下で刺激し、30 分後の JNK の活性化を抗 JNK 抗体を使用したウェスタンブロット法により解析した。同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて3回行ったが結果は同様であった。(Chikaraishi A et al : Eur J Pharmacology 427 : 151-158, 2001) の第4図を許可を得て転載)



第4図 尿管上皮細胞における interleukin-1β (IL-1β) 刺激による monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 分泌量 (A), mRNA 発現量 (B) に対するトラニラストの抑制効果. (A) 尿管上皮細胞 (NRK52E) を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度 (30 μM から 300 μM) のトラニラスト添加条件下で刺激し, 12 時間後の培養上清中の MCP-1 分泌量を ELISA 法にて計測し比較した. 数値は平均値±標準誤差を表す (n=4). \*P<0.05 コントロール群と比較; #P<0.05 IL-1β 刺激単独群と比較. (B) メサンギウム細胞を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度 (30 μM から 300 μM) のトラニラスト添加条件下で刺激し, 6 時間後の MCP-1 mRNA 発現量をノザンプロット法にて比較した. 同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて 4 回行ったが結果は同様であった.

した。第3図Aに示すようにトラニラストはIL-1 $\beta$ 刺激によるJNKのリン酸化を抑制した。これに対し、トラニラストはIL-1 $\beta$ 刺激によるp38, ERKのリン酸化には影響せず(第3図B, C), トラニラストによる活性化の抑制はJNK選択的であることが明らかとなった。各種MAP kinase蛋白質量のレベルは総MAP kinaseに対する抗体(抗ERK抗体, 抗p38抗体, 抗JNK抗体)により検出されるバンドにより確認した。トラニラストによるJNK活性化の抑制効果は濃度依存性であった(第3図D)。

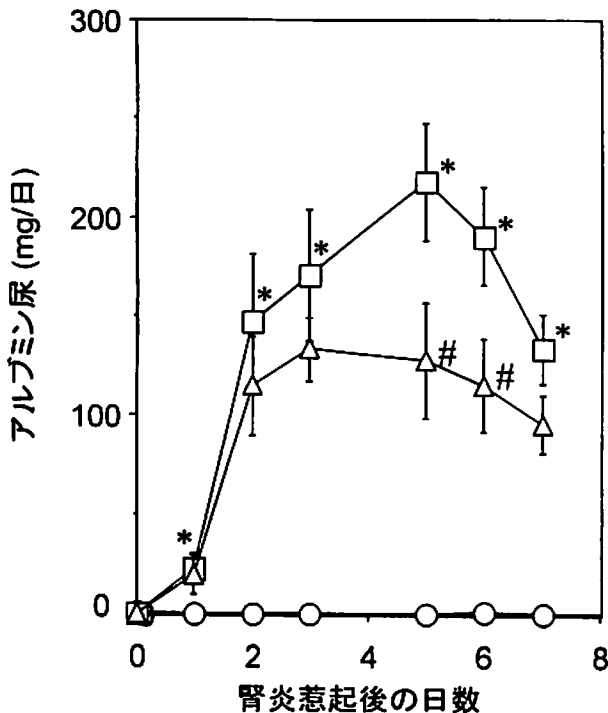
#### 4) 尿管上皮細胞におけるInterleukin-1 $\beta$ によるMCP-1発現誘導に対するトラニラストの影響

培養尿管上皮細胞NRK52E細胞においてもIL-1 $\beta$ 刺激(0.2nM)により著明なMCP-1の発現誘導を認め、これに対してトラニラストは濃度依存的にMCP-1蛋白(第4図A), mRNA(第4図B)の発現を抑制した。

### 2. 糸球体腎炎モデル(ラットThy 1.1腎炎)に対するトラニラストの投与効果の検討

#### 1) アルブミン尿に対するトラニラストの効果

第5図に示すようにMoAb 1-22-3投与直後より著明



第5図 Thy 1.1腎炎惹起後のアルブミン尿の経時的変化 (○:コントロール群, □:Thy 1.1腎炎無処置群, △:Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群)。数値は平均値±標準誤差を表す。\*P<0.05コントロール群と比較; #P<0.05Thy 1.1腎炎無処置群と比較。

な尿アルブミンの増加を認め、Thy 1.1腎炎無処置群においては腎炎誘発5日目まで増加傾向が持続して5日目にピークとなり、以後漸減傾向となった。これに対してThy 1.1腎炎トラニラスト投与群では腎炎3日目をピークに以後漸減傾向に転じ、5日目、6日目ではThy 1.1腎炎無処置群に比して有意に尿アルブミンは減少していた。コントロール群の尿アルブミン排泄量は極少量であった。

#### 2) 血液化学検査・血圧値の比較

腎炎誘発7日目における収縮期血圧値、体重、血液化学検査値を比較した。第1表に示すように収縮期血圧、体重は各群で変化を認めなかった。Thy 1.1腎炎無処置群の血清アルブミン値と血清総蛋白値は尿中への漏出を反映してコントロール群と比較して著明に減少したが、Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群ではこれらの減少の程度が有意に緩和されていた。腎機能に関しては、Thy 1.1腎炎無処置群ではコントロール群と比較して血清クレアチニン値が有意に上昇したが、Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群ではその上昇の程度が抑制される傾向を認め、コントロール群との間のクレアチニン値の変化は有意なものではなかった。

#### 3) 糸球体障害に対するトラニラストの効果

PAS染色標本により腎炎誘発7日目の腎臓の組織学的変化を評価した。過去の報告例にもあるように<sup>21, 26)</sup>Thy 1.1腎炎無処置群の糸球体(第6図B)はコントロール群(第6図A)と比較して著明な細胞増多と基質沈着の増加を認め、一部にメサンギウム融解像が残存していた。一方、Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群(第6図C)ではこのような糸球体の病的変化が改善しており、糸球体障害スコアの改善は腎炎無処置群と比較して有意であった(第6図D)。なお腎炎誘発24時間後のメサンギウム細胞融解(mesangiolysis)の程度はトラニラスト投与の有無により影響を受けなかった。

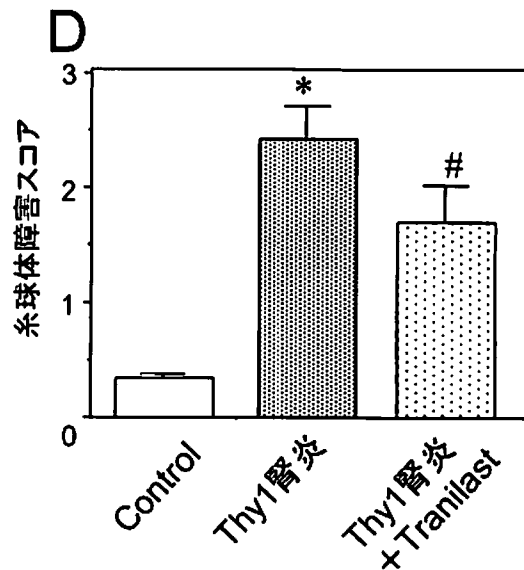
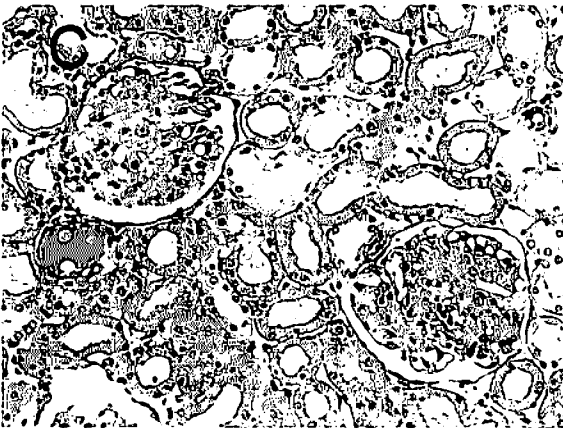
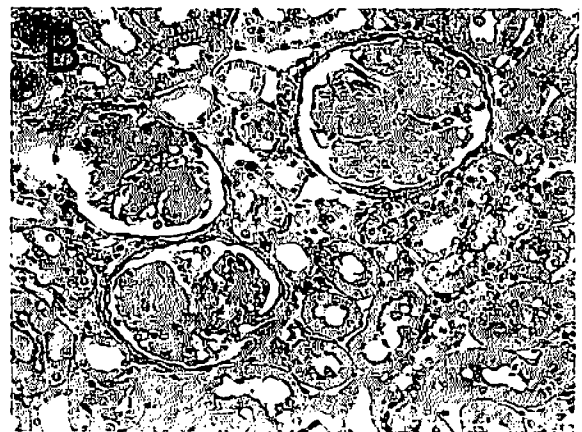
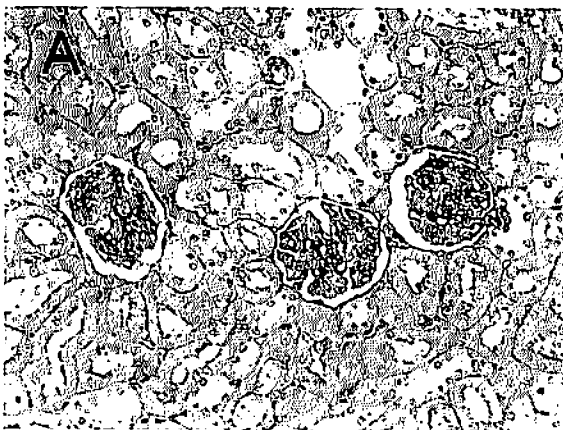
#### 4) 糸球体・間質領域へのマクロファージ浸潤に対するトラニラストの効果

Thy 1.1腎炎無処置群の糸球体内ED-1陽性マクロファージ数はコントロール群と比較して著明に増加した(第7図AとC)。これに対し、Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群の糸球体浸潤マクロファージ数は無処置群と比較して有意に減少していた(第7図Eと第8図A)。尿管間質領域においてもThy 1.1腎炎無処置群(第7図D)ではコントロール群(第7図B)と比較して軽度開大した間質空隙に有意なマクロファージの浸潤を認め、トラニラスト投与により浸潤マクロファージ数は有意に減少していた(第7図Fと第8図B)。

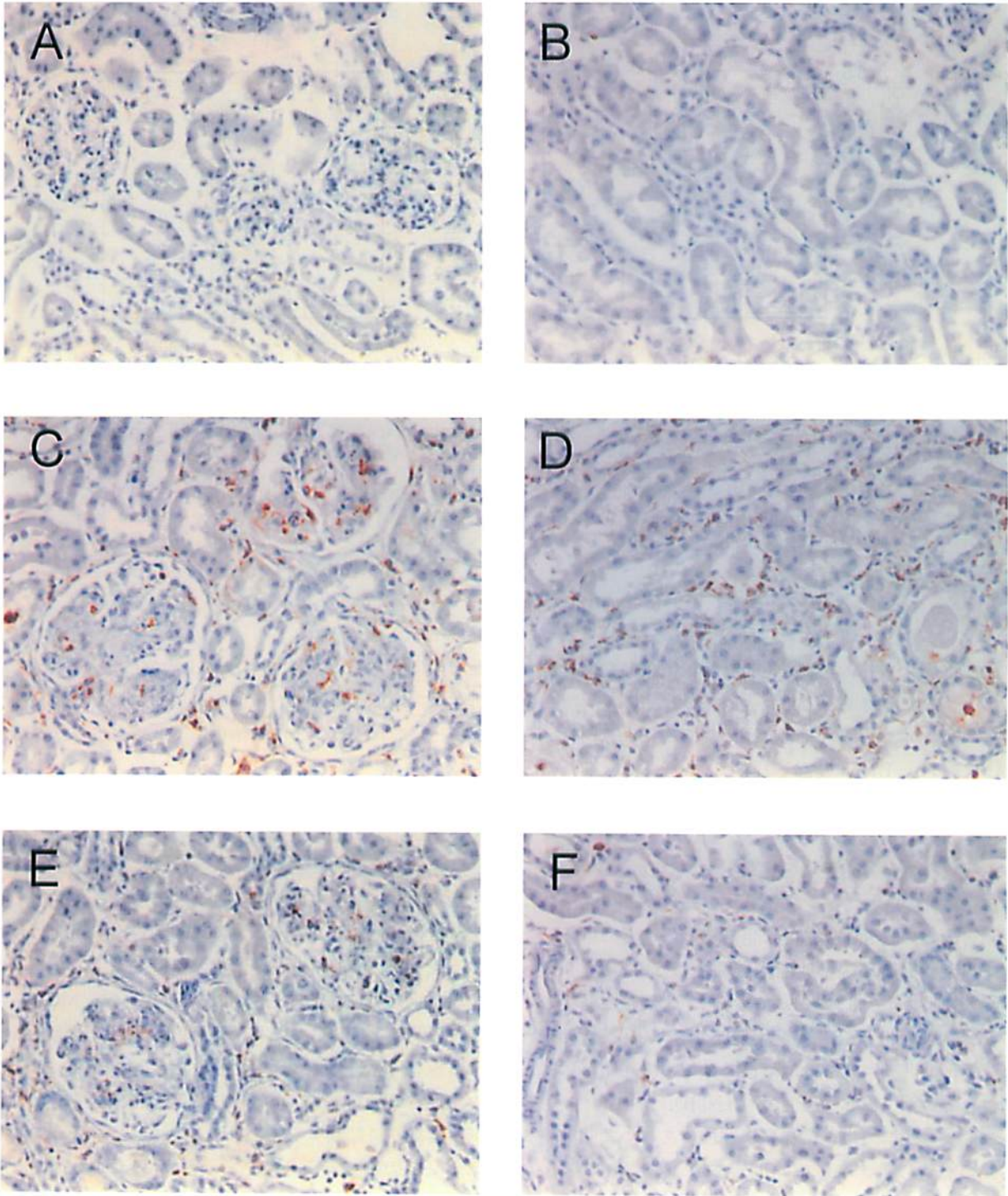
第1表 トラニラスト投与の体重・血圧・血液生化学値への影響

|                  | コントロール群   | 腎炎未治療群     | 腎炎+トラニラスト投与群           |
|------------------|-----------|------------|------------------------|
| 体重 (g)           | 164.2±2.0 | 162.5±5.2  | 159.5±4.2              |
| 収縮期血圧 (mmHg)     | 119±8     | 128±12     | 130±5                  |
| 血清総蛋白 (g/dl)     | 5.60±0.09 | 5.20±0.06* | 5.48±0.09 <sup>‡</sup> |
| 血清アルブミン (g/dl)   | 4.44±0.08 | 3.50±0.11* | 3.86±0.17**            |
| 血清クレアチニン (mg/dl) | 0.22±0.02 | 0.34±0.04* | 0.28±0.03              |

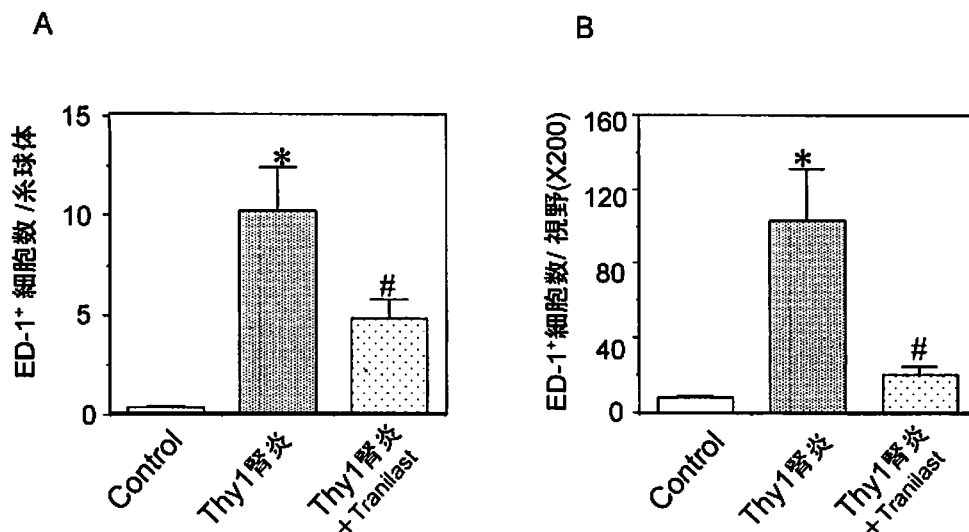
腎炎ラットにトラニラストを連日経口投与し、腎炎7日目に大動脈より採血した。数値は平均値±標準誤差を表す。\*P<0.05 コントロール群と比較；\*\*P<0.05 腎炎未治療群と比較。



第6図 A-C: 糸球体領域 (倍率×200) の periodic acid-Schiff 染色標本写真 (A: コントロール群, B: Thy 1.1 腎炎無処置群, C: Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群), D: 糸球体障害スコアの検討 (Control: コントロール群, Thy1 腎炎: Thy 1.1 腎炎無処置群, Thy1 腎炎+Tranilast: Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群)。数値は平均値±標準誤差を表す。\*P<0.05 コントロール群と比較；#P<0.05 Thy 1.1 腎炎無処置群と比較。



第7図 糸球体 (A, C, E; 倍率×200), 腎皮質間質領域 (B, D, F; 倍率×100) の ED-1 に対する免疫組織染色標本写真 (A, B: コントロール群, C, D: Thy 1.1 腎炎無処置群, E, F: Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群).



第8図 糸球体 (A), 皮質間質領域 (B) の ED-1 陽性細胞数の検討 (Control: コントロール群, Thy1 腎炎; Thy 1.1 腎炎無処置群, Thy1 腎炎 + Tranilast: Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群). 数値は平均値±標準誤差を表す. \*P<0.05 コントロール群と比較; #P<0.05 Thy 1.1 腎炎無処置群と比較.

5) 活性化メサンギウム細胞・間質筋線維芽細胞に対するトラニラストの効果

活性化メサンギウム細胞の指標である糸球体  $\alpha$ -SMA<sup>9)</sup>は, Thy 1.1 腎炎無処置群では糸球体構成細胞の大部分に発現を認め, メサンギウム細胞の著明な活性化が示唆された (第9図C). 一方, Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群では無処置群と比較して糸球体  $\alpha$ -SMA 発現が有意に抑制されていた (第9図Eと第10図A).

腎間質領域の  $\alpha$ -SMA 発現は間質障害の進展に重要な役割を果たす間質筋線維芽細胞を反映している<sup>9)</sup>. Thy 1.1 腎炎無処置群ではコントロール群と比較して軽度ではあるが有意な間質  $\alpha$ -SMA 発現増加を認め (第9図D), Thy 1.1 腎炎トラニラスト治療群ではこの増加が有意に抑制されていた (第9図Fと第10図B).

コントロール群では正常な発現部位である小葉間動脈レベルの脈管以外, 糸球体, 間質領域のいずれにも  $\alpha$ -SMA の発現は認めなかった (第9図AとB).

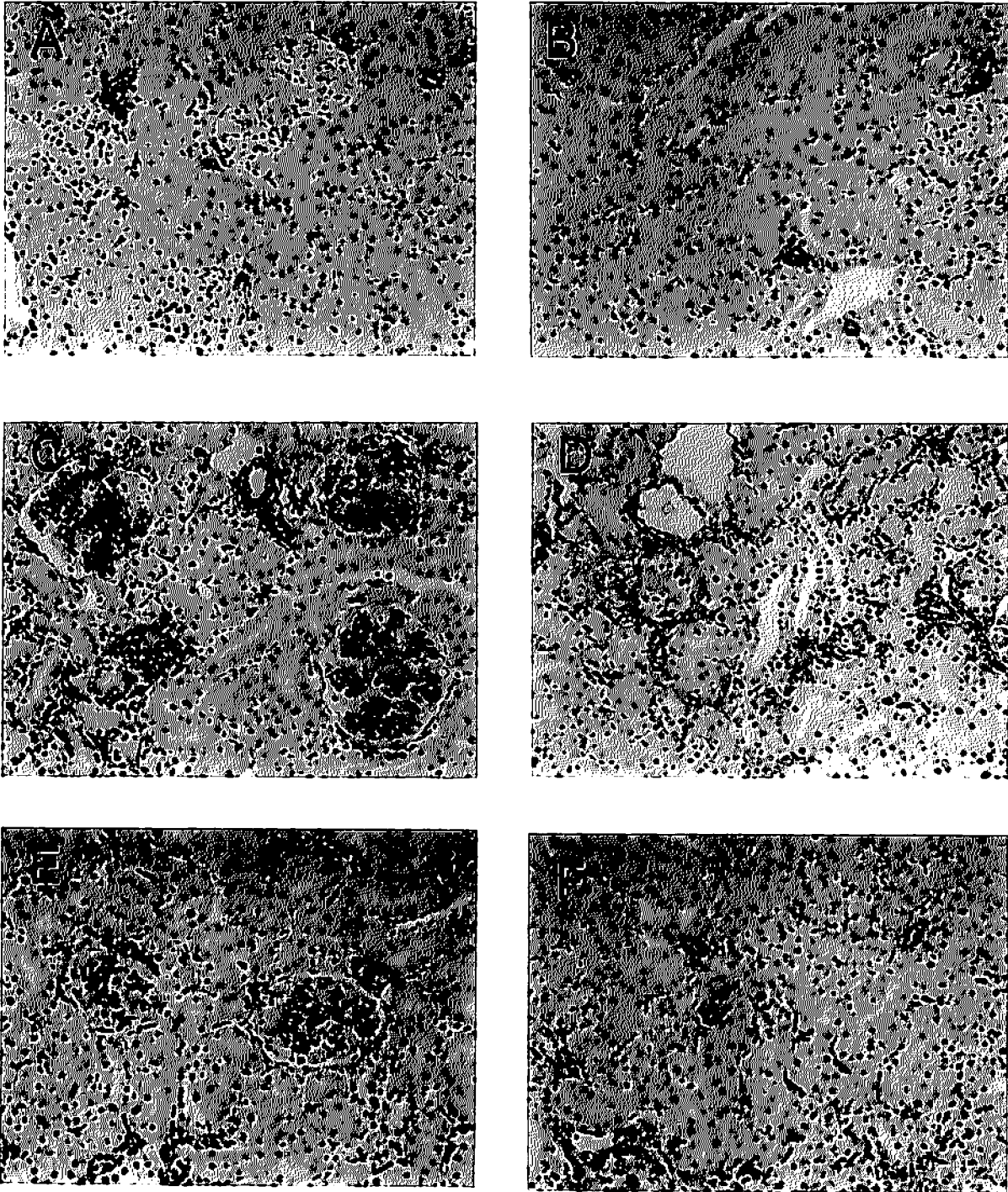
6) 尿中 MCP-1 排泄量に対するトラニラストの効果

Thy 1.1 腎炎において MCP-1 はマクロファージの浸潤・活性化に中心的役割を担っていることが報告されており<sup>11, 12, 22)</sup>, Thy 1.1 腎炎の尿中 MCP-1 排泄量に対するトラニラストの投与効果を検討した. 第11図に示すように Thy 1.1 腎炎無治療群ではコントロール群と比較して尿 MCP-1 排泄量の有意な増加を認め, 経時的に

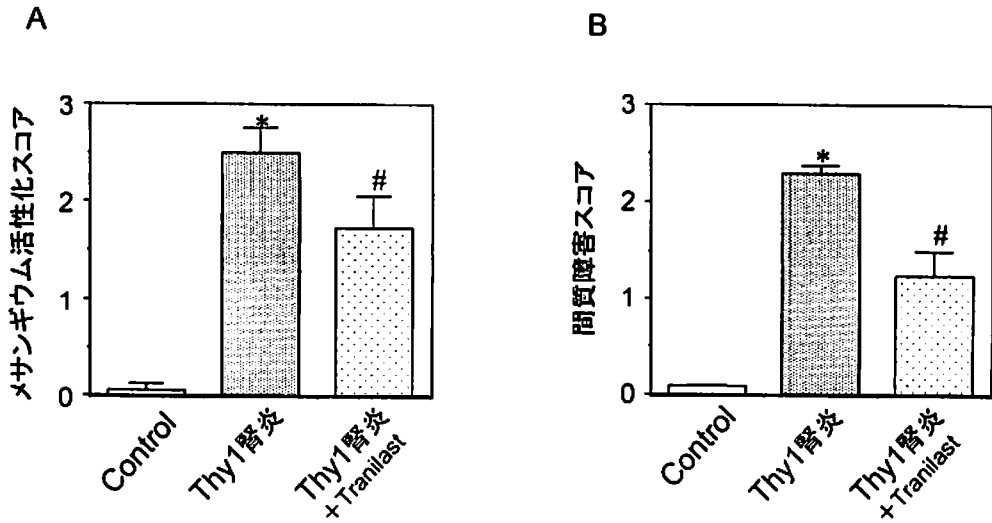
漸増傾向であった. トラニラスト治療により尿 MCP-1 排泄量の増加は抑制される傾向を認め, 腎炎誘発1日目と7日目ではトラニラスト治療による減少が有意であった.

考 察

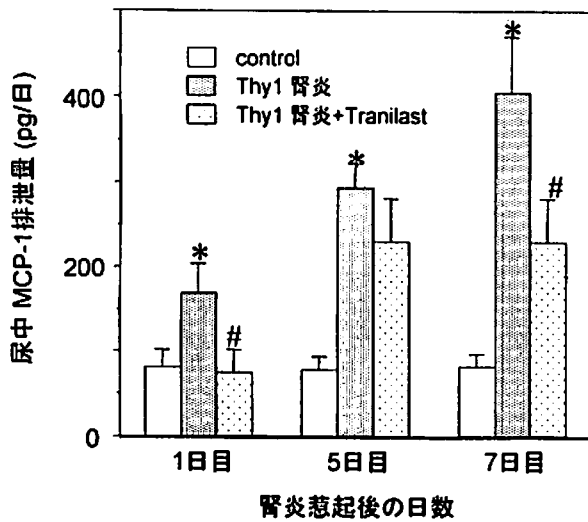
本研究では抗アレルギー薬であるトラニラストが, まず, 腎糸球体メサンギウム細胞と尿管上皮細胞において, マクロファージの走化活性化因子である MCP-1 の発現誘導を抑制することを示した. 続いて, MCP-1 発現への関与を指摘されている細胞内シグナル伝達経路である核転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化と, MAPkinase 経路の主要な3つの経路のうち, JNK 経路の活性化を同薬剤が選択的に抑制することを明らかにした. さらに, 糸球体腎炎の動物モデルであるラット Thy 1.1 腎炎に対してトラニラストの投与を試み, 同薬剤による治療が炎症局所のマクロファージ浸潤を抑制することにより腎障害改善効果を有することを示した. トラニラストは現在まで臨床的に広く用いられてきた薬剤であり, 近年では PTCA 後の著明な再狭窄予防効果が注目されるに従い<sup>15)</sup>, 炎症性細胞や血管平滑筋細胞などに対するトラニラストの多種多様な抗炎症・抗増殖効果の報告が相次いでなされている<sup>16-19)</sup>. 同薬剤の臨床での標準的な投与量におけ



第9図 糸球体 (A, C, E; 倍率×200)、腎皮質間質領域 (B, D, F; 倍率×100) の $\alpha$ -smooth muscle actin に対する免疫組織染色標本写真 (A, B: コントロール群, C, D: Thy 1.1 腎炎無処置群, E, F: Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群).



第10図 メサンギウム細胞の活性化スコア(A), 間質筋線維細胞の増加スコア(B)の検討 (Control: コントロール群, Thy1 腎炎: Thy 1.1 腎炎無処置群, Thy1 腎炎+Tranilast: Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群). 数値は平均値±標準誤差を表す. \*P<0.05 コントロール群と比較; #P<0.05 Thy 1.1 腎炎無処置群と比較.



第11図 Thy 1.1 腎炎惹起後の尿中 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 排泄量の経時的变化の比較 (Control: コントロール群, Thy1 腎炎: Thy 1.1 腎炎無処置群, Thy1 腎炎+Tranilast: Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群). 数値は平均値±標準誤差を表す (n=6). \*P<0.05 コントロール群と比較; #P<0.05 Thy 1.1 腎炎無処置群と比較.

るヒトの血清中の濃度は 100  $\mu\text{M}$  程度, 血清での蛋白結合率が 80%程度であるので, 血清中の遊離濃度 (20  $\mu\text{M}$  程度) は我々の実験系において MCP-1 の発現誘導を抑制した濃度 (30  $\mu\text{M}$ ) と比較しても遜色なく, 臨床での使用において MCP-1 の抑制作用を期待し得る数字である. そして, 今回我々がラットに対して経口投与に用いた量についても, 過去の報告において臨床的投与量によるヒトの血中濃度とラットの血中濃度がほぼ同程度に達成されている方法を採用した<sup>33)</sup>.

細胞実験では, まず, メサンギウム細胞で ELISA 法を用いて IL-1 刺激による MCP-1 蛋白の分泌増加をトラニラストが濃度依存性に抑制することを示し, さらにノザンプロット法によりトラニラストが同刺激による MCP-1 mRNA 発現の誘導を抑制することを明らかにした. トラニラストによる MCP-1 蛋白・mRNA の発現誘導の抑制作用は尿細管上皮細胞でも同様に認められた.

核転写因子 NF- $\kappa\text{B}$  は炎症に関与する種々の炎症性サイトカインや接着因子の転写の促進に関与しており<sup>34)</sup>, メサンギウム細胞では IL-1 $\beta$  刺激による MCP-1 遺伝子の発現に重要であることが報告されている<sup>35, 36)</sup>. NF- $\kappa\text{B}$  は非刺激下の細胞では抑制蛋白 I $\kappa\text{B}$  と複合体を形成し細胞質内に局在しているが, IL-1 $\beta$  刺激が加わると I $\kappa\text{B}$  は速やかに分解され, 遊離した NF- $\kappa\text{B}$  が核内に移行し



て標的遺伝子のプロモーター領域に存在する  $\kappa$ B 配列に結合し、その転写を活性化する<sup>9)</sup>。今回我々はルシフェラーゼ法を用いて、メサンギウム細胞において IL-1 $\beta$  刺激による核転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化をトラニラストが抑制することを示したが、EMSA により得られた結果ではトラニラストは IL-1 $\beta$  刺激による NF- $\kappa$ B の DNA 結合能の増加を抑制しなかった。なおウェスタンブロット法により I $\kappa$ B の分解を検討した結果も、トラニラストは IL-1 $\beta$  刺激による I $\kappa$ B $\alpha$  及び I $\kappa$ B $\beta$  の分解の程度に影響せず、EMSA の結果と合致するものであった。近年、NF- $\kappa$ B 依存性の転写活性化のメカニズムとして NF- $\kappa$ B の DNA 結合過程以降に複数のプロセスが介在し、転写の活性化には NF- $\kappa$ B が  $\kappa$ B 配列に結合した後に、NF- $\kappa$ B の p65 サブユニットのリン酸化<sup>35)</sup>、コアクチベーター蛋白との結合<sup>36)</sup>、p65 と RNA ポリメラーゼ II との相互作用<sup>37)</sup>などの過程を必要とすることが明らかとなっている。従って本実験におけるルシフェラーゼ法と EMSA の結果から、トラニラストが NF- $\kappa$ B の活性化を抑制した機序として、同薬剤が NF- $\kappa$ B の DNA 結合以降のこれらのプロセスに影響を及ぼした可能性も想定される。内皮細胞においては、トラニラストが NF- $\kappa$ B 依存性の転写活性をその DNA 結合能に影響せずに抑制し、その機序としてトラニラストが NF- $\kappa$ B とコアクチベーター CBP (cAMP response element binding protein) との相互作用を抑制することを示唆する報告がなされている<sup>38)</sup>。

近年、NF- $\kappa$ B の活性化に MAPkinase の主要な 3 つの経路 ERK<sup>30)</sup>、p38<sup>31)</sup>、JNK<sup>32)</sup>のいずれもが関与することが明らかにされ注目されている。JNK 経路に関しては抑制優勢変異型の JNK の導入により単球における NF- $\kappa$ B 依存性の転写活性の抑制効果が示されている<sup>31)</sup>。今回の実験では IL-1 $\beta$  により活性化される MAPkinase の 3 つの経路のうち、トラニラストは ERK、p38 の活性に影響せずに JNK の活性化を選択的に抑制した。メサンギウム細胞において JNK 経路と NF- $\kappa$ B を結び付ける所見としては、NF- $\kappa$ B 依存性に転写される cyclooxygenase 2 (COX 2) と inducible nitric oxide synthase (iNOS) の IL-1 $\beta$  による転写の誘導に JNK 経路が必要であるとの報告が近年なされている<sup>39, 40)</sup>。MCP-1 の誘導における JNK 経路の関与についてはさらに詳細な検討を要するが、これらの所見はトラニラストによる NF- $\kappa$ B 活性化抑制への JNK 経路の関与を示唆するものであると考えられる。

今回、ラット Thy 1.1 腎炎に対してトラニラスト投与効果を検討した実験では、トラニラストによりアルブ

ミン尿が減少し、腎組織所見の解析では、糸球体における細胞増多・基質過剰蓄積の緩和、マクロファージ浸潤の減少、メサンギウム活性化の抑制効果などの所見が得られた。トラニラストの治療効果は糸球体障害の改善にとどまらず、尿細管間質領域へのマクロファージの浸潤や筋線維芽細胞の増加所見に特徴づけられる二次的な間質障害をも緩和するものであった。

MCP-1 は様々な腎臓疾患においてマクロファージの誘導、活性化の中心的役割を担っており、Thy 1.1 腎炎においても糸球体に発現する MCP-1 がマクロファージの浸潤<sup>2)</sup>そして糸球体硬化の進展<sup>11)</sup>に関与していることが示されている。今回、トラニラストは Thy 1.1 腎炎の糸球体へのマクロファージの浸潤を抑制した。Thy 1.1 腎炎の初期の段階では主たる MCP-1 産生のはメサンギウム細胞であることが示唆されており<sup>22)</sup>、メサンギウム細胞においてトラニラストが MCP-1 の誘導を抑制した結果と考えあわせると、トラニラストによる腎炎ラットの糸球体浸潤マクロファージの減少は、少なくとも部分的には、メサンギウム細胞からの MCP-1 産生抑制に基づくものであると考えられる。

$\alpha$ SMA は活性化メサンギウム細胞の発現マーカーであり、活性化したメサンギウム細胞は収縮型から分泌型へ形質転換し、増殖し細胞外基質を過剰産生するようになる。Thy 1.1 腎炎において糸球体  $\alpha$ SMA 発現は糸球体障害を反映して顕著な増加を認める<sup>3)</sup>。今回、トラニラストは糸球体  $\alpha$ SMA 発現を有意に抑制し、これは PAS 染色における糸球体の細胞増多・基質過剰蓄積の有意な抑制効果を伴っていた。メサンギウム細胞の活性化には浸潤マクロファージに由来する種々のサイトカインや増殖因子、特に PDGF<sup>41)</sup> と TGF- $\beta$ <sup>42, 43)</sup>が重要とされており、トラニラストによるメサンギウム細胞活性化の抑制効果にはマクロファージの浸潤抑制作用が関与していると考えられる。加えて、トラニラストがメサンギウム細胞において PDGF の効果を抑制するとの Hishikawa らの報告<sup>17)</sup>や、同薬剤の抗 TGF- $\beta$  作用を示す多数の報告例<sup>16, 33)</sup>から、炎症腎における PDGF や TGF- $\beta$  によるメサンギウム細胞への活性化刺激のシグナルをトラニラストが直接抑制した可能性も示唆される。

トラニラストは Thy 1.1 腎炎に伴う尿細管間質へのマクロファージの浸潤、並びに間質筋線維芽細胞の増生を抑制した。ヒト糸球体腎炎では間質領域の MCP-1 発現量は間質へのマクロファージ浸潤の程度と極めてよく相関し<sup>44)</sup>、実験腎炎においては尿細管上皮由来の MCP-1 の発現を特異的に抑制することにより、尿細管間質障害が緩和されることが明らかにされている<sup>45)</sup>。本実験で

はトラニラストが尿細管上皮細胞の MCP-1 発現誘導を抑制しており、これを腎炎ラットにおける腎間質領域のマクロファージの浸潤を抑制した機序の一つとして想定することが可能である。近年、片側尿管結紮によるラット腎間質障害モデルへのトラニラストの投与による尿細管障害と間質線維化の抑制効果が報告されたが<sup>46)</sup>、これは純粋な腎間質病変に対するトラニラストの治療効果を示している。本実験でもトラニラストは腎間質障害の指標である $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞数を減少させたが、これらの結果は糸球体病変に続発する間質障害においても同薬剤が直接腎間質に作用して病変の進展を抑制している可能性を示唆するものである。

ヒト腎障害において尿排泄 MCP-1 の由来としては、メサンギウム細胞や尿細管上皮細胞、そして浸潤マクロファージなどが想定されている<sup>5, 44)</sup>。今回、トラニラストは細胞実験でメサンギウム細胞・尿細管上皮細胞において MCP-1 の発現誘導を抑制し、実際に炎症腎の糸球体・間質のマクロファージの浸潤を減少させた。さらにトラニラストは腎炎ラットの尿 MCP-1 排泄量を減少させた。以上の所見は、腎炎におけるマクロファージの浸潤抑制効果にこれらの細胞に由来する MCP-1 へのトラニラストによる発現・分泌抑制効果が関与することを裏付けるものであると考えられる。

今日まで、ヒト腎炎の治療薬としてはステロイドや免疫抑制薬が用いられてきたが、免疫系や代謝系など種々の全身的副作用が臨床の場で問題となりその使用の機会を制限してきた。これに対してトラニラストによる副作用の主だったものは、PTCA 再狭窄予防効果を検討した TREAT 試験の報告でも肝機能障害程度であり、その出現頻度は5%以下に留まっている<sup>45)</sup>。今回の実験ではトラニラスト投与による肝障害や低栄養などの合併は認められなかった。トラニラストは臨床的に安全性が確立されている薬剤であり、こうした観点からも抗ケモカイン作用・NF- $\kappa$ B 抑制作用により腎炎進展を抑制する安全な経口薬として注目に値すると考える。

## 総 括

1. メサンギウム細胞及び尿細管上皮細胞を用いた検討においてトラニラストは IL-1 $\beta$  刺激により誘導される MCP-1 mRNA 発現量を濃度依存的に抑制した。この抑制機序として、トラニラストによる IL-1 $\beta$  刺激下での核蛋白 NF- $\kappa$ B の活性化の抑制作用や選択的な JNK 経路の抑制作用が関与している可能性が示唆された。
2. ラット糸球体腎炎モデルでの検討では、トラニラス

ト経口投与による治療は尿アルブミンを減少させ、糸球体・間質へのマクロファージ浸潤を抑制し、糸球体・間質いずれにおいても病変の進展を緩和した。さらに、尿中 MCP-1 排泄量もトラニラストにより減少した。

以上の結果より、臨床的に広く安全に使用されている抗アレルギー薬であるトラニラストが MCP-1 発現抑制作用により、糸球体腎炎の進展抑制効果を有することが明らかにされた。

本稿を終えるにあたり、懇切な御指導と御校閲を賜りました、慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深く感謝いたします。また、本研究を直接御指導いただきました、林松彦助教授に心より感謝いたします。ならびに御協力、御助言をいただきました研究室各員に深く感謝いたします。

本論文の要旨の一部は第 43 回 (名古屋, 2000 年) と第 44 回 (大阪, 2001 年) 日本腎臓学会, 33rd (Toronto, 2000) and 34th (San Francisco, 2001) Annual Meeting of American Society of Nephrology において発表した。

本研究の一部は平成 13 年度文部省科学研究費補助金 (奨励研究 (A), 課題番号 13770606) によった。

## 文 献

- 1) Nakai S, Shinzato T, Sanaka T, Kikuchi K, Kitaoka T, Shinoda T, Yamazaki C, Sakai R, Omori H, Morita O, Iseki K, Kubo K, Tabei K, Masakane I, Fushimi K, Wada A, Miwa N, Akiba T: The current state of chronic dialysis treatment in Japan. *J Jpn Soc Dial Ther* 35: 1155-1184, 2002
- 2) Atkins RC: Macrophages in renal injury. *Am J Kidney Dis* 31: xiv-xivii, 1998
- 3) Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Pritzl P, Gordon K, Gown AM: Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. *J Clin Invest* 87: 847-858, 1991
- 4) Eddy AA: Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7: 2495-2508, 1996
- 5) Banba N, Nakamura T, Matsumura M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K: Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 58: 684-690, 2000
- 6) Luster, AD: Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Eng J Med* 338: 436-445, 1998
- 7) Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J: Glomerular expression of monocyte attractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab*

- Invest 71 : 536-542, 1994
- 8) Segerer S, Nelson PJ, Schloendorf D : Chemokines, chemokine receptors, and renal disease : from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11 : 152-176, 2000
  - 9) Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, Mantovani A : Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest* 73 : 804-809, 1995.
  - 10) Rovin BH, Doe N, Tan LC : Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *Am J Kidney Dis* 27 : 640-646, 1996
  - 11) Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RAK : Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming factor- $\beta$ . *Kidney Int* 56 : 135-144, 1999
  - 12) Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F, Helmchen UM, Stahl RAK : Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* 51 : 770-776, 1997
  - 13) Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi KI, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K : Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J* 10 : 1418-1425, 1996
  - 14) Isaji M, Nakajoh M, Naito J : Selective inhibition of collagen accumulation by *N*-(3, 4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (*N*-5') in granulation tissue. *Biochem Pharmacol* 36 : 469-474, 1987
  - 15) Tamai H, Katoh O, Suzuki S, Fujii K, Aizawa T, Takase S, Kurogane H, Nishikawa H, Sone T, Sakai K, Suzuki T, for the Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial Study Group : Impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty : Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial (TREAT). *Am Heart J* 138 : 968-975, 1999
  - 16) Fukuyama J, Miyazawa K, Hamano S, Ujii A : Inhibitory effects of tranilast on proliferation, migration, and collagen synthesis of human vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 74 : 80-84, 1996
  - 17) Hishikawa K, Nakaki T, Hirahashi J, Marumo T, Saruta T : Tranilast restores cytokine-induced nitric oxide production against platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 28 : 200-207, 1996
  - 18) Suzawa H, Kikuchi S, Ichikawa K, Koda A : Inhibitory action of tranilast, an anti-allergic drug, on the release of cytokines and PGE2 from human monocytes-macrophages. *Jpn. J Pharmacol* 60 : 85-90, 1992
  - 19) Capper EA, Roshak AK, Bolognese BJ, Podolin PL, Smith T, Dewitt DL, Anderson KM, Marshall LA : Modulation of human monocyte activities by tranilast, SB252218, a compound demonstrating efficacy in restenosis. *J Pharmacol Exp Ther* 295 : 1061-1069, 2000
  - 20) Hishikawa K, Nakaki T, Hirahashi J, Marumo T, Saruta T : Tranilast inhibits the effects of platelet-derived growth factor on cell proliferation and induction of nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 291 : 435-438, 1995
  - 21) Bagchus WM, Hoedemaeker PHJ, Rozing J, Bakker WW : Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy 1.1 antibodies. A sequential histological and ultrastructural study in the rat. *Lab Invest* 55 : 680-687, 1986
  - 22) Stahl RAK, Thaiss F, Disser M, Helmchen U, Hora K, Schloendorf D : Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* 44 : 1036-1047, 1993
  - 23) Chikaraishi A, Hirahashi J, Takase O, Marumo T, Hishikawa K, Hayashi M, Saruta T : Tranilast inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 427 : 151-158, 2001
  - 24) Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, Takase O, Chikaraishi A, Hayashi M, Shimizu N, Saruta T : Overexpression of truncated I $\kappa$ B $\alpha$  potentiates TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int* 57 : 959-968, 2000
  - 25) Fan J-M, Ng Y-Y, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY : Transforming growth factor- $\beta$  regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro*. *Kidney Int* 56 : 1455-1467, 1999
  - 26) Kawachi H, Orikasa M, Matsui K, Iwanaga T, Toyabe S, Oite T, Shimizu F : Epitope-specific induction of mesangial lesions with proteinuria by a MoAb against mesangial cell surface antigen. *Clin exp Immunol* 88 : 399-404, 1992
  - 27) Grande J.P, Walker HJ, Holub BJ, Warner GM, Keller DM, Haugen JD, Donadio, Jr. JV, Dousa TP : Suppressive effects of fish oil on mesangial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int* 57 : 1027-1040, 2000
  - 28) Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert A : Activation of nuclear factor-B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int* 48 : 1263-1271, 1995
  - 29) Stylianou E, Nie M, Ueda A, Zhao L : c-Rel and p65 *trans*-activate the monocyte chemoattractant protein-1 gene in interleukin-1 stimulated mesangial cells. *Kidney Int* 56 : 873-882, 1999
  - 30) McGilvray ID, Lu Z, Bitar R, Dackiw APB, Davreux CJ, Rotstein OD : VLA-4 integrin cross-linking on human monocytic THP-1 cells induces tissue factor expression by mechanism involving mitogen-

- activated protein kinase. *J Biol Chem* 272 : 10287-10294, 1997
- 31) Wesselborg S, Bauer MKA, Vogt M, Schmitz ML, Schulze-Osthoff K : Activation of transcriptional factor NF- $\kappa$ B and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem* 272 : 12422-12429, 1997
- 32) Tuyt LML, Dokter WHA, Birkenkamp K, Koopmans SB, Lummen C, Kruijer W, Vellenga E : Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF- $\kappa$ B-dependent IL-6 expression in human monocytes. *J Immunol* 162 : 4893-4902, 1999
- 33) Pinto YM, Pinto-Sietsma S-J, Philipp T, Engler S, Kossmehl P, Hocher B, Marquardt H, Sethmann S, Lauster R, Merker H-J, Paul M : Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor  $\beta_1$  attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR (mRen2) 27 rat. *Hypertension* 36 : 747-754, 2000
- 34) Barmes PJ, Karin M : Nuclear factor-B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Eng J Med* 336 : 1066-1071, 1997
- 35) Egan LJ, Mays DC, Huntoon CJ, Bell M.P, Pike MG, Sandborn WJ, Lipsky JJ, McKean DJ : Inhibition of Interleukin-1-stimulated NF-B RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity. *J Biol Chem*.274 : 26448-26453, 1999
- 36) Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T : CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 2927-2932, 1997
- 37) Qiu D, Zhao G, Aoki Y, Shi L, Uyei A, Nazarian S, Ng JCH, Kao PN : Immunosuppressant PG490 (Triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cells and NF- $\kappa$ B transcriptional activation. *J Biol Chem* 274 : 13443-13450, 1999
- 38) Spiecker M, Lorenz I, Meyer J, Darius H : Tranilast inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappa B activation in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 62 : 856-863, 2002
- 39) Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR : Interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p-38 MAPK signal pathways in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 273 : 28670-28676, 1998
- 40) Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR : Both p38 $\alpha$  MAPK and JNK/SAPK pathways are important for induction of nitric-oxide synthase by interleukin-1 $\beta$  in rat glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 274 : 36200-36206, 1999
- 41) Nakamura H, Isaka Y, Tsujie M, Akagi Y, Sudo T, Ohno N, Imai E, Hori I : Electroporation-mediated PDGF receptor-IgG chimera gene transfer ameliorates experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 59 : 2134-2145, 2001
- 42) Blom IE, van Dijk AJ, Wieten L, Duran K, Ito Y, Kleij L, deNichilo M, Rabelink TJ, Weening JJ, Aten J, Goldschmeding R : *In vitro* evidence for differential involvement of CTGF, TGF, and PDGF-BB in mesangial response to injury. *Nephrol Dial Transplant* 16 : 1139-1148, 2001
- 43) Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E : Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor  $\beta_1$ . *Nature* 346 : 371-374, 1990
- 44) Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F, Schena FP : Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides : a pathogenetic role in interstitial monocyte recruitment. *J Am Soc Nephrol* 7 : 906-913, 1996
- 45) Okada H, Moriwaki K, Kalluri R, Imai H, Ban S, Takahama M, Suzuki H : Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 expression in tubular epithelium attenuates tubulointerstitial alteration in rat Goodpasture syndrome. *Kidney Int* 57 : 927-936, 2000
- 46) Miyajima A, Asano T, Asano T, Yoshimura I, Seta K, Hayakawa M : Tranilast ameliorates renal tubular damage in unilateral ureteral obstruction. *J Urol* 165 : 1714-1718, 2001

学位論文

マウス舌癌同所移植モデルを用いた MMP 阻害剤  
ONO-4817 の頸部リンパ節転移抑制効果

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室

(指導：小川 郁教授)

山 下 拓

(平成 16 年 2 月 26 日受付)

Key Words : head and neck squamous cell carcinoma, matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, orthotopic implantation model, lymph node metastasis

口腔癌症例の約 50%に頸部リンパ節転移を認めると報告されている<sup>1-3)</sup>ように、口腔癌を含む頭頸部扁平上皮癌は高率に頸部リンパ節転移をきたすことが知られている。また口腔、中咽頭扁平上皮癌において、頸部リンパ節転移を認めない症例の 5 年生存率が 81%であるの<sup>4)</sup>に比べ、リンパ節内転移を認める症例は 64%、リンパ節外浸潤を認める症例は 21%と頸部リンパ節転移が重要な予後因子であることも報告されている<sup>5)</sup>。さらに頭頸部扁平上皮癌の治療後頸部リンパ節再発症例の 5 年生存率が 29.2%と極めて不良であることも報告されている<sup>6)</sup>。このように頭頸部癌に対する手術的治療、放射線治療、化学療法<sup>7)</sup>の進歩にもかかわらず、現在でも頸部リンパ節転移の制御には難渋することも少なくない。したがって頸部リンパ節転移の分子機構の解明と治療および予防法の確立は、頭頸部扁平上皮癌の治療成績向上において重要な課題のひとつであると考えられる。

リンパ節転移の分子機構についてはまだ不明な点が多いが、癌細胞による上皮下の基底膜の破壊、結合組織への浸潤、リンパ管への侵入、リンパ管内での移動、リンパ節での増殖というプロセスは少なくとも必要である<sup>8-10)</sup>。この過程において、癌細胞は移動の障壁となっている周囲の細胞外マトリックスを分解する必要がある。なかでも基底膜の分解は最も重要であると考えられている。基底膜は IV 型コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカンなどで構成される丈夫な網状構造を形成しており、

上皮細胞の基底膜を裏打ちするように存在する。基底膜は口腔粘膜上皮の基底膜に存在し、また毛細血管に比べると未発達であるが毛細リンパ管周囲にも存在する<sup>11)</sup>。すなわち癌細胞の局所浸潤、リンパ管内侵入の際に基底膜は一種のバリアーとして機能していると考えられ、その分解は、癌の局所浸潤やリンパ節転移において必須である。細胞外マトリックスの分解にはマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, 以下 MMP と略す)、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼなどの蛋白分解酵素が働いているが、そのうち基底膜の主要構成成分である IV 型コラーゲンを基質とする酵素には MMP 遺伝子ファミリーに属する MMP-2 と MMP-9 がある。したがって MMP-2、MMP-9 は癌の浸潤、リンパ節転移に重要な役割を担っていると考えられ、事実 MMP-2 および MMP-9 の発現や活性化率と頭頸部扁平上皮癌の頸部リンパ節転移が相関しているとの報告が散見される<sup>8-13)</sup>。また細胞膜表面で潜在型 MMP-2 を特異的に活性化する膜型マトリックスメタロプロテアーゼのひとつである membrane-type 1 matrix metalloproteinase (以下 MT1-MMP と略す)<sup>8, 14)</sup>の発現も頸部リンパ節転移との関与を示す報告がある<sup>13, 15-18)</sup>。このように MMP-2、MMP-9、MT1-MMP をはじめとする MMP 遺伝子ファミリーは癌の浸潤転移や予後に関与していることが知られている。またこれら MMP 遺伝子ファミリーの活性阻害が癌の浸潤転移

本論文は Yamashita T, Fujii M, Tomita T, Ishiguro R, Tashiro M, Tokumaru Y, Imanishi Y, Kanke M, Ogawa K, Kameyama K, Otani Y : The inhibitory effect of matrix metalloproteinase inhibitor ONO-4817 on lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Anticancer Res* 23 : 2297-2302, 2003 の一部を含む。

の抑制や予後の改善に寄与することを示す多くの報告が動物実験においてなされている。MMP 阻害剤が血行性転移を抑制することについては多くの報告がある<sup>19-23)</sup>。また胃癌の腹膜播種を抑制するとの報告もみられる<sup>24, 25)</sup>。しかし、リンパ節転移の抑制に関する報告は少なく<sup>26)</sup>、とくに頭頸部扁平上皮癌の頸部リンパ節転移抑制の報告はない。そこで本研究では、頭頸部癌の頸部リンパ節転移抑制における MMP 阻害剤の効果について動物実験で検討を行った。

リンパ行性転移の実験的研究は 1954 年 Zeidman や Buss らにより初めて報告され<sup>27)</sup>、その後少数のリンパ行性転移モデルが開発された<sup>28, 29)</sup>。頭頸部癌の頸部リンパ節転移に関しては、舌癌同所移植による頸部リンパ節転移モデル作成の報告がある<sup>30)</sup>。また Matsui らはヒト舌癌由来の扁平上皮癌細胞株 HSC-3 の同所移植をくり返すことにより頸部リンパ節への高転移株 HSC-3-M3 を分離したことを報告している<sup>31)</sup>。そこで本研究では、頸部リンパ節への高転移能を有するヒト舌扁平上皮癌由来細胞株 HSC-3-M3 のヌードマウスへの同所移植モデルを用いて、舌癌の頸部リンパ節転移に対する MMP 阻害剤の抑制効果について検討した。MMP 阻害剤に関しては、経口投与が可能で MMP-2, MMP-9 に対し強い活性阻害作用を有する ONO-4817 を使用した<sup>32)</sup>。

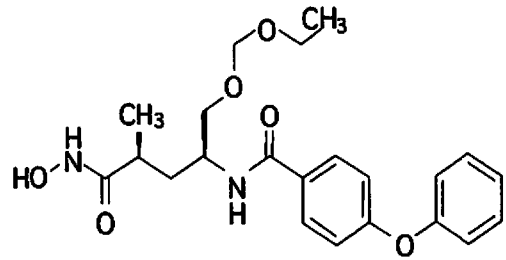
## 材料と方法

### 1. 細胞培養

本研究では、高い頸部リンパ節転移能を有する細胞株 HSC-3-M3 を用いた。HSC-3-M3 はヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3 より分離された細胞株亜型であり<sup>31)</sup>、太田隆英博士(金沢医科大学病理学教室)より供与された。HSC-3-M3 の標準培養液は抗生物質(100 IU/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン, 250 ng/ml アンホテリシン B)を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 10% 仔牛血清を混合して作製した。細胞は 37°C, 5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。培養液, 10% 仔牛血清, 抗生物質はいずれも Gibco BRL (Grand Island, NY, USA) より購入した。

### 2. MMP 阻害剤

使用した MMP 阻害剤 ONO-4817 ([2S, 4S]-N-Hydroxy-5-ethoxymethyloxy-2-methyl-4-[4-phenoxymethyl]aminopentanamide) (第1図) は小野薬品工業株式会社で開発された。ONO-4817 は *in vitro* の実験では dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解したうえ種々



第1図 ONO-4817 の分子構造。(Yamashita T et al : Anti Cancer Res 23 : 2297-2302, 2003 の Figure 1 を許可を得て転載)

の濃度に調整し、*in vivo* の実験では 0.5% carboxymethyl cellulose sodium (CMC) に溶解し 40 mg/ml の濃度に調整して使用した。

### 3. MTT assay

HSC-3-M3 の増殖に対する ONO-4817 の影響を検討した。細胞増殖は tetrazolium-dye-based-assay (MTT assay) により検討した。1 ウェルあたり  $2.0 \times 10^4$  個の癌細胞を 96 ウェルマイクロプレートに播種した。通常の培地(1 ウェルあたり 100 µl)にて 24 時間培養後、PBS で 2 回洗浄し、種々の濃度(0 nM, 1 nM, 10 nM, 1 µM, 100 µM)の ONO-4817 を添加した無血清培地(1 ウェルあたり 100 µl)に交換し、さらに 24 時間培養した。24 時間後に PBS で 5 mg/ml に希釈した MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 溶液を 1 ウェルあたり 10 µl ずつ添加した。さらに 4 時間反応させた後、溶液を吸引除去し、100 µl の溶解溶液(酸性イソプロパノール)を加えた。プレートを 30 分間攪拌し 570 nm 波長の吸光度を測定した。

### 4. 実験動物

4 週齢, 雄の BALB/cA ヌードマウス (CLEA Japan, Inc.) を購入し 5 週齢で実験に使用した。実験動物は慶應義塾大学実験動物センター内で飼育し、すべての実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに準拠し、これを遵守して施行した。

### 5. 組織ホモジネートの作成

マウス舌に移植した腫瘍の MMP-2 および MMP-9 の活性を測定するため、組織のホモジネートを作成した。マウスの舌腫瘍を摘出、細切し 0.15 M NaCl, 10 mM

CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaNa<sub>3</sub>, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM N-ethylmaleimide を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で氷冷下にホモジナネートした。次に 3000 rpm, 15 分遠心分離を行った後、上清を回収し、ゼラチンザイモグラフィによる分析用サンプルとして -20°C フリーザーで保存した。蛋白濃度は Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) にて測定し、単位蛋白量あたりの MMP-2, MMP-9 活性を比較検討した。

#### 6. ゼラチンザイモグラフィ

細胞株の培養上清および組織ホモジネート上清中の MMP-2, MMP-9 の活性はゼラチンザイモグラフィにより測定した。サンプルは 20% glycerol, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 0.05% bromophenol blue tracking dye を含む電気泳動用 buffer で 37°C, 30 分間インキュベートした後、0.2% ゼラチンを含む 10% SDS-polyacrylamide gels で -4°C 下に電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 2.5% Triton X-100 にて 30 分間室温で 2 回洗浄し、10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl を含む buffer (pH 7.5) で 37°C, 17 時間インキュベートした。In vitro での ONO-4817 による MMP-2, MMP-9 活性阻害効果は、種々の濃度 (0, 1, 3, 10, 30 nM) の ONO-4817 を incubation buffer に加えることで検出した。その後、ゲルは 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 で 30 分間染色し、5% イソプロパノール, 8% 酢酸水溶液で脱色した。ゼラチン分解を受けた部分は Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色を受けた青色の背景の中の透明なバンドとして検出された。このバンドを反転化し NIH Image software (version 1.61) で半定量化した。MMP-9 の活性化率は (活性型のバンド濃度/非活性型のバンド濃度 + 活性型のバンド濃度) の式で算出した。

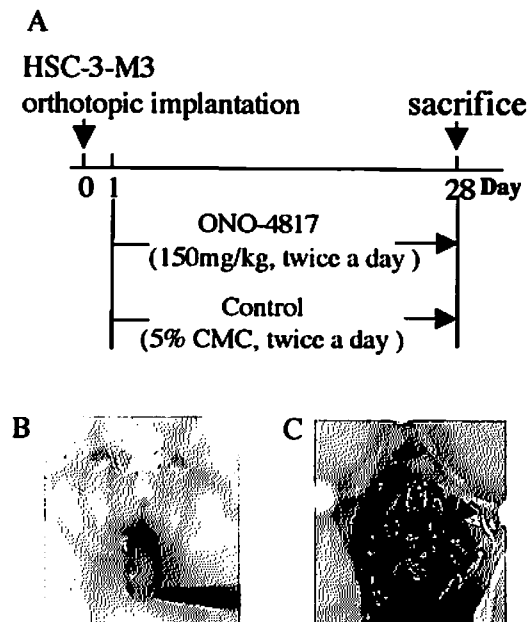
#### 7. Film *in situ* zymography (以下 FIZ と略す)

マウスより摘出した腫瘍は、摘出後すぐに cryomold O.C.T. 4583 Compound (Miles, Inc., Elkhart, IN, USA) に入れ、ドライアイスで冷却した 2 メチルブタンで急速冷凍包埋した。冷凍ブロックは cryostat microtome (Leica model CM 1510-11) で薄切し 4 μm の連続切片を作製した。これら薄切片を 7 μm のゼラチンでコートされたフィルム (Fuji Photo Film Co., Ltd, Tokyo, Japan) にのせ、37°C で 16 時間 humidified chamber でインキュベートした。その後 Amido Black 10B (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)

で染色し、70% メタノール, 10% 酢酸水溶液で脱色した。ゼラチン分解を受けた部分は Amido Black 10B で染色されないため、黒色の背景に対して、透明から薄い青色域として同定される。ゼラチン分解活性は光学顕微鏡で検出した。連続切片の一部は HE 染色を行いゼラチン分解を受けた部位を組織学的に同定した。

#### 8. 舌癌同所移植モデルの作製と ONO-4817 治療実験

HSC-3-M3 細胞を 2.0 × 10<sup>6</sup> cells/ml となるよう Hank's balanced salt solution (Gibco BRL, Grand Island, NY) に混和調整した。50 μl (1.0 × 10<sup>5</sup> cells) を 30 ゲージ針にてヌードマウスの舌縁に同所移植した。移植後 21 日目に犠死させ舌腫瘍を摘出した。In vitro での ONO-4817 による MMP-2, MMP-9 のゼラチン分解活性抑制効果の検討のため、舌腫瘍のホモジネート上清をサンプルとしてゼラチンザイモグラフィを行った。電気泳動後、種々の濃度 (0, 1, 3, 10, 30 nM) の ONO-4817 を含む溶液中でインキュベートした。



第2図 (A) HSC-3-M3 の同所移植によるマウス舌扁平上皮癌モデルを用いた治療実験。マウスを2つのグループ (ONO-4817 治療群, コントロール群) に分けた。治療群には HSC-3-M3 同所移植翌日 (day 1) から day 28 まで ONO-4817 を 150mg/kg を 1 日 2 回経口投与した。コントロール群には同期間 vehicle のみを投与した。(B) HSC-3-M3 同所移植後 28 日の舌腫瘍。(C) コントロール群の頸部リンパ節 (矢頭)。肉眼上、転移の有無は不明である。(Yamashita T et al: Anti Cancer Res 23: 2297-2302, 2003 の Figure 2 を改変, 許可を得て転載)

次に *in vivo* での ONO-4817 の効果を検出するため、 $1.0 \times 10^6$  の HSC-3-M3 細胞を day 0 にヌードマウスの舌縁に同所移植した。移植 24 時間後 (day 1) に無作為にマウスを 2 つのグループ (ONO-4817 の投与を行う治療群と vehicle のみ投与するコントロール群) に分けた。治療群のマウスには day 1 から day 28 まで ONO-4817 を投与した。ONO-4817 は 0.5% carboxy-methyl cellulose sodium (CMC) に 40 mg/ml の濃度になるよう混和し、投与量を 150 mg/kg として 1 日 2 回経口投与した。コントロール群では 28 日間 vehicle のみを 1 日 2 回経口投与した。すべてのマウスは day 28 の ONO-4817 あるいは vehicle の最終投与 2 時間後に犠死させ、舌腫瘍と頸部リンパ節を摘出した。頸部リンパ節については、ルーベ下にオトガイ下、両側顎下、両側頸静脈周囲の探索を行い摘出した (第 2 図)。移植腫瘍におけるゼラチン分解活性はゼラチンゼイモグラフィと FIZ により評価した。両群ともマウスの体重を day 1, 7, 14, 21, 28 に測定し比較を行った。摘出した頸部リンパ節は 20%ホルマリン溶液で固定した後、パラフィン包埋し、各リンパ節の全幅にわたり 100  $\mu$ m ごとに 4  $\mu$ m の切片を作成した。すべての切片は HE 染色を施した後に光学顕微鏡にて転移の有無を検索した。

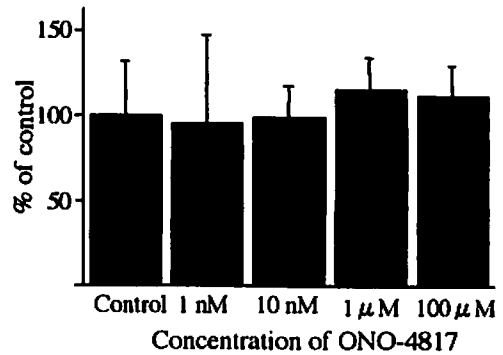
### 9. 統計学的検討

MTT assay の結果は Kruskal-Wallis test で評価した。2 群間での生存率、体重、頸部リンパ節転移陽性率は Wilcoxon test, Mann-Whitney's U test, Fisher's exact probability test をそれぞれ使用し検討した。いずれも危険率  $p < 0.05$  のとき統計学的に有意差ありと判定した。

## 結 果

### 1. HSC-3-M3 の細胞増殖に対する ONO-4817 の効果

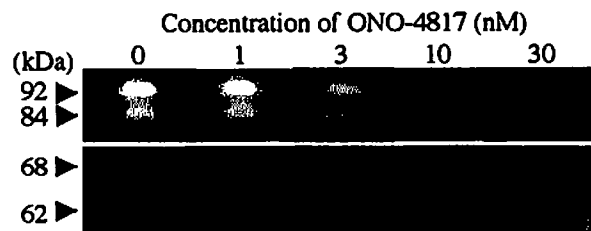
HSC-3-M3 の細胞増殖に対する ONO-4817 の効果を検討するため MTT assay を行った。その結果、*in vitro* において ONO-4817 は HSC-3-M3 に対して 100  $\mu$ M の濃度まで殺細胞効果をもたなかった ( $p = 0.7536$ ; 第 3 図)。



第 3 図 MTT アッセイ。 *In vitro* において、ONO-4817 は 100  $\mu$ M の濃度まで HSC-3-M3 の細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

### 2. *In vitro* における ONO-4817 の MMP-2, MMP-9 活性抑制効果

HSC-3-M3 細胞の培養上清をサンプルとしてゼラチンゼイモグラフィを行った結果、潜在型 MMP-2 (68kDa) および潜在型 MMP-9 (92kDa) が検出された。HSC-3-M3 を移植したマウス舌腫瘍のホモジネート上清からはゼラチンゼイモグラフィにて潜在型 MMP-2, 活性型 MMP-2 (62kDa), 潜在型 MMP-9, 活性型 MMP-9 (84kDa) が検出された。MMP-9 のゼラチン分解活性 (潜在型 MMP-9, 活性型 MMP-9 活性の和) は *in vitro* において ONO-4817 により濃度依存性に阻害された (第 4 図)。コントロールの MMP-9 活性を 100% とすると 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM ONO-4817 添加時のそれぞれの活性は 86%, 64%, 36%, 12% であった。MMP-2 についても ONO-4817 添加によりゼラチン分解活性を抑制する傾向がみられたが、コントロールでの活性が低いため定量化は不可能であった。

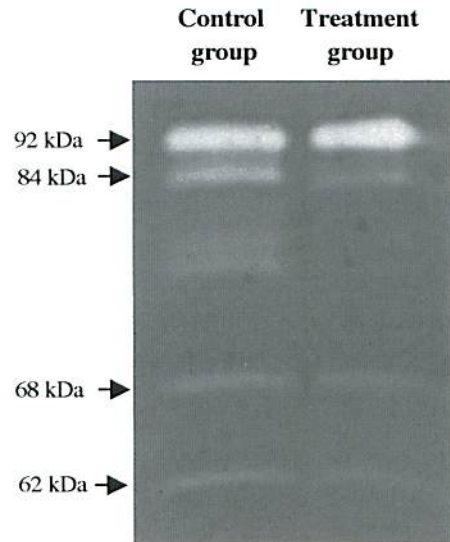


第 4 図 ONO-4817 による MMP-9 のゼラチン分解活性抑制効果 (*in vitro*)。ゼラチンゼイモグラフィの結果、MMP-9 (92kDa; 潜在型, 84kDa; 活性型) のゼラチン分解活性は ONO-4817 の濃度依存性に抑制された。(Yamashita T et al: *Anti Cancer Res* 23: 2297-2302, 2003 の Figure 3 を許可を得て転載)

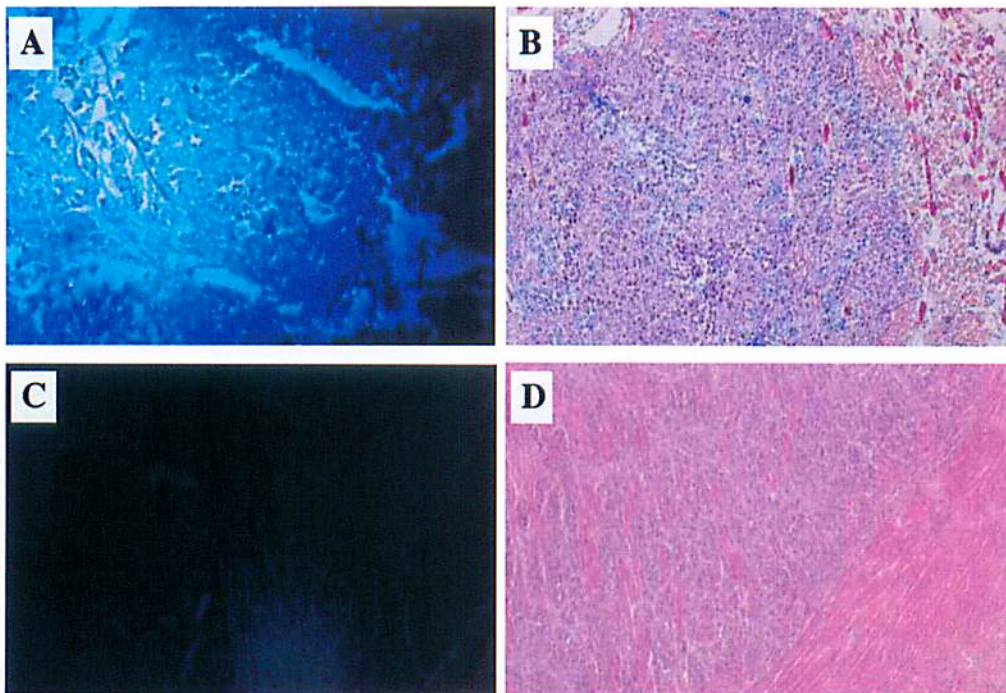


### 3. *In vivo* における ONO-4817 のゼラチン分解活性抑制効果

*In vivo* における ONO-4817 のゼラチン分解活性抑制効果はゼラチンザイモグラフィーおよび FIZ を用いて検出した。ゼラチンザイモグラフィーの結果、コントロール群に比較し、治療群の舌腫瘍組織において MMP-9 活性化率の低下が認められた。活性化率は治療群 21%、コントロール群 36%であった (第 5 図)。FIZ の結果、コントロール群の舌腫瘍組織に一致して強いゼラチン分解活性が認められたのに対して、治療群ではゼラチン分解活性は著しく抑制されていた (第 6 図)。



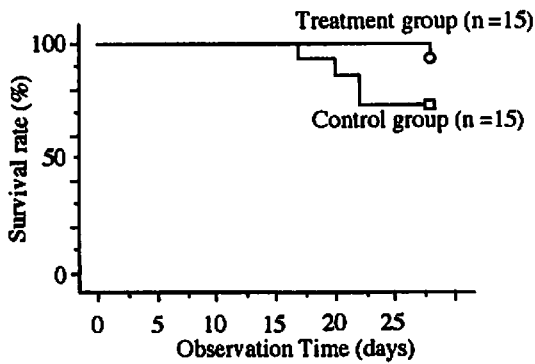
第 5 図 ONO-4817 による MMP-9 のゼラチン分解活性抑制効果 (*in vivo*)。ゼラチンザイモグラフィーの結果、コントロール群と比較し治療群において低い MMP-9 活性化率を示した。活性化率はコントロール群 0.36、治療群 0.21 であった。(Yamashita T et al : Anti Cancer Res 23 : 2297-2302, 2003 の Figure 4 を許可を得て転載)



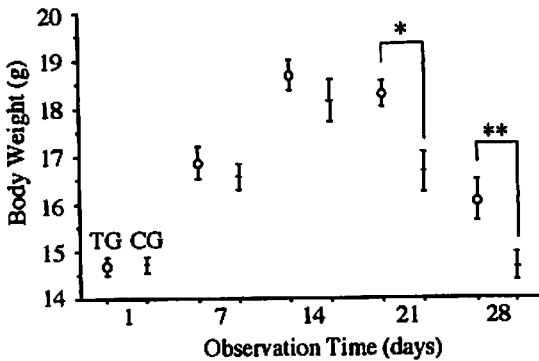
第 6 図 舌癌組織における ONO-4817 のゼラチン分解活性抑制効果。A (FIZ) と B (HE 染色) はコントロール群の舌癌組織の連続切片 (×40)。C (FIZ) と D (HE 染色) は治療群の舌癌組織の連続切片 (×40)。FIZ の結果、コントロール群 (A) と比較し治療群 (C) の舌癌組織ではゼラチン分解活性が抑制されている。コントロール群においては癌病巣に一致して強いゼラチン分解活性を認めるが、治療群においては非常に弱い。(Yamashita T et al : Anti Cancer Res 23 : 2297-2302, 2003 の Figure 5 を改変、許可を得て転載)

4. 頸部リンパ節転移および体重変化に対する ONO-4817 の効果

同所移植によるマウス舌への腫瘍形成は治療群, コントロール群ともにすべて成功した. 治療群の 15 匹中 14 匹 (93.3%), コントロール群の 15 匹中 12 匹 (80.0%) が同所移植後 28 日間生存した. 治療群のマウスのうち 1 匹は移植後 day 28 に, コントロール群のマウスの内 3 匹は day 17, 20, 22 にそれぞれ死亡した. 今回の検討では両群間の生存率に統計学的有意差は認められなかった (第 7 図;  $p=0.1167$ ). 同所移植後 21 日と 28 日でのマウスの体重の比較では, コントロール群と比較し治



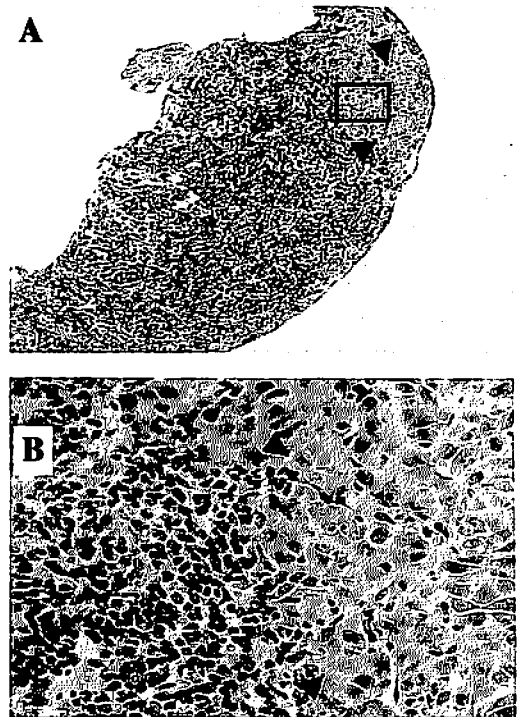
第 7 図 カプランマイヤー法による生存曲線. 2 群間での生存率には統計学的有意差は認めなかった ( $p=0.1167$ ).



第 8 図 コントロール群 (CG) と治療群 (TG) でのマウスの体重変化. Day 21 および day 28 において, 治療群はコントロール群に比べ統計学的有意に体重が重かった. 平均体重±標準偏差は day 21 において治療群  $18.3 \pm 1.1$  g, コントロール群  $16.7 \pm 1.5$  g, day 28 においてそれぞれ  $16.1 \pm 1.6$  g,  $14.7 \pm 1.0$  g であった. \* $p=0.0022$ , \*\* $p=0.0288$ ; Mann-Whitney's *U*-test. (Yamashita T et al: Anti Cancer Res 23: 2297-2302, 2003 の Figure 6 を改変, 許可を得て転載)

療群において, 有意に体重減少が抑制されていた (第 8 図). 第 21 日の平均体重±標準偏差は治療群  $18.3 \pm 1.1$  g, コントロール群  $16.7 \pm 1.5$  g ( $p=0.0022$ ) であり, 第 28 日はそれぞれ  $16.1 \pm 1.6$  g,  $14.7 \pm 1.0$  g ( $p=0.0288$ ) であった.

第 28 日またはマウスの死亡した日に舌腫瘍および頸部リンパ節を摘出した. いずれのマウスも肺や肝臓を含む舌以外の臓器に異常所見は認めなかった. 舌への視診上の潰瘍形成は治療群において 33.3% (15 匹中 5 匹), コントロール群において 66.7% (15 匹中 10 匹) にみられた. しかし舌腫瘍の大きさに関しては 2 群間で有意な相違を認めなかった. 頸部リンパ節は最低で 2 個, 最大で 5 個, 平均 2.6 個 (治療群 2.3 個, コントロール群 2.9 個) 摘出された. 頸部リンパ節転移はすべて顕微鏡的転移であり (第 9 図), 治療群の 13.3% (15 匹中 2 匹), コントロール群の 60.0% (15 匹中 9 匹) に認められた. この頸部リンパ節転移に対する ONO-4817 の効果は 2 群間で統計学的有意差を示した ( $p=0.0209$ ; 第 1 表).



第 9 図 同所移植モデルでの頸部リンパ節転移. (A) リンパ節辺縁洞に顕微鏡的転移巣を認める (矢頭) ( $\times 40$ ). (B) (A) の四角で囲まれた部分の拡大像, 転移巣を認める (矢頭) ( $\times 100$ ).

第1表 ONO-4817 の頸部リンパ節転移抑制効果.

|   | Treatment group | Control group | p value* |
|---|-----------------|---------------|----------|
| Incidence of lymph node metastasis <sup>b</sup> | 2/15 (13.3%)    | 9/15 (60.0%)  | p=0.0209 |

\*Fisher's exact probability test により検定

<sup>b</sup>頸部リンパ節転移を認めたマウス数 / HSC-3-M3 を同所移植したマウス数

1 匹のマウスあたり 2 個から 5 個の頸部リンパ節を摘出し顕微鏡的リンパ節転移の有無を検索した.

(Yamashita T et al: Anti Cancer Res 23 : 2297-2302, 2003 の Table 1 を改変, 許可を得て転載)

## 考 察

今回使用した MMP 阻害剤 ONO-4817 は, 動物実験モデルで肝細胞癌の同所移植モデルにおける肝内転移や腎細胞癌の静脈内注射による血行性転移モデルにおける肺転移を抑制するとの報告がある<sup>33, 34</sup>). しかし, リンパ行性転移抑制に関する報告はない. そこで本研究では, MMP 阻害剤 ONO-4817 を用いて, 舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に対する効果を検討すべく動物実験をおこなった. ONO-4817 の MMP-1 に対する IC<sub>50</sub> 値, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 に対する Ki 値はそれぞれ 1600±265 nM, 0.73±0.407 nM, 42±5.51 nM, 2500±115 nM, 2.1±0.702 nM であり, ONO-4817 は MMP-2, MMP-9 に対して強い活性抑制効果を持つが MMP-1, MMP-3, MMP-7 に対してはその活性をほとんど抑制しない薬剤であることが報告されている<sup>32</sup>). MMP 阻害剤の高頻度かつ重大な副作用でヒドロキサン酸型 MMP 阻害剤の臨床試験における容量制限毒性でもある関節痛, 筋肉痛は MMP-1 の阻害が関与していると考えられている<sup>34, 35</sup>). MMP-1 に対する活性阻害作用をほとんど有さない ONO-4817 はこの副作用を減少させる可能性があり, 臨床試験における投与量の増加が期待できる薬剤であると考えられる.

HSC-3-M3 細胞はヌードマウスへの舌扁平上皮癌同所移植モデルにおいて, 頸部リンパ節への高転移能を有する細胞株である<sup>31</sup>). 本研究では舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に対する予防効果を検討するため, 頸部リンパ節へ高転移能を有する HSC-3-M3 細胞を使用した.

HSC-3-M3 の細胞増殖に対する ONO-4817 の効果を MTT アッセイにより検討した. MTT アッセイの結果, ONO-4817 は 100 μM の濃度まで, HSC-3-M3 に対し *in vitro* における直接的な細胞毒性を有しないことが示された. この結果は, ONO-4817 と同型の他のヒドロキサン酸型 MMP 阻害剤における MTT アッセイの結果と一致する<sup>21, 22, 36</sup>).

*In vivo* でのゼラチンザイモグラフィーの結果, HSC-3-M3 移植により形成された舌癌組織において, ONO-4817 の投与は MMP-2, MMP-9 の発現量にはほとんど影響を及ぼさないが, 潜在型 MMP-9 の活性化を抑制していることが判明した. 潜在型 MMP-9 の活性化因子として MMP-3<sup>37</sup>) や MMP-7<sup>38</sup>) が知られている. *In vivo* における MMP-9 活性化抑制の機序は今回の検討からは不明であるが, MMP-3 や MMP-7 の *in vivo* における発現量に間接的に関与している可能性がある.

MMP-2, MMP-9 活性の調節は, 遺伝子発現, 潜在型酵素の産生, 細胞外への分泌, 細胞外での活性化, 活性型酵素の内在性インヒビターによる阻害などのステップで極めて緻密になされている<sup>39</sup>). 従来より, ノーザンブロッティング, ゼラチンザイモグラフィー, 免疫染色などの結果として, MMP-2 や MMP-9 の mRNA や蛋白の発現が頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移や予後と相関するとの報告がなされているが, これらは MMP 活性調節の一部のステップとの相関であり, 総合的な MMP-2, MMP-9 の活性すなわち癌組織での細胞外マトリックス分解能との相関を見ることはできない. これに対し FIZ は MMP 活性調節の全ステップの結果としての, 組織局所における蛋白分解活性を直接観察できる利点がある. 本研究でも FIZ を行い, ONO-4817 の局所癌組織におけるゼラチン分解能抑制効果の有無を検討した. その結果, HSC-3-M3 のヌードマウスへの舌癌同所移植モデルにおいて, ONO-4817 は舌癌組織でのゼラチン分解能を強く抑制していることが判明した. ゼラチンザイモグラフィーの結果から考えると, 局所癌組織での ONO-4817 によるゼラチン分解能の抑制は MMP-2, MMP-9 の直接的な活性抑制と *in vivo* における MMP-9 活性化の抑制の少なくとも 2 つの機序が関与していると考えられる.

本研究から, ニューマウスへの舌癌同所移植モデルにおいて舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移は ONO-4817 により抑制されることが判明した. これは, 頭頸部扁平

上皮癌の頸部リンパ節転移が MMP 阻害剤投与により効果的に抑制されることを示した最初の研究である。リンパ節転移抑制の機序として、細胞外マトリックスの分解抑制による局所癌組織での癌細胞の浸潤やリンパ管への侵入の阻害が考えられる。またリンパ節転移が原発巣での微小脈管密度に相関するとの報告が大腸癌<sup>40)</sup>、上咽頭癌<sup>41)</sup>においてなされている。さらに ONO-4817 が腎細胞癌において原発巣での脈管密度を濃度依存性に抑制するとの報告もある<sup>34)</sup>。したがって本研究でのリンパ節転移抑制効果においても、原発巣における細胞外マトリックス分解抑制効果のほか、微小脈管密度抑制効果も機序として働いている可能性がある。

卵巣癌<sup>42)</sup>や神経膠腫<sup>43)</sup>の同所移植モデルで MMP 阻害剤の単独投与がマウスの生存期間を延長させるとの報告がある。本研究においてはコントロール群と ONO-4817 治療群での生存率に統計学的有意差を認めなかった。しかし観察数と観察期間が十分とはいえず、頭頸部扁平上皮癌の生存率に対する MMP 阻害剤の効果については本研究からは不明である。また同所移植後 21 日と 28 日において ONO-4817 投与により体重減少が抑制されることが示された。すべての頸部リンパ節転移が顕微鏡的転移であり、他臓器に異常所見を認めなかったことから、全身状態に影響する治療群とコントロール群間の相違点は原発巣の状態のみである。すなわち、ONO-4817 による体重減少抑制効果は、本薬剤の原発巣に対する効果によると考えられる。原発巣の腫瘍の大きさには有意な相違は認められなかったが、原発巣での潰瘍形成は治療群よりコントロール群に多く認められた。これは原発巣での ONO-4817 による MMP-2、MMP-9 活性抑制に伴う基底膜分解の抑制をはじめとした細胞外マトリックス分解抑制効果によると考えられる。潰瘍形成に伴う摂食時痛が、コントロール群の食事摂取量を減少させ、体重減少を促進させたとも考えられる。MMP 阻害剤の原発巣に対する効果については、大腸癌<sup>44)</sup>、乳癌<sup>45)</sup>、悪性黒色腫<sup>46)</sup>、肺癌<sup>47)</sup>において、その原発巣の発育と浸潤を抑制すると報告されている。ONO-4817 も原発巣に対する同様の効果をもつと考えられる。

本研究において、頸部リンパ節転移は HSC-3-M3 同所移植翌日からの ONO-4817 の投与で抑制され、またマウスの体重減少は day 21 および day 28 において抑制された。この結果は MMP 阻害剤が早期舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移抑制に効果が期待できるとともに、根治的治療が困難な進行期においても QOL の向上に寄与する有効な治療手段になりうることを示唆する。1984 年に最初の MMP 阻害剤の人への投与が行われ<sup>48)</sup>、

1990 年代には各種進行癌に対する MMP 阻害剤の効果が臨床試験において検討された。切除不能胃癌症例での第 3 相試験において、MMP 阻害剤の生存率改善への寄与を認めたとの報告がある<sup>49)</sup>が、肺癌、卵巣癌、肺小細胞癌、乳癌などに対するほとんどの第 3 相試験では MMP 阻害剤の生存率への寄与を認めていない<sup>50, 51)</sup>。これらの結果から、癌に対する MMP 阻害剤の適応を疑問視する意見もある。しかし 1) 癌浸潤、転移の原因となる MMP に対しより特異的な阻害を行う、2) 関節痛、筋肉痛をはじめとする副作用なく長期間投与できる MMP 阻害剤を選択する、3) 早期の癌に対する MMP 阻害剤の効果を検討する、4) 現在まで MMP 阻害剤の臨床試験が行われていない癌 (頭頸部、膀胱、腎など) に対する効果を検討する、などのような視点での臨床試験の再検討が可能であるとする意見もある<sup>51)</sup>。今後の新たな臨床試験のモデル作成のため、癌における MMP の役割、MMP 阻害剤の効果に関する知見の蓄積が必要と考えられるが、本薬剤、本モデルは 2)、3)、4) の点であらたな臨床試験のための基礎データとしての意義があると考えられる。

## 総 括

1. MTT アッセイの結果、MMP 阻害剤 ONO-4817 はヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3-M3 に対して 100 $\mu$ M の濃度まで殺細胞効果を示さなかった<sup>52)</sup>。
2. HSC-3-M3 を移植したヌードマウス舌癌のホジネート上滑をゼラチンザイモグラフィーに供した結果、潜在型 MMP-2、活性型 MMP-2、潜在型 MMP-9、活性型 MMP-9 が検出された。また *in vitro* において MMP-9 のゼラチン分解活性は ONO-4817 により濃度依存性に阻害された<sup>52)</sup>。
3. *In vivo* における ONO-4817 のゼラチン分解活性抑制効果をゼラチンザイモグラフィーおよび FIZ を用いて検出した。ゼラチンザイモグラフィーの結果、コントロール群に比較し ONO-4817 治療群の舌腫瘍において MMP-9 活性化率の低下が認められた。FIZ の結果、コントロール群に比較し ONO-4817 治療群の舌癌組織において、ゼラチン分解活性の著しい抑制が認められた。強いゼラチン分解活性がコントロール群の腫瘍巣に一致して認められたのに対して、治療群ではその活性は著しく抑制された<sup>52)</sup>。
4. 舌扁平上皮癌のヌードマウス同所移植モデルを用いて MMP 阻害剤 ONO-4817 投与の効果を検討した。コントロール群と比較し治療群において統計学的有意にマ

ウスの体重減少が抑制された。またコントロール群と比較し治療群において統計学的有意に頸部リンパ節転移が抑制された<sup>52)</sup>。

以上より、舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移が MMP 阻害剤 ONO-4817 により抑制されることが示された。その機序の一部と考えられる *in vitro*, *in vivo* での細胞外マトリックス分解抑制効果が確認された。この結果は、MMP 阻害剤が舌扁平上皮癌の付加的治療手段の 1 つになりうることを示唆するものである。

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室小川郁教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に対して直接御指導いただきました藤井正人助教授（現国立病院東京医療センター臨床研究センター部長）に深謝いたします。また御指導、御助言をいただきました外科学教室大谷吉秀講師、病理学教室亀山香織講師に厚く感謝いたします。また細胞を御供与いただきました金沢医科大学病理学教室の太田隆英博士、ONO-4817 を御供与いただきました小野薬品工業株式会社に感謝いたします。さらに本研究に御協力いただきました耳鼻咽喉科学教室諸兄に心より御礼申し上げます。

本研究の要旨は第 26 回日本頭頸部腫瘍学会（2002 東京）において発表した。

なお本研究の一部は文部科学省科学研究費奨励研究 A（平成 13 年度 No. 13770987）により行われた。

## 文 献

- 1) Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED : Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 35 : 257-265, 1999
- 2) Li XM, Wei WI, Guo XF, YuenPW, Lam LK : Cervical lymph node metastatic patterns of squamous carcinomas in the upper aerodigestive tract. *J Laryngol Otol* 110 : 937-941, 1996
- 3) Snow GB, van den Brekel MW, Leemans CR, Patel P : Surgical management of cervical lymph nodes in patients with oral and oropharyngeal cancer. *Recent Results Cancer Res* 134 : 43-55, 1994
- 4) Grandi C, Mingardo M, Guzzo M, Licitra L, Podrecca S, Molinari R : Salvage surgery of cervical recurrences after neck dissection or radiotherapy. *Head Neck* 15 : 292-295, 1993
- 5) Fujihara T, Sawada T, Hirakawa K, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M : Establishment of lymph node metastatic model for human gastric cancer in nude mice and analysis of factors associated with metastasis. *Clin Exp Metastasis* 16 : 389-398, 1998
- 6) Carr I : Lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2 : 307-317, 1983
- 7) 鈎スミ子, 小谷容子, 藤川和生, 西 厚生, 宮越一穂, 豊田徳雄, 大嶋雅美, 神原 忠 : リンパ管の構造とリンパ流. *脈管学*, 19 : 151-157, 1979
- 8) Shimada T, Nakamura H, Yamashita K, Kawata R, Murakami Y, Fujimoto N, Sato H, Seiki M, Okada Y : Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas : implications for lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 18 : 179-188, 2000
- 9) Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY : Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 36 : 207-213, 2000
- 10) O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA : Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127 : 813-820, 2001
- 11) Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen TS, Lee SY, Furukawa M : Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 89 : 715-723, 2000
- 12) Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, Kanzaki J : Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma : studies of clinical samples and *in vitro* cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 150 : 15-21, 2000
- 13) Imanishi Y, Fujii M, Tokumaru Y, Tomita T, Kanke M, Kanzaki J, Kameyama K, Otani Y, Sato H : Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 31 : 895-904, 2000
- 14) Emonard HP, Remacle AG, Noel AC, Grimaud JA, Stetler-Stevenson WG, Foidart JM : Tumor cell surface-associated binding site for the M(r) 72,000 type IV collagenase. *Cancer Res* 52 : 5845-5848, 1993
- 15) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M : A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370 : 61-65, 1994
- 16) Sato H, Takino T, Kinoshita T, Imai K, Okada Y, Stetler-Stevenson WG, Seiki M : Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* 385 : 238-240, 1996
- 17) Du B, Wang P, Guo X, Du B : Expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in laryngeal

- carcinoma. *Pathol Oncol Res* 52 : 214-217, 1999
- 18) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA : Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9 : 541-573, 1993
  - 19) Oba K, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Ohta M, Kaneko T, Shouji T, Igarashi A, Nakamura S : Prevention of liver metastasis of human colon cancer by selective matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166. *Cancer Lett* 175 : 45-51, 2002
  - 20) Maekawa R, Maki H, Wada T, Yoshida H, Nishida-Nishimoto K, Okamoto H, Matsumoto Y, Tsuzuki H, Yoshioka T : Anti-metastatic efficacy and safety of MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin Exp Metastasis* 18 : 61-66, 2000
  - 21) Jimenez RE, Hartwig W, Antoniu BA, Compton CC, Warshaw AL, Fernandez-Del CC : Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis : an additive strategy for cancer control. *Ann Surg* 231 : 644-654, 2000
  - 22) Bu W, Tang ZY, Sun FX, Ye SL, Liu KD, Xue Q, Chen J, Gao DM : Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20. *Hepato-gastroenterology* 45 : 1056-1061, 1998
  - 23) Sledge GW Jr, Qulali M, Goulet R, Bone EA, Fife RJ : Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 87 : 1546-1550, 1995
  - 24) Otani Y, Kubota T, Sakurai Y, Igarashi N, Yokoyama T, Kimata M, Wada N, Kameyama K, Kumai K, Okada Y, Kitajima M : Expression of matrix metalloproteinases in gastric carcinoma and possibility of clinical application of matrix metalloproteinase inhibitor *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci* 30 : 541-543, 1999
  - 25) Igarashi N, Kubota T, Otani Y, Matsuzaki SW, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, Tamaki K, Tanzawa K, Kobayashi T, Kitajima M : Preventive effect of matrix metalloproteinase inhibitor, R-94138, in combination with mitomycin C or cisplatin on peritoneal dissemination of human gastric cancer cell line TMK-1 in nude mice. *Jpn J Cancer Res* 90 : 116-121, 1999
  - 26) Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Hirakawa-YS, Chung K : Inhibition of invasion and lymph node metastasis of gastrointestinal cancer cells by R-94138, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res* 20 : 4331-4338, 2000
  - 27) Zeidman I, Buss JM : Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. I. Effectiveness of the lymph node as a barrier to the passage of embolic tumor cells. *Cancer Res* 14 : 403-405, 1954
  - 28) Van de velde CJH, Carr I : Lymphatic invasion and metastasis. *Experientia* 33 : 837-884, 1977
  - 29) Carr I, Carr J : Experimental models of lymphatic metastasis. *Tumor Invasion and Metastasis*. (Ed) Liotta LA, Hart IR, Martinus Nijhoff, The Hague, p. 189-205, 1980
  - 30) Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, Harada H, Yamamoto E : Development of a new invasion and metastasis model of human oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31 : 216-221, 1995
  - 31) Matsui T, Ota T, Ueda Y, Tanino M, Odashima S : Isolation of a highly metastatic cell line to lymph node in human oral squamous cell carcinoma by orthotopic implantation in nude mice. *Oral Oncol* 34 : 253-256, 1998
  - 32) Yamada A, Uegaki A, Nakamura T, Ogawa K : ONO-4817, an orally active matrix metalloproteinase inhibitor, prevents lipopolysaccharide-induced proteoglycan release from the joint cartilage in guinea pigs. *Inflamm Res* 49 : 144-146, 2000
  - 33) Sawada S, Murakami K, Yamaura T, Mitani N, Tsukada K, Saiki I : Therapeutic and analysis model of intrahepatic metastasis reflects clinical behavior of hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 93 : 190-197, 2002
  - 34) Muraishi Y, Mitani N, Fuse H, Saiki I : Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor (ONO-4817) on lung metastasis of murine renal cell carcinoma. *Anti-cancer Res* 21 : 3845-3852, 2001
  - 35) Chirivi RG, Garofalo A, Crimmin MJ, Bawden LJ, Stoppacciaro A, Brown PD, Giavazzi R : Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer* 58 : 460-464, 1994
  - 36) Noha M, Yoshida D, Watanabe K, Teramoto A : Suppression of cell invasion on human malignant glioma cell lines by a novel matrix-metalloproteinase inhibitor SI-27 : *in vitro* study. *J Neurooncol* 48 : 217-223, 2000
  - 37) Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H : Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 267 : 3581-3584, 1992
  - 38) Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y : Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem*. 270 : 6691-6697, 1995
  - 39) 大谷吉秀, 木全 大, 五十嵐直喜, 久保田哲朗, 北島政樹, 藤井正人, 亀山香織, 岡田保典 : 消化器癌転移抑制における MMP 活性阻害の意義 臨床応用への展望. *Biotherapy* 13 : 679-685, 1999
  - 40) Oh-e H, Tanaka S, Kitadai Y, Shimamoto F, Yoshihara M, Haruma K : Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*

- 44 : 1129-1136, 2001
- 41) Wakisaka N, Wen OH, Yoshizaki T, Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E, Nakanishi I : Association of vascular endothelial growth factor expression with angiogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 109 : 810-814, 1999
- 42) Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MJ, Balkwill FR : A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res* 53 : 2087-2091, 1993
- 43) Price A, Shi Q, Morris D, Wilcox ME, Brasher PM, Rewcastle NB, Shalinsky D, Zou H, Appelt K, Johnston RN, Yong VW, Edwards D, Forsyth P : Marked inhibition of tumor growth in a malignant glioma tumor model by a novel synthetic matrix metalloproteinase inhibitor AG3340. *Clin Cancer Res* 5 : 845-854, 1999
- 44) Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman R M : Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 54 : 4726-4728, 1994
- 45) Low JA, Johnson MD, Bone EA, Dickson RB : The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) retards human breast cancer solid tumor growth but not ascites formation in nude mice. *Clin Cancer Res* 2 : 1207-1214, 1996
- 46) Conway JG, Trexler SJ, Wakefield JA, Marron BE, Emerson DL, Bickett DM, Deaton DN, Garrison D, Elder M, McElroy A, Willmott N, Dockerty AJ, McGeehan GM : Effect of matrix metalloproteinase inhibitors on tumor growth and spontaneous metastasis. *Clin Exp Metastasis* 14 : 115-124, 1996
- 47) Anderson IC, Shipp MA, Docherty AJP, Teicher BA : Combination therapy including a gelatinase inhibitor and cytotoxic agent reduces local invasion and metastasis of murine Lewis lung carcinoma. *Cancer Res* 56 : 715-718, 1996
- 48) McCullagh K, Wadsworth H, Hann M : Carboxyalkyl peptide derivatives. *European Patent Application EU126* : 1-111, 1984
- 49) Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW : Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer : a randomised trial. *Br J Cancer* 86 : 1864-1870, 2002
- 50) Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JA : A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 87 : 161-167, 2002
- 51) Pavlaki M, Zucker S : Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi) : the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev* 22 : 177-203, 2003
- 52) Yamashita T, Fujii M, Tomita T, Ishiguro R, Tashiro M, Tokumaru Y, Imanishi Y, Kanke M, Ogawa K, Kameyama K, Otani Y : The inhibitory effect of matrix metalloproteinase inhibitor ONO-4817 on lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Anticancer Res* 23 : 2297-2302, 2003

学位論文

Interleukin-6 に誘導される腎細胞癌の増殖における  
活性化型 STAT3 の役割

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

(指導：村井 勝教授)

はり ぐち あき お  
堀 口 明 男

(平成 16 年 3 月 23 日受付)

Key Words : renal cell carcinoma, interleukin-6, signal transducer and activator of transcription 3, extracellular signal-regulated kinases, apoptosis

Interleukin-6 (IL-6) は様々な種類の細胞に対して分化誘導や増殖の制御などの多彩な生物学的機能を有する多機能性サイトカインである<sup>1, 2)</sup>。IL-6 の受容体システムはリガンド結合能を有する gp80 と細胞内情報伝達を担う gp130 から構成される<sup>3, 4)</sup>。IL-6 は gp80 と結合することにより gp130 のホモ二量体形成を誘導し、gp130 に恒常的に会合している Janus kinase (Jak) を近接させることにより Jak 同士のリン酸化を促す<sup>5)</sup>。次いで、活性化された Jak は gp130 の細胞内領域に存在するチロシン残基をリン酸化する<sup>5)</sup>。これらのリン酸化されたチロシン残基は細胞内に存在している Src homology 2 (SH2) ドメインを有する Signal transducers and activators of transcription (STAT1 と STAT3) や SH2 domain containing phosphatase 2 (SHP2) などのアダプター分子と会合し、これらのアダプター分子はリン酸化され活性化する<sup>5, 6)</sup>。

リン酸化された STAT3 はホモ二量体または STAT1 とヘテロ二量体を形成後に核内へ移行し、特定の遺伝子発現を調節する転写因子として機能する<sup>7)</sup>。STAT3 は特に cyclin D1 などの細胞周期関連タンパクや bcl-2 などのアポトーシス関連タンパクの発現を制御する<sup>8, 9)</sup>。STAT3 は IL-6 の刺激によってチロシンのリン酸化 (Tyr705 のリン酸化) とセリンのリン酸化 (Ser727 の

リン酸化) を受ける<sup>10)</sup>。STAT3 におけるチロシンのリン酸化は STAT3 の二量体形成、さらに核内移行および DNA への結合に不可欠であるが、セリンのリン酸化の機能的意義については議論が分かれている<sup>5, 10~12)</sup>。一方、リン酸化された SHP2 は mitogen-activated protein kinase (MAPK) family の中で古典的 MAPK ともよばれる extracellular signal-regulated kinases (ERKs) をリン酸化し、活性化する<sup>6)</sup>。

IL-6 の細胞内シグナル伝達において Jak-STAT3 経路と SHP2-ERKs 経路が主要な役割を果たしていることは論を待たないが、最近の知見では、それら以外にも、STAT family の一亜型である STAT5 や、MAPK family の一亜型である p38 が IL-6 の刺激によって活性化されるという報告も散見され、他のシグナル伝達経路の関連性も示唆されている<sup>13, 14)</sup>。これらの報告は IL-6 の刺激による細胞内シグナル伝達経路が細胞の種類、由来臓器、細胞環境などにより多種多様であることを示している。また ERKs の活性には様々な機序により STAT3 の活性を制御するクロストークが存在することも報告されている<sup>11, 12, 15, 16)</sup>。

IL-6 は血液系、免疫系など様々な疾患の病態形成に深く関与しており、特に悪性腫瘍では増殖因子として働くことが知られている<sup>2, 17~21)</sup>。泌尿器科領域の悪性腫瘍

本論文は Horiguchi A, Oya M, Marumo K, and Murai M : STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P. *Kidney Int* 61 : 926-938, 2002 の一部、また、Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, and Murai M : Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma : a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol* 168 : 762-765, 2002 の一部を、許可を得て引用した。



では前立腺癌と腎細胞癌において IL-6 が増殖因子であることが指摘されてきた<sup>18, 19)</sup>。特に腎細胞癌においては腫瘍組織で IL-6 および IL-6 受容体の強発現が認められる点、さらに腎癌細胞が IL-6 の刺激により増殖し、抗 IL-6 抗体によって増殖が抑制される点から IL-6 が腎細胞癌の autocrine growth factor であることが以前から示唆されてきた<sup>18, 22)</sup>。また、腎細胞癌患者はしばしば発熱や白血球増加症などの腫瘍随伴症候群を呈するが、IL-6 は病態生理学的に腫瘍随伴症候群の原因の一つであると考えられている<sup>17)</sup>。さらに進行性腎細胞癌患者の多くは血清 IL-6 が高値を示し、血清 IL-6 が高値の症例は低値の症例に比べ予後不良であることが報告されている<sup>17)</sup>。このような背景から IL-6 に誘導される autocrine growth を抑制する治療が腎細胞癌の新たな治療戦略となる可能性が示唆される。しかしながら、IL-6 に誘導される腎細胞癌の増殖に関する細胞内シグナル伝達経路を含めた機序の詳細はいまだに解明されていない。

このような背景から、本研究では IL-6 により誘導される腎細胞癌の増殖に関与している細胞内シグナル伝達経路を解析し、シグナル阻害剤による細胞内シグナルの変化および増殖の抑制効果を検討した。また、IL-6 が autocrine growth factor である悪性腫瘍において、しばしば腫瘍組織内に STAT3 の活性化が認められる<sup>23)</sup>、腎細胞癌においても同様に STAT3 の活性化が認められる可能性があると考え、IL-6 の細胞内シグナルの解析に引き続き、腎細胞癌組織内の STAT3 の活性化を免疫組織学的に解析し、その臨床的意義につき検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞株

4 種のヒト腎癌細胞株 Caki-1 細胞 (以下 Caki-1)、ACHN 細胞 (以下 ACHN)、769P 細胞 (以下 769P)、A498 細胞 (以下 A498) を American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) より購入した。これらの細胞を 50 IU/ml の penicillin (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)、50 µg/ml の streptomycin (Gibco BRL)、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地 (Gibco BRL) で 5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で培養した。

### 2. 試薬

ヒトリコンピナント IL-6 は Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA) より購入し、20 ng/ml の濃度で使用した。抗ヒト IL-6 モノクローナル中和抗体 (以下抗 IL-6 Ab) は R&D systems (Minneapolis, MN, USA) より購入し

た。Jak 阻害剤 AG490 と MEK 1 阻害剤 PD98059 は Calbiochem (LaJolla, CA, USA) より購入し、dimethylsulfoxide (DMSO) を溶媒として 50 mM に溶解し、暗所で -70°C に保存した。Phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) は Calbiochem より購入した。抗 total STAT1 ポリクローナル抗体、抗リン酸化 STAT1 (p-STAT1 (Tyr701)) ポリクローナル抗体、抗 total STAT3 ポリクローナル抗体、抗リン酸化 STAT3 (p-STAT3 (Tyr705)) ポリクローナル抗体、抗リン酸化 STAT5 (p-STAT5 (Tyr694)) ポリクローナル抗体、抗 total p38 ポリクローナル抗体、抗リン酸化 p38 (p-p38 (Thr180/Tyr182)) ポリクローナル抗体、抗 total ERKs ポリクローナル抗体、抗リン酸化 ERKs (p-ERKs (Thr202/Tyr204)) ポリクローナル抗体は New England Biolabs (Beverly, MA, USA) より購入した。抗 total STAT5 モノクローナル抗体、抗 bcl-2 モノクローナル抗体、抗 bcl-xL モノクローナル抗体、抗 bax モノクローナル抗体、抗 mcl-1 モノクローナル抗体は BD Transduction Laboratories, Inc. (Franklin Lake, NJ, USA) より、抗 β-actin モノクローナル抗体は DAKO JAPAN (Tokyo, Japan) より購入した。

### 3. 培養細胞上清中の IL-6 濃度の測定

6 well plate を用いて 1 well に  $1 \times 10^4$  個の細胞を、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地中で 24 時間前培養した。その後、各 well を無血清培地で洗浄し、培地を 1 ml の無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。培養上清を回収し、3000 g で遠心分離した後 IL-6 濃度を HS human IL-6 immunoassay kit (R&D systems) を用いた ELISA 法にて測定した。

### 4. RNA の抽出と IL-6 受容体 (gp80, gp130) の RT-PCR 解析

$1 \times 10^7$  個の細胞から Trizol (Gibco BRL) を用いて total RNA を抽出した。1 µg の RNA を Molony murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) とランダムプライマーを用いて逆転写反応を起こした。得られた 2 µl の cDNA を 2 U の Taq polymerase (Boehringer Mannheim) を用いて PCR 法を施行した。35 サイクルの反応後、15 µl の PCR 産物を 1.5% agarose gel で泳動し、ethidium bromide で染色した。PCR に使用した各 primer の塩基配列と予想される PCR 産物の分子量は以下の通りである。

- 1) gp130 (product size 720 bp)  
 5'-ACC TAT GAA GAT AGA CCA TCT AAA-3' (sense)  
 5'-GGT TCT ATA AAA TAT AGT ATA ATT-3' (antisense)
- 2) gp80 (product size 768 bp)  
 5'-ATG CTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG-3' (sense)  
 5'-TCT GAG CTC AAA CCG TAG TCT-3' (antisense)
- 3) GAPDH (product size 983 bp)  
 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3' (sense)  
 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' (antisense)

#### 5. ウェスタンブロット解析

細胞を無血清 RPMI 1640 培地で 24 時間前培養した後に IL-6 で刺激した。刺激後に細胞を 100  $\mu$ M  $\text{Na}_2\text{VO}_4$  を添加した phosphate-buffered-saline (PBS) で洗浄し、lysis buffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 50 mM NaF, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ ) を加え、細胞溶解液を抽出した。サンプルを SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) に転写した。次いで、5% スキムミルクを含む Tris-buffered saline (TBS) で非特異的な抗体の結合に対するブロッキングを行った後、一次抗体と反応させた。Amplified alkaline phosphatase system (Bio-Rad) を用いて目的とするバンドを可視化した。Jak 阻害剤 AG490 と MEK1 阻害剤 PD98059 の細胞内シグナルに対する影響を解析する場合は IL-6 による刺激前に AG490 と 16 時間または PD98059 と 1 時間前培養した。アポトーシス関連タンパクの変化を解析する場合は細胞を 100  $\mu$ M AG490 と IL-6 を加え 48 時間から 96 時間培養した後にタンパクを抽出し、同様の方法でウェスタンブロット解析を行った。その後バンドをイメージスキャナーで取り込み、NIH Image 1.52 program (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて定量化した。

#### 6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

核内抽出液を lysis buffer (20 mM HEPES pH7.9, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20% glycerol, 20 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , 1

mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin) により抽出した。20  $\mu$ g の核抽出液を 2  $\mu$ g の polydeoxyinosinic-polydeoxycytidylic acid (poly dI-dC; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) と  $^{32}\text{P}$  でラベルされた sis-inducible-element (SIE; 5'-GTG CAT TTC CCG TAA ATC TTG TCT AGA-3') に相同の塩基配列を有する double-strand oligonucleotides とともに binding buffer (10 mM HEPES pH 8.0, 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT) に室温で 20 分反応させた。サンプルを 4% polyacrylamide gel で泳動分離し、乾燥後に解析した。

#### 7. 細胞量の判定

平底 96 well plate の各 well で、200  $\mu$ l の 10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地中で  $1 \times 10^4$  個の細胞を 24 時間前培養後、試薬を含む無血清 RPMI 1640 培地に交換した。培養後に plate を洗浄し、2% エタノールを含む 0.2% クリスタルバイオレット溶液で細胞を染色し、細胞量を判定した。

#### 8. アポトーシス

アポトーシスを核染色による形態学的観察とフローサイトメトリーを用いた terminal deoxynucleotide transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL) 法により判定した。核染色では、細胞を 4% パラホルムアルデヒドにて室温で 30 分固定し、1 mM の Hoechst 33258 (Sigma, St. Louis, MO, USA) で 37°C、10 分間染色した。細胞の形態を 365 nm に励起した蛍光顕微鏡で観察した。TUNEL 法では、 $1 \times 10^6$  個の細胞を 1% パラホルムアルデヒドで固定した後、断片化した DNA を Apotag Plus Fluorescein (FITC) kit (Oncor, Gaithersburg, MD, USA) で検出した<sup>20)</sup>。FITC でラベルされた細胞を Propidium iodide (PI; Sigma) で対比染色し、EPICS ALTRA flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) で解析した。

#### 9. 腎細胞癌組織の免疫組織染色

1989 年 10 月から 2001 年 8 月の期間に国立埼玉病院において外科的治療を施行した腎細胞癌 48 例 (男性 39 例, 女性 9 例) から得た腫瘍組織と周囲の正常腎組織を対象とした。手術検体の免疫組織染色については施設内の了承を得て施行した。手術日を観察開始日、最終観察日を観察終了日として観察期間を計算した。観察期間は 2 ヶ月から 116 ヶ月 (平均 40 ヶ月) であった。ホ

ルマリン固定後のパラフィン包埋切片を5 μmの厚さに薄切した。切片をキシレンで脱パラフィン、エタノールで親水化した後、抗原賦活の目的で10 mM, pH 6.0のクエン酸バッファーに浸しマイクロウェーブにより60分間加熱した<sup>23, 25)</sup>。内因性ペルオキシダーゼ活性を不活性化するために切片に0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を滴下し30分間反応させた。次いで非特異的な抗体の結合を阻止するために10%正常ヤギ血清を滴下し室温で60分間反応させた後、1:25に希釈した抗STAT3ポリクローナル抗体または抗p-STAT3ポリクローナル抗体と4℃で一晩反応させた。そしてSimple stain Max PO (Nichirei Corp., Tokyo, Japan)を滴下し、室温にて60分間反応させ、diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB)を滴下し、室温で10分間反応させ発色させた。TBSにて洗浄した後にヘマトキシリンで対比染色した。切片全体を観察しp-STAT3の陽性細胞率を判定した。腫瘍の病理組織学的診断はWHO分類およびTNM分類にしたがった。

10. 統計学的解析

相対的細胞量の差はunpaired t testにて判定した。p-STAT3の発現と病理組織学的所見との関連はchi-square testにて検討した。低発現群と高発現群の疾患特異的生存率に関するKaplan-Meier生存曲線を作成し、log-rank testにて有意差を検定した。多変量解析には多変量Cox比例ハザードモデルを用いた。IL-6濃度、相対的細胞量は平均値±標準偏差で表示した。P<0.05を統計学的に有意差ありと判定した。

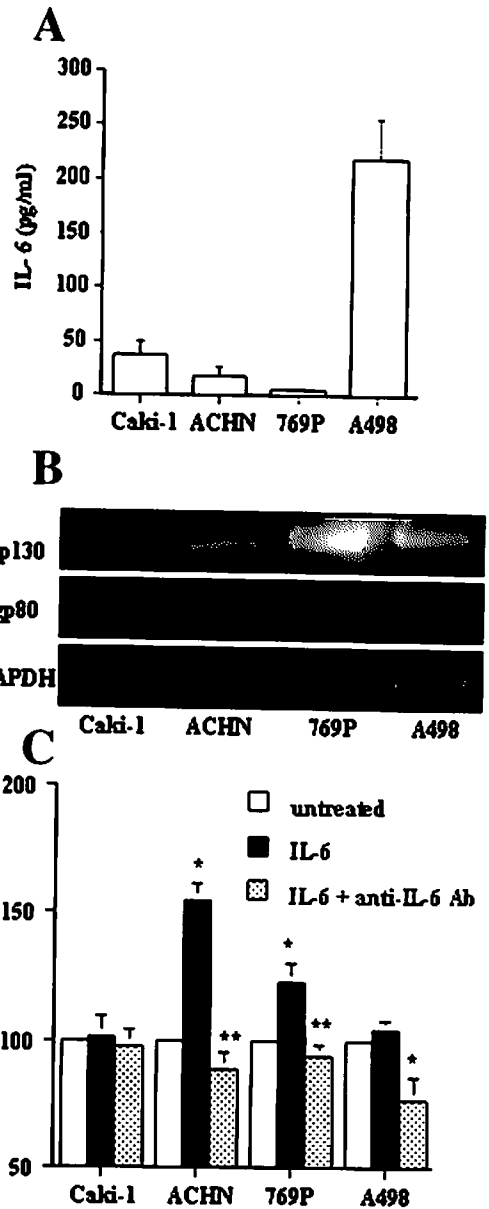
結 果

1. 腎癌細胞におけるIL-6の産生とIL-6受容体の発現

腎癌細胞が培養上清中に産生するIL-6濃度をELISA法により測定した。培養上清中のIL-6濃度はCaki-1が35.3±13.8 pg/ml, ACHNが16.3±9.3 pg/ml, 769Pが4.2±2.0 pg/ml, A498が219±37 pg/mlであった(第1図A)。また、IL-6受容体(gp80とgp130)のmRNAの発現をRT-PCR法で解析した。gp80の発現(768 bp)は全ての細胞に認められたが、gp130の発現(720 bp)はACHN, 769P, A498で認められたが、Caki-1では認められなかった(第1図B)。

2. 外因性に添加されたIL-6と抗IL-6 Abの腎癌細胞の増殖に与える影響

外因性に添加されたIL-6と抗IL-6 Abの腎癌細胞の増殖に与える影響をクリスタルバイオレット法にて検討

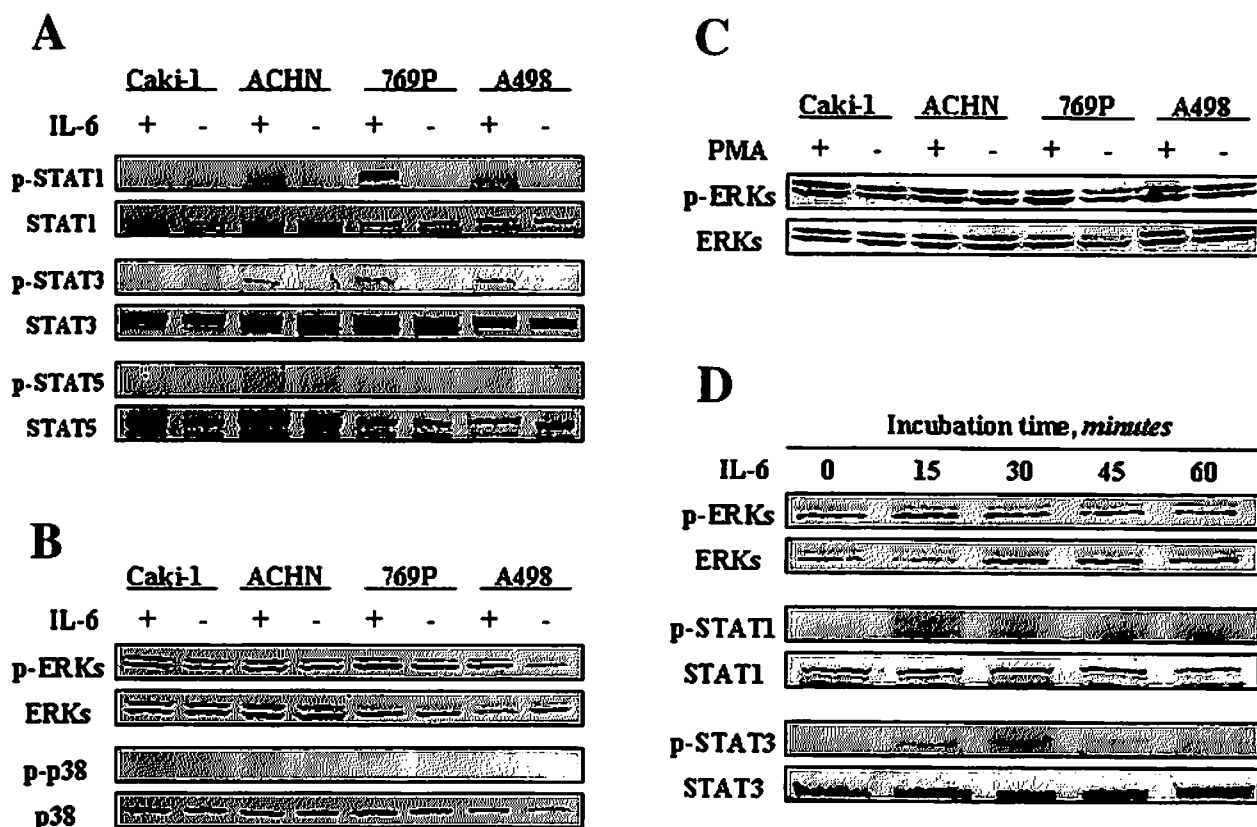


第1図 (A) 腎癌細胞が培養上清中に産生するIL-6濃度の測定。6 well plateの各wellに1×10<sup>4</sup>個の細胞を前培養し、無血清培地に交換した24時間後に上清を回収しELISA法により測定した。結果は独立した3回の測定結果の平均値±標準偏差で表示した。(B) RT-PCR法による腎癌細胞におけるIL-6受容体(gp80とgp130)mRNA発現の解析。gp80, gp130, GAPDHのproduct sizeはそれぞれ720 bp, 768 bp, 983 bpであった。GAPDHはinternal controlとして用いた。(C) IL-6添加による細胞増殖。無治療群(□), 20 ng/ml IL-6を添加した群(■), 1.5 μg/mlの抗IL-6 Abと20 ng/ml IL-6を添加した群(▨)をそれぞれ96時間培養し、細胞生存率をクリスタルバイオレット染色にて判定した。結果は独立した3回の測定結果の平均値±標準偏差で表示した。\*無治療群に比べ有意な変化(p<0.05), \*\*IL-6添加群に比べ有意な変化(p<0.05) (Horiguchi A et al: Kidney Int 61: 926-938, 2002のFig. 1を許可を得て転載)

した。抗IL-6 Abは20 ng/mlのIL-6の生物学的活性を完全に中和可能とされている1.5 µg/mlの濃度で利用した。96時間のIL-6との培養によりIL-6非添加群に比べACHN (154.6±6.7%)と769P (122.8±7.1%)で有意な増殖の促進が認められた ( $p<0.05$ , 第1図C)。また、その増殖促進効果は抗IL-6 Abの添加によって有意に抑制された ( $p<0.05$ , 第1図C)。A498ではIL-6の添加による有意な増殖促進効果は認めなかったが、IL-6非添加群に比べ抗IL-6 Abの添加によって増殖は有意に抑制された ( $p<0.05$ , 第1図C)。gp130のmRNAの発現が認められなかったCaki-1ではIL-6、抗IL-6 Abともに増殖に有意な影響を与えなかった (第1図C)。

### 3. 腎癌細胞におけるIL-6刺激による細胞内シグナルの解析

腎癌細胞におけるIL-6刺激による細胞内シグナルを抗リン酸化特異的抗体によるウェスタンブロット法により解析した。まず、IL-6によるSTAT1, STAT3, STAT5のチロシンリン酸化を検討した。無血清培地中で飢餓状態にある細胞をコントロールとして、IL-6で15分刺激した細胞とSTATのリン酸化レベルを比較した。活性化型、非活性化型を含むtotal STAT1, total STAT3, total STAT5の発現は全ての細胞で認められ、その発現レベルはIL-6刺激により変化しなかった (第2図A)。gp130の発現を認めなかったCaki-1以外でSTAT1とSTAT3のチロシンリン酸化が認められた (第2図A)。一方、全ての細胞でSTAT5のチロシン



第2図 腎癌細胞におけるIL-6刺激による細胞内シグナル経路の解析。無血清培地中の細胞を20 ng/mlのIL-6で15分間刺激した。STAT1, STAT3, STAT5のリン酸化(A), ERKsとp38のリン酸化(B)を活性化型のみを認識するリン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロット法によって解析した。(C)無血清培地中の細胞を無治療、または100 ng/mlのPMAで刺激し、ERKsのリン酸化レベルをウェスタンブロット法により解析した。(D)IL-6で刺激したACHNにおけるSTAT1, STAT3, ERKsのリン酸化の経時的変化。無血清培地中の細胞を15分から60分間IL-6で刺激し、ウェスタンブロット法により解析した。(Horiguchi A et al: *Kidney Int* 61: 926-938, 2002のFig. 2を許可を得て転載)

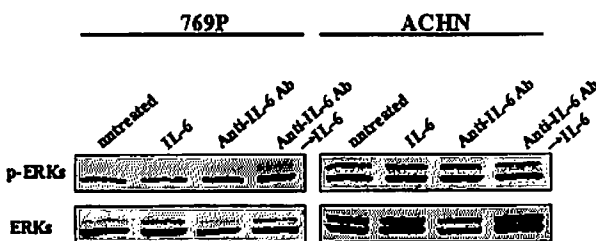
リン酸化は認められなかった (第2図A).

次いで、IL-6刺激によるERKsとp38のリン酸化を検討した。活性化型、非活性化型を含むtotal ERKs, total p38, の発現は全ての細胞で認められ、その発現レベルはIL-6刺激により変化しなかった (第2図B). ERKsはIL-6の刺激前から全ての細胞で恒常的にリン酸化されており、そのレベルは外因性に添加されたIL-6により上昇しなかった (第2図B). p-ERKsの陽性コントロールとして、ERKsの強い刺激物質であるPMAを加えERKsのリン酸化レベルの変化を観察したところ、Caki-1と769PではERKsのリン酸化レベルの上昇が認められた (第2図C). 一方、全ての細胞でp38のリン酸化は認められなかった (第2図B).

さらに、ACHNにおけるIL-6刺激後15分から60分のSTAT1, STAT3, ERKsの経時的なリン酸化の変化を検討した。STAT1とSTAT3のリン酸化は一過性で、IL-6刺激後15分以内にリン酸化の上昇が認められ、60分後には非刺激時のレベルに戻った (第2図D). しかしERKsのリン酸化レベルは終始変化しなかった (第2図D).

#### 4. 恒常的なERKsのリン酸化と腎癌細胞が産生する内因性IL-6の関連

ERKsがIL-6の主要なシグナル伝達経路である点<sup>6, 26)</sup>、腎癌細胞が検出可能なレベルのIL-6を培養上清中に産生している点 (第1図A) から、腎癌細胞が産生している内因性IL-6が恒常的なERKsのリン酸化の原因である可能性を考え、抗IL-6 Abとの培養による内因性IL-6活性の抑制を介したERKsのリン酸化レベルの変化



第3図 内因性IL-6の中和によるERKsのリン酸化レベルの変化。無血清培地中の769PとACHNの無治療群、IL-6で15分刺激した群、抗IL-6 Abと24時間培養した群、抗IL-6 Abと24時間培養後にIL-6で15分間刺激した群から得たサンプルを用いてウェスタンブロット法で解析した。ERKsのリン酸化レベルに変化は認めなかった。(Horiguchi A et al: Kidney Int 61: 926-938, 2002のFig. 3を許可を得て転載)

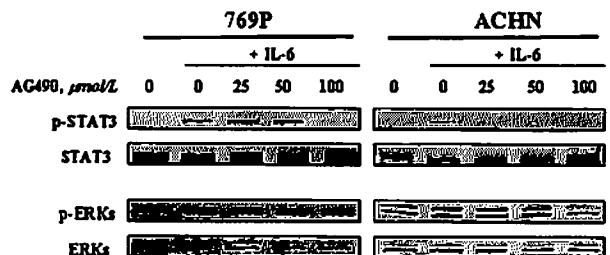
を検討した。ACHN, 769Pの無治療群、15分間外因性のIL-6で刺激をした群、24時間抗IL-6 Abと培養した群、24時間抗IL-6 Abと培養した後にIL-6で15分間刺激した群でERKsのリン酸化レベルをウェスタンブロット法で比較検討した。ACHN, 769Pの両者とも抗IL-6 AbによるERKsのリン酸化レベルの低下は認めず、また引き続きIL-6刺激でもリン酸化レベルの上昇は認められなかった (第3図). Caki-1, A498でも同様の結果であった。

#### 5. Jak阻害剤AG490のSTAT3とERKsのリン酸化への影響

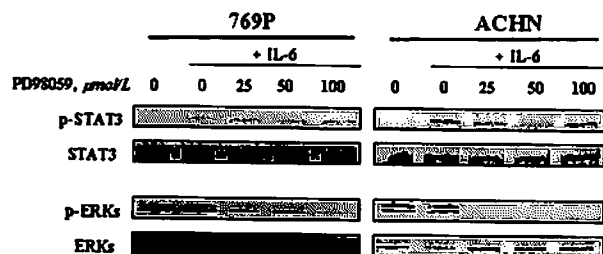
IL-6刺激はgp130の二量体形成を促し、Jak1, Jak2, Tyk2をリン酸化し、引き続きSHP2, STAT3が活性化する<sup>5, 6)</sup>。腎癌細胞のIL-6の細胞内シグナルにおけるJakの役割を検討するために、Jak阻害剤AG490によるSTAT3とERKsのリン酸化への影響を検討した。ACHNと769Pを16時間AG490と前培養した後にIL-6で刺激したサンプルでウェスタンブロット法を施行した。ACHNでは25 μMのAG490で、769Pでは100 μMのAG490でIL-6刺激によるSTAT3のリン酸化が抑制された (第4図). しかしながら、ERKsの恒常的なリン酸化は100 μMのAG490でも抑制されなかった (第4図).

#### 6. 恒常的なERKsのリン酸化の抑制によるSTAT3のリン酸化への影響

ERKs活性とSTAT3活性のクロストークは細胞の種類や活性の状態により多岐にわたることが報告されてい



第4図 IL-6で刺激した腎癌細胞におけるJak阻害剤AG490のSTAT3とERKsのリン酸化への影響。無血清培地中の769PとACHNの無治療群、IL-6で15分間刺激した群、様々な濃度のAG490と16時間混合培養した後にIL-6で15分間刺激した群から得たサンプルを用いてウェスタンブロット法で解析した。(Horiguchi A et al: Kidney Int 61: 926-938, 2002のFig. 4を許可を得て転載)



第5図 IL-6で刺激した腎癌細胞におけるMEK1阻害剤PD98059のSTAT3とERKsのリン酸化への影響。無血清培地中の769PとACHNの無治療群、IL-6で15分間刺激した群、様々な濃度のPD98059と1時間混合培養した後にIL-6で15分間刺激した群から得たサンプルを用いてウェスタンブロット法で解析した。(Horiguchi A et al: *Kidney Int* 61: 926-938, 2002のFig. 5を許可を得て転載)

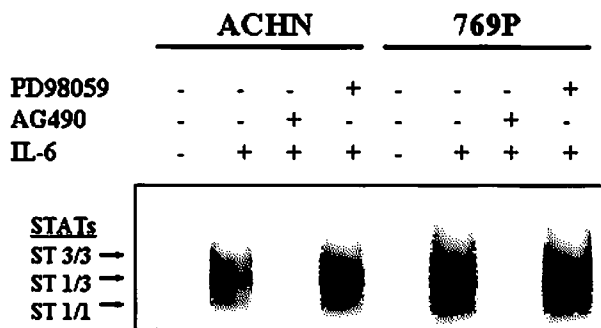
る<sup>11, 12, 15, 16)</sup>。ERKsがSTAT3のセリンのリン酸化を通じてSTAT3の活性を上昇させるという報告がある一方で、ERKsがSTAT3のチロシンリン酸化よりも上流レベルでSTAT3の活性を抑制するという報告も存在する<sup>11, 16)</sup>。我々が検討した全ての腎癌細胞でERKsの恒常的リン酸化が認められたため、ERKsがSTAT3の活性に何らかの影響を与えている可能性があると考えた。ACHNと769Pを1時間MEK1阻害剤PD98059と培養した後にIL-6の刺激を加えたサンプルでERKsとSTAT3のリン酸化を比較検討した。ERKsのリン酸化はACHN, 769Pともに25  $\mu\text{M}$ のPD98059で抑制されたが、STAT3のチロシンリン酸化は100  $\mu\text{M}$ のPD98059でも変化しなかった(第5図)。

#### 7. AG490とPD98059によるSTATとDNAの結合能に与える影響

次いで、IL-6によるSTATのチロシンリン酸化に加え、STATとDNAの結合能の上昇とAG490またはPD98059による抑制の有無を検討した。32Pでラベルした、活性化したSTAT1とSTAT3が高い親和性で結合することが自明であるSIEプローベを用いたEMSAを施行した。ACHNと769PではIL-6刺激により速やかにSIEプローベに結合するSTAT-DNAの複合体が確認され、その結合能はAG490によって著明に抑制されたが、PD98059に影響されなかった(第6図)。

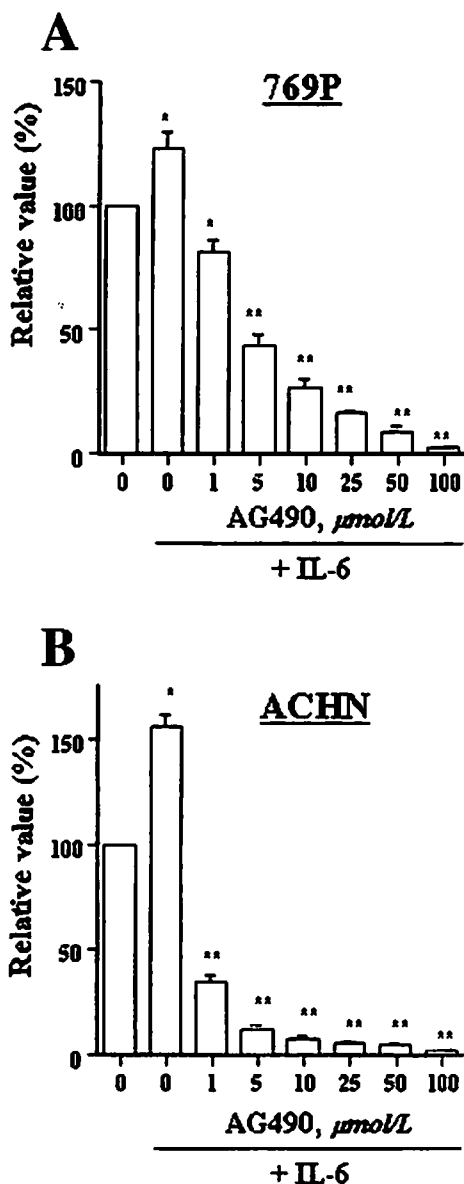
#### 8. AG490によるIL-6誘導性の腎癌細胞の増殖抑制

これまでの結果から腎癌細胞ACHNおよび769Pに



第6図 IL-6刺激により亢進したSTAT-DNA結合能のAG490とPD98059による影響。無血清培地中のACHNと769Pの無治療群、IL-6で15分間刺激した群、100  $\mu\text{M}$ のAG490(16時間)またはPD98059(1時間)と混合培養した後にIL-6で15分間刺激した群から得た核抽出液を、活性化したSTAT1とSTAT3に結合する<sup>32</sup>PでラベルしたSIE oligonucleotideプローベと反応させ、EMSAで解析した。左にSTAT3のホモ二量体(ST3/3と表示)、STAT1とSTAT3のヘテロ二量体(ST1/3と表示)、STAT1のホモ二量体(ST1/1と表示)を記す。(Horiguchi A et al: *Kidney Int* 61: 926-938, 2002のFig. 6を許可を得て転載)

においてIL-6は主にSTAT3を活性化することで増殖傾向を示し、Jak阻害剤AG490はIL-6の誘導するSTAT3のチロシンリン酸化と核内でのDNA結合能を抑制することが示された。次いで、IL-6による細胞内シグナルをJak阻害剤AG490で抑制した結果、IL-6の誘導する細胞増殖にどのような影響を与えるかを検討した。ACHNと769PをIL-6と様々な濃度のAG490の存在下で96時間培養したところ、両者で濃度依存性の増殖抑制効果が認められた(第7図)。ACHNでは1  $\mu\text{M}$ の濃度から有意な増殖抑制効果が認められ、その $\text{IC}_{50}$ 値は0.5  $\mu\text{M}$ であった。769Pでは1  $\mu\text{M}$ の濃度から有意な増殖抑制効果が認められ、その $\text{IC}_{50}$ 値は3.5  $\mu\text{M}$ であった。AG490の溶媒であるDMSOによる細胞障害は、検討したAG490の最高濃度である100  $\mu\text{M}$ 溶液を作成するのに要したDMSOとの混合培養で全く細胞障害が認められないことから除外可能と考えられた。AG490の非特異的反応を検討するために、IL-6非刺激下でAG490を反応させたところ、ACHN, 769Pとも有意な増殖抑制が認められた。しかし、増殖抑制に要した濃度はIL-6刺激下での濃度に比べ高濃度で、両者とも $\text{IC}_{50}$ 値は10.0  $\mu\text{M}$ であった。さらに、IL-6に反応を示さなかったCaki-1でもAG490による増殖抑制が認められたが、増殖抑制に要した濃度はIL-6刺激下での



第7図 IL-6刺激に誘導される腎癌細胞増殖に対するAG490の効果。96 well plateに $1 \times 10^4$ 個のACHN(A)または769P(B)を200 $\mu$ lの10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地ににて前培養した。24時間後に無血清培地、またはIL-6を含む無血清培地、または様々な濃度のAG490とIL-6を含む無血清培地に交換し、96時間後に細胞量をクリスタルバイオレット法にて判定した。結果は独立した3回の測定結果の平均値 $\pm$ 標準偏差で表示した。\*無治療群に比べ有意な変化( $p < 0.05$ )、\*\*無治療群に比べ有意な変化( $p < 0.01$ )。(Horiguchi A et al: *Kidney Int* 61: 926-938, 2002のFig. 7を許可を得て転載)

ACHNと769Pの増殖抑制に要した濃度よりも高濃度であり、 $IC_{50}$ 値は30.0 $\mu$ Mであった。

### 9. AG490によるアポトーシスの誘導

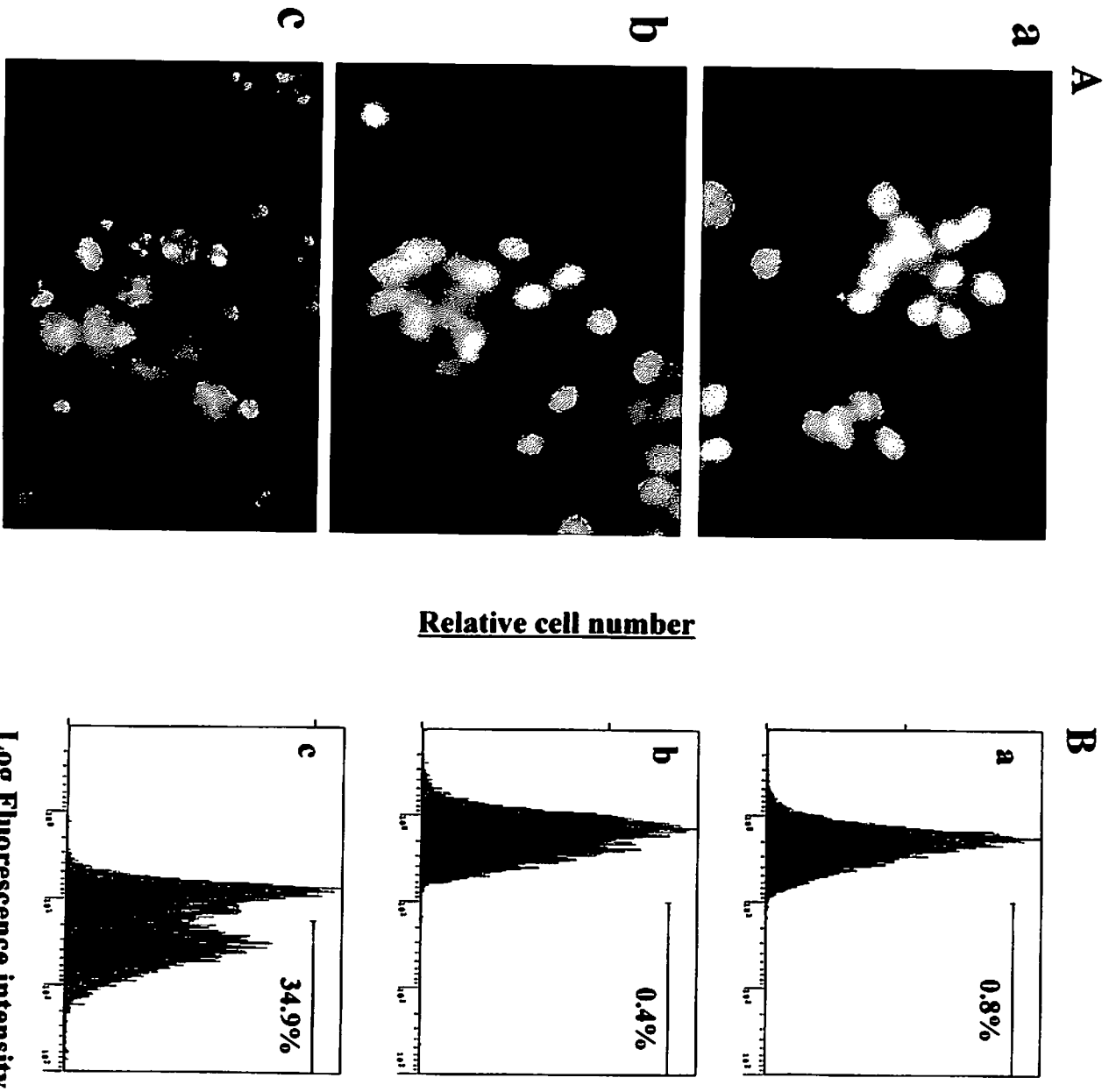
STAT3の活性化はアポトーシスを抑制することが報告されている<sup>8, 9, 21)</sup>。IL-6刺激による細胞内シグナルをAG490により抑制することでアポトーシスが誘導可能かをHoechst 33258を用いた核染色による形態学的観察とフローサイトメトリーを用いたTUNEL法により検討した。ACHNの無治療群、IL-6刺激をした群、100 $\mu$ MのAG490添加後にIL-6刺激をした群をそれぞれ96時間培養した。それぞれの細胞をHoechst 33258を用いて核染色したところAG490添加後にIL-6刺激をした群ではアポトーシスの典型的な所見である、核の断片化とクロマチンの濃縮が認められた(第8図A)。また、フローサイトメトリーを用いたTUNEL法ではアポトーシスが認められた細胞の割合は無治療群、IL-6刺激をした群でそれぞれ0.8%、0.4%であったのに対して、AG490添加後にIL-6刺激をした群では34.9%に認められた(第8図B)。769Pでも同様のアポトーシス誘導が確認された。

### 10. AG490によるアポトーシス関連タンパクの発現変化

腎癌細胞でAG490に誘導されるアポトーシスの機序を検討するため、アポトーシス関連タンパクであるbcl-2、bcl-xL、mcl-1、baxのAG490による発現の変化をウェスタンブロット法で検討した。ACHNを用いて100 $\mu$ MのAG490添加後にIL-6で刺激し、48時間から96時間までの変化を観察した。治療開始前の発現レベルではbcl-2、baxの発現は認められたが、bcl-xLの発現は低く、mcl-1の発現は認められなかった。治療後96時間でbcl-2の発現は治療開始前の66.9%に低下し、baxの発現は153.5%に増加したが、bcl-xLの発現は変化しなかった(第9図)。

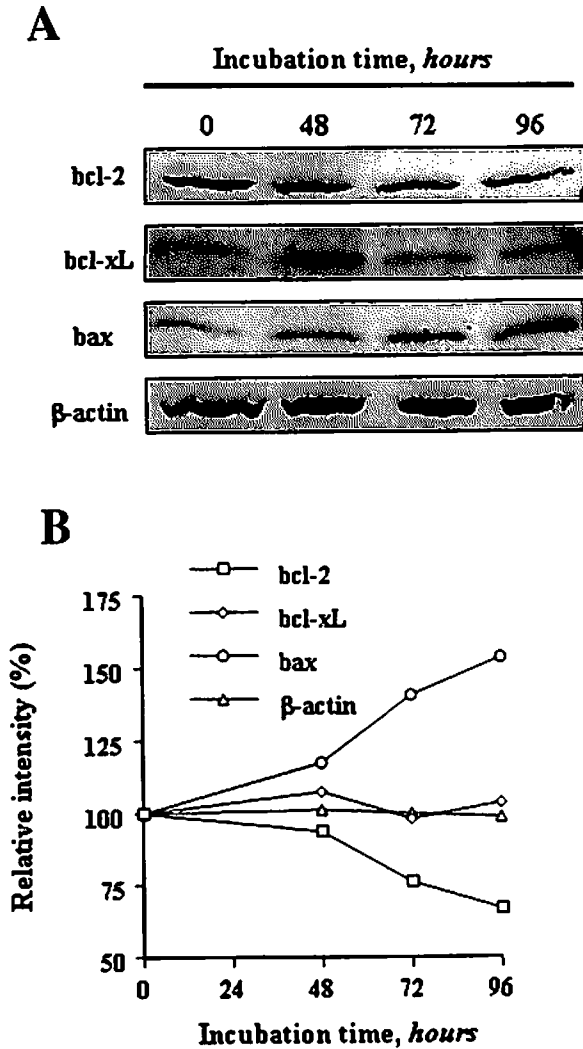
### 11. 腎細胞癌組織におけるp-STAT3とtotal STAT3の発現

IL-6が腎細胞癌のautocrine growth factorである点、腎細胞癌患者の血清中及び腫瘍組織中には有意な量のIL-6が存在している点、またこれまでの結果から腎癌細胞におけるIL-6の細胞内シグナルが主にJak-STAT3経路を介している点から、腎癌組織中にSTAT3の活性化が認められる可能性が考えられた。48例の腎細胞癌組織のパラフィン包埋切片を対象にp-ST



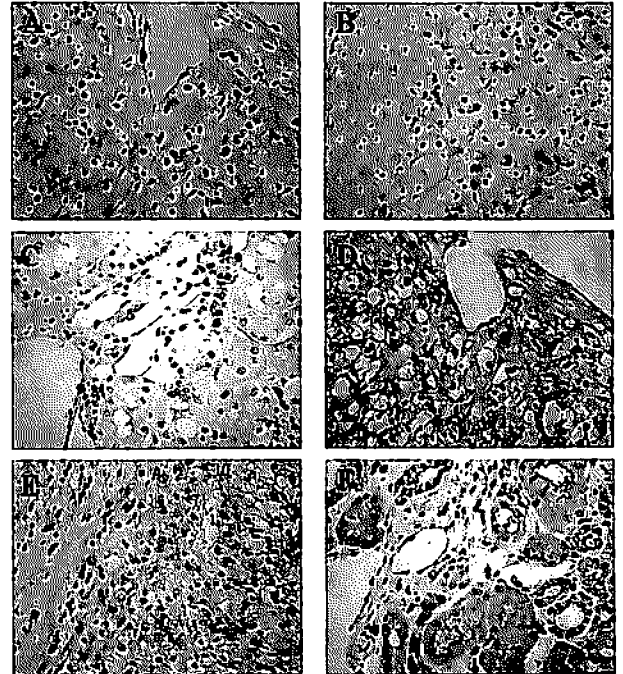
第8図 ACHNのAG490によるSTAT3の誘導. 無血清培地中の無治療のACHN (a), IL-6刺激下のACHN (b), 100  $\mu$ MのAG490とIL-6を投与したACHN (c)を96時間培養した. (A) Hoechst 33258で染色したACHNの蛍光顕微鏡所見. 100  $\mu$ MのAG490とIL-6を投与したACHNではSTAT3に特徴的な核の濃縮. 断片化が認められた. (B) フローサイトメトリーを用いたTUNEL法によるSTAT3の判定. ヒストグラムは細胞内のDNA断端の割合を示す. 対数変換した蛍光強度が101を超える細胞をSTAT3陽性と判定した. (Horiguchi A et al : *Kidney Int* 61 : 926-938, 2002 の Fig. 8 を許可を得て転載)





第9図 (A) ウェスタンブロット法によるアポトーシス関連タンパク bcl-2, bcl-xL, bax の発現変化の解析。100 μM の AG490 と IL-6 を投与した ACHN を 48 時間から 96 時間培養したサンプルを用いて解析した。β-actin は internal control として用いた。(B) バンドの定量値の変化を治療開始直後を 100% とした相対値で表示した。bcl-2, ◇は bcl-xL, ○は bax, △はβ-actin を示す。(Horiguchi A et al : Kidney Int 61 : 926-938, 2002 の Fig. 9 を許可を得て転載)

AT3, total STAT3 の発現を免疫組織学的に検討した。p-STAT3 の発現には腫瘍間の差が認められたが、発現例では腫瘍細胞の核内に強い p-STAT3 の染色像が認められた (第 10 図 A, B)。STAT3 は細胞質内で非活性化型の状態で存在し、刺激が加わることによりチロシンリン酸化が起こり、二量体を形成し核内へ移行する<sup>9)</sup>。したがって、核内に p-STAT3 の染色像が認められたこ



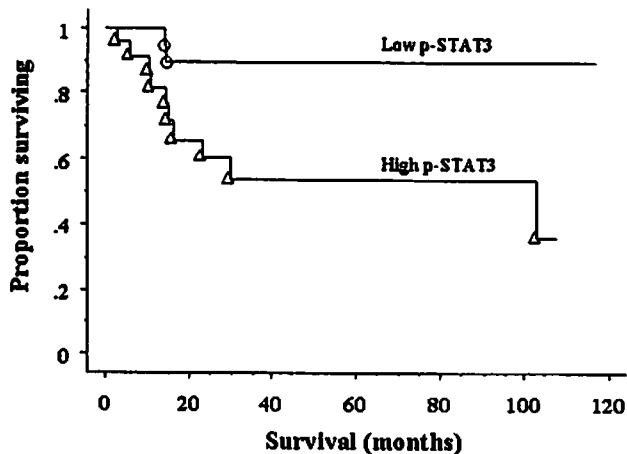
第 10 図 腎細胞癌組織および腫瘍周囲の正常腎組織における p-STAT3 および total STAT3 の免疫組織染色像 (400 倍)。(A) p-STAT3 高発現例の p-STAT3 染色像、腫瘍細胞核内に著明な染色像を認める。(B) p-STAT3 低発現例の p-STAT3 染色像。(C) 高発現例 (A) の正常腎組織の p-STAT3 染色像。(D) 高発現例 (A) と同部位の total STAT3 染色像。(E) 低発現例 (B) と同部位の total STAT3 染色像。(F) 正常腎組織 (C) と同部位の total STAT3 染色像を示す。(Horiguchi A et al : J Urol 168 : 762-765, 2002 の Fig. 1 を許可を得て転載)

とは腎癌組織中で STAT3 の活性化が認められる有力な根拠になると考えられた。したがって、p-STAT3 の陽性像を STAT3 の活性化と考えた。p-STAT3 の陽性細胞率は腫瘍によって両極端であり、10%以下の陽性率を示す群と、90%以上の陽性率を示す群に分かれたため、それぞれを低発現群、高発現群と定義した。低発現群、高発現群はそれぞれ 24 例 (50%) であった。腫瘍周囲の正常腎組織では p-STAT3 の発現はほとんど認められなかった (第 10 図 C)。一方、total STAT3 は p-STAT3 の発現のレベルに関係なく、また正常腎組織においても、ほぼ同レベルの発現が認められた (第 10 図 D~F)。

12. p-STAT3 の発現と病理組織学的所見との関連  
p-STAT3 の発現と進展度 (T 分類)、異型度、手術時の遠隔転移の有無、組織型との関連を第 1 表に示す。

第1表 p-STAT3の発現レベルと病理組織学的所見との関連  
Lowは低発現例、Highは高発現例を示す。有意差はchi-square testにより判定した。  
(Horiguchi A et al : J Urol 168 : 762-765, 2002のTable 1を許可を得て転載)

|                             | No. Pts | p-STAT3 staining |      | p Value |
|-----------------------------|---------|------------------|------|---------|
|                             |         | Low              | High |         |
| <b>Pathological stage</b>   |         |                  |      |         |
| T1-T2                       | 36      | 19               | 17   | N. S.   |
| T3-T4                       | 12      | 5                | 7    |         |
| <b>Metastatic disease</b>   |         |                  |      |         |
| M0                          | 41      | 24               | 17   | 0.0094  |
| M1                          | 7       | 0                | 7    |         |
| <b>Histological grade</b>   |         |                  |      |         |
| G1                          | 17      | 9                | 8    | N. S.   |
| G2-G3                       | 31      | 15               | 16   |         |
| <b>Histological subtype</b> |         |                  |      |         |
| Clear cell                  | 41      | 20               | 21   | N. S.   |
| Granular                    | 4       | 2                | 2    |         |
| Papillary                   | 1       | 0                | 1    |         |
| Sarcomatoid                 | 2       | 2                | 0    |         |



第11図 p-STAT3発現レベル別のKaplan-Meier疾患特異的生存曲線。低発現群対高発現群で比較し、log-rank検定により有意差ありと判定した( $p=0.0117$ )。  
(Horiguchi A et al : J Urol 168 : 762-765, 2002のFig. 2を許可を得て転載)

p-STAT3と病理学的進展度、異型度、組織型の間には有意な関連は認めなかった。一方、手術時に遠隔転移を有する7例は全てp-STAT3高発現群であったが、遠隔転移のない41例ではp-STAT3高発現群は17例のみと有意差を認めた( $p=0.0094$ , 第1表)。

### 13. p-STAT3の発現と予後の関連

p-STAT3高発現群と低発現群の疾患特異的生存率を単変量解析にて比較したところ、高発現群は低発現群に比べ有意に予後不良であった( $p=0.0117$ , 第11図)。単変量解析にて判明した有意な予後因子はp-STAT3の高発現、手術時の遠隔転移の存在( $p<0.0001$ )、異型度がgrade 2またはgrade 3( $p=0.0181$ )、進展度がT3またはT4( $p=0.0272$ )、clear cell carcinoma以外の組織型( $p=0.0371$ )であった。多変量Cox比例ハザードモデルによる解析では手術時の遠隔転移の存在( $p=$

第2表 多変量Cox比例ハザードモデルによる独立予後因子の解析  
Hazard Ratioはハザード比、95%CIは95%信頼区間を示す。(Horiguchi A et al : J Urol 168 : 762-765, 2002のTable 2を許可を得て転載)

| Variable                                     | Hazard Ratio | 95% CI        | p Value |
|--|--------------|---------------|---------|
| Pathological stage (T3-4)                    | 3.749        | 0.840-16.728  | 0.0833  |
| Metastatic disease (M1)                      | 7.463        | 1.345-41.417  | 0.0215  |
| Histological grade (G2-3)                    | 5.804        | 0.505-66.656  | 0.1579  |
| Histological subtype (other than clear cell) | 19.556       | 2.396-159.577 | 0.0055  |
| p-STAT3 staining (high)                      | 9.293        | 1.345-41.417  | 0.0439  |

0.0215), clear cell carcinoma 以外の組織型 ( $p=0.0055$ ), そして p-STAT3 の高発現 ( $p=0.0439$ ) が独立した予後予測因子であった (第2表).

## 考 察

IL-6 が腎細胞癌の増殖に重要な役割を果たしていることは以前より指摘されていたが<sup>17, 19, 22)</sup>, その細胞内シグナルなどの詳細な機序は検討されていない. 本研究では IL-6 による細胞内シグナルの解析に先立って, 4種の腎癌細胞株 Caki-1, ACHN, 769P, A498 を用いて培養上清中への IL-6 の産生および IL-6 受容体の発現, 外因性 IL-6 による増殖促進効果について確認した. ACHN と 769P において外因性 IL-6 による有意な増殖促進効果が認められたが, 他の細胞株より高い IL-6 産生能を有し, IL-6 受容体の発現が認められた A498 では増殖促進効果は認められなかった. しかしながら, A498 で無治療群および外因性 IL-6 投与群に比し, 抗 IL-6 Ab 投与群の増殖に有意な抑制が認められたことから, A498 の増殖に少なくとも部分的には IL-6 が関与していると考えられた. Caki-1 が外因性 IL-6, 抗 IL-6 Ab とともに反応を示さなかったのは IL-6 による細胞内シグナル伝達に不可欠な gp130 の発現が認められなかったためと考えられる<sup>3, 4)</sup>. これらの結果から過去の報告と同様に, IL-6 が腎癌細胞に対して autocrine あるいは paracrine growth factor として働いていることを確認した<sup>19, 22)</sup>.

腎癌細胞における IL-6 の細胞内シグナルを解析するにあたり, IL-6 が腎細胞癌以外の様々な悪性腫瘍の growth factor である点に着目した<sup>18, 21, 26, 27)</sup>. IL-6 による増殖を介するシグナル経路は細胞によって大きく異なる. 例えば, IL-6 依存性 hybridoma である B9 細胞やいくつかの多発性骨髄腫由来の細胞株では STAT3 の活性化は IL-6 による増殖に無関係であり, ERKs の活性化に依存している<sup>26)</sup>. 一方, 前立腺癌細胞株や骨髄腫細胞株 U266 では IL-6 による増殖は STAT3 の活性化に依存している<sup>21, 27)</sup>. 本研究では, gp130 の発現が認められない Caki-1 以外の細胞で IL-6 刺激による STAT3 と, わずかながら STAT1 のチロシンリン酸化と DNA 結合能の上昇が認められた. STAT1 が IL-6 による増殖に関与している可能性を否定しきれないが, 最近の知見では STAT1 は STAT3 と相反する作用があり, 腫瘍の増殖に抑制的であると考えられている<sup>28-30)</sup>. 今回の結果からは IL-6 刺激による STAT3 の活性が STAT1 の活性を上回った結果, 細胞増殖に傾いた可能

性が考えられる. 一方, STAT3 以外の主要な IL-6 のシグナル伝達経路である ERKs は, 検討した全ての細胞株で恒常的に活性化されていた. ERKs の活性化レベルは外因性の IL-6 刺激によっても, 抗 IL-6 Ab による内因性の IL-6 の中和によっても変化しなかった. また, Jak 阻害剤 AG490 による Jak レベルでの IL-6 のシグナル抑制によっても ERKs の活性は変化しなかった. また ERKs と STAT3 の間のクロストークも認められなかった. これらの結果から IL-6 に誘導される腎癌細胞の増殖は STAT3 を介しており, ERKs に非依存的であると結論した.

腎癌細胞における ERKs の恒常的活性化の原因は現在のところ明らかではない. 過去の報告では腎細胞癌の大部分で ERKs の恒常的活性化があり, 活性化のレベルは腫瘍の異型度と進展度に比例し上昇するとされている<sup>31)</sup>. ERKs は IL-6 以外の epidermal growth factor (EGF) や transforming growth factor (TGF) - $\alpha$  などの増殖因子によっても活性化することが知られており<sup>32)</sup>, それらは腎細胞癌の autocrine growth factor であると報告されている<sup>33)</sup>. したがって, それらの growth factor のシグナルが ERKs の恒常的活性化に関与している可能性が予想される.

本研究で使用した Jak 阻害剤 AG490 は恒常的な Jak2 の活性化を有する急性リンパ芽球性白血病由来の細胞に対する増殖抑制作用を有し, アポトーシスを誘導することが最初に報告された<sup>34)</sup>. 過去の報告に述べられているように AG490 は Jak family (Jak1, Jak2, Jak3) 以外のチロシンキナーゼを抑制しないということ<sup>34-36)</sup>, Jak を発現していない Jurkat 細胞などの増殖を抑制しないことなどから AG490 の Jak への特異性は高いと考えられる<sup>35, 37)</sup>. また, 最近の報告では AG490 が STAT5 や ERKs の活性を抑制することが知られているが<sup>35, 36)</sup>, 今回の結果では STAT5 は無刺激の状態でも, IL-6 刺激下でも活性化が認められなかった点, また ERKs の恒常的活性化は 100  $\mu$ M の AG490 でも抑制されなかった点から考えて, 少なくとも AG490 が STAT5 や ERKs の活性を抑制した可能性は除外できると考えられる. AG490 は無刺激の細胞に対しても有意な増殖抑制効果を示したが, IL-6 刺激下の細胞に比べ高い濃度を要した. 我々の結果と同様に, サイトカイン刺激下と非刺激下で AG490 に対する感受性が異なる例が過去の論文で報告されている<sup>38)</sup>. AG490 の Jak に対する特異性から考えて, IL-6 刺激下と非刺激下で増殖抑制に要する AG490 の濃度の差は IL-6 刺激下と非刺激下における Jak の活性の差が原因であると考えられる.

最近の研究でAG490は種々の癌細胞におけるSTAT3の活性を抑制し、アポトーシスを誘導することで増殖を抑えることが報告されている<sup>21, 27, 36)</sup>。そのため本研究ではAG490がIL-6によるSTAT3の活性を抑制することがアポトーシス関連タンパク bcl-2, bcl-xL, mcl-1, bax の発現を制御し、アポトーシスを誘導するか検討した。過去の研究結果と同様にAG490はACHNと769PにおいてIL-6によるSTAT3の活性化を抑制し、bcl-2のdown regulationとbaxのupregulationを伴うアポトーシスを誘導した。アポトーシス関連タンパクの中でbcl-2は腎細胞癌で高頻度に発現していると報告されており、腎細胞癌におけるbcl-2の過剰発現は腎細胞癌が通常の化学療法や放射線療法に耐性を示す一因と考えられている<sup>38, 40)</sup>。AG490がbcl-2のdown regulationを起こしたことは、腎細胞癌におけるbcl-2の発現にSTAT3が関与している可能性を示唆する。

最近の研究では、IL-6によるautocrine growthが指摘されている悪性腫瘍において、しばしばSTAT3の恒常的活性化が報告されている。泌尿器科領域の悪性疾患では前立腺癌組織中に高頻度のSTAT3の活性化が認められており、IL-6によるautocrine growthが原因と考えられている<sup>29)</sup>。本研究で我々は腎細胞癌組織中のSTAT3の活性化をp-STAT3の免疫組織学的に評価したところ、高頻度(50%)に活性化が認められた。さらに、STAT3の活性化は手術時の遠隔転移の存在と有意に関連し、多変量解析において有意な予後予測因子であった。この結果はSTAT3の活性化が腎細胞癌の増殖進展に深く関わっていることを示唆している。STAT3の活性化の原因としてtotal STAT3の過剰発現とSTAT3への慢性的な刺激の存在が考えられる<sup>41)</sup>。しかし第10図に示す通り、total STAT3の発現はSTAT3の活性化のレベルとは無関係であり、正常腎組織においても腫瘍と同レベルの発現が認められることから前者の可能性は否定的であり、後者の可能性が強いと考える。STAT3に対し慢性的な刺激を与える可能性があるcytokine, growth factorはIL-6以外にもEGFやTGF- $\alpha$ などが考えられる。これらは全て腎細胞癌のautocrine growth factorであることから、腎細胞癌組織におけるSTAT3の活性化はIL-6シグナルのみに由来するものではない可能性も考えられる。しかし、本研究におけるIL-6とSTAT3の関係や血清IL-6濃度が高値の例に進行例が多く、予後不良である点<sup>17)</sup>などSTAT3の高活性化例と臨床的、病理学的側面との関係に共通した関連も認められるため、少なくとも部分的にはIL-

6は腎細胞癌組織中のSTAT3の活性化に関与しているものと予想される。この点については今後検討すべき問題と考える。

臓器限局性の腎細胞癌の主たる治療法はいまだに外科的治療であり、転移性腎細胞癌は通常の化学療法や放射線療法に耐性を示し予後不良である<sup>42)</sup>。転移性腎細胞癌に対して現在、インターフェロン $\alpha$ やIL-2などを中心とした免疫療法が行われているが、その有効率は約15%前後と決して満足できるものではなく、新たな有効な治療法の開発が待たれるところである<sup>42)</sup>。本研究は腎細胞癌におけるIL-6によるSTAT3の活性化を抑制する治療が腫瘍の増殖を抑制する効果があるのみならず、bcl-2などのアポトーシス関連タンパクの発現を抑制し通常の化学療法や放射線療法に対する感受性を亢進することで、進行性腎細胞癌の新たな治療戦略への応用の可能性を示唆すると考える。

## 総 括

IL-6に誘導される腎細胞癌の増殖の機序を、細胞内シグナルを中心に解析し、細胞内シグナルの抑制による増殖抑制効果を検討した。さらに、腎細胞癌組織におけるSTAT3の活性化を免疫組織学的に解析し、病理組織学的所見および臨床経過との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. 腎癌細胞株におけるIL-6の細胞内シグナルは主にJak-STAT3経路を介していることが示された。ERKsはIL-6の刺激と無関係に恒常的活性化を示した。
2. MEK1阻害剤PD98059によるERKs活性の抑制がSTAT3の活性に変化を与えなかったことから、腎細胞癌のIL-6刺激下ではERKsによるSTAT3の活性制御は存在しないと考えられた。
3. Jak阻害剤AG490はIL-6刺激によるSTAT3の活性化を抑制し、IL-6の誘導する細胞増殖を抑制した。細胞増殖の抑制はbcl-2のdownregulation, baxのupregulationを伴うアポトーシスの誘導によるものであった。
4. 腎細胞癌組織において高頻度のSTAT3の活性化が認められた。STAT3の活性化は手術時に遠隔転移を有する例に有意に多く認められ、多変量解析で有意な予後予測因子であった。

これらの結果から腎細胞癌においてIL-6誘導性のSTAT3の活性化を抑制する治療が進行性腎細胞癌の新たな治療戦略に応用できる可能性が考えられた。

本稿を終えるにあたり、始終懇切な御指導、御高閣を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室村井勝教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に対して直接御指導いただきました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室丸茂健助教授、大家基嗣講師に深謝いたします。また、適切なるご助言、ご協力下さいました泌尿器科学教室諸兄に感謝いたします。

なお、本研究の一部は、第97回米国泌尿器科学会(2002年, Orland), 第61回日本癌学会総会(2002年, 東京), 第91回日本泌尿器科学会総会(2003年, 徳島), 第98回米国泌尿器科学会(2003年, Chicago)において発表した。

## 文 献

- 1) Kishimoto T : The biology of interleukin-6. *Blood* 74 : 1-10, 1989
- 2) Hirano T : Interleukin 6 and its receptor : ten years later. *Int Rev Immunol* 16 : 249-284, 1998
- 3) Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T : Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63 : 1149-1157, 1990
- 4) Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T : Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58 : 573-581, 1989
- 5) Schindler C, Darnell JE : Transcriptional responses to polypeptide ligands : the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64 : 621-651, 1995
- 6) Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T : Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130 : involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5 : 449-460, 1996
- 7) Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T : Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77 : 63-71, 1994
- 8) Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. : Stat3 as an oncogene. *Cell* 98 : 295-303, 1999
- 9) Zushi S, Shinomura Y, Kiyohara T, Miyazaki Y, Kondo S, Sugimachi M, Higashimoto Y, Kanayama S, Matsuzawa Y : STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. *Int J Cancer* 78 : 326-330, 1998
- 10) Wen Z, Zhong Z, Darnell JE : Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82 : 241-250, 1995
- 11) Ng J, Cantrell D : STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727. *J Biol Chem* 272 : 24542-24549, 1997
- 12) Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J : STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17 : 6508-6516, 1997
- 13) Fujitani Y, Hibi M, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, Yoshida H, Yamaguchi T, Sugiyama K, Yamanaka Y, Nakajima K, Hirano T : An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 14 : 751-761, 1997
- 14) Zauberman A, Zipori D, Krupsky M, Ben-Levy R : S tress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 18 : 3886-3893, 1999
- 15) David M, Petricoin E, Benjamin C, Pine R, Weber MJ, Lerner AC : Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 269 : 1721-1723, 1995
- 16) Sengupta TK, Talbot ES, Scherle PA, Ivashkiv LB : Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 11107-11112, 1998
- 17) Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, Menetrier-Caux C, Schemann S, Negrier S, Philip T, Favrot M : Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 72 : 424-430, 1997
- 18) Okamoto M, Lee C, Oyasu R : Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res* 57 : 141-146, 1997
- 19) Miki S, Iwano M, Miki Y, Yamamoto M, Tang B, Yokokawa K, Sonoda T, Hirano T, Kishimoto T : In terleukin-6 (IL-6) functions as an *in vitro* autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett* 250 : 607-610, 1989
- 20) Horiguchi A, Oya M, Marumo K, Murai M : STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P. *Kidney Int* 61 : 926-938, 2002
- 21) Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R : Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10 : 105-115, 1999
- 22) Gogusev J, Augusti M, Chretien Y, Droz D : Interleukin-6 and TNF alpha production in human renal cell

- carcinoma. *Kidney Int* 44 : 585-592, 1993
- 23) Campbell CL, Jiang Z, Savarese DM, Savarese TM : Increased expression of the interleukin-11 receptor and evidence of STAT3 activation in prostate carcinoma. *Am J Pathol* 158 : 25-32, 2001
- 24) Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z : Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53 : 1945-1951, 1993
- 25) Peterson WM, Wang Q, Tzekova R, Wiegand SJ : Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J Neurosci* 20 : 4081-4090, 2000
- 26) Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC : IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159 : 2212-2221, 1997
- 27) Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC : Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 60 : 1225-1228, 2000
- 28) Bromberg J, Darnell JE, Jr. : The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19 : 2468-2473, 2000
- 29) Bromberg JF, Fan Z, Brown C, Mendelsohn J, Darnell JE, Jr. : Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. *Cell Growth Differ* 9 : 505-512, 1998
- 30) Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ : Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth In vitro. *J Clin Invest* 102 : 1385-1392, 1998
- 31) Oka H, Chatani Y, Hoshino R, Ogawa O, Kakehi Y, Terachi T, Okada Y, Kawaichi M, Kohno M, Yoshida O : Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 55 : 4182-4187, 1995
- 32) Robinson MJ, Cobb MH : Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9 : 180-186, 1997
- 33) Atlas I, Mendelsohn J, Baselga J, Fair WR, Masui H, Kumar R : Growth regulation of human renal carcinoma cells : role of transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 52 : 3335-3339, 1992
- 34) Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM : Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379 : 645-648, 1996
- 35) De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, Klein B : JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br J Haematol* 109 : 823-828, 2000
- 36) Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR, Farrar WL : JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J Immunol* 162 : 3897-3904, 1999
- 37) Kirken RA, Erwin RA, Taub D, Murphy WJ, Behbod F, Wang L, Pericle F, Farrar WL : Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J Leukoc Biol* 65 : 891-899, 1999
- 38) Nielsen M, Kalltoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T, Dobson P, Svejgaard A, Odum N : Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides : tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 6764-6769, 1997
- 39) Huang A, Fone PD, Gandour-Edwards R, White RW, Low RK : Immunohistochemical analysis of BCL-2 protein expression in renal cell carcinoma. *J Urol* 162 : 610-613, 1999
- 40) Tomita Y, Bilim V, Kawasaki T, Takahashi K, Okan I, Magnusson KP, Wiman KG : Frequent expression of Bcl-2 in renal-cell carcinomas carrying wild-type p53. *Int J Cancer* 66 : 322-325, 1996
- 41) Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, Murai M : Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma : a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol* 168 : 762-765, 2002
- 42) Motzer RJ, Russo P : Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 163 : 408-417, 2000

学位論文

ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規 NF- $\kappa$ B 活性阻害剤の抗腫瘍効果

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

(指導：村井 勝教授)

菊 地 栄 次

(平成 16 年 3 月 23 日受付)

Key Words : anticancer, apoptosis, hormone-refractory, NF- $\kappa$ B, prostate cancer

米国のみならず我が国においても、前立腺癌発見率は年々増加傾向を示している<sup>1,2)</sup>。その背景には集団検診や人間ドックなどにおける prostate specific antigen (PSA) 測定の導入<sup>3)</sup>、また PSA 関連マーカーや経直腸的超音波を用いた系統的前立腺針生検の普及による早期前立腺癌診断効率の上昇が挙げられる<sup>4)</sup>。前立腺癌の治療において、限局性癌に対しては根治的前立腺全摘除術あるいは小線源療法を含めた放射線治療が主体をなすが、再発性、浸潤性あるいは転移性前立腺癌では内分泌治療が選択される。当初、多くの前立腺癌は内分泌治療に反応するものの、数年以内にホルモン抵抗性癌に移行する<sup>5)</sup>。現時点ではホルモン抵抗性前立腺癌に対する有効な治療法は存在せず、新たな治療法の確立が望まれる。

ホルモン抵抗性前立腺癌においては、その増殖、あるいは浸潤に interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-6, や granulocyte-macrophage colony-stimulating factor などの多くのサイトカインが重要な役割を果たしていると考えられている<sup>6)</sup>。In vitro においてホルモン非感受性ヒト前立腺癌樹立細胞株が大量の IL-6 を産生することが報告され<sup>7)</sup>、著者の教室においても血清 IL-6 値が内分泌治療後の前立腺癌において重要な予後因子であることを認めている<sup>8)</sup>。これらのサイトカインは種々のシグナル伝達系を介した転写因子によって制御されており、その転写因子のうち nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) はサイトカイン産生遺伝子の転写調節を行う重要な因子として広く知られている<sup>9)</sup>。また、NF- $\kappa$ B はホルモン抵抗性前立腺癌においてしばしば恒常的に活性化されており、そのこと

が抗アポトーシス関連蛋白の発現を増強し、種々の癌治療効率を低下させ、また抗癌剤耐性株出現に寄与すると考えられている<sup>10,11)</sup>。Palayoor ら<sup>10)</sup>は、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞株である DU145 あるいは PC-3 において、NF- $\kappa$ B は恒常的に活性化されているが、ホルモン感受性ヒト前立腺癌細胞株である LNCaP ではその現象が認められなかったと報告している。さらに著者の教室でも、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞の TNF- $\alpha$  に対する抵抗性の機序に NF- $\kappa$ B の活性亢進が関与していることを示してきた<sup>11)</sup>。以上のことから前立腺癌のホルモン治療抵抗性の獲得においては、NF- $\kappa$ B が大きく関与しており、このため NF- $\kappa$ B を直接ターゲットとした治療が、新たな前立腺癌の治療戦略の確立につながるものと考えられる。

天然物由来の化合物で、弱い抗菌活性を示す物質として dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) が合成された<sup>12)</sup>。DHMEQ はヒト T 細胞白血病 Jurkat 細胞において強い NF- $\kappa$ B 活性抑制効果を示し、またタイプ II コラーゲンにより誘発されたマウス関節炎モデルにおいて抗炎症作用を示した。これまでの報告では、NF- $\kappa$ B 活性阻害作用を有するとされる天然物由来化合物の NF- $\kappa$ B 抑制効果は概して一過性であり<sup>13)</sup>、またそれらを癌治療に応用した研究は報告されていない。本研究においては、新規に開発された NF- $\kappa$ B 活性阻害剤 DHMEQ によるホルモン抵抗性前立腺癌治療の可能性を追求した。具体的には DHMEQ の (a) 恒常的に活性化されている NF- $\kappa$ B に対する抑制効果、(b) アポトー

本論文は、Kikuchi E, Horiguchi Y, Nakashima J, Kuroda K, Oya M, Ohigashi T, Takahashi N, Shima Y, Umezawa K, Murai M : Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor  $\kappa$ B inhibitor in nude mice. Cancer Res 63 : 107-110, 2003 の一部を含む。

シス誘導作用, (c) *in vitro* および *in vivo* における抗腫瘍効果について検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞株と実験動物

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP (ホルモン感受性), DU145, PC-3 および JCA-1<sup>10</sup> (ホルモン非感受性) を用いた。各細胞は 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS), 100 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) および 100 IU/ml ペニシリン (Gibco BRL) を添加した RPMI 1640 培養液で, 5% 炭酸ガス含有空気下細胞培養器内にて 37 °C の環境で単層培養した。

生後 6~8 週齢のオス BALB/c ノードマウス (nu/nu) を Sankyo Lab Service Co. (東京) より購入した。1 ケージに 5 匹のノードマウスを収容し, オートクレーブ滅菌を施した飼料と水を与え, 1 日 2 回ノードマウスの状態を観察した。なお動物実験は, 慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して施行した。

### 2. 試薬

DHMEQ は慶應義塾大学大学院理工学研究科において開発, 合成したものである<sup>12)</sup>。DHMEQ は dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液を用いて 10 mg/ml に溶解した。培養液中において DMSO は最終濃度 <0.1% に調整した。

### 3. *In vitro* での細胞傷害効果

細胞傷害効果は Nedwin ら<sup>13)</sup> の用いた吸光度測定法に準じて測定した。96 well plate に各前立腺癌細胞を 1 well あたり  $2 \times 10^4$  個播いて 37 °C で培養した。24 時間後に種々の濃度の DHMEQ を各 well に加えた。DHMEQ 存在下に 48 時間培養した後上清を除去し, 0.2% クリスタルバイオレットで細胞を 15 分間染色した。Phosphate-buffered saline (PBS) にて 3 回洗浄した後, 各 well の吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad, 東京) にて, 405 nm を reference として 570 nm 波長の吸光度を測定した。また各前立腺癌細胞に対する経時的細胞傷害効果を 20 µg/ml の DHMEQ を投与後 12, 24, 36, 48 時間後に検討した。

### 4. NF-κB 活性の測定

DHMEQ の NF-κB 活性に対する作用を, luciferase reporter gene assay により検討した。遺伝子導入は正

電荷型リポソームである Gene PORTER 2 (Gene Therapy Systems, San Diego, CA, USA) を用いて行った。96 well plate に各前立腺癌細胞を 1 well あたり  $2 \times 10^4$  個播いて 24 時間 37 °C で培養した。NF-κB に対する特異的結合配列をプロモーター領域に持つ luciferase gene を組み込んだプラスミド (0.2 µg, 慶應義塾大学, 井上純一郎教授より供与), および 1 µl の Gene PORTER 2 を 50 µl の無血清培養液中に希釈後, 混和し各 well に加え, 37 °C で 14 時間培養した。その後, 種々の濃度の DHMEQ (50 µl) を 10% FBS 添加培養液にて希釈後, 各 well に加えた。DHMEQ 存在下にさらに 8 時間培養した後上清を除去し, PBS にて 3 回洗浄した後, 50 µl の Reporter Lysis Buffer (Luciferase Assay Kit; Promega, Madison, WI, USA) を加え, これを回収した。Lysate 中の Luciferase 活性を luminometer にて測定した (Lumat 9501; Berthold, Bad Wildhad, Germany)。また, 同時に各前立腺癌細胞数を計測し, NF-κB 活性を対応する well の細胞数で除して, 相対 luciferase 活性を算出した。

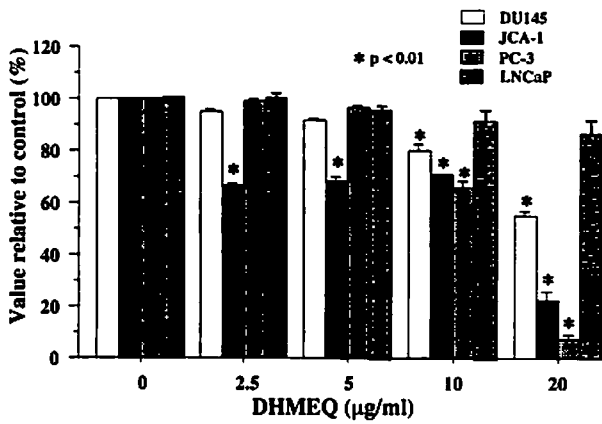
### 5. ゲルシフトアッセイ (EMSA)

JCA-1 前立腺癌細胞を 20 µg/ml の DHMEQ 存在下で 0, 2, 4, 6, 8 時間培養後回収し, PBS にて洗浄し, 400 µl のバッファー A (10 mM HEPES, 10 mM KCL, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM P-MSF) に再浮遊し, 氷上にて 15 分間静置した。14,000 rpm にて 5 分間遠心し上清を除去した。回収した細胞の核を 40 µl のバッファー C (50 mM HEPES, 50 mM KCL, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 25% glycerol) に懸濁させ 20 分間静置した後, 14,000 rpm で 5 分間遠心にかけ, 上清を集め, 核抽出物とした。タンパク 5 µg 分の核抽出物, 2 µg の poly (dI-dC), そして <sup>32</sup>P-γ-ATP にて標識した DNA プローブを混和し 25 °C で培養した。反応液を 4% polyacrylamide gel で 150 V にて電気泳動した後, gel を乾燥させ, オートラジオグラフィーを行った。なお用いた κB 配列含有二重鎖オリゴヌクレオチドは, 5'-ATGTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' である。

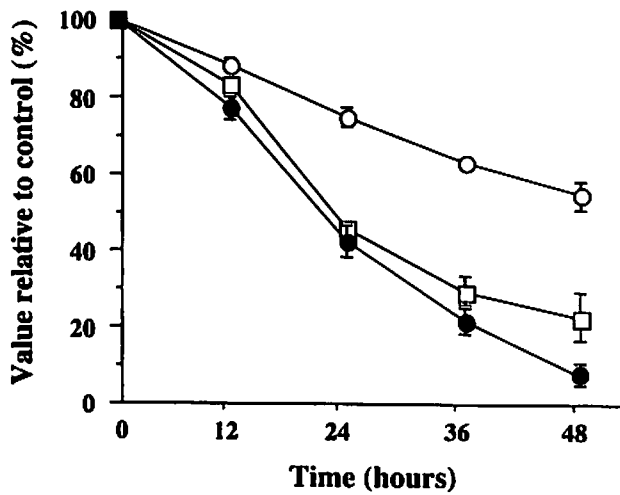
### 6. ウェスタンブロッティング

DHMEQ 治療後の JCA-1 細胞における IκBα, Bcl-2 そして Bcl-xL タンパクの発現変化をウェスタンブロッティング法により検討した。DHMEQ (0, 10, 20, 40 µg/ml) 存在下に培養した JCA-1 細胞を, 50 µl の lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40, 20 mM

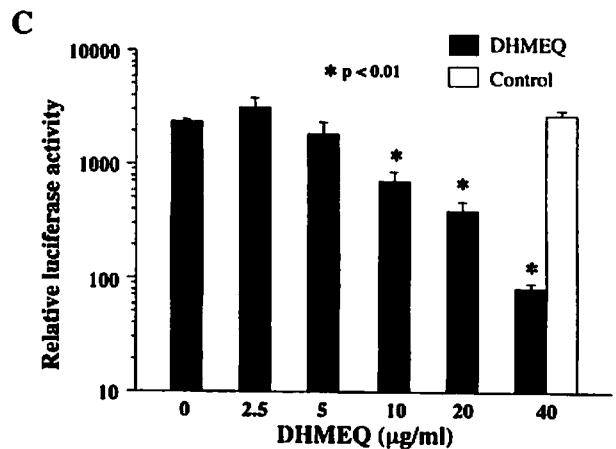
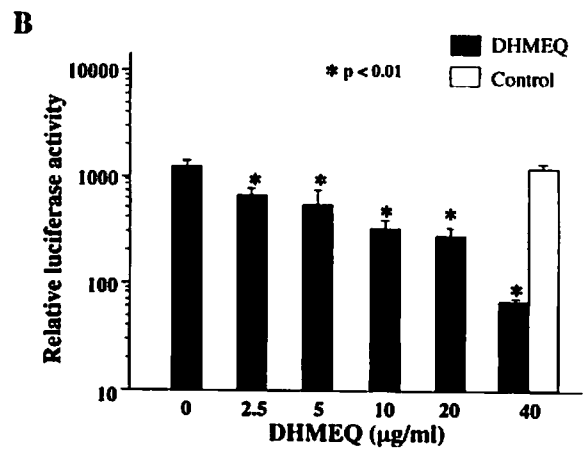
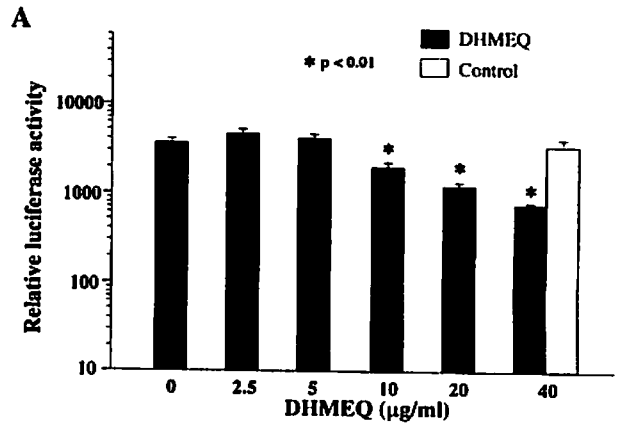




第1図 *In vitro* における DHMEQ の前立腺癌細胞に対する濃度依存性増殖抑制効果。ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞 DU145, JCA-1, および PC-3 において DHMEQ により著明な増殖抑制効果が認められた。一方、ホルモン感受性ヒト前立腺癌細胞 LNCaP においては、明らかな増殖抑制効果は認められなかった。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003 の第1図を許可を得て改変, 転載)



第2図 *In vitro* における DHMEQ の前立腺癌細胞に対する時間依存性増殖抑制効果。20 μg/ml の DHMEQ 投与後, DU145 (○), JCA-1 (□), および PC-3 (●) において、時間依存性に増殖抑制効果が認められた。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003 の第1図を許可を得て転載)



第3図 DHMEQ による NF- $\kappa$ B 活性抑制効果。DHMEQ 投与後, DU145 (A), JCA-1 (B), および PC-3 (C) において、濃度依存性に NF- $\kappa$ B 活性化抑制が認められた。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003 の第2図を許可を得て改変, 転載)

EDTA, 100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.1 mg/ml leupeptin, 1mM PMSF) を用いて溶解し, 14,000 rpm で15分間遠心し, 残渣を除去し, 細胞抽出液を得た. タンパク質を定量後, 等量の sample buffer (84 mM Tris-HCl pH 6.3, 4% sodium dodecylsulfate, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue) と混合し, 10分間煮沸したものを sample とした. 泳動用バッファー中で12% poly-acrylamide gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて200Vの定電圧で35分間泳動した. さらに polyvinilidene difluoride (PVDF) 膜 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) に100Vの定電圧で60分間転写した. PVDF膜を5% skim milk を含む Tween 20- Tris-buffered saline (TBS) の中で4°Cにて一晩ブロッキングを行った. 翌日, PVDF膜を, 5% skim milk を含む TBS buffer に希釈したウサギ抗 IκBα ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), マウス抗 Bcl-2 モノクローナル抗体, マウス抗 Bcl-xL モノクローナル抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), あるいはマウス抗 β-actin モノクローナル抗体 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) と1時間反応させた. 抗ウサギ抗体, あるいは抗マウス抗体 (Dako A/S, Glostrup, Denmark) を Tween 20-TBS に希釈して, PVDF膜と1時間反応させた後, enhanced chemiluminescence 法によりタンパク質の検出を行った.

#### 7. アポトーシス誘導の検討

DHMEQ によるアポトーシス誘導の有無を検討するにあたり, ApopTag (Intergen Co., Purchase, NY, USA) による terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) reaction end labeling (TUNEL 法) を用いた<sup>16)</sup>. 各前立腺癌細胞を 20 μg/ml の DHMEQ 存在下で48時間培養後回収し, PBS で洗浄後, 70%エタノールで細胞を固定した. その後, 細胞を Tdt と digoxigenin-dUTP で1時間37°Cで反応させた. 反応停止後 FITC 標識 anti-digoxigenin で30分間室温で反応させ, 洗浄後, 細胞のアポトーシス指数を flow cytometer (Beckman, Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) で分析した. また DHMEQ による濃度依存性のアポトーシス誘導実験は Annexin V/propidium iodide (PI) 染色法 (Mebisyo, Medical & Biological Laboratories, 名古屋) を用いて行った. 各種濃度の DHMEQ 存在下で, JCA-1 細胞を48時間培養し回収した. 細胞浮遊液に Annexin V-FITC および PI を加え, 室温, 暗室にて15

分間反応させた. その後, flow cytometer にてアポトーシスの検出を行った.

#### 8. *In vivo* での抗腫瘍効果

JCA-1 細胞 (5×10<sup>6</sup>個/無血清培地 100 μl) を, 21G 注射針にてマウスの背部皮下に移植した. 腫瘍直径が約 5 mm 程度となったところで無作為に2グループ (n=8/group) に分類し, 治療を開始した. 治療群には, 100 μl の DHMEQ (8 mg/kg/マウス) を腹腔内にハミルトンマイクロシリンジにて連日14日間投与した. コントロール群は治療群と等量の DMSO を含む無血清培地を投与した. 治療を開始した日を第0日目とし, 1日おきに腫瘍の長径と短径をスライディングキャリパーで, また, マウスの体重を体重計で測定した. 腫瘍重量は下記の公式より算出した.

推定腫瘍重量 (W)=0.52×(a×b<sup>2</sup>) [a:長径 (cm), b:短径 (cm)]

#### 9. 統計学的処理

結果は平均±標準偏差で表した. 統計学的解析は t 検定を用い, P-value が 0.01 未満であるものを統計学的に有意と判断した.

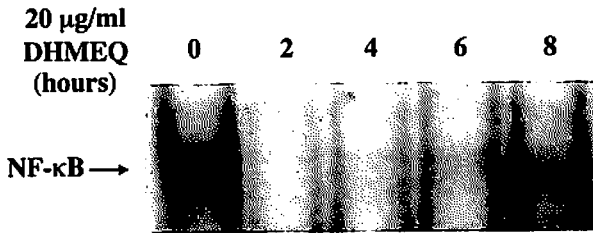
## 結 果

#### 1. *In vitro* における DHMEQ の前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果

種々の濃度の DHMEQ を48時間用いて, 各種前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した. DU145 および PC-3 において 10 μg/ml 以上, JCA-1 において 2.5 μg/ml 以上の DHMEQ 投与により著明な増殖抑制効果が認められた (p<0.01; 第1図). 一方, LNCaP においては, いずれの濃度においても明らかな増殖抑制効果は認められなかった. また 20 μg/ml の DHMEQ で経時的な治療効果を検討したところ, DU145, JCA-1, および PC-3 において, 時間依存性に増殖抑制効果が認められた (第2図).

#### 2. DHMEQ による NF-κB 活性抑制

luciferase reporter gene assay を用いた DHMEQ の NF-κB 転写活性化の検討において, DU145 および PC-3 において 10 μg/ml 以上, JCA-1 において 2.5 μg/ml 以上の DHMEQ 投与により, 濃度依存的に NF-κB 転写活性化が抑制された (第3図 A-C).



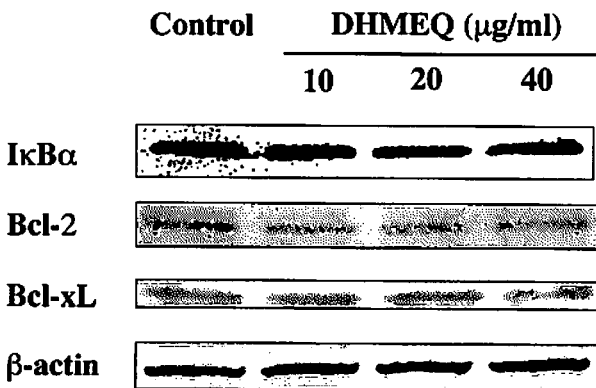
第4図 DHMEQによるNF- $\kappa$ BのDNA結合阻害効果。恒常的にNF- $\kappa$ Bが活性化状態にあるJCA-1細胞において、DHMEQ投与後、2～6時間においてNF- $\kappa$ BとDNAの結合が完全に阻害された。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003の第3図を許可を得て転載)

### 3. DHMEQによるNF- $\kappa$ BのDNA結合能に与える影響

DHMEQがNF- $\kappa$ BのDNA結合に与える影響についてgel shift assayを行い、検討した。JCA-1において20  $\mu$ g/mlのDHMEQで処理後2～6時間で、NF- $\kappa$ Bのバンドの消失が確認された(第4図)。その後8時間でNF- $\kappa$ BとDNAの結合の回復が認められた。

### 4. DHMEQのI $\kappa$ B $\alpha$ タンパクに与える影響

NF- $\kappa$ Bが活性化するときには阻害タンパクであるI $\kappa$ B $\alpha$ がリン酸化され、さらにユビキチン/プロテアソーム系を介して分解されることが知られている。DHMEQによるI $\kappa$ B $\alpha$ タンパクの発現変化をウェスタンブロッティング法により検討した。40  $\mu$ g/mlのDHMEQ処理

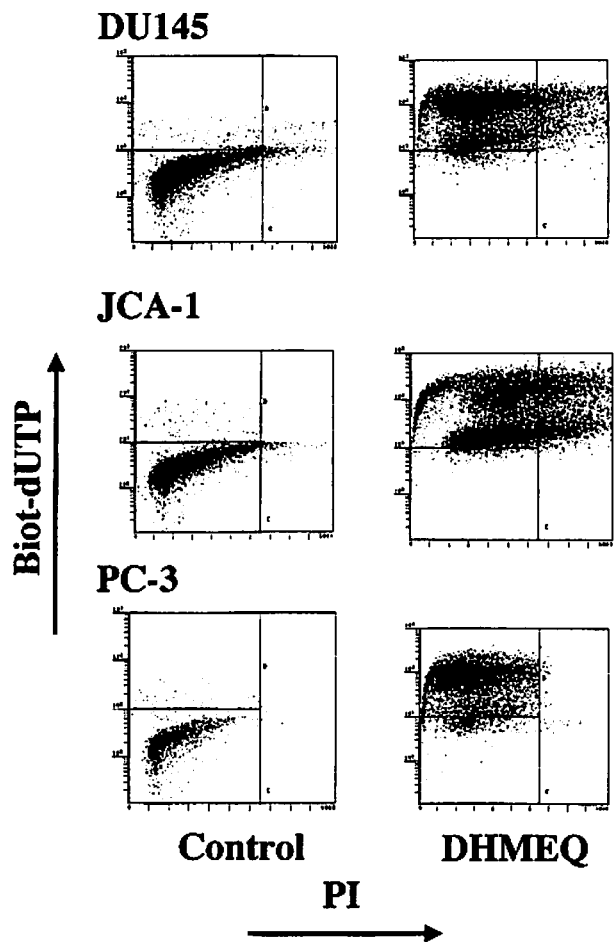


第5図 DHMEQのI $\kappa$ B $\alpha$ 、Bcl-2およびBcl-xLタンパク発現に与える影響。JCA-1細胞において、DHMEQによりI $\kappa$ B $\alpha$ 、Bcl-2およびBcl-xLタンパクの発現変化を認めなかった。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003の第4図を許可を得て転載)

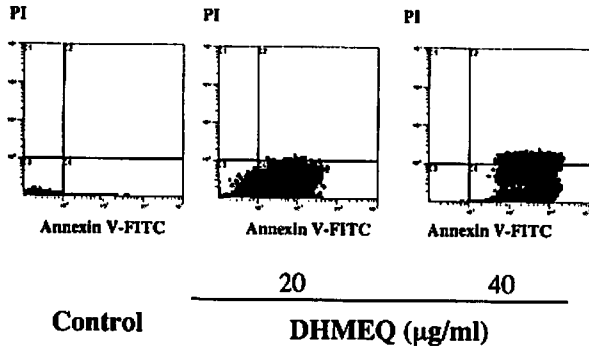
後においても、JCA-1細胞内でのI $\kappa$ B $\alpha$ タンパクレベルは変化しなかった(第5図)。

### 5. DHMEQの前立腺癌細胞に対するアポトーシス誘導効果

DHMEQが前立腺癌細胞に対してアポトーシスを誘導するかどうかを、TUNEL法を用いて検討した。DU-145、JCA-1およびPC-3細胞において20  $\mu$ g/mlのDHMEQで有意にアポトーシス誘導が検出された(第6図)。またAnnexin V/PI染色法を用いたJCA-1細胞のアポトーシス誘導の検討では、コントロールで2.9%しかアポトーシスが検出されなかったのに対し、20  $\mu$ g/ml、40  $\mu$ g/mlのDHMEQによりそれぞれ23.8%、



第6図 TUNEL法を用いたDHMEQによるアポトーシス誘導の検出。DU145、JCA-1、およびPC-3においてDHMEQにより著明なアポトーシス誘導が確認された。縦軸はFITC標識にて検出されたアポトーシス指数を示し、横軸はPIを示している。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003の第5図を許可を得て転載)

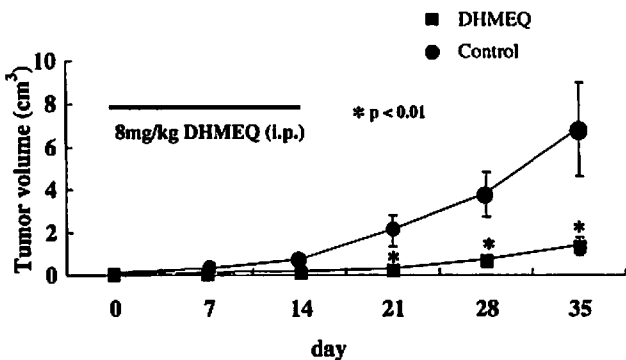


第7図 Annexin V/PI 染色法を用いた DHMEQ によるアポトーシス誘導の検出。薬剤無治療 JCA-1細胞においてアポトーシスが検出されなかったのに対し、20 µg/ml, 40 µg/ml の DHMEQ により JCA-1細胞においてそれぞれ 23.8%, 44.1% のアポトーシスが検出された。縦軸は PI を、横軸は FITC 標識された Annexin V を示している。

44.1% のアポトーシスが検出された (第7図)。さらにアポトーシス誘導に重要な役割を果たしている Bcl-2 および Bcl-xL タンパクが DHMEQ により影響を受けるかどうかをウエスタンブロッティング法により検討した。DHMEQ 治療により Bcl-2 および Bcl-xL タンパクレベルは変化していなかった (第5図)。

6. *In vivo* における DHMEQ の前立腺癌に対する抗腫瘍効果

ヌードマウスの背部皮下に移植した JCA-1 腫瘍の直



第8図 *In vitro* における DHMEQ の前立腺癌に対する抗腫瘍効果。JCA-1細胞 (5 × 10<sup>6</sup>) をヌードマウス BALB/c (nu/nu) の背部皮下に移植した。腫瘍径が 5 mm になったところで、14日間 DHMEQ (8 mg/kg) の腹腔内投与を行った。治療開始 21 日目より DHMEQ 治療群において有意な抗腫瘍効果が認められた。(Kikuchi E et al: Can Res 63: 107-110, 2003 の第5図を許可を得て改変, 転載)

径が 5 mm になった時点より、DHMEQ の腹腔内投与を 14 日間連日行った。治療開始 21 日目より DHMEQ 治療群において有意な抗腫瘍効果がみられた (第8図)。治療開始後 21 日目の腫瘍体積は DHMEQ 治療群で 0.27 ± 0.12 cm<sup>3</sup>, コントロール群 2.07 ± 0.75 cm<sup>3</sup> であった。またマウスの体重に対する影響を検討したところ、DHMEQ 治療群のマウスにおいてコントロール群と比較し、体重変化を認めなかった。

考 察

本研究では epoxyquinomicin C の骨格をモデルに分子合成された epoxydone 化合物 DHMEQ を用いて、その癌治療への応用の可能性を検討した。DHMEQ が特異的に NF-κB を抑制し、抗腫瘍効果を示すかどうかを、NF-κB が恒常的に活性化状態にあるホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞を用いて検討を行った。まず、各種前立腺癌細胞に対する DHMEQ の直接細胞傷害作用を確認した。DHMEQ は濃度依存性に、また時間依存性にホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞株である DU145, JCA-1, PC-3 の細胞増殖を抑制した。一方、ホルモン感受性ヒト前立腺癌細胞株である LNCaP ではその増殖抑制効果が認められなかった。LNCaP は通常状態において NF-κB が活性化されていないことがすでに報告されている<sup>10)</sup>。一方、本研究においても確認されたように DU145, JCA-1, PC-3 においては NF-κB が恒常的に活性化状態にあることから、DHMEQ はホルモン非感受性前立腺癌細胞に特異的に増殖抑制効果を示すと考えられた。次いで、その効果が DHMEQ の NF-κB 阻害作用によるものかを検討するために luciferase reporter gene assay を行った。DHMEQ は NF-κB の転写活性化を濃度依存性に抑制した。その効果は *in vitro* における細胞増殖抑制の強さと相関している。以上のことから DHMEQ は NF-κB 転写活性化を阻害することでホルモン非感受性前立腺癌細胞において増殖抑制効果を示したと考えられる。これらの *in vitro* の結果をもとに、マウスを用いた *in vivo* の検討を行った。JCA-1 細胞を用いた皮下腫瘍モデルにおいて DHMEQ は治療開始後 21 日目より有意に抗腫瘍効果を示した。また DHMEQ 治療群のマウスにおいてコントロール群と比較し、体重減少を認めなかったことから、DHMEQ はマウス自体に強い毒性をおよぼさないものと考えられた。

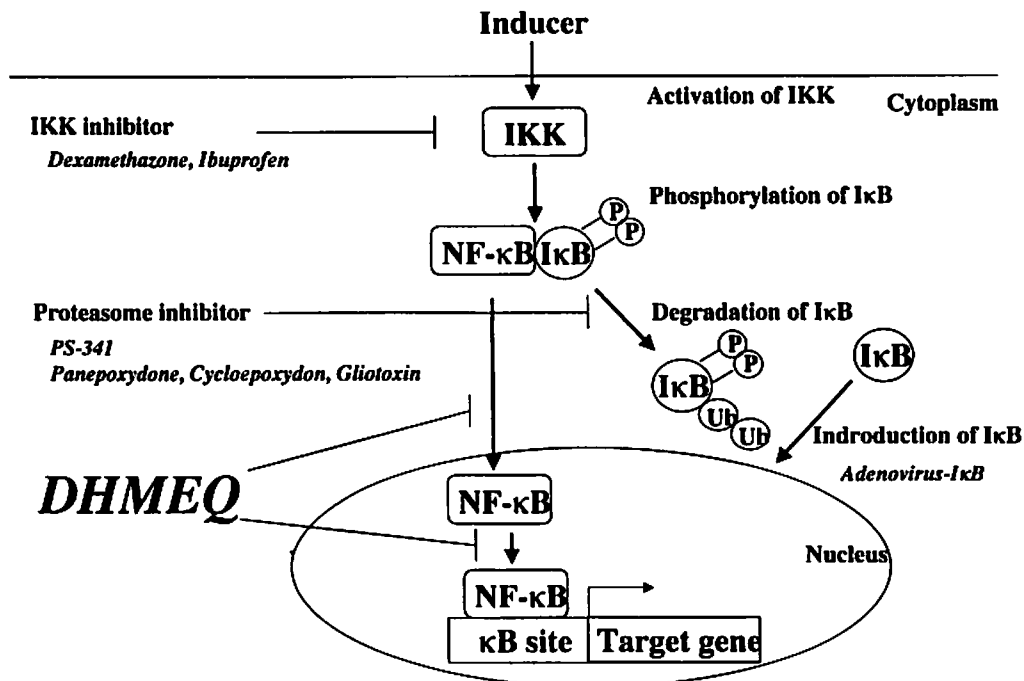
NF-κB 活性化までの流れは、IκBα のリン酸化・分解より始まり、NF-κB が核内移行し、標的 DNA と結合することでその遺伝子を活性化する。DHMEQ がその

どの部位を阻害することでホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞において増殖抑制効果を発揮するかを検討した。gel shift assay において DHMEQ 処理後 2 時間から 6 時間にかけて NF-κB の DNA 結合が完全に消失し、その後 NF-κB 活性の回復が確認された。NF-κB 回復の理由としては DHMEQ が代謝されて、NF-κB 活性抑制作用が薄れた、あるいは NF-κB の turnover が速く、NF-κB が DHMEQ に対して過飽和状態になり一定時間後は阻害できなくなった、などが考えられる。また、ウェスタンブロッティング法による IκBα のリン酸化・分解の検討では、40 μg/ml の濃度の DHMEQ 処理後においても、IκBα タンパクレベルの変化を認めなかった。このことから DHMEQ は IκBα のリン酸化・分解には影響をあたえず NF-κB の活性化を直接阻害していることが示唆された。Ariga ら<sup>17)</sup>によるアフリカミドリザル腎由来 COS-1 細胞を用いた検討では、DHMEQ 処理にて p65 の核内移行の阻害が確認された。すなわち DHMEQ は NF-κB の核移行を阻害していると考えられた。以上のことからホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞における DHMEQ の NF-κB 活性抑制機序には NF-κB の DNA 結合直接阻害、あるいは同時に NF-κB の核移行阻害が考えられる。今後、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞における NF-κB の核、細胞質それぞれにお

ける局在、また DHMEQ による NF-κB の核内移行の変化の検討が必要であると考えられる。

NF-κB はアポトーシス誘導抑制に働くと考えられている。Fibroblast や macrophage 培養細胞においては、NF-κB のサブユニットの欠損、あるいは抑制が TNF-α の応答で誘導されるアポトーシスを増強したと報告されている<sup>18, 19)</sup>。そこで、著者らはホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞における DHMEQ のアポトーシス誘導効果について検討を行った。DU145, JCA-1 および PC-3 細胞において DHMEQ で有意にアポトーシスが誘導された。また、DHMEQ は JCA-1 細胞において、アポトーシスを濃度依存性に誘導した。その誘導は Bcl-2 あるいは Bcl-xL などのアポトーシス抑制タンパクの発現とは無関係であった。NF-κB は Survivin など inhibitor of apoptosis protein (IAP) の遺伝子を活性化することが知られている。DHMEQ は IAP の発現を抑制することでアポトーシス誘導に働くのではないかと推測される。以上のことから DHMEQ はホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞の NF-κB 活性を抑制し、アポトーシス誘導を介して細胞傷害効果を示すと考えられた。

著者らはこれまでにアポトーシス誘導増強を目的とした、ホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対するもう一つの新しい治療法を検討し、報告している<sup>20)</sup>。



第9図 NF-κB の活性化経路と種々の薬剤、方法による NF-κB 抑制機序。

Diethylstilbestrol は前立腺癌に対して hormone ablation を目的として用いられている薬剤の一つであるが<sup>21-23</sup>、同時にアポトーシスの誘導を促し、直接的な殺細胞効果を有することが報告されている<sup>24</sup>。そこで著者らは Bcl-2 タンパク発現をアンチセンスオリゴヌクレオチド<sup>25</sup>により抑えることで、diethylstilbestrol の前立腺癌細胞に対する殺細胞効果、アポトーシス誘導の増強を試みた。Bcl-2 アンチセンスオリゴヌクレオチドは特異的に前立腺癌細胞の Bcl-2 発現を抑え、diethylstilbestrol の直接殺細胞効果を増強した。同時に Bcl-2 アンチセンスオリゴヌクレオチドと diethylstilbestrol の併用治療でアポトーシス誘導も増強された<sup>26</sup>。

NF- $\kappa$ B 活性を抑制し、抗腫瘍効果を増強する他の方法、薬剤が報告され、またその臨床研究が開始されている (第9図)。イブプロフェンなどの非ステロイド性抗炎症剤や、デキサメサゾンなどのステロイド剤は I $\kappa$ B kinase を阻害することで I $\kappa$ B のリン酸化を阻害し、NF- $\kappa$ B 活性を抑制する<sup>28, 29</sup>。これらの薬剤は *in vitro* の研究において殺細胞効果を認めたが、*in vivo* では十分な抗腫瘍効果が報告されていないのが現状である。I $\kappa$ B はリン酸化された後、ユビキチン/プロテアソーム系を介して分解される。プロテアソーム阻害剤はその分解を抑制し、NF- $\kappa$ B 活性阻害に寄与する<sup>28, 29</sup>。プロテアソーム阻害剤の一つである PS-341 は、*in vivo* の検討において NF- $\kappa$ B 活性阻害を介して、腫瘍の増殖、血管新生を抑制した<sup>30</sup>。しかしその反応は非特異的であり、実際、NF- $\kappa$ B 活性以外に関与するユビキチン/プロテアソーム系にも影響を与えてしまう。天然物由来の化合物である panepoxydone<sup>31</sup>、cycloepoxydon<sup>31</sup>、gliotoxin<sup>32</sup> なども I $\kappa$ B $\alpha$  の分解を抑制し、NF- $\kappa$ B を阻害するが、その効果は一過性であり、またそれらを癌治療に応用した研究は報告されていない。直接 I $\kappa$ B 産生を増加させる試みとして、I $\kappa$ B 遺伝子を腫瘍細胞内に導入する研究も報告されている<sup>33</sup>。組み換えアデノウイルスを用いて、安定型 I $\kappa$ B 遺伝子を膀胱癌<sup>34</sup>や腎癌細胞<sup>35</sup>に導入したところ、NF- $\kappa$ B 活性の抑制、アポトーシスの誘導、殺細胞効果が確認された。しかし、臨床応用を考慮した場合、遺伝子治療は、*in vivo* の研究もまだ十分に検討されていないのが現状であり、臨床応用にはいたっていない。DHMEQ はこれまで検討された方法、薬剤とは異なり、NF- $\kappa$ B の核移行あるいは、NF- $\kappa$ B の DNA 結合を直接阻害することで、抗腫瘍効果を発揮する新しいタイプの NF- $\kappa$ B 阻害剤であると考えられる。

各種抗癌剤あるいは放射線治療後、癌細胞内の NF- $\kappa$ B 活性が増加し、そのことが治療の効果を低下させる

ことが知られている<sup>36, 37</sup>。このため、NF- $\kappa$ B 活性を抑えることが抗癌剤あるいは放射線治療の効果を増強させる可能性が示唆される。実際、NF- $\kappa$ B を抑制することで、daunorubicin あるいは放射線治療のアポトーシス誘導が増強されることが報告されている<sup>38</sup>。今後、前立腺癌において、DHMEQ を併用することにより、各種抗癌剤や放射線治療の感受性を高め、さらに強力な抗癌治療の開発も期待される。

## 総括

新規に開発された NF- $\kappa$ B 活性阻害剤 DHMEQ によるホルモン抵抗性前立腺癌治療の有効性を検討し、以下の結果を得た<sup>39</sup>。

1. DHMEQ はホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対して濃度依存性に、また時間依存性に増殖抑制効果を示した。
2. DHMEQ は NF- $\kappa$ B 転写活性化を抑制した。また、DHMEQ は NF- $\kappa$ B と DNA の結合を阻害したが、阻害タンパクである I $\kappa$ B $\alpha$  には影響を与えなかった。
3. DHMEQ はホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対してアポトーシスを誘導した。その作用機序には Bcl-2 関連タンパクが関与しないことが示唆された。
4. ノドマウスを用いた前立腺癌皮下腫瘍モデルにおいて、DHMEQ 治療は有意に抗腫瘍効果を示した。

以上の結果から DHMEQ はホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞において恒常的に活性化している NF- $\kappa$ B を抑制することで、抗腫瘍効果を示した。ホルモン抵抗性前立腺癌に対する確立した治療法が存在しない現在、DHMEQ は今後新たな分子標的治療として期待できることが示唆された。

本稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、御高閣を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室村井 勝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、多大なる御助言をいただいた堀口 裕先生、中島 淳講師、慶應義塾大学大学院理工学研究科梅澤一夫教授に深謝いたします。さらに御協力をいただいた泌尿器科学教室の教職員各位の皆様へ感謝いたします。

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究 B, No. 13470341) の援助を受けた。

文 献

- 1) Arai Y, Okubo K, Aoki Y, Maekawa S, Okada T, Maeda H, Ogawa O, Kato T : Patient-reported quality of life after radical prostatectomy for prostate cancer. *Int J Urol* 6 : 78-86, 1999
- 2) Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA : Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49 : 8-31, 1999
- 3) Catalona WJ : Screening for prostate cancer. *Lancet* 343 : 1437, 1994
- 4) Kikuchi E, Nakashima J, Ishibashi M, Ohigashi T, Asakura H, Tachibana M, Murai M : Prostate specific antigen adjusted for transition zone volume : the most powerful method for detecting prostate carcinoma. *Cancer* 89 : 842-849, 2000
- 5) Reiner WG, Scott WW, Eggleston JC, Walsh PC : Long-term survival after hormonal therapy for stage D prostatic cancer. *J Urol* 122 : 183-184, 1979
- 6) Chung TD, Yu JJ, Spiotto MT, Bartkowski M, Simons JW : Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. *Prostate* 38 : 199-207, 1999
- 7) Nakajima Y, DelliPizzi AM, Mallouh C, Ferreri NR : TNF-mediated cytotoxicity and resistance in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 29 : 296-302, 1996
- 8) Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H, Murai M : Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6 : 2702-2706, 2000
- 9) Baeuerle PA, Baltimore D : NF- $\kappa$ B : ten years after. *Cell* 87 : 13-20, 1996
- 10) Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD : Constitutive activation of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 18 : 7389-7394, 1999
- 11) Sumitomo M, Tachibana M, Nakashima J, Murai M, Miyajima A, Kimura F, Hayakawa M, Nakamura H : An essential role for nuclear factor  $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death in prostate cancer cells. *J Urol* 161 : 674-679, 1999
- 12) Matsumoto N, Ariga A, To-e S, Nakamura H, Agata N, Hirano S, Inoue J, Umezawa K : Synthesis of NF- $\kappa$ B activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg Med Chem Lett* 10 : 865-869, 2000
- 13) Erkel G, Anke T, Sterner O : Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by panepoxydone. *Biochem Biophys Res Commun* 226 : 214-221, 1996
- 14) Muraki J, Addonizio JC, Choudhury MS, Fischer J, Eshghi M, Davidian MM, Shapiro LR, Wilmot PL, Nagamatsu GR, Chiao JW : Establishment of new human prostatic cancer cell line (JCA-1). *Urology* 36 : 79-84, 1990
- 15) Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA, Jr., Goeddel DV : Effect of interleukin 2, interferon- $\gamma$ , and mitogens on the production of tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$ . *J Immunol* 135 : 2492-2497, 1985
- 16) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493-501, 1992
- 17) Ariga A, Namekawa J, Matsumoto N, Inoue J, Umezawa K : Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced nuclear translocation and activation of NF- $\kappa$ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin. *J Biol Chem* 277 : 24625-24630, 2002
- 18) Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM : Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* 274 : 787-789, 1996
- 19) Beg AA, Baltimore D : An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science* 274 : 782-784, 1996
- 20) Kikuchi E, Nakashima J, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Murai M : Enhancement of diethylstilbestrol induced cytotoxicity by bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and a glutathione depletor for prostate cancer. *J Urol* 169 : 730-734, 2003
- 21) Cox RL, Crawford ED : Estrogens in the treatment of prostate cancer. *J Urol* 154 : 1991-1998, 1995
- 22) Burns-Cox N, Basketter V, Higgins B, Holmes S : Prospective randomised trial comparing diethylstilboestrol and flutamide in the treatment of hormone relapsed prostate cancer. *Int J Urol* 9 : 431-434, 2002
- 23) Scherr D, Pitts WR, Jr., Vaughn ED, Jr. : Diethylstilbestrol revisited : androgen deprivation, osteoporosis and prostate cancer. *J Urol* 167 : 535-538, 2002
- 24) Robertson CN, Roberson KM, Padilla GM, O'Brien ET, Cook JM, Kim CS, Fine RL : Induction of apoptosis by diethylstilbestrol in hormone-insensitive prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 88 : 908-917, 1996
- 25) Crooke ST : Therapeutic applications of oligonucleotides. *Biotechnology (N Y)* 10 : 882-886, 1992
- 26) Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M : Immunosuppression by glucocorticoids : inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. *Science* 270 : 286-290, 1995
- 27) Kopp E, Ghosh S : Inhibition of NF- $\kappa$ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265 : 956-959, 1994
- 28) Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ : Proteasome inhibitors : a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59 : 2615-2622, 1999
- 29) Orłowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, Grever MR, Orłowski M, Dang CV : Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 58 : 4342-4348, 1998
- 30) Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, Van Waes C :

- Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor- $\kappa$ B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7 : 1419-1428, 2001
- 31) Gehrt A, Erkel G, Anke T, Sterner O : Cycloepoxydon, 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-pent-1-enylbenzene and 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-pent-1,3-dienylbenzene, new inhibitors of eukaryotic signal transduction. *J Antibiot (Tokyo)* 51 : 455-463, 1998
- 32) Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EB, Vogt M, Myers C, Parks T, Warring P, Muhlbacher A, Czernilofsky AP, Baeuerle PA : The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Exp Med* 183 : 1829-1840, 1996
- 33) Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U : Control of I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267 : 1485-1488, 1995
- 34) Sumitomo M, Tachibana M, Ozu C, Asakura H, Murai M, Hayakawa M, Nakamura H, Takayanagi A, Shimizu N : Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated I $\kappa$ B $\alpha$  overexpression. *Hum Gene Ther* 10 : 37-47, 1999
- 35) Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M : Constitutive activation of nuclear factor- $\kappa$ B prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 20 : 3888-3896, 2001
- 36) Baldwin AS : Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest* 107 : 241-246, 2001
- 37) Huang Y, Johnson KR, Norris JS, Fan W : Nuclear factor- $\kappa$ B/I $\kappa$ B signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. *Cancer Res* 60 : 4426-4432, 2000
- 38) Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, Jr., Liu R, Adams J, Elliott P, Cusack JC, Jr. : Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition : implications for a role of NF- $\kappa$ B. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50 : 183-193, 2001
- 39) Kikuchi E, Horiguchi Y, Nakashima J, Kuroda K, Oya M, Ohigashi T, Takahashi N, Shima Y, Umezawa K, Murai M : Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor  $\kappa$ B inhibitor in nude mice. *Cancer Res* 63 : 107-110, 2003
-



学位論文

膀胱癌患者血清中の IgG 抗体が認識する  
新しい膀胱癌抗原の同定

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

(指導：村井 勝教授)

伊 藤 敬 一

(平成 16 年 3 月 25 日受付)

Key Words : SEREX, bladder cancer antigen, lipolic acid synthetase, kelch-like protein,  
tumor reactive T cell

癌治療において有効な免疫治療を確立することは 1 つの重要なテーマである。生体内の免疫系による腫瘍の拒絶には細胞性免疫が重要であり、多くの場合 CD8+ 細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes ; CTL) が腫瘍細胞を排除する役割を担っていることが分かってきた<sup>1-3)</sup>。このため悪性腫瘍に対する有効な免疫治療を確立するために、CD8+T 細胞に認識される腫瘍抗原の同定が試みられてきた。CD8+T 細胞が認識するヒト腫瘍抗原はメラノーマを中心に同定され、gp100<sup>4)</sup>や MART-1<sup>5)</sup>などの組織特異抗原、MAGE ファミリー<sup>6)</sup>などの癌精巣抗原、β-カテニン<sup>7)</sup>や MART-2<sup>8)</sup>などの癌特異的変異抗原などが腫瘍反応性 T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法により同定された。これらの抗原の一部は、細胞免疫治療の臨床試験においてすでに適応され、腫瘍の縮小も報告されている<sup>1, 9)</sup>。

腫瘍反応性 T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法は有効な方法であるが、腫瘍反応性 T 細胞株や腫瘍細胞株を樹立しにくい癌腫においては適用が難しい。このような背景から Sahin らは腫瘍組織から作成した cDNA ライブラリーを癌患者血清でスクリーニングする SEREX (serological identification of recombinant cDNA expression cloning) 法を報告した<sup>10)</sup>。SEREX 法には腫瘍細胞や腫瘍反応性 T 細胞の細胞株化を必要とせず、どのような癌腫においても適用できるという利

点がある。また SEREX 法は患者血清中の IgG が反応する抗原を単離するため、ヘルパー CD4+T 細胞がその抗原を認識していることが示唆されるが、Pfreundschuh や Old らのグループによる多くの検討の結果、SEREX 法で単離される抗原の中には MAGE ファミリーや tyrosinase など含まれることがわかり、CD8+T 細胞に認識される抗原を単離する方法としても有用であることがわかってきた<sup>10, 11)</sup>。

本研究は進行性膀胱癌に対する免疫治療に応用しうる癌抗原の同定を目的とした。進行性膀胱癌の治療は、他の転移性腫瘍の治療と同様に困難である。治療として多剤併用化学療法<sup>12)</sup>が行われる場合が多いが、治癒にいたることは少なく新しい治療法の開発が待たれる。進行性膀胱癌に対する治療として、免疫治療は可能性を秘めている。進行癌に進展する可能性がある異型度の高い表在性膀胱癌や carcinoma *in situ* を随伴する表在性膀胱癌に対して、*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) の膀胱内注入療法は最も有効な治療法とされており<sup>13)</sup>、その抗腫瘍効果の機序として、膀胱局所の免疫反応が関連していることが示唆されている<sup>14-16)</sup>。また腫瘍反応性 T 細胞を誘導しうる癌抗原の中で、癌精巣抗原に分類される MAGE ファミリーや NY-ESO-1 などが膀胱癌に発現することが報告されている<sup>17-19)</sup>。我々の教室においても、HLA-A24 拘束性 MAGE-3 ペプチドで刺激した自己樹

本論文は Ito K, Fujita T, Akada M, Kiniwa Y, Tsukamoto M, Yamamoto A, Matsuzaki Y, Matsushita M, Asano T, Nakashima J, Tachibana M, Hayakawa M, Ikeda H, Murai M, Kawakami Y. Identification of bladder cancer antigens recognized by IgG antibodies of a patient with metastatic bladder cancer. *Int J Cancer* 108 (5) : 712-724, 2004 の一部を含む。

状細胞を用いることにより、進行膀胱癌症例において転移巣の縮小を認めている<sup>20)</sup>。これらの所見から免疫治療は進行性膀胱癌に対しても有効である可能性がある。

膀胱癌における細胞免疫治療を確立するためには、膀胱癌抗原の同定と腫瘍反応性 T 細胞を誘導しうるエピトープの決定が必要である。しかし膀胱癌では、癌精巢抗原である MAGE-1, -2, -3, -12 や NY-ESO-1 などの発現が報告されているにとどまり<sup>17, 18, 19)</sup>、腫瘍反応性 T 細胞に認識されうる膀胱癌抗原の報告は少ない。比較的最近、膀胱癌において KIAA0205 という新規遺伝子の塩基配列に変異を生じ、変化したアミノ酸配列がエピトープになり HLA-B\*4403 拘束性に CD8+T 細胞に認識されたという報告がなされた<sup>21)</sup>。しかし他の 60 例の膀胱癌組織で検討したところ、同様の遺伝子の変異は認められず診断や治療に応用しうる膀胱癌抗原とはならないと考えられた。現時点では細胞免疫治療に使用しうる膀胱癌抗原は非常に少ないといえる。

このような背景から、本研究では SEREX 法を用いて膀胱癌に対する免疫治療に応用しうる癌抗原を同定することを目的とした。膀胱癌抗原として KU-BL-1 と KU-BL-2 を同定した<sup>22)</sup>。これらの分子のアミノ酸配列をもとに機能的な推察を加えるとともに、2 分子に由来する HLA-A24 高親和性ペプチドが腫瘍反応性 T 細胞を誘導しうるかを検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞株と組織

ヒト膀胱移行上皮癌 (transitional cell carcinoma : TCC) 細胞株である FY<sup>20)</sup>, KU1, KU7, KU19-19, NBT-2, T-24 は RPMI1640 (10% fetal bovine serum ; FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) で培養した。FY および KU-19-19 は浸潤性膀胱癌 (TCC, grade3) の転移巣から樹立された細胞株であった。NBT-2 と T24 は浸潤性膀胱癌 (TCC, grade 3) の原発巣から樹立された細胞株であった。KU1 と KU7 は膀胱癌 (それぞれ grade 2 と grade 1) の原発巣から樹立されたものであった。

11 種類のヒトメラノーマ細胞株、4 種類のヒト肺癌細胞株、7 種類のヒト大腸癌細胞株、4 種類のヒト白血病細胞株、4 種類のヒト腎細胞癌細胞株、2 種類のヒト乳癌細胞株、2 種類のヒト前立腺癌細胞株、2 種類のヒトグリオーマ細胞株、2 種類のヒト食道癌細胞株、3 種類のヒト膵癌細胞株、腫瘍浸潤性 T 細胞株 (TIL), EB virus transformed B 細胞株、皮膚線維芽細胞株を

RNA の抽出に用いた。正常膀胱粘膜組織、膀胱癌組織、腎細胞癌組織は手術検体から採取し、使用するまで -80 °C で保存した。

### 2. 膀胱癌由来 FY 細胞からの cDNA ライブラリーの作成

症例は 76 歳の女性。筋層浸潤を伴う膀胱癌の診断で膀胱全摘除術を施行した。原発巣の組織診断は筋層浸潤を伴う非乳頭状移行上皮癌 (grade 3, pT3) であり、術後 5 カ月目に右鼠径リンパ節、傍大動脈リンパ節の腫脹を認めた。鼠径部の生検を行い組織診断は移行上皮癌 (grade 3) であった。膀胱癌細胞株 FY はこの鼠径リンパ節転移から樹立された<sup>20)</sup>。この FY 細胞からグアニジン-塩化セシウム超速心法を用いて total RNA を抽出した。Poly (A)<sup>+</sup> RNA は Oligotex-dT30 super (TAKARA, Kyoto, Japan) で 2 回処理を行い純化した。cDNA ライブラリーの作成には Poly (A)<sup>+</sup> RNA 5 µg を使用した。First-strand の合成は oligo (dT) プライマーを用いて行った。cDNA 断片はバクテリオファージ発現ベクター (ZAP express, Stratagene, La Jolla, CA) に封入し、*E. coli* に感染させ  $2.3 \times 10^6$  個のリコンビナントを有する cDNA ライブラリーを作成した。

### 3. cDNA ライブラリーの発現クローニング

作成した cDNA ライブラリーを用いて、寒天培地 (15 cm プレート) 上に約  $1.0 \times 10^6$  個のプラークを発現させ、その上にニトロセルロースメンブレン (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England) を置いた。Isopropyl-thio-galactoside を用いてリコンビナントタンパクを発現させた。*E. coli* とラムダファージに対する血清中の抗体を吸収し偽陽性反応を最小限にするために、*E. coli* 細胞ライセートとインサートのないバクテリオファージ発現タンパクを用い血清を処理した。スクリーニングには 100 倍に希釈した患者血清を用いた。TBS-T (0.05% Tween 20) 溶液でメンブレンを 3 回洗浄し、1 : 4000 の 2 次抗体 (alkaline phosphatase-conjugated goat antihuman Fc antibodies ; Cappel, Aurora, Ohio) を使用した。陽性のプラークは 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (SIGMA, St. Louis, MO) と nitroblue tetrazolium (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いた発色反応で判定した。陽性のプラークはもとの寒天培地から分離した。単離したクローンの cDNA インサートは、T3 primer (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG) と T7 primer (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC) を用いて

行った PCR 産物を用いて塩基配列を決定するか、pBK CMV プラスミドに変換した後、塩基配列を決定した。塩基配列の決定は Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit を用い ABI Prism 310 genetic analyzer (PE Biosystems, Branchburg, NJ) で行った。決定されたインサートの塩基配列は NCBI の遺伝子データベースである BLAST プログラムを用いて解析した。

#### 4. 単離抗原に対する血清中の IgG 抗体の存在の検討

単離したそれぞれの抗原に対する IgG 抗体の存在を、癌患者や健康人の血清を用いて検討した。イムノスクリーニングと同様の手法を用いた。陽性ファージクローンとインサートを持たないファージ (negative control) を 1:1 の割合で混合することにより、陽性反応のある血清を識別した。

#### 5. RT-PCR およびノーザンブロット

Total RNA はグアニジン-塩化セシウム超遠心法で細胞株や組織から抽出した。正常組織の RNA は正常膀胱組織をのぞいて Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) から購入した。正常膀胱粘膜は手術検体を使用した。逆転写反応は Super Script II 逆転写酵素 (Gibco BRL, Rockville, MD) を用いた。PCR は至適なアニーリング温度で Ex-Taq DNA polymerase (TAKARA) を用いて行った。検討する各遺伝子に特異的なプライマーは塩基配列が確定した cDNA インサートの配列が増幅されるように設定した。KU-BL-1 の primer は 5'-GGAAATGTCTCTACGCTGCG (sense primer) と 5'-AACATGATCGTGGCTGTGGC (antisense primer), KU-BL-2 の primer は 5'-GGTGGAGAAGAGCAGCAAGAAG (sense primer) および 5'-GGT CCTCTGGAGACAGTAGATG (antisense primer) を使用した。

またノーザンブロットを行うために正常組織の Poly (A)<sup>+</sup>RNA (2 µg/lane) がプロットされているナイロンメンブレン (Human Multiple Northern Blot, Clontech) を使用した。その他の組織や細胞株の RNA に関しては 20 µg の total RNA を各レーンに使用し、アガロース (1.0% ホルムアルデヒド) 上で電気泳動を行いナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham) にタンパクを転写した。目的の遺伝子を増幅した PCR 産物を用い、High Prime DNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH) を用いて<sup>32</sup>P で標識したプローブを作成した。Quick Hyb 溶液 (Stratagene) を用い、プ

レハイブリダイゼーション (68°C, 20 分間) およびハイブリダイゼーション (68°C, 2 時間) を行った。シグナルは Molecular Imager Fx (BIO RAD, Hercules, CA) で検出した。コントロールにはβ-actin cDNA プローブ (Clontech) を用いた。

#### 6. 定量的 PCR

正常組織と癌組織における B2 の発現レベルを検討するために Taqman real-time PCR を行った。センスプライマー (5'-TCAAGGAGATGACAGACGTGC), アンチセンスプライマー (5'-GACCCAGGACTTTGGTTTTCGA), プローブ (5'(FAM) CAAAGTGGTGAAGGAGGTGG CCAA-(TAMRA)) を用いた。データの検討は ABI Prism 7700 Sequence Detector System (PE Biosystems) を用いて行った。

#### 7. 5'-RACE

5'末端の塩基配列を決定するために Marathon TM cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて 5'-RACE を行った。FY 細胞から抽出した 1 µg の poly (A)<sup>+</sup> RNA を oligo (dT) プライマーと AMV 逆転写酵素を用い反応を行った。Second strand の合成は、*E. coli* DNA polymerase I, RNase H を用いた。T4 DNA polymerase を用いて 2 本鎖 DNA の末端を平坦化し、T4 DNA ligase を用いて Marathon cDNA adapter 1 と結合した。この cDNA を Marathon cDNA adapter 1 と KU-BL-1 特異的プライマー (5'-TCGTGGCTGTG GCGGTGGCATATTCTCC) を用い PCR を行った。さらに adapter primer 2 と KU-BL-1 特異的プライマー (5'-GGCATATTCTCCACCTCCCCAACACTC) を用いた二次 PCR を 20 サイクル行った。pGEM-T (Promega Inc., Madison, WI) に挿入し塩基配列を決定した。

#### 8. HLA-A24 高親和性合成ペプチドを用いた CTL の誘導

樹状細胞 (DC) の誘導は過去に報告された方法に従った<sup>23</sup>。末梢血単核球 (PBMC) は Lymphoprep (AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway) を用いて健康人から分離した。PBMC を表面処理プレート (Primaria, Falcon, Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 上で 30 分間培養し、浮遊細胞は凍結保存した。付着細胞は RPMI1640 (10% FCS) で翌朝まで培養した。付着細胞は RPMI1640 (10% FCS) に GM-CSF (50 ng/ml) と IL-4 (50 ng/ml) を加え 7 日間培養した。成

第2表 SEREX 法で単離された未知分子。  
(Ito K et al : Int J Cancer 108 (5) : 712-724, 2004 の Table II を許可を得て転載)

| クローン名 | 単離されたクローンの数 | 同定された遺伝子                        | Unigene   | 染色体      |
|-------|-------------|---------------------------------|-----------|----------|
| B1    | 2           | Putative lipoic acid synthetase | Hs.53531  | 6p21.3   |
| B3    | 8           | Hypothetical protein            | Hs.26481  | 7p21.3   |
| B4    | 7           | KIAA0603                        | Hs.173802 | 13q21.33 |
| B15   | 2           | KIAA0782                        | Hs.21264  | 11q13.3  |
| B19   | 1           | EST                             | Hs.288897 | 2q36.1   |
| B22   | 1           | EST                             | Hs.173259 | 6q25.3   |
| B31   | 1           | EST                             | Hs.21486  | 2p11.2   |
| B33   | 1           | EST                             | -         |          |
| B34   | 1           | EST                             | -         |          |
| B36   | 1           | Hypothetical protein            | -         | 6        |
| B39   | 1           | EST                             | -         |          |
| B44   | 1           | Hypothetical protein            | Hs.8836   | 22q13.2  |

討した。HLA-A24 が導入された T2 細胞 (T2-A24) をペプチド抗原特異的 T 細胞誘導のポジティブコントロールとした。

#### 9. 統計学的解析

各群間の比較は Unpaired *t*-test を用いて検討し、*p*<0.05 を統計学的有意とした。

### 結 果

#### 1. 膀胱癌患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原の単離

FY 細胞から作成した cDNA ライブラリーを同一人の血清を用いてスクリーニングした。合計  $1.2 \times 10^6$  個のファージクローンをスクリーニングし、78 個の陽性クローンを単離した。78 個のクローンは 48 の異なった分子に分けられ (B1-B48)、36 の既知の分子 (第 1 表) と 12 の未知の分子に分けられた (第 2 表)。12 の未知分子のうち 8 分子は部分的な塩基配列が GenBank データベース上に登録されている Unigene cluster と一致した。High density lipoprotein binding protein (HDLBP)<sup>24)</sup> (B13)、negative cofactor 2  $\alpha$ -subunit (B16)、pinch protein (B48)、B1、B3、B4、B15 の 7 つの分子は 2 回以上単離された。このうち HDLBP、B3、B4 が最も多く単離された。

膀胱癌の診断や治療に応用しうる抗原を見つけるために、既知分子では以前に癌との関連性が示唆されているもの、未知の分子に関しては完全に新規であるか、

DNA database で一致する cDNA 断片の由来組織が癌や限られた正常組織に限定されるものを選別した。36 の既知分子の中で、9 分子が癌との関連性が過去に報告されていた (B5、B6、B7、B8、B9、B12、B14、B27、B37)。未知分子では database 上で一致する cDNA 断片の由来組織を検討し、癌で高発現している可能性のあるものを選択した。例えば、B1 の一致する Unigene cluster (Hs.53531) は癌組織 (神経芽腫、網膜芽腫、胚細胞腫瘍、メラノーマ、リンパ腫、メラノーマ) などや、良性腫瘍 (膀胱移行上皮乳頭腫) や限られた正常組織 (胎児心臓、胎盤、メラノサイト) であった。この結果から、B1 は癌細胞と限られた正常組織のみに発現する可能性があると考えられる。また B3 の一致する Unigene cluster (Hs.26481) は癌組織 (神経芽腫、肺癌、メラノーマ、皮膚扁平上皮癌、腎癌、胚細胞腫瘍)、限られた正常組織 (胎児心臓、精巣、妊娠時の子宮、メラノサイト) などであった。多くの正常組織に発現し癌組織に対して発現の差がないと予想される分子は除外し、36 分子を免疫原性の有無を評価する分子として選択した。

#### 2. 単離抗原に対する健常人および癌患者血清中の IgG 抗体の存在

選別された 36 分子に対して IgG 抗体が健常人の血清中に存在するかを 16 例に対して行った。36 抗原中 24 抗原は、健常人血清 16 例中に抗体が存在しないか、1 例にのみ抗体が存在した (第 3 表)。これらの 24 抗原に対して、膀胱癌患者血清 28 例の検討を行った。24

熟 DC を誘導するために、抗 CD40 モノクローナル抗体 (500 ng/ml), IFN- $\gamma$  (500 IU/ml), LPS (0.4 ng/ml) で 5 日目に刺激を加えた。

KU-BL-1 と KU-BL-2 のアミノ酸配列上で HLA-A24 高親和性ペプチドを BIMAS プログラムを用いて検討した。それぞれ 2 つずつ HLA-A24 高親和性のペプチドを選択した (KU-BL-1<sub>89-97</sub> : NYNKLKNTL, KU-BL-1<sub>332-360</sub> : SYKAGEFFL, KU-BL-2<sub>338-346</sub> : VYILGGSQL, KU-BL-2<sub>207-215</sub> : VYDA AVRML)。これらのペプチドは Fmoc 法で合成し、逆相カラムを用いた高速液体クロ

マトグラフィーにより精製し、質量分析にて確認を行った。CTL の誘導は、 $2 \times 10^6$  個の同一人の PBMC 中の浮遊細胞を、20  $\mu$ g/ml のペプチドで刺激した  $5 \times 10^5$  個の DC と Iscove's DMEM (10% human serum) 中で共培養した。共培養 3 日目に 50 IU/ml に IL-2 (Shionogi, Osaka, Japan) を加えた。培養 7 日目にペプチドで刺激した  $2 \times 10^6$  個の自己 PBMC を放射線照射後に加え刺激を行い、さらに 10 日目と 12 日目に IL-2 を加えた。同様の刺激を 2 回行い最後の刺激から 7 日目に抗原特異的応答を IFN- $\gamma$  release assay を用いて検

第 1 表 SEREX 法で単離された既知分子  
(Ito K et al : Int J Cancer 108 (5) : 712-724, 2004 の Table I を許可を得て転載)

| クローン名 | 単離されたクローン数 | 同定された分子                                      | 染色体          |
|-------|------------|--|--------------|
| B2    | 1          | Transcription factor tat-CT1                 | 19q13        |
| B5    | 1          | Golgin-84                                    | 14q          |
| B6    | 1          | -enolase                                     | 1p36.3-p36.2 |
| B7    | 1          | Laminin receptor 1                           | 3p21.3       |
| B8    | 1          | Mitotin                                      | 1q32-q41     |
| B9    | 1          | PM5 protein                                  | 16p13.11     |
| B10   | 1          | EBNA-2 coactivator                           | 7q31.3       |
| B11   | 1          | Hsp70-1                                      | 6p21.3       |
| B12   | 1          | -actinin 4                                   | 19q13        |
| B13   | 8          | High-density lipoprotein binding protein     | 2q37         |
| B14   | 1          | Lbc protooncogene                            | 15q24-q25    |
| B16   | 2          | Negative cofactor 2 subunit                  | 11q13.3      |
| B17   | 1          | Nitric oxide synthase 3                      | 7q36         |
| B18   | 1          | Kinectin 1                                   | 14q22.1      |
| B20   | 1          | STE20-like kinase                            | 12q24.2      |
| B21   | 1          | Follistatin-related protein                  | 3q13.33      |
| B23   | 1          | Tyrosyl-tRNA synthetase                      | 1p34.3       |
| B24   | 1          | Initiation factor 4B                         | 12q12        |
| B25   | 1          | Elongation factor-1                          | 6q14.1       |
| B26   | 1          | Translation factor CA150                     | 5q31         |
| B27   | 1          | Thrombospondin 1                             | 15q15        |
| B28   | 1          | Translocon-associated protein                | Xq28         |
| B29   | 1          | C-terminal binding protein 2                 | 10q26.13     |
| B30   | 1          | Protective protein for -galactosidase        | 20q13.1      |
| B32   | 1          | Lens epithelium-derived growth factor        | 9p22.1       |
| B35   | 1          | Histone macro H2A1.2                         | 5q31.3-q32   |
| B37   | 1          | Annexin VIII                                 | 10q11.2      |
| B38   | 1          | Ribosomal protein L28                        | 19q13.4      |
| B40   | 1          | Pyruvate dehydrogenase- subunit              | Xp22.2-p22.1 |
| B41   | 1          | Ribosomal protein L19                        | 17q11.2-q12  |
| B42   | 1          | Ribosomal protein L37a                       | 2            |
| B43   | 1          | Ribosomal protein S6                         | 9p21         |
| B45   | 1          | Succinate dehydrogenase complex subunit A    | 5p15         |
| B46   | 1          | Protein tyrosine phosphatase receptor type U | 1p35.3-p35.1 |
| B47   | 1          | Pinch-2 protein                              | 2q14-q21     |
| B48   | 2          | Pinch protein                                | 2q12.2       |

第3表 健常人と様々な癌患者の血清中の SEREX 単離抗原に特異的な IgG 抗体の存在

36分子に対して健常人血清中の IgG 抗体の存在を検討した。その中で健常人血清中に IgG 抗体したのが1例以下であった24分子に対して癌患者血清における検討を行った。第3表にはその24抗原の結果を表示した。\*B1に関しては30の健常人に対して IgG 抗体の存在を検討した。(Ito K et al : Int J Cancer 108 (5) : 712-724, 2004 の Table III を許可を得て転載)

| クローン名 | 健常人<br>n=16 | 膀胱癌<br>n=28 | 前立腺癌<br>n=14 | メラノーマ<br>n=10 | 脳腫瘍<br>n=10 | 膵癌<br>n=10 | 腎癌<br>n=10 | 食道癌<br>n=10 | 大腸癌<br>n=7 | 精巣腫瘍<br>n=6 |
|-------|-------------|-------------|--------------|---------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| B1    | 0*          | 2           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B2    | 0           | 2           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B3    | 0           | 8           | 0            | 0             | 0           | 0          | 1          | 0           | 0          | 0           |
| B4    | 0           | 3           | 1            | 0             | 1           | 0          | 0          | 1           | 0          | 0           |
| B5    | 0           | 1           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B6    | 0           | 4           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B7    | 0           | 3           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B8    | 1           | 5           | 1            | 1             | 1           | 4          | 0          | 0           | 1          | 1           |
| B9    | 0           | 5           | 0            | 0             | 0           | 1          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B10   | 0           | 1           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B11   | 0           | 4           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B12   | 0           | 1           | 0            | 1             | 0           | 0          | 1          | 0           | 1          | 0           |
| B13   | 0           | 4           | 0            | 1             | 0           | 0          | 1          | 0           | 0          | 0           |
| B14   | 0           | 1           | 2            | 0             | 0           | 0          | 3          | 1           | 0          | 0           |
| B15   | 0           | 1           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B16   | 0           | 2           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B18   | 0           | 2           | 1            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B20   | 0           | 1           | 3            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B22   | 0           | 3           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B28   | 0           | 1           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B29   | 0           | 1           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B30   | 0           | 1           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |
| B33   | 1           | 1           | 0            | 1             | 1           | 1          | 1          | 0           | 0          | 0           |
| B44   | 0           | 1           | 0            | 0             | 0           | 0          | 0          | 0           | 0          | 0           |

抗原中 13 抗原が 28 例中 2 例以上 IgG 抗体が存在した (第 3 表)。残りの 11 分子に関しては cDNA ライブラリーのスクリーニングに用いた血清にのみ IgG 抗体が存在した。B3 は膀胱癌患者血清中に最も高頻度に IgG 抗体が存在した (28 例中 8 例)。

これらの 24 分子については膀胱癌以外の癌患者血清の検討も行った (第 3 表)。24 抗原中 14 抗原は膀胱癌以外の癌患者血清中に IgG 抗体は存在せず、高頻度に IgG 抗体を認める抗原は少なかった。B8 (mitosin), B14 (LBc 癌原遺伝子), B20 (STE20-like kinase) は複数の膵癌、腎癌、前立腺癌などの患者血清中に IgG 抗体が存在した。B3 に特異的な IgG 抗体は 8 例 (28 例中) の膀胱癌患者血清中に認められたが、その他の癌腫においては腎癌患者血清 1 例でのみ陽性で、その他の癌患者血清や健常人血清では抗体の存在を認めなかった。B1 に特異的な IgG 抗体は膀胱癌患者 28 例中 2 例の血清中に認められ、その他の癌患者や健常人血清中には IgG 抗体を認めなかった。

### 3. 単離抗原の組織、細胞株における mRNA 発現の検討

前述の選択された 24 抗原に対して、RT-PCR により組織発現パターンを検討した。まず PCR で検討した。ほとんどの抗原は多くの正常組織に発現していたが、B1, B2, B3 は癌細胞株と精巣などのごく限られた正常組織のみに 25 サイクルの PCR で発現を認めた。B1 は 6 例中 4 例の膀胱癌細胞株と精巣に発現を認めた。また正常膀胱粘膜、脳、平滑筋にも弱く発現を認めた。さらに様々な癌組織や癌細胞株にパネルを広げて発現を検討した。多くの癌細胞株で発現を認め、23 例の膀胱癌組織、3 例の胃癌組織、10 例の腎細胞癌組織では全例で発現を認めた (第 4 表)。ノーザンプロットで B1 は約 1.7-kb にバンドが認められ、4 例の膀胱癌細胞株、6 例の膀胱癌組織では全例、正常膀胱粘膜に発現を認め、RT-PCR の結果とほぼ一致した (第 1 図)。B1 は正常膀胱粘膜に発現しているが、膀胱癌組織にも強く発現していた。B1 は精巣にも発現し、その他の組織では正常

第4表 RT-PCR 法による KU-BL-1 の様々な癌細胞株や癌組織における発現の検討

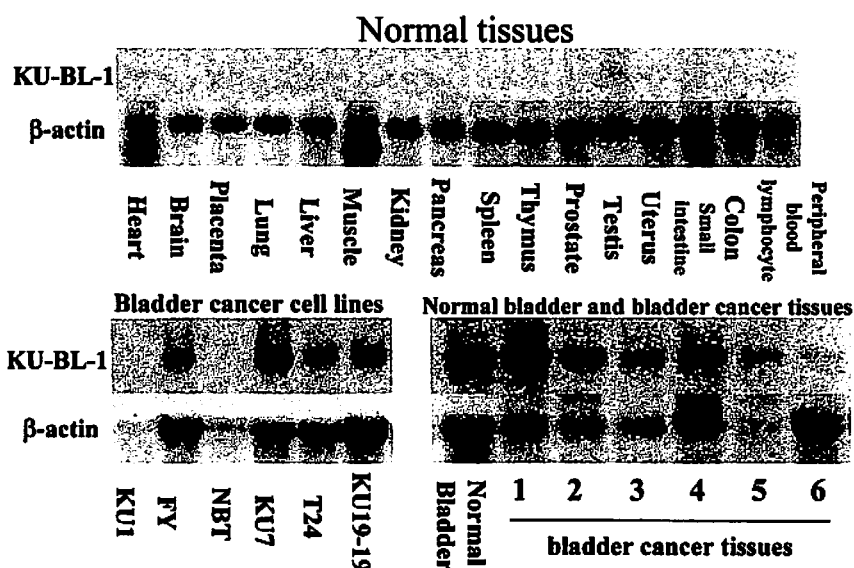
( ) 内は腫瘍組織に対する結果を表示した。細胞株では 25 サイクル、組織では 30 サイクルの結果を表示した。ND：施行せず。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Table IV を許可を得て転載)

| 癌種    | 陽性数/トータル    |
|-------|-------------|
| メラノーマ | 11/11       |
| 膀胱癌   | 4/6 (23/23) |
| 乳癌    | 1/2         |
| 大腸癌   | 5/7         |
| 食道癌   | 1/2         |
| 胃癌    | ND (3/3)    |
| グリオーマ | 1/2         |
| 血液系腫瘍 | 4/4         |
| 肺癌    | 1/4         |
| 前立腺癌  | 1/2         |
| 腎癌    | 3/3         |
| 腎癌    | 2/4(10/10)  |

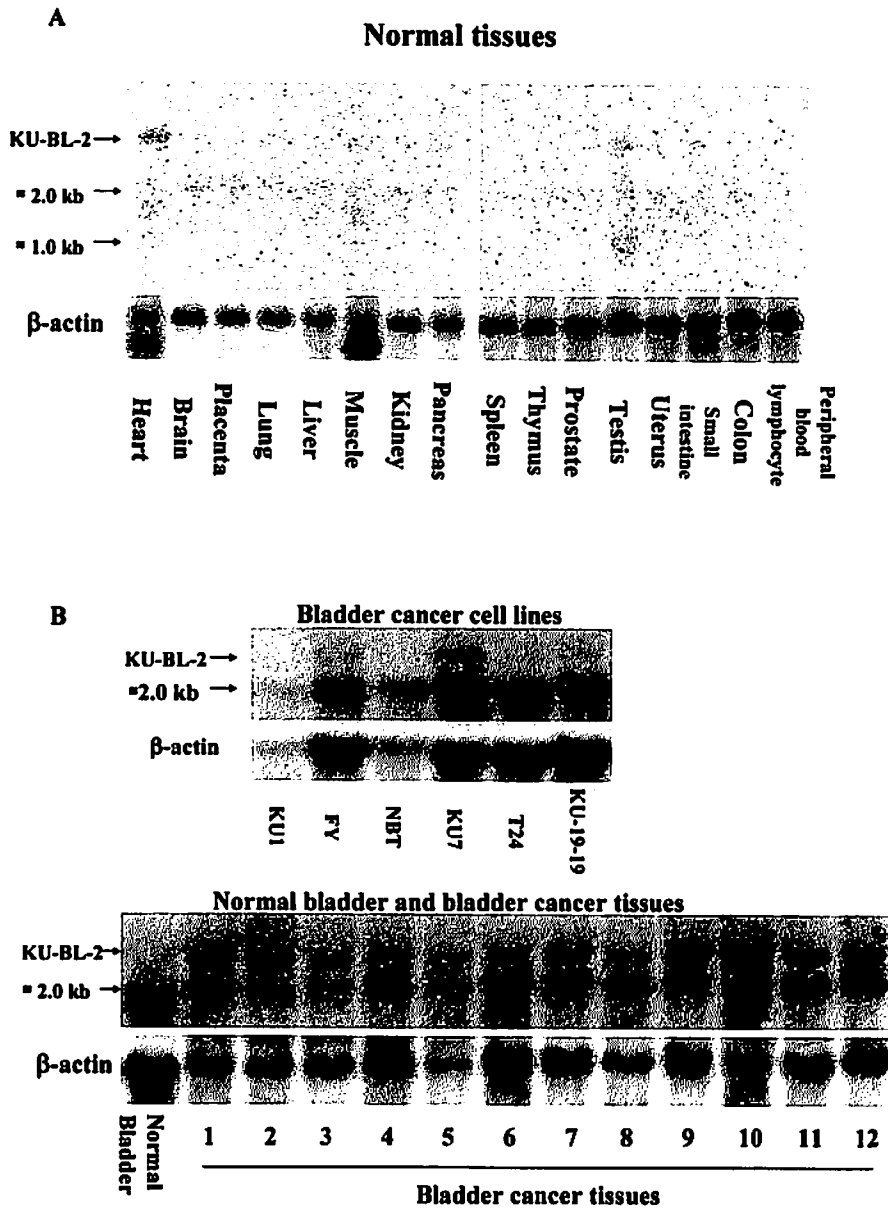
の心臓や肝臓にごく弱い発現を認めるのみであった。これらの結果から、B1 は膀胱癌、正常膀胱粘膜に強く発現し、精巣以外の正常組織にはほとんど発現がみられない抗原と考えられた。KU-BL-1 と命名しさらなる検討を行った。

B2 (Tat-CT1) は RT-PCR とノーザンブロットで正常膀胱粘膜と比較し膀胱癌組織に発現が高かった。このため定量的な評価のために Real-time PCR を行った。B2 は正常膀胱粘膜と比較し膀胱癌組織に発現は高かったが、膀胱癌組織での発現は B2 の発現を認める心臓や腎臓などの正常組織と比べ高いとはいえなかった。このため B2 は膀胱腫瘍に対する免疫組織学的検討に利用しうる抗原であるが、免疫治療に使用しうる可能性は低いと思われた。

B3 に関して、25 サイクルの PCR では検討したほとんどの癌細胞株で発現を認め、膀胱癌細胞株では 6 例中 4 例で発現を認めた。正常組織では脳、心臓、肺、精巣に発現を認めた。ノーザンブロットでは、正常組織において B3 と考えられる弱い 3.2-Kb のバンドを心臓と精巣に認め、精巣にのみ弱い 1.0-kb のバンドを認めた。ごく弱い 2.0-Kb のバンドを正常組織全般に認めた(第 2A 図)。B3 と考えられる 3.2-Kb のバンドは 6 例



第1図 正常組織、膀胱癌細胞株および膀胱癌組織における KU-BL-1 の mRNA の発現の検討。約 1.7 kb の長さの部位に KU-BL-1 と考えられるバンドを認めた。6 種類中 4 種類の膀胱癌細胞株、膀胱癌組織 6 検体すべて、および正常膀胱粘膜と精巣に強い発現を認めた。市販に購入したメンブレン(図の上段)は各レーンに 2 μg の poly (A)<sup>+</sup> RNA を使用している。その他のメンブレンに関しては各レーンに 20 μg の total RNA (図の下段)を使用している。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Figure 1 を許可を得て転載)



第2図 正常組織、膀胱癌細胞株および膀胱癌組織における KU-BL-2 の mRNA の発現の検討。KU-BL-2 の全長とほぼ一致する 3.2-Kb の長さにバンドを認めた。正常組織 (図の上段) では、心臓と精巣に発現を認めた (A)。精巣にのみ弱い 1.0-kb のバンドを認めた。薄い 2.0-Kb のバンドはすべての組織に発現していた。3.2Kb のバンドは 6 種類中 3 種類の膀胱癌細胞株、膀胱癌組織のすべてに発現を認めたが膀胱粘膜には発現を認めなかった (B)。市販に購入したメンブレンは各レーンに 2g の poly (A)<sup>+</sup> RNA を使用している (A)。その他のメンブレンに関しては 20 μg の total RNA を各レーンに使用している (B)。(Ito K et al : Int J Cancer 108 (5) : 712-724, 2004 の Figure 2 を許可を得て転載)



```

1 gagcgacgtaatttcgacctgtcctttcccgggagttagcgatccctcaaccctgcact
61 gcgctagtoctaagaggaaATGTCTCTACGCTGCGGGGATGCAGCCCGCACCCCTGGGGC
121 CCCGGGTATTTGGGAGATATTTTTGCAGCCCAGTCAGACCGTTAAGCTCCTTGCCAGATA
181 CAAAAAAGGAACTCCTAAGAATGGACCAGACCTCAAGATTTGTATCTGGTGATCTTG
241 CAGACAGGAGCACCTGGGATGAATATAAAGGAAACCTAAAACGCCAGAAAGGAGAAAGGT
301 TAAGACTACCTCCATGGCTAAGACAGAGATTTCCATGGGGAAAAATTACAATAAACTGA
361 AAAATACTTTGCGGAATTTAAATCTCCATACAGTATGTGAGGAAGCTCGATGTCCCAATA
421 TTGGAGAGTGTGGGGAGGTGGAGAATATGCCACCGCCACAGCCACGATCATGTTGATGG
481 GTGACACATGTACAAGAGGTTGCAGATTTTGTCTGTTAAGACTGCAAGAAATCCTCCTC
541 CACTGGATGCCAGTGAGCCCTACAATACTGCAAAGGCAATTCAGAAATGGGGTCTGGATT
601 ATGTTGTCTCGACATCTGTGGATCGAGATGATATGCCTGATGGGGGAGCTGAACACATTG
661 CAAAGACCGTATCATATTTAAAGGAAAGGAATCCAAAAATCCTTGTGGAGTGTCTTACTC
721 CTGATTTTCGAGGTGATCTCAAAGCAATAGAAAAAGTTGCTCTGTGACGATTAGATGTT
781 ATGCACATAATGTAGAAACAGTCCCAGGATACAGAGTAAGGTTTCGTGATCCTCGGGCCA
841 ATTTGTATCAGTCCCTACGTGACTGAAACATGCCAAGAAGTTTCAGCCTGATGTTATTT
901 CTAAAACATGTATAATGTTGGGTTTAGGCGAGAATGATGAGCAAGTATATGCAACAATGA
961 AAGCACTTCGTGAGGCAGATGTAGACTGCTTGAAGTATAGGACAATATATGCAGCCAACAA
1021 GCGTACCTTAAGGTTGAAGATATATTAATCTCCTGAAAAATTCATACTGGGAAAAAG
1081 TAGGAAATGAACTTGGATTTCAATATACTGCAAGTGGCCCTTTGGTGCCTTCTTCATATA
1141 AAGCAGGTGAATTTTTCCTGAAAAATCTAGTGGCTAAAAGAAAAACAAAAGACCTCtaaa
1201 acttcaacaagacctcaagatcacagaaattttaaaatttgattccagtttaaacag
1261 aggtgggtgccagaaatgctggaatgagtgatggtgccccacctctttgcttaaaaaaaa
1321 aaatgtcaatagccagcagatagtggtcagcctgtaatcccagcaacttaggaggccaa
1381 ggcgggtggatcacctgaggtcaggagttcgagaccagcctggccaacatggtgaaatcc
1441 tgtctcactaaaaacaaaaaattagtcaggcgtggtagtggtgctgtaatcccagc
1501 tactcgggaggctaaggcaggagaatcactgaaacctgggagggggaggtgcatgagc
1561 caagatcgtccattgccctccagcctgggtgacaagagcaaaactccatctcaaaataa
1621 taaaaaggaaaaaaaagtcaataaactgtacaaatttaattacagtaaaaaaaaaaaaaa
1681 aaaaaaaaaaaaaa

```

第3図 KU-BL-1 cDNA の塩基配列。

KU-BL-1 の塩基配列の全長は 1,668-bp であり 1,116-bp の ORF を含んでいた (下線部)。372 のアミノ酸からなる蛋白であった。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Figure 3 を許可を得て転載)

中 3 例の膀胱癌細胞株とほとんどの膀胱癌組織に発現を認めた (第 2B 図)。これらの結果から B3 は膀胱癌の診断や治療に応用できる可能性がある抗原と考えられた。B3 を KU-BL-2 と命名しさらなる検討を行った。

#### 4. KU-BL-1 の全長の同定と KU-BL-1 蛋白の機能の予測

SEREX 法で単離されたクローンがコードする cDNA で最長のものは 1,603-bp の cDNA フラグメントであった。5'末端側の残りの塩基配列を決定するために 5'-RACE 法を行った。5'-RACE により、ノーザンプロットで認められる約 1.7-kb のバンドにはほぼ一致する 1,668-bp の cDNA を同定した (第 3 図)。1,116-bp の open reading frame (ORF; 下線) を有し、Kozak 配列とストップコドンで最初の ATG と推定される部位の 5'側に認められた。372 個のアミノ酸で構成される蛋白と考えられた。相同性のある遺伝子を DNA データベースで検討すると推定の human lipoic acid synthetase (LAS) (AJ224162) の部分配列と human cDNA clone

FLJ22636 (UniGene number: 53531) とほとんど一致した。このため KU-BL-1 はヒト LAS と考えられた。KU-BL-1 遺伝子は FLJ22636 より 5' 側に 18bp 長く、3' 側に 65 bp 短かった。FLJ22636 と比較し 1077 番目の塩基が異なり、コドン 333 においてリシンがアルギニンに変わっていた。第 4 図に示されたように NCBI の protein BLAST でそのアミノ酸配列を検討すると、マウスの乳癌から同定された LAS (NP\_077791) と 87%、分裂酵母から同定された LAS の可能性のある蛋白 (O13642) と 59%、分裂酵母から同定された LAS precursor (BAA21430) と 67%、酵母から同定された Lip 5p<sup>25</sup>) (NP\_014839) と 56% 一致した。マウス LAS (NP\_077791) と Lip 5p (NP\_014839) との相同性を第 4 図に示した。KU-BL-1 は金属結合部位 (iron-sulfur cluster) である CXXXCXXX という特徴的なモチーフを他の LAS と同様に有していた。この構造は硫黄が lipoic acid に導入されるさいに関与していると報告されている<sup>26)</sup>。

|       |     |  |     |
|-------|-----|--|-----|
| BL-1  | 1   | <u>MSLRGGDAARTLGPVVFGRVFCSPVPLSSLPDKKELLONGPDL</u>     | 45  |
| MLAS  | 1   | <u>MAIRGWDIARSLGSRIFGRYAFT-VRALSSLPDKKKEFLHNGPDL</u>   | 44  |
| LIP5  | 57  | <u>RVPVGNSTEVENATSQLTGTSGKRRKGNRKRITTEFKDAIINLGESF</u> | 91  |
| BL-1  | 46  | <u>QDFVSGDLADRSTWDEYKGNLKRQGERLRLPPWKEIETPMGKNY</u>    | 90  |
| MLAS  | 45  | <u>QDFVSGDLADKSTWDEYKGNLKRQGERLRLPPWLKTKIETPMGKNY</u>  | 89  |
| LIP5  | 92  | <u>ADFVSGK-ASKMILDPL-EKARONTEEAAKLPRWLKVPTEKGTNY</u>   | 134 |
| BL-1  | 91  | <u>NKLNITLRNINLHITVCEEARCPNIGECWGGGEYATATATIMMGD</u>   | 135 |
| MLAS  | 90  | <u>NKLNITLRNLSLHITVCEEARCPNIGECWGGGEYATATATIMMGD</u>   | 134 |
| LIP5  | 135 | <u>HKLGQDVKEIGLISITVCEEARCPNIGECWGGKDKSKATATIMLLGD</u> | 179 |
| * * * |     |  |     |
| BL-1  | 136 | <u>TCTRGCRCFSVKTARNPPPLDASEFYNTAKALAENGLDYVWLTSTV</u>  | 180 |
| MLAS  | 135 | <u>TCTRGCRCFSVKTARNPPPLDANEEDNTAKALAENGLDYVWLTSTV</u>  | 179 |
| LIP5  | 180 | <u>TCTRGCRCFSVKTNRTFSPKPPMEPENTAEATKRNGLYVWLTSTV</u>   | 224 |
| BL-1  | 181 | <u>DRDDMPDGGAEHLAKTVSYLKERNPKILVECLTPDFRGDLKAIER</u>   | 225 |
| MLAS  | 180 | <u>DRDDVADGGAEHLAKTVSCLKERNPKILVECLTPDFRGDLRAVEK</u>   | 224 |
| LIP5  | 225 | <u>DRDDLVDGGANHLAETVRKIKOKAENTLVEITSGDFRGDLKMDI</u>    | 269 |
| BL-1  | 226 | <u>VALSGLDVAHNVEITVPELQSKVRDPRANFDQSLRVLRHAKKVOF</u>   | 270 |
| MLAS  | 225 | <u>VALSGLDVAHNVEITVPELQSKVRDPRANFDQSLRVLRHAKKVOF</u>   | 269 |
| LIP5  | 270 | <u>MAQCGLDVAHNLEITVESTTPHVRDRA TYROSLSVLERAKATVF</u>   | 314 |
| BL-1  | 271 | <u>DVLSKTSIMLGLGENDEQVYATMKALREADVDCLTLGOYMQPTRR</u>   | 315 |
| MLAS  | 270 | <u>DVVSKTSIMLGLGETDEQVYATLKAALRAADVDCITLGOYMQPTRR</u>  | 314 |
| LIP5  | 315 | <u>SLITKTSIMLGLGETDEQITQILKDLRNIQCDVVVIFGOYMRPQR</u>   | 359 |
| BL-1  | 316 | <u>HLKVEEYITPEKPKYWEKVGNEIGFLYTAGGPLVRSSYKAGEEPTI</u>  | 360 |
| MLAS  | 315 | <u>HLKVEEYVITPEKPKYWEKVGNEIGFLYTAGGPLVRSSYKAGEEPTI</u> | 359 |
| LIP5  | 360 | <u>HMKVVEYVKPEKFDYKRALEMGFLYTAGGPLVRSSYKAGEEPTI</u>    | 404 |
| BL-1  | 361 | <u>KNLVAKRRKTKDL</u>                                   | 372 |
| MLAS  | 360 | <u>KNLVARRKTK</u>                                      | 369 |
| LIP5  | 405 | <u>ENVLKRRNMK</u>                                      | 414 |

第4図 KU-BL-1と他の lipoic acid synthetase との アミノ酸配列の比較。

KU-BL-1の アミノ酸配列を他の LAS と比較した。KU-BL-1はマウスの乳腺腫瘍から単離された LAS (NP\_077791) (MLAS)と 87%の 相同性があり、酵母で報告されている Lip 5p (NP\_014839) と 56%の 相同性を認めた。金属結合部位のモチーフ (iron-sulfur cluster) である CXXXCXXC には下線を引いてある。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004 の Figure 4 を許可を得て転載)

```

1      cgyggagcgcagccaggttgytagcgtgcctccctgagcgtttctaaagggggccggccgyc
61     cttygtctttcggcagtgycgagcagcgcgcgcctgcgcgcgcttccagagctggggcgt
121    gcagctgcactgcogctgcogctgttttgytlogatagatccccagctgtgccagagctf
181    cgaccctgcggccggccgycgagcccccgggggtgaaccgagctgagggaggATGGCAGC
      M A A
241    CTCTGGGGTGGAGAAGCAGCAGCAGAGAGACCGGAGAAGAACTGTCTGCTCGGGAAGA
      S G V E K S S K K K T E K K L A A R E E
301    AGCTAAATTTGTCGGGTTTCATGGCGCTCATGAAATAACATGCGGAACAGAAACGTT
      A K * L L A G F M G V N H N M R K G K T E
361    GTGTGACGTGATCTCATGCTCCAGGAAGAAGATACCTCTCATGCTGTTGTTCTTGC
      E D V X L M V Q E R K Y P A H R V V L S
421    TGCAGCCAGTCAATTTTTAACTTAATGTTCAACTAACATGCTTGAATCAAGTCCTT
      A A S H F F N L M F T T N N L E S K S F
481    TGAAGTAGAATCAAGATGCTGAACCTGATATTATTGAACAACCTGGTGAATTTGCTA
      E V S L K D A S F D X I R Q L V F F A Y
541    TACTGCTAGAAATTCCTGAAATAGCAACAAATGTCAGTCTTGTCTGGATGACAGCAACCA
      T A R X S V N S N N V O S L L D A A H G
601    ATATCAGATTGAACCTGTGAAGAAATGTGTGTTGATTTTTGAAGAACAAGTTGATGC
      Y Q X E R V K K M C V D F L K E G V D A
661    TTCAAATGCTTGGTATAAGTGTCTAGCGGAGTGTCTAGATTGCTGTAATTTGAAGC
      S N C L G I S V L A E C L D C F E L K A
721    AACTGCAGATGACTTTATTCATCAGCACTTACTGAAGTTACAAAACGTGAATTTCT
      T A D D F I H Q H F T E V Y K T D E F L
781    TCAACTTGATGTCAGCGAGTAACACATCTTCTCAACCAGGACACTGTGACTGTGAGAC
      Q L D V K R V T H L L N Q D T L A T V R A
841    AGAGGATCAGGTTTATGATGCTGCACTGAGTGGTGGAAATACGATGAACCTTAACGCCA
      E D Q V Y D A A V R W L K Y D E P N R Q
901    GCCATTATGTTGATACTCTTAAAGTCAAGGTTTCTCTTATATCAAGAATTTCTT
      P F M V D I L A K V R P P L Z I S K N F L
961    AAGTAAACGGTACAAGCTGAACCACTTATCAAGACAATCTGAAATGCCTTAAGATGTT
      S K T V Q A E P L I Q D N P E C L K M V
1021   GATAATGGAAATGAGGTACCATCTACTGTCTCCAGAGGACCGAGAAGAAGTGTGATGG
      I S G M R Y H L L S P E D R E E L V D G
1081   CACAAGACCTAGAAGAAGAAACATGACTACCCATAGCCCTATTGGAGGCTCTCAACC
      T R P R R K K H D Y RU K A L Y G G S Q F
1141   ACAGTCTGTAGATATTTAACCAGAGGATATAGCTGGACAGACATCCGCTGCCCTT
      Q S C R Y F N P K D Y S W T D I R C P F
1201   TGAATAACGAGAGATGCAGCATGCGTGTGGGACAAATGATAGTATACATTTGGGAGG
      E K R R R D A A C V F W D N2 V Y X L G G
1261   CTCTCAGCTTTTCCCAATAAAGCGAATGGACTGCTATAATGATGTAAGGATAGCTGTA
      S O L F P X K R M D C Y N V V K D S W Y
1321   TTGGAACTGGGCTCTCCGACACCTCGAGACAGCCTTGTGCTGCTGCTGCAAGGCCAA
      S K L G P P T P R D S L A A C A A E G3 E
1381   AATTTATACATCTGGAGGCTCAGAAGTAGGAACCTCAGCTCTGTATTTATTGAGTGT
      I Y T S G G S E V G H S A L X L F E C Y
1441   TGTACGAGAATGAAAGCTGGCACACAAGGCCAGCATGCTGACCCAGCGCTCCAGCCA
      D T R T E S W H T K P S M L T O R C S H
1501   TGGATGTGGAGCCAAATGGCCTAATCTATGTTTGTGGTGGAAAGTTTGGAAACAATG
      G M V E A N G A L I Y V C G G S L G H N V
1561   TTCGGGAGAGTCTTAATCTGTGAAGTTTATGATCTGCCACAGAAACATGGAGTGA
      H G R V L N S C E V Y D P A T E T W T E
1621   GCTGTCCAAATGATGAAAGCCAGGAAGATCATGGGCTGGTATTGTAAAAGACAAAT
      L C P M I E A R K N H G L V F V K D5 K I
1681   ATTTCTGTGGTGTGATGATGTTAGTGTGCTGAGCAATGTGAAATATACGATAT
      F A V G G G O N G L G G L D N V R Y Y D I
1741   TAAGTTGAACGAATGGAAGATGGTCTCACCAATGCCATGGAAGGGTGAACAGTGAATG
      K L N E W K M V S P M P W K G V T V K C
1801   TGCAGCAATGGCTCAAGTATTATGCTTGGCTGGTTTTCAGGGTCTTGGTGGATAGG
      A A V G S6 I V Y V L A G F O G V G R L G
1861   ACATCTCTGAAATATAATACCGAAACAGACAAATGGGCTGCCAACTCCAAGTCTGTC
      H I L E Y N T E T D K W V A N S K V R A
1921   TTTTCACTCACAAGTGTGTTAATTTGCTGTGATGACTTGTGGACAAATCAAGAGAC
      F P V T S C L I C V V D T C G A N E E T
1981   CCTTGAACATgasaatgagtgagcttcagactctcagagctctcasaatagaccac
      L E T
2041   cagtgctttgttccagygatttgytgacaaagtttgytttgytgttttgyttaaagaag
2101   ttccaagtgaatgaggttcoctataaastagatgttcttttatagttcttcttaatt
2161   caaagtcataattttagctgcccacaaaccagacatactagcagaaaacttgaaa
2221   aagataaagcatttgtaaaaatgtgaattcttgaatgaattccacttgttaactatg
2281   attttggcgaatagaagattggtcactcagtgaaagcagctatcttagcttagattct
2341   attttcagtcacacagagctctacaggttaggtctgttgtgctcagtcagaacta
2401   agaaaagtatgaattgtaagtcagaatgggcaactcagatggagcagcttagctcaca
2461   gtttgtgtctatttatttatttagtgccaaatgtaattccattttaaagtaagccag
2521   agtggtcaagcattacacactttctcacaacttccaaacagatttgggggttta
2581   atatgtccaaactcctcatgaanataatccatccacttaanataatccatcttttaac
2641   ataaaatgtaagcttagcaccatcattatatagtctgttttataccagtggttaa
2701   saaggtattctgctctttagtctcactgttaataaaaccacatcagtagtgatt
2761   aactgcaaaaagttaagctattatagcaattctagatcattagaanaagcagtgta
2821   gttgtcaaatcagtggtgactttgaactcttttaacgagcactgaattctttccct
2881   tagcacaacatgaanatttaacctagttgtctcacaagtttggtaactcaggttag
2941   atatctgctcctcattcattgctttttagtgatcaataaattttacaaccccaac
3001   taactcattctcctagtaactttgctttttcactgtgtaggaatgaacaatgta
3061   aagctgtcaaatcaatgtttttagtataatataaataatttttaacttaaaaaaa
3121   aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

第5図 KU-BL-2の塩基配列およびアミノ酸配列。  
 KU-BL-2のORF(下線)は1,758 bpであり、586のアミノ酸で構成される蛋白であった。KU-BL-2のアミノ酸配列はBTB/POZドメイン(a)と6つのkelch repeat(b)を有していた。(Ito K et al: Int J Cancer 108 (5): 712-724, 2004のFigure 5を許可を得て転載)

A

|         |        |            |        |       |       |      |       |       |     |
|---------|--------|------------|--------|-------|-------|------|-------|-------|-----|
| KU-BL-3 | MAASGV | EKSSKKKTEK | KLAA   | REEAK | LLAG  | FMGV | MNNMR | RKQ   | 40  |
| Kelch   | QYSNEQ |            |        |       | HTARS | FDA  | MNE   | M     | 153 |
| KLHL3   | KLSSQT | LIQAGDDEKN | QRTITV | NPA   | HMGK  | AFKV | MNE   | ELRSK | 46  |

|         |    |       |         |    |      |     |     |     |     |      |      |     |    |     |
|---------|----|-------|---------|----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|----|-----|
| KU-BL-3 | KT | CDVIL | LMVQERK | LP | AHRV | VLA | AA  | S   | HFF | NL   | MFTT | NML | ES | 80  |
| Kelch   | KQ | CDVIL | LVADDVE | CH | AHRM | VLA | ASC | SPY | EYA | MFTS | -FE  | ES  | ES | 192 |
| KLHL3   | QL | CDVM  | IVAEDVE | LE | AHRV | VLA | AC  | SPY | ECA | MFT  | GDM  | ES  | ES | 86  |

|         |      |          |         |     |      |     |      |     |      |   |    |   |     |   |     |    |   |   |     |
|---------|------|----------|---------|-----|------|-----|------|-----|------|---|----|---|-----|---|-----|----|---|---|-----|
| KU-BL-3 | KSF  | EVELKDAE | PDIEEQ  | L   | VEFA | YTA | RI   | S   | VNSN | N | VO | S | LL  | A | 120 |    |   |   |     |
| Kelch   | RQAR | ITLQSV   | DARALEL | L   | IDYV | YTA | I    | VE  | VNED | N | VO | S | LL  | A | 232 |    |   |   |     |
| KLHL3   | KAKK | IEIKD    | V       | DGQ | TLSK | L   | IDYI | YTA | E    | I | E  | V | TEE | N | VO  | LL | P | A | 126 |

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| KU-BL-3 | A | N | Q | Y | D | I | E | P | V | K | K | M | C | 133 |
| Kelch   | A | N | L | L | D | L | T | D | V | R | D | A | C | 245 |
| KLHL3   | A | S | L | L | D | L | M | D | V | R | Q | N | C | 139 |

B

|             |      |    |       |       |   |   |   |   |   |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|-------------|------|----|-------|-------|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| KU-BL-3(R1) | IAL  | F  | GG    | ----- | S | Q | P | S | C | R | --- | Y | F | N | P | K | D | Y | S | --- | H   | T   | D | I | R | - | C | P | F | E | K | R | R | D | A | A | C | V | F | W | N | 336 |
| KLHL3 (R1)  | VMIV | GG | ----- | Q     | A | P | K | A | I | R | S   | V | E | C | Y | D | F | E | E | D   | R   | --- | D | Q | I | A | - | E | L | P | S | R | C | R | A | G | V | F | M | A | G | 347 |
| Kelch (R1)  | ILLV | GG | QA    | ----- | P | K | A | I | R | S | V   | E | W | Y | D | L | R | E | E | K   | --- | H   | Y | Q | A | E | - | M | P | N | R | C | R | S | G | L | S | V | L | G | D | 450 |

|             |   |   |   |   |    |        |       |   |   |    |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |   |   |   |   |   |   |     |     |
|-------------|---|---|---|---|----|--------|-------|---|---|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| KU-BL-3(R2) | V | Y | I | L | GG | -S-Q-- | L     | F | P | -- | I  | K | R | M | D | C | V | N | V | K | D | S   | --- | H | Y | S | K | L | G | - | P | P | T | P | R | D | S   | --- | L | A | C | A | E | G | 382 |     |
| KLHL3 (R2)  | H | V | Y | A | GG | F      | N-G-- | S | L | R  | -- | V | R | T | V | D | V | D | G | V | K | D   | --- | H | Y | S | I | A | S | - | M | Q | E | R | R | S | T   | --- | G | A | A | V | L | N | D   | 394 |
| Kelch (R2)  | K | V | Y | A | GG | F      | N-G-- | S | L | R  | -- | V | R | T | V | D | V | D | P | A | T | --- | H   | Y | S | I | A | S | - | M | E | A | R | R | S | T | --- | G   | V | A | A | L | N | G | 496 |     |

|             |   |   |   |   |    |    |       |   |   |     |     |   |   |     |     |   |   |     |   |     |     |     |   |   |     |     |   |   |   |   |   |   |   |     |   |   |     |   |     |   |     |   |   |   |     |   |     |     |
|-------------|---|---|---|---|----|----|-------|---|---|-----|-----|---|---|-----|-----|---|---|-----|---|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|---|-----|---|-----|-----|
| KU-BL-3(R3) | K | I | Y | T | S  | GG | SE    | V | G | --- | N   | S | A | --- | L   | Y | F | E   | C | --- | D   | T   | R | E | S   | --- | H | T | K | P | - | S | M | --- | T | Q | R   | C | S   | H | --- | M | V | E | A   | N | G   | 430 |
| KLHL3 (R3)  | L | L | Y | A | GG | F  | D-G-- | S | T | G   | --- | L | S | V   | E   | Y | S | Y   | K | T   | --- | N   | E | W | --- | F   | V | A | - | P | M | N | T | R   | Q | S | --- | M | V   | G | V   | V | E | G | 441 |   |     |     |
| Kelch (R3)  | C | I | Y | A | GG | F  | D-G-- | T | T | G   | --- | L | S | A   | --- | E | M | --- | D | P   | K   | --- | D | I | --- | H   | R | F | I | A | - | S | M | --- | T | R | R   | S | --- | M | V   | G | V | V | H   | G | 543 |     |

|             |   |   |   |   |    |   |       |     |   |   |   |   |     |   |   |     |   |     |     |     |   |     |     |     |     |   |   |     |   |     |   |   |   |   |     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |
|-------------|---|---|---|---|----|---|-------|-----|---|---|---|---|-----|---|---|-----|---|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|---|-----|---|---|---|---|-----|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|
| KU-BL-3(R4) | L | I | V | C | GG | S | L     | --- | G | N | V | S | G   | R | V | --- | N | S   | C   | --- | E | V   | --- | D   | P   | A | T | E   | H | --- | T | E | L | C | -   | P   | M | --- | E | A   | R | --- | K | N   | H | --- | L | V   | F | K   | D | 481 |
| KLHL3 (R4)  | K | L | Y | A | GG | Y | D-G-- | A   | S | R | Q | L | --- | S | T | V   | E | Q   | --- | N   | P | A   | T   | --- | N   | E | W | --- | L | Y   | V | A | - | D | M   | --- | S | T   | R | --- | S | G   | A | --- | G | V   | L | S   | G | 490 |   |     |
| Kelch (R4)  | L | L | Y | A | GG | Y | D-G-- | F   | T | R | Q | L | --- | S | S | V   | E | --- | N   | P   | D | --- | D   | T   | --- | H | V | N   | V | A   | E | - | M | S | --- | S   | R | --- | S | G   | A | --- | G | V   | L | N   | N | 592 |   |     |   |     |

|             |   |   |   |   |    |   |       |   |   |     |   |     |   |   |   |     |   |     |   |     |     |     |     |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |     |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |   |   |   |     |   |   |   |   |     |
|-------------|---|---|---|---|----|---|-------|---|---|-----|---|-----|---|---|---|-----|---|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|-----|---|-----|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|---|---|---|-----|---|---|---|---|-----|
| KU-BL-3(R5) | K | I | F | A | GG | Q | N-G-- | L | Q | G   | L | --- | D | N | V | --- | D | --- | K | L   | --- | N   | --- | K   | M | --- | V | S   | - | P   | M | --- | P | W   | K   | G | V   | T | V | K | C   | A | V | G | S | 528 |   |   |   |     |   |   |   |   |     |
| KLHL3 (R5)  | Q | L | Y | A | GG | H | D-G-- | P | L | V   | R | --- | K | S | V | --- | E | --- | D | --- | P   | G   | T   | --- | N | --- | K | Q   | V | A   | - | D   | M | --- | N   | M | --- | C | R | R | N   | A | G | V | C | A   | V | N | G | 537 |   |   |   |   |     |
| Kelch (R5)  | I | L | Y | A | GG | H | D-G-- | P | M | --- | V | --- | R | R | S | --- | V | --- | E | --- | A   | --- | D   | --- | C | E   | T | --- | N | --- | S | --- | R | S   | --- | V | A   | - | D | M | --- | S | Y | C | R | R   | N | A | G | V   | A | H | D | G | 639 |

|             |   |   |   |   |    |   |       |       |   |   |     |     |   |   |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |     |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |   |   |     |   |     |
|-------------|---|---|---|---|----|---|-------|-------|---|---|-----|-----|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|-----|---|-----|
| KU-BL-3(R6) | I | V | V | L | A  | G | F     | Q-G-- | V | G | R   | --- | G | H | I | L   | --- | E   | --- | N   | --- | T   | --- | E   | --- | D   | --- | K   | --- | V   | --- | A   | N | S   | --- | K   | V | R   | A | F | P | V | T | S | C | L | I | C | V | V | D | 576 |   |   |     |   |     |
| KLHL3 (R6)  | L | L | Y | V | GG | D | D-G-- | S     | C | N | --- | L   | A | S | V | --- | E   | --- | N   | --- | P   | --- | V   | --- | T   | --- | D   | --- | K   | --- | T   | --- | L | --- | L   | --- | P | T   | N | M | S | T | G | R | S | Y | A | G | V | A | V | I   | H | K | 585 |   |     |
| Kelch (R6)  | L | L | Y | V | GG | D | D-G-- | T     | S | N | --- | L   | A | S | V | --- | E   | --- | N   | --- | P   | --- | D   | --- | S   | --- | D   | --- | S   | --- | H   | --- | R | --- | I   | --- | L | --- | P | A | L | M | T | I | G | R | S | Y | A | G | V | C   | M | I | D   | K | 687 |

第6図 KU-BL-3 と kelch および KLHL3 との2つのドメインの比較。

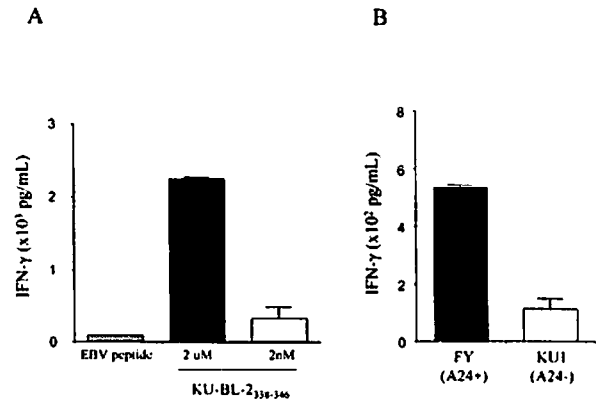
(A) BTB/POZ ドメインの比較. KU-BL-3 では過去に報告された37のコンセンサスシーケンス<sup>20)</sup>のうち35アミノ酸(\*)が一致していた. 一致しない部位は(#)でマークした. (B) Kelch repeat の比較. 完全に一致するアミノ酸は(#)でマークした. 機能的に類似しているアミノ酸は(+)でマークしている.

## 5. KU-BL-2 の構造と機能の検討

KU-BL-2 をコードする最長の cDNA クローンは 3,112-bp の長さの cDNA をコードしており、ノーザンプロットの 3.2-kb のバンドとほぼ一致した。KU-BL-2 をコードするその他の 7 つのクローンの塩基配列と比較し、ORF は 1,758-bp であり 586 個のアミノ酸で構成される蛋白であることがわかった (第 5 図)。Kozak 配列とストップコドンが最初の ATG と推定される部位の 5' 側に存在し ORF の正当性が確認された。DNA データベース上で検討すると KU-BL-2 はヒト胎児脳組織に由来する機能不明の cDNA clone DKFZp564C1616 (AL136597) と一致し、7 番染色体上に存在することがわかった。KU-BL-2 はショウジョウバエの卵子形成時に発現される *kelch* protein<sup>27)</sup> に相同性が高かった。DKFZp564C1616 と比較し 584 番目と 887 番目の塩基が異なっていたが、アミノ酸配列に変化はなかった。相同性のある蛋白をデータベース上で検索すると、KU-BL-2 のアミノ酸配列は機能不明の蛋白 hypothetical protein (CAB66532) とほぼ一致した。KU-BL-2 はヒト *kelch-like* protein 3 (KLHL3 : Q9UH77) と 34%、ショウジョウバエの *kelch* 蛋白<sup>27)</sup> (Q04652) と 33%、*kelch-like* 2 (Mayven : NP\_009177) と 32% の相同性があり、その他の *kelch-like* protein と同相同性を認めた。PROSITE プログラムや Pfam プログラムを用いたアミノ酸配列のモチーフを検討すると、KU-BL-2 は *kelch-like* protein に特徴的に保存されている BTB/POZ ドメインと 6 つの *kelch* repeat という特徴的な配列を有する可能性が示された (第 5 図)。KU-BL-2 のアミノ酸配列上の BTB/POZ ドメインと考えられる部位はアミノ酸で 37 個中 35 個 (94.6%) が過去に報告されたコンセンサスシーケンス<sup>28)</sup> と一致した (第 6A 図)。また KLHL3 と *kelch* 蛋白の 6 つの *kelch* repeat との相同性を (第 6B 図) に示した。これらの結果から、KU-BL-2 は新規の *kelch-like* protein であると考えられた。

## 6. 合成ペプチドを用いた腫瘍反応性 T 細胞の誘導

KU-BL-1 と KU-BL-2 由来の HLA-A24 高親和性ペプチドを合成し、これを用いて 8 人の健康人の PBMC を刺激することによりペプチド特異的に反応する T 細胞の誘導を試みた。4 種類のペプチドを合成した。これらの中で、KU-BL-2 に由来するペプチドである VYILGGSQI でペプチド特異的に反応する T 細胞を 1 例において誘導できた (第 7A 図)。VYILGGSQI で刺激された T 細胞は HLA-A24 と KU-BL-2 を同時に発



第 7 図 HLA-A24 結合 KU-BL-2 ペプチドによる腫瘍反応性 T 細胞の誘導。

HLA-A24 高親和性合成ペプチドを用い、8 人の健康人の末梢血リンパ球から腫瘍反応性 T 細胞を誘導した。1 回目の刺激は樹状細胞を用い、その他の 3 回は放射線照射後の自己末梢血リンパ球を用いて行った。T 細胞による抗原の認識は IFN-γ release assay を用いて評価した。A ; 8 例のドナー中 1 例で KU-BL-2 ペプチド (VYILGGSQI) を特異的に認識する T 細胞が誘導できた。ペプチドで刺激されていない T2-A24 細胞からの IFN-γ の産生をバックグラウンドとして、その IFN-γ 値を差し引いた値を示した。B ; その CTL は HLA-A24 陽性 KU-BL-2 陽性自己膀胱腫瘍細胞株 FY を認識したが、HLA-A24 陰性膀胱癌細胞株 KU1 を認識しなかった。(Ito K et al : Int J Cancer 108 (5) : 712-724, 2004 の Figure 6 を許可を得て転載)

現する膀胱癌細胞株 FY を認識し、HLA-A24 陰性の膀胱癌細胞株 KU1 は認識しなかった (第 7B 図)。その他の 3 つのペプチドでは、腫瘍細胞に強く反応する T 細胞を誘導できなかったが、SYKAGEFFL で刺激することにより、ペプチド特異的に T2-A24 細胞に弱く反応する T 細胞が 1 例で誘導された。

## 考 察

免疫学的な癌の拒絶において患者血清中に産生された抗体の役割は明らかにされていないが、生体内における腫瘍の消退に T 細胞が重要な役割を果たすことが多くのマウス腫瘍モデル<sup>3)</sup> やヒトメラノーマ<sup>1, 2)</sup> において証明されてきた。癌患者において T 細胞の反応をモニターしながら効率の良い細胞免疫治療を確立するためには腫瘍反応性 T 細胞に認識される腫瘍抗原を同定することが必要である。これまで cDNA 発現クローニング法を用い腫瘍反応性 T 細胞により認識されるヒトメラノーマ抗原が数多く単離されてきた<sup>4, 5, 8)</sup>。

MAGE や NY-ESO-1 などの癌精巣抗原が膀胱癌に発現していることが報告されている<sup>17, 18, 19)</sup>が、T細胞に認識される腫瘍抗原が膀胱癌において同定された報告は少なく<sup>18, 20)</sup>、膀胱癌に対する免疫治療を確立するためには膀胱癌抗原をさらに同定する必要がある。Pfreundschuh や Old らのグループは SEREX 法を様々な癌腫に適用し、多くの腫瘍抗原を単離した<sup>10, 11)</sup>。その結果、SEREX 法は血清中の抗体で腫瘍抗原を検出する方法であるが、CD4<sup>+</sup>T細胞認識抗原だけではなく CD8<sup>+</sup>T細胞認識抗原を同定する方法としても有用であることが分かってきた。我々のグループもメラノーマとメラノサイトに高発現される KU-MEL-1 を SEREX 法により同定し報告した<sup>29)</sup>。本研究では SEREX 法を膀胱癌に対して適用し、癌抗原の同定を試みた。

本研究では、36 の既知分子と 12 の未知分子を単離した。HDLBP と新規遺伝子である B3 と B4 が最もイムノスクリーニングで単離された分子であった。HDLBP に対する IgG 抗体は 28 例中 4 例の膀胱癌患者の血清中に存在した。HDLBP は 110-kD の細胞膜関連タンパクであり細胞内のコレステロールを取り除くために HDL に特異的に結合すると報告されている<sup>21)</sup>。しかし癌に関連した報告はなされていない。膀胱癌を有する患者において HDLBP に対する免疫反応がに起こっている場合があり、膀胱癌との関連性を検討する必要がある。

単離された 36 の既知分子の中で 9 分子は過去に何らかの癌との関連性が報告されている。そのうち 2 つ (Golgin-84 および Lbc 癌原遺伝子) は他の遺伝子と組み換えを起こして癌遺伝子を形成する遺伝子であった。しかし FY 細胞株にはこのような遺伝子の変化は検出されなかった。 $\alpha$ -enolase, mitosin, thrombospondin-1, AnnexinVIII などの遺伝子は癌細胞における発現の増加が報告されている。癌細胞において発現が増加している蛋白に対して IgG 抗体が生体内で産生されることは過去の SEREX 法を用いた報告で示唆された<sup>29)</sup>。また  $\alpha$ -enolase が HLA-DRB1\*08032 拘束性に CD4<sup>+</sup>T細胞に認識され、IgG の産生を促進していることが扁平上皮癌を有する患者において最近証明された<sup>30)</sup>。Laminin receptor 1,  $\alpha$ -actinin4, Metalloproteinase-like collagenase (PM5) などは正常細胞にも発現する蛋白であるが、癌の進展や予後との関連性も過去に報告されてきた。このような正常細胞にも存在する蛋白に対して抗体が産生されるのは、癌細胞内でこれらの蛋白が構造の変化を起こし免疫原性が高まった可能性がある。しかし本研究では、それぞれのクローンにコードされた塩基配列に遺伝

的多型以外の変化は認められなかった。

FY 細胞株は MAGE-1, -2, -3 を発現し<sup>20)</sup>、過去の SEREX 法によるメラノーマなどに関する報告でも MAGE ファミリーが単離されているが<sup>10)</sup>、本研究では MAGE ファミリーは単離されなかった。この理由として患者の血清中の MAGE 抗原に対する抗体価が比較的低かったか、HLA タイプなどの遺伝的要因で MAGE 抗原に対する IgG 抗体が産生なかったことが考えられる。

KU-BL-1 は mRNA の発現と血清中の IgG 抗体の存在を検討した結果、膀胱癌に発現し正常膀胱と精巣以外の正常組織に発現を認めない免疫原性のある抗原であると考えられた。KU-BL-1 は過去に報告された LAS と構造が類似しており、ヒト LAS をコードしていると推定された。これまでに報告された LAS と同様に、硫黄を lipoic acid に導入する際に必要である金属結合部位 (iron-sulfur cluster) のモチーフである CXXXCXXC という配列を含んでいた。Lipoic acid は硫黄を含む補酵素である pyruvate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase, branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase, glycine cleavage system などの酵素の作用に不可欠である<sup>31)</sup>。膀胱腫瘍における LAS の役割は今後検討する必要がある。

KU-BL-2 は膀胱癌細胞株、膀胱癌組織、および正常心臓や精巣組織に発現していた。KU-BL-2 に対する IgG 抗体は膀胱癌患者 28 例中 8 例に存在し、健常人の血清中には検出されなかった。KU-BL-2 は *kelch* 蛋白およびその他の *kelch-like protein* と同源性が高かった。*Kelch* はショウジョウバエの卵子形成の時に発現し *ring canal*<sup>27)</sup> という細胞間輸送路に発現する蛋白である。KU-BL-2 は zinc-type の転写因子に認められる BTB/POZ ドメインを持ち、また *kelch-like protein* に特徴的である *kelch repeat* を有していた。*Kelch repeat* は蛋白と蛋白の相互作用をに関連する部位であり、これによってクロマチンの構造を変化させたり、細胞骨格や nuclear matrix protein などを変化させることが報告されている<sup>28)</sup>。*Kelch repeat* は典型的に約 50 のアミノ酸からなる 6 つのリピートからなっており、 $\beta$ -superbarrel 構造<sup>32)</sup>をなしていると予想される。このリピートはアクチンなどの他の蛋白に作用することが報告されている<sup>33)</sup>。この蛋白の膀胱腫瘍における役割も今後検討を要する。

KU-BL-1 と KU-BL-2 は細胞内蛋白と考えられるので、生細胞では抗体はこれらの抗原を認識することはできず、抗体を利用した治療には使用することができない。しか

し T 細胞を介した免疫治療の良いターゲットになりうると考える。本研究ではこの 2 つの分子に由来する 4 種類の HLA-A24 親和性のペプチドを用いて腫瘍反応性 T 細胞を誘導できるかを検討した。KU-BL-2 に由来するペプチドにおいてペプチド特異的 T 細胞が誘導でき、同時に KU-BL-2 を発現する腫瘍細胞株を認識した。また KU-BL-1 に由来するペプチドにおいても、ペプチド特異的に弱く反応する T 細胞が誘導された。この結果から、KU-BL-1 と KU-BL-2 は細胞免疫治療に応用しうる膀胱癌抗原である可能性が示された。今後はその他のペプチドにおいて CTL を誘導できるか、膀胱腫瘍の患者の PBMC から CTL が誘導できるか、特に KU-BL-1 や KU-BL-2 に対する IgG 抗体が血清中に存在する患者において CTL が誘導できるかをさらに検討していく必要がある。

細胞免疫治療を行うときに、KU-BL-1 や KU-BL-2 が精巢に発現していることは大きな問題とは思わないと思われる。つまり精粗細胞や精母細胞などは MHC class I を発現していないため T 細胞に認識されない。また KU-BL-2 は正常心臓に、KU-BL-1 は正常膀胱に比較的強く発現していたが、免疫治療に使用する抗原として除外する必要はないと思われる。もし KU-BL-2 のエピトープの密度が心筋細胞に低ければ、自己免疫反応は起こらないであろうし、KU-BL-1 が正常膀胱粘膜に発現しているも膀胱切除症例では免疫治療の妨げとはならない。

SEREX 法で同定された抗原の免疫細胞治療における意味は、最近マウスの腫瘍モデルにおいて検討された<sup>30)</sup>。その報告では、SEREX 法で同定された抗原は有用なヘルパー CD4<sup>+</sup> T 細胞の抗原になりうるということが証明され、抗原性のあるペプチドで同時に CD8<sup>+</sup> T 細胞を刺激することにより、強い抗腫瘍効果を認めることが示された。この所見から KU-BL-1 や KU-BL-2 も細胞免疫治療の際に免疫反応を誘導できる可能性がある。この 2 つの分子は膀胱腫瘍に比較的高頻度に発現し、限られた正常組織のみに発現を認め、膀胱腫瘍の患者で IgG 抗体が産生されていた。さらに KU-BL-2 に由来する一つのペプチドにおいて腫瘍反応性 T 細胞を誘導できた。これらの抗原は膀胱癌の診断に応用しうる腫瘍マーカーや、膀胱癌患者に対する免疫細胞治療におけるターゲットになりうる抗原であると考えられた。

## 総 括

膀胱癌抗原の同定するために SEREX 法を用いた。細胞異型度の高い膀胱癌の転移巣から樹立した FY 細胞

株から cDNA ライブラリーを作成した。このライブラリーを同一人の血清でスクリーニングした。

1. 48 種類の抗原が単離され、36 種類の既知分子と 12 種類の未知分子であった。
2. 健常人および癌患者血清中の抗体の存在や組織特異的な発現パターンの検討を行った結果、KU-BL-1 と KU-BL-2 が免疫原性が高く、癌組織に高発現している有力な膀胱癌抗原候補と考えられた。
3. KU-BL-1 は特徴的な CXXXXCXXC というモチーフを有し、lipoic acid synthetase の一つと考えられた。KU-BL-1 は検討した多くの膀胱癌細胞株や膀胱癌組織に発現し、正常組織においては膀胱粘膜や精巢に発現していた。KU-BL-1 に対する IgG 抗体は膀胱癌患者血清中 28 例中 2 例に認められたが、健常人 30 人では認められなかった。
4. KU-BL-2 はショウジョウバエの *kelch* 蛋白に相同性があり *kelch-like protein* の一つと推定された。特徴的な BTB/POZ ドメインや *kelch repeat* を認めた。KU-BL-2 は検討した多くの膀胱癌細胞株や膀胱癌組織に発現し、正常組織においては精巢や心臓に発現していた。KU-BL-2 に対する IgG 抗体は膀胱癌患者血清中 28 例 8 例に認められたが、健常人 16 人では認められなかった。
5. KU-BL-1 と KU-BL-2 のアミノ酸配列に由来する HLA-A24 高親和性ペプチドを用いて、健常人由来の末梢血リンパ球から腫瘍反応性 T 細胞の誘導を試みた。KU-BL-2 のペプチドである VYILGGSQI において 8 例中 1 例で腫瘍反応性の T 細胞を誘導することができた。

以上の結果から KU-BL-1 と KU-BL-2 は膀胱癌に高発現する免疫原性のある分子であり、膀胱癌の診断や免疫細胞治療に応用しうる抗原であると考えられた。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲および激励を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室村井勝教授に深甚なる謝意を表します。また終始懇切に多大なる直接のご指導、ご校閲をいただきました慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報部門河上裕教授に心から感謝致します。さらに多大なご協力をいただきました先端医科学研究所細胞情報部門と慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室の諸先生方に感謝致します。

また本研究の一部は、科学研究費補助金基盤研究 (S)、厚生労働省がん研究助成金、厚生労働科学研究費補助金 (がん克服戦略研究事業)、車両競技公益資金記念財団助成、日本私立学校振興・共済事業団 (学術研究振興資金)、

慶應義塾大学大型研究助成, 慶應義塾大学医学部研究奨励費によった。

文 献

- 1) Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4 : 321-327, 1998
- 2) Kawakami Y, Robbins PF, Wang RF, Rosenberg SA. Identification of tumor-regression antigens in melanoma. *Important Adv Oncol* 3-21, 1992
- 3) Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter-receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71 : 1093-1102, 1992
- 4) Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E, Rosenberg SA. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression. *J Immunol* 154 : 3961-3968, 1995
- 5) Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 3515-3519, 1994
- 6) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon TA. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 : 1643-1647, 1991
- 7) Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, Rosenberg SA. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183 : 1185-1192, 1996
- 8) Kawakami Y, Wang X, Shofuda T, Sumimoto H, Tupesis J, Fitzgerald E, Rosenberg S. Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor-infiltrating T lymphocytes. *J Immunol* 166 : 2871-2877, 2001
- 9) Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411 : 380-384, 2001
- 10) Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 11810-11813, 1995
- 11) Jager E, Gnjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity : CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 12198-12203, 2000
- 12) Millikan R, Dinney C, Swanson D, Sweeney P, Ro JY, Smith TL, Williams D, Logothetis C. Integrated therapy for locally advanced bladder cancer : final report of a randomized trial of cystectomy plus adjuvant M-VAC versus cystectomy with both pre-operative and postoperative M-VAC. *J Clin Oncol* 19 : 4005-4013, 2001
- 13) Catalona WJ, Ratliff TL. Bacillus Calmette-Guerin and superficial bladder cancer. Clinical experience and mechanism of action. *Surg Annu* 22 : 363-378, 1990
- 14) Bohle A, Gerdes J, Ulmer AJ, Hofstetter AG, Flad, H. D. Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J Urol* 144 : 53-58, 1990
- 15) Stefanini GF, Bercovich E, Mazzeo V, Grigioni WF, Emili E, D'Errico A, Lo Cigno M, Tamagnini N, Mazzetti M. Class I and class II HLA antigen expression by transitional cell carcinoma of the bladder : correlation with T-cell infiltration and BCG treatment. *J Urol* 141 : 1449-1453, 1989
- 16) De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Aarden LA, Tetteroo E, De Groot ER, Van der Meijden AP, Vegt PD, Debruyne FM, Ruitenberg EJ. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 34 : 306-312, 1992
- 17) Patard JJ, Bresseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, Francois P, Abi-Aad A, Van Cangh, P, Abbou CC, Chopin D. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer* 64 : 60-64, 1995
- 18) Heidecker L, Bresseur F, Probst-Kepper M, Gueguen M, Boon, T, Van den Eynde BJ. Cytolytic T lymphocytes raised against a human bladder carcinoma recognize an antigen encoded by gene MAGE-A12. *J Immunol* 164 : 6041-6045, 2000
- 19) Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Tsushima T, Kumon H, Old LJ, Nakayama E. NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma : correlation with tumor grade. *Cancer Res* 61 : 4671-4674, 2001
- 20) Nishiyama T, Tachibana M, Horiguchi Y, Nakamura



- K. Ikeda Y, Takesako K, Murai M. Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. *Clin Cancer Res* 7 : 23-31, 2001
- 21) Gueguen M, Patard JJ, Gaugler B, Brasseur F, Renaud JC, Van Cangh PJ, Boon T, Van den Eynde BJ. An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *J Immunol* 160 : 6188-6194, 1998
- 22) Ito K, Fujita T, Akada M, Kiniwa Y, Tsukamoto M, Yamamoto A, Matsuzaki Y, Matsushita M, Asano T, Nakashima J, Tachibana M, Hayakawa M, Ikeda H, Murai M, Kawakami Y. Identification of bladder cancer antigens recognized by IgG antibodies of a patient with metastatic bladder cancer. *Int J Cancer* 108 (5) : 712-724, 2004
- 23) Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 179 : 1109-1118, 1994
- 24) McKnight GL, Reasoner J, Gilbert T, Sundquist KO, Hokland B, McKernan PA, Champagne J, Johnson CJ, Bailey MC, Holly R. Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein-binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells. *J Biol Chem* 267 : 12131-12141, 1992
- 25) Sulo P, Martin NC. Isolation and characterization of LIP5. A lipoate biosynthetic locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268 : 17634-17639, 1993
- 26) Tate R, Riccio A, Iaccarino M, Patriarca EJ. Cloning and transcriptional analysis of the lipA (lipoic acid synthetase) gene from *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol Lett* 149 : 165-172, 1997
- 27) Xue F, Cooley L. kelch encodes a component of inter-cellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell* 72 : 681-693, 1993
- 28) Bardwell VJ, Treisman R. The POZ domain : a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* 8 : 1664-1677, 1994
- 29) Kiniwa Y, Fujita T, Akada M, Ito K, Shofuda T, Suzuki Y, Yamamoto A, Saida T, Kawakami Y. Tumor antigens isolated from a patient with vitiligo and T-cell-infiltrated melanoma. *Cancer Res* 61 : 7900-7907, 2001
- 30) Kondo H, Sahara H, Miyazaki A, Nabeta Y, Hirohashi Y, Kanaseki T, Yamaguchi A, Yamada N, Hirayama K, Suzuki M, Hamuro J, Torigoe T, Takahashi N, Kohama G, Ikeda H, Sato N. Natural Antigenic Peptides from Squamous Cell Carcinoma Recognized by Autologous HLA-DR8-restricted CD4+ T Cells. *Jpn. J. Cancer Res* 93 : 917-24, 2002
- 31) Morikawa T, Yasuno R, Wada H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria. *FEBS Lett* 498 : 16-21, 2001
- 32) Bork P, Doolittle RF. *Drosophila* kelch motif is derived from a common enzyme fold. *J Mol Biol* 236 : 1277-1282, 1994
- 33) Tilney LG, Tilney MS, Guild GM. Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing *Drosophila* follicles. *J Cell Biol* 133 : 61-74, 1996
- 34) Nishikawa H, Tanida K, Ikeda H, Sakakura M, Miyahara Y, Aota T, Mukai K, Watanabe M, Kuribayashi K, Old LJ, Shiku H. Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 14571-14576, 2001

慶應医学 第81卷第4号号外  
平成16年12月25日

# 博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第174号

慶應義塾大学

論文の内容および審査要旨公表

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

慶應義塾大学

| 学位授与年月日<br>学位記号            | 氏名      | 生年月日        |
|----------------------------|---------|-------------|
| 平成16年 9月13日<br>慶大博士甲第2307号 | 三 上 裕 嗣 | 昭和44年 7月16日 |
| 平成16年10月18日<br>慶大博士甲第2311号 | 川 澄 正 興 | 昭和49年10月20日 |
| 平成16年11月 8日<br>慶大博士甲第2312号 | 水 野 隆 一 | 昭和47年 3月 3日 |

論文の内容および審査要旨公表

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

慶應義塾大学

| 学位授与年月日<br>学位記号            | 氏名        | 生年月日        |
|----------------------------|-----------|-------------|
| 平成16年 9月13日<br>慶大博士乙第3820号 | 赤 路 和 則   | 昭和43年 3月22日 |
| 同 同 第3821号                 | 伊 藤 敬 一   | 昭和42年 3月15日 |
| 同 同 第3822号                 | 井 上 芳 正   | 昭和46年 5月23日 |
| 同 同 第3823号                 | 植 田 良     | 昭和47年 8月23日 |
| 同 同 第3824号                 | 岡 部 輝 雄   | 昭和39年 6月19日 |
| 同 同 第3825号                 | 小 川 登 志 子 | 昭和45年 9月 9日 |
| 同 同 第3826号                 | 荻 野 剛 志   | 昭和44年 3月10日 |
| 同 同 第3827号                 | 柏 木 政 憲   | 昭和40年11月30日 |
| 同 同 第3828号                 | 金 子 文 彦   | 昭和42年 1月18日 |
| 同 同 第3829号                 | 菊 地 栄 次   | 昭和44年 7月18日 |

| 学位授与年月日<br>学位記号            | 氏名     | 生年月日        |
|----------------------------|--------|-------------|
| 平成16年9月13日<br>慶大博士乙第3830号  | 北郷 実   | 昭和43年9月25日  |
| 同 同 第3831号                 | 木村 裕之  | 昭和38年7月29日  |
| 同 同 第3832号                 | 小谷 真理子 | 昭和42年9月21日  |
| 同 同 第3833号                 | 小林 央   | 昭和45年4月16日  |
| 同 同 第3834号                 | 下山 勝   | 昭和38年12月23日 |
| 同 同 第3835号                 | 杉山 一郎  | 昭和45年7月2日   |
| 同 同 第3836号                 | 鈴木 天之  | 昭和44年6月15日  |
| 同 同 第3837号                 | 武田 篤也  | 昭和41年9月22日  |
| 同 同 第3838号                 | 田中 雄大  | 昭和47年7月14日  |
| 同 同 第3839号                 | 力石 昭宏  | 昭和44年10月21日 |
| 同 同 第3840号                 | 都丸 哲也  | 昭和39年9月6日   |
| 同 同 第3841号                 | 中村 真理  | 昭和45年9月4日   |
| 同 同 第3842号                 | 林田 朋子  | 昭和38年10月4日  |
| 同 同 第3843号                 | 細江 直樹  | 昭和46年7月1日   |
| 同 同 第3844号                 | 堀川 治   | 昭和36年9月12日  |
| 同 同 第3845号                 | 堀口 明男  | 昭和45年1月9日   |
| 同 同 第3846号                 | 峰松 直人  | 昭和46年2月4日   |
| 同 同 第3847号                 | 山下 拓   | 昭和45年1月28日  |
| 平成16年10月18日<br>慶大博士乙第3850号 | 大泉 太郎  | 昭和41年5月5日   |
| 同 同 第3851号                 | 栗田 康生  | 昭和44年5月6日   |
| 平成16年11月8日<br>慶大博士乙第3852号  | 石井 誠   | 昭和45年8月25日  |

| 学位授与年月日<br>学位記号           | 氏名    | 生年月日        |
|---------------------------|-------|-------------|
| 平成16年11月8日<br>慶大博士乙第3853号 | 入江聖子  | 昭和47年12月25日 |
| 同<br>第3854号               | 岡博史   | 昭和46年4月1日   |
| 同<br>第3855号               | 酒井のぞみ | 昭和43年4月26日  |
| 同<br>第3856号               | 中野雅   | 昭和42年11月3日  |

## 目 次

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 三上 裕詞 | 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.<br>(脊髄損傷マウスへの樹状細胞移植による神経幹細胞の活性化および神経機能回復) ..... 7     | 7  |
| 川澄 正興 | Targeted introduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abnormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice.<br>(アミロイド前駆体蛋白質にV642I変異を導入したノックインマウスはアルツハイマー病の初期段階を反映した機能的異常を示す) ..... 8 | 8  |
| 水野 隆一 | INHIBITION OF THE MKP-1 EXPRESSION POTENTIATES JNK RELATED APOPTOSIS IN RENAL CANCER CELLS.<br>(腎癌細胞株におけるMKP-1阻害によるJNK関連アポトーシスの誘導) ..... 9   | 9  |
| 赤路 和則 | Effect of intra-ischemic hypothermia on the expression of c-Fos and c-Jun, and DNA binding activity of AP-1 after focal cerebral ischemia in rat brain.<br>(ラット局所脳虚血モデルを用いた虚血中低脳温におけるc-Fos、c-Jun発現とAP-1 DNA結合能の検討) ..... 10                  | 10 |
| 伊藤 敬一 | 膀胱癌患者血清中のIgG抗体が認識する新しい膀胱癌抗原の同定 ..... 11  | 11 |
| 井上 芳正 | The modifier subunit of glutamate cysteine ligase (GCLM) is a molecular target for amelioration of cisplatin resistance in lung cancer.<br>(グルタメートシステインライゲースのモディファイアーサブユニットは肺癌におけるシスプラチン耐性の克服に有用な分子標的である。) ..... 12                          | 12 |
| 植田 良  | Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera.<br>(神経膠腫患者の血清抗体に認識される転写調節因子SOX6の同定と発現解析) ..... 13  | 13 |
| 岡部 輝雄 | Usefulness of Residual Percent Plaque Area After Percutaneous Coronary Intervention in Predicting Persistent Positive Remodeling.<br>(ステント留置冠動脈の遠隔期ポジティブリモデリング現象の予知；術後残存粥腫面積率との関連) ..... 14  | 14 |
| 小川登志子 | Chronic allergy to dietary ovalbumin induces lymphocyte migration to rat small intestinal mucosa that is inhibited by MAdCAM-1.<br>(OVAによる慢性食餌アレルギーラットの小腸粘膜におけるTリンパ球マイグレーションおよびMAdCAM-1の関与について) ..... 15                                     | 15 |
| 荻野 剛志 | Senescence-associated decline of lymphocyte migration in gut-associated lymphoid tissues of rat small intestine.<br>(腸管リンパ装置 (GALT) における加齢に伴うリンパ球マイグレーションの変化について) ..... 16   | 16 |
| 柏木 政憲 | A Neuronal Mechanism of Propofol-Induced Central Respiratory Depression in Newborn Rats.<br>(プロポフォールにより惹起される新生ラットの中枢性呼吸抑制のニューロンレベルにおける機序) ..... 17   | 17 |

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| 金子 文彦          | Down-regulation of matrix-invasive potential of human liver cancer cells by type I interferon and a histone deacetylase inhibitor sodium butyrate.<br>(I型インターフェロン及び酪酸によるヒト肝細胞癌株に対する細胞外基質浸潤抑制効果) .....                          | 18 |
| 菊地 栄次<br>北郷 実  | ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規NF- $\kappa$ B活性阻害剤の抗腫瘍効果 .....   | 19 |
|                | COMPARISON OF K-RAS POINT MUTATION DISTRIBUTIONS IN INTRADUCTAL PAPILLARY-MUCINOUS TUMORS AND DUCTAL ADENOCARCINOMA OF THE PANCREAS<br>(K-ras点突然変異分布からみた膵管内乳頭腫瘍及び通常型膵管癌の特徴) .....  | 20 |
| 木村 裕之          | 潰瘍性大腸炎およびCrohn病におけるNitric Oxide産生と大腸粘膜のNitric Oxide Synthase活性の増加 .....  | 21 |
| 小谷真理子          | Neutrophil depletion attenuates interleukin-8 production in mild-overstretch ventilated normal rabbit lung.<br>(健常肺での器械的肺過伸展時の気道IL-8産生における好中球の役割) .....  | 22 |
| 小林 央           | In situ demonstration of dendritic cell migration from rat intestine to mesenteric lymph nodes : relationships to maturation and role of chemokines.<br>(ラット生体内における樹状細胞の腸管より腸間膜リンパ節への移行に関する解析 : 樹状細胞成熟度とケモカインの影響についての検討) ..... | 23 |
| 下山 勝<br>杉山 一郎  | 網膜におけるNO、CO生成系を介した可溶性グアニル酸シクラーゼの調節 .....   | 24 |
|                | Ultrastructural Analysis of the Paranodal Junction of Myelinated Fibers in 31-Month-Old-Rats.<br>(31ヶ月齢ラットでの髄鞘化神経線維のパラノードジャンクションにおける超微細構造の分析) .....  | 25 |
| 鈴木 天之<br>武田 篤也 | 低酸素イメージング薬剤を用いた核医学的手法による放射線治療効果の予測 .....   | 26 |
|                | EVALUATION OF NOVEL MODIFIED TANGENTIAL IRRADIATION TECHNIQUE FOR BREAST CANCER PATIENTS USING DOSE-VOLUME HISTOGRAMS.<br>(DVH解析を用いた腋窩リンパ節領域を含む接線照射法の評価) .....   | 27 |
| 田中 雄大          | Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte.<br>(単一卵子の直接RT-nested PCR法によって解析されたヒト卵子特異的ヒストンH1遺伝子の構造と発現) .....                                   | 28 |
| 力石 昭宏<br>都丸 哲也 | 抗アレルギー薬トラニラストの糸球体腎炎の進行抑制効果に関する研究 .....   | 29 |
| 中村 真理          | 皮膚電気刺激および経頭蓋磁気刺激による大脳運動野の興奮性に関する研究 .....   | 30 |
|                | Glucocorticoid regulation of proteoglycan synthesis in mesangial cells.<br>(糖質コルチコイドによるメサンギウム細胞のプロテオグリカン産生の調節) .....   | 31 |
| 林田 朋子          | Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF- $\beta$ -dependent responses in human mesangial cells.<br>(メサンギウム細胞の、TGF- $\beta$ 刺激反応における、ERK MAPkinase及びSmadシグナルの交互作用) .....                     | 32 |
| 細江 直樹          | Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa.<br>(炎症時および非炎症時の腸管粘膜におけるTリンパ球と血管内皮との相互作用におけるTECK/CCL25の役割) .....                            | 33 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 堀川 治  | Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment : study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes<br>(ヒト関節軟骨由来chondronおよび培養軟骨細胞を用いた軟骨細胞周囲環境におけるVI型コラーゲンの分布について) ..... | 34 |
| 堀口 明男 | Interleukin-6に誘導される腎細胞癌の増殖における活性化型STAT3の役割.....   | 35 |
| 峰松 直人 | Association of <i>CYP2A6</i> deletion polymorphism with smoking habit and development of pulmonary emphysema.<br>(ニコチン代謝酵素 <i>CYP2A6</i> 欠失型遺伝子多型の喫煙習慣および肺気腫発症への関与) .....   | 36 |
| 山下 拓  | マウス舌癌同所移植モデルを用いたMMP阻害剤ONO-4817の頸部リンパ節転移抑制効果 .....   | 37 |
| 大泉 太郎 | Angiographic manifestations and operative findings with 70 cases of hemifacial spasm : relation of common trunk anomalies.<br>(顔面痙攣70症例の脳血管造影所見と術中所見：特に共通幹の関与について) .....  | 38 |
| 栗田 康生 | Daily oral verapamil before but not after rapid atrial excitation prevents electrical remodeling.<br>(高頻度心房刺激開始前からのベラパミル投与は電気的リモデリングの進行を抑制できるが高頻度心房刺激開始後からのベラパミル投与では電気的リモデリングの進行を阻止できない) .....  | 39 |
| 石井 誠  | Inhibition of c-Jun NH <sub>2</sub> -Terminal Kinase Activity Improves Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Lungs.<br>(c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinaseの抑制はラット肺の虚血再灌流傷害を改善する) .....   | 40 |
| 入江 聖子 | 2型糖尿病の腎症進展・増悪に関する遺伝学的研究<br>-NADPHオキシダーゼ遺伝子およびRAGE遺伝子多型の関与-.....   | 41 |
| 岡 博史  | Linear discriminant analysis of dermoscopic parameters for the differentiation of early melanomas from Clark naevi.<br>(ダーモスコピー画像上のパラメータを抽出し、早期悪性黒色腫をクラーク母斑と鑑別するための線型判別分析) .....  | 42 |
| 酒井のぞみ | Involvement of Histone Acetylation in Ovarian Steroid-induced Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells.<br>(卵巣性ステロイドホルモンにより誘導されるヒト子宮内膜間質細胞脱落膜化におけるヒストンアセチル化の役割に関する研究) .....   | 43 |
| 中野 雅  | Suppression of Colorectal Cancer Growth Using an Adenovirus Vector Expressing an Antisense <i>K-ras</i> RNA.<br>(アンチセンス <i>K-ras</i> RNA発現アデノウイルスベクターによる大腸がんの増殖抑制) .....  | 44 |



# 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.

(脊髄損傷マウスへの樹状細胞移植による神経幹細胞の活性化および神経機能回復)

三 上 裕 嗣

## 内容の要旨

成熟哺乳類の中脳神経系には神経幹細胞が存在するにもかかわらず、その自己修復能力は特に脊髄において非常に乏しい。成熟哺乳類の脳においては、神経幹細胞から神経新生が起こり機能回復に寄与することが報告されているが、損傷脊髄においてはその類の報告はまだない。成熟哺乳類の損傷脊髄由来の神経幹細胞は、神経新生の起きている場として知られている歯状回に移植されるとニューロンに分化するが、損傷脊髄に移植されるとそれが起こらない。また、成熟哺乳類の脊髄が損傷されると、その場の神経幹細胞は反応性に増殖しそのほとんどがニューロンではなくアストロサイトへ分化するということから、損傷脊髄で神経新生が起こらないのは内在性の神経幹細胞の性質の違いにあるのではなく、ニューロンへの分化に何らかの阻害的な微小環境が存在している可能性が示唆される。一方で最近では、中枢神経系が免疫系から隔離された環境にあることに着目し、T細胞やマクロファージを損傷前後に誘導、もしくは移植することで機能回復が得られたとの報告もなされているが、その機序については不明な点が多い。そこで今回われわれは、免疫系細胞が神経幹細胞に対して何らかの作用をもたらさう可能性を仮定し、共培養を行ったところ、樹状細胞が神経幹細胞を著しく増殖させることがわかった。さらに樹状細胞には神経軸索の再生作用が報告されている神経栄養因子、NT-3を分泌することも明らかになった。実際に樹状細胞を脊髄損傷マウスに移植すると、対照群でも一部の内在性神経幹細胞は活性化し増殖したが、その変化は樹状細胞移植群で有意に増強することがわかった。また損傷後14日の樹状細胞移植群でのみ、損傷周囲部にHu(+)BrdU(+)もしくはNeuN(+)BrdU(+)二重陽性ニューロンが観察された。とくに前者ではアポトーシスについて否定的な結果であり、適切な環境が導入されれば成熟哺乳類の損傷脊髄においてもニューロンが新生することをわれわれは初めて示した。さらに樹状細胞移植群でのみ皮質脊髄路の神経軸索が再生していたが、実際の樹状細胞移植損傷脊髄中に対照群より多く含まれていたNT-3や内在性マイクログリアの活性化が寄与した可能性がある。これまでの実験結果をもとに運動機能解析を行ったところ、樹状細胞移植群ではマウスの種に関係なく対照群に対して有意な機能回復が認められた。今回の研究においてわれわれは、中枢神経系の再生に関わる樹状細胞の新しい機能—内在性神経幹細胞の増殖誘導とこれまでnon-neurogenicな環境と考えられていた損傷脊髄でのニューロンの新生—を見いだすとともに、成熟哺乳類の損傷脊髄への樹状細胞移植により、神経軸索の再生と機能回復をもたらされることを示した。このことは、損傷された中枢神経系の再生に向けた新規の治療法の開発につながると思われる。

## 論文審査の要旨

成熟哺乳類の中脳神経系には神経幹細胞が存在するにもかかわらず、その自己修復能力は特に脊髄において非常に乏しい。損傷脊髄で神経新生が起こらないのは内在性の神経幹細胞の性質の違いにあるのではなく、ニューロンへの分化に何らかの阻害的な微小環境が存在している可能性が示唆されている。一方で最近では、中枢神経系が免疫系から隔離された環境にあることに着目し、T細胞やマクロファージを損傷前後に誘導、もしくは移植することで機能回復が得られたとの報告もなされているが、その機序については不明な点が多い。そこで本研究では、免疫系細胞が神経幹細胞に対して何らかの作用をもたらさう可能性を仮定し、共培養を行ったところ、樹状細胞が神経幹細胞を著しく増殖させることがわかった。また樹状細胞には神経栄養因子、NT-3を分泌することも明らかになった。実際に樹状細胞を脊髄損傷マウスの損傷部に損傷直後に移植すると、損傷後7日では内在性神経幹細胞は対照群に比べ有意に活性化、増殖していた。また、樹状細胞移植群でのみ損傷後14日で損傷周囲に新生ニューロンが観察され、損傷後4ヶ月では切断した皮質脊髄路の神経軸索が再生していた。運動機能解析ではマウスの種に関係なく、樹状細胞移植群では対照群に比べ有意な機能回復が認められた。

審査では、まず樹状細胞との共培養で神経幹細胞が増殖したことについて、樹状細胞の培養上清だけではその増殖活性が1/10であったことにより、やはりvivoにおいても細胞の移植は必要なのか、液性因子だけではだめなのかと質問がなされた。これについて、神経幹細胞は非常に限られた条件でしか培養できず、その条件では培養上清中の液性因子の活性が低下してしまった可能性があるとし、vivoで液性因子が有効に寄与している可能性は充分であると回答された。次に皮質脊髄路の再生が灰白質でみられた理由について質問され、最近の研究により白質には軸索伸展阻害因子タンパクが局在していることが知られており、それが影響している可能性はあると回答された。また、外傷を受けた脊髄の血行動態について、樹状細胞移植群では毛細血管の増生などの所見は認められたかと質問され、残念ながら現時点では未検討であるが注目すべき点であり、今後の検討課題であると回答された。樹状細胞の移植時期についても質問され、脊髄損傷時にみられる、神経再生に阻害的な微小環境を、損傷早期から変えるため受傷直後に移植したと回答された。マウス用に独自に開発した運動機能解析法のラットへの応用の可能性についても質問され、ラットには後肢による起立以外に頸部の持ち上げによる運動があり、対応は可能だが若干難しい点があると回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているものの、樹状細胞を用いて損傷脊髄再生への新たな道を切り拓いた点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭  
解剖学 仲嶋 一範 外科学 河瀬 斌  
内科学 鈴木 則宏

学力確認担当者:

審査委員長: 仲嶋 一範

試問日: 平成16年 6月30日

# Targeted introduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abnormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice.

(アミロイド前駆体蛋白質にV642I変異を導入したノックインマウスはアルツハイマー病の初期段階を反映した機能的異常を示す)

川 澄 正 興

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

アルツハイマー病(ア病)は、高齢者に見られる進行性痴呆の最も一般的な原因である。大多数のア病は孤発性であるが、その発症原因については説明が進んでいない。一方、常染色体優性遺伝のア病事例も報告され、アミロイド前駆体タンパク質(APP)が家族性ア病の原因遺伝子の一つとして同定された。APPは、ア病患者の脳に見られる老人斑の主要成分である $A\beta$ の前駆体である。家族性ア病の遺伝子変異の影響を生体内で検討するため、これまで多くのトランスジェニックマウスが作製されてきた。これらの先行するマウスモデルでは老人斑の形成や行動異常が見られたが、神経細胞死や神経原線維変化はAPPに関連したモデルでは再現されなかった。また、これらはAPPを過剰に発現しており、ヒトでの家族性ア病の遺伝子変異を正確には再現していない。

そこで本研究では、ヒトの家族性ア病患者で見られる遺伝子変異を初めて忠実に再現したモデルとして、家族性ア病の遺伝子変異であるV642I変異APPを内因性プロモーターのもとで生理的に発現させたノックインマウスを作製した。ヒトの家族性ア病患者と同様に、変異した対立遺伝子をつだけ有するヘテロ型のこのマウスを29ヶ月齢まで用い、行動学的、病理学的、生化学的解析を行った。

行動学的解析として、open-field test、高架式十字迷路、水探索試験を行った。水探索試験は、実験装置内に据え付けられた給水瓶の在り処を覚えさせ、翌日にそれを覚えているかを調べる行動試験である。このうち、open-field testと高架式十字迷路では異常は認められず、運動パターンや活動性、感情の変化についての異常はなかった。水探索試験においては、高齢のヘテロ型のV642I変異APPノックインマウスに異常が認められ、給水瓶にたどり着くまでに野生型のマウスに比べて時間がかかった。このような学習障害が認められるものの、短期記憶には異常はなかった。

また、ア病での特徴的な病理所見である老人斑の形成、神経原線維変化、神経細胞の脱落の有無を検索したが、高齢ノックインマウスにおいてもこれらの病理像は見られなかった。

さらに我々は、生化学的解析により脳内の $A\beta_{42}$ (43)と $A\beta_{40}$ の量をELISA法により測定した。 $A\beta$ はア病での特徴的な病理所見である老人斑の主要成分であり、 $A\beta_{42}$ (43)は毒性が高い $A\beta$ とされている。高齢のヘテロ型ノックインマウスでは $A\beta_{42}$ (43)と $A\beta_{40}$ の比が有意に上昇し、 $A\beta_{42}$ (43)が相対的に多くなることが明らかとなった。

以上のように、ヒトの家族性ア病を遺伝子レベルで忠実に再現したV642I変異APPノックインマウスを作製し、器質的異常ではなく、機能的異常を示すことを報告した。これはア病の発症初期段階を反映している可能性があり、ア病の発症機序を解明するための動物モデルとして有用であると考えられた。

既存のアルツハイマー病(ア病)動物モデルには、ヒトでの発症原因を正確に反映したモデルはなかった。そこで本研究では、家族性ア病の遺伝子変異を忠実に再現したV642I-APPノックインマウスを作製した。ヘテロ型の雌では生後125週までに生存率が低下した。潜在的学習行動を調べる水探索試験において、27ヶ月齢のヘテロ型は学習能力の低下を示した。短期記憶を示すY字型迷路ではヘテロ型と野生型の差異は認められなかった。長期記憶を調べる放射状8方向迷路ではヘテロ型で学習の遅延が認められた。29ヶ月齢の脳にはア病に関連した病理学的変化は認められなかったが、ヘテロ型で脳内の $A\beta_{42}$ (43)/ $A\beta_{40}$ 比が上昇した。高齢のノックインマウスは器質的異常ではなく機能的異常を示すことから、ア病の発症初期段階を反映していることが示唆された。

審査ではまず、イントロン17に残存するloxP配列の影響について質問がなされた。それに対して、loxPを含み、変異のないマウスも作製したが、本研究で対照として用いたloxPも変異も含まないマウスと差は認められなかったと回答された。野生型とヘテロ型の脳でのAPP総転写量には変化がないものの、残存するloxP配列がスプライシングパターンに影響を与える可能性があり、全長に渡ってAPP転写量を解析すべきであると助言された。マウスのgenetic backgroundについて質問され、本研究ではTT2系統由来の同腹のF1マウスを用いているが、その後C57BL/6系統への戻し交配を進めており、行動実験で同様の結果が得られていると報告された。また、ホモ型はやや出生率の低下が見られるものの生存可能であり、予備的検討ではヘテロ型と同様の経過をたどっていると報告された。

次に、このマウスが形態的变化を生じることなく機能異常のみを示す原因について質問され、可溶性 $A\beta$ の影響が考えられると回答された。また、以前のin vitroでの検討で、V642I変異が誘導する神経細胞死を抑制する神経防御因子の存在が明らかになっており、今後その因子の挙動をin vivoで検討する必要があると回答された。

ヘテロ型マウスにおいて、野生型と変異型の対立遺伝子から生じるAPPの転写量や発現量に差はないのかとの質問がなされた。ヘテロ型のゲノムDNAの塩基配列データから野生型と変異型の対立遺伝子は1:1に存在すること、APPの総転写量と総発現量には野生型とヘテロ型で差がないことから、間接的証拠ながら野生型と変異型のAPPは同程度に発現していることが示唆されると回答された。

雌で生存率が低下した原因について質問され、エストロゲンの欠乏が影響している可能性があるかと回答されたが、生存率が低下する時期におけるエストロゲンや $A\beta_{42}$ (43)の濃度を測定し、両者の関係について見解を深めるべきであると助言された。

V642I-APPの生体内での役割について質問され、この変異が $A\beta$ の切断部位に影響し、 $A\beta_{42}$ (43)/ $A\beta_{40}$ 比を変えることで行動異常を引き起こしている可能性があるかと回答された。最後に知能の発育遅滞と痴呆は明確に区別されるべきであり、本研究におけるマウスは若齢期の知能発育が正常であったかとの質問がなされ、若齢では記憶学習障害は認められなかったと回答された。

以上のように、本研究はさらに検討すべき課題はあるものの、V642I-APPを内因性プロモーターのもとで発現するモデルマウスを作製し、行動異常を示すことを明らかにした点で、ア病の病態解明に貢献するものと評価された。

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

試問日: 平成16年 9月 8日

# INHIBITION OF THE MKP-1 EXPRESSION POTENTIATES JNK RELATED APOPTOSIS IN RENAL CANCER CELLS.

(腎癌細胞株におけるMKP-1阻害によるJNK関連アポトーシスの誘導)

水野 隆一

## 内容の要旨

腎細胞癌は化学療法、放射線療法に抵抗性であり、その治療は外科的切除が中心である。多発転移を有する症例や、術後再発例などいわゆる進行性腎細胞癌に対しては、インターフェロンやインターロイキン2を用いた免疫療法が行われているが、効果が見られるのは10-20%程度であり、新たな治療法の確立が望まれている。本研究においては、MAPKs経路によるアポトーシス誘導が新たな治療法となる可能性に着目し、腎細胞癌におけるJNK経路によるアポトーシス誘導とその経路におけるMKP-1の役割について検討した。

材料・方法：4種類の腎癌細胞株 (ACHN, Caki-1, 769P, KU20-01) を使用した。JNK関連アポトーシスの誘導のため、JNK活性化剤であるアノマイシンを使用した。MAPKsを特異的に不活性化するとされているMKP-1がJNKのリン酸化を阻害しているのではないかと仮定し、MKP-1の阻害薬であるRo-318220を使用した。殺細胞効果の測定はアラマーブルー法にて行った。アポトーシス誘導の確認にはフローサイトメトリーによるTUNEL法、ヘキスト33258を用いた細胞形態の観察、アガロースゲル電気泳動によるDNA断片化の検出を行った。細胞内シグナルの変化の検出にはウェスタンブロット法を用いた。

結果：アノマイシン投与によって、いずれの細胞株においてもJNKの一時的な活性化が見られたが、アポトーシス誘導は観察されなかった。Ro-318220投与によってCaki-1, KU20-01においてMKP-1の発現低下を認めた。アノマイシンとRo-318220の同時投与によってCaki-1, KU20-01においてMKP-1の発現低下とJNKの持続的な活性化が観察された。両細胞株においてアポトーシス誘導が観察され、bcl-2およびbcl-xLの発現低下が認められた。このアポトーシス誘導にJNK経路が関与していることを確認するため、JNKの阻害剤であるJNK inhibitor Iを投与したところ、アノマイシンとRo-318220の同時投与によるCaki-1, KU20-01における殺細胞効果は有意に抑制された。

考察・結論：本研究では、MKP-1が腎癌細胞においてERKよりむしろJNKを優位に阻害していることが示された。また、腎癌細胞におけるJNK関連アポトーシスの誘導にはJNKの持続的な活性化が必要であり、MKP-1はJNKのリン酸化を阻害することでアポトーシスを阻害していると推察された。JNK関連アポトーシスの誘導にはbcl-2ファミリーの関与が疑われた。本研究により、JNK経路によるアポトーシス誘導が、新たな腎癌治療となりうる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

術後再発例を含むいわゆる進行性腎細胞癌に対しては、インターフェロンやインターロイキン2を用いた免疫療法が行われているが、その奏効率は15%程度であり、新たな治療法の確立が望まれている。本研究においては、MAPキナーゼ経路によるアポトーシス誘導が新たな治療法となる可能性に着目し、腎細胞癌におけるJNK経路によるアポトーシス誘導とその経路におけるMAPキナーゼホスファターゼ-1 (MKP-1) の役割について検討した。その結果、MKP-1が腎癌細胞においてERKよりむしろJNKを優位に阻害していることが示された。また、腎癌細胞におけるJNK関連アポトーシスの誘導にはJNKの持続的な活性化が必要であり、MKP-1はJNKのリン酸化を阻害することでアポトーシスを阻害していると推察された。腎細胞癌におけるJNK関連アポトーシスの誘導にはbcl-2ファミリーの関与が疑われた。本研究により、JNK経路によるアポトーシス誘導が、新たな腎細胞癌の治療となりうる可能性が示唆された。

審査では、まず本実験で用いたJNK活性化剤アノマイシンおよびMKP-1阻害薬Ro-318220の作用機序について質問があり、前者は細胞にストレスを与えることでJNKカスケードを活性化し、後者はMKP-1の分解を促すのではなく転写を抑制することでその生成を阻害するとの説明がなされた。次いで腎癌細胞株においてMKP-1の発現とERKのリン酸化が亢進している原因につき質問された。これに対し、MAPKカスケードにおいてERKの上流にあるRaf-1等のキナーゼが亢進していることによりERKのリン酸化が亢進しており、同時にMKP-1の発現が促されている可能性が高い旨説明がなされた。細胞株による殺細胞効果の差については、MKP-1の発現の高い細胞株ほどJNKのリン酸化と殺細胞効果が強く、MKP-1はアポトーシスを阻害することで腎癌細胞の生存に寄与しているとの考えが述べられた。他のMKPファミリーの発癌への関与についてはMKP-2, MKP-3の発現はほとんど見られなかったことが説明された。臨床例におけるMKP-1の発現に関しては、手術摘出標本40例を検討したところ約75%の症例で健常部に比して腫瘍部でのMKP-1の発現が亢進しており、進行癌より限局癌で発現が亢進している傾向があると説明がなされ、免疫染色や定量PCRによる評価が今後の検討課題とされた。さらには今後の臨床応用について質問がなされ、炎症性サイトカインやRNA interferenceなどの併用によるさらなる検討を続けるべきであるという助言がなされた。

以上、本研究は今後検討されるべき課題を残してはいるものの、JNK経路によるアポトーシス誘導が新たな治療法となりうる可能性が示唆された点で、今後の腎細胞癌の治療の発展に寄与し得る有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
内科学 猿田 享男 病理学 坂元 亨宇  
先端医科学 河上 裕  
学力確認担当者：  
審査委員長：猿田 享男

試問日：平成16年10月19日

# Effect of intra-ischemic hypothermia on the expression of c-Fos and c-Jun, and DNA binding activity of AP-1 after focal cerebral ischemia in rat brain.

(ラット局所脳虚血モデルを用いた虚血中低脳温における  
c-Fos、c-Jun発現とAP-1 DNA結合能の検討)

赤 路 和 則

## 内容の要旨

(目的) 即初期遺伝子の発現と、これらの遺伝子産物AP-1が一過性脳虚血後の神経細胞死にどのように関わっているかは明らかではない。我々は、rat局所一過性脳虚血におけるc-Fosとc-Junの発現、その2量体である転写因子AP-1のDNA結合活性を測定し、さらに神経細胞保護的に働く低脳温を加えることにより、これらの遺伝子発現、転写活性にどのような変化が生じるかを検討し、その役割を明らかにする。

(方法) 雄性Wistar Rat (体重300-320g) をhalothane浅麻酔下に非動化し、Koizumi-Longaのsuture methodにて右中大脳動脈閉塞を行った。閉塞は1時間とし、その後再灌流を行った。虚血中、21度の部屋に覚醒下で放置した群(常温群)と1度のcold roomに放置した群(低脳温群)とを比較検討した。再灌流3、6、24時間後に灌流固定を行い、線条体、海馬のlevelで切片を作製し、c-Fos、c-Jun抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。再灌流2日後に断頭し、TTC染色にて梗塞体積の測定を行った。また、再灌流3、72時間後に断頭し、皮質の組織を採取し、転写因子AP-1のDNA結合活性をEMSA法にて検討した。

(結果) 脳温(左後頭葉に埋め込んだtelemetric probeにより測定)は常温群では、40度以上に上昇、低脳温群では30度に低下した。梗塞体積は、線条体では差はないものの、低脳温群で、皮質において有意に縮小していた( $P < 0.001$ )。c-Fos発現は、皮質において、再灌流3時間後で、低脳温群で強く認めた。c-Jun発現は、両群間で、差を認めなかった。AP-1のDNA結合活性は、皮質において、再灌流3時間後で、低脳温群で増強していた( $P < 0.01$ )。

(結論) 低脳温により、梗塞周囲で、c-Fos発現と転写因子AP-1のDNA結合活性が虚血後早期に増加し、梗塞体積が縮小した。神経細胞生存の原因か結果かは明らかではないが、局所脳虚血において、低脳温により保護された組織で、転写の変化が重要な役割を持つことが、本結果により示唆された。

## 論文審査の要旨

c-Fos、c-Junなどの即初期遺伝子(IEG)の発現は、一過性脳虚血後に神経細胞が生存するか否かに深く関わっている。c-Fosとc-Junの2量体であるAP-1は転写制御蛋白であり、特定のDNAに結合し、標的遺伝子の転写を促す。IEG発現とそれに伴う遺伝子制御が、有益か不利益かは明らかではない。また、虚血中低脳温の神経細胞保護作用は広く受け入れられている。本研究では、ラット局所一過性脳虚血で、c-Fos、c-Junの発現とAP-1のDNA結合活性に対する低脳温の効果を検討し、IEGとAP-1の役割を明らかにすることを目的とした。TTC染色の結果より、虚血周囲、いわゆる「ischemic penumbra」である皮質では、低脳温は梗塞体積を著明に縮小させた。免疫組織化学染色により、低脳温群では、再灌流3時間後に皮質全体でc-Fosの強い発現を認めた。EMSAにより、低脳温群では、皮質のAP-1のDNA結合活性の増加を認めた。以上より、c-Fos発現とAP-1結合活性の増加が、低脳温の神経細胞保護に直接関与しているのか、虚血周囲領域での神経細胞生存の結果を反映しているのかは断定できないが、少なくともこれらの遺伝子、転写活性の変化が、神経組織の生死に重要な働きをしていることが明らかになった。

審査では、まず、免疫組織化学染色で、c-Fosが発現している細胞について質問された。拡大写真を提示し、神経細胞であるとの回答がなされた。これに対し、神経細胞で発現していることを証明するためにはマーカーとの二重染色が必要との指摘がなされた。次に、低脳温でのc-Fos蛋白増加の機序についての説明が求められた。過去の文献でc-FosのmRNA発現が低脳温により減少していることより、蛋白合成障害が改善したためにc-Fos蛋白が増加した可能性があるとの回答がなされた。これに対し、過去の文献は全く同じ実験条件ではないため、本研究において蛋白だけではなくmRNAの検討も必要であるとの指摘がなされた。また、転写因子AP-1の標的遺伝子について質問された。NGF、BDNF、bFGFや蛋白チロシンキナーゼ受容体trkBなどの、神経栄養特性を持ったいくつかの遺伝子産物の可能性があるとの回答がなされた。これに対し、これらの下流のメカニズムの検討が重要であるとの指摘がなされた。さらに、他のFos/Junファミリー遺伝子の検討、c-Fos蛋白の定量的評価も重要であるとの助言がなされた。

以上のように本研究は今後なお検討されるべき課題を残しているものの、局所脳虚血モデルでc-Fos発現とAP-1結合活性の増加が神経細胞生存と関連していることを示した点で、有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 河瀬 敏  
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之  
分子生物学 清水 信義  
学術確認担当者: 北島 政樹、仲嶋 一範  
審査委員長: 仲嶋 一範  
研究指導者: 石井 裕正 (内科学)

試問日: 平成16年 6月22日

# 膀胱癌患者血清中のIgG抗体が認識する新しい膀胱癌抗原の同定

伊 藤 敬 一

## 内容の要旨

表在性膀胱癌に対する*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) の膀胱内注入療法は、治療法としても再発の予防法としても有効であり、その抗腫瘍効果の機序として免疫反応との関連性が示唆されている。一方、転移を有する進行性膀胱癌の治療には多剤併用化学療法が用いられるが、治療成績は満足すべき状態ではなく新しい治療法の開発が望まれる。進行性膀胱癌に対しても免疫治療は有効である可能性がある。申請者は進行性膀胱癌の免疫治療に応用しうる癌抗原の同定するためserological identification of recombinant cDNA expression cloning (SEREX) 法を用いた。細胞異型度の高い膀胱癌のリンパ節転移巣から申請者の教室で樹立したFY細胞株からmRNAを抽出し、ファージをベクターとしたcDNAライブラリーを作成した。このcDNAライブラリーを用いてタンパクを発現させ、同一の膀胱癌患者の血清中のIgG抗体が認識する蛋白をコードするファージクローンを単離した。各陽性クローンのコードする塩基配列を決定し、遺伝子を同定した。48種類の分子が単離され、36種類の既知分子と12種類の未知分子であった。これらの各分子に対するIgG抗体が存在するかどうかを、健常人ならびに膀胱癌患者を含めた癌患者血清において検討した。また各抗原に対する組織特異的なmRNAの発現パターンをRT-PCRおよびノーザンブロットを用いて検討した。これらの検討の結果、KU-BL-1とKU-BL-2が膀胱癌の患者において免疫原性が高く、膀胱癌組織に高発現している有力な膀胱癌抗原候補と考えられた。KU-BL-1は特徴的なCXXXCXXCというモチーフを有し、ヒトlipoic acid synthetaseの一つと考えられた。KU-BL-1は検討した多くの膀胱癌細胞株や膀胱癌組織に発現し、正常組織においては正常膀胱粘膜や精巣に発現していた。KU-BL-1に対するIgG抗体は膀胱癌患者血清中28例中2例に認められたが、健常人30人では認められなかった。KU-BL-2はショウジョウバエのkelch蛋白に相同性がありkelch-like proteinの一つと推定された。特徴的なBTB/POZドメインや6つのkelch repeatを認めた。KU-BL-2は検討した多くの膀胱癌細胞株や膀胱癌組織に発現し、正常組織においては精巣や心臓に発現していたが正常膀胱粘膜には認められなかった。KU-BL-2に対するIgG抗体は膀胱癌患者血清中28例8例に認められ検討した分子の中で最多であったが、健常人16人では認められなかった。KU-BL-1とKU-BL-2のアミノ酸配列に由来するHLA-A24高親和性ペプチドを用いて、健常人の末梢血リンパ球から腫瘍反応性T細胞の誘導を試みた。同一人の末梢血単核球から樹状細胞を誘導し、ペプチドをパルスして抗原提示を行った。KU-BL-2のペプチドであるVYILGGSQIにおいて8例中1例で腫瘍反応性T細胞を誘導することができた。以上の結果からKU-BL-1とKU-BL-2は膀胱癌に高発現する免疫原性のある分子であり、膀胱癌の診断や免疫細胞治療に応用しうる抗原であると考えられた。

## 論文審査の要旨

膀胱癌の治療や診断に応用しうる癌抗原を同定することを目的とした。抗原の同定にはSEREX法を用いた。すなわち、膀胱癌のリンパ節転移巣から樹立したFY細胞株を用いcDNAライブラリーを作成した。タンパク発現系において、膀胱癌患者の血清中のIgG抗体が認識するタンパクをコードするファージクローンを単離した。塩基配列を決定した結果、36種類の既知分子と12種類の未知分子であった。健常人と癌患者血清中の抗体の存在、mRNAの発現パターンを検討した結果、KU-BL-1とKU-BL-2が膀胱癌患者で免疫原性が高く膀胱癌組織や細胞株に高発現している有力な抗原候補と考えられた。KU-BL-1はヒトlipoic acid synthetaseの一つと考えられた。またKU-BL-2はショウジョウバエのkelch蛋白に相同性がありkelch-like proteinの一つと推定された。KU-BL-1とKU-BL-2に由来するHLA-A24高親和性ペプチドを用いて、健常人の末梢血リンパ球から腫瘍反応性T細胞の誘導を試みた。KU-BL-2由来のペプチドであるVYILGGSQIにおいて健常人8例中1例で腫瘍反応性T細胞を誘導することができた。以上の結果からKU-BL-1とKU-BL-2は膀胱癌の診断や免疫療法に応用しうる抗原であると結論した。

審査においては、単離された48遺伝子からどのような基準でKU-BL-1とKU-BL-2を選択するに至ったかという質問がなされた。健常人の血清中に抗体が産生されている分子を検討から除外し、選別された24遺伝子のRT-PCRとノーザンブロットによる組織発現の検討の結果を重要視し、特異的な発現パターンのある分子を選択したと回答された。KU-BL-2のノーザンブロットで認めた約2.0kbのバンドに対する検討がなされたかという指摘があり、KU-BL-2のsplice variantの可能性があると回答された。KU-BL-1が正常膀胱に発現する事が治療に応用する際に問題にならないかという質問があり、膀胱が切除された症例では問題とはならないが、未切除例においては膀胱炎などの副作用の可能性があると回答された。単離されたα-actinin 4, mitotin, 癌遺伝子関連遺伝子などの興味深い既知分子や、KU-BL-1, 2などの未知分子の今後の臨床応用の可能性に対する質問があった。これらの遺伝子の発現と膀胱癌の悪性度や予後が相関する可能性があること、血清中の抗原タンパクやそれらに対する抗体の存在が腫瘍マーカーとして診断や進行度の推定に役立つ可能性があるかと回答された。抗体を用いて同定した抗原に対して、CD4+T細胞ではなくCD8+T細胞に認識される抗原の検討が最初になされたのはなぜかという質問があった。生体内の腫瘍の拒絶に重要であるCD8+T細胞に認識される抗原を同定する事が本研究の第一の目的であり、その手法としてSEREX法を用いたと回答された。

KU-BL-1, KU-BL-2の機能に関する検討、単離された分子の膀胱癌との関連性、さらには臨床応用の可能性など多くの研究すべきテーマは残されているものの、新規の膀胱癌抗原を同定したこと、膀胱癌の免疫療法に応用しうるペプチドを同定したという点において有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
先端医科学 河上 裕 病理学 坂元 亨宇  
微生物学・免疫学 小安 重夫  
学力確認担当者: 北島 政樹、河上 裕  
審査委員長: 河上 裕

試問日: 平成16年 7月 6日

# The modifier subunit of glutamate cysteine ligase (GCLM) is a molecular target for amelioration of cisplatin resistance in lung cancer.

(グルタメートシステインライゲースのモディファイアーサブユニットは肺癌におけるシスプラチン耐性の克服に有用な分子標的である。)

井上 芳正

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

### 緒言

癌細胞のシスプラチン (CDDP) 耐性の原因として細胞内グルタチオン (GSH) 量の上昇が知られている。GSH合成の律速酵素は Glutamate cysteine ligase (GCL) である。GCLは、modifier subunit (GCLM) と catalytic subunit (GCLC) の2つのサブユニットで構成される。GCL発現と抗癌剤耐性に相関があることは知られているが、どちらのサブユニットが癌細胞のCDDP耐性に重要なものについては、現在までのところ不明である。

リボザイム (Ribozyme) は、RNAを塩基配列特異的に酵素的に切断するアンチセンスリボ核酸 (RNA酵素) で、標的のm-RNAを塩基配列特異的に切断するように合成可能である。

今回我々は、ヒト肺腺癌細胞株A549にGCLの各サブユニット (GCLM, GCLC) に対するリボザイム (Anti-GCLM ribozyme, Anti-GCLC ribozyme) を導入し、GCLの各サブユニット (GCLM, GCLC) に特異的な発現の抑制が、NSCLCのCDDP耐性に与える影響を検討したので報告する。

### 材料・方法

A549にGCLMおよびGCLCをそれぞれ特異的に切断するリボザイムを導入し、anti-GCLM ribozyme導入株 (A549/M-Rz)、anti-GCLC ribozyme導入株 (A549/C-Rz) を得た。コントロールとして、それぞれのリボザイムの活性中心配列を1塩基変えて失活させた、変異型リボザイム導入株 (A549/dis-M-Rz, A549/dis-C-Rz) を作成した。A549/M-Rz・A549/C-Rzにおける標的遺伝子 (それぞれGCLM, GCLC) の発現、細胞内GCL活性、細胞内GSH量、CDDP感受性をそれぞれのコントロール (A549/dis-M-Rz, A549/dis-C-Rz) と比較・検討した。

測定値の比較において、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

### 結果

リボザイム導入株 (A549/M-Rz, A549/C-Rz) ではそれぞれのコントロールに比べて標的遺伝子の発現が低く、細胞内GCL活性が有意に低下していた。リボザイム導入株 (A549/M-Rz, A549/C-Rz) のCDDP感受性はともにコントロールと比較して有意に高かったが、感受性の変化はA549/M-Rzの方が、A549/C-Rzより顕著であった。さらに、A549/M-RzのCDDP感受性はA549/C-Rzと比較しても、有意に高かった。

### 考察

以上の結果から、GCLCおよびGCLMともに癌細胞のCDDP耐性克服に有用な標的であり、さらにGCLCよりもGCLMの方が非小細胞肺癌のCDDP耐性克服の標的としてより有用である可能性が示唆された。

シスプラチン (CDDP) は非小細胞肺癌 (NSCLC) に対する化学療法 key drug である。CDDPの解毒においてグルタチオン (GSH) 抱合によるCDDPの細胞外への排泄が重要である。GSH合成の律速酵素は Glutamate cysteine ligase (GCL) である。GCLは、modifier subunit (GCLM) と catalytic subunit (GCLC) の2つのサブユニットで構成される。本研究ではヒト肺腺癌細胞株A549にGCLの各サブユニット (GCLM, GCLC) の遺伝子発現をmRNAレベルで特異的に抑制する ribozymeを導入し、GCLの各サブユニットの発現を特異的に抑制することがNSCLCのCDDP耐性に与える影響を検討した。ribozyme導入株のCDDP感受性は上昇したが、感受性の上昇はAnti-GCLM ribozyme導入株の方が、Anti-GCLC ribozyme導入株より顕著であった。GCLCとGCLMともに非小細胞肺癌のCDDP耐性克服の標的として有望である事が示唆された。

審査では、細胞株としてA549よりもシスプラチン耐性株を選択した方が適切であったのではないかと質問がなされた。これに対して、非小細胞肺癌は7割以上がシスプラチンに対して自然耐性であり、獲得耐性よりも自然耐性の克服がより重要課題であると考えられること、事前の検索でA549が複数の肺癌細胞株の中でシスプラチン感受性が最も低いことから、自然耐性のモデルとしてA549を採用したと回答された。また、ribozyme導入株ではコントロールに比べ細胞内GCL活性が有意に低下していたにもかかわらず、細胞内GSH量に差がなかった点について説明を求められた。これに対し、CDDP投与により新たに合成されるGSH量に差がある可能性があるかと回答されたが、CDDP投与後の細胞内GSH量の詳細な検討が行われるべきとの指摘がなされた。本研究ではGCLCよりもGCLMの方が非小細胞肺癌のCDDP耐性克服の標的としてより有用である可能性があると主張しているが、これを主張するにはribozymeによる標的遺伝子の抑制には導入株の間でのばらつきが大きく、細胞株間でのGCLC, GCLMの蛋白量と感受性との相関が示されていない点が問題となるとの指摘があった。これに対しては、遺伝子抑制レベルと感受性の相関については別の研究で検討中であり、蛋白量については現時点で特異性の高い抗体の入手が難しいことが検討を妨げていると回答された。

以上のように、本研究ではなお検討すべき点は残るものの、Glutamate cysteine ligaseのmodifier subunitがCDDP耐性の克服に有用な標的であることを初めて示したものである点で、今後の癌化学療法に向けて有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 小林 紘一  
病理学 坂元 亨宇 端医科学 河上 裕  
内科学 小川 聡  
学力確認担当者: 北島 政樹、坂元 亨宇  
審査委員長: 坂元 亨宇  
研究指導者: 石井 裕正 (内科学)

試問日: 平成16年 6月 8日

# Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera.

(神経膠腫患者の血清抗体に認識される転写調節因子SOX6の同定と発現解析)

植 田 良

## 内容の要旨

近年の免疫学、分子生物学の急速な進歩は悪性腫瘍細胞に対する免疫認識機構を解析することを可能にし、さらにT細胞が認識する腫瘍特異的な拒絶抗原の存在が明らかにされたことから、これら抗原分子を用いた免疫治療への応用が進められている。我々は臨床に極めて治療困難な悪性脳腫瘍に対する免疫療法法の確立を目的に、グリオーマ特異抗原の同定を試みた。

グリオーマ患者血清を用いたSEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) 法により、精巣組織由来のcDNA libraryをスクリーニングしたところ、胎生期に転写調節因子として機能するSOX6が高頻度に単離された。さらに、グリオーマ患者、他の脳疾患患者、各種癌患者、および健康人の血清中のSOX6に対するIgG抗体の検出頻度を解析したところ、SOX6特異的IgG抗体は36人中12人(約33%)のグリオーマ患者に認められたのに対し、グリオーマ以外の脳疾患患者では14人中0人(0%)、各種癌患者では54人中2人(約4%)、健康人では37人中1人(約2%)の血清中に認められるのみであった。また、ELISA法によりSOX6のDNA結合部位であるHMG domainに対する血清中IgGの抗体価を解析したところ、グリオーマ患者血清中IgGは健康人の血清中IgGに比して有意に高い抗体価を有することが示された。一方、SOX遺伝子ファミリーは胚発生過程において組織特異的に発現され、それらがコードする蛋白は胚発生の制御や細胞運命の決定において、重要な役割を果たすことが最近明らかになってきた。マウスSOX6の発現は、胚発生過程の中樞神経系において確認されるが、成体マウスの中樞神経系ではその発現が顕著に減少することが報告されている。ヒトSOX6の組織発現性をRT-PCR、定量的PCR、Northern blotで検討したところ、SOX6はグリオーマ組織や胎児脳組織において高い発現が認められたが、成人正常組織には精巣を除いてほとんど発現が認められなかった。抗SOX6抗体を用いたWestern blotによる解析では、SOX6蛋白はグリオーマ組織において発現が観察されたが、正常成人脳組織においては発現を認めなかった。さらに抗SOX6抗体を用いた免疫組織学的解析において、解析した18例のグリオーマ組織 (Glioblastoma 8例、Anaplastic astrocytoma 5例、Diffuse astrocytoma 1例、Oligoastrocytoma 4例) 全例において陽性細胞を認めた。一方、正常成人脳組織では明らかなSOX6陽性細胞は認められなかった。

本研究において、精巣由来cDNA libraryを用いたSEREX法により単離された転写調節因子SOX6が、グリオーマ組織において高い発現を示し、さらにグリオーマ患者血清中IgG抗体に高頻度に認識されることを示した。SOX6の特異的な組織発現性は組織学的診断への応用が期待され、またその高い抗原性はグリオーマの血清学的診断やグリオーマに対する免疫治療に応用できる可能性を示唆するものである。

## 論文審査の要旨

グリオーマは浸潤性の成長であるが故に外科的治療は制約を受けており新たな治療法の確立が強く望まれている。現在までこの腫瘍細胞を選択的に攻撃する有効な治療法は存在せず、その意味でも免疫系に認識される抗原の同定や免疫治療の開発は治療成績の向上を目指す上で有意義である。本研究では免疫治療のターゲットとして有用であると考えられる、癌と精巣に共通して発現する抗原 (Cancer-Testis Antigen) の同定を想定し、患者血清を用いたSEREX法により精巣由来cDNA libraryから転写調節因子SRV-like HMG box6 (SOX6) を単離した。また、SOX6はグリオーマ組織で高く発現し、グリオーマ患者血清中IgGに高頻度に認識されることを示した。このことから発現が強く制御されているSOX6の過剰発現により免疫系に暴露され、抗体産生が誘導されると推測された。更にSOX6の組織特異的な発現性や高い抗原性は、グリオーマの組織学的・血清学的診断や免疫治療に有用である可能性が示唆された。

審査では単離された抗原分子が特異的免疫反応を惹起した機序に関する考察が主論点となった。これに対し、機序を証明するには至っていないが、単離させたSOX6遺伝子クローンの配列に変異が認められなかったこと、SOX6の発現は免疫寛容の場である精巣組織を除いた成人正常組織ではほとんど認められず、グリオーマ組織において高発現していたことから、SOX6の過剰発現によって特異的なIgG抗体産生が誘導されている可能性が示唆されると回答された。遺伝子変異については精巣cDNA library由来のクローン遺伝子に関して解析されているが、グリオーマ腫瘍細胞についても検討されるべきであると補足された。次にSOX6を用いたグリオーマの診断や抗原分子を標的とした免疫治療を臨床へ応用し得る可能性や課題についての問題が提起された。まず血清学的診断についてはELISAでの抗SOX6抗体陽性率が低いことが指摘され、より抗体価の高い抗体認識部位の同定により陽性率の向上を目指している旨が述べられた。また、この検出系での抗体認識部位は、SOX family間で保存されている領域であるため抗体のcross reactivityの可能性を考慮して再評価すべきであると補足された。最後に免疫組織学的、発生学的なSOX6陽性細胞の特徴について質問され、SOX6を高発現する細胞では神経幹細胞で特異的に発現する分子も発現すること等を提示しつつ、SOX6がグリオーマのみならず成体中樞神経系の未分化な細胞に高発現している可能性が示唆された。更に今後グリオーマの腫瘍発生過程を解明する上で、SOX6の胎生期や成体中樞神経系における発現や構造・機能解析が重要となるとの意見が出された。

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、他疾患に比して免疫系に認識される抗原の同定が稀少であるグリオーマにおいて、臨床応用に向けて有望な抗原分子を単離・解析した点で有意義であり、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 外科学 河瀬 斌  
生理学 岡野 栄之 解剖学 仲嶋 一範  
病理学 坂元 亨宇  
学力確認担当者: 北島 政樹、岡野 栄之  
審査委員長: 岡野 栄之

試問日: 平成16年 7月26日

# Usefulness of Residual Percent Plaque Area After Percutaneous Coronary Intervention in Predicting Persistent Positive Remodeling.

(ステント留置冠動脈の遠隔期ポジティブリモデリング現象の予知；術後残存粥腫面積率との関連)

岡 部 輝 雄

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

〈背景〉ステント留置術の導入を契機とし、経皮的冠動脈形成術は冠動脈疾患の治療に欠くことのできない治療法となった。しかし、依然として遠隔期再狭窄が本治療法の最大の弱点である。今日、ステント内再狭窄症例数が増加する一方、同疾患に対する有効な治療法は確立されていない。従って、ステント留置に際しては、遠隔期再狭窄に関する指標及び再狭窄回避に関する指標を明確にし、それらの指標に準じた治療法の選択が重要である。近年、ステント留置後の冠動脈が遠隔期に拡張（ポジティブリモデリング）を呈する可能性が示唆され、遠隔期成績との関連が注目されている。

〈目的〉本研究では、ステント留置後の冠動脈が遠隔期にリモデリングを呈するか否かを評価すると共に、リモデリングと遠隔期成績との関連性を明らかにし、同現象に関する術後規定因子の決定を行う。

〈方法〉対象は、冠動脈病変に対してステントを留置した230症例、230病変。術前後及び6ヶ月以内の遠隔期において、定量的冠動脈造影及び血管内超音波による解析を実施した。遠隔期血管断面積と術後血管断面積の比率が $\geq 1.1$ の場合、ポジティブリモデリングを呈していると定義した。以下の指標を算出し定義した。(1) 晩期損失量＝術後血管内腔断面積－遠隔期血管内腔断面積、(2) 粥腫面積率＝ $(血管断面積 - 血管内腔断面積 / 血管断面積) \times 100$ 、(3) 粥腫面積率増加量＝遠隔期粥腫面積率－術後粥腫面積率。

〈結果〉ポジティブリモデリング群 ( $n=67$ ) の粥腫面積率増加量 ( $22 \pm 17\%$ ) は、非ポジティブリモデリング群 ( $n=163$ ) ( $15 \pm 13\%$ ) に比し有意に大であった ( $p < 0.05$ )。しかし血管断面積の増加に伴い、晩期損失量はポジティブリモデリング群 ( $1.5 \pm 3.7 \text{mm}^2$ ) で有意に小であった ( $2.7 \pm 2.0 \text{mm}^2$ ,  $p < 0.05$ )。ポジティブリモデリング群の再狭窄率 ( $16.4\%$ ) は、非ポジティブリモデリング群 ( $28.2\%$ ,  $p < 0.05$ ) に比し有意に小であった。両群間の単変量解析では、術前の血管断面積 ( $12.5 \pm 4.0 \text{mm}^2$  対  $14.3 \pm 5.0 \text{mm}^2$ ,  $p = 0.0094$ ) と血管内腔断面積 ( $1.4 \pm 0.6 \text{mm}^2$  対  $1.7 \pm 0.9 \text{mm}^2$ ,  $p = 0.0112$ )、術後の血管断面積 ( $14.9 \pm 4.4 \text{mm}^2$  対  $17.2 \pm 5.0 \text{mm}^2$ ,  $p = 0.0014$ ) と粥腫面積率 ( $42 \pm 12\%$  対  $48 \pm 9\%$ ,  $p < 0.0001$ ) に有意差を認めた。多変量解析の結果、術後粥腫面積率が遠隔期ポジティブリモデリングの独立規定因子であり、逆相関関係にあった (危険率  $0.944$ 、 $95\%$ 信頼区間  $0.914 - 0.975$ ,  $p = 0.0004$ )。

〈結論〉ステント留置後の冠動脈には、実際に遠隔期ポジティブリモデリングを呈するものを認め、術後粥腫面積率が同現象を規定した。さらに、ポジティブリモデリング現象が遠隔期再狭窄に対しては影響を与えている可能性が示唆された。

経皮的冠動脈形成術に際し、ステント留置の最大の問題点は遠隔期再狭窄を完全には回避出来ない点にある。従って、再狭窄回避に関連した指標を同定し、それに基づいたステント留置術が求められている。本研究では、ステント留置後冠動脈の遠隔期ポジティブリモデリング現象を明確にし、同現象と遠隔期再狭窄率軽減との関連性を証明した。また、術後残存粥腫面積率が同現象の独立規定因子であり逆相関関係にあることを明確にした。即ち、術後残存粥腫面積率が小であるほどステント留置冠動脈は遠隔期ポジティブリモデリングを呈し、再狭窄を回避できる可能性が示唆された。

審査では、まず方法論に関連して血管内超音波法の測定精度に関する質問がなされた。2人の測定検者が同一症例を個別に測定し、両測定値の相関係数が $0.95$ 以上であったことから、その精度は十分信頼できるとの回答がなされた。音響陰影の影響に関する質問があった。解析はビデオ上で音響陰影の存在しないフレームを利用しており測定可能との回答がなされた。さらに、ステント種類の相違の影響について質問があった。ステントは全てステンレス性のチューブ型であり、留置した際の金属面積及び再狭窄率等にも大差が無いことからその影響は過少であると判断したとの回答がなされた。また、2群間の相違は小さく臨床的意義がどこまで存在するのか疑問点との指摘があった。2群間の晩期損失量の相違は $1.5 \sim 2.0 \text{mm}^2$ である。通常必要とされるステント断面積は $8 \sim 9 \text{mm}^2$ であり、同面積に占める晩期損失量の相違は十分に大きいとの回答がなされた。次に、方向性冠動脈硬化切開術 (DCA) の影響について質問がなされた。DCAの影響を排除するためにDCA施行例を除いた症例においても解析を行い、同様の結果を得たとの回答がなされた。ポジティブリモデリングを来す機序及びステント外側の粥腫増殖と新生内膜増殖の関連性について質問がなされた。発生機序については、血管外膜の炎症反応が中心的役割を果たしていると考えられるが組織学的解析はなされておらず、今後の検討課題である旨が回答された。術後粥腫量と新生内膜量間の相関性が過去に報告されているが本研究では同定されなかった。その理由は、母集団の背景、手技内容、解析方法の相違に起因しているとの回答がなされた。最後に、術前にリモデリングしている血管の遠隔期変化について質問がなされた。ポジティブリモデリング群では術前血管断面積が相対的に小であったことから、術前ネガティブリモデリングを呈している血管が遠隔期ポジティブリモデリングを呈すると考えられるとの回答がなされた。

以上のように、本研究には今後の課題が残されているものの、再狭窄を回避出来ると考えられた薬剤溶出性ステントの限界が明らかになりつつある今日、ステント留置法を再検討し新たな治療法を構築する根拠として臨床的意義があると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 放射線医学 栗林 幸夫  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者：北島 政樹、四津 良平  
審査委員長：四津 良平

試問日：平成16年 7月26日



# Chronic allergy to dietary ovalbumin induces lymphocyte migration to rat small intestinal mucosa that is inhibited by MAdCAM-1.

(OVAによる慢性食餌アレルギーラットの小腸粘膜における  
Tリンパ球マイグレーションおよびMAdCAM-1の関与について)

小川 登志子

## 内容の要旨

食餌アレルギーにおける腸管粘膜の病理組織学および免疫学的変化についての詳しい報告は少ない。本研究では、OVA (ovalbumin) によりIgEの関与する即時型の食事アレルギーに加え、Tcellの関与する遅延型アレルギーをラット腸管に惹起させ、OVAによる慢性アレルギー腸炎モデルを確立するとともに生体顕微鏡下で小腸におけるTリンパ球migrationの状態を観察し、血管接着分子とくにMAdCAM-1の関与につき検討することを目的とした。

実験にはIgEアレルギー反応を生じやすい動物種であるBN (Brown Norway) ラットを用い、OVAを腹腔内投与して感作した後OVA含有水 (10mg/ml/day) を連日胃管にて6週間摂取させ飼育し、小腸に慢性炎症を惹起させた (daily gavage群)。感作後OVA含有水 (10mg/day) を連日飲水させたものをFree drinking群、対照群としては、感作を行わずOVA含有水 (10mg/ml/day) を連日投与する群 (OVA fed control) および感作後に水 (1 ml/day) を投与する群 (OVA sensitized control) を作成し4群で比較した。それぞれの小腸粘膜における形態変化およびリンパ球サブセット、接着分子の発現を免疫組織化学的に観察し、さらに生体顕微鏡下にパイエル板や絨毛粘膜の粘膜微小血管における腸リンパ由来Tリンパ球のマイグレーションを検討した。

Daily gavageやfree drinking群では血清のOVA特異的IgG、IgEの上昇がみられた。OVA投与群の小腸粘膜では明らかな絨毛の萎縮や陰窩長の増大、Tリンパ球の浸潤が観察された。またこれらの群では、RMCP II (rat mast cell protease II) やMAdCAM-1の発現も増加していた。抗MAdCAM-1抗体の連続投与では、OVAアレルギーに伴う粘膜の形態変化やCD4リンパ球の浸潤が減弱した。生体顕微鏡下での小腸のTリンパ球migrationの観察では、慢性アレルギーラットのパイエル板や絨毛粘膜の粘膜微小血管ではリンパ球の集積が有意に増加しており、その変化は抗MAdCAM-1抗体の投与にて抑制された。

以上の結果OVAによる慢性食餌アレルギーモデルにおいてTリンパ球マイグレーションの亢進が示され、その機序にMAdCAM-1のupregulationが関与しているということが示された。また、OVAの曝露に対して過剰なIgE反応が生じると、粘膜免疫機構が乱れTリンパ球マイグレーションの亢進を伴う細胞性免疫異常が惹起され、粘膜傷害が生じると考えられた。その際に、接着分子MAdCAM-1は慢性食事アレルギーにともなう腸炎形成に関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

本研究では、OVA (ovalbumin) によりIgEの関与する即時型の食餌アレルギーに加え、Tcellの関与する遅延型アレルギーをラット腸管に惹起させ、OVAによる慢性アレルギー腸炎モデルを確立するとともに生体顕微鏡下で小腸におけるTリンパ球migrationの状態を観察し、血管接着分子とくにMAdCAM-1の関与につき検討することを目的とした。

実験にはIgEアレルギー反応を生じやすい動物種であるBN (Brown Norway) ラットを用い、OVAを腹腔内投与して感作した後OVA含有水 (10mg/ml/day) を連日胃管にて6週間摂取させ飼育し、小腸に慢性炎症を惹起させた (daily gavage群)。感作後OVA含有水 (10mg/day) を連日飲水させたものをFree drinking群、対照群としては、感作を行わずOVA含有水 (10mg/ml/day) を連日投与する群 (OVA fed control) および感作後に水 (1 ml/day) を投与する群 (OVA sensitized control) を作成し4群で比較した。その結果、Daily gavageやfree drinking群では血清のOVA特異的IgG、IgEの上昇がみられた。OVA投与群の小腸粘膜では明らかな絨毛の萎縮や陰窩長の増大、Tリンパ球の浸潤が観察された。またこれらの群では、RMCP II (rat mast cell protease II) やMAdCAM-1の発現も増加していた。抗MAdCAM-1抗体の連続投与では、OVAアレルギーに伴う粘膜の形態変化やCD4リンパ球の浸潤が減弱した。生体顕微鏡下での小腸のTリンパ球migrationの観察では、慢性アレルギーラットのパイエル板や絨毛粘膜の粘膜微小血管ではリンパ球の集積が有意に増加しており、その変化は抗MAdCAM-1抗体の投与にて抑制された。

以上の結果OVAによる慢性食餌アレルギーモデルにおいてTリンパ球マイグレーションの亢進が示され、また、OVAの曝露に対して過剰なIgE反応が生じると、粘膜免疫機構が乱れTリンパ球マイグレーションの亢進を伴う細胞性免疫異常が惹起され粘膜傷害が生じ、それらに接着分子MAdCAM-1が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

審査では、本研究におけるコントロールのとり方について質疑が行われた。OVA経口投与群を陰性コントロールとしておいている妥当性については、OVA投与群とOVA感作+OVA投与の2つをコントロールとして考えた方が望ましいと判断され、実際には病変の程度が後者の方が非常に大きいので、論文投稿時のreviewerのリクエストに従ってコントロールを設定したと述べ、了解された。

また、このモデルの性格について質問がなされ、BNラットの遺伝的な特徴もあり、今回の実験では組織学的な有意差はないものの特異的IgEの上昇は認められたこと、このアレルギーは即時型と遅延型とが平行して起こっているのではないかと考えられるが、リンパ球浸潤機序の詳細については今後の更なる検討を待たなければならないこと、などが説明された。

以上のように、本研究には今後さらに検討すべき点があるものの、現在病態解明が進んでいない食餌アレルギーについて動物モデルでの基礎的研究を行ったものとして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 解剖学 相磯 貞和  
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: 北島 政樹、石川 博通  
審査委員長: 石川 博通  
研究指導者: 石井 裕正 (内科学)

試問日: 平成16年 6月 9日

# Senescence-associated decline of lymphocyte migration in gut-associated lymphoid tissues of rat small intestine.

(腸管リンパ装置 (GALT) における加齢に伴うリンパ球マイグレーションの変化について)

荻野 剛志

## 内容の要旨

加齢による末梢のリンパ球の機能低下やサイトカインによる免疫応答の減弱など全身の免疫機能の低下が示唆されている。腸管リンパ装置 (gut-associated lymphoid tissue : GALT) はリンパ球のhomingを通じて独自の免疫防御機構を形成している。老化が全身のリンパ系の免疫機能に与える影響に関しては様々な報告があるが、腸管局所免疫に与える影響についての報告は少ない。そこで本研究ではパイエル板のリンパ球動態を生体観察し、加齢に伴うリンパ球マイグレーションの変化につき検討した。

若齢 (12週) 及び老齢 (77週) のfisher344ラットを用いて腸リンパ管にカニューレを挿入し、腸管リンパをドレナージ採取し時間当たりのリンパ球数の測定及び表面接着分子発現のFACS解析を行った。また採取したTリンパ球を蛍光色素CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) で標識後に同系同週数のrecipientに経静脈的に投与し、生体顕微鏡下にパイエル板における後毛細血管細静脈におけるローリングと接着状態を観察した。また、リンパ球をMACS (magnetic cell sorting and separation) にて、CD4, CD8 negative cellに選択的に分離し、そのmigration動態を同様に観察した。さらに老齢ラットのリンパ球を若齢ラットに、若齢ラットのリンパ球を老齢ラットに投与した際のmigration動態の変化も同様の手順で観察した。また老齢、若齢ラットのパイエル板におけるリンパ球サブセットおよびMAdCAM-1発現について免疫組織学的に検討した。

老齢ラットでは時間当たりの腸管リンパ管でのリンパ球輸送の減少を認めるとともに、FACS解析でL-selectinの発現の低下を認めたが、 $\alpha 4$ -integrin, CD18の発現は差異を認めなかった。パイエル板におけるリンパ球のhomingに関してはいずれの時間においても若齢ラットに比べ老齢ラットでは血管内皮へのローリングと接着はともに有意に減少を認めた。MACSを用いた観察は両分画ともに有意に老齢ラットで減少したが、特にCD4の方が著明な減少をみた。免疫組織学的にもパイエル板においてCD4, CD8ともに老齢ラットで減少していた。しかし、パイエル板細静脈におけるMAdCAM-1の発現には差異を認めなかった。また老齢ラットのリンパ球を若齢ラットに投与した場合は若齢ラットのリンパ球を老齢ラットに投与した場合に比べhomingの減少が大きく、加齢にともなうリンパ球マイグレーションの低下にはL-selectinを始めとしたリンパ球側の要因が深く関与していると考えられた。

## 論文審査の要旨

本研究では、リンパ球のmigration動態を観察することにより老齢、若齢の腸管リンパ装置におけるリンパ球ホーミング、リンパ球や組織での接着分子の発現、免疫グロブリン産生能の差異を比較検討した。

Fisher344ラットの若齢 (12週) 老齢 (77週) を用いて腸リンパ管にカニューレを挿入し、持続的に腸管リンパをドレナージ採取、それぞれ時間当たりのリンパ球数の測定及び表面接着分子の発現のFACS解析を行ったところ、老齢ラットでは時間当たりの腸管リンパ管でのリンパ流量、リンパ球数の減少、L-selectinの発現の低下を認めたが、 $\alpha 4$ -integrin, CD18の発現については差異を認めなかった。

また採取したリンパ球を蛍光色素CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) で標識後に同系同週数のrecipientに経静脈的に投与し、生体顕微鏡下にパイエル板におけるmigration動態の変化を比較観察した結果、パイエル板におけるリンパ球のhomingに関してはいずれも時間とともにパイエル板細静脈に接着が認められるものの若齢に比べ老齢では少ない傾向にあり、磁場を用いた選択カラムでのnegative selectionを用いたmigration動態の観察はCD4, CD8ともに有意に老齢で減少したが、特にCD4の方が著明な減少をみたこと、免疫組織学的にもパイエル板においてはCD4, CD8ともに有意に老齢で減少していたが、パイエル板細静脈におけるMAdCAM-1の発現には差異を認めなかった。また老齢のリンパ球を若齢に投与した場合リンパ球homingが減少した。

以上より、加齢に伴いGALTにおいてリンパ球の腸管リンパ管輸送やmigrationに変化をきたしている可能性が示唆された。その原因としてL-selectinを始めとしたリンパ球側の要因が深く関与していると考えられた。

審査においては、まず実験条件として加齢による体重差がデータに影響を及ぼすか否かについては質問され、影響がある可能性はあるが今までのところそれについて明らかとした文献などはないと答えられた。

また、組織所見についてラベルされたリンパ球の存在場所について質問され、extravasationではなくpost capillary venuleにstickしているものであると回答された。

リンパ球の表面抗原の解析結果には、L-selectin陽性細胞について質疑があり、くり返し比較した結果L-selectin分子の発現が老齢で低下していると改めて説明されたが、若齢と老齢との間でその他のadhesion moleculeでは有意差がない事については、chemokine receptorやchemical mediatorについて今後の実験を進めたいと述べられた。

以上の審査の結果、本研究はリンパ球マイグレーションにおいて加齢に伴う変化とその機序について新たな所見を明らかとした基礎的研究として、消化器病学上有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 解剖学 相磯 貞和

微生物学・免疫学 石川 博通 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：北島 政樹、石川 博通

審査委員長：石川 博通

研究指導者：石井 裕正 (内科学)

試問日：平成16年 6月 9日

# A Neuronal Mechanism of Propofol-Induced Central Respiratory Depression in Newborn Rats.

(プロポフォールにより惹起される新生ラットの中枢性呼吸抑制のニューロンレベルにおける機序)

柏木 政憲

## 内容の要旨

### 背景

プロポフォールは、中枢性吸気ドライブを抑制して呼吸抑制を惹起することが示唆されているが、その精密な神経学的メカニズムは、十分理解されないままになっている。本研究においては、プロポフォールに対する延髄呼吸性ニューロンの反応（細胞膜特性に対する効果を含む）と、プロポフォールにより惹起された呼吸抑制におけるGABA<sub>A</sub>受容体の役割を解明することを目的とした。

### 方法

新生ラット（日齢1-4日）の脳幹と頸髄を摘出し、人工髄液で連続的表面灌流を行った。横隔神経に連なることが知られている第4頸髄（C4）前根から、周期的な吸息性バースト活動を記録し、呼吸神経出力の指標とした。灌流液を標準液からプロポフォールを添加した液に切り替え、C4吸息性バースト数の経時的变化を観察した。また、延髄と頸髄の境界部に隔壁を設けて別々に灌流し、延髄にプロポフォールを投与した時、次いでプロポフォールとGABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬ピククリンを同時に投与した時のC4吸息性バースト数の経時的变化を観察した。延髄腹外側の呼吸性ニューロン活動を穿孔パッチクランプ法により記録し、灌流液を標準液からプロポフォールを添加した液に切り替え、膜電位の変化を記録した。

### 結果

プロポフォールはC4の吸息性バースト数を濃度及び時間依存的に減少させ、無呼吸を生じさせた。この呼吸抑制はピククリンの投与によって完全に回復した。物側の腹外側延髄で25のニューロンを記録した。プロポフォールは吸息先行型及び呼息性ニューロンの静止膜電位を過分極させるとともに、バースト内発火頻度を減少させ、また、これらのうち33%のニューロンにおいて活動電位の発火を休止させた。一方、プロポフォールは吸息性ニューロンの静止膜電位、バースト内発火頻度に有意な影響を与えず、活動電位の発火休止を惹起することもなかった。

### 結論

プロポフォールは延髄呼吸性ニューロンのうち、吸息先行型および呼息性ニューロンの活動を抑制したが、吸息性ニューロンに対しては抑制作用を示さなかった。プロポフォールによる呼吸性出力の減少は、主として吸息先行型ニューロンの抑制を介するものと考察された。また、この呼吸抑制にはGABA<sub>A</sub>受容体の活性化が関与することが示唆された。

## 論文審査の要旨

全身麻酔薬プロポフォールは、比較的強い呼吸抑制作用を有することが報告されているが、延髄呼吸中枢に対する作用と機序は明らかではなかった。本研究では新生ラット摘出脳幹脊髄標本を使用し、プロポフォールに対する延髄呼吸性ニューロンの反応と、GABA<sub>A</sub>受容体の役割を検討した。プロポフォールは、吸息先行型ニューロンと呼息性ニューロンの活動を抑制するが、吸息性ニューロンには直接には作用しないことが明らかにされた。プロポフォールの呼吸抑制作用には、その麻酔作用と同じく、GABA<sub>A</sub>受容体の賦活化が関与することの間接的証拠が示された。また、プロポフォールが、吸息先行型ニューロンのGABA<sub>A</sub>受容体に作用する可能性が示唆された。

審査ではまず、呼息性ニューロンの抑制が呼吸リズムに与える影響について質問された。呼息性ニューロンは吸息相と呼息相の変換に関与している可能性があるがその役割は明確にされていないこと、吸息相の終了は主として吸息性ニューロンの不応期によるもので、呼息性ニューロンの抑制によっても吸息相の延長は観察されないこと、したがって、呼息性ニューロンの抑制が呼吸回数や吸息パターンに与える影響は小さいと考察されることが回答された。また、プロポフォールとピククリンの作用点について質問がなされた。プロポフォールはGABA<sub>A</sub>受容体の塩素イオンチャネル付近に、ピククリンはGABA結合部位に結合すること、GABA<sub>A</sub>受容体がプロポフォールに対して高い感受性を有することはアフリカツメガエルの卵母細胞に発現した組換え受容体を用いた研究で証明されていることが回答された。次に、幼若ラットにおける呼吸リズム形成機構の成熟性について質問された。新生ラットにおいても、呼吸性ニューロン中の基本的シナプス結合がすでに存在すること、出生後約2週間でペースメーカー細胞群による呼吸リズム形成から、ネットワーク内の呼吸性ニューロン群の相互抑制による呼吸リズム形成への変化が起こると考えられることが回答された。続いて、麻酔下のヒト脳脊髄液中のプロポフォール濃度と本研究の灌流液中の濃度との比較について質問がなされた。前者は後者より非常に低かったこと、これは静脈内に投与されたプロポフォールの一部だけが組織中から脳脊髄液中へ移動して、生体内の環境において希釈された結果であって、標的組織内の濃度を反映するものではないと考えられることが回答された。このほか、実験結果で、吸息先行型ニューロンと呼息性ニューロンについて個別に記載すべきであること、考察で、プロポフォールがβ<sub>1</sub>サブユニットにのみ作用するような記述があり誤解を招きやすいとの指摘があった。

以上のように、本研究は、いくつかの検討すべき課題を残しているが、プロポフォールの延髄呼吸中枢に対する抑制作用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  
内科学 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範  
外科学 小林 紘一  
学力確認担当者：北島 政樹、鈴木 則宏  
審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成16年 8月20日

# Down-regulation of matrix-invasive potential of human liver cancer cells by type I interferon and a histone deacetylase inhibitor sodium butyrate.

(I型インターフェロン及び酪酸によるヒト肝細胞癌株に対する細胞外基質浸潤抑制効果)

金子 文彦

## 内容の要旨

我々は培養ヒト肝細胞癌株を分化誘導させることにより、その悪性を低下させることを検討してきた。特にインターフェロン- $\alpha$ やヒストン脱アセチル化阻害薬である酪酸が、ヒト肝細胞癌の増殖を濃度依存性に抑制し、正常への形成変化を誘導することを報告してきた。

本研究では肝細胞癌の転移機序における細胞外基質浸潤に着目し、インターフェロン及び酪酸がヒト肝細胞癌の細胞外基質(マトリゲル)浸潤および浸潤に重要な役割を果たすマトリックスプロテアーゼ活性に及ぼす作用につき検討した。

6種類のヒト肝細胞癌株(HLE, HLF, PLC/PRF/5, HepG2, HCC-T, HCC-M)を用いたマトリゲルインベージョンアッセイによるマトリゲル浸潤能の測定では、HLEとHLFのみが高浸潤能を示した。HLEとHLFを $1 \times 10^3$ U/mlのインターフェロン、2mMの酪酸にて7日間刺激培養したところ、アポトーシスは誘導されなかったが、細胞形態が変化し、マトリゲル浸潤能は有意に低下した。また、ゼラチンゼイモグラフィーによる検討では、HLEとHLFは活性型MMP-2、潜在型MMP-2、活性型MMP-9、潜在型MMP-9を分泌していたが、インターフェロン、酪酸により両細胞株ともこれらMMPの発現は有意に低下した。さらに、両細胞株の分泌する活性型MMP-2、9を測定したところ、インターフェロン、酪酸により発現が低下した。リアルタイムRT-PCRによる検討では、MMP familyの中でもI型コラーゲンの溶解に重要なMMP-1 mRNAの発現がインターフェロン、酪酸刺激により低下した。MMPの拮抗物質であるTIMP-1 mRNA、TIMP-2 mRNAの発現に関しては、インターフェロンによって共に有意な発現の増加が認められたが、酪酸刺激ではわずかに減少し、インターフェロンと酪酸はマトリゲル浸潤能を抑制するものの、そのメカニズムには相違があると推察された。

以上の結果より、インターフェロンと酪酸は、ヒト肝細胞癌のマトリゲル浸潤能を抑制し、さらにマトリックスプロテアーゼ-2、9の発現を抑制することにより、転移を抑制することが示唆された。

## 論文審査の要旨

肝細胞癌は主に血行性に肝内、肝外へと転移し、同時性異時性多発癌とともに転移の有無が予後を左右する。本研究では、近年進行肝細胞癌の治療に用いられてきているI型インターフェロン(IFN)とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である酪酸(SB)の細胞外基質浸潤能とMMPの発現に及ぼす効果を検討した。6種類のヒト肝細胞癌株の中からマトリゲルインベージョンアッセイにて高浸潤能を示したHLEとHLFを、 $1 \times 10^3$ U/mlのIFN、2mMのSBにて刺激培養したところ、アポトーシスは誘導されなかったが細胞形態が変化し、マトリゲル浸潤能は有意に低下した。また、ゼラチンゼイモグラフィーにて、HLEとHLFは活性型、潜在型MMP-2、9を分泌していたが、IFN、SBによりこれらの発現は有意に低下した。さらに、分泌された活性型MMP-2、9をELISAで測定したところ、両薬剤により発現が低下した。リアルタイムRT-PCRによる検討では、MMP familyの中でもI型コラーゲンの溶解に重要なMMP-1 mRNAの発現がIFN、SB刺激により低下した。しかしMMPの拮抗物質であるTIMP-1 mRNA、TIMP-2 mRNAの発現に関しては、IFNとSB刺激では効果が異なり、その細胞内シグナル伝達機序には相違があることが推察された。

審査ではまず、IFNとSBによる細胞形態の変化に関して、細胞表面の突起様構造やアクチンの状態など、転移に関連する形態の変化を検討しているかとの質問があり、高倍率で細胞形態を観察すると、IFNやSBにより細胞の突起様構造が減少し、円形の構造をとるようになったこと、過去の検討では、アクチンは減少していたとの返答がなされた。またこれらの薬剤によるMMPの変化は多様であることが考えられるが、他のMMPIに関しては検討したのかとの質問に対し、MMP-1、MMP-3、MMP-7、MT1-MMP等のRT-PCRを行ったが、均一な結果が得られなかったとの返答がなされた。また、マトリゲルで高い浸潤能を示した細胞株のみでなく浸潤能の低かった細胞株についてもゼイモグラフィーを行うか、MMPのインヒビターを用いた結果を示すべきであったとの指摘があり、論文には示さなかったが、低浸潤能の細胞株を用いたゼイモグラフィーでは、MMPの分泌が少なかったとの返答がなされた。また今後臨床応用を考えるならin vivoでのモデル実験も行うべきであるとの指摘がなされた。さらに両薬剤の相乗効果はあるかとの質問に対し、文献的にはin vitroで肝細胞癌株に対して相乗効果があり、その系はSTAT1を介するものであったと返答された。

以上のように、本研究は実験系や結論の導き方に検討すべき課題を残しているものの、近年肝細胞癌に対する抗腫瘍効果の注目されているI型IFN、またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるSBが肝細胞癌株に対し細胞外基質への浸潤抑制効果を示し、その機序としてMMP-2、9の産生を抑制したことを明らかにした点で、肝臓病学上有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 医化学 末松 誠  
外科学 北島 政樹 病理学 坂元 亨字  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 北島 政樹  
審査委員長: 北島 政樹  
研究指導者: 石井 裕正 (内科学)

試問日: 平成16年 6月 15日

# ホルモン抵抗性前立腺癌に対する新規NF- $\kappa$ B活性阻害剤の抗腫瘍効果

菊 地 栄 次

## 内容の要旨

ホルモン抵抗性前立腺癌において、その増殖、あるいは浸潤に多くのサイトカインが重要な役割を果たしている。これらのサイトカインは種々のシグナル伝達系を介した転写因子によって制御されており、その転写因子のうちnuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) はサイトカイン産生遺伝子の転写調節を行う重要な因子として広く知られている。このためNF- $\kappa$ Bを直接ターゲットとした治療は、新たなホルモン抵抗性前立腺癌の治療戦略の確立につながるものと考えられる。申請者は、新規に開発されたNF- $\kappa$ B活性阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) によるホルモン抵抗性前立腺癌治療の可能性を追求した。具体的にはDHMEQの (a) 恒常的に活性化されているNF- $\kappa$ Bに対する抑制効果、(b) アポトーシス誘導作用、(c) *in vitro*および*in vivo*における抗腫瘍効果について検討した。

まず、*in vitro*におけるDHMEQのホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した。同時に $\kappa$ Bプロモーターを有するluciferase reporter plasmidを遺伝子導入することによりNF- $\kappa$ B転写活性を測定した。DHMEQがNF- $\kappa$ BのDNA結合能、I $\kappa$ B $\alpha$ タンパクに与える影響について、それぞれgel shift assay、ウエスタンブロッティングを行った。またアポトーシスの検出をTUNEL法、Annexin V/PI染色法を用いて行った。さらに前立腺癌皮下腫瘍モデルを用いて、DHMEQの14日間、腹腔内投与を行い、その抗腫瘍効果を検討した。

DHMEQはホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対して濃度依存性に、また時間依存性に増殖抑制効果を示し、NF- $\kappa$ Bの転写活性を抑制した。DHMEQはNF- $\kappa$ BとDNAの結合を阻害したが、阻害タンパクであるI $\kappa$ B $\alpha$ には影響を与えなかった。このことからDHMEQのNF- $\kappa$ B活性抑制機序にはNF- $\kappa$ BのDNA結合直接阻害、あるいは同時にNF- $\kappa$ Bの核移行阻害が考えられた。DHMEQはホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞に対してアポトーシスを誘導した。その作用機序にはBcl-2関連タンパクが関与しないことが示唆された。*In vivo*の検討において治療開始後21日目より、DHMEQ治療群 (平均腫瘍径、 $0.27 \pm 0.12 \text{cm}^3$ ) はコントロール群 ( $2.07 \pm 0.75 \text{cm}^3$ ) に比べ、有意な抗腫瘍効果を示した。

本研究結果より、DHMEQがホルモン非感受性ヒト前立腺癌細胞において恒常的に活性化しているNF- $\kappa$ Bを抑制し、腫瘍増殖を抑制することが示された。ホルモン抵抗性前立腺癌に対する確立した治療法が存在しない現在、DHMEQは今後新たな分子標的治療として期待できることが示唆された。

## 論文審査の要旨

NF- $\kappa$ Bはホルモン抵抗性前立腺癌における増殖、浸潤に大きく寄与している。このためNF- $\kappa$ Bを直接ターゲットとした治療は、新たなホルモン抵抗性前立腺癌の治療戦略の確立につながるものと考えられる。本研究では、新規に開発されたNF- $\kappa$ B活性阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) による、恒常的に活性化されているNF- $\kappa$ Bに対する抑制効果、アポトーシス誘導作用、*in vitro*および*in vivo*における抗腫瘍効果を検討した。その結果、DHMEQはホルモン非感受性前立腺癌細胞に対して濃度、時間依存性に増殖抑制効果を示し、NF- $\kappa$ Bの転写活性を抑制し、アポトーシスを誘導することが判明した。DHMEQはNF- $\kappa$ BとDNAの結合を直接阻害したが、抑制タンパクであるI $\kappa$ B $\alpha$ には影響を与えなかったことが確認された。また、*in vivo*の検討において有意な抗腫瘍効果を示すことが判明した。以上の結果から、DHMEQによるホルモン抵抗性前立腺癌治療の有用性が示唆された。

審査ではまず、ホルモン抵抗性前立腺癌の増殖とNF- $\kappa$ B活性化との関連についての質問がなされた。過剰に産生されたIL-6などのサイトカインがIKK $\alpha$ を活性化し、I $\kappa$ B $\alpha$ をリン酸化、NF- $\kappa$ Bを活性化する。NF- $\kappa$ Bはそのサイトカインの遺伝子を活性化し、産生を促す。いわゆるautocrine刺激が前立腺癌の増殖に寄与していると説明された。またNF- $\kappa$ Bにより抗アポトーシス遺伝子が活性化され、前立腺癌細胞自体のアポトーシスが抑制されているとも回答された。次に、DHMEQ治療によるアポトーシス誘導の機序について説明を求められた。本研究ではBcl-2関連タンパクの変化は認められなかったが、本治療によるSurvivinタンパクの発現の減少がすでに確認されており、IAPを介したアポトーシスの誘導が推測されると回答された。またDHMEQ治療によるNF- $\kappa$ Bの核内移行の阻害を検討する上で、核および細胞質におけるp65、p50タンパク等の局在を免疫染色法で確認すべきとの助言がなされた。最後に、DHMEQ治療の適応、臨床応用への可能性について質問がなされた。NF- $\kappa$ Bが活性化した癌腫において、直接抗腫瘍効果のみならず、抗サイトカイン療法としての効果も期待できると推測される。今後は、DHMEQの分解・代謝経路の検討、最適な投与方法の確立、抗癌剤あるいは放射線との併用効果等の検討が必要であると回答された。

以上のように、本研究では今後検討されるべき課題を残しているものの、ホルモン抵抗性前立腺癌に対する確立した治療法が存在しない現在、DHMEQが今後新たな分子標的治療として期待できることを示した有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝

先端医科学 河上 裕 病理学 坂元 亨字

外科学 北島 政樹

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 7月 7日

# COMPARISON OF K-RAS POINT MUTATION DISTRIBUTIONS IN INTRADUCTAL PAPILLARY-MUCINOUS TUMORS AND DUCTAL ADENOCARCINOMA OF THE PANCREAS

(K-ras点突然変異分布からみた膵管内乳頭腫瘍及び通常型膵管癌の特徴)

北 郷 実

## 内容の要旨

膵管内乳頭腫瘍 (Intraductal papillary-mucinous tumor : IPMT) は組織学的に過形成、腺腫、腺癌と様々な組織学的細胞より構成されているが、これらが遺伝子学的変化も伴っているのかどうか明らかでない。今回、K-ras点突然変異を利用して、IPMTと通常型膵管癌 (Ductal adenocarcinoma : DC) の病変を構成している細胞を複雑箇所より採取しその変異を解析した。さらに臨床的特徴も合わせて比較検討した。

対象は切除されたIPMT20症例とDC7例。IPMTおよびDCにおける切除標本の病理組織学的マッピングを作成し、その主病巣やその辺縁部、離れた部位の腺管からmicrodissection法を用いて検体を採取しDNAを抽出した。抽出されたDNAをEnriched PCR by Bst-NI digestion/Non-RI Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法を用いてK-ras点突然変異を検索した。変異が確認された検体ではGenetic analyzer (ABI PRISM 310) を用いて塩基配列を決定した。

20症例のIPMTから266検体、7症例のDCから88検体でDNAが抽出され解析された。K-ras点突然変異はIPMT 80%、DC 100%に認められた。変異を認めた症例で主病巣内に複数の変異型を認めたのは、IPMT 43.8%であったのに対し、DCでは認められなかった。また、主病巣で認めた変異型にIPMTとDCでは差を認めなかった。IPMTで辺縁部及び主病巣と離れた部位に変異型を認めたものはそれぞれ66.7%、62.5%で、変異を認めた全例に主病巣と同じ変異型を認めた。しかし、それ以外にIPMTは40%で主病巣と離れた部位で異なる変異型を認めた。臨床的にIPMTはDCより高齢であり、予後良好であるが、IPMT-腺癌症例を主病巣の変異型の数から単数型、複数型に分けると主病巣に単数の変異型を認めた症例は複数の変異型の症例より予後は不良でDCと差を認めなかった。

IPMTは遺伝子学的にもheterogeneityを有しており、hyperplasia-adenoma-carcinomaと緩徐に発育し、予後良好な腫瘍である。また、主病巣におけるK-ras点突然変異の検査がIPMT-腺癌の予後予測因子になる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

膵管内乳頭腫瘍 (Intraductal papillary-mucinous tumor : IPMT) は特徴的な臨床的性質を有した膵管由来の腫瘍で、膵癌と異なる遺伝子学的変化を有している可能性が高い。そこで、IPMTを構成している病変の複数箇所より腫瘍細胞を採取してK-ras点突然変異を解析した。また、通常型膵癌 (Ductal adenocarcinoma : DC) も合わせて解析し、遺伝子学的変化と共に臨床的特徴とも比較検討した。本研究ではIPMTとDCでK-ras点突然変異の頻度と変異型で差を認めなかった。しかし、IPMTは主病巣で複数の変異型を43.8%に認め、さらにIPMT腺癌症例(60%)はIPMT腺腫症例(36.5%)より高頻度であった。また、IPMTは辺縁部及び主病巣と離れた部位にもそれぞれ主病巣と同じ変異型を認めた。臨床的にもIPMT腺癌症例はDCより高齢であり、予後良好であった。

審査では、まずIPMT腺癌症例とDCの主病巣において同一症例で変異型に加え野性型を認めたことに対し、技術的な問題かそれとも癌部に異なる変異型と野生型が共存するのかと質問された。微小な検体を対象として癌細胞を採取したが、間質が含まれている可能性は否定できないと説明された。

IPMTの病理診断は困難であるがどのようにして診断したかとの質問には、WHOの診断基準に従い、一人の病理医に遺伝子の解析結果を知らせずに診断していただいたと回答された。

また、複数の変異型を認めた症例を具体的にどこから採取したものがどのような変異型を示したか提示してほしいとの要望もあった。今回は論文の紙面の制限から詳細な症例提示はできなかったが個々の症例に対するデータは保有していると説明された。

IPMT腺癌症例では症例が少なく、主病巣の変異が単数・複数で予後などを比較するのは困難ではないかとの指摘があった。もともとIPMT症例は少なく、対象症例は過去10年間の症例でDNA解析された症例が選択されており、IPMT腺癌症例の単数型が複数型より予後が不良であると結論付けることはさらなる症例蓄積が今後の課題であると説明された。

以上、本研究はさらに検討すべき課題はあるものの、IPMTはDCと異なった遺伝子学的特徴を持つこと、主病巣におけるK-ras点突然変異の検査がIPMT腺癌症例の予後予測因子になる可能性が示された点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹

病理学 坂元 亨宇 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、坂元 亨宇

審査委員長：坂元 亨宇

試問日：平成16年 7月 6日

# 潰瘍性大腸炎およびCrohn病におけるNitric Oxide産生と大腸粘膜の Nitric Oxide Synthase活性の増加

木村 裕之

## 内容の要旨

腸粘膜におけるnitric oxideの産生増大は、炎症性腸疾患の増悪因子となっている可能性がある。本研究では、潰瘍性大腸炎患者およびCrohn病患者における血中のnitric oxideと大腸粘膜のNO合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)活性を測定し、病変の活動性との関連性を検討した。さらに潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜において、炎症の程度と誘導型NOS (iNOS) 発現およびペルオキシナイトライト(peroxynitrite) 形成との関連につき組織学的に検討した。

活動期の潰瘍性大腸炎患者およびCrohn病患者の血清中NOx濃度は著明に上昇し、患者大腸粘膜のNOS活性と血清NOx濃度には正の相関が認められた。

活動期潰瘍性大腸炎患者においては、iNOS活性は病変部において著明に上昇がみられたが、非病変部の粘膜においてもわずかに上昇がみられた。このiNOS活性の増加は内視鏡的および組織学的な炎症のgradingと相関していた。iNOS免疫染色では粘膜固有層のみならず粘膜上皮にて強い発現を認め、一方、構成型NOS (cNOS) 活性の増大は潰瘍性大腸炎患者においては認められなかった。また、peroxynitriteの形成は活動性のある炎症粘膜の粘膜固有層にて観察された。それに対して、Crohn病患者では病変部のみならず非病変部の肉眼的に正常な粘膜においてもiNOS活性の著明な増大を認めた。さらにcNOS活性に関しても病変部において上昇が認められた。

以上の結果より、炎症性腸疾患患者の血中のNOx濃度上昇は腸管の炎症を反映している可能性が考えられた。粘膜内で産生されるiNOS由来のnitric oxideおよびその代謝産物は炎症性腸疾患の大腸粘膜における炎症と組織障害に密接に関係している可能性を明らかにした。しかし一方潰瘍性大腸炎とCrohn病においては、腸管病変におけるnitric oxideストレスに両者で差異がみられる可能性があると考えられた。

## 論文審査の要旨

腸粘膜におけるnitric oxideの産生増大は、炎症性腸疾患の増悪因子となっている可能性がある。本研究では、潰瘍性大腸炎患者およびCrohn病患者における血中のnitric oxide (NOx) と大腸粘膜のNO合成酵素(nitric oxide synthase, NOS) 活性を測定し、病変の活動性との関連性を検討した。さらに潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜において、炎症の程度と誘導型NOS (iNOS) 発現およびペルオキシナイトライト(peroxynitrite) 産生との関連につき組織学的に検討した。

その結果、活動期の潰瘍性大腸炎患者およびCrohn病患者の血清中NOx濃度は著明に上昇し、患者大腸粘膜のNOS活性と血清NOx濃度には正の相関が認められた。更に、活動期潰瘍性大腸炎患者においては、iNOS活性は病変部において著明に上昇がみられたが、非病変部の粘膜においてもわずかに上昇がみられた。このiNOS活性の増加は内視鏡的及び組織学的な炎症のgradingと相関していた。iNOS免疫染色では粘膜固有層のみならず粘膜上皮にて強い発現を認めた。一方、構成型NOS (cNOS) 活性の増大は潰瘍性大腸炎患者においては認められなかった。また、peroxynitriteの産生は活動性のある炎症粘膜の粘膜固有層にて観察された。それに対して、Crohn病患者では病変部のみならず非病変部の肉眼的に正常な粘膜においてもiNOS活性の著明な増大を認めた。さらにcNOS活性に関しても病変部において上昇が認められた。

以上の結果より、炎症性腸疾患患者の血中のNOx濃度上昇は腸管の炎症を反映している可能性が考えられた。粘膜内で産生されるiNOS由来のnitric oxideおよびその代謝産物は炎症性腸疾患の大腸粘膜における炎症と組織障害に密接に関係している可能性を明らかにした。しかし一方潰瘍性大腸炎とCrohn病においては腸管病変におけるnitric oxideに両者で差異がみられる可能性があると考えられた。

審査に当たっては、まず免疫組織学的検討の特異性および方法論につき質問があり、特にnegative controlの置き方、あるいは組織学的所見の把握についてより良質の写真を提示すべきとの示唆があったが、再現性について説明がなされ、了解された。

また、血中と組織とのNOxの相関について、相関からはずれる症例での腸内細菌、腸内環境の関与について質問があった。組織レベルの検索に当たって、生検場所の差異を平均化するために3ヵ所以上の生検組織をホモジナイズして使用した為、測定部位の差異というよりも腸内細菌の関与が予想されるが、今後の考察・検討課題にすべきであると指摘された。

服用薬剤の影響について質問があり、臨床検体であるため服用薬剤によりデータが修飾されている可能性があるものの、炎症を抑制する薬剤を服用していても差をもってNO産生の増大が認められることが証明されたと回答があった。

また、CDとUCとの病態差異に関し、マクロファージの発現についての観察がなされているかとの質問があり、今回は検討していないと回答され、今後検討すべきこととの指摘があった。更に、今後、大腸のバクテリアの影響についてヤサイトカインとCRPの検査値について研究を進展させる検討を続けるべきという助言がなされた。

以上のように、本研究は潰瘍性大腸炎およびCrohn病における大腸粘膜炎症にnitric oxideが関与し、両者にて差異がみられる可能性を指摘したという点で、今後検討されるべき課題を残しているものの、消化器病学上価値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 解剖学 相磯 貞和

医化学 末松 誠 外科学 北島 政樹

微生物学・免疫学 石川 博通

学力確認担当者：北島 政樹、末松 誠

審査委員長：末松 誠

研究指導者：石井 裕正 (内科学)

試問日：平成16年 5月29日

# Neutrophil depletion attenuates interleukin-8 production in mild-overstretch ventilated normal rabbit lung.

(健康肺での器械的肺過伸展時の気道IL-8産生における好中球の役割)

小 谷 真 理 子

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

(緒言) 重症呼吸不全に対する人工呼吸の有用性は広く認められる一方、近年陽圧換気自体が引き起こす急性肺傷害 (Ventilator-induced lung injury, 以下VILI) が注目されている。発生機序として大きな一回換気量 (Vt) がもたらす肺泡過伸展という器械的要因に加え、サイトカインなどの化学的要因の関与が示唆されている。中でも好中球は敗血症性肺傷害モデルにおいて重要な役割を持つとされているが、VILIへの関与については十分に解明されていない。そこでVILIにおける好中球の役割について健康肺モデルを用いて検討した。

(方法) 日本白色家兎 (体重2.2~2.5kg) を麻酔導入後気管切開し pressure controlによる4時間の人工呼吸を行った。換気方法ならびに前処置により無作為に、Vt=8 ml/kgのControl群 (C群)、Vt=20ml/kgのLarge Volume群 (L群)、人工呼吸開始4日前に硫酸ビンブラスチン0.75mg/kgを投与し好中球除去した後Vt=20ml/kgで換気したDepletion群 (D群) に分けた (各n=6)。換気終了後気管支肺泡洗浄を行い洗浄液 (BALF) を採取した。肺損傷の指標として肺乾湿重量比 (W/D) ならびにBALF/血漿中アルブミン濃度比を、またBALFおよび血漿中のIL-8、TNF- $\alpha$ 濃度、肺泡あたりの好中球数、ICAM-1およびp-selectinの発現について検討した。さらにビンブラスチンの肺泡マクロファージに対する影響を調べるため上記以外の家兎を用いてビンブラスチン投与群と非投与群 (各n=4) のBALF中マクロファージを培養しIL-8産生能を比較した。

(結果) 3群ともW/Dやアルブミン濃度比に有意差はなく、肺傷害の特徴である血管透過性亢進を示唆する所見を認めなかった。しかしL群ではC群に比べ肺泡への好中球集積とBALF中IL-8が有意に増加しており、IL-8免疫染色でも気道および肺泡上皮細胞、好中球、マクロファージ、肺動脈が強く染色された。L群の血中IL-8と血中およびBALF中TNF- $\alpha$ はC群と同様増加せず、p-selectinやICAM-1の発現も観察されなかった。一方D群におけるBALF中IL-8はL群と比較して有意に低く、IL-8免疫染色でも染色の程度は減少していた。ビンブラスチン投与群と非投与群の間でマクロファージのIL-8産生能に差は認められなかった。

(結論) 今回設定した換気量はそれ自身が直接肺傷害を引き起こす程は大きくないが、健康肺において好中球の肺流入を励起し、BALF中IL-8濃度を上昇させるには十分であった。この結果から健康肺においても陽圧換気により炎症反応の非常に初期の段階が気道・肺泡内を中心に引き起こされることが明らかとなり、その過程に好中球が重要な役割を持つことが示唆された。

重症呼吸不全に対する人工呼吸の有用性は広く認められる一方、近年陽圧換気自体が引き起こす急性肺傷害 (Ventilator-induced lung injury, 以下VILI) が注目されており、発生機序として大きな一回換気量がもたらす肺泡過伸展という器械的要因に加え、サイトカインなどの化学的要因の関与が示唆されている。中でも好中球は敗血症性肺傷害モデルにおいて重要な役割を持つとされているがVILIへの関与については十分に解明されていない。本研究では、肺傷害に特徴的な生理的変化や肺泡構造の破壊を生じないmild-overstretchモデルを新たに作成し、このモデルを用いてVILIにおける好中球の役割について検討した。本研究により、それ自身が直接肺傷害を引き起こす程は大きくない換気量が、健康肺において好中球の肺への集積およびBALF中IL-8濃度の増加をもたらすこと、またIL-8産生の過程に好中球が重要な役割を持つことを明らかにした。

審査では、まずvinblastineの投与方法および投与量について確立された方法であるのか、また好中球以外の細胞への影響はないのかとの質問がなされた。これに対し、すでに確立されたものであること、また好中球以外の細胞に関してIL-8産生能については影響がない旨回答された。次に、好中球がIL-8産生の主産生源であるという結果について、他細胞の可能性が否定されたことにより可能性はあるが、確定は難しいのではないかと指摘を受けた。続いて、健康肺を用いた本研究の結果を障害肺に当てはめることが出来るのかとの質問がなされた。健康肺と障害肺ではVILIを生じるメカニズムが異なると考えられるため、そのまま当てはめることは難しい旨回答された。これに伴い、同一の個体で健康部分と障害部分を作成したモデルにおける今後の検討を助言された。また、過伸展群および好中球除去群のPaCO<sub>2</sub>値が対照群に比べて低いことが、何らかの影響を及ぼしたのではないかと質問がなされた。各群間において有意差が認められず、いずれの群もpH値が正常であったことより影響はなかったと考えられると回答された。最後に、本研究では4時間の換気が行なわれているが引き続き換気を行なった場合、肺障害につながるかと質問がなされた。これに対して、明らかな肺障害は生じないと考えられるが、何らかのストレスやダメージが加わった場合に大きな障害へと発展する可能性が示唆される旨回答された。

以上より、本研究には今後さらに検討すべき点を残すものの、健康肺におけるmild-overstretchが好中球の集積やIL-8産生を励起することを明らかにし、VILIの発生経路に関する研究が進化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 臨床麻酔学 武田 純三

外科学 小林 紘一 内科学 小川 聡

微生物学・免疫学 石川 博通

学力確認担当者: 北島 政樹、小林 紘一

審査委員長: 小林 紘一

試問日: 平成16年 8月23日



# In situ demonstration of dendritic cell migration from rat intestine to mesenteric lymph nodes : relationships to maturation and role of chemokines.

(ラット生体内における樹状細胞の腸管より腸間膜リンパ節への移行に関する解析：  
樹状細胞成熟度とケモカインの影響についての検討)

小林 央

## 内容の要旨

樹状細胞は強力な抗原提示細胞であり、所属リンパ系器官へと移動しつつ成熟することが知られているが、移行先を決定する因子について報告は少ない。本研究では、樹状細胞が腸管壁からリンパ管を經由し腸間膜リンパ節へ移行する動態を生体観察し、成熟度の違いや、細胞上の接着分子或いはケモカインやその受容体の関与につき検討した。

Wistarラットを用い、腸間膜リンパ節除去後の腸管リンパ液及び脾臓より樹状細胞を採取した。リンパ液の未熟樹状細胞はTNF- $\alpha$ 、IL-4およびGM-CSFを用いて成熟誘導させた。樹状細胞の食食能はラテックスミクロスフェアを用い、細胞表面抗原の表出はフローサイトメトリーを用い解析した。樹状細胞を蛍光色素CFDSEで標識後に小腸漿膜下に局所注入し経時的に腸間膜リンパ節への移行細胞数を観察し、腸間膜リンパ節の凍結標本にて定量した。細胞接着分子ICAM-1及びCD11b/c、ケモカイン6Ckine (CCL21)、SDF-1 $\alpha$  (CXCL12)、MIP-3 $\alpha$  (CCL20)の関与を検討した。またケモカインに対する遊走能はポリカーボネート・フィルターを用い解析した。

腸管由来未熟樹状細胞の食食能は維持されていたが、成熟誘導された細胞の食食能は低下していた。脾臓細胞の食食能はその中間の状態であった。未熟樹状細胞はMHCII、ICAM-1、CD11b/cの表出を認めたが共刺激分子の表出は低く、成熟誘導された樹状細胞では共刺激分子およびMHCIIの表出が増加し、脾臓細胞はその中間的パターンを示した。未熟樹状細胞は、局注48時間において腸間膜リンパ節へ最大移行したが、成熟及び脾臓樹状細胞は、24時間後に最大となった。ICAM-1やCD11b/cに対する抗体投与は樹状細胞の移行に影響を与えなかった。成熟樹状細胞はCCL21への遊走能を示し、CCR7の脱感作により腸間膜リンパ節への移行が阻害された。脾臓細胞はCCL21へ弱い遊走能を示したがCCR7脱感作により移行は抑制されなかった。未熟樹状細胞はCCL20への遊走能を示し、リンパ節移行はCCR6の阻害によって抑制された。腸間膜リンパ節ではCCL20発現を認め、一方CCR6とCCR7のmRNAは未熟及び成熟樹状細胞両者で確認されたが、前者は未熟細胞において、後者は成熟細胞において強く発現していた。

従来樹状細胞は刺激下でのみ末梢からリンパ節へ移行すると考えられていたが、腸管リンパ由来の樹状細胞は無刺激の状態でも、定常的に移行していることが明らかになった。脾臓細胞が成熟細胞の移行動態と類似していることは、成熟度が移行速度を規定する主たる因子であることを示唆している。また本研究は腸間膜リンパ節への移行にケモカインとそのリガンドが重要な役割を果たすことを示した。

## 論文審査の要旨

本研究では、樹状細胞が腸管壁からリンパ管を經由し腸間膜リンパ節へ移行する動態を生体観察し、成熟度の違い、細胞上の接着分子或いはケモカインとその受容体の関与につき検討した。

Wistarラットを用い、腸間膜リンパ節除去後の腸管リンパ液及び脾臓より樹状細胞を採取しTNF- $\alpha$ 、IL-4およびGM-CSFを用いて成熟誘導させた。樹状細胞の食食能はラテックスミクロスフェアを用いて測定し、未熟樹状細胞の食食能は維持されていたが、成熟誘導された細胞の食食能は低下し脾臓由来樹状細胞の食食能はその中間的な状態であったことが明らかとなった。細胞表面抗原の表出はフローサイトメトリーを用い解析し、未熟樹状細胞ではMHCII、ICAM-1、CD11b/c

の表出を認めたが共刺激分子の表出は低く、成熟誘導された樹状細胞では共刺激分子およびMHCIIの表出が増加し、脾臓由来樹状細胞はその中間的パターンを示した。樹状細胞を蛍光色素CFDSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) で標識後に小腸漿膜下に局所注入し経時的に腸間膜リンパ節への移行細胞数を観察し、腸間膜リンパ節の凍結標本にて定量した。またケモカインに対する遊走能はポリカーボネート・フィルターを用い解析した。未熟樹状細胞では、局注48時間後に腸間膜リンパ節へ最大移行したが、成熟及び脾臓由来樹状細胞では、局注24時間後に最大となり、ICAM-1及びCD11b/cに対する抗体投与は樹状細胞のリンパ節への移行に影響を与えなかった。成熟樹状細胞はCCL21への遊走能を示し、CCR7の脱感作により腸間膜リンパ節への移行が阻害された。脾臓由来樹状細胞はCCL21への弱い遊走能を示したがCCR7の脱感作ではその移行は抑制されなかった。未熟樹状細胞はCCL20への遊走能を示し、CCR6の脱感作にて腸間膜リンパ節への移行は抑制された。更に、腸間膜リンパ節でのCCL20蛋白の発現が確認された。未熟及び成熟樹状細胞におけるCCR6とCCR7の発現がmRNAレベルで確認されたが、前者は未熟樹状細胞において、後者は成熟樹状細胞において強く発現していた。

これらの結果より、従来樹状細胞は刺激下でのみ末梢からリンパ節へ移行すると考えられていたが、腸管由来の樹状細胞は無刺激の状態でも、定常的に移行していることが明らかになり、また脾臓由来樹状細胞の移行動態が成熟樹状細胞の移行動態と類似しているのは成熟度が移行動態を規定する主たる因子であること、腸間膜リンパ節への移行にケモカインとそのリガンドが重要な役割を果たすこと、などが示唆された。

審査では、本研究において胸管ドレナージによって得られた樹状細胞の性格について質疑がなされた。一般の未処置のラットにおいて同様の処置を行った場合にはほとんど樹状細胞がとれないが本研究において腸間膜リンパ節除去ラットでは有意な数での樹状細胞が採取されたこと、食食能や表面抗原の状態から得られた樹状細胞は未熟の状態に近い樹状細胞であると推測されること、腸管漿膜除去ラットの腸管を観察したところ炎症反応など病理学的所見に乏しかったことから非刺激下で樹状細胞が採取されたと予想されること、などが述べられ、了解された。

また、臨床との関連での質問に対して、ヒトでも未熟に近い状態の樹状細胞が循環し免疫寛容に関わっているとの文献的報告が見られること、担癌患者においてはガン細胞と反応させ抗原提示をさせるためには食食能を有する未熟な樹状細胞が良いが、T細胞と反応し活性化させるためには成熟化した樹状細胞が望ましいこと、などが述べられた。

なお、論文中の組織写真については改善の必要が望まれること、in vitroで成熟誘導を行った樹状細胞の他にin vivoにて成熟誘導を行った樹状細胞でも表面抗原の解析を行うことも望まれることなどの指摘があった。

以上の審査の結果、本研究は、将来免疫反応の異常によって惹起されるアレルギー疾患、炎症性腸疾患の病態解明へと至る腸管樹状細胞についての基本的性格を明らかにしたものとして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 解剖学 相磯 貞和  
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  
研究指導者：石井 裕正 (内科学)

試問日：平成16年 6月 7日

# 網膜におけるNO、CO生成系を介した可溶性グアニル酸シクラーゼの調節

下山 勝

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

〔目的〕可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) は、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) などのガス状モノオキسدが結合することによって活性化されるが、COによるsGC活性化は、*in vitro*ではNOに比べてはるかに弱いとされている。*in vivo*において、NO依存性のsGC活性化にCOが影響を及ぼしているとの報告があるが、COによるcGMPの調節については不明な点が多く残されている。本研究では、ラット網膜組織を用いてsGCの局在を免疫組織学的に調べるとともに、sGC活性化機構における内因性ガスCOとNOの相互作用を調べることを目的とした。

〔方法〕2種類の抗sGCモノクローナル抗体、β鎖を認識するmAb28131と活性化の状態を識別できるmAb3221を用いてラット網膜におけるsGCの免疫組織学的局在を調べた。ガス生成系酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO) とNO合成酵素 (NOS) の発現についてもモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。内因性のガス生成系に影響を及ぼす薬剤、L-アルギニン、N<sup>o</sup>-ニトロ-L-メチルアルギニンメチルエステル (L-NAME)、亜鉛プロトポルフィリンIX (ZnPP) をラットに投与し、網膜各層におけるmAb3221の染色性の変化を半定量的に解析した。また、*in vitro*において、ウシから精製したsGCにより産生されたcGMP量をenzyme-linked immunosorbent assayを用いて測定し、NOおよびCOによるsGC活性化の程度、およびそれらの相互作用を調べた。

〔結果〕免疫染色の結果、ミュラー細胞とオン型双極細胞にsGC発現が認められた。網膜におけるHO-2の主要な発現細胞はミュラー細胞であった。nNOSはアマクリン細胞に発現が認められた。染色性の半定量的解析の結果、L-アルギニン投与のみならずHO阻害剤であるZnPP投与によってもmAb3221の染色性が著明に増加した。外境界膜においてはL-NAME単独投与の時に比べて、ZnPPとL-NAMEの同時投与の方がmAb3221染色性を顕著に減少させたが、この相乗効果は内顆粒層および内網状層では認められなかった。*in vitro*の実験においてCOはNO濃度が低い時にはsGCを軽度活性化していたが、NO濃度が高くなるとsGC活性に対し抑制的に作用していることが確認された。

〔結論〕ミュラー細胞は、sGC含有細胞であると同時にHO-2も発現していることが確認された。外境界膜ではNOの非存在下でも基礎的なsGC活性化の維持においてCOがその役割を担っていることが示され、網膜の各層においてsGCはオートクラインおよびパラクラインの調節を受けていることが示唆された。また、*in vitro*の実験からもNOによるsGC活性化に対してCOが調節的役割を果たしていることが確認された。

cGMPは網膜における光情報伝達において中心的な役割を果たしている。視細胞ではcGMP生成系としてNOやCOの調節を受けない膜結合型のグアニル酸シクラーゼ (pGC) が知られており、ホスホジエステラーゼ (PDE) による調節を受けている。しかしながら他の神経細胞や支持細胞におけるcGMP生成系については蛋白局在および調節機構に関して不明な点が多く残されていた。

本研究では、ラット網膜組織において、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) がミュラー細胞とオン型双極細胞に発現していることが確認された。また、内顆粒層および内網状層においては、sGCはNO依存性に活性化されており、COがこれに対し抑制的にコントロールしていることが確認された。一方外境界膜では、基礎的なsGC活性化の維持においてCOがその役割を担っており、sGCが網膜の各層によって部位特異的に内因性ガスの調節を受けていることが解明された。

審査においては、まず免疫染色を用いてsGC活性の定量化が可能か質問された。これに対し、本研究において確認されたsGCの染色性の変化はアセトン固定、ホルマリン固定を施した標本では検出できないため、今回示した固定法を用いればNOの結合に伴うsGCの活性化を意味する蛋白の構造変化を反映した変化を拾い上げると回答された。これに関し、他の方法で定量が可能であるか質問があり、培養細胞を用いてcGMP量を定量する方法も技術的には可能であるものの、その局在を解明することはできず、今回の方法はそれを補完するものと回答があった。さらに、NOS陽性細胞として確認された血管内皮細胞やアマクリン細胞から産生されるNOが、sGCの局在するミュラー細胞や双極細胞に影響を及ぼすか質問された。これに対しては、NOの拡散距離および半減期は、血流や酸素濃度の状態に左右されるため生理学的状態で実際に影響を及ぼす距離およびその濃度は不明であるが、NOがthiolと複合体を形成して輸送、分泌されることにより組織内を移動する可能性があることと回答された。その他、免疫染色における陽性細胞同定については二重染色のみならず、ミュラー細胞においてはCa<sup>2+</sup>、HO2、sGCの3重染色を行うと明解になるとの助言があった。また、sGCの局在に関してミュラー細胞と双極細胞は同定してあるが、他の細胞での発現がないことの証明が必要であることが指摘された。また今回確認された内因性ガスによるsGCの活性化調節がpGCを介した光情報伝達に与える影響、さらにはオン型双極細胞においてsGCが発現している意義について考察が不十分である事が指摘されたため加筆訂正を行うものとした。以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題が残されているが、内因性ガスメディエータによるsGCの調節機構について、*in vitro*、*in vivo*双方の系を用いて系統的に検討されており、神経組織におけるガス分子を介した情報伝達機構に関して新たな研究分野を展開させる可能性もあり興味深くかつ有意義な論文であると高く評価された。

論文審査担当者 主査 医化学 末松 誠  
生理学 岡野 栄之 解剖学 仲嶋 一範  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 北島 政樹、岡野 栄之  
審査委員長: 岡野 栄之  
研究指導者: 小口 芳久 (眼科学)

試問日: 平成16年 6月23日

# Ultrastructural Analysis of the Paranodal Junction of Myelinated Fibers in 31-Month-Old-Rats.

(31ヶ月齢ラットでの髄鞘化神経線維のパラノードジャンクションにおける超微細構造の分析)

杉 山 一 郎

## 内容の要旨

老化とともに神経系においては、ニューロンの萎縮や喪失、グリア細胞やミエリン(髄鞘)の低形成など、多くの形態的变化がもたらされ、加齢による脳機能低下の原因になっていると考えられている。

その中でも、ミエリンは、神経系において、電気的インパルスの伝導度を高め、情報処理能力を増すという重要な役割を果たしている。最近、老化に伴って、大脳灰白質の質量はほぼ保たれるのに対して、大脳白質量が著明に減少していくことが分かり、その大きな原因のひとつがミエリンの喪失であるとの報告がされている。

今回私は、31ヶ月の老齢ラット大脳を材料として、はじめに電子顕微鏡を用いて形態学的解析を試みた。すると神経軸索のパラノード領域において、マクロファージの出現、ミエリンと軸索との分離、ミエリンの層構造の分裂及び風船形成など、1ヶ月の若齢ラットには見られない所見を認めた。神経軸索のパラノード領域は、軸索が髄鞘化されていく際の起始部となる、ミエリン形成において極めて重要な領域であり、老齢ラットではこの領域において非常に特徴的な所見を示していることが分かった。組織化学の結果からは、この変化が特に脳梁において顕著であることが示唆された。さらに生化学的解析を試みたところ、主要なミエリン関連タンパク質の構成パターンについては若齢及び老齢ラットで大きな差を認めなかったが、ミエリンの総量については、老齢ラットにおいて減少がみられることが分かった。そこで個々のミエリン関連タンパク質について、ウェスタンブロット法で比較してみると、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)において、そのアイソフォームのひとつである21.5-kDaが、若齢では産生しているのに対し、老齢ではほとんど産生していないことが判明した。他のミエリン関連タンパク質についても比較してみたが、若齢と老齢との間で、違いを認めなかった。

この結果は、21.5-kDa MBPが、パラノード領域におけるミエリン構造の維持等において、重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。

この研究のさらなる追究により、加齢による脳機能低下や、痴呆など加齢に関係すると考えられている神経疾患、そしてミエリンの形成と維持において異常を認める疾患について、原因を解明していくられるものと考えている。

## 論文審査の要旨

加齢に伴う脳機能低下の原因として、ニューロンの萎縮や喪失、グリア細胞やミエリン(髄鞘)の低形成などの形態的变化があるといわれている。ミエリンは、神経系において、電気的インパルスの伝導度を高め、情報処理能力を増す役割を果たしている。老化に伴う大脳白質量減少の原因のひとつとしてミエリンの喪失が報告されている。本研究では、31ヶ月の老齢ラット大脳を材料として、電子顕微鏡を用いた形態学的解析と生化学的解析を行い、老化による変化を検討した。電顕では、神経軸索のパラノード領域を中心として、マクロファージの出現、ミエリンと軸索との分離、ミエリンの層構造の分裂及び風船形成などの特徴的な所見を認めた。生化学的解析では、主要なミエリン関連タンパク質の構成パターンは若齢と老齢で大きな差を認めなかったが、ミエリンの総量については、老齢で減少していた。ウェスタンブロット法による個々のミエリン関連タンパク質の解析では、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)において、アイソフォームのひとつである21.5-kDaが、老齢で産生が低下していることが判明した。この結果から、21.5-kDa MBPが、パラノード領域におけるミエリン形成に、重要な役割を担っている可能性が示唆された。

審査では、まず、電顕標本を作製する際の灌流固定の方法についての質問がなされた。リングル液で十分に血液を灌流してから、固定液でも灌流、浸透固定しており、電顕像でのartifactの影響は少ないと回答された。また、老齢ラットでは具体的に何か症状のようなものがあつたかとの質問がなされた。focalな症状は認めなかったが、全体的に活動性の低下、運動能力の低下を認めていたと回答された。またMBPのウェスタンブロット解析の結果で、老齢ラットでのdegraded MBPのバンドが強く出すぎているのではとの指摘があつた。Degraded MBPのバンドについては、数回施行した確認実験でも強弱はまちまちで、特異的でなく、どの実験においても21.5-kDa MBPは産生が弱かつたことが説明された。さらに遺伝子レベルでは、老齢と若齢で差があるのかとの質問がされたが、遺伝子レベルでの確認については、今後実験をすすめていくとの回答がされた。細胞分画法についても言及があり、実際にパラノード領域が採れているのか、パラノードの変化を見るにはコントロールをとり、プロテアーゼインヒビターの活性を見るべきであるとの助言がなされた。またinternal controlの必要性についても助言があつた。さらにMBP遺伝子に関連して、golli proteinについての質問がなされた。MBP遺伝子がproduceする2つのタンパクファミリーの1つで、自己免疫の過程で重要なタンパクであり、ミエリンの構成物質ではないとの回答がされた。

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、老化によるミエリンの形成異常およびミエリン塩基性タンパクとの関連が示唆された点において、有意義な論文であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 河瀬 斌  
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 北島 政樹、仲嶋 一範  
審査委員長: 仲嶋 一範

試問日: 平成16年 7月26日

# 低酸素イメージング薬剤を用いた核医学的手法による放射線治療効果の予測

鈴木 天之

## 内容の要旨

【目的】腫瘍組織の酸素状態は放射線療法や化学療法に対する感受性を決定する要素のひとつであり、腫瘍の酸素状態を非侵襲的に把握することが癌治療において重要である。本研究は、低酸素組織親和性化合物として共同開発した<sup>99m</sup>Tc-HL91 (4,9-diaza-3,3,10,10-tetramethyldecane-2,11-dione dioxime) の特性と腫瘍組織の酸素状態との関係を検討し、腫瘍の放射線反応性と当該の腫瘍への<sup>99m</sup>Tc-HL91の取り込みとの相関から、<sup>99m</sup>Tc-HL91シンチグラフィによって腫瘍の放射線治療効果を予測することができるかを明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト腫瘍(胃癌MKN45、頬上皮癌KB-31、肺腺癌HLC)を大腿に植えたヌードマウスを実験モデルとして用いた。<sup>99m</sup>Tc-HL91を投与後腫瘍への<sup>99m</sup>Tc-HL91の取り込みと酸素プローブにより測定した腫瘍組織の酸素分圧との相関を求めた。各種腫瘍組織内の<sup>99m</sup>Tc-HL91分布をオートラジオグラフィにて調べた。さらに、腫瘍に4MVリナックX線を照射し、逐次<sup>99m</sup>Tc-HL91シンチグラフィを施行して、腫瘍への<sup>99m</sup>Tc-HL91の取り込みを腫瘍の成育とともに評価した。

【結果】酸素分圧が対筋肉比で0.55未満の腫瘍へは<sup>99m</sup>Tc-HL91が血液中の約1.25倍取り込まれ、比分圧が0.55以上の酸素分圧の高い腫瘍では<sup>99m</sup>Tc-HL91の取り込みは血中の約0.95倍であった。<sup>99m</sup>Tc-HL91の取り込みが血中のそれよりも高い腫瘍の酸素分圧(対筋肉比)は平均0.50で、取り込みが血中より低い腫瘍の比分圧の平均は0.61であった。オートラジオグラフィの所見は、<sup>99m</sup>Tc-HL91が壊死部とviable部で低く、その境界領域、すなわち低酸素と推測される領域で高い分布を示していた。<sup>99m</sup>Tc-HL91シンチグラフィを放射線照射前後に行い、照射後に<sup>99m</sup>Tc-HL91の集積が増加した腫瘍は放射線に対する反応が不良であった。また、照射後に集積が低下した腫瘍では放射線に対する反応が認められた。

【考察】<sup>99m</sup>Tc-HL91は酸素分圧がより低い腫瘍組織に集積する特性があり、<sup>99m</sup>Tc-HL91を用いた核医学検査により腫瘍の酸素状態を非侵襲的に把握しうることを示していた。したがって、放射線照射後に<sup>99m</sup>Tc-HL91の集積が増加することは腫瘍細胞が増殖を続けている、または低酸素細胞が増加していることを示唆し、<sup>99m</sup>Tc-HL91の集積が減少することは、腫瘍組織が治癒して壊死化している、または低酸素細胞が減少していることを示唆していると考えた。以上より、<sup>99m</sup>Tc-HL91シンチグラフィによって放射線治療の効果を非侵襲的に予測することが可能で、本法は放射線治療の継続や治療方針の変更などの治療計画を立てるに際して有用な方法と考えられた。

## 論文審査の要旨

腫瘍組織の酸素状態は放射線療法や化学療法に対する感受性を決定する重要な要素のひとつである。本研究は、低酸素組織親和性を示す化合物<sup>99m</sup>Tc-HL91 (4,9-diaza-3,3,10,10-tetramethyldecane-2,11-dione dioxime) の集積を調べることにより腫瘍の酸素状態を非侵襲的に把握し、放射線治療効果を予測しうるが明らかにし、癌の治療方針決定に際してのその有用性を検討するために行った。

ヒト腫瘍を大腿に植えたヌードマウスを用いて、酸素プローブにより測定した腫瘍内部の酸素分圧と腫瘍への<sup>99m</sup>Tc-HL91の取り込みとの関係を検討した結果、酸素分圧の低い腫瘍の<sup>99m</sup>Tc-HL91取り込みが高い傾向があった。腫瘍のオートラジオグラムと病理標本を比較したところ、<sup>99m</sup>Tc-HL91の集積は壊死部とviable部で低く、その境界領域(低酸素と推測される)で高かった。また腫瘍に4MVリナックX線を照射し、その成育を測定するとともに、逐次シンチグラフィを行って腫瘍への<sup>99m</sup>Tc-HL91の取り込みを評価した。照射後に集積が増加した腫瘍は放射線に対する反応が不良で、逆に照射後集積が低下した腫瘍では放射線に対する反応が認められた。

審査においては、まず<sup>99m</sup>Tc-HL91の低酸素細胞への集積機序について質問がなされた。これに対して、完全には解明されていないものの、低酸素細胞中でTcが還元され価数が低下し、水溶性となることで細胞内に停留するとの報告があると回答された。次に、低酸素細胞で放射線治療の効果が薄い理由を確認する質問がされた。それに対し、放射線の間接作用であるラジカルの発生が低酸素下で少ないためと回答された。また、血流の乏しいであろう低酸素部に<sup>99m</sup>Tc-HL91が集積するのは何故かとの質問がされた。これに対しては、少ないながらも低酸素細胞に到達した<sup>99m</sup>Tc-HL91が細胞内に停留するためとの考察が回答された。さらに、オートラジオグラフィの実験においてviable部と壊死部の境界領域を低酸素としてよいかとの質問がされた。これは確証に乏しいが、酸素の豊富なviable部と酸素の乏しい壊死部の境界が低酸素状態にあるという推測に矛盾はない旨、回答がなされた。最後に、研究に用いた腫瘍の組織像を詳細に検討すべきとの指摘と、照射前に<sup>99m</sup>Tc-HL91の取り込みでその後の治療効果を予測できることがより望ましいという意見があった。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているものの、<sup>99m</sup>Tc-HL91を用いた核医学検査により腫瘍の酸素状態を非侵襲的に把握し、放射線治療効果を予測することが可能となり、癌の治療方針決定における臨床応用の可能性を示唆したという点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 放射線医学 久保 敦司  
放射線医学 栗林 幸夫 外科学 北島 政樹  
病理学 坂元 亨宇  
学力確認担当者: 北島 政樹、栗林 幸夫  
審査委員長: 栗林 幸夫

試問日: 平成16年 8月25日

# EVALUATION OF NOVEL MODIFIED TANGENTIAL IRRADIATION TECHNIQUE FOR BREAST CANCER PATIENTS USING DOSE-VOLUME HISTOGRAMS.

(DVH解析を用いた腋窩リンパ節領域を含む接線照射法の評価)

武田 篤也

## 内容の要旨

乳癌の治療法は拡大切除から縮小切除へと移行し、今日早期乳癌の標準的治療法は乳房温存療法となっている。標準的な乳房温存療法は、原発巣とその近傍組織のみを切除し、同時に腋窩郭清を施行し、その後残存乳房に対し放射線治療をする方法である。早期乳癌において、この乳房温存療法は乳房切除術と比較して同等の生存率であることが多くの臨床試験で証明されている。さらに最近では全例に標準的腋窩郭清 (level I - II 郭清) をすることが疑問視されている。今後臨床的腋窩リンパ節転移陰性例に対しては腋窩非郭清もしくはsentinel node biopsyのみを施行し、腋窩領域の局所制御を放射線治療にゆだねられる可能性も考えられ、その場合は腋窩領域が十分に照射されている事を検証する必要がある。現行の接線照射は、残存乳房に効率よく照射する照射法であるが、この方法では腋窩領域の照射範囲、線量は不十分かつ不確定である。

我々は以前腋窩リンパ節郭清時に留置したクリップの位置をCTと位置決め時のX線写真により確認した。その結果接線照射時、外側からの照射作成において、照射野背側縁が上腕骨頭背側、頭側縁が上腕骨頭尾側に設定することで腋窩リンパ節領域をほぼ網羅可能であることを報告した。

この腋窩リンパ節領域を考慮した接線照射法 (modified tangential irradiation technique : MTIT) における乳房、腋窩、肺野、心臓のDVH (dose volume histogram) を算出し、腋窩リンパ節領域を考慮しない通常の接線照射 (conventional tangential irradiation technique : CTIT) のDVHと比較した。

対象は早期肺癌例に対し、乳房温存手術+腋窩郭清を施行し、その後接線照射を施行した44例である。それぞれ22例ずつに術後MTIT、CTITにて照射野を設定し、同時にCTを撮影した。その後治療計画装置にてそれぞれの照射法における乳房、腋窩リンパ節領域 (level I II III)、肺、心臓のDVHを解析した。

その結果乳房への照射ではMTITとCTITに変化を認めなかった。腋窩リンパ節領域への照射を比較すると、MTITでは標的線量の70%以上当たる領域が、level I II IIIにおいてそれぞれ84 - 100%、59 - 100%、70 - 100%であるのに対し、CTITではそれぞれ2 - 84%、0 - 53%、0 - 31%であり、有意にMTITが高い値が示された。肺への照射は若干MTITにおいて増加するものの、心臓への照射はいずれの方法でも軽微であることが示された。

以上より、MTITは乳房への照射は十分であり、腋窩領域への照射はCTITと比較して格段に広く照射され、肺、心臓への照射は少ないことが示された。

## 論文審査の要旨

乳癌の治療法は縮小手術の方向にあり、今日早期乳癌の標準的治療法は乳房温存療法となっている。さらに将来的には腋窩の局所治療としての標準的腋窩郭清を省略できる可能性も考えられている。今後臨床的腋窩リンパ節転移陰性例に対しては、sentinel node biopsyのみを施行し、そこに転移のない例には腋窩非郭清あるいは、放射線照射で腋窩領域の局所制御を目指すようになる可能性もある。接線照射は元々肺への照射範囲を最小にしつつ、残存乳房に効率よく照射する照射法である。同時に腋窩領域にも少なからず照射されているが、その照射範囲、線量は不十分かつ不確定である。腋窩領域にも十分に照射する接線照射法を解析した結果、外側からの照射野作成において、照射野背側縁を上腕骨頭背側、頭側縁を上腕骨頭尾側に設定することで腋窩リンパ節領域をほぼ網羅可能であった。

この腋窩リンパ節領域を含めることを考慮した接線照射 (the modified tangential irradiation technique : MTIT) は通常の接線照射と比較して、各レベルの腋窩リンパ節領域および乳房に十分な線量が照射されることが確認され、肺、心臓への照射は少ないことが示された。

審査ではmicrometastasisに対し、放射線治療が有効であるかという質問がなされ、肺癌のmicrometastasisに対して、50Gy/25回の予防照射をすることにより良好な成績が報告されており有効性があると考えられる旨説明がなされたが、さらに乳癌という経過の長い分裂の少ない細胞に対しては、その効果に疑問が残り、長期の経過観察が必要であると指摘された。さらに35Gyでは制御線量として十分ではない可能性が指摘され、それに対し、50Gyが理想だが、予防照射という観点から副作用の少ない治療であることが不可欠であり、また制御率は線量と比例関係にあるので低線量でもある程度の予防効果が期待できるとの説明がなされた。次に肺への照射体積の増加は臨床上問題とならないかという質問がなされ、画像上放射線肺炎は照射野に一致した狭い範囲に出現するものの、臨床症状を有する例は経験していないとの説明がなされた。またMTITによる治療法がどのような患者に適應され、その結果良好な腋窩制御が得られるか、副作用が少ないかについて長期的な経過観察が必要であること、しっかりとinformed consentを得ることが指摘された。

以上、MTITはその有効性や副作用、適応についてさらなる検討が必要であるものの、早期乳癌患者の標準的治療法の一部を担う接線照射において、腋窩領域を網羅する方法を開発したことの意義は大きく、臨床上非常に重要であり、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 放射線医学 久保 敦司  
外科学 北島 政樹 放射線医学 栗林 幸夫  
病理学 坂元 亨宇  
学力確認担当者：北島 政樹  
審査委員長：北島 政樹

読問日：平成16年 8月25日

# Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte.

(単一卵子の直接RT-nested PCR法によって解析された  
ヒト卵子特異的ヒストンH1遺伝子の構造と発現)

田 中 雄 大

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

ヒストンは真核細胞の主要な核蛋白であり、コアヒストン (H2A, H2B, H3およびH4) と、リンカーヒストン (H1) の2種類がある。哺乳動物のヒストンでは、H4を除いて複数のサブタイプが存在する。中でもサブタイプが最も多いのがH1ファミリーであり、5種類の体細胞型H1、分化段階特異的H1、精巣特異的H1、そして卵子特異的H1が報告されている。卵子特異的H1は、その発現時期が非受精卵から受精後早期までに限局していることなどから、単にDNAのパッケージングだけではなく、卵子型から胚型への遺伝子発現パターンのリプログラミングにも関わっていると考えられている。卵子特異的H1は、これまでウニ (csH1)、アフリカツメガエル (B4)、ゼブラフィッシュ (HIM)、マウス (H1foo) の4種で同定されていたが、ヒトではその存在が確認されていなかった。本研究では単一卵子からヒト卵子特異的H1遺伝子の同定を行なった。

当大学医学部倫理委員会承認の上、顕微授精を施行した卵子のうち、受精が成立しなかった非受精卵を患者カップルの文書による同意の上使用した。マウス卵子特異的H1と相同性が高い、DNA配列およびmRNA配列をヒトゲノムデータベースから検索し、この配列をもとに、異なる4箇所のプライマー対を作成した。サルコシル溶液を用いて、非受精卵の細胞膜を破壊し、直接RT-nested PCRを行なった。得られたPCR産物の配列を決定し、contigを作成した結果、1041塩基対のオープンリーディングフレームを含む1067塩基対のcDNAが得られた。検討の結果、この遺伝子は、1) mRNAがヒト卵子のみに発現しており、他の臓器には発現していなかった、2) 推定されるアミノ酸配列との相同性は、H1fooが最も高く、ついでB4であった、3) 推定されるアミノ酸配列は、H1に特徴的なcentral globular domainをもち、他種の卵子特異的H1との相同性はこの領域が最も高かった。以上のことから、我々はこの遺伝子が卵子特異的H1ファミリーに属すると考え、これをosH1 (oocyte-specific H1) と命名した。データベースの解析により、osH1遺伝子は、1) イントロンを有している、2) mRNAがpolyA tailを有している、3) 他のH1遺伝子に特徴的に見られるcis-element (H1 box, GC rich-element) が存在していない、4) 種間のアミノ酸配列の保存性が、他のH1サブタイプに比べて著しく低い、といった、体細胞型H1とはかなり異なる構造をもっていることが明らかになった。ヒトの体外受精において、精子プロタミンと卵子ヒストンの置換不全が受精障害の一因であるといわれ、今後、本研究で同定したosH1遺伝子の詳細な機能解析は受精のメカニズムの解明につながるものと考えられる。

本研究では、体外受精から得られたヒトの単一非受精卵より、直接RT-nested PCRを行い、1041塩基対のオープンリーディングフレームを新たに同定した。この遺伝子は、多種の卵子特異的ヒストンH1と最も相同性が高く、更にcentral globular domainといわれるH1共通の構造を有していることから、ヒト卵子特異的H1と考えられ、これをosH1 (oocyte-specific H1) と命名した。データベースの解析により、osH1遺伝子は、体細胞型H1とはかなり異なる構造をもっていることが明らかになった。

審査では、まず使用したヒト非受精卵についての質問があった。これについて、顕微授精施行後、48時間以内に前核形成に至らなかった破棄予定卵を非受精卵と定義し、患者カップルの文書による同意を得た上で、実験に使用したと返答された。体細胞型H1と卵子特異的H1の機能的な差異について質問があった。これについて、他種の卵子特異的H1における知見を例に出しながら、一般的にH1の機能はDNAの高度のパッケージングであるが、卵子特異的H1には、それに加えて卵子型から胚型への遺伝子発現パターンのリプログラミングにも関わっていると考えられている、しかしながら詳細な機能解析は今後の検討課題であるとの説明があった。また、データベース解析から、osH1遺伝子の遺伝子座が第3染色体短腕にあるという結果について、ヒトの3番染色体のゲノム配列のデータベースはつい最近まで不十分なところがあり、遺伝子座の決定については、複数のデータベースを併用するなど、慎重をきたす必要があるという指摘があった。更に、osH1のmRNAのスプライシング部位が、NCBI (National Center for Biotechnology Information) が予測していたものと異なることを明らかにしたことについて、推測に使用されたアルゴリズム (GenomeScan) のプログラミング構造についても考察すべきではないかという指摘があった。卵子特異的H1とリンカーDNAの結合が緩徐であることが種間の多様性を許容したのではないかという考察に対して、卵子特異的H1が非常に速やかに精子プロタミンを置換するという事実と矛盾するのではないかという指摘があった。これについて、プロタミンと卵子特異的H1との置換は、それぞれのタンパクの結合能の強さに依存しているのではなく、「プロタミン脱凝集因子」など、様々なファクターが関わっている可能性があることが述べられた。最後に今後の展望についての質問があった。これについて、現在、抗osH1ポリクローナル抗体を作成し、osH1タンパク質の実際の発現を検討中であるとの回答があった。また、破棄予定となった異常卵におけるosH1タンパク質の発現の有無を調べることによって、ヒト不妊の原因の解明につながる可能性を検討中であるとの回答があった。

以上、本研究はいくつかの検討課題は残しているものの、ヒトの卵子特異的ヒストンH1遺伝子の転写産物を同定し、ヒトの受精・発生のメカニズムの一層の解明につながる可能性があるという点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
分子生物学 清水 信義 小児科学 高橋 孝雄  
発生・分化生物学 須田 年生  
学力確認担当者: 北島 政樹、清水 信義  
審査委員長: 清水 信義

試問日: 平成16年 7月 8日

# 抗アレルギー薬トラニラストの糸球体腎炎の進行抑制効果に関する研究

カ 石 昭 宏

## 内容の要旨

糸球体腎炎の進展過程にマクロファージが深く関与し、その走化活性化因子であるmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)が新たな治療法の標的として注目されている。抗アレルギー薬であるトラニラストは多様な抗炎症作用を有し、近年、経皮的冠動脈血管形成術後の再狭窄抑制効果が注目されている。今回我々は、腎臓メサンギウム細胞・尿細管細胞におけるMCP-1発現に対するトラニラストの影響・その作用機序につき検討するとともに、糸球体腎炎のモデルである抗Thy1.1抗体メサンギウム増殖性腎炎 (Thy1.1腎炎) に対するトラニラストの投与効果を検討した。

### 【方法】

1. ラットメサンギウム細胞および尿細管細胞においてinterleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 刺激によるMCP-1の蛋白 (ELISA法)・mRNA (ノザンプロット法) 発現に対するトラニラストの影響を検討した。トラニラストが細胞内情報伝達系に及ぼす影響を調べるために核転写因子nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)の活性をルシフェラーゼアッセイ法とelectromobility shift assayにより検討し、MAPkinaseの3つの主要な経路 (ERK, p38, JNK) を抗リン酸化MAPkinase抗体を用いたウェスタンプロット法にて検討した。

2. Wistarラットに対して抗Thy1.1抗体を投与して糸球体腎炎 (Thy1.1腎炎) を惹起し、この腎炎モデルに対してトラニラストを連日経口投与した。治療効果の検討のために腎組織の病理学的検討とともに、免疫組織染色の検討 (浸潤マクロファージの指標としてED-1抗原、メサンギウム活性化・間質myofibroblastの指標である $\alpha$ -smooth muscle actin) を加え、尿中MCP-1排泄量の比較も行った。

### 【結果と考察】

1. メサンギウム細胞及び尿細管上皮細胞を用いた検討においてトラニラストはIL-1 $\beta$ 刺激により誘導されるMCP-1蛋白・mRNA発現量を濃度依存的に抑制した。この抑制機序として、トラニラストによるIL-1 $\beta$ 刺激下での核蛋白NF- $\kappa$ Bの活性化の抑制作用や選択的なJNK経路の抑制作用が関与している可能性が示唆された。

2. ラット糸球体腎炎モデルでの検討では、トラニラスト経口投与による治療は尿アルブミンを減少させ、糸球体・間質へのマクロファージ浸潤を抑制し、糸球体・間質いずれにおいても病変の進展を緩和した。さらに、尿中MCP-1排泄量もトラニラストにより減少した。

以上の結果より、トラニラストはラット糸球体腎炎における糸球体・間質障害を緩和し、その機序としてメサンギウム細胞・尿細管上皮細胞におけるMCP-1発現抑制作用の関与が示唆された。将来、糸球体腎炎に対する新しい治療法としてトラニラストの抗ケモカイン作用が有望であると思われた。

## 論文審査の要旨

糸球体腎炎の進展・増悪にマクロファージが関与することから、その走化活性化因子であるmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)の抑制で、腎炎の進展阻止効果が期待される。そこで本研究では、抗炎症作用を有し、MCP-1の発現抑制効果を有する抗アレルギー薬のトラニラストに注目し、腎メサンギウムおよび尿細管細胞におけるMCP-1の発現への影響、さらに糸球体腎炎モデルである抗Thy1.1抗体メサンギウム増殖性腎炎 (Thy1.1腎炎) におけるトラニラストの効果を検討した。

トラニラストはメサンギウムおよび尿細管細胞において、interleukin-1 $\beta$ により誘導されるMCP-1蛋白・mRNAの発現量を濃度依存的に抑制した。その機序として、nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)の活性抑制やMAP kinaseの経路の抑制作用の関与を明らかにした。次にThy1.1腎炎において、トラニラストの経口投与が尿中アルブミン排泄を減らし、糸球体・間質へのマクロファージの浸潤を抑制し、尿中MCP-1の排泄量を減少させ、腎炎の進展阻止効果を呈することを明らかにした。

以上の研究に関して、まずなぜ冠動脈血管形成術後の再狭窄抑制効果が明らかにされなかったトラニラストの腎への作用に注目したのか興味もたれた。当研究者は、トラニラストのMCP-1発現抑制効果が明らかなこと、組織の線維化抑制効果を有することから腎炎の進展阻止効果が期待できると考え、in vitro、in vivoの両面より研究したとされた。

次にメサンギウム細胞および尿細管細胞の培養系での検討で、通常ヒトに投与されるよりも高濃度のトラニラストが用いられたことが問題とされた。培養液中のトラニラストは約80%が培養液中のアルブミンと結合し、活性を呈するのは遊離している約20%であるので、使用量を多くしたとしたが、培養液中の濃度を測定できればよかったと助言された。トラニラストの作用機序に関して、NF- $\kappa$ Bの活性抑制やJNK経路の抑制を介する可能性が示されたことから、腎保護効果を有するアンジオテンシン受容体拮抗薬の作用との比較がなされれば一層よかったと助言された。

腎炎モデルでの検討では、トラニラストは尿中アルブミン排泄量を減少させ、糸球体と間質へのマクロファージの浸潤抑制およびMCP-1の尿中排泄減少を示したが、この効果が一過性であることが指摘された。本研究で用いたThy1.1腎炎モデルは一過性の腎障害が特徴であることから、トラニラストの効果も一過性であった可能性があり、他の腎炎モデルでの検討が必要とされた。トラニラストのヒト腎炎への投与効果は興味あるところであり、当研究者はすでに少数例での検討で多少の効果を確認しているが、多数例での検討が計画されているとされた。

以上のように本研究は、トラニラストの効果を細胞レベルと個体レベルとで検討し、この領域で価値ある研究と評価された。しかし論文の書き方に問題点があり、図表の説明の訂正や語句の統一等の必要性が指摘された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男  
泌尿器科学 村井 勝 病理学 岡田 保典  
薬剤学 谷川原 祐介

学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝  
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成16年 7月 8日

# 皮膚電気刺激および経頭蓋磁気刺激による大脳運動野の興奮性に関する研究

都 丸 哲 也

## 内容の要旨

【目的】リハビリテーション治療手技として皮膚刺激、振動刺激など様々な感覚入力を利用し、麻痺筋への促通等を行なっているが、その多くが経験に基づくもので科学的根拠を欠いているものも少なくない。本研究は経頭蓋磁気刺激 (transcranial magnetic stimulation: 以下TMS) が皮膚刺激の運動機能促通に与える影響を電気生理学的に検索したものである。

### 【方法】

(実験1) 健常被験者8名を対象に皮膚電気刺激が大脳運動野興奮性に及ぼす影響を、特に時系列の観点から検討を加えた。条件刺激として右示指遠位橈側を感覚閾値の2倍で電気刺激した後、右第一背側骨間筋を標的筋としてTMSによる運動誘発電位 (motor evoked potential: 以下MEP) を記録した。TMSの頻度は1/7Hzと設定し、先行する電気刺激とTMSの刺激間隔を10msから100msの間でランダムに選択できるように設定した。

(実験2) 12名の被験者を対象に皮膚への電気刺激とその70ms後のTMSからなるペア刺激を0.1Hzの頻度で180回 (30分間) 行い、その後での大脳皮質の興奮性の変化を調べた。大脳皮質の興奮性は安静時MEP閾値の1.05倍刺激によるMEP振幅を指標として、180回のペア刺激前と刺激直後、10分後、20分後および30分後の4回評価を行った。ペア刺激前と刺激直後、30分後に関してはさらに静止期 (以下silent period) とF波による脊髄レベルの興奮性の測定も行った。

### 【結果】

(実験1) 電気刺激とTMSの刺激間隔が20ms、50ms、60ms、70ms、80ms、100msにおいて有意な促通を認め、70msで最大の促通現象がみられた。

(実験2) ペア刺激直後にMEP振幅は著明に増大し、時間経過とともに刺激前のレベルに戻る傾向を示した。このMEP振幅の増大はペア刺激10分後においても有意であった。Silent periodの持続時間に関しては有意な延長が30分後まで持続していた。一方、F波の振幅に関してはペア刺激前後で有意な変化を認めなかった。

### 【考察と結語】

皮膚電気刺激後20msおよび50msから80msの2つの促通現象はその出現する潜時からそれぞれ脊髄由来の促通および大脳皮質由来の促通に相当するものと考えられた。また、TMSを用いた皮膚筋反射の大脳皮質由来の促通現象の研究報告とも一致するものであった。

30分間のペア刺激によりペア刺激10分後まで有意なMEP振幅の増大を認め、皮質レベルの興奮性の評価として同時に行ったsilent periodは有意に延長し、脊髄レベルの興奮性の指標としてのF波振幅に変化を認めなかったことから、ペア刺激後のMEP振幅の増大が大脳皮質由来の変化であることが示唆された。このように皮膚筋反射の2番目の促通の時間間隔でのペア刺激を用いて大脳皮質の興奮性の増大を検討した報告は本研究が初めてであり、運動麻痺のリハビリテーション治療手段として臨床応用が示唆された。

## 論文審査の要旨

本研究は経頭蓋磁気刺激 (以下TMS) を用いて、リハビリテーション治療手技として利用されている皮膚刺激による運動機能促通に関して、電気生理学的に検索したものである。健常成人を対象に、まず、予備実験として、皮膚電気刺激がどのタイミングで大脳運動野の興奮性を最も増大させるかを調べ、皮膚電気刺激の70ms後にTMSを行った時にMEP振幅が最も増大するという結果を得た。次に、皮膚電気刺激とその70ms後のTMSからなるペア刺激を0.1Hzの頻度で30分間行い、その前後で大脳皮質の興奮性の変化を調べた。その結果、ペア刺激終了から10分後までMEP振幅の有意な増大を認め、silent periodは有意に延長した。脊髄レベルの興奮性の指標であるF波には変化を認めなかったことから、ペア刺激後の変化が大脳皮質由来であることが示唆された。このように皮膚筋反射の2番目の促通の時間間隔でのペア刺激を用いて大脳皮質の興奮性の増大を示した報告は本研究が初めてである。

審査では、まず結果の個人差や再現性に関して質問された。これに対して、皮膚電気刺激の強度 (感覚閾値の2倍と設定) の被験者による感受性の相違や身長差による潜時のずれなどの個人差が認められるが、同一体内の再現性に関しては、予備実験において良好であったと回答された。次に、皮膚電気刺激が大脳運動野に到達するまでの神経経路について質問があり、これに対して、皮膚から主にグループII線維 (圧覚、触覚) で脊髄に入り、後索を上行し、視床VPLc核を経て一次感覚野に入り、介在ニューロンを経て大脳運動野の錐体細胞に影響を及ぼすと推察していると回答された。次に、ペア刺激後にMEP振幅が増大したメカニズムに関する質問に対して、海馬のHebbian synapseにおけるlong-term potentiation (LTP) と同様の現象を想定しているとの回答があった。さらに、LTPにしては潜時が短すぎるとの指摘があったが、これについては、興奮性シナプス後電位が惹起されてから100ms以内に活動電位を起こさせることでシナプス効率を変化させることが可能であったというMarkramらの実験が紹介された。次に、MEP振幅の増大 (促通) とsilent periodの延長 (抑制) という一見矛盾した結果が得られた点について質問があり、これに対して、MEP振幅の増大は、安静時における運動の起こりやすさの増大を意味し、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介する変化と考えられているのに対し、silent periodの延長は随意収縮中における抑制系の増大を意味し、 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 受容体を介する変化と考えられていると回答された。今後の方向性として、パクロフェン、フェニトインなどの薬物の影響の検討、100ms以降のより長い刺激間隔での検討、内包後脚梗塞患者における検討などの助言がなされた。

以上、本研究にはなお検討すべき点が残るものの、運動機能促通のためのリハビリテーション治療手技としての皮膚感覚入力の重要性を電気生理学的に示し、今後の脳卒中片麻痺患者の治療手段としての応用可能性を示唆した点で、意義ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 リハビリテーション医学 里宇 明元

外科学 河瀬 斌 内科学 鈴木 則宏

解剖学 仲嶋 一範

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 8月 7日



# Glucocorticoid regulation of proteoglycan synthesis in mesangial cells.

(糖質コルチコイドによるメサンギウム細胞のプロテオグリカン産生の調節)

中 村 真 理

## 内容の要旨

腎糸球体にはバイグリカン、デコリンなど様々なプロテオグリカンが発現しており、増殖因子の機能調節等多様な機能を担っている可能性が示唆されている。現在腎炎の治療にステロイド(糖質コルチコイド)薬が広く用いられており、糸球体障害改善に有効であることが示されている。本研究では糖質コルチコイドの一つであるデキサメサゾンが各種のプロテオグリカン産生に与える影響とその機序について検討した。

### 【対象と方法】

ラットおよびヒトメサンギウム細胞をデキサメサゾンで刺激したのち、プロテオグリカン産生をCPC沈殿法で定量した。産生されたプロテオグリカンの生化学的特性は、DEAE-Sephacelによるイオン交換クロマトグラフィーとSephrose-CL2Bによる分子篩クロマトグラフィーで検討した。プロテオグリカンコア蛋白のmRNA発現は、ノーザンブロット法とRT-PCR法、蛋白発現はウェスタンブロット法で測定した。また、バイグリカン遺伝子プロモーターをメサンギウム細胞に遺伝子導入し、デキサメサゾン刺激した後、dual luciferase assayにてプロモーター活性を定量した。in vivoの実験では10週齢の雄SDラットにデキサメサゾン(5mg/kg/day)を3日間腹腔内投与した。投与後糸球体を単離し、バイグリカンとデコリンのmRNA発現をRT-PCR法により測定した。

### 【結果と考察】

メサンギウム細胞をデキサメサゾンで刺激した結果、時間および用量依存性にプロテオグリカン産生が低下し( $p < 0.01$ )、その作用は糖質コルチコイド受容体拮抗薬であるミフェプリストンにより阻害された。プロテオグリカンコア蛋白発現の検討では、デキサメサゾン投与後にデコリン発現が低下したが、バイグリカンに関してはmRNA・蛋白発現の増加ならびにバイグリカン遺伝子のプロモータ活性の有意な増加を認めた。プロモーター活性の増加が認められた場所はグルココルチコイド応答領域(GRE: glucocorticoid response element)を含んでおり、デキサメサゾンはGREを介してバイグリカン遺伝子の転写調節を行っている可能性が示唆された。in vivoにおいてもデキサメサゾン投与により糸球体のバイグリカンmRNAの増加を認めた。以上より、デキサメサゾンがプロテオグリカン遺伝子発現をサブタイプ特異的に調節していることが明らかとなった。これらの変化がステロイド薬の糸球体障害抑制効果に影響している可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

腎糸球体の細胞外マトリックスの構成成分の1つとして、バイグリカン、デコリンなど種々のプロテオグリカンが発現している。これらのプロテオグリカンは、transforming growth factor (TGF)  $\beta$ などの増殖因子の機能調節など多彩な機能を有している。本研究は、腎メサンギウム細胞における各種プロテオグリカン産生への糖質コルチコイドの影響を、ラットおよびヒトで、in vitroおよびin vivoの両実験で検討した。糖質コルチコイドとしてその作用が強力で、鉱質コルチコイド作用のないデキサメタゾン(DX)を用いた。

まず培養メサンギウム細胞での実験で、DXはラットでもヒトでもプロテオグリカン産生を抑制し、その作用が糖質コルチコイド受容体拮抗薬で抑制されることを明らかにした。プロテオグリカンのコア蛋白発現の検討では、DX投与後にデコリン発現は低下し、バイグリカンに関してはmRNA・蛋白の増加およびバイグリカン遺伝子のプロモータ活性の有意な増加を認めた。ラットを用いたin vivoの研究でも、DXの投与は糸球体のバイグリカンmRNAを増加させた。

以上の成績から、DXはプロテオグリカン遺伝子発現をサブタイプ特異的に調節し、その変化がステロイド薬の糸球体障害抑制効果に影響していると考えた。

以上の研究に関して、なぜDXを用いたのか、またその投与量がやや多いことが問題となった。本研究では諸種糖質コルチコイドのプロテオグリカン産生抑制効果の検討の結果、DXの作用が強力で安定していることからDXを使用し、しかも確実な効果を得るために、通常ヒトに投与される量よりもやや多い量を用いたとされた。次にプロテオグリカンのコア蛋白発現の検討で、デコリンが低下し、一方バイグリカンが増加した意義が目玉された。デコリンの発現低下はDXによる総プロテオグリカン産生抑制と関係しており、一方バイグリカンの増加は、バイグリカンがTGF $\beta$ と結合し、抗TGF $\beta$ 作用により腎障害の予防に貢献しているのではないかと考えた。

ヒトとラットのメサンギウム細胞を使って実験がなされたが、できればヒトに限って実験した方がよかったとされた。しかし、ヒトの細胞は入手し難いことと、結果にばらつきが出るために、ラットのメサンギウム細胞を主として用いて実験したとされた。In vivoの実験は正常ラットを用いて行われたが、腎炎モデルで検討されるべきであったと助言された。さらにこの研究とこれまでの腎疾患のステロイド治療との関連において、ステロイド反応性腎症と非反応性腎症の原因をプロテオグリカンの変化と関係づけられるかが問題となった。プロテオグリカンのサブタイプの変化が関連している可能性があるが、今後の検討課題とされた。

以上のように、本研究は糖質ステロイドの腎作用とプロテオグリカンとの関係を明らかにし、腎疾患に対する糖質コルチコイドの作用機序の解明の点で、有用な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 幸男  
泌尿器科学 村井 勝 病理学 岡田 保典  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝  
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成16年 8月24日

# Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF- $\beta$ -dependent responses in human mesangial cells.

(メサンギウム細胞の、TGF- $\beta$ 刺激反応における、ERK MAPkinase及びSmadシグナルの交互作用)

林 田 朋 子

## 内容の要旨

腎糸球体硬化症の病態には、細胞外基質（以下ECM）のメサンギウム領域への沈着と尿細管領域の狭小化を特徴とする。その病態には transforming growth factor  $\beta$ （以下TGF- $\beta$ ）等様々なサイトカインの関与が指摘されているが詳細は不明である。私どもは腎糸球体硬化の発症においてTGF- $\beta$ がいかにECMの産生を促すのか、細胞内シグナル伝達機構の調節を検討してきた。本論文ではTGF- $\beta$ の作用におけるERK MAP kinaseおよびSmadシグナルの交互作用を検討した。

(対象と方法) ヒトメサンギウム細胞およびマウス乳腺上皮細胞において、TGF- $\beta$ 1 (1.0ng/ml) の刺激後RIPA bufferで細胞内蛋白を抽出、一部は抗Smad2/3抗体にて免疫沈降し、Smadリン酸化、重合をWestern blot法にて検討した。-0.4 $\alpha$ 2 (I) collagen promoterまたはSmad3-Gal4/Gal-Lux reporterはリポフェクション法にて細胞導入し24時間TGF- $\beta$ 1刺激による転写活性を測定した。

(結果と考察) ヒトメサンギウム細胞におけるTGF- $\beta$ 1の刺激において、ERK MAP kinaseの阻害薬はSmad3転写活性、Smad2/3のセリンリン酸化及びSmad4とのヘテロマー形成を有意に抑制したが、マウス乳腺上皮細胞ではその効果が認められずERK MAP kinaseの関与は細胞特異的であることが示された。阻害薬の抑制効果は、免疫沈降したSmad2/3分子内の総リン酸化セリン量において有意であったが、受容体特異的SSXSモチーフのリン酸化には有意差を認めなかった。受容体キナーゼの基質セリンを欠くSmad3AはTGF- $\beta$ 1刺激により分子内にリン酸化セリンが認められ、ERK MAP kinase阻害薬はこれを抑制した。この結果は、TGF- $\beta$ 1刺激により活性化されたERK MAP kinaseを介して、R-Smad分子内のSSXSモチーフ以外のセリンリン酸化が誘導されることを示唆した。次にTGF- $\beta$ 1のコラーゲン転写誘導は、活性型MAP ERK kinase kinase (caMEK) 発現下で有意に亢進し、またSmad3コンストラクトの導入はコラーゲン転写を亢進した。受容体基質セリンを欠くSmad3Aの導入はTGF- $\beta$ 1の転写誘導活性を完全に抑制したが、caMEKによる転写亢進は影響を受けなかった。一方ERK MAP kinase基質配列を欠くSmad3EPMコンストラクトを導入した細胞ではcaMEKによる転写亢進は抑制されたが、TGF- $\beta$ 1の転写誘導には有意な変化を認めなかった。

以上の結果から、ERK MAP kinaseカスケードとの交互作用は、Smadシグナル伝達機構を調節しヒトメサンギウム細胞におけるTGF- $\beta$ 刺激によるコラーゲン発現に相乗的に作用することが明らかにされた。

## 論文審査の要旨

腎糸球体硬化症では、細胞外基質のメサンギウム領域への沈着や尿細管領域の狭小化が特徴であり、この病態の発症には、transforming growth factor (TGF)  $\beta$ など種々のサイトカインの関与が想定されている。本研究では、培養ヒトメサンギウム細胞を用いて、TGF $\beta$ の細胞外基質の産生亢進における細胞内シグナル伝達機構を検討した。

ヒトメサンギウム細胞においてTGF $\beta$ 1は、ERK MAP kinaseを刺激した。ERK MAP kinaseの阻害薬は、Smadと呼ばれる細胞内シグナル伝達因子、すなわちSmad

3転写活性、Smad2/3のセリンリン酸化およびSmad4とのヘテロマー形成を有意に抑制し、ERK MAP kinaseカスケードとSmadシグナル伝達機構とが密接に関係していることを明らかにした。このような作用はマウス乳腺上皮細胞では認められず、ERK MAP kinaseの関与は細胞特異的であるとした。

次にTGF $\beta$ 1のコラーゲン転写誘導は、活性型MAP ERK kinase kinase (caMEK) 発現下で有意に亢進した。受容体基質セリンを欠くSmad3Aの導入は、TGF $\beta$ 1の転写誘導活性を完全に抑制したが、caMEKによる転写亢進は影響を受けず、一方ERK MAP kinaseの基質配列を欠くSmad3 EPMコンストラクトを導入した細胞では、caMEKによる転写亢進を認めなかったが、TGF $\beta$ 1の転写誘導には有意な変化はみられなかった。

以上の研究成績から、ERK MAP kinaseカスケードの交互作用がSmadシグナル伝達を調節し、メサンギウム細胞におけるTGF $\beta$ 刺激によるコラーゲン発現に相乗的に作用していると結論した。

このような研究に関してまず問題となったのが使用されたメサンギウム細胞の安定性である。ヒトのメサンギウム細胞を用いていることからどの程度の継代培養されたものが妥当であるかが問題とされた。本研究では何度かの検討で5-6代目の細胞が安定していたことから、5-6継代の細胞を用いてすべての実験をしたとされた。また対照として用いた上皮細胞がヒトではなくマウス乳腺上皮細胞を用いたことが問題とされたが、このような実験でしばしば用いられる代表的な細胞であるからとされた。

次にメサンギウム細胞におけるTGF $\beta$ の刺激でERK MAP kinaseカスケードとSmadシグナル伝達機構とが密接に関係してコラーゲン発現に作用することを明らかにしたが、この機構の解明を臨床にどう生かすかが議論された。TGF $\beta$ の発現さらにその刺激による細胞内シグナル伝達機構が種々の条件によって影響を受けることも解明できたので、細胞内シグナル伝達の局所的な阻止により、腎硬化の阻止に有効な薬剤の開発を進めていきたいとされた。

以上のように本研究はメサンギウム細胞において、TGF $\beta$ による細胞外基質産生に関する細胞内シグナル伝達機構を明瞭に示され、腎硬化の領域に大きく貢献す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 病理学 岡田 保典  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝  
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成16年 8月24日

# Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa.

(炎症時および非炎症時の腸管粘膜におけるTリンパ球と血管内皮との相互作用におけるTECK/CCL25の役割)

細江 直樹

## 内容の要旨

近年、組織特異的なリンパ球ホーミングにおいて、リンパ球指向性C-Cケモカインの関与が示唆されてきたが、生体内の腸管における証明は少ない。本研究は、TECK (Thymus-expressed chemokine) / CCL25とそのリガンドCCR9が、マウス腸粘膜においてTリンパ球の微小血管への接着にどのような役割を果たすかにつき生体顕微鏡観察により検討することを目的とした。小腸より粘膜固有層リンパ球LPL (Lamina Propria Lymphocyte)、腸管上皮内リンパ球IEL (Intraepithelial Lymphocyte) をそれぞれ分離し、Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester solution (CFDSE) で蛍光標識し生体顕微鏡を用いて観察を行った。生理条件下 (非炎症時) では、CCR9のdesensitizationによるCCR9の阻害もしくは抗TECK/CCL25中和抗体投与により、TECK/CCL25-CCR9システムを選択的に阻害すると、小腸において粘膜微小血管へのLPL、IELの接着数が減少したが、大腸においては接着数の減少は認められなかった。Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ 投与) により、小腸、大腸粘膜においてLPLの有意な接着数の増加を認めたが、IELでは有意な増加を認めなかった。TNF- $\alpha$ 投与による炎症時においても、CCR9のdesensitization或いは抗TECK/CCL25中和抗体投与により、小腸においてのみLPL、IELの粘膜微小血管への接着数が減少したが、大腸においては接着数の減少は認められなかった。RT-PCR法によりmRNAレベルでLPL、IEL上のCCR9の発現が認められた。Chemotaxis assayの結果、LPL、IEL上のCCR9をdesensitizationすると、他のケモカインレセプターは阻害 (cross desensitization) されず、TECK/CCL25に対するLPL、IELの走化能力のみが減少することが確認された。Western blot法による検討あるいは蛍光標識抗TECK/CCL25抗体による生体観察にてTECK/CCL25の局在を検討した結果では、大腸粘膜では非炎症時、TNF- $\alpha$ 投与時とも、TECK/CCL25の発現は認めなかったが、小腸粘膜固有層においては、TNF- $\alpha$ 投与により、正常時と比較しTECK/CCL25の発現量の増加が認められた。以上の結果、非炎症時、炎症時ともに、TECK/CCL25-CCR9システムが小腸粘膜微小血管へのTリンパ球接着に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 論文審査の要旨

C-CケモカインTECK (Thymus-expressed chemokine) /CCL25は、胸腺細胞のほかに小腸での高い発現が報告されている。本研究は、TECK/CCL25とそのリガンドCCR9が、マウス腸粘膜においてTリンパ球ホーミングにどのような役割を果たすかにつき生体顕微鏡観察を用いて比較検討した。TECK/CCL25-CCR9システムを選択的に阻害する方法として、Desensitization techniqueによるCCR9の阻害もしくは抗TECK/CCL25中和抗体投与を行った。TECK/CCL25-CCR9システムを選択的に阻害すると生理条件下、また、TNF- $\alpha$ 投与による炎症時においても、小腸において粘膜微小血管へのLPL、IELの接着数が減少したが、大腸においては接着数の減少は認められなかった。Western blot法による検討あるいは蛍光標識抗TECK/CCL25抗体による生体観察にてTECK/CCL25の局在を検討した結果では、大腸粘膜ではTECK/CCL25の発現は認められず、小腸粘膜固有層においては、TNF- $\alpha$ 投与により、正常時と比較しTECK/CCL25の発現量の増加が認められた。本研究において、非炎症時、炎症時ともに、TECK/CCL25-CCR9システムが小腸粘膜微小血管へのTリンパ球接着に重要な役割を果たしていることが示唆された。

審査では、まず、desensitizationという現象の機序についての質問があった。それに対し、文献上は、過量のTECK/CCL25を長時間作用させることにより、リンパ球上のケモカインレセプターCCR9の感度の低下が起こり、さらに、レセプター自体が細胞内に取り込まれるとされていると回答された。

次に、TNF- $\alpha$ 投与によりLPLの有意な接着数の増加を認めたが、IELでは有意な増加を認めなかった理由についての質問があり、LPLとIELの接着分子の発現の相違、存在する場所の相違が関係している可能性があるかと回答された。

更に、蛍光標識抗TECK/CCL25抗体による生体観察について、固定された標本でも、TECK/CCL25の局在を比較検討すべきだったのではないかと指摘があった他、他臓器での観察の有無について質問があったのに対して、今回の観察では行っていないが、過去の生体観察では行っており、他臓器へリンパ球が捕捉されないことは確認していると回答した。しかしながら、desensitizationを行ったリンパ球が他臓器へ捕捉される可能性を考慮して、その有無を本研究において確認すべきだったのではないかと指摘があった。

以上のように、本研究には今後さらに検討すべき点があるものの、TECK/CCL25-CCR9システムが小腸粘膜微小血管へのTリンパ球接着に重要な役割を果たしていることを明らかにした点で消化器病学上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 解剖学 相磯 貞和  
微生物学・免疫学 石川 博通 微生物学・免疫学 小安 重夫  
医化学 末松 誠

学力確認担当者: 北島 政樹、石川 博通

審査委員長: 石川 博通

研究指導者: 石井 裕正 (内科学)

試問日: 平成16年 6月16日

# Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment : study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes

(ヒト関節軟骨由来chondronおよび培養軟骨細胞を用いた軟骨細胞周囲環境におけるVI型コラーゲンの分布について)

堀 川 治

## 内容の要旨

軟骨細胞はその周囲に存在する pericellular microenvironment (PCME) と共に chondron と呼ばれる単位を形成し、また関節軟骨を構成するコラーゲン中、割合が 1% 程度の VI 型コラーゲンはこの PCME に特異的に存在している。これまで、ヒト関節軟骨を用いて chondron における VI 型コラーゲンについて報告したものは非常に少ない。本研究ではヒト関節軟骨を用い、OA の病期進行に伴う chondron の PCME における VI 型コラーゲンの分布を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によって立体的に観察した。また interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) をヒト培養軟骨細胞に添加し、細胞周囲の VI 型コラーゲン蓄積に対する影響についても検討した。

法医、病理解剖時に若年者の膝関節からヒト正常関節軟骨を、そして膝関節 OA 患者に対する人工膝関節置換術時にヒト OA 関節軟骨を採取し、低速ホモゲネート法により chondron を抽出した。同時に作製した軟骨のパラフィン切片を safranin-O 染色し、Mankin score による軟骨の変性度で 3 群に分類した (正常群 = Normal 群、軽度変性群 = Slight 群、中等度変性群 = Moderate 群)。生存の軟骨細胞を標識するため Cell Tracker Green fluorochrome (CFDA) を添加した。これらの chondron に抗ヒト VI 型コラーゲン抗体による免疫染色を行い、VI 型コラーゲンを含む PCME、及び軟骨細胞の体積を CLSM を用いて測定した。また正常ヒト関節軟骨を酵素処理して得られた軟骨細胞を agarose gel 内で三次元培養し、IL-1 $\beta$  および TGF- $\beta$ 1 を添加して、新たに増加した VI 型コラーゲンの体積を chondron と同様に免疫染色した後に CLSM で測定した。その結果、VI 型コラーゲンは PCME に一致して特異的に局在し、PCME と軟骨細胞との体積比 (P/C ratio) では Moderate 群は他群と比較して有意に大きい値を示していた。培養軟骨細胞の周囲には VI 型コラーゲンが蓄積され、TGF- $\beta$ 1 添加群では VI 型コラーゲンの範囲が拡大し、IL-1 $\beta$  群では逆に縮小していた。

本研究により、軟骨変性が軽度から中等度に進むにしたがい PCME の体積は増加し、この増加が chondron において OA の進行に従い増加する化学的なストレスに対応している可能性が考えられた。OA 軟骨 chondron で認められた PCME の分布範囲の拡大には、基質合成抑制に働く IL-1 $\beta$  に比べ、基質合成促進に作用する TGF- $\beta$ 1 がより強く関与しており、また VI 型コラーゲンは OA 病期で亢進している matrix metalloproteinases による影響を受けにくいことから、軟骨細胞の防御に効果的に働いているものと推測される。

## 論文審査の要旨

軟骨細胞はその周囲に存在する pericellular microenvironment (PCME) と共に chondron という単位を形成し、VI 型コラーゲンはこの PCME に特異的に存在している。これまで、ヒト関節軟骨を用いての chondron における VI 型コラーゲンの報告は非常に少ない。本研究ではヒト関節軟骨を用い、OA の病期進行に伴う chondron の PCME における VI 型コラーゲンの分布を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によって立体的に観察した。また interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) をヒト培養軟骨細胞に添加し、細胞周囲の VI 型コラーゲン蓄積に対する影響についても検討した。ヒト正常関節軟骨及びヒト OA 関節軟骨より、chondron を抽出した。作製した軟骨のパラフィン切片を safranin-O 染色し、Mankin score による軟骨の変性度で 3 群に分類した (正常群、軽度変性群、中等度変性群)。これらの chondron に抗ヒト VI 型コラーゲン抗体による免疫染色を行い、PCME、及び軟骨細胞の体積を CLSM で測定した。また軟骨細胞を三次元培養し、IL-1 $\beta$  および TGF- $\beta$ 1 を添加後、増加した VI 型コラーゲン体積を chondron と同様に免疫染色した後 CLSM で測定した。その結果、PCME と軟骨細胞との体積比では中等度変性群は他群より有意に大きく、培養軟骨細胞周囲に蓄積した VI 型コラーゲンは、TGF- $\beta$ 1 添加群ではその範囲が拡大し、IL-1 $\beta$  群では縮小していた。これらから、軟骨変性の進行による PCME の体積増加は、OA の進行に従い増加する化学的なストレスに対応しており、この体積増加には、IL-1 $\beta$  に比べ TGF- $\beta$ 1 がより強く関与していると考えられた。

審査では、軟骨細胞の培養を OA 軟骨で行ったのかとの質問がなされた。それに対して正常及び OA 軟骨細胞で VI 型コラーゲンの蓄積に差はなかったとの回答がなされた。また chondron の検討で高度軟骨変性群での VI 型コラーゲンの分布状態はどうであったかとの質問がなされた。それに対して、高度変性群では残存軟骨が少なく chondron の抽出が困難であったこと、mechanical な抽出方法により chondron 自体が破壊されたことから分析は困難であったとの回答がなされた。また、OA に典型的な形態の cluster formation についても解析していくべきとの助言がなされた。さらに、より生体に近い chondron を培養系に供し、cytokine、growth factor の添加実験を今後は非行っていくべきとの助言もなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、軟骨 chondron における VI 型コラーゲンの分布を CLSM によって三次元的に解析し、また軟骨細胞の VI 型コラーゲン合成と cytokine、growth factor との相互関係を分析した点が、OA 病態解明に向けて有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科 戸山 芳昭  
病理学 岡田 保典 発生・分化生物学 須田 年生  
病理学 坂元 亨宇  
学術誌認定担当者: 北島 政樹、岡田 保典  
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成16年 6月30日

# Interleukin-6に誘導される腎細胞癌の増殖における活性化型STAT3の役割

堀 口 明 男

## 内容の要旨

Interleukin-6 (IL-6) は様々な疾患の病態形成に深く関与する多機能的サイトカインである。IL-6の細胞内シグナル伝達経路は細胞の種類や由来臓器により多種多様であることが知られている。IL-6は以前より腎細胞癌の増殖因子のひとつであることが指摘されてきたが、その詳細な機序についてはいまだに解明されていない。本研究はIL-6に誘導される腎細胞癌の増殖における活性化型STAT3の役割に関する基礎的、臨床的検討を目的とした。

ヒト腎癌細胞株 (Caki-1, ACHN, 769P, A498) を対象に、IL-6により活性化されるシグナル伝達経路をリン酸化特異的抗体によるウェスタンブロット法とゲルシフトアッセイにより解析した。次いで、IL-6刺激下でのIL-6中和抗体、Jak阻害剤AG490、MEK1阻害剤PD98059の細胞内シグナルへ与える影響を検討した。Jak阻害剤AG490によるアポトーシスの誘導を核染色とTUNEL法により判定し、アポトーシス関連タンパク発現の変化をウェスタンブロット法で検討した。48例の腎細胞癌組織中の活性化型STAT3の発現を、抗リン酸化STAT3抗体 (p-STAT3抗体) を用いた免疫組織染色で解析し、病理学的所見と予後との関連を検討した。

IL-6添加後、IL-6受容体を発現していないCaki-1以外でSTAT3のリン酸化とDNA結合能の上昇が認められたが、すべての細胞株でERKsはIL-6刺激と無関係に恒常的活性化を示した。MEK1阻害剤PD98059によりERKsの活性化を抑制してもSTAT3の活性化は変化しなかったことから、IL-6刺激下の腎癌細胞ではERKsによるSTAT3の活性化は存在しないと考えられた。Jak阻害剤AG490はIL-6刺激によるSTAT3の活性化を抑制し、IL-6の誘導する腎癌細胞の増殖を抑制し、bcl-2のdown regulationとbaxのdown regulationを伴ったアポトーシスを誘導した。48例の腎細胞癌のうち、24例 (50%) に腫瘍細胞核内の強いp-STAT3染色像が認められ、高発現群と判定した。高発現群には手術時の遠隔転移例が有意に多く、また低発現群に比し予後不良であった。さらに、p-STAT3の高発現は多変量解析において有意な予後予測因子であった。

本研究によりIL-6に誘導される腎癌細胞の増殖は主にSTAT3を介しており、ERKsには非依存的であることが示された。また、STAT3の活性化の抑制により腎癌細胞の増殖が抑制された点、そして転移を有する腎細胞癌に特に高頻度のSTAT3の活性化が認められた点からSTAT3経路の抑制が腎細胞癌の新たな治療戦略に結びつく可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

Interleukin-6 (IL-6) は腎細胞癌のautocrine growth factorであるが、その詳細な機序は解明されていない。本研究では、IL-6による腎細胞癌増殖に関与するシグナル伝達経路を解析し、シグナルの抑制による抗腫瘍効果と腎癌組織におけるSTAT3の活性化と臨床的意義を検討した。ヒト腎癌細胞株 (Caki-1, ACHN, 769P, A498) にIL-6を添加するとSTAT1とSTAT3の活性化が認められたが、ERKsはすべての細胞株で恒常的に活性化しており、IL-6や抗IL-6中和抗体を添加しても活性化の程度に変化はなかった。Jak阻害剤AG490はIL-6によるSTAT3の活性化を抑制し、bcl-2のdown regulationとbaxのup regulationを伴ったapoptosisを誘導した。臨床検体におけるSTAT3の活性化を免疫組織染色により検討したところ、活性化型STAT3高発現例には遠隔転移例が有意に多く、活性化型STAT3の高発現は多変量解析において有意な予後因子であった。

審査では、まず各腎癌細胞株のIL-6産生能が異なっており、paracrine growthをしている細胞とautocrine growthをしている細胞が存在する可能性について質問がなされ、解析には互いに異なる性質を有する細胞株を対象とすべきであるとの指摘がなされた。これに対し、予備実験で他の細胞株のIL-6産生能を検討しており、それらの細胞においても産生能の差が著明であり、IL-6に対する増殖反応もそれぞれ異なっていることからparacrine growth, autocrine growthをしている細胞が存在すると回答がなされた。また、増殖の判定に細胞数の経時的変化を検討することで、増殖におけるERKsの関与を推測することが可能であるとの助言がなされた。次に、IL-6非添加時にSTAT3の活性化は認められないが、IL-6非添加時にJak阻害剤AG490を加えた際に増殖抑制が起こるかとの質問がなされた。これに対し、IL-6非添加時でもAG490による増殖抑制は起こるが、抑制に要する濃度はIL-6添加時に比べ高濃度を要することからIL-6非添加時と添加時のAG490の作用が異なる可能性が考えられるとの返答がなされた。臨床検体におけるSTAT3の活性化にIL-6以外の刺激が関与している可能性につき質問がなされた。これに対し、IL-6以外にも腎癌の増殖因子であるEGF、c-Met、angiotensinなどの関与も考えられるとの回答がなされた。臨床検体を用いた研究に関して、今後は症例数を増やす一方で、各症例の詳細な経過を解析に組み込んでいくべきであるとの助言がなされた。

本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、腎細胞癌のIL-6による増殖の機序を解明し、シグナルの抑制が進行腎細胞癌の新たな治療戦略に結びつく可能性を示した価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝

病理学 坂元 亨宇 先端医科学 河上 裕

内科学 猿田 享男

学力確認担当者：北島 政樹、坂元 亨宇

審査委員長：坂元 亨宇

試問日：平成16年 7月 6日

# Association of *CYP2A6* deletion polymorphism with smoking habit and development of pulmonary emphysema.

(ニコチン代謝酵素*CYP2A6*欠失型遺伝子多型の喫煙習慣および肺気腫発症への関与)

峰 松 直 人

## 内容の要旨

タバコ依存の主因であるニコチンはチトクロームP450に属する*CYP2A6*により代謝される。それ故、*CYP2A6*の遺伝子変異/多型は喫煙習慣を規定する可能性がある。*CYP2A6del*はアジア人において高頻度に見られる全欠失型多型であり、ニコチン代謝活性を著明に阻害する。本研究では*CYP2A6*欠失型多型と喫煙習慣ならびに慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の臨床像との関連を検討した。

COPD診断のためスパイロメトリーおよび胸部CT検査を施行した日本人喫煙者203名 (喫煙者群) および健常非喫煙者123名 (非喫煙対照者群) を対象とした。喫煙者群から一日喫煙量、喫煙年数、禁煙年数を聴取した。CT画像における肺野気腫病変の程度を視覚的に判定して、low attenuation area (LAA) スコアを算出し、スパイロメトリーにより一秒量 (FEV<sub>1.0</sub>) を測定した。また喫煙者群のうち170名において単位肺気量あたりの一酸化炭素肺拡散能 (Kco=DL<sub>CO</sub>/VA) を測定した。これらの肺機能指標を日本人成人健常者から得られた予測基準値に対する比 (%FEV<sub>1.0</sub>、%Kco) で表し、肺機能障害の程度を評価した。全対象者の末梢血よりDNAを分離し、*CYP2A6del*の遺伝子型を二段階PCR法およびRFLP法により決定した。統計解析においてp<0.05の場合を有意と判定した。

両群における*del*アレル頻度は0.18であり、アジア人を対象とした過去の報告と同等であった。*\*1/\*1*をW群、*\*1/del*および*del/del*をD群として、各群対象者にしめるD群の割合を%Dと定義した。喫煙者群においてD群の生涯喫煙量および一日喫煙量はW群のそれと比べて有意に少量であったが喫煙年数には差を認めなかった。相対的重喫煙者群 (生涯喫煙量60pack-years以上または一日喫煙量1.5packs以上) における%Dは相対的軽喫煙者群に比べて有意に低値であったが、喫煙年数により群別した場合には%Dに差を認めなかった。相対的重喫煙者群は非喫煙対照者群に比べて低い%D値を示したが、相対的軽喫煙者群と非喫煙対照者群の間では%Dに差を認めなかった。以上の結果より、*CYP2A6*の欠失型遺伝子多型は一日喫煙量を制限して重喫煙者に移行することを抑制するが、習慣的喫煙者となることを抑止するものではないと考えられた。喫煙者群は禁煙者群に比べて%D値が有意に高く、ロジスティック回帰分析において年齢、気腫病変、肺機能の程度とは無関係に*del*アレルは禁煙に対する内的阻害因子として作用した。肺野気腫病変が高度な群 (高LAAスコア、低Kco) では、そうでない群と比較して%D値が有意に低く、ロジスティック回帰分析において年齢、喫煙量とは無関係に*del*アレルは気腫病変の増悪を抑制する内的因子として作用することが確認された。

## 論文審査の要旨

タバコ依存の主因であるニコチンは*CYP2A6*により代謝されるため*CYP2A6*の遺伝子変異/多型は喫煙習慣を規定して慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 進行に関与する可能性がある。本研究では日本人喫煙者203名および健常非喫煙者123名を対象として*CYP2A6*欠失型多型と喫煙習慣ならびにCOPDとの関連を検討した。欠失型多型を有する対象においては野生型を有する対象に比べて生涯喫煙量、1日喫煙量が有意に少量であり、重喫煙者になりにくいことが示された。しかし欠失型多型を有していても1日1箱以上の喫煙が可能であり、軽喫煙者と健常非喫煙者の多型頻度に差がないことから、この多型が喫煙習慣の形成に及ぼす影響は少ないと考えられた。喫煙者と禁煙者との比較において欠失型多型は年齢や気腫病変、肺機能障害の程度とは無関係に禁煙を困難化する内的因子として作用した。また、この欠失型多型は喫煙量への影響とは別の何らかの機序により気腫病変を軽度にとどめる内的因子として作用することが示された。

審査では、まず対象者 (喫煙者) が病院受診者であることのバイアスが結果に影響する可能性を指摘された。これに対しては、その可能性は否めないが喫煙習慣のみならずCOPDとの関係を検討することを目的としてこの対象者を選択した旨、欠失型多型頻度が過去の報告と同等である点から極端に特殊な遺伝子型を有した群ではないと考えられる旨、回答された。次にCTスキャンを用いた気腫病変の評価方法、遺伝子型の決定方法につき質問がなされ、具体的方法につき説明された。また、この多型が喫煙量への影響以外のいかなる機序により気腫病変を軽度にとどめることに寄与しうものか質問がなされた。これに対しては肺の炎症を惹起する何らかの物質の不活性前駆体がタバコ煙に含まれ、欠失型多型を有する場合、*CYP2A6*酵素活性低下によりその活性化が抑制される可能性が考えられると回答された。さらに本研究の臨床応用の可能性につき質問がなされ、遺伝子型によるニコチン代替療法の個別化、また*CYP2A6*の拮抗物質およびニコチンの経口同時投与による禁煙支援の可能性につき述べられた。審査の後半では喫煙習慣と遺伝要因全般に関する最近の知見につき討論され、喫煙習慣の形成、維持に遺伝要因が強く関与すること、*CYP2A6*遺伝子の欠失型以外の多型、また喫煙習慣に関与するneurotransmitter遺伝子の多型などについての質疑応答がなされた。その他、邦語要約の語句使用が不適切であるとの指摘、統計解析方法についての数点の助言があった。

以上のように、本研究はその機序の解明や臨床応用の点につき今後検討すべき課題を多く残しているが、*CYP2A6*欠失型多型と喫煙習慣、COPDとの関連の一部を明らかにした点で当該領域における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 小川 聡  
外科学 小林 紘一 分子生物学 清水 信義  
衛生学公衆衛生学 大前 和幸  
学力確認担当者: 北島 政樹、小林 紘一  
審査委員長: 小林 紘一

試問日: 平成16年 8月 5日

# マウス舌癌同所移植モデルを用いた MMP阻害剤ONO-4817の頸部リンパ節転移抑制効果

山下 拓

## 内容の要旨

【背景】頸部リンパ節転移は舌扁平上皮癌の予後因子のひとつであり、臨床でその治療に難渋することも多い。現在においても頸部リンパ節転移の制御率の改善は、舌扁平上皮癌の治療成績向上における重要な課題である。癌のリンパ節転移成立過程において細胞外マトリックスの分解は必須であり、その分解を担う酵素がMatrix metalloproteinase (以下MMPと略)である。したがってMMP阻害剤がリンパ節転移抑制に寄与する可能性があり、以下の実験を行った。

【実験方法および結果】実験1：頸部リンパ節への高転移能を有するヒト舌扁平上皮癌由来細胞株HSC-3-M3に対するMMP阻害剤ONO-4817の細胞増殖に及ぼす影響をMTT assayにより検討した。その結果、*in vitro*においてONO-4817はHSC-3-M3に対して100 $\mu$ Mの濃度まで殺細胞効果を有しなかった。

実験2：*In vitro*におけるONO-4817のMMP-2、MMP-9活性抑制効果を検討するため、HSC-3-M3をヌードマウスへ同所移植後3週経過した舌癌組織のホモジネート上清を用いてGelatin zymographyを行った。その結果、MMP-9のゼラチン分解活性は*in vitro*においてONO-4817により濃度依存性に阻害された。コントロールのMMP-9活性を100%とすると1 nM、3 nM、10 nM、30 nM ONO-4817添加時のそれぞれの活性は86%、64%、36%、12%であった。

実験3：HSC-3-M3をマウス舌へ同所移植し、移植翌日から治療群にはONO-4817を150mg/kgを、対照群には溶媒のみを1日2回経口投与し、28日後に犠牲死させた。*In vivo*におけるONO-4817のMMP-2、MMP-9活性抑制、ゼラチン分解抑制効果を検討するためGelatin zymography、Film *in situ* zymography (以下FIZと略)を行い比較した。また体重変化、頸部リンパ節転移の有無を比較した。Gelatin zymographyの結果、対照群に比較し、治療群の舌癌組織においてMMP-9活性化率の低下が認められた。FIZの結果、対照群の舌癌組織に一致して強いゼラチン分解活性が認められたのに対して、治療群では著しく抑制された。また第21日と第28日での体重の比較では、治療群において有意にマウスの体重減少が抑制された。頸部リンパ節転移は治療群の13.3% (15匹中2匹)、対照群の60.0% (15匹中9匹)に認められ、2群間で統計学的有意差を認めた ( $p = 0.0209$ )。

【結論】舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移がMMP阻害剤ONO-4817により抑制されることが示された。その機序の一部と考えられる*in vitro*、*in vivo*での細胞外マトリックス分解抑制効果が確認された。これらの結果は、MMP阻害剤が舌扁平上皮癌の付加的治療手段の一つになりうることを示唆するものである。

## 論文審査の要旨

頭頸部癌の頸部リンパ節転移の有無とmatrix metalloproteinase (MMP)-2、MMP-9の発現、活性化が相関するとの報告が多くみられる。しかし、これらMMPの活性阻害により頭頸部癌の頸部リンパ節転移が抑制されることを示した報告はない。そこで本研究では、MMP阻害剤の頸部リンパ節転移に対する効果をヌードマウス舌癌同所移植モデルを用いて検討した。その結果、MMP阻害剤ONO-4817の投与で、頸部リンパ節転移が抑制できること、末期におけるマウスの体重減少が抑制されることが示された。Gelatin zymographyの結果、直接的なMMP-9活性の抑制と*in vivo*におけるMMP-9活性化率の抑制が認められた。また、film *in situ* zymographyの結果、舌癌組織でのゼラチン分解活性の著明な抑制が認められた。以上より、癌局所の細胞外マトリックス分解抑制がリンパ節転移抑制効果に寄与していることが示唆された。

審査では、まず同所移植の部位についての質問があり、これに対して、移植は左舌縁から筋層内に行われたこと、したがって本モデルでは上皮下の基底膜浸潤の抑制が転移抑制の機序として働いているかは検討できないとの回答があった。さらに、不完全ではあるが毛細リンパ管周囲に存在する基底膜への浸潤阻害や、基底膜以外の細胞外マトリックス分解抑制が転移抑制の機序として働いていることが示唆されたとの考察が述べられた。次に、薬剤の投与量について、150mg/kgとするとヒトではかなりの投与量となるが、この量にした根拠について問われた。本薬剤のマウスでの投与量と血中濃度、組織内濃度との関連についての報告がないため至適投与量を決定するのは困難であるが、文献的に本薬剤のマウスでの実験の報告を参考に投与量を決定したとの回答があった。使用した細胞株が一つでは不十分ではないかとの質問に対しては、ヒト舌癌の細胞株のうち動物実験モデルで頸部リンパ節転移を高率に示すものが少なく、本モデルでの検討に適する細胞株がほとんどないと回答された。また、治療群のマウスと対照群のマウスで舌癌局所の潰瘍形成に差を認めた理由が質問され、同所移植は筋層内に行われたため、筋層から基底膜への逆行性の浸潤を抑制した可能性があるとの回答された。舌癌局所の比較方法について、否全体の重量の比較や脈管密度の比較も行う必要があること、このようなモデルでの局所と頸部リンパ節転移巣での分子生物学的な比較の報告が少なく検討すべきことの助言があった。また、臨床応用についての質問がなされたが、本薬剤が殺細胞効果を認めない抗転移薬である点から、早期の癌に対する転移予防として、あるいは術後の再発予防としての応用が期待できると回答された。

以上のように本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、MMP阻害剤が頭頸部癌の頸部リンパ節転移を抑制できることを示し、新しい治療法の可能性を示唆した点で臨床的にも有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 耳鼻咽喉科学 小川 郁  
病理学 坂元 亨宇 病理学 岡田 保典  
歯科・口腔外科学 中川 種昭  
学術確認担当者：北島 政樹、坂元 亨宇  
審査委員長：坂元 亨宇

試問日：平成16年 7月 2日

# Angiographic manifestations and operative findings with 70 cases of hemifacial spasm : relation of common trunk anomalies.

(顔面痙攣70症例の脳血管造影所見と術中所見：特に共通幹の関与について)

大 泉 太 郎

## 内容の要旨

顔面痙攣の原因は顔面神経起始部への脳動脈の圧迫が原因とされている。本研究では、脳血管の構造上の特殊性が圧迫に関与している可能性を検討した。

1988年から2001年まで、慶應義塾大学病院で神経減圧術を施行された70症例の顔面痙攣の術前脳血管造影所見と術中所見から圧迫血管や圧迫部位を調べ、椎骨動脈(VA)関与症例を除く圧迫血管の共通幹の割合を正常椎骨動脈造影像100例の報告と比較した。

脳血管造影はSeldinger法にて、原則として4 vessel studyを行った。顔面神経起始部は、側面にて外耳孔後縁から5mm後方でドイツ水平線に垂線を引き、その線上で斜台から14mmの点を中心とした半径2.5mmの領域にある。正面では、正中から13mmの所にある。そこで、椎骨動脈造影像で、顔面神経起始部の位置と圧迫血管や周囲の血管構造の予測を術前に先行手術に望んだ。

全例に後頭蓋窩開頭を行い、顔面神経起始部を直接圧迫している血管を減圧した。術中所見から圧迫血管と圧迫部位を術前椎骨動脈造影像で確認し、次の項目を検討した。

①前下小脳動脈(AICA)と後下小脳動脈(PICA)の共通幹の有無

②圧迫血管と健側血管の脳底動脈や椎骨動脈からの分岐部の位置

③圧迫血管と健側血管の起始部径と血管の最初の分岐の位置

すると、正常例100例では共通幹は50% (dominant AICA 40%, dominant PICA 10%)であったが、VA関与症例を除く顔面痙攣50例では82% (dominant AICA 48%, dominant PICA 34%)であり、有意な差を認めた ( $P < 0.01$ )。

圧迫血管と対応する健側の血管の起始部径を比べると、圧迫血管の起始部径の方が大きい傾向にあった。

そして、Dominant PICA, PICAの起始部と最初の分岐部やVAの屈曲部の高さは、患側が高い傾向にあった。

顔面痙攣の患者では共通幹を有している確率が高い。これらの例では、顔面神経起始部近傍に共通幹のmain trunk, rostral branch, caudal branchの3者が入り組んで存在し、それに血管の加齢変化が加わり、神経圧迫の原因になると考えられた。

## 論文審査の要旨

顔面痙攣の原因は顔面神経起始部への脳動脈の圧迫が原因とされている。本研究では、脳血管の構造上の特殊性や血管の太さが圧迫に関与している可能性を慶應義塾大学病院で神経減圧術を施行した70症例の術前脳血管造影所見と術中所見から検討した。

すると、顔面痙攣の患者では病側に共通幹を有している事が正常例に比べて多く、健側血管より起始部径が大きいものが多かった。これらの例では、顔面神経起始部近傍に起始部径の大きい共通幹のmain trunk, rostral branch, caudal branchの3者が入り組んで存在し、それに血管の加齢変化が加わり、神経圧迫の原因になると考えられた。

審査では、まず共通幹の定義についての質問があり、脳血管造影上、片側のAICAかPICA、どちらかが存在せず、存在する方が両血管領域を灌流している場合を共通幹と定義するとの回答があった。また、この論文のpriorityについて質問があり、病側と健側の血管の起始部径の比較や、片側のみ共通幹ある場合、共通幹が圧迫血管である割合などの検討を行っており、両側が共通幹だった場合、91%で病側共通幹の起始部径の方が大きかったことや、片側が正常分岐で片側が共通幹だった場合、90%で共通幹が圧迫血管であった、ということがpriorityであるとの回答があった。MRAでも責任血管の同定は可能では、との質問があり、MRAで責任血管の同定は可能だが共通幹の認影は難しい、との回答があった。顔面痙攣の発生のメカニズムについての質問もあり、もともと顔面神経起始部は稀突起細胞とSchwann細胞のミエリンの移行部であり機械的な力に弱い部位である。そこを脳血管が圧迫することによって、顔面神経核へ逆行性の持続的な刺激が起こり興奮性が増すKindlingや、脱髄で軸索間に刺激が伝わりSynkinesisをおこすEphaptic transmissionなどが原因として考えられているが、神経減圧の術中、圧迫血管を減圧した直後から顔面痙攣が消失することも多く、顔面痙攣のメカニズムの全てが解明されているわけではないとの回答があった。また、神経減圧術後の再発例の特徴について質問があり、VAが強く顔面神経起始部を圧迫しVAの除圧が困難だった例が多かった、との回答があった。

本研究は、顔面痙攣患者の圧迫血管の構造上の特殊性や血管の太さが圧迫に関与している事を明らかにした点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 河瀬 斌

内科学 鈴木 則宏 放射線医学 栗林 幸夫

耳鼻咽喉科学 小川 郁

学力確認担当者：北島 政樹、鈴木 則宏

審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成16年 8月23日



# Daily oral verapamil before but not after rapid atrial excitation prevents electrical remodeling.

(高頻度心房刺激開始前からのベラパミル投与は電気的リモデリングの進行を抑制できるが  
高頻度心房刺激開始後からのベラパミル投与では電気的リモデリングの進行を阻止できない)

栗田 康生

## 内容の要旨

### (緒言)

発作性の心房細動 (AF) が出現停止を繰り返すうちに、徐々にその持続時間が延長し、ついには慢性化していく様子がしばしば経験されるが、これは生じたAF自体がAFを誘発、持続させやすくするように心房筋に変化を与えるためと考えられている。その電気生理学的变化を電気的リモデリング (electrical remodeling) と呼ぶ。電気的リモデリングは心房有効不応期 (ERP) の短縮、ERPの刺激頻度依存特性の減弱、ERPの不均一性の増加、心房内伝導速度 (CV) の低下、興奮波長 (WL) の短縮、AF誘発性の増加などの総称である。近年その機序が明らかにされ、その主因が細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷にあると考えられるようになった。本研究ではL型Caチャンネル遮断薬により心房電気的リモデリングが長期抑制可能か否かを検討した。

### (方法)

すべての実験は本塾における動物実験ガイドラインに基づいて行った。右心耳心外膜側に高頻度刺激電極を縫着した雑種成犬24頭を対象に、L型Caチャンネル遮断薬verapamil hydrochloride (ワソラン<sup>®</sup>以下verapamil)を高頻度刺激開始7日前から投与するB (Before) 群8頭、高頻度刺激開始2日後より投与開始するA (After) 群8頭、verapamilを投与せず高頻度刺激のみ行うC (Control) 群8頭にわけ、高頻度刺激開始前、2日目、7日目、14日目にERP、ERPの刺激頻度依存特性、CV、WLを計測し比較検討した。またAF誘発性について比較検討した。

### (結果および考察)

無投薬であるC群で、高頻度刺激開始2日目よりERPの短縮、頻度依存特性の減弱、CVの低下、WLの短縮など、高頻度刺激に伴う電気的リモデリングの進行を認め、AF誘発性も経時的に増加した。

Verapamilを高頻度刺激開始2日後から投与したA群でもその変化は同様に認められた。

一方、verapamilを高頻度刺激開始7日前から投与したB群では14日間の高頻度刺激に伴うERPの短縮、CVの低下が抑制され、ERPの刺激頻度依存特性が保持された。B群でもAF誘発を完全には抑制できなかったものの、15秒以上持続するAFの誘発率はB群で低下し、誘発されたAFのFF間隔は長く、持続時間が有意に短縮した。L型Caチャンネル遮断薬が高頻度刺激開始前から投与されれば、14日間の高頻度刺激に伴う電気的リモデリングの進行が抑制される可能性がこの実験モデルから示唆された。

### (結論)

高頻度刺激開始前からのverapamilの投与が、14日間の高頻度刺激に伴って生じる電気的リモデリングの進行を抑制したが、高頻度刺激開始2日後からの投与ではその効果は認められなかった。L型Caチャンネル遮断薬を高頻度刺激開始前より投与し、細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷を予防することが心房電気的リモデリングの進行抑制に重要であると考えられた。

## 論文審査の要旨

心房細動 (AF) は発作性の時期を繰り返すうちに慢性化していく例が多い。これは生じたAF自体が心房筋に電気的あるいは構造的変化を与え、AFをさらに誘発、持続させやすい素地を形成するためと考えられている。その電気生理学的变化を電気的リモデリングと呼ぶ。電気的リモデリングは心房有効不応期 (ERP) の短縮、ERPの刺激頻度依存特性の減弱、心房内伝導速度 (CV) の低下、興奮波長 (WL) の短縮、AF誘発性の増加などの総称である。近年その主因が細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷にあると考えられるようになったことより、本研究ではL型Caチャンネル遮断薬が心房電気的リモデリングの長期抑制が可能か否かを検討することを目的とした。右心耳に高頻度刺激電極を縫着した雑種成犬24頭を対象に、L型Caチャンネル遮断薬verapamilを高頻度刺激開始7日前から投与するB (Before) 群8頭、高頻度刺激開始2日後より投与開始するA (After) 群8頭、verapamilを投与せず高頻度刺激のみ行うC (Control) 群8頭にわけ、ERP、ERPの刺激頻度依存特性、CV、WL、AF誘発性の14日間の高頻度刺激に伴う経時的変化を比較検討した。無投薬であるC群で、ERPの短縮、頻度依存特性の減弱、CVの低下、WLの短縮、AF誘発性の経時的な増加など、高頻度刺激に伴う電気的リモデリングの進行を認めた。Verapamilを高頻度刺激開始2日後から投与したA群でもその変化は同様に認められた。一方、verapamilを高頻度刺激開始7日前から投与したB群では14日間の高頻度刺激に伴うERPの短縮、CVの低下が抑制され、ERPの刺激頻度依存特性が保持され、15秒以上持続するAFの誘発率が低下し、誘発されたAFの持続時間が有意に短縮した。L型Caチャンネル遮断薬を高頻度刺激開始前より投与し、細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷を予防すれば心房電気的リモデリングの進行抑制が可能である可能性が示唆された。

審査ではまず、電極縫着術より高頻度刺激開始までの日数に3群間で差があることが実験プロトコール上の問題との指摘があった。A群で高頻度刺激開始2日目よりverapamil内服が開始された理由が問われ、高頻度刺激開始2日目にはERPの短縮など電気的リモデリングが十分生じているためと回答された。またB群で7日前からverapamil内服が開始されている理由が問われ、前実験で2日前、5日前、7日前の3つのプロトコールが試され、最も血中濃度の安定していた7日前からの内服というプロトコールとなった旨回答があった。高頻度の持続刺激ではなく緩徐で間欠的な刺激で本研究を行った場合の結果がどう予想されるかの質問に対し、高頻度刺激でも本研究で持続的心房細動に至った成犬はなく、緩徐で間欠的な刺激ではコントロール群でも十分に電気的リモデリングを進行させることが困難ではないかと回答された。さらに実際に細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷がどのような変化をもたらしているかの質問がなされ、本研究では行っていないが他施設の研究でL型CaチャンネルのmRNAレベルでの変化、さらにNaチャンネル、一部のKチャンネルの変化なども生じていることが確認されていると回答された。臨床的に重要な左房側の検討がなされていないとの指摘があり、左房側に電極を縫着するには胸骨正中切開が必要となるが侵襲が大きく、本研究の目的である14日間の高頻度刺激を継続することが困難であり、長期生存が可能な右肋間開胸による右心耳電極縫着の方法が選択されたと回答された。

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、Caチャンネル遮断薬の内服開始時期の重要性を示した点で有意義であり、臨床的にも価値のある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 四津 良平 生理学 柚崎 通介  
薬剤学 谷川 原 祐介  
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 8月30日

# Inhibition of c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase Activity Improves Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Lungs.

(c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinaseの抑制はラット肺の虚血再灌流傷害を改善する)

石 井 誠

## 内容の要旨

【背景】虚血再灌流肺傷害は、肺移植後の早期死亡の主因とされているため、その発生機序を解明し有効な治療手段を確立することは肺移植後の生存率向上に不可欠である。近年MAPキナーゼ(MPAK)の1種であるJNKが様々な臓器の移植後の虚血再灌流傷害に関与していると報告されている。しかし、肺移植における虚血再灌流傷害でのJNKの病態形成に対する意義は不明である。そこで本研究では、ラット虚血再灌流肺におけるJNK関連シグナル伝達経路の役割を中心に検討した。

【材料・方法】ラット虚血再灌流肺モデルは、Euro-Collins (EC) 液にて肺を灌流し心肺をブロックとして摘出し4時間4℃にてEC液にて保存後、37℃にて3時間再灌流を行い作成した。保存液および再灌流液中にdimethylsulfoxide (DMSO) を投与した群 (対照群)、保存液および再灌流液中にJNKの特異的阻害薬であるSP600125を投与した群 (SP-IR群)、保存液中のみにSP600125を投与した群 (SP-I群) に分けた。各群において、各リン酸化MAPKの発現と各MAPK活性を各々ウェスタンブロット法およびキナーゼアッセイ法により経時的に検討した。またAP-1およびNF-κBのDNA結合能をゲルシフトアッセイ法にて、さらにNF-κBの抑制蛋白であるIκB-αをウェスタンブロット法にて検討した。再灌流3時間における肺胞洗浄液 (BAL) 液中の蛋白量 (BCA法)、LDH、TNF-α (ELISA法) の測定、病理組織学的検討、アポトーシスの検討を行った。また再灌流30分における対照群でのリン酸化JNK (p-JNK) の発現の局在を、免疫組織染色にて検討した。

【結果】対象群のJNK活性は虚血中と再灌流中に2峰性に上昇し、AP-1のDNA結合能もJNK活性と同様の経時的変化を示した。p-JNKは気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、気管支および血管平滑筋などに発現していた。またNF-κBのDNA結合能はAP-1と異なり虚血中には変化なく、再灌流時に上昇した。そしてSP600125を保存液および再灌流液中へ投与したSP-IR群は対象群に比べ、JNK活性およびAP-1は抑制され、肺胞洗浄液中の蛋白、LDH、TNF-αは減少し、肺損傷は病理組織上改善し、アポトーシスは抑制された。NF-κB、IκB-α、p38、ERKには明らかな変化は認めなかった。一方、SP600125を保存液中のみに投与したSP-I群はBAL中の上記諸物質はSP-IR群と異なり減少しなかった。

【結論】JNKは虚血再灌流肺傷害において中心的役割を果たすと考えられた。さらに、肺移植などの虚血再灌流傷害に対してJNK活性の抑制が、有効な治療手段となりうる事が示唆された。

## 論文審査の要旨

肺移植は本邦では1997年に臓器移植法案が施行されて以降徐々に増加傾向にあるが、移植後早期死亡の主因として虚血再灌流傷害は重要な課題であり、その分子生物学的機序を解明し有効な治療手段を講じることができれば肺移植後の生存率を向上させることが可能となる。本研究では虚血再灌流においてJNKおよびAP-1活性の亢進を介して肺組織傷害が誘導され、この現象はJNK阻害薬の投与により著明に抑制されることを明らかにした。以上よりJNKは虚血再灌流肺傷害において重要な役割を果たし、肺移植などの虚血再灌流傷害に対してJNK阻害薬は有効な治療手段となり得ることが示唆された。

審査では、虚血再灌流中の気道圧やガス交換方法に関して質問がなされた。これに対し、心肺摘出時に主気管支を吸気終末位で結紮した後は再灌流終了時まで結紮を続けており、また再灌流時の酸素化は灌流液中に自己血を添加し (Hct約10%)、模型人工肺に21%O<sub>2</sub>含有ガスを流入させて行ったと回答された。次に、再灌流終了時の対照群における病理組織標本に関して、固定方法と肺水腫と記載している点に関して質問がされた。ホルマリン液は約10cmの高さからほぼ一定量を一定圧で主気管支より注入した後に主気管支を結紮し、心肺を24時間ホルマリン液の中に入れ固定したこと、それによる肺胞の拡張が組織標本では修飾されている可能性があることと回答されたが、主論文に具体的な組織の固定方法を記載すべきであったと助言された。また、アポトーシス陽性細胞の細胞種について質問されたが、肺胞上皮細胞が多くを占め、気道上皮細胞や血管内皮細胞にはごく少数のアポトーシス陽性細胞のみであったことと回答された。次に、NF-κBと異なり虚血中にJNKやAP-1が一過性に上昇する機序とその意義に関し質問がなされた。これに対して、再灌流後は主に活性酸素種によりNF-κBやJNK/AP-1が活性化されると推測されるが、冷保存 (虚血) 中のJNK/AP-1活性化の機序は別と考えられ今後の検討課題であると回答された。虚血中のみJNK阻害薬を投与した群では対象群で上昇した気管支肺胞洗浄液中の諸物質の減少は認めなかったことから、虚血中のJNK/AP-1上昇は組織傷害の点では再灌流時に比べて重要でなく、むしろ組織保護的に作用している可能性さえあると回答された。また、虚血中のJNK阻害薬の投与方法に関し質問されたが、これに対し冷保存前にドナーラットに対し経静脈的あるいは腹腔内にあらかじめJNK阻害薬を投与することも考えうるが、本研究では行っておらず今後の検討課題であると回答された。

以上のように本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、虚血再灌流肺傷害に対するJNK阻害薬治療の可能性を示した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡  
外科学 小林 紘一 医化学 末松 誠  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 北島 政樹、小林 紘一  
審査委員長: 小林 紘一

試問日: 平成16年10月 8日

# 2型糖尿病の腎症進展・増悪に関する遺伝学的研究

—NADPHオキシダーゼ遺伝子およびRAGE遺伝子多型の関与—

入江 聖子

## 内容の要旨

(目的) 糖尿病性腎症の発症進展には遺伝要素の関与が大きい。また、体内の酸化ストレスは糖尿病性細小血管障害の病態形成に深く関わっている。血管床におけるNADPHオキシダーゼは酸化ストレスの起源として重要であり、そのp22phox遺伝子多型は冠動脈疾患患者において血管壁におけるスーパーオキシド産生およびその疾患頻度と関連していると報告されている。一方、高血糖状態において終末糖化産物(AGE)が形成されAGE受容体(RAGE)に結合し、受容体シグナルを介して活性酸素を産生し血管病変を促進することが示唆されており、RAGE遺伝子G1704T多型と糖尿病性細小血管性皮膚炎との関連が報告されている。本研究では、日本人2型糖尿病患者を対象とし、糖尿病性腎症におけるNADPHオキシダーゼp22phox遺伝子C242T多型とRAGE遺伝子G1704T多型の臨床的意義について検討した。

(対象と方法) 1990年より埼玉社会保険病院にて定期的に外来経過観察されている2型糖尿病患者691名を対象とした。このうち、糖尿病性腎症のない正常群108名(グループN)と、糖尿病性腎症の発症進展を認めた進行群73名(グループD)の2群に分類した。進行群は経過観察中に正常アルブミン尿から微量アルブミン尿あるいは顕性蛋白尿へ、または微量アルブミン尿から顕性蛋白尿へ進行したものである。患者末梢血よりDNAを抽出し、両遺伝子多型をABI7700によるTaqmanPCR法により検討した。

(結果と考察) p22phox C242T多型は、正常群ではCC群85名、CT+TT群23名、増悪群ではCC群66名、CT+TT群7名であり、正常群においてCT+TT群の出現頻度が有意に高かった( $p=0.0427$ )。RAGE G1704T多型は正常群ではGG群94名、GT+TT群14名、増悪群ではGG群54名、GT+TT群19名であり、増悪群においてGT+TT群の出現頻度が有意に高かった( $p=0.0313$ )。p22phox遺伝子とRAGE遺伝子の組み合わせの検討では、p22phox CCとRAGE GT+TTゲノタイプの組み合わせを有する患者はp22phox CT+TTとRAGE GGゲノタイプの組み合わせを有する患者よりも有意に糖尿病性腎症の発症進展の危険性が高いことが示された( $p=0.0057$ )。またロジスティック多重回帰分析を行ったところHbA1c値、中性脂肪値、収縮期血圧値とならび本遺伝子多型の組み合わせも独立した危険因子であることが認められた( $p=0.0073$ )。

以上より、糖尿病性腎症の発症進展にp22phox遺伝子C242T多型+RAGE遺伝子G1704T多型が関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

近年、糖尿病性腎症の発症進展に遺伝的要素の関与が示唆されていることから、本研究では2型糖尿病患者において、糖尿病の血管障害との関係が示唆されているNADPHオキシダーゼp22phox遺伝子C242T多型と終末糖化産物の受容体(RAGE)遺伝子G1704T多型の臨床的意義を検討した。外来通院中の糖尿病性腎症を有さない糖尿病患者108名と、糖尿病性腎症の発症進展を認めた73名とを対象とし、体重、血圧、脈拍数、眼底変化といった身体所見、血糖、脂質等の血液化学検査とともに、末梢血よりDNAを抽出し、p22phox遺伝子C242T多型とRAGE遺伝子G1704T多型をABI7700によるTaqmanPCR法により検討した。

糖尿病腎症のない群ではp22phox C242T多型で、CT+TT群の出現頻度が有意に高く、一方、腎症増悪群ではRAGE G1704T多型のCT+TT群の出現頻度が有意に高かった。P22phox遺伝子とRAGE遺伝子の組み合わせの検討では、p22phox CCとRAGE GT+TTゲノタイプの組み合わせを有する患者は、p22phox CT+TTとRAGE GGゲノタイプの組み合わせを有する患者よりも有意に糖尿病性腎症の発症進展の危険性が高かった。またロジスティック多重回帰分析との組み合わせで、本遺伝子多型の組み合わせも、血糖、脂質や血圧とともに、独立した危険因子であることが示唆された。

このような研究に対し、まずp22phox遺伝子C242T多型の機能との関係が問題とされた。P22phox C242T多型はNADPHオキシダーゼのヘム結合部位にあたると思われるが、その他の遺伝子多型がNADPHオキシダーゼの構成要素の集合を妨げる可能性があることから、他の遺伝子多型も検討すべきであったと助言された。また各患者で実際に酸化ストレスがどのような状態にあったかが問題とされた。本研究者は、これらの患者の早朝随時尿中の8-hydroxydeoxy-guanosineを測定したが、抗酸化作用を有する薬剤を服用している患者が多かったためか、腎症の有無で差がなかったとされた。

対象とされた患者の糖尿病腎症の診断も問題とされた。確定診断には腎生検が有用であるが、すべての患者に行うことは倫理的に問題であることから、臨床経過、尿および血液所見によつたとされた。対象とされた患者は長期観察例であることから、かなり確かな診断が下されたとされた。

糖尿病腎症の進展にはp22phox遺伝子、RAGE遺伝子のほか多くの遺伝子の関与があることから、貴重な検体を集めてあることから、他の重要な遺伝子も合わせて検討されれば、さらに意義ある研究になったと助言があった。

以上のように、本研究で検討された遺伝子多型がp22phox遺伝子とRAGE遺伝子だけであったことに多少の問題が残されたが、多数の長期観察例を対象患者とした検討で、糖尿病性腎症の発症進展にp22phox遺伝子C242T多型+RAGE遺伝子G1704T多型の関与を明らかにした点で、この方面の研究に貢献する価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 亨男  
分子生物学 清水 信義 泌尿器科学 村井 勝  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者：北島 政樹、清水 信義  
審査委員長：清水 信義

試問日：平成16年10月20日

# Linear discriminant analysis of dermoscopic parameters for the differentiation of early melanomas from Clark naevi.

(ダーモスコピー画像上のパラメータを抽出し、早期悪性黒色腫をクラーク母斑と鑑別するための線型判別分析)

岡 博 史

## 内容の要旨

早期の悪性黒色腫は転移を起こしていない場合には、むしろ生命予後のよい悪性腫瘍であり、腫瘍の厚さが0.75mm以下の悪性黒色腫では5年生存率は93%以上であると報告されている。ダーモスコピーは近年開発され、肉眼に比べ診断率の向上につながることが報告されているが、診断に主観的な要素があることが指摘されている。良性色素性母斑(クラーク母斑)から悪性黒色腫をスクリーニングにて早期に検出するためのコンピュータシステムを構築するために、ナポリ大学(イタリア)とグラーツ大学(オーストリア)にて集積され、病理組織学的に診断が確定している症例から以下の3つの条件を満たすダーモスコピー画像を無作為に選択した。すなわち、(1)フレーム内に腫瘍全体が収まっている症例、(2)足底、手掌、口腔粘膜以外の場所に生じた症例および、(3)腫瘍の解析を妨げる毛髪が含まれていない症例である。コンピュータ解析に使用した症例は、表皮内悪性黒色腫23例、Breslowの分類にて厚さ0.75mm以下の悪性黒色腫(thin invasive melanoma, 以下TIMと略す)36例を含む59例の早期悪性黒色腫および臨床的に鑑別に苦慮したクラーク母斑188例である。画像は腫瘍を周辺皮膚から色調から自動的に切り出したのちに、色調、テクスチャー、非対称性、円度の観点から62個のパラメータを個々に計算し、悪性黒色腫と良性色素性母斑の両者を線型判別分析行なった。色調の計算では赤、緑、青、輝度を用いて腫瘍の黒色の部分を考慮できるように考慮した。テクスチャーの計算では画像工学で表現される偏差、歪度、エネルギー、エントロピーを使用した。悪性黒色腫では腫瘍の周辺部分に色調、テクスチャーの特徴があると考え、腫瘍の直径に対して周囲10%を切り出し、同部における色調、テクスチャーの解析も行った。線型判別分析の中でstep-wise法を使用し、判別に寄与するパラメータを選択した。TIMとクラーク母斑の間では感度94.4%、特異度98.4%を得た。(Wilks  $\lambda$  0.23, パラメータ数13)相互検証においても感度91.7%、特異度98.4%と良好な結果を得た。一方表皮内悪性黒色腫とクラーク母斑では感度73.9%、特異度85.6%を得、(Wilks  $\lambda$  0.69, パラメータ数6)相互検証では感度69.6%、特異度85.6%であった。TIMとクラーク母斑の間では色調が大きく寄与していることが解析より明らかになり、病変の深度が大きくなるほど特徴的な色調が生じると考えた。表皮内悪性黒色腫とクラーク母斑の間ではテクスチャーと対称性が中等度寄与したが、両者を十分に判別することができなかつた。今後、特有の色調と特徴的な形状を自動的に検出することによって、表皮内悪性黒色腫をより高い精度で鑑別できると考えられる。

## 論文審査の要旨

ダーモスコピーは日常診療上、悪性黒色腫を診断する際に有用な手法であることは知られている。今回、著者は画像内の腫瘍の認識から、解析に至る過程をすべて自動的に計算するプログラムを構築し、悪性黒色腫を判別可能な客観的手法を開発した。これによりコンピュータ上の判別は、その性質上使用者を問わずに再現性のある結果を得ることができる。腫瘍の厚さの異なる悪性黒色腫とクラーク母斑を比較すると表皮内悪性黒色腫では非対称性が、厚さ0.75mm以下の悪性黒色腫では色調がもっとも判別に寄与していることが判明した。それぞれの厚さごとに異なる悪性黒色腫とクラーク母斑を比較している点が本研究の新しいアプローチといえる。

審査では、このシステムがさらに開発されるにつれて、皮膚科専門医の観察眼を超えていく可能性はないかとの質問があったが、あくまでもこの解析はスクリーニングに使用するものであり、また皮膚科医の診断を助けるものであることが説明された。これは放射線科の分野におけるCAD(computer aided diagnosis)と同等のものであるとの指摘があった。さらに現在はこの研究で使用したプログラムを改良し、ウェブサイト上で自動判別するサイトを公開しているとの説明に対し、将来的にはスクリーニングの使用に応用できる可能性があるとの評価された。今研究では日本人症例が入っていないので、今後は日本人の症例を含めていく必要があるとの指摘があった。

自動的に腫瘍部分を色調から切り出しているが、今後その境界部が病理学的に正しく評価されているかを調べてみることも興味深いとのコメントがあった。論文の中で特徴的な色調を今後調べていく必要があると書かれていることに対する質問があった。著者は最近、悪性黒色腫に特有な色調を12種類ほど検出しており、それを用いることによって悪性黒色腫の30%程度を判別できると説明した。また、streakなどの特徴的な構造物を取り出し、その均一性を測定する研究を現在行っていると説明し了解された。悪性黒色腫類似の黒色腫瘍のスクリーニングに用いるのであるならば今後はクラーク母斑のみならず、その他の母斑、脂漏性角化症など他の腫瘍との鑑別を考えていく必要があるのではないかとコメントがあった。また、適当なフィルタリングを加えることによってより適切に分類できる可能性についても指摘があった。

以上のように本研究は悪性黒色腫をデジタル解析し、客観的かつ再現性のある結果を得る手法を開発しており、色素性皮膚病変の早期診断を追求する上で、有益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  
形成外科学 中島 龍夫 放射線医学 栗林 幸夫  
病理学 坂元 亨宇  
学力確認担当者: 北島 政樹、中島 龍夫  
審査委員長: 中島 龍夫

試問日: 平成16年10月12日

# Involvement of Histone Acetylation in Ovarian Steroid-induced Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells.

(卵巣性ステロイドホルモンにより誘導されるヒト子宮内膜間質細胞脱落膜化におけるヒストンアセチル化の役割に関する研究)

酒 井 の ぞ み

## 内容の要旨

ヒストンアセチル化酵素(histone acetyltransferase : HAT)と脱アセチル化酵素(histone deacetylase : HDAC)は、核構造蛋白コアヒストン(H2A, H2B, H3, H4)のアセチル化・脱アセチル化を介して転写活性の制御を行っている。一方、脱落膜化現象は子宮内膜間質細胞においてエストロゲンのプライミングに続いてプロゲステロンの作用によって引き起こされ、妊娠の成立(着床)・維持にとってきわめて重要である。増殖・分化(脱落膜化)・剥脱を繰り返す子宮内膜では、特異的かつ周期的なエピジェネティックな遺伝子発現制御の関与が強く示唆される。本研究では子宮内膜脱落膜化の制御機構をヒストンアセチル化の側面から明らかにすることを目的とした。

ヒト子宮内膜組織より腺細胞ならびに間質細胞を分離した後、特異的HDAC阻害剤(trichostatin A ; TSA)、卵巣ステロイド(17 $\beta$ -estradiol+progesterone ; E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>)の存在下または非存在下にて培養した後RNAを抽出し、脱落膜化マーカーであるinsulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1)およびprolactin (PRL)、その他にmatrix metalloproteinase-2 (MMP-2)のmRNAの発現をRT-PCR、Competitive RT-PCR、Northern blotにて解析した。ヒストンを抽出し、ヒストンのアセチル化状態とそのアセチル化部位を、AUT gel解析ならびにアセチル化ヒストン抗体を用いたWestern blotにより解析した。さらにアセチル化ヒストンH4に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法(ChIP assay ; Chromatin Immunoprecipitation Assay)によりIGFBP-1プロモーター領域のヒストンのアセチル化状態の検討を行った。IGFBP-1およびPRL mRNAはE<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>添加により発現が誘導され、TSA(10~500ng/ml)との同時添加により濃度依存性かつ相乗的にその増強を認めた。MMP-2では発現量に変化は認めなかった。TSA単独、E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>、同時投与のいずれにおいても脱落膜化様形態変化を認めた。一方、腺細胞ではいずれの処置によってもIGFBP-1の発現誘導および形態変化は認められなかった。AUT gel解析ならびにWestern blotにおいてH3およびH4がE<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>によりアセチル化され、TSAの同時添加によりそのアセチル化の増強が認められた。ChIP assayではE<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>処置により間質細胞IGFBP-1プロモーターのプロゲステロン応答領域のヒストンH4がアセチル化され、それはTSAにより増強されることが示された。TSAは、ヒストンアセチル化によるプロゲステロン作用の増強を通じて間質細胞の分化を促進することが示された。以上のことより、子宮内膜脱落膜化にヒストンアセチル化が深く関与していることが明らかとなった。

## 論文審査の要旨

ヒト子宮内膜は、卵巣ステロイド反応性に脱落膜化と称される分化を遂げ、妊娠維持に機能する。本研究では、ヒト子宮内膜間質の初代培養細胞を用いて、世代継承に重要なこの過程における、遺伝子転写機構を担うヒストンアセチル化の関与について基礎的解析を行うと同時に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)の分化誘導剤への臨床応用の可能性につき検討を行った。その結果、特異的HDACi(trichostatin A ; TSA)を培養子宮内膜間質細胞に添加することで人為的にアセチル化を起こしうることを示し、アセチル化ヒストン特異抗体を用いた解析において、アセチル化の標的となるヒストンとそのリジン残基も同定した。また、TSAによる脱落膜化誘導を形態学的変化および脱落膜化に伴い発現上昇する蛋白IGFBP-1およびプロラクチンの発現誘導の2点において示した。さらにChIPアッセイを用いることで、卵巣ステロイドによりIGFBP-1プロモーターの一部であるプロゲステロン応答領域のヒストンH4がアセチル化されるという分子機構を明らかにし、この効果がTSAにより増強されることを示した。

審査ではまず、脱落膜化について質問がなされた。これに対し、脱落膜化は組織形態変化にとどまらない、細胞レベルでの間質細胞に局限した形態的・機能的分化を意味し、妊娠維持に必須である旨回答された。次に、HDACiとしてTSAを用いた理由について質問がなされたが、TSAが他のHDACiより低濃度(nMレベル)で効果を及ぼす点、反応が可逆的である点等から基礎研究で頻用される代表的なHDACiであるため選択したものと回答された。また、間質細胞と腺細胞の鑑別方法について質問がなされた。これに対し、純度の高い間質細胞を得るために確立した分離・純化行程について説明がなされ、蛍光免疫染色による判定で純度は95%以上であったと回答された。さらに、ヒストンアセチル化解析に用いられたAUTゲル、ChIPアッセイについての方法論に関しても質疑応答が行われた。Western blotにおいて使用したアセチル化リジン特異抗体について、ペプチド免疫原由来の抗体を使用する際の特異反応への考慮につき助言がなされた。HDACiの新規分化療法剤としての臨床応用として、内膜機能不全不妊症の他に子宮内膜症・子宮内膜癌を標的とする場合の検討すべき課題、細胞レベルから組織レベルに解析をステップアップするための組織培養、さらにヒストンアセチル化酵素の候補として考察に挙げたSRC-1とCBP/p300の実際の検討なども行うべきである旨助言が与えられた。

本研究は、上記検討課題は残るものの、初代培養を用い子宮内膜脱落膜化の分子機構にヒストンアセチル化が深く関与していることを初めて明らかにした点で、今後の臨床応用も含め価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
医化学 末松 誠 病理学 岡田 保典  
発生・分化生物学 須田 年生  
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10月12日

# Suppression of Colorectal Cancer Growth Using an Adenovirus Vector Expressing an Antisense K-ras RNA.

(アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターによる大腸がんの増殖抑制)

中野 雅

## 内容の要旨

我が国での大腸がんの罹患率は過去20年間で急速に増加しており、1998年における大腸がんの死亡数は胃がん、肺がんに次いで第3位を占める。進行大腸がん、特に外科的切除不能例での化学療法を主体とする治療成績はいまだ満足のいくものではなく、遺伝子治療がこれに代わる新しい治療法として期待されている。大腸がんは複数の遺伝子異常の集積により発生し、この多段階発がん過程においてK-rasの変異は細胞複製の促進を介して腺腫からがんへの進展に寄与すると言われている。K-rasの点突然変異は大腸がんでは40~50%と膵がんに次いで高頻度であることから、大腸がんの発がん過程においてK-rasが中心的な役割を担っている可能性が高い。今回著者はK-rasを標的とした大腸がんに対する遺伝子治療法開発の前臨床段階として、アンチセンスK-rasRNA発現アデノウイルスベクターAxCA-AS-K-rasを用いて大腸がん細胞に対する*in vitro*ならびに*in vivo*での抗腫瘍効果と安全性を検討した。

AxCA-AS-K-ras導入後のHCT-15細胞株において、CAGプロモーターによって発現誘導されたアンチセンスK-rasRNAの発現を確認し、K-ras特異的p21モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析では、アンチセンスK-rasRNA導入大腸がん細胞株におけるK-ras p21蛋白質発現の抑制も確認した。5種類のヒト正常細胞株ではアンチセンスK-rasRNA導入による*in vitro*での増殖抑制は認められなかったが、K-rasの点突然変異の有無にかかわらず7種類の大腸がん細胞株 (HT-29, WiDr, SW1116, HCT-15, NCCCO33, NCCCO34, NCCCO31) すべてにおいて著明な増殖抑制が認められた。次にSPF環境下で飼育したSCIDマウスの左側腹部皮下にHCT-15細胞を注入して皮下腫瘍モデルを作成し、皮下腫瘍が4mmに達した時点でAxCA-AS-K-rasを24時間ごとに3回腫瘍内に直接注入し腫瘍径の経時的変化を観察した。最終投与後7日間にわたりHCT-15皮下腫瘍の増殖抑制が認められ、皮下腫瘍の組織学的検討では広範な細胞死と腫瘍周囲への単核球およびリンパ球の浸潤を認めた。

アンチセンスK-rasRNAの導入により*in vitro*だけでなく*in vivo*においても大腸がん細胞の増殖抑制が確認された。特に毒性が認められなかった点も含め、将来的な臨床応用を目指す上で有用な知見が得られた。切除不能肝転移例や腸閉塞を合併した原発巣など、進行大腸がん局所での腫瘍のコントロールを目的とした新たな治療法としての、アンチセンスK-rasRNA発現アデノウイルスベクター腫瘍内注入の有用性を確立するために、今後臨床研究も含めさらに研究を進めたいと考えている。

## 論文審査の要旨

我が国での大腸がんの罹患率は過去20年間で急速に増加しており、進行大腸がん、特に外科的切除不能例での化学療法を主体とする治療成績は向上している一方で、遺伝子治療が新しい治療法として期待されている。大腸がんの多段階発がん過程において、K-rasの点突然変異は細胞複製の促進を介して腺腫からがんへの進展に関与すると言われ、大腸がんでは膵がんに次いで高頻度であることから、大腸がんの発がん過程においてK-rasが中心的な役割を担っている可能性が高い。本研究ではK-rasを標的とした大腸がんに対する遺伝子治療法開発の前臨床段階として、アンチセンスK-ras RNA発現アデノウイルスベクターAxCA-AS-K-rasを用いて大腸がん細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。K-rasの点突然変異の有無にかかわらず7種類の大腸がん細胞株すべてにおいて著明な増殖抑制が認められ、HCT-15細胞を用いて作成した皮下腫瘍モデルにおいても、AxCA-AS-K-rasの腫瘍内直接注入によりHCT-15皮下腫瘍の増殖抑制が認められた。

審査ではまずAxCA-AS-K-rasによる抗腫瘍効果の機序について説明が求められた。活性型rasの抑制によるPI3K/AKT経路を介したアポトーシスの誘導が細胞増殖抑制の機序の1つであり、*in vivo*ではさらにVEGF発現抑制を介した血管新生抑制効果の影響も考えられ、今後検討していく課題であると回答された。また以前の報告において膵がん細胞株ではK-ras点突然変異依存性の増殖抑制を認めたのに対し、本研究では点突然変異の有無にかかわらずすべての大腸がん細胞株で抑制が認められたことについて質問があった。膵がん細胞と大腸がん細胞とでは細胞の生存・増殖におけるK-ras遺伝子の依存度に違いがあり、発がん機構におけるK-rasの役割が異なる可能性があることと回答された。この膵がん細胞と大腸がん細胞での相異を追及する上で、ras下流のシグナルについての検討も考慮すべきとの助言がなされた。最後に皮下腫瘍に対する約7日間の増殖抑制効果後増殖が認められたことに対し、単一遺伝子を標的とした遺伝子治療の限界についての指摘があり、再投与の必要性や投与間隔の検討など、実際の臨床応用を目指す上での問題点や治療効果向上のために治療の個別化の必要性などについて助言がなされた。

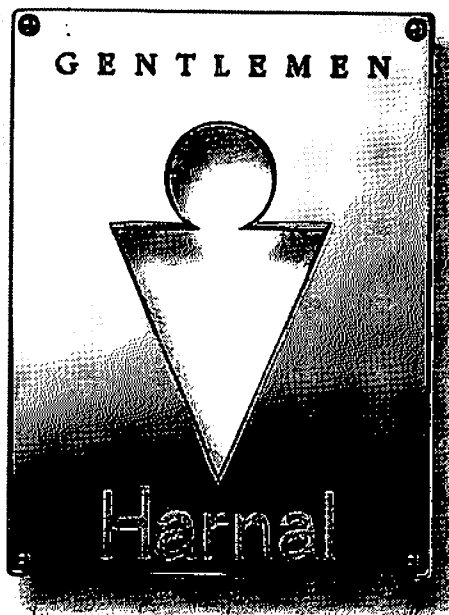
以上のように、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、アンチセンスK-ras RNAの導入により*in vitro*のみでなく*in vivo*においても大腸がん細胞の増殖抑制効果を示し、大腸がんにおいてK-rasが遺伝子治療の標的になりうることを示唆された。すなわち、一部の膵がんにおいてK-rasががん形質の維持あるいはがん細胞生存の鍵となる分子であることを示した点で消化器病学上価値ある有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 日比 紀文  
外科学 北島 政樹 病理学 坂元 亨字  
先端医科学 河上 裕  
学力確認担当者: 北島 政樹  
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成16年10月13日

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ブロッカー！



- 前立腺・尿道平滑筋に選択的なα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低下、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22% (104/4724例)で、主なものはめまい、胃不快感等です。(再審査終了時)なお、重大な副作用として、失神・意識喪失、肝機能障害、黄疸が認められています。

【禁忌(次の患者には投与しないこと)】

- (1) 本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者
- (2) 塩酸バルデナフィル水和物を投与中の患者【「相互作用」の項参照】

【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【併用禁忌】(併用しないこと) 塩酸バルデナフィル水和物(レビトラ)【併用注意】(併用に注意すること)降圧剤、クエン酸シムルデナフィル

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、ALP上昇、黄疸等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。

|                   | 0.1~5%未満  | 0.1%未満                      | 頻度不明             |
|-------------------|-----------|-----------------------------|------------------|
| 精神神経系             | めまい、ふらふら感 | 立ちくらみ、頭暈、嘔気                 | 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 <sup>1)</sup> |           | 痒痒感、発疹等                     | 尋麻疹              |
| 消化器               | 胃不快感      | 嘔気、嘔吐、口渇、便秘、胃痛、食欲不旺、下痢、嘔下障害 |                  |
| その他               |           | 鼻閉、浮腫、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**<sup>®</sup> 0.1mg  
0.2mg カプセル

塩酸タムスロシン製剤

薬価収載