

第83卷第2号

平成18年

6月

慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

綜 説

●着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング 浜谷 敏生(69)

講 座

●内視鏡を用いた婦人科悪性腫瘍（子宮癌・卵巣癌）手術 安藤 正明(81)

●非定型的自己免疫性肝疾患をめぐる諸問題 稲垣 恭孝(91)

●呼吸の中樞性化学感受性とカリウムチャンネル 小山田吉孝(97)

学 会 展 望

●第29回慶應外科フォーラム(103)

●第12回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会(115)

慶應医学会平成17年度庶務・会計報告(122)

学 位 論 文

●女性性器癌細胞における β 1,4-ガラクトース転移酵素の発現とその細胞生物学的特性におよぼす影響 山下 博(T13)

●知覚変容発作に関する研究：抗精神病薬の副作用とする立場から 内田 裕之(T23)

号 外

●博士（医学）学位論文－内容および審査要旨－（第180号）(別頁)

Vol. 83
JuneNo. 2
25, 2006

慶應醫學會

綜 説

着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室¹⁾

Developmental Genomics and Aging Section, Laboratory of Genetics, National Institute on Aging (NIA),
National Institutes of Health, Baltimore, MD, USA²⁾

はま 谷 敏 生¹⁾, 洪 実²⁾, 久 慈 直 昭¹⁾, 浅 田 弘 法¹⁾,
丸 山 哲 夫¹⁾, 吉 村 泰 典¹⁾

Key Words : Preimplantation embryo, gene expression profiling, microarray, MGA, ZGA

はじめに

近年では、未受精卵を含めた着床前期胚の潜在能力を利用することによって、発生工学が著しい進歩を遂げ、着床前期胚発生における遺伝子ネットワークの解明は、生殖医学のみならず再生医学においても極めて重要となっている。また、最近のマイクロアレイ技術の急速な進歩を背景に、着床前期胚の研究においても、生殖補助医療(ART)における卵および胚の分子生物学的質の評価法の開発、生命始動および分化全能性に係る遺伝子発現制御機構の解明、クローン胚における核のリプログラミング機構の解明などを目的として、個々の遺伝子の発現のみならず、グローバルに遺伝子発現動態を観察することが試みられている。ここでは、我々が行った遺伝子発現プロファイリングの解析結果を中心に、着床前期胚における遺伝子発現動態について述べたい。

着床前期胚における遺伝子発現動態の研究背景

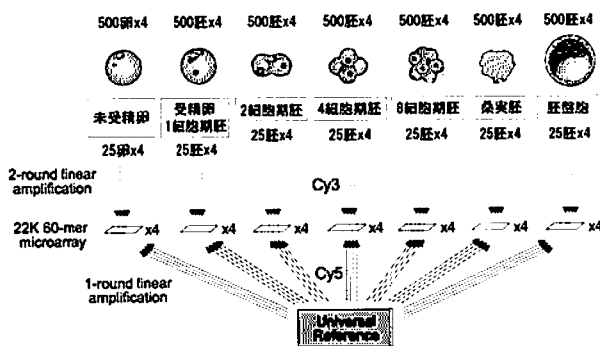
着床前期胚発生においては、受精、コンパクション、胚性ゲノムの活性化、胚盤胞腔の形成、内細胞塊と栄養外胚葉の分化、着床など劇的な生物学的事象が存在する。また、少子化社会を背景に体外受精をはじめとする不妊治療の意義が増大しているため、着床前期胚発生機構の分子生物学的理解を深め、体外受精における妊娠率を向上することが重要となっている。さらに、未受精卵を含めた着床前期胚の潜在能力を利用することによって、近年、発生工学が著しい進歩を遂げている。例えば、体細胞クローン動物など人為的な遺伝的コントロールをされ

た動物の創出が多数報告されるようになった。また、ヒト染色体異常卵の治療や体外受精の成功率向上を目的として、高齢患者の卵に若年健康女性から提供されたドナー卵の細胞質を注入する、あるいは除核したドナー卵に高齢患者の卵核を注入する卵細胞質移植が検討されている。マウスでは、胚性幹細胞から外来遺伝子の導入およびマーカー遺伝子を用いた選別により、卵細胞へ特異的に分化させることが可能となった¹⁾。このようにしてできた卵細胞の核を患者の体細胞核と入れ替えて胚盤胞へと発生させ、その患者自身のゲノムを持つ胚性幹細胞を作るといったテラーメード医療も技術的には近い将来可能になるかもしれない。しかし、これらの安全性を確立するためには、置換された体細胞核の未受精卵および着床前期胚におけるリプログラミング機構の解明が必須である。このように、着床前期胚発生における分子生物学的機構の解明は生殖医学および再生医学において極めて重要である。

着床前期胚発生には、卵形成過程において蓄積された卵性遺伝子産物と受精後に胚性ゲノムから読み出される胚性遺伝子産物の両方が必要である。それでは、卵性遺伝子産物には着床前期胚においてどのような役割があるのだろうか？また、未受精卵ではあらゆる遺伝子の転写が停止しているが、いったい受精後いつからどのような胚性遺伝子群が最初に読み出され、それらはどのような生物学的役割を担っているのだろうか？さらに、着床前期胚における分化全能性とその喪失、すなわち桑実胚におけるコンパクションに続く胚盤胞期における内細胞塊と栄養外胚葉への分化などは、どのような遺伝子群によってコントロールされているのだろうか？これら

の疑問に答えるためには、従来の研究手法によりいくつかの遺伝子の発現変化を観察するのみならず、全遺伝子の発現動態を観察することにより、マスター遺伝子群を見出し、それらの有機的遺伝子ネットワークを解明することが重要である。

最近では、遺伝子ネットワーク解明のアプローチとして、DNA オリゴ・マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルが使用されるようになった。しかし、着床前期胚の研究においては、サンプルの希少性と、初期胚に特異的に発現される遺伝子を含むマイクロアレイ・プラットフォームの欠如が大きな障害となっていた。しかし、*in vitro* transcription による cRNA 増幅および labeling reaction の効率化 (Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit from Agilent Technologies など)、さらに、未受精卵～胚発生各段階 cDNA ライブラリーの expression sequence tags (ESTs) を含む NIA Mouse Gene Index に基づいて作製された NIA 22K 60-mer oligo microarray (Agilent Mouse Development Oligo Microarray: 現在は 44K にバージョンアップ) の登場がこれを可能にした²⁾。そこで、われわれはマウス着床前期各ステージの胚を 4 セット (1 セット 500 個) 集め、それぞれから mRNA を抽出、*in vitro* transcription 反応により cRNA 増幅および Cy3 標識し、Cy5 標識された universal reference とともに、NIA 22K 60-mer oligo microarray において hybridization に供した (図



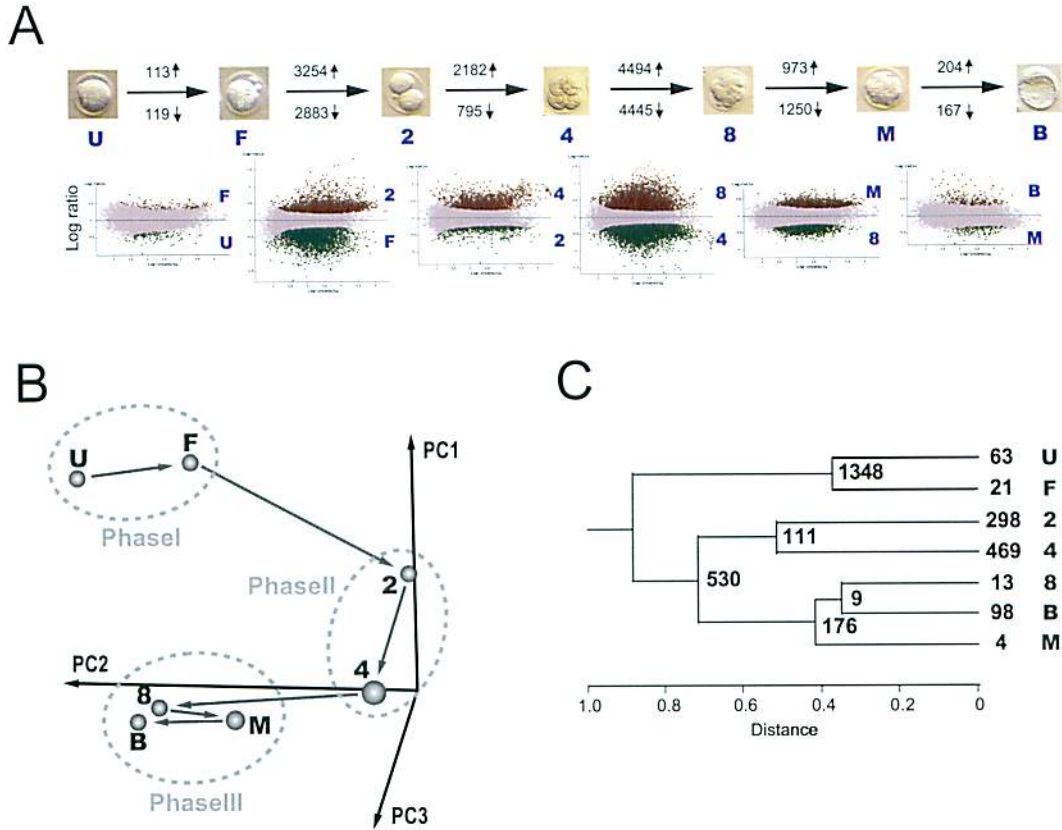
第1図 実験方法: ハイブリダイゼーション・デザイン
着床前期各ステージの胚を、500 個ずつプールして 1 セットとしたものを、それぞれ 4 セットずつ集めた。各々のセットからそれぞれ mRNA を抽出、2-round の cRNA 増幅を行い、Cy3 標識した。1-round の cRNA 増幅で Cy5 標識したコントロール・サンプル、Universal reference とともに、マイクロアレイにおいてハイブリダイゼーションに供した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004: 6: 117-31 より改変。)

1)³⁾。ここでは、我々の結果を中心に、着床前期胚における遺伝子発現に関するこれまでの知見および他グループのマイクロアレイ・データ⁴⁾も含めて述べたいと思う。なお、遺伝子表記に関しては NCBI Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) にある Gene symbol を用い、遺伝子機能に関するキーワードとして Gene Ontology (GO) term (<http://www.geneontology.org/>)⁵⁾を用いた。また、データ解析には、NIA array analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>)⁶⁾、TIGR MultiExperiment Viewer (MeV) (<http://www.tm4.org/mev.html>)¹⁰⁾、GenMAPP (<http://www.genmapp.org/>)¹¹⁾を用いた。

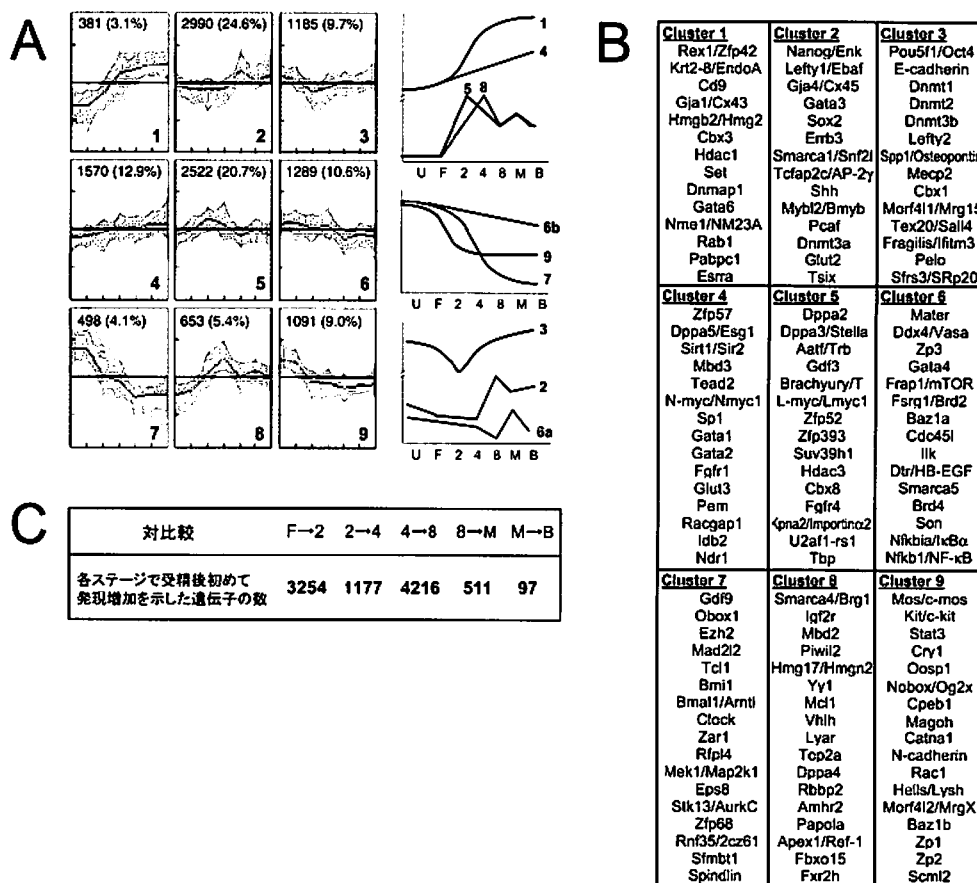
マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング ～*in vivo*～

着床前期胚発生における遺伝子発現変化の全体像

最初に、我々のデータセットからマウス着床前期胚における遺伝子発現のおおよその傾向をつかむため、各ステージ間で対比較 pairwise comparison を行った (図 2A)。NIA 22K 60-mer oligo microarray には、21939 の遺伝子塩基配列 (60mer) がスポットされているが、そのうち、受精卵から 2 細胞期胚にかけて、3254 の遺伝子が発現上昇、2883 の遺伝子が発現低下を示し、さらに、4 細胞期から 8 細胞期にかけても、4494 の遺伝子が発現上昇、4445 の遺伝子が発現低下を示した。すなわち、受精卵から 2 細胞期胚、また 4 細胞期胚から 8 細胞期胚の間に最も劇的な遺伝子発現の変化を認めた。また、いずれかのステージ間で有意な変化が認められた 12179 の遺伝子を用いて、階層クラスタリング hierarchical clustering あるいは主成分分析 principle component analysis (PCA) を行ったところ、同様の傾向が認められ、遺伝子発現の観点から、着床前期を未受精卵-受精卵期 (Phase I)、2-4 細胞期 (Phase II)、8 細胞期-胚盤胞期 (Phase III) に分けることができた (図 2B, C)。Phase I～II における多数の遺伝子の発現上昇は、女性前核と男性前核より新たに構築された核から最初に読み出された RNA によるものであり、ZGA (Zygotic gene activation) に当たると考えられる。一方、Phase II～III にかけてのグローバルな遺伝子発現上昇は、我々が初めて観察した現象であり、これを MGA (Mid-preimplantation gene activation) と称することとした。MGA については後に詳しく述べるが、Van Blerkom らは着床前期胚におけるタンパク質合成の変化を SDS-gel の泳動パターンから観察し、4 細胞



第2図 マイクロアレイデータの解析結果と着床前期胚における遺伝子発現の全体像
 U, 未受精卵; F, 受精卵; 2, 2細胞期胚; 4, 4細胞期胚; 8, 8細胞期胚; M, 桑実胚; B, 胚盤胞。
 (A) 隣り合う2ステージ間における対比較。各々の scatter plot において、縦軸は Log Ratio, すなわち発現比, 横軸は Cy3・Cy5 平均信号強度を示し, 有意な発現上昇を認めた遺伝子を赤色のドットで, 有意な発現低下を認めた遺伝子を緑色のドットで示し, これらの遺伝子の数も付した。(B) 主成分分析。主成分分析において, 着床前期胚は, 未受精卵と受精卵の Phase I, 2~4細胞期の Phase II, 8細胞期以降の Phase III の3つのグループに分かれた。Phase I→II, すなわち受精卵から2細胞期にかけての大きな発現増加は, Zygotic gene activation, ZGA に相当する。一方, Phase II→III, すなわち4細胞期胚から8細胞期胚にかけての大きな発現増加は Mid-preimplantation Gene Activation, MGA と名付けられた。(C) 階層クラスタリング。階層クラスタリングでも同様の3つのグループに分かれた。また, 各ステージ・各グループにおいて有意に特異的な発現を示した遺伝子も抽出されたので, それらの遺伝子数も示した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004; 6; 117-31 より改変。)



第3図 K-mean 法による非階層クラスタリングと胚性 RNA のさらなる解析

(A) K-mean 法による非階層クラスタリングにより、9つの発現パターンを示すクラスターが得られ、それらはさらに大きく3つのグループに分かれた。第1のグループは、クラスター1、4、5、8を含み、新たに構築された胚性ゲノムからの遺伝子発現を示した。第2のグループは、クラスター7と9を含み、卵形成過程に豊富に蓄えられた卵性 RNA で、着床前期に分解されるパターンであった。第3のグループは、クラスター2と3を含み、卵性 RNA が分解を受ける一方、少し遅れて胚性 RNA が作られるような遺伝子発現パターンであると考えられた。黒色で示した発現パターンは、これまでに報告のあるパターンであるが、赤色で示した発現パターンは、マイクロアレイ実験によって明らかとなったものである。(B) それぞれのクラスターに含まれた遺伝子の凡例を示した。(C) 胚性に読み出される遺伝子がどのステージに初めて読み出されるのかに注目し、それらの遺伝子数を示した。(Hamatani, et al. *Developmental Cell* 2004; 6; 117-31 より改変。)

期～8細胞期の際に最も劇的な変化があることを1975年に明らかにしている¹²⁾。

着床前期胚発生における遺伝子個々の発現パターン

次に、全体の遺伝子発現変化の傾向よりもむしろ個々の遺伝子の発現変化を追うため、いずれかのステージ間で有意な変化を認めた12179の遺伝子について、K-mean 法による非階層クラスタリングを行った。図3に

示したように、9つの発現パターンに分類された。これら着床前期胚における遺伝子発現パターンの多くが、Wave-like pattern, すなわち、発現上昇の後、速やかに抑制されるパターンであり、ステージ特異的な遺伝子発現がグローバルに存在することが明らかとなった。Wang と Zernicka-Goetz らのマイクロアレイ実験においても、同様にステージ特異的な Wave-like pattern が観察されている⁴⁾。筆者らが観察した9つの発現パター

ンは、さらに大きく3つのグループに分類された。第1のグループは、クラスター1 (381 遺伝子)、クラスター4 (1570 遺伝子)、クラスター5 (2522 遺伝子)、クラスター8 (653 遺伝子) を含み、新たに構築された胚性ゲノムからの遺伝子発現である。一方、第2のグループは、クラスター7 (498 遺伝子) とクラスター9 (1091 遺伝子) であり、卵形成過程に豊富に蓄えられ、未受精卵の成熟過程あるいは受精後に分解される RNA と考えられた。また、第3のグループは、クラスター2 (2990 遺伝子) とクラスター3 (1185 遺伝子) で、卵性 RNA が分解を受ける一方、幾らか遅れて胚性 RNA が作られるような遺伝子発現のパターンである。最後に、クラスター6 (1289 遺伝子) には、第2のパターンを示す遺伝子 (Mater など) と第3のパターンを示す遺伝子 (Hb-egf など) の両方が含まれていた。

胚性 RNA

非階層クラスタリングでも明らかなように、着床前期の遺伝子発現は、卵性 RNA の分解と受精後新たに構築された核から転写された遺伝子の発現上昇が、複雑に重なりあっている。そこで、我々は、胚性に読み出される遺伝子がどのステージで初めて読み出されているのかに注目した。受精卵～2細胞期、2細胞期～4細胞期、4細胞期～8細胞期、8細胞期～桑実胚期、桑実胚期～胚盤胞期に、それぞれ新たに3254、1177、4216、511、97の遺伝子の発現上昇を認めている (図3C)。対比較の結果と同様、受精卵～2細胞期、4細胞期～8細胞期で多数の遺伝子が新たに転写開始されており、それぞれがZGA、MGAに相当すると考えられた。

受精卵～2細胞期に発現上昇を認めた遺伝子のほとんどは、K-mean clusteringにおいて、クラスター1、5、8に分類され、ZGAパターンを呈する。これらの遺伝子は、図4に示すように、細胞分裂や核酸合成などの基礎的な細胞機能に関するGO termで特徴付けられた。すなわち、ZGAは、Phase IIIにおける高度な形態変化にではなく、新たな生命の始動に際し、Phase IIにおける細胞分裂や代謝などの基礎的な細胞機能の確立に貢献していると考えられた。

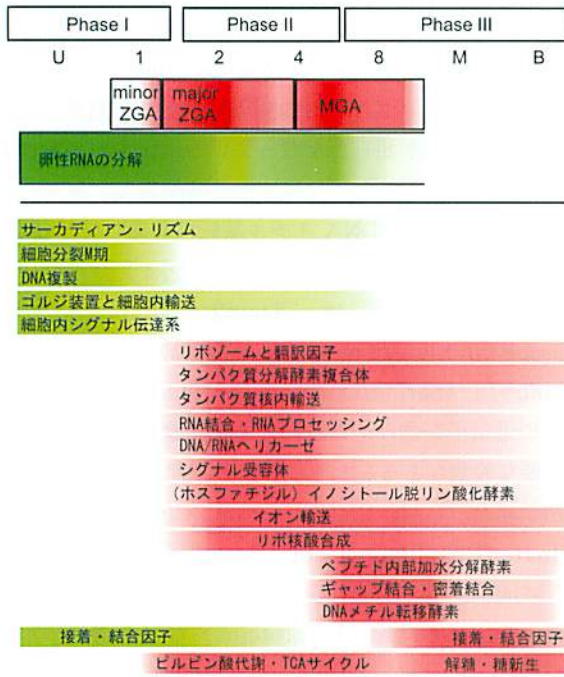
また、4～8細胞期 (Phase II～III) に発現上昇を認めた4216のMGA遺伝子のうち、2752 (82.7%) がクラスター2に、409 (12.3%) がクラスター3に分類された。形態的に最も劇的な変化をきたす8細胞期～桑実胚期および桑実胚期～胚盤胞期に、少数の遺伝子しか発現上昇を認めていないことから、このMGA産物がコンパクション、胚盤胞腔の形成、ICMとTEへの分

化などに極めて重要であることが推察された。MGA遺伝子には、Lefty-1, Oct4, Nanog, Bmyb, Melk など、ノックアウトマウスの作製実験により初期発生に不可欠であることが明らかとなっている遺伝子が多数含まれる。また、“ペプチド内部加水分解酵素”、“ギャップ結合・密着結合”、“DNAメチル基転移酵素”などのGO termをもつ遺伝子が多く含まれた (図4)。“ペプチド内部加水分解酵素”は、Timp2, Timp3, Timp4 (Tissue inhibitor of metalloproteases) や Serpina3n, Serpinb1a (Serine/cysteine peptidase inhibitors) などの遺伝子を含み、これらの遺伝子産物が着床において重要な役割があることを示唆すると考えられる。また、“密着結合”には、Cldn6, Cldn8, Cldn10, Cldn12, Cldn15 (Claudins), Ocln (Occludin)、“ギャップ結合”には、Gja3, Gja4, Gja7, Gjb1, Gjb5 (gap junction membrane channel proteins) などの遺伝子が含まれた。

8細胞期～桑実胚期あるいは桑実胚期～胚盤胞期においては、“接着因子”、“small GTPaseシグナル伝達”、“グルコース代謝”などのGO termをもつ遺伝子が発現上昇を示した (図4)。“small GTPaseシグナル伝達”は、Iqgap1, Rac1, Kras2, Cdc42 など E-cadherinに関連した細胞接着に重要な遺伝子を含み、これらはコンパクションに重要であると考えられる。また、着床前期胚における極性に注目し、WangとZernicka-Goetzらも、この時期にWnt, Bmpのシグナル伝達系に関わる遺伝子の活性化を観察している⁹⁾。さらに、エネルギー代謝回路については、着床前期胚前期ではピルビン酸代謝・TCA cycleが主であるが、着床前期胚後期ではグルコースが利用可能となることが知られている^{13), 14)}。筆者らのマイクロアレイ・データでも、ミトコンドリア・ピルビン酸代謝に関わる遺伝子が着床前期初期から発現上昇している一方、解糖・糖新生に関わる遺伝子はむしろ徐々に発現上昇し、着床前期後期に高発現していることが確認された。さらに、glucoseの細胞内への取り込みに重要なGlut1, Glut8, Irs1, Igf1rなどの遺伝子も8細胞期～桑実胚期で有意な発現上昇を示した。

卵性 RNA

卵形成過程に大量のRNAやタンパク質が蓄えられるが、未受精卵 (Metaphase II) においては全ての遺伝子の転写は停止している。これまで、マウスにおいては、一部のRNAは卵成熟過程において分解が開始され、ほとんど全ての卵性RNAが2細胞期までに分解されると考えられてきた^{15), 16)}。我々のデータにおいても、確か



第4図 着床前期胚における遺伝子発現パターンと GO term との関係

GO term と前述のクラスター分類を利用し、それぞれのステージにおいて発現上昇を示した遺伝子群に頻度の高い GO term を抽出した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004 : 6 ; 117-31 より改変.)

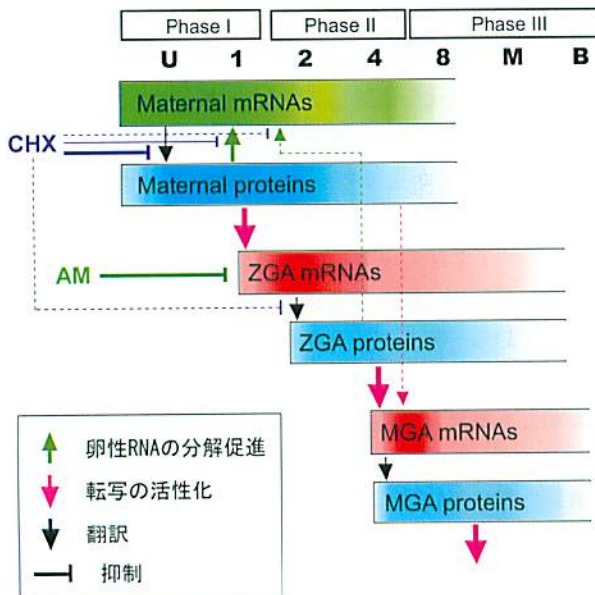
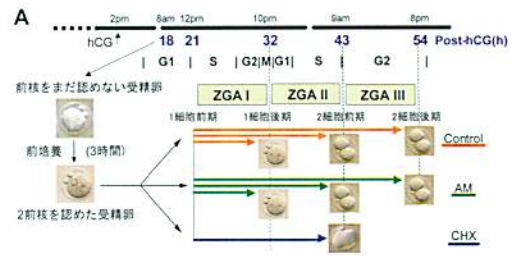


図6. 着床前期胚の遺伝子発現調節機構のモデル

卵性 RNA の翻訳が ZGA に必須であり、また、一部の遺伝子の卵性 RNA 分解にも重要な役割を果たしていると考えられた。また、MGA の誘導に ZGA が必要であることが推察された。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004 : 6 ; 117-31 より改変.)



B

対比較	ZGA I 21h vs. 32h	ZGA II 32h vs. 43h	ZGA I+II 21h vs. 43h	ZGA III 43h vs. 54h
阻害剤(-)で培養した場合、 発現上昇を示した遺伝子	47	114	129	1733
そのうち、AMと培養した場合に 発現上昇を示さなかった遺伝子	1 (2.1%)	101 (88.6%)	99 (76.7%)	1727 (99.7%)
そのうち、CHXと培養した場合に 発現上昇を示さなかった遺伝子	-	-	107 (82.9%)	-

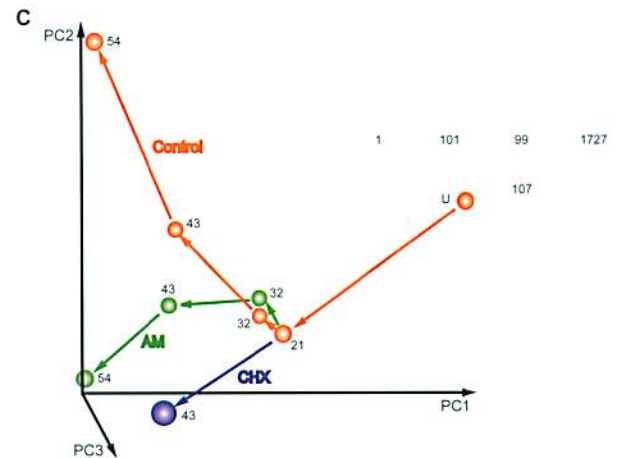


図5. 体外培養胚を用いた遺伝子発現プロファイリング

(A) hCG 注射後 18 時間の採取直後に既に 2 前核を有した受精卵は棄却し、2 極体 1 前核の受精卵を 3 時間前培養し、新たに 2 前核を認めた受精卵のみを hCG 注射後 21 時間後より体外培養に供した。hCG 注射後 32, 43, 54 時間後に、それぞれ 1 細胞後期、2 細胞前期、2 細胞後期の胚を採取した。それぞれ 100 個の胚をプールしたものを 3 セット集め、mRNA を抽出し、マイクロアレイに供した。また同様に、転写阻害剤 α -amanitin (AM)、翻訳阻害剤 cycloheximide (CHX)、DNA 合成阻害剤 aphidicolin (AC)、さらに AC の溶媒として用いた dimethylsulfoxide (DMSO) とともに培養した各ステージ胚も採取し、それぞれマイクロアレイに供し、各薬剤の ZGA に対する影響を観察した。Post-hCG 21h, 1 細胞前期; Post-hCG 32h, 1 細胞後期; Post-hCG 43h, 2 細胞前期; Post-hCG 54h, 2 細胞後期。(B) ステージ間対比較により、有意な発現上昇を認めた遺伝子数は、hCG 注射後 21→32 (ZGA I), 32→43 (ZGA II), 21→43 (ZGA I+II), 43→54 時間後 (ZGA III) に、それぞれ 47, 114, 129, 1733 であったが、これらの発現上昇が各種薬剤と培養した場合にどれだけ抑制されたかを検討した。(C) 体外培養胚マイクロアレイデータの主成分分析。翻訳阻害剤 (CHX) は転写阻害剤 (AM) と同等に ZGA を強く抑制した。(Hamatani, et al. Developmental Cell 2004 : 6 ; 117-31 より改変.)

にクラスター 9 はこれに相当するが、クラスター 6 やクラスター 7 の大部分の遺伝子（それぞれ 68.7%、70.5%）は 4 細胞期から 8 細胞期にかけて有意な発現低下を示した。また、ヒトにおいても多く卵性 RNA が 4 細胞期以降に分解されていることが観察されている⁷⁾。これら卵に転写産物が蓄えられる遺伝子は、受精および着床前期発生の準備に重要な遺伝子群と考えられるが、クローニングにおける核移植後の体細胞核リモデリングに重要な遺伝子も多く含むことが予想される。Zeng と Schultz らは、着床前期胚に比較して、未受精卵の遺伝子発現プロファイルは、クロマチン構造、ゲノム安定性などに関連する遺伝子が特徴的であったと報告している⁹⁾。さらに、最近になって、Pan と Schultz らは、原始卵胞から胞状卵胞に至る各卵胞発育段階における卵母細胞の遺伝子発現プロファイリングについても報告している¹⁷⁾。階層クラスタリングの結果、卵母細胞における遺伝子発現の変化は、原始卵胞から 1 次卵胞にかけて最大で、双方のステージで発現が認められた 16883 の遺伝子プローブのうち、5020 のプローブで 2 倍以上の変化が観察されている。これは、一層の顆粒膜細胞が立方体状に密に卵母細胞を取り囲むようになり、卵胞構造が構築され、卵胞・卵細胞が成長・分化を始めることを反映していると考えられる。また、2 次卵胞と胞状卵胞の間でも、比較的大きな遺伝子発現変化が認められ、meiotic competence の獲得（体外培養した場合に減数分裂再開）を反映しているのかもしれない。胞状卵胞で高発現を示した遺伝子には、タンパク質合成およびリボソーム、細胞分裂、DNA 修復、微小管などに関する GO term をもつものが多かった。一方、我々は、若年雌マウスから得た未受精卵と高齢雌マウスから得た未受精卵から RNA を抽出しマイクロアレイでそれらの遺伝子発現も比較したが、クロマチン構造、DNA メチル化、ゲノム安定性、細胞分裂、RNA ヘリケースなどに関わる遺伝子の発現が大きく変化していた¹⁸⁾。さらに、Van Blerkom や Tarin らが卵におけるミトコンドリアの重要性を以前から指摘しているように¹⁹⁻²¹⁾、ミトコンドリアおよびエネルギー代謝に関わる遺伝子が大きく変化していた。これらの遺伝子は卵の老化および着床前期発生および妊孕性に大きく関わっていると考えられる。

マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング ～in vitro～

マウスにおける ZGA の遺伝子発現動態をさらに詳細に観察するため、図 5A に示したように、受精後に細胞

周期を同期させて体外培養した 1 細胞前期胚 (post-hCG 21h)、1 細胞後期胚 (post-hCG 32h)、2 細胞前期胚 (post-hCG 43h)、2 細胞後期胚 (post-hCG 54h) についても遺伝子発現プロファイリングを行った³⁾。また同様に、 α -amanitin (AM, 転写阻害剤) あるいは cycloheximide (CHX, 翻訳阻害剤) とともに培養した各ステージ胚も、それぞれマイクロアレイに供し、これらの薬剤の ZGA における遺伝子発現に対する影響も観察した (図 6)。阻害剤 (-) で培養した場合、発現上昇を認めた遺伝子数は、1 細胞後期までに 47、1 細胞後期～2 細胞前期に 114、2 細胞前期～2 細胞後期に 1733 であった (図 5B)。1 細胞後期までの 47 遺伝子の発現上昇は、十分量の AM を使用したにもかかわらず抑制されなかったため²²⁾、poly (A) tail の長さの変化により、mRNA の安定性が変化したか、cRNA amplification labeling reaction における oligo-d (T) プライマーによる逆転写効率が変化したためであると考えられた²³⁾、²⁴⁾。一方、1 細胞後期～2 細胞前期に発現上昇を示した 114 遺伝子は、AM によりその 88.6% の発現上昇が抑制され、胚性ゲノムから転写が再開されたものと考えられ、ZGA の一部 (“minor ZGA”) であると思われた。同様に、2 細胞前期～後期の 1733 遺伝子の発現上昇も AM がその 99.7% の発現上昇を抑制したため、2 細胞前期に major ZGA は 2 細胞前期に開始されると考えられた。一方、阻害剤 (-) で培養した場合、1 細胞前期～2 細胞前期には 129 遺伝子の発現上昇を認めたが、CHX と培養した場合には、そのうち 107 遺伝子 (82.9%) の発現上昇が抑制され、AM の場合 (99 遺伝子, 76.7%) と同程度まで抑制された。主成分分析 (図 5C) においても、遺伝子発現の全体像は、AM と培養した場合と同様、阻害剤 (-) で培養した場合から大きく外れることが明らかとなった。また、1 細胞後期において卵形成過程で蓄えられていた RNA は盛んに翻訳されるものの、新たに合成された RNA (ZGA RNA) は 2 細胞期になるまで翻訳されないことに照らして考えると¹⁶⁾、²⁵⁾、卵性 RNA からの翻訳こそが ZGA には必須であると考えられた²⁴⁾。さらに、阻害剤 (-) で培養した場合、1 細胞後期～2 細胞前期に 1416 遺伝子の発現が減少したが、CHX と培養した場合にはそのうち 221 遺伝子の発現が上昇に転じたため、卵性 RNA の翻訳が一部の遺伝子の卵性 RNA 分解にも重要な役割を果たしていることが示唆された。このように、着床前期胚では、卵性 RNA の翻訳と分解が能動的に行われ、その結果 ZGA が誘導されると考えられる (図 6C)。また、受精卵を AM と培養すると、RNA の翻訳は阻害されないに

もかわらず、通常次ステージまでに細胞分裂は停止することから²⁶⁾、MGAの誘導には、卵性遺伝子産物よりも、むしろZGA遺伝子産物が重要であると考えられた(図6)。

マウス胚盤胞の着床遅延現象における 遺伝子発現プロファイリング

一部の哺乳類では、気候や栄養状態が不良である場合に着床が遅延することがある。その場合、胚は着床せずに発生が停止(Dormancy, Diapause)し、環境が至適状態に戻ると胚発生が再開し、着床する。マウスにおいては、性交後3.5日に卵巣を摘除し、Progesteroneのみを毎日補充することにより、人為的に着床遅延を惹起させることができる。また、Estradiol (E₂)を単回投与することにより、Dormancyは解消され、着床が誘起され、その後の胎仔発生も正常である。マウスではこの着床遅延胚を用いるとES細胞が効率よく樹立されることから、Dormancyは細胞の分化発生能に影響を与えず、細胞分裂が抑制されていることになる。もし、このメカニズムが解明され、制御されれば、ARTにおける卵や胚の効率的な凍結保存法の開発、胎状奇胎・絨毛癌の治療法開発、ES細胞の維持培養や分化誘導の効率化などへ応用できる可能性がある。無論、胚性着床因子の研究にもこのモデルは有用である。そこで、このマウス着床遅延モデルにおいて、着床遅延にある胚盤胞(Dormant blastocyst)とE₂により着床能を回復させた胚盤胞(Activated blastocyst)の遺伝子発現プロファイルを比較検討した。それぞれ100個を1セットとしたものを3セットずつ集め、各セットからmRNAを抽出し、cRNA増幅(2本鎖DNA合成および*in vitro* transcription)を2回行い、Cy3-標識ターゲットを合成した²⁷⁾。それぞれのターゲットはCy5標識コントロール・ターゲットと共に、NIA 60mer oligo microarrayにおいてハイブリダイゼーションに供した。マイクロアレイ上にある21239遺伝子のうち、80遺伝子がDormant blastocystで、149遺伝子がActivated blastocystで有意に高発現を示した。細胞周期、シグナル伝達系、エネルギー代謝に関連した遺伝子が多く含まれていた。

一方、哺乳類の着床遅延におけるDormancyは、線虫の“Dauer larva(耐性幼虫)”，殆ど加齢せず乾燥や高温などに耐性を示し、餌の無いところで数ヶ月間(通常の寿命の数倍以上)生存可能となる現象に似ている。線虫の“Dauer larva”および加齢においては、daf-2

とdaf-16遺伝子が重要な役割を果たしている。餌が十分ある環境では、daf-2の下流で、daf-16が抑制されると耐性幼虫形成が抑制されることがわかっている。daf-2はインスリン/インスリン様成長因子の受容体であり、哺乳類の着床前期胚では、Insr, Irs1, Igf1r, Igf2rが発現しているが、そのうちIrs1とIgf2rは、Dormant blastocystで有意に高発現を示し、特にIgf2rは内細胞塊に比し、栄養外胚葉で高く発現していた。Igf2rを抑制すると、Igf2が上昇し、児の体重増加に至ることから考えると、Igf2rの高発現はリガンドの減少による二次的な反応あるいは何らかの形でDormancyの維持に貢献している可能性がある。一方、哺乳類におけるDaf-16のホモログはFork-head蛋白(Foxo1, Foxo3, Foxo4)であり、Foxo3aはDormant blastocystで有意に高発現を示し、また栄養外胚葉で高く発現していると考えられた。Foxo3aは、Smad5あるいはそれらの結合領域をプロモーターにもつp21^{cip1/waf1}とともに、Dormant blastocystで有意に高発現を示した。これらは、dormancyにおける細胞周期の停止に寄与していると考えられた(図7)。最後に、胚性着床因子としては、Activated blastocystにおけるHb-egfの高発現が目された。そこで、リコンビナントHb-egf蛋白でコートしたビーズを子宮内腔に入れて、内膜における各種蛋白の発現を観察したところ、着床期と同様に、Cox-2やBmp2、さらにはHb-egfの発現上昇が認められたため、胚盤胞におけるHb-egfの発現上昇がバラクラインに子宮内膜に働きかけ、内膜の胚受容能引き出ししている可能性が示された。

ヒト着床前期胚の遺伝子発現プロファイリング ~*in vitro*~

ヒト着床前期胚においても、DobsonとReijo Peraらは、未受精卵~8細胞期胚それぞれ1個からRNAを抽出して増幅し、cDNAマイクロアレイを用いてRNAプロファイリングを行っている²⁾。ヒトでは、発現変化した遺伝子数について言えば、ZGAに較べ、卵性RNAの分解の方が圧倒的に多数であったため、特異的な卵性RNAの分解が初期発生の始動にきわめて重要な働きがあると分析している。さらに、驚くことに分割停止した胚においても、ZGAが認められたことを報告しており、形態に基づく胚の質的判断は実際の胚の発生能力を過小評価している危険があることを報告している。また、4細胞期~8細胞期胚で初めて発現上昇を認めた遺伝子も認められているが、ヒトではZGAのタイミングがマウ

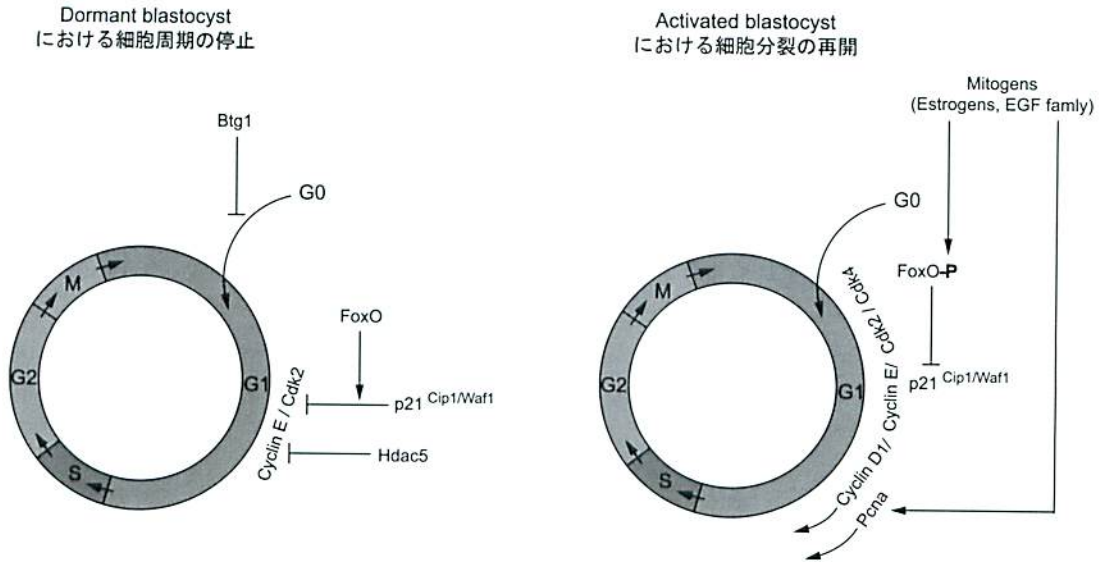


図7. Dormant blastocyst における細胞周期停止のメカニズム
 p21 が G1 期の進行に不可欠な Cyclin E-cdk2 の複合体を抑制することにより, dormancy の成立・維持が行われると考えられる. また, p21 を活性化する Foxo3a などの FoxO 蛋白, クロマチン高次構造を変化させ遺伝子発現を抑制する Hdac5 や G0 期から G1 期へ進行を抑制する Btg1 など dormancy における細胞周期の停止に貢献していると考えられた. (Lopes, et al. Reproduction 2004 : 128 ; 676 より抜粋.)

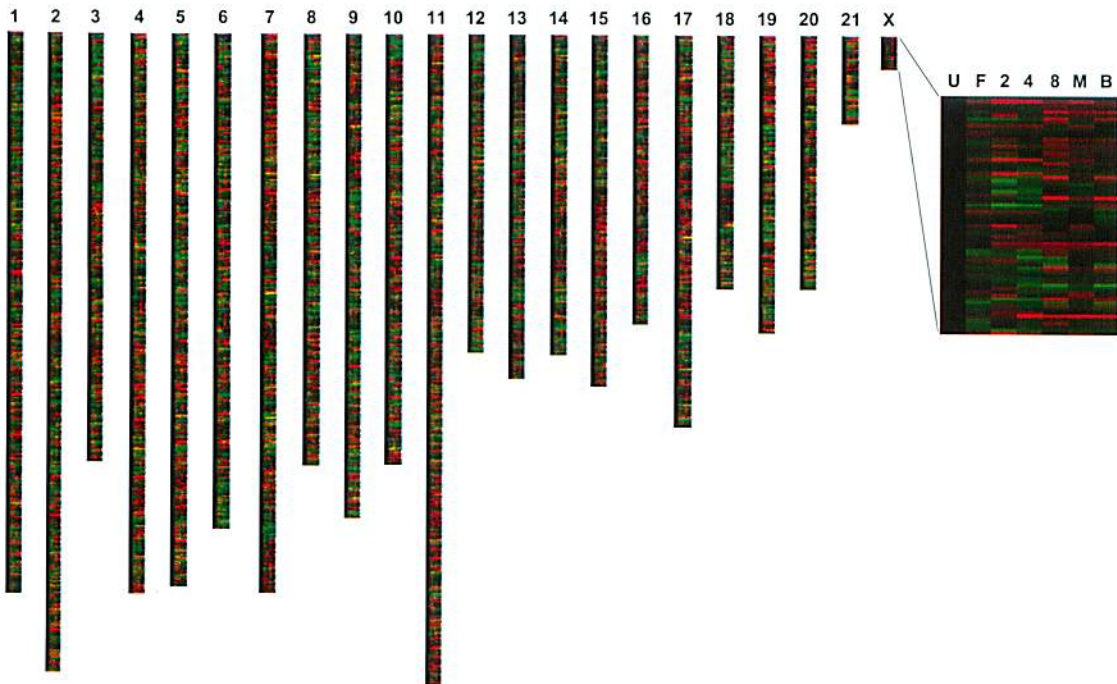


図8. 着床前期胚の遺伝子発現変化と染色体における遺伝子座との関係
 各遺伝子の着床前期各ステージにおける発現データを, 未受精卵における発現量に比して (赤色は高発現, 緑色は低発現) 横方向に示し, 縦方向には各染色体上の遺伝子座の順に並べた.

スよりも遅いため、これがマウスにおける ZGA の一部に相当するのか MGA に相当するのか今後の検討が期待される。

おわりに

このように、マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングは、着床前期胚の研究にも非常に有用である。また一方では、以下の点から、発生学や分子生物学のみならず、情報工学や発生工学の研究リソースとして今後の活用が期待される。第2減数分裂中期で停止して

いた未受精卵が、受精により細胞周期が再開するため、着床前期胚では細胞周期が極めて同調している。また、未受精卵ではすべての遺伝子の転写が停止しているが、受精後まもなく1細胞期後期には胚性ゲノムよりの転写が開始される。さらに、卵丘細胞の混入に細心の注意を払えば、他組織の混入がほとんどない、均一なサンプルが入手可能である。つまり、着床前期胚発生における遺伝子発現プロファイリングは、Bioinformatics における遺伝子発現ネットワークの解明やシミュレーションに格好のサンプル・データを供給できる。例えば、着床前期胚の遺伝子発現データを、それぞれの染色体上におけ

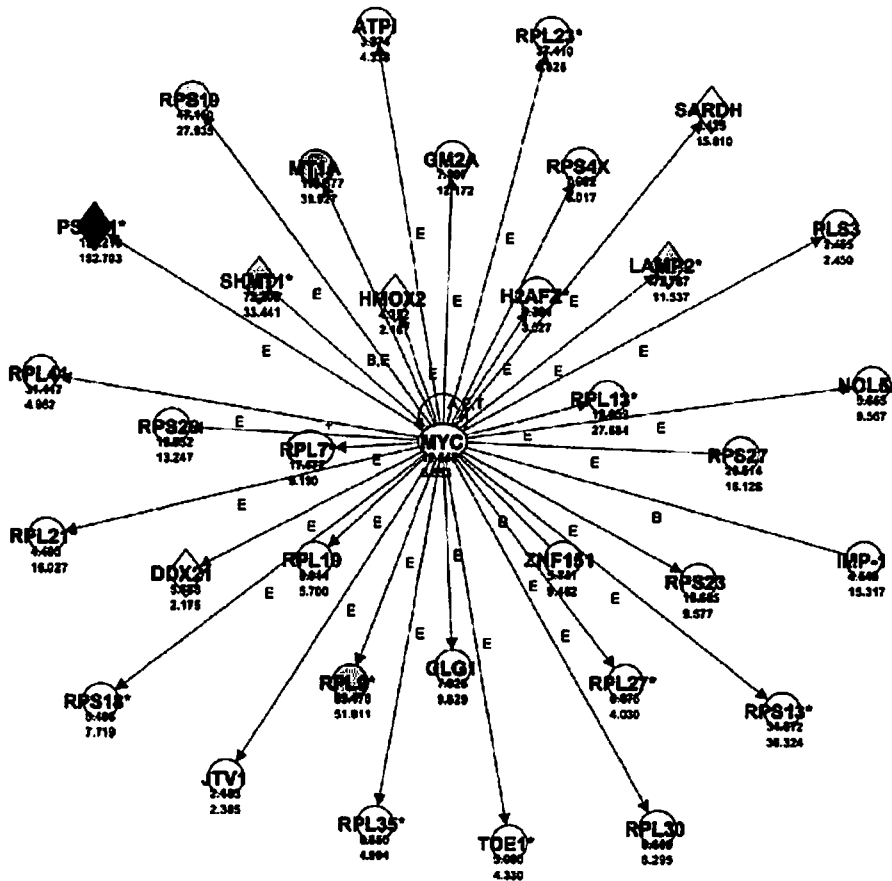


図9. ZGA における遺伝子ネットワーク解析

1細胞期胚から2細胞期胚にかけて発現上昇を示し、かつその上昇がα-amanitinにより抑制された遺伝子の中から、Ingenuity Pathways Analysisソフトウェアにより抽出されたMyc遺伝子ネットワーク⁹⁾。遺伝子間の距離は関連の強さを示し、“E”は発現の相関に基づいており、“B”は物理的な結合が報告されているものである。各遺伝子の下に記された数字は、上段が1細胞期胚の発現強度に対する2細胞期胚の発現強度の比、下段がα-amanitinと培養した2細胞期胚の発現強度に対するコントロール2細胞期体外培養胚の発現強度の比である。比が高いほど濃い赤色で示してある。各遺伝子の図形(円形、菱形など)は、遺伝子産物の機能(酵素、転写因子など)に基づいて表記されている。(Zeng, et al. Developmental Biology 2005: 283; 40-57より抜粋。)

る遺伝子座に載せてみると、図8が描ける。この図から、同調して発現上昇あるいは発現低下を示す遺伝子がクラスターを形成しているように見える染色体部分がある。これらは染色体高次構造の変化により、転写因子がDNAにアクセスしやすくなり、ゲノム上近い場所にある遺伝子群の転写をいっせいに活性化するのかもしれない。さらに、これらの遺伝子がネットワークを形成し、ある一つの細胞機能を果たしているかもしれない。Paillissonらは、マウス卵のcDNA libraryにおけるESTの出現頻度を解析し、*in silico*で卵特異的発現を示す遺伝子を抽出し、それらがマウス染色体上でクラスターをなしていることを報告している。さらに、そのlociはいずれもテロメアに近いと、他臓器での可逆的な発現抑制がいわゆる“Telomere position effect²⁹⁾”による可能性があることを指摘している。一方、ZengとSchultzらは、1細胞期胚から2細胞期胚にかけて発現上昇を示し、かつその上昇が α -amanitinにより抑制された遺伝子を抽出した上で、Ingenuity Pathways Analysisというソフトにより、これまでの知見を統合して、ZGAのマスター遺伝子の抽出を試みている(図9)⁶⁾。今後は、このような情報学的解析と更なる生物学的データの蓄積により、着床前期胚におけるZGAおよびMGAの誘起システムが解明され、さらには遺伝子ネットワークの全貌が明らかとなることを期待したい。最後に、ここで紹介した遺伝子発現プロファイリング・データは全て、NCBI-GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) あるいはEBI-ArrayExpress database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) よりダウンロードが可能であることも記しておきたい。

文 献

- 1) Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR : Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells, *Science*, 300(5623) : 1251-6, 2003.
- 2) Carter MG, Hamatani T, Sharov AA, Carmack CE, Qian Y, Aiba K, Ko NT, Dudekula DB, Brzoska PM, Hwang SS, Ko MS : In situ-synthesized novel microarray optimized for mouse stem cell and early developmental expression profiling, *Genome Res*, 13(5) : 1011-21, 2003.
- 3) Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS : Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development, *Dev Cell*, 6(1) : 117-31, 2004.
- 4) Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic

- L, Scott MP, Davis RW, Zernicka-Goetz M : A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo, *Dev Cell*, 6(1) : 133-44, 2004.
- 5) Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM : Transcript profiling during preimplantation mouse development, *Dev Biol*, 272(2) : 483-96, 2004.
- 6) Zeng F, Schultz RM : RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo, *Dev Biol*, 283(1) : 40-57, 2005.
- 7) Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, Taylor T, Shen S, Haqq C, Pera RA : The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development, *Hum Mol Genet*, 13(14) : 1461-70, 2004.
- 8) Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G : Gene ontology : tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nat Genet*, 25(1) : 25-9, 2000.
- 9) Sharov AA, Dudekula DB, Ko MS : A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data, *Bioinformatics*, 21(10) : 2548-9, 2005.
- 10) Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J : TM4 : a free, open-source system for microarray data management and analysis, *Biotechniques*, 34(2) : 374-8, 2003.
- 11) Doniger SW, Salomonis N, Dahlquist KD, Vranizan K, Lawlor SC, Conklin BR : MAPPFinder : using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data, *Genome Biol*, 4(1) : R7, 2003.
- 12) van Blerkom J, Brockway GO : Qualitative patterns of protein synthesis in the preimplantation mouse embryo. I. Normal pregnancy, *Dev Biol*, 44(1) : 148-57, 1975.
- 13) Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, Devaskar SU, Moley KH : GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(13) : 7313-8, 2000.
- 14) Martin KL, Leese HJ : Role of developmental factors in the switch from pyruvate to glucose as the major exogenous energy substrate in the preimplantation mouse embryo, *Reprod Fertil Dev*, 11(7-8) : 425-33, 1999.
- 15) Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML : Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development, *J Biol Chem*, 270(38) : 22077-80, 1995.

- 16) Schultz RM : The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo, *Hum Reprod Update*, 8(4) : 323-31, 2002.
- 17) Pan H, O'Brien M J, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM : Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development *in vitro*, *Dev Biol*, 286(2) : 493-506, 2005.
- 18) Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS : Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes, *Hum Mol Genet*, 13(19) : 2263-78, 2004.
- 19) Tarin JJ : Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos, *Mol Hum Reprod*, 2(10) : 717-24, 1996.
- 20) Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A : Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes, *Hum Reprod Update*, 6(6) : 532-49, 2000.
- 21) Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P : Mitochondrial transfer between oocytes : potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy, *Hum Reprod*, 13(10) : 2857-68, 1998.
- 22) Kidder GM, Green AF, McLachlin JR : On the use of alpha-amanitin as a transcriptional blocking agent in mouse embryos : a cautionary note, *J Exp Zool*, 233(1) : 155-9, 1985.
- 23) Rambhatla L, Patel B, Dhanasekaran N, Latham KE : Analysis of G protein alpha subunit mRNA abundance in preimplantation mouse embryos using a rapid, quantitative RT-PCR approach, *Mol Reprod Dev*, 41(3) : 314-24, 1995.
- 24) Wang Q, Latham KE : Requirement for protein synthesis during embryonic genome activation in mice, *Mol Reprod Dev*, 47(3) : 265-70, 1997.
- 25) Nothias JY, Miranda M, DePamphilis ML : Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse, *Embo J*, 15(20) : 5715-25, 1996.
- 26) Schultz RM, Davis W, Jr., Stein P, Svoboda P : Reprogramming of gene expression during preimplantation development, *J Exp Zool*, 285(3) : 276-82, 1999.
- 27) Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK : Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(28) : 10326-31, 2004.
- 28) Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA : Position effect at *S. cerevisiae* telomeres : reversible repression of Pol II transcription, *Cell*, 63(4) : 751-62, 1990.

講 座

内視鏡を用いた婦人科悪性腫瘍（子宮癌・卵巣癌）手術

倉敷成人病センター産婦人科¹⁾, 大阪中央病院産婦人科²⁾, いわき市立総合磐城共立病院³⁾

安藤 正明¹⁾, 伊熊 健一郎²⁾, 土岐 利彦³⁾

Key Words : Minimally Invasive Surgery, 後腹膜アプローチ法, 後腹膜リンパ節郭清, Total Laparoscopic Radical Hysterectomy, Laparoscopic Debulking

はじめに

悪性腫瘍に対する手術は、1990年台から普及し始めた腹腔鏡下手術により大きく変わりつつある。すでに外科領域における大腸癌に対する腹腔鏡下大腸切除は広く行われるようになり、腹腔鏡によるアプローチは直腸癌・胃癌にまで適用されつつある。体表に大きな切開を加えないこの“Minimal Access Surgery”では、出血量が少なく腸閉塞などの腸管合併症も少なく、術後の回復も極めて早いことなどから“Minimally Invasive Surgery”としての手術方法であることが広く認識されてきている。婦人科領域においては、良性疾患に対しては比較的早くから適用されており、内鏡視下手術の利点はすでに実証されてきた。しかし、悪性疾患に対しては外科領域とは異なり現時点では適用とはされておらず、未だに十分な普及にはほど遠いのが現状と言えよう。手術内容がradicalであればある程この低侵襲な手術による恩恵は大きくなるはずである。従って、手術操作が広汎な範囲に及ぶ婦人科癌に内鏡視下手術を導入することにより、極めて有用性の高い治療法を提供することになる。われわれは1998年から後腹膜リンパ節郭清あるいは広汎性子宮全摘出術に腹腔鏡を導入した。術後の回復は極めて早く、癒着による腸管合併症が激減し、また長期予後も開腹手術と差がない¹⁾。この項では、我々がこれまでに経験してきた手術術式を紹介すると共に、婦人科悪性腫瘍に対する内鏡視下手術の可能性と現在の適用についても示したい。

手技の基本

完全かつ安全な切除のためには anatomical

structureを明確に分離することが鏡視下手術では特に重要である。内視鏡手術においては術野の拡大など有利な点がある一方で視野の狭小化や遠近感の喪失などといった手術の困難性を増す要因もある。臓器損傷や切断すべき位置の誤認を防ぐ面でも局所解剖を完全に把握しておくことは極めて重要であると考えている。著者らは実際の手術操作においても出来る限り解剖的構築を明確に分離した上で切離を行っている。具体的には切離に先立ち血管・神経などをできるだけ正確に剥離し露出しておく。正確な血管の露出あるいは骨盤深部の靭帯の分離には吸引管を用いた剥離(suction dissection)が有用である。吸引管を用い断続的に吸引をかけながら剥離操作を行うと余分の脂肪が吸引され血管やリンパ管、神経が浮き出してくる。

後腹膜リンパ節郭清

婦人科悪性腫瘍においては子宮頸癌・体癌・卵巣癌のいずれもが、後腹膜リンパ節転移を起しやすいためである。特に、子宮体癌・卵巣癌では傍大動脈リンパ節(326b1)が一次リンパ節である。この部位の郭清またはサンプリングには、従来法の開腹手術であれば剣状突起に及ぶ長大な腹壁切開が必要となり手術侵襲は極めて大きいものとならざるを得なかった。また子宮頸癌や子宮体癌で傍大動脈リンパ節郭清を要すハイリスク症例では術後の放射線治療を必要とする場合も多くなる。放射線治療併用例の合併症はきわめて深刻となる場合があり危惧されてきた。実際、我々は1989年から開腹による傍大動脈リンパ節郭清を行ってきたが、開腹手術・放射線治療併用例では極めて重篤な腸管合併症を数多く経験した。このため低侵襲な手法がないか模索していた。



図1-1 5 mmEndoTIPによる後腹膜へのアクセス

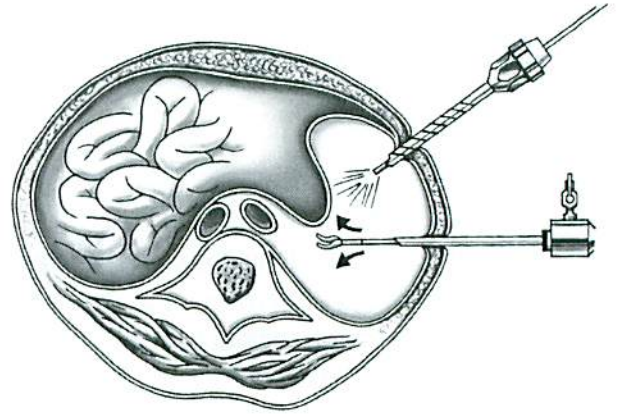


図1-2 後腹膜の展開法

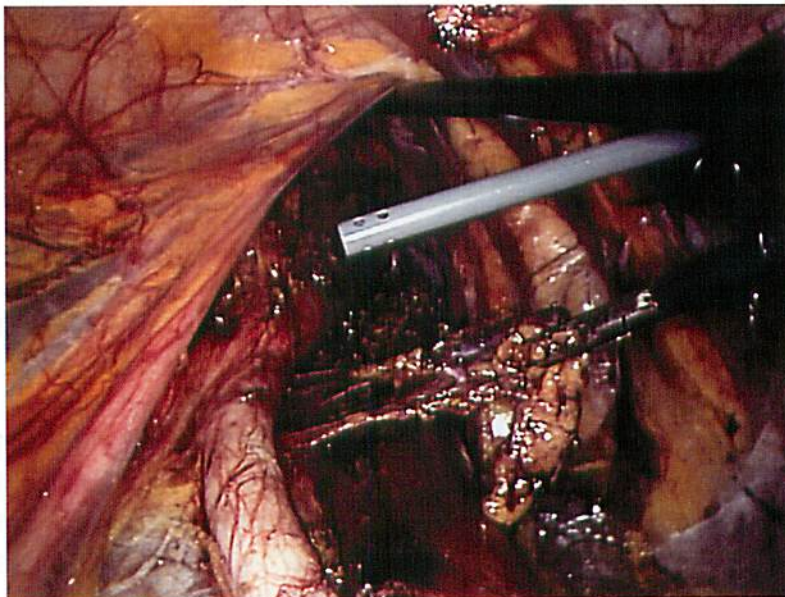


図1-3 実際の後腹膜の展開

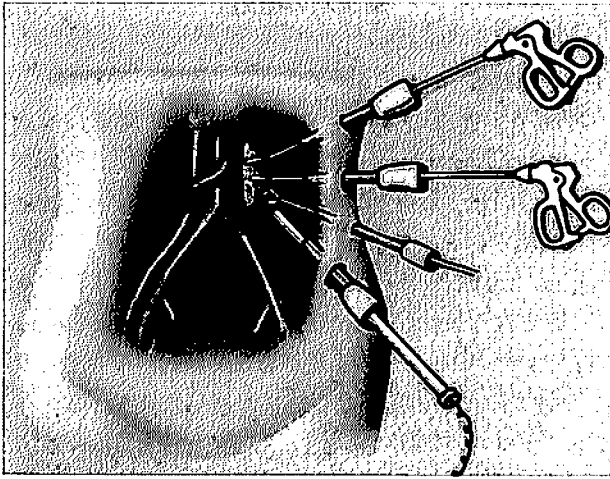


図2-1 トロッカーの配置

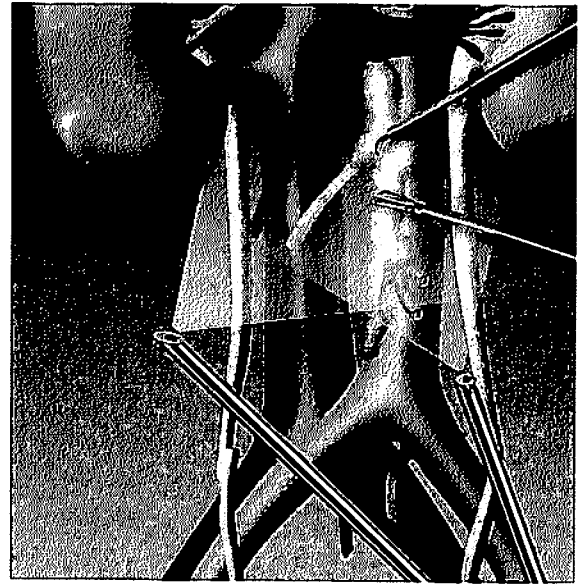


図3-1 大動脈右側郭清における30°光学視管の使用

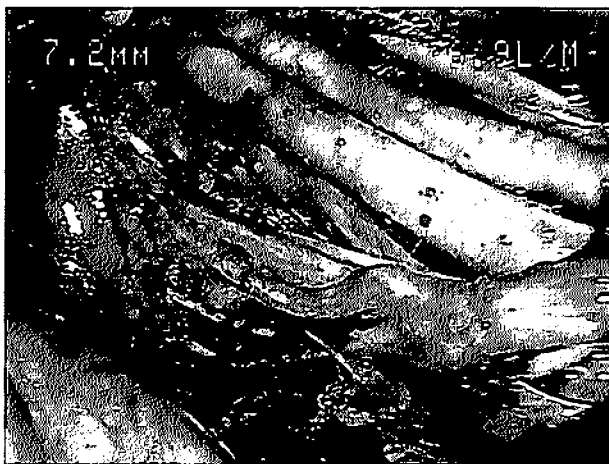


図2-2 後腹膜鏡下全後腹膜リンパ節郭清
上(傍大動脈リンパ節郭清後)
下(骨盤リンパ節郭清後)

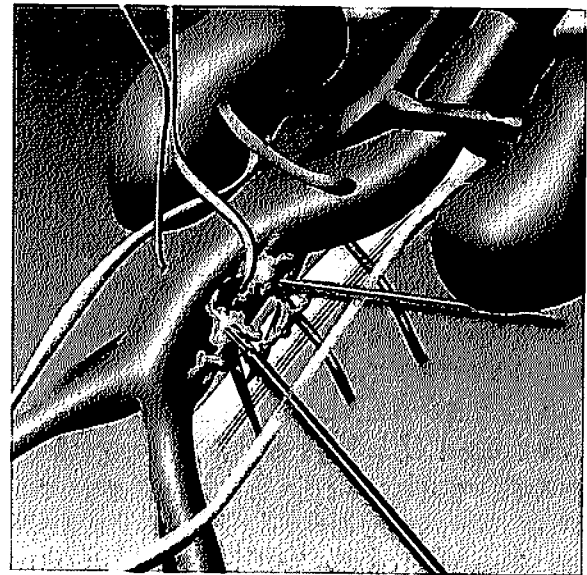


図3-2 大血管のテープによる牽引

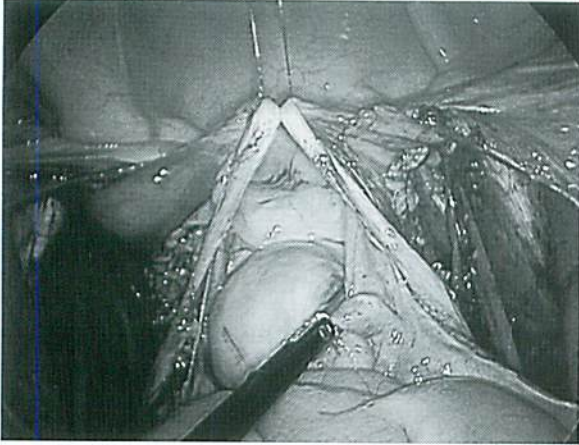


図4-1 側臍靱帯つり上げ法

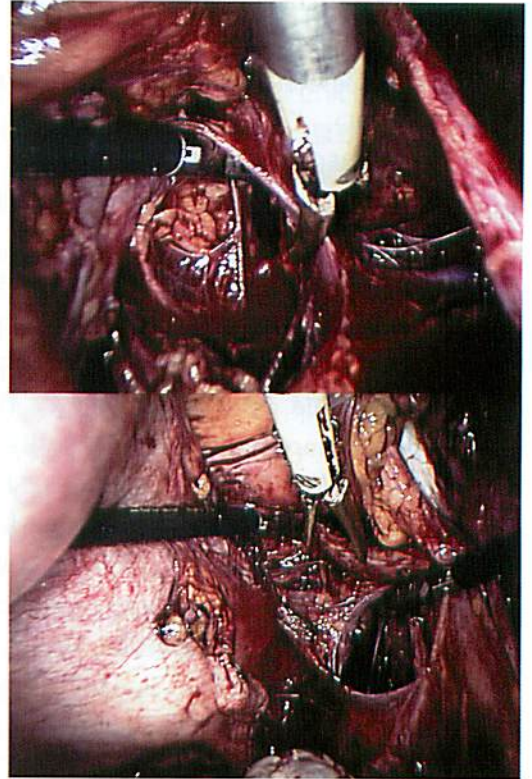


図5-2 基靱帯の切断(上)と
膀胱子宮靱帯後層の切断(下)

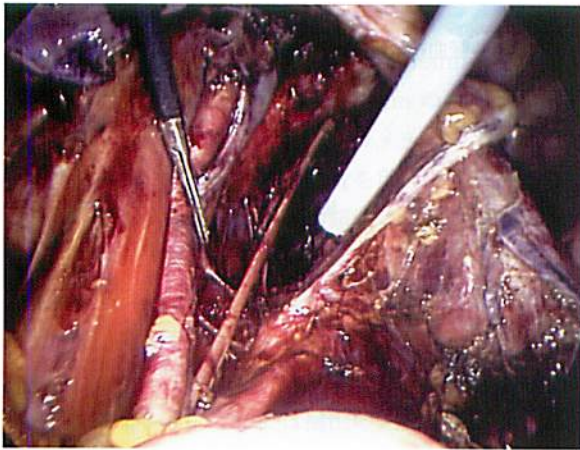


図4-2 側臍靱帯つり上げ法による術野

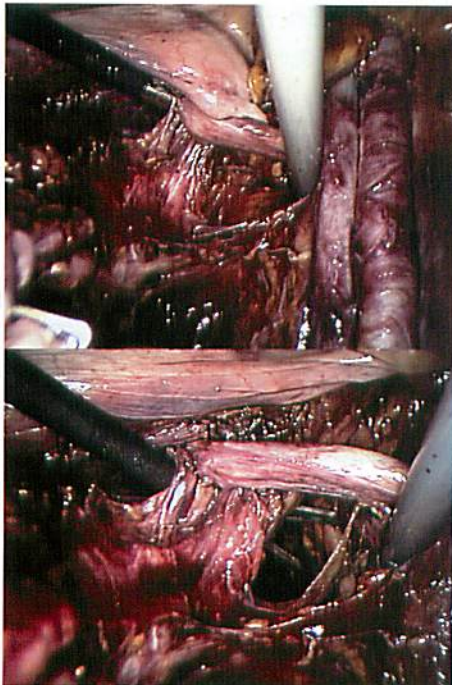


図5-1 尿管の分離

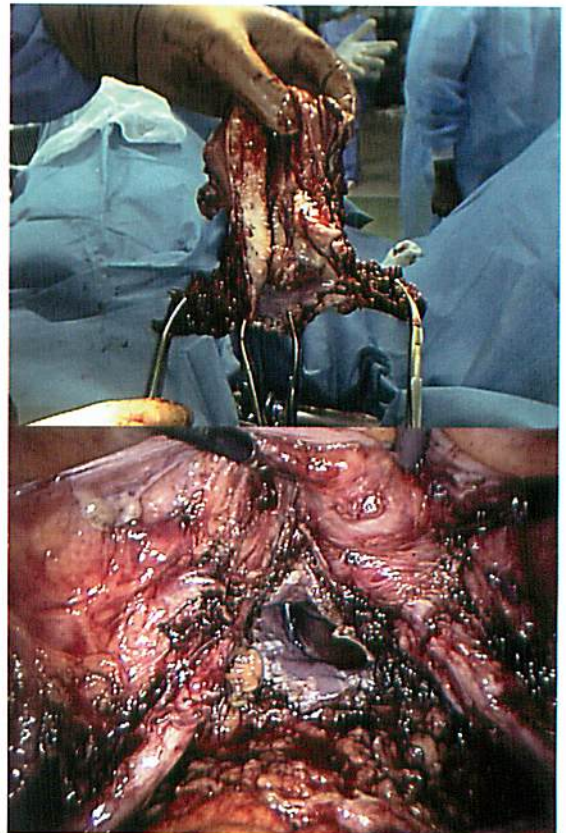


図5-3 上: TLRH 摘出物 下: 摘出後の状態

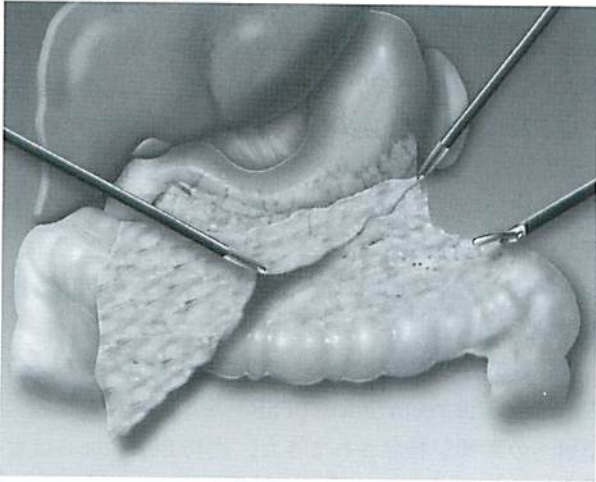


図6-1 腹腔鏡下大網切除

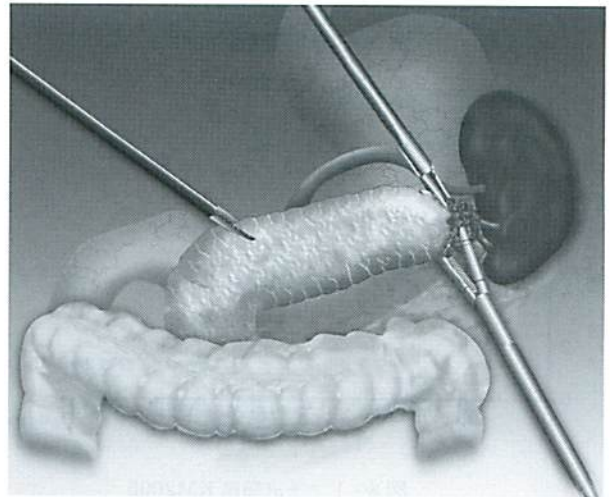


図6-4 孤立性転移巣の切除(膵尾部・脾)



図6-2 大網切除標本

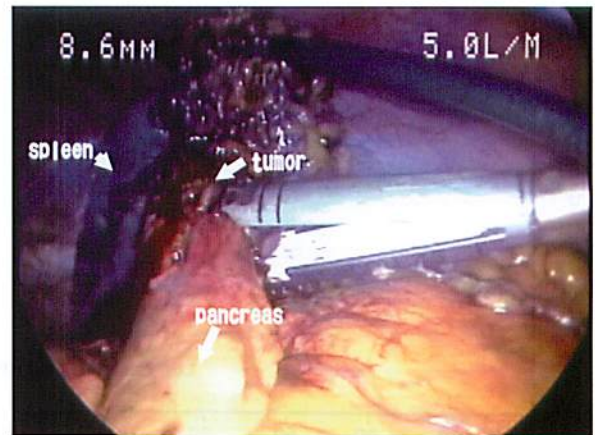


図6-5 脾・膵尾部切除



図6-3 アルゴンビームコアギュレーターによる
腹膜播種巣の焼灼

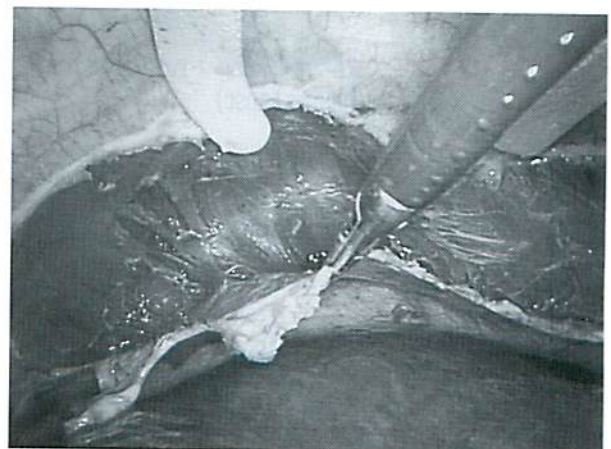


図6-6 横隔膜ストリッピング

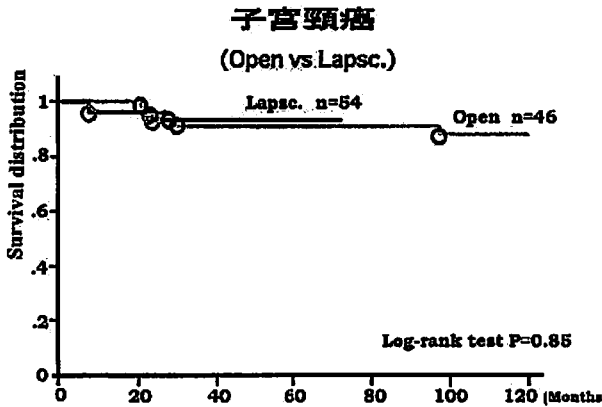


図8-1 子宮頸癌 KM2005

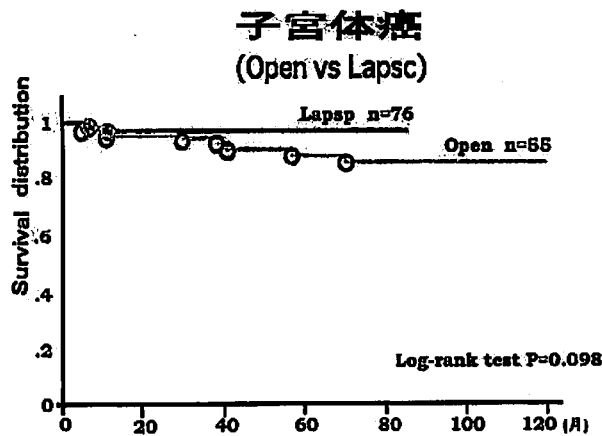


図8-2 子宮体癌 KM 曲線 2005

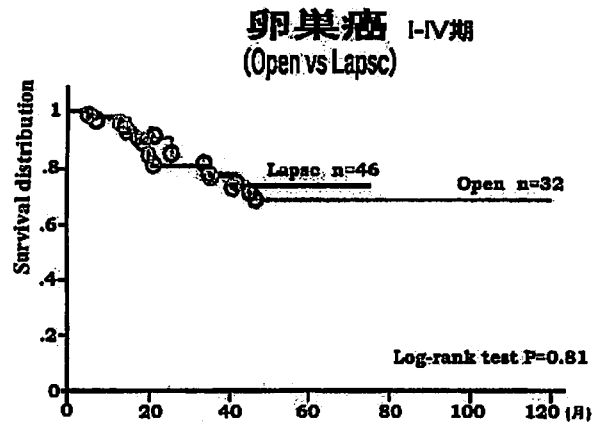


図8-3 全卵巣癌 KM 曲線 2005

の作業環境に加えて限られた狭い空間でモノポーラなどの power source を用いるためと考えられる。悪性腫瘍手術においては、さらに複雑な操作や広汎な剥離を必要とするため、臓器損傷のリスクはさらに高くなることが危惧される。これらの困難な条件に対処するには、剥離・縫合・結紮など腹腔鏡下では困難とされる手術の基本手技を修得しこれに習熟することが重要であろう。当然、局所解剖の完全な把握、power source などの使用器具の作業原理の知識なども要求される。

腹腔鏡特有の作業環境として炭酸ガス気腹がある。過去 trocar site recurrence (TSR) を中心に癌の進展・増殖への影響が懸念されてきた。当初 Berends らは大腸癌での 21% と極めて高い合併率を報告しており、婦人科領域においても散発的な報告が見られる¹⁵⁾。しかし、動物実験では CO2 気腹によって癌の増殖が増えるとするものと減るとするものがあり、その結果は様々である。また、宿主の癌に対する免疫能の低下は腹腔鏡下手術よりも開腹手術の方が大きいとする報告も見られ、現時点ではどちらの方が悪影響を強く及ぼすのか否かは定かでない¹⁶⁾。現に大腸癌手術においては RCT により開腹と腹腔鏡手術に長期予後に差のないことが明らかとなっている。このような中、婦人科領域では Childers らが進行卵巣癌症例の腹腔鏡下手術で 1% と報告している¹⁷⁾。我々の症例では子宮頸癌 101 例子宮体癌 94 例中 1 例も TSR を認めなかったが、卵巣癌症例 53 例中 2 例（いずれも癌性腹水例の IIIc 期）に認めた。これらの 2 例は他にも多発性転移を認めこれによる TSR 自体が予後を悪化させたものとは考え難い。手技のまずさに関わる長期予後の悪化は許されない。我々は現時点では内視鏡下手術にあたり、“monobloc isolation technique” を遵守すると共に、腫瘍の扱いには十分な注意を払って手術を行うことが必要である。

おわりに

悪性腫瘍に対する内鏡視下手術は、従来法の開腹手術に比べて術後の回復が極めて早く、術中出血も少なく、特に腸管麻痺や腸閉塞などの腸管合併症が少ない点は注目に値する。放射線治療や化学療法などの術後治療の遅れを防ぐことや、早期の社会復帰にもつながる。一方、鏡視下手術では短期予後は良好なのであるが、長期予後への影響に関してはいまだ明確にはなっていない。現在データの集積を進めている時点であるため観察期間や症例数に限界はあるものの現段階では術式による差は無いものと考えている。しかしこの点に関しては今度のデー

タのさらなる蓄積を待つ必要がある。これらの内鏡視下手術に要求される手術手技は難易度が極めて高く、偶発症や合併症を予防するには十分なトレーニングを必要とする。今後、系統化されたトレーニングシステムの確立や研修施設の指定などの教育システム作りなども重要な課題として早期実現化が待たれる。

参考文献

- 1) 安藤 正明, 伊熊健一郎, 依光 正枝, 金尾 祐之, 宮部 勇樹 (Yuki Miyabe), 前畑 賢一郎, 西内 敏文, 大本 裕之: 特集手術術式-アプローチの選択-I. 術式とアプローチ 8. 悪性疾患 1) 子宮体癌・子宮頸癌・卵巣癌に対する内視鏡手術の可能性『腹腔鏡・後腹膜鏡を用いた婦人科癌に対するアプローチ』Strategy for Gynecologic Oncologic Surgery-Role of Laparoscopy and Retroperitoneoscopy-産婦人科の実際 53: 1723-1734, 2004.
- 2) 安藤正明, 伊熊健一郎, 吉田孝, 西内敏文, 吉岡保: 内視鏡下腹膜外傍大動脈リンパ節郭清術: 両側側方アプローチ: Endoscopic Para-aortic Lymphadenectomy-A Bilateral Extraperitoneal Approach. 日本産科婦人科内視鏡学会雑誌, 16: 62-68, 2000s.
- 3) 安藤正明, 伊熊健一郎, 吉田孝, 西内敏文, 吉岡保, Artin M. Ternamian: 子宮癌・卵巣癌に対する内視鏡下後腹膜リンパ節郭清術: 多視点ローテート法から. 日内鏡外会誌, 6: 168-174, 2001.
- 4) Vasilev SA, McGonigle KF: Extraperitoneal para-aortic lymph node dissection. Gynecol Oncol 61: 315-320, 1996.
- 5) Dargent D: Laparoscopic extra-peritoneal aortic dissection (video tape), Mars, Provideo, 1997.
- 6) Masaaki Andou, Kenichiro Ikuma, Tamotsu Yoshioka, A. Ternamian. A New Approach for Accessing Retroperitoneal Space Using a 5mm Visual Access Cannula. Surgical Endoscopy, 17: 1158-1161, 2003.
- 7) 安藤正明, 伊熊健一郎, 吉岡保: 内視鏡的外科手術-子宮頸癌・卵巣癌後腹膜鏡による傍大動脈・骨盤リンパ節郭清術から. 癌治療と宿主, 13: 176-184, 2001.
- 8) 安藤正明, 伊熊健一郎, 高木偉博, 依光正枝, 宮部勇樹, 金尾祐之, 西内敏文, 大本裕之: 『今月の臨床: 安全な腹腔鏡下手術をめざして』安全性と予後に配慮した手術手技: 6) 腹腔鏡下骨盤リンパ節摘出術 臨床婦人科産科 59 巻3号 308-313, 2005.
- 9) Dargent D: A new future for Schauta's operation through presurgical retroperitoneal pelvicoscopy. Eur J Gynaecol Oncol 8: 292-296, 1987
- 10) Canis M, Mage G, Wattiez A, Pouly JL, Manhes H, Bruhat M A: La Chirurgie endoscopique a-t-elle une place dans la chirurgie radicale du cancer du col uterin? (letter). J Gynecol Obstet Biol Reprod, 19: 9 21, 1990
- 11) Nezhat CR, Burrell MO, Nezhat FR, Benigno BB, Welander CE: Laparoscopic radical hysterectomy with paraaortic and pelvic node dissection. Am J Obstet Gynecol, 166, 864-865, 1992
- 12) 安藤正明, 伊熊健一郎, 奥村みどり, 吉田孝, 西内俊文, 吉岡保: 全腹腔鏡下広汎子宮全摘出術: 臍 pipe を導入した P-TLRH (Pipe-assisted TLRH) Pipe-assisted total laparoscopic radical hysterectomy 産婦人科治療, 83: 644-654, 2001.
- 13) 安藤正明, 伊熊健一郎, 土岐利彦, 奥村みどり, 浅桐和男, 吉田孝, 西内敏文, 吉岡保, 武田佳彦: 婦人科悪性腫瘍に対する内視鏡下手術: 進行子宮頸癌・進行卵巣癌. 日内鏡外会誌, 4: 332-338, 2002
- 14) 安藤正明, 伊熊健一郎, 依光正枝, 前畑賢一郎, 西内敏文, 大本裕之, 吉岡保, 武田佳彦: 婦人科進行癌・再発癌における手術手技とその工夫: 内視鏡を用いた卵巣・卵管の進行癌・再発癌に対する debulking surgery. 日本産科婦人科手術学会雑誌, 14: 67-76, 2003.
- 15) Berends FJ: Subcutaneous metastases after laparoscopic colectomy [letter] Lancet 344(8914): 58, 1994.
- 16) Catoriona BJW, Duff MB, Steven DH, et al.: Minimal modulation of lymphocyte and natural killer cell subsets following minimal access Surgery. Am J Surg. 177: 48-54, 1999.
- 17) Childers JM, Aqua KA, Surwit EA, et al.: Abdominal-wall tumor implantation after laparoscopy for malignant conditions. Obstet Gynecol 84: 765-769, 1994

講 座

非定型的自己免疫性肝疾患をめぐる諸問題

日本鋼管病院内科 消化器肝臓病センター

い な が き や す た か
稲 垣 恭 孝

Key Words：非定型的自己免疫性肝疾患，自己免疫性肝炎，原発性胆汁性肝硬変，原発性硬化性胆管炎

はじめに

一般に自己免疫性以外の肝障害の原因として A, B, C, D, E 型肝炎ウイルスによるウイルス性肝炎，薬物性肝障害，アルコール性肝障害，代謝性肝疾患，肉芽腫性肝疾患，非アルコール性脂肪肝 (non alcoholic fatty liver disease : NAFLD)，非アルコール性脂肪性肝炎 (non alcoholic steatohepatitis : NASH)，非肝炎ウイルスによる肝炎，腫瘍性肝障害，循環障害に伴う肝障害，種々の全身性疾患に伴う肝障害などが挙げられる。従って自己免疫性肝疾患の診断にはまず十分これらを鑑別，除外する必要がある。

自己免疫性肝疾患としては自己免疫性肝炎 (auto-immune hepatitis : AIH)，原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis : PBC)，原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis : PSC) が知られている。病変の主座は AIH では肝細胞，PBC では小葉間胆管，PSC では肝内外胆管であることはわかっており独立した疾患と考えられているがこれらの疾患の病因および発症機序は自己免疫機序が想定されているものいまだ不明と言わざるを得ない。それゆえ現時点では自己免疫性肝疾患各々に真に特異的な診断方法や根本的治療法はないが，我が国の難治性の肝炎研究班の診断基準^{1), 2)}や国際診断基準³⁾が提唱されており典型例の診断はそれほど難しくはない。

治療も AIH については我が国の AIH の治療指針⁴⁾も呈示されており大部分は副腎皮質ステロイドに対する反応は良好である。しかし本稿でとりあげるような非定型的な自己免疫性肝疾患が約 10-15% 存在し診断に苦慮する場合も少なくない。また AIH でも診断が遅れ肝硬変に進展してしまった例や劇症化例などでは副腎皮質ステロイドの効果が不良で予後不良である。従って非定型的な自己免疫性肝疾患の診断治療には注意を要し一般医家や専門外の医師はもとより肝臓専門医にとっても臨床

上，重要な問題である。これまで肝臓学会および消化器病学会でもしばしば取り上げられ，ワークショップなどのテーマとなっている^{4), 5)}。本稿では通常非定型例としてとりあげられる PBC+AIH overlap 症候群や autoimmune cholangitis (AIC) だけではなく診断あるいは治療上注意を要する自己免疫性肝疾患の非定型例を広くとりあげ以下各々につき当院の症例に一部言及しつつ概説する。

非定型的自己免疫性肝疾患 (variants of autoimmune liver diseases) とは

典型例としての症候，血液生化学的所見，自己抗体，病理組織所見，副腎皮質ステロイドに対する治療反応性などに合致しない症例，診断基準の除外項目を併せ持つ症例や 2 つ以上の自己免疫性肝疾患の病像を同時あるいは異時に併せ持つ症例などが挙げられる。戸田らの全国アンケート集計⁶⁾によると自己免疫性肝疾患 640 例中 64 例 (10.0%) で主治医 (+施設病理医) により非定

第 1 表：日本鋼管病院における各種自己免疫性肝疾患と非定型例

		非定型例	
AIH	48 例	劇症化 AIH	2 例
		急性発症型	11 例
		ANA(-)ASMA(-)AIH(cryptogenic hepatitis)	1 例
		HCV(+)-AIH	1 例
		SLE+AIH	1 例
		PBC+AIH overlap	1 例
PBC	31 例	AIC(AMA(-)PBC)	5 例
PSC	2 例		

型例と診断されている。一方治療上問題となる非定型例として副腎皮質ステロイド抵抗性の AIH, 自己免疫性劇症肝炎, C型肝炎合併 AIH 例の治療などが挙げられる。表1に市中病院である当院における自己免疫性肝疾患患者数と非定型例を示す。

A. 非定型的 AIH

1) 自己抗体：抗核抗体 (ANA), 抗平滑筋抗体 (ASMA) とともに陰性の AIH, cryptogenic chronic hepatitis

Manns ら⁷⁾は AIH を同定される自己抗体の種類により type I, IIa, IIb, III の3型に亜分類することを提唱している (表2)。本邦の AIH では95%が ANA 陽性の AIH type I であり, ASMA は40-60%前後で陽性である。ASMA はなぜか未だに健康保険適応となっていないため検索される率が低いと推測される。しかし本邦の AIH の集計では ANA 陰性の AIH は5%前後存在しそのうち ASMA のみ陽性の症例があり以前は AIH type IV とされていた。従って特に ANA 陰性例では ASMA も測定することは AIH の診断上重要である。しかし AIH type IV は病状, 副腎皮質ステロイドなどの治療効果は ANA 陽性の AIH type I と変わらないとされており独立して分類する意義は少なく今日では type I に包含して扱われている。当院でも ANA (-) ASMA (+) の AIH を2例経験しているがいずれも副腎皮質ステロイドに対する反応は良好であった。

一方 ANA 陰性かつ ASMA 陰性で AIH と診断されている症例も413例中の5例 (1.2%) で認められたと報告されている⁸⁾。両者陰性でも国際診断基準で AIH と診断できれば AIH として治療すべきと考えられる。また ANA 陰性かつ ASMA 陰性の症例5例のうち3例 (60%) は後述する急性発症型 AIH であったと報告されている。

ANA, ASMA 以外の自己免疫性肝炎関連の自己抗体として AIH type IIa で高力価に出現するとされている LKM1 (type 1 liver/kidney microsome antibody) がある。欧米では AIH type IIa は小児や若年女性に好

発し I 型糖尿病や自己免疫性甲状腺炎を高率に合併するとされているが本邦の AIH では LKM1 が認められることは極めて稀である。

LKM1 は P450・2D6 を標的抗原とすることがわかっており, その一部に C型肝炎ウイルスとの分子相同性が存在する。AIH type IIb は HCV (+), LKM1 (+) の症例であり IFN 治療により HCV が消失すると自己抗体も消失することから真の自己免疫性肝炎には含めないのが妥当である。Anti-SLA (anti-soluble liver antigen antibody) 陽性の AIH type III については後述するがいずれにしても LKM1 も Anti-SLA も本邦 AIH では検出されることはごく稀であり診断的意義は少ない。

しかし他の肝疾患が除外診断により否定的であり通常の AIH の診断基準は満たさないが AIH と考えられる症例が存在する。その場合, 経過を追跡していると定型的な自己抗体が出現したり, 血清γグロブリンが2.0 g/dl 以上に上昇してきて診断基準をみたすようになる症例と終始, 既知の定型的自己抗体はすべて陰性のままであるが肝組織所見, 副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤が有効であることなどから非定型的 AIH と考えられる症例がみられる。全国アンケート集計⁹⁾による自己免疫性肝疾患640例中30例 (4.7%) のその他の分類に含まれる症例である。

既知の肝炎ウイルスマーカー陰性, 自己抗体陰性の原因不明の肝障害をみた場合, 非B非C型ウイルス性肝炎, NAFLD, NASH などの他, 非定型的自己免疫性肝疾患の可能性も考慮する必要がある。なお逆に NAFLD ないし NASH の20%に ANA が陽性, 3%に ASMA 陽性であるとの報告もありこの場合肝生検を施行しないと鑑別は難しく注意を要する。

Czaja ら¹⁰⁾によれば原因不明の cryptogenic chronic active hepatitis は年齢, 性別, 副腎皮質ステロイドに対する反応性などで通常の AIH と変わらないこと, ASMA や ANA とは別の自己抗体である anti-SLA または anti-LP (anti-pancreas antibody) が40%と高い陽性率を示すこと, また anti-SLA/anti-LP 陽性例では HLADR3 が60%にみられることを報告している。

しかし anti-SLA または anti-LP については Miyakawa ら¹¹⁾は日本人では anti-SLA/LP の陽性率は低く ANA または ASMA 陽性の AIH type I の75例中の7例 (6.7%) のみで陽性で, cryptogenic hepatitis の3例では認められなかった (0%) と報告している。

anti-SLA や anti-LP の他にも anti-LC1, p-ANCA, anti-ASGPR, anti-sulfatide など種々の自己抗体と AIH との関連が報告されており AIH 非定型例では検討

第2表：自己免疫性肝炎の自己抗体による亜分類

AIH subtype	ANA and/or ASMA	antiLKM1	antiSLA	HCV
I型	+	-	-	-
IIa型	-	+	-	-
IIb型	-	+	-	+
III型	-	-	+	-

する必要がある。未だ真に疾患特異的なマーカーは見つかっておらず更に検討を要するが、通常の AIH 関連自己抗体が陰性の AIH が非定型例として存在することは知っておく必要がある。

2) 急性発症型 AIH

AST/ALT の著明な上昇を呈し急性肝炎様に発症する AIH は急性発症型 AIH (acute-onset or acute type AIH) と呼ばれており、肝組織所見は慢性肝炎の急性増悪である症例の他に肝組織像でみても急性肝炎像を示す症例が存在するとされている。我が国の AIH の診断指針にも組織学的所見について時に急性肝炎像を呈すると記載されている。急性発症型 AIH では当初は自己抗体陰性ないし低値陽性、 γ グロブリン 2.0 g/dl 以下のことも多く、AIH スコアも低値で AIH と確定診断できないことが少なくない。その後経過を追うと自己抗体の出現、 γ グロブリンの 2.0 g/dl 以上へ上昇をみることも多いが重症型ではその頃になり治療を開始したのでは遅い場合もあり注意を要する。また急性発症重症型では通常の AIH より若年発症が多いとする報告もある。原因不明の急性肝炎、急性肝障害を見た場合常に AIH も鑑別診断に入れておく必要がある。またある時点で AIH の診断基準を満たしていなくても AIH の可能性を完全には除外せず慎重に経過をフォローアップする必要がある。一時的に自然寛解しその後しばらくして急性増悪し重症化する場合もあり慎重な対応が求められる。

3) 自己免疫性劇症肝炎急性型、亜急性型、遅発性肝不全 (late onset hepatic failure : LOHF)

自己免疫性肝炎は劇症肝炎、LOHF の原因としても最近注目を集めており、劇症化例では早期にステロイドパルス療法など積極的治療が必要であるが肝不全が進行したあとでは副腎皮質ステロイドも必ずしも有効ではなく予後不良である。肝移植が必要となる場合も少なくない。原因不明の劇症肝炎、LOHF では自己免疫性の可能性も念頭において診療に当たる必要がある。

藤原らによる 1998-2003 年の劇症肝炎の全国集計では¹⁰⁾劇症肝炎+LOHF のうち自己免疫性と考えられるのは 698 例中 48 例 (6.9%) と報告されている。また自己免疫性例は急性型では 316 例中の 5 例 (1.6%) に対し亜急性型の 318 例中の 34 例 (10.7%)、LOHF の 64 例中の 9 例 (14.1%) を占めていたと報告されており、自己免疫性例は劇症肝炎亜急性型、遅発性肝不全の経過をとる場合が多いことがわかる。図 1 に当院の自己免疫性亜急性性肝炎例の剖検時肝組織所見を示す。亜広範壊死を呈し形質細胞を伴う多数のリンパ球浸潤がみられる。なお免疫組織染色では細胞障害性 T 細胞 (CTL) を多



第 1 図 自己免疫性肝炎劇症化 (亜急性性肝炎) の剖検時肝組織所見

数認めている。

4) 副腎皮質ステロイド抵抗性あるいは無効の AIH

わが国の AIH の約 90% は HLADR4 が陽性で中年女性が多く副腎皮質ホルモンに対する反応性が良好で 90% 以上で副腎皮質ステロイドが有効である。国際診断基準に副腎皮質ステロイドの有効性の項目があるくらいであるが前項で述べたごとく治療開始が遅れた例や重症化劇症化例などで副腎皮質ステロイド無効例があり注意を要する。副腎皮質ステロイド無効例ではステロイドパルス療法、アザチオプリンの併用やサイクロスポリン、タクロリムスの投与も試みられている。しかし劇症化例では経過により適切な時期に肝移植を考慮すべきである。

欧米の AIH では HLA は DR3 と DR4 の両方が認められ、DR3 陽性の AIH は若年者に多く、その一部は副腎皮質ホルモン抵抗性であるといわれている。

B. 自己免疫性胆管炎 (autoimmune cholangitis : AIC)、AMA 陰性原発性胆汁性肝硬変。

Brunner ら¹¹⁾は 1987 年に抗ミトコンドリア抗体陰性であるが臨床生化学的、肝組織学的に慢性非化膿性破壊性胆管炎を認め抗核抗体陽性でステロイドや免疫抑制剤が著効する症例を報告し immunocholangitis と名付けた。その後 1992 年 Michieletti ら¹²⁾も臨床生化学的、肝組織学的には原発性胆汁性肝硬変に合致するが抗ミトコンドリア抗体が陰性の 13 例について検討しいずれも抗核抗体陽性で特に 8 例は高抗体価を呈したとし autoimmune cholangitis (AIC) という名称を提唱した。

1993 年 Ben-Ari, Sherlock ら¹³⁾も同様の 4 例を報告し PSL の有効な例が多い点などより当初は autoimmune cholangiopathy と呼ぶことを提唱し AIH の subgroup と位置付け注目を集めた。我々も RA に合併

した, AMA 陰性であるが肝組織学的には PBC に合致する肉芽腫, 非化膿性破壊性胆管炎 (CNSDC) などを呈し AIC に相当する PSL が有効な症例を報告している¹⁰⁾. PBC のうち ANA 陽性かつ AMA 陰性の症例は本邦では 2.6%, Berg らによれば 2.5% と報告されている. 但し AMA の陽性率は測定法により異なる. 通常の蛍光抗体間接法による AMA では PBC の約 90% で陽性である. 一方 ELISA 法による IgG クラスの抗 pyruvate dehydrogenase (PDH) 抗体測定がミトコンドリア M2 抗体として検査機関にて普及し診断基準にも加えられているが陽性率は蛍光抗体法よりやや低い. それに対し Western immunoblot 法を用い各種ミトコンドリア抗原である PDH-E2, protein X, BCKD-E2, OGDH-E2 に対する IgG, IgM, IgA class の抗体を同時測定すると陽性率は高率で真の AMA 陰性 PBC は稀と報告されている.

結局その後種々の議論がなされたが諸家の検討では AMA 陽性の PBC と AMA 陰性, 抗核抗体強陽性のいわゆる AIC に本質的差異は認められず現在では AIC は独立した疾患概念というより AMA 陰性の PBC, PBC の亜型と考える見解が大勢を占めている¹⁵⁾.

C. overlap 症候群

1) PBC+ AIH overlap 症候群, AIH+PBC mixed form

PBC+ AIH overlap 症候群は 1970 年 Popper らが最初に報告した概念であり病理組織学的には PBC に合致する非化膿性破壊性胆管炎を認め, AMA 陽性であるが組織学的に肝炎像もあり ASMA 陽性で臨床像, 生化学的所見は慢性活動性肝炎の経過をとる AIH の臨床像が優位な病態であるとした. その後 Kloppel G, Berg ら¹⁶⁾ は同様の症例を報告し CAH-PBC, mixed type, 後に mixed form と呼称し副腎皮質ステロイドの投与が必要とした. 一方, Lohse, Meyer zum Büschenfelde ら¹⁷⁾ は PBC に罹患した患者のうち遺伝的に肝炎像を強く呈する素質を持つ者がこれらの症例にあたり overlap ではなく PBC, hepatitic form と呼称した.

このような PBC と AIH の病像を同時に併せ持つ PBC+ AIH overlap 症候群と診断されている症例は本邦では戸田らの全国アンケート集計⁶⁾によると 640 例中 37 例 (5.8%) で主治医 (+施設病理医) により診断されている. しかしこのうち肝臓病理専門医 3 名による見直しが行われた 26 例では 7 例のみが overlap 症候群の可能性があると診断されたにとどまり残り 19 例は AIH, 13 例は PBC と診断されている.

PBC+ AIH overlap 症候群の頻度は欧米では Poupon ら¹⁸⁾によると PBC の 9.2% に, Czaja ら¹⁹⁾によると PBC の 19%, AIH の 5% にみられると報告されている.

一般に PBC の 30-70% で抗核抗体が陽性, 一方 AIH の 5-10% で抗ミトコンドリア抗体が陽性とされており単に自己抗体のパターンで診断すると overlap 症候群は過剰診断となる.

中沼らによると²⁰⁾病理学的には PBC でも胆汁うっ滞性変化が顕著な古典的 PBC に加え種々の程度で肝炎性変化が同時に見られる症例が約 30% 程度あり, interface hepatitis として peace meal necrosis が種々の程度に出現し, その他に肝実質炎 (lobular hepatitis) が 17-13% 程度みられると報告している. 従って PBC で肝炎性変化が特に高度の場合のみ overlap と診断すべきとしている. 逆に AIH でも種々の程度の胆管障害がみられ, 肝炎性胆管障害に加え PBC 型の破壊性胆管障害を示すものも少数あるが PBC 合併の診断は胆管障害に加え胆管消失や肉芽腫の有無, 胆汁うっ滞などの所見を総合して評価する必要があるとしている. Czaja らは AIH で破壊性胆管炎は 7%, 胆管消失は 5% にみられるとしているが木下らはいずれも 0% としている.

臨床問題となる治療法については本邦全国アンケート集計⁶⁾によると PBC+AIH overlap ではプレドニゾン (PSL) 単独 10 例あるいはウルソデオキシコール酸 (UDCA) 単独投与 23 例に比べ PSL+UDCA 併用投与症例 14 例で最も改善率が高いと報告している. Poupon ら²¹⁾ も厳密に診断された PBC+AIH overlap 症候群 17 例で UDCA 単独の 11 例と UDCA+免疫抑制剤投与の 6 例を 7.5 年追跡した検討で線維化の進展抑制に併用投与群が UDCA 単独群より勝っているとの成績を報告している. しかしいずれも retrospective な集計である.

一般に PBC では骨粗鬆症を来し易く PSL の使用には慎重を要するため UDCA あるいはベザフィブラートを基本とし AIH 像が前景にたつ症例や AIH 像が高度な時期に限定して PSL を使用することが無難と思われる. また PBC+AIH overlap の診断そのものに混乱がみられるため今後, 疾患概念, 治療法と予後など臨床的意義を更に明らかにする必要がある.

2) AIH+PSC overlap 症候群

AIH+PSC overlap 症候群は本邦の自己免疫性肝疾患 640 例中 1 例で報告されているのみで本邦では極めて稀である⁶⁾.むしろ PSC は潰瘍性大腸炎を合併する頻度が高くその点の精査が必要である.

欧米では Beuers ら²²⁾によると AIH-PSC overlap 症候群は小児、青年または若年成人の AIH または PSC の 6～8% にみられるとしている。

3) 自己免疫性肝疾患相互の異時性移行

PBC と AIH が同時性に見られるのが overlap であり、異時性に見られるのが PBC と AIH 相互の移行例と考えられる。

異時性の PBC→AIH への移行変貌例は本邦および諸外国例共報告されている。しかしその逆の AIH→PBC への移行例はそれに比べ明らかに稀とされている。

D. HCVRNA 陽性 AIH

IFN は慢性関節リウマチ、AIH などの自己免疫性疾患を誘発したり、既存の自己免疫性疾患を増悪させることが知られており、AIH は IFN 投与の禁忌とされている。逆に副腎皮質ホルモンなどの免疫抑制剤は B 型肝炎に対する程ではないが HCV 増殖を促し C 型肝炎の悪化を招く恐れがある。HCV 陽性の患者への肝移植直後は、ペグインターフェロン+リビリン併用療法が施行困難な上、免疫抑制剤投与で線維化と胆汁うっ滞が急速に進む症例 (fibrosing cholestatic hepatitis) があることが知られている。C 型肝炎は移植後では通常と異なる経過をとり治療が難しく移植後 5 年で肝硬変になる症例もある。

HCVRNA 陽性で ANA 陽性、高γglob 血症を呈する C 型慢性肝炎が 10-20% 存在し治療法が問題となる。また C 型慢性肝炎は自己免疫性慢性甲状腺炎や免疫性血小板減少症を合併することが少なからずある。HCVRNA 陽性の慢性肝炎で見られる ANA が単なる C 型慢性肝炎に随伴する自己免疫現象なのか真の I 型 AIH の合併を意味するのかが問題となる。

わが国の難治性の肝疾患に関する研究班から C 型肝炎ウイルス感染をともなう AIH に関しても AIH 診断治療指針のなかで言及されており¹⁾それによると国際診断基準のスコアが高い症例では副腎皮質ホルモンの投与が望ましく、スコアが低い症例は IFN 投与を考慮することになっている。しかしそれが実際妥当か否かは治療経過を注意深く観察し判断する必要がある。ANA 低力価、HCV 低ウイルス量あるいはセログループ 2 の症例は慎重に IFN を試してよいと思われる。また症例によっては副腎皮質ホルモンと IFN の併用療法が必要とする報告者もいる。

E. 薬物誘発 AIH,

IFN 以外にも薬物を使用している患者で自己抗体陽

性の肝障害が認められることが知られており、その場合は①もともとあった AIH に薬物性肝障害が合併した場合、②AIH が薬物により誘発された例、③薬物性肝障害に単に自己免疫現象をともなう場合などが考えられ、これらを鑑別することが必要である。メチルドーパ、ミノマイシン、イソニアジド、HMG-CoA 阻害剤の atorvastatin などの薬物が誘因と考えられる AIH が報告されている。まず使用している薬物について一般的薬物性肝障害の他 AIH 誘発についての報告があるか否か情報を収集する必要がある。臨床経過と肝生検組織所見が鑑別診断に重要であるが実際には鑑別困難な場合も少なくない。AIH ではないと判断した場合でも副腎皮質ステロイド中止後の慎重な経過観察が必要である。

F. 全身性自己免疫性疾患、膠原病との合併例、SLE+AIH, Sjögren+AIH, Sjögren+PBC など

全身性自己免疫性疾患 (SLE, RA, Sjögren, PM, PSS など) の経過中に肝障害が出現したときその肝障害が全身性自己免疫性疾患自体によるものか AIH や PBC などの合併によるものか、その他の原因によるのかが問題となる。原病に伴うものとしては SLE などでの肝血管炎によるもの、結節性再生性過形成 (nodular regenerative hyperplasia of the liver : NRH) が、成人発症スティル病に伴う肝障害、慢性関節リウマチではアミロイドーシスの合併などがある。その他の原因としては脂肪肝や薬物性肝障害の合併、心不全による肝障害などがある。

従来 SLE には AIH が合併することは稀とされていたが、SLE を合併した AIH の症例報告が散見される。SLE のみでは ASMA は陰性、抗 2 本鎖 DNA 抗体が陽性で AIH との鑑別に有用とされているが必ずしも決め手にはならない。また ASMA は I 型 AIH の 40-60% 程度でしか陽性にならない。SLE では各種自己抗体が陽性となる上、既述のような種々の肝障害の可能性があり SLE+AIH 合併の診断には特に肝病理組織所見が重要となる。

Matsumoto ら²³⁾は種々の膠原病 160 例で肝組織所見を検討したところ 3 例で AIH の合併があり 3 例中 2 例は SLE、1 例は MCTD との合併であったと報告している。

結 語

1) 原因不明の急性または慢性の肝障害をみた場合、診断基準のみにとらわれず本稿でとりあげた非定型的自

己免疫性肝疾患の可能性も考え診療にあたる必要がある。

2) 非定型的自己免疫性肝疾患の診断では肝病理組織学的所見の検討が特に重要であり積極的に肝生検を施行すべきである。

3) 診断困難例では最終診断名が変わる場合もあり治療に対する反応を含めた臨床経過の観察, 自己抗体を含む血液検査の経過を追った再検など慎重な対応が不可欠である。

文 献

- 1) 戸田剛太郎, 自己免疫性肝炎診断指針 1996; 肝臓 37: 298-300, 1996.
- 2) 戸田剛太郎, 大西三郎: 原発性胆汁性肝硬変の診断基準 (平成16年度), 肝臓 46: 233, 2005.
- 3) McFarlane IG et al. International Autoimmune Hepatitis Group: International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J. Hepatol* 31: 929-938, 1999
- 4) 日本膵管病院内科 稲垣恭孝 鈴木修 水野嘉夫 W4-4 非定型的自己免疫性肝障害の検討, ワークショップ4 非定型的自己免疫性肝障害をどう取り扱うか DDW-Japan 2000 第4回日本肝臓学会大会 2000年10月26日
- 5) 日本膵管病院内科 稲垣恭孝 鈴木修 水野嘉夫 W5-4 非定型的自己免疫性肝疾患の検討 DDW-Japan 2003 ワークショップ5 自己免疫性肝疾患の非定型例 (第45回日本消化器病学会大会・第7回日本肝臓学会大会合同)
- 6) 戸田剛太郎, 銭谷幹男ほか: 厚生科学研究補助金特定疾患対策研究事業 難治性の肝疾患に関する研究 平成13年度 総括・分担研究報告書: 11-19, 2001
- 7) Manns MP, Kruger M: Immunogenetics of chronic liver diseases. *Gastroenterology* 106: 1676-1697, 1994
- 8) Czaja AJ, Shums Z, Norman GL. Frequency and significance of antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas in variant autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 35: 475-483, 2002
- 9) Miyakawa H, Kawashima Y et al. Low frequency of anti-SLA/LP autoantibody in Japanese adult patients with autoimmune liver diseases: analysis with recombinant antigen assay *J Autoimmun.* 21: 77-82, 2003
- 10) 藤原研司, 持田 智, 松井 淳: 劇症肝炎, 遅発性肝不全 (late onset hepatic failure: LOHF) の全国集計 (2003年) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「難治性の肝疾患に関する調査研究」班 平成16年度報告書 (印刷中), 2005
- 11) Brunner G and Klinge O. A cholangitis with antinuclear antibodies (immunocholangitis) resembling chronic non-suppurative cholangitis. *Dtsch. Med. Wochenschr* 1987; 112: 1454-1458
- 12) Michieletti P, Bassendine MF, Heathcote EJ et al. Antimitochondrial antibody (AMA) negative primary biliary cirrhosis (PBC) or autoimmune cholangitis? *Hepatology* 1992; 16: 568
- 13) Ben-Ari Z, Dhillon AP and Sherlock S. Autoimmune cholangiopathy: Part of the spectrum of autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology* 1993; 18: 10-15
- 14) 稲垣恭孝, 宮地清光, 神谷知至, 宮本京, 塚田信廣, 米井嘉一, 鈴木修, 桐生恭好, 長村義之 慢性関節リウマチを合併した自己免疫性胆管炎の1例日本消化器病学会雑誌 91: 1057-1061, 1994
- 15) 稲垣恭孝: 抗ミトコンドリア抗体陰性PBC, AIC. 自己免疫性肝障害の臨床 監修 辻孝夫 編集 恩地森一 山本和秀 東俊宏 日本医学館 東京 2001 p 132-138
- 16) Kloppel G, Seifert G, Lindner H, Dammermann R, Sack HJ, Berg PA: Histopathological features in mixed types of chronic aggressive hepatitis and primary biliary cirrhosis. Correlations of liver histology with mitochondrial antibodies of different specificity. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 373: 143-60, 1977
- 17) Lohse AW, Meyer zum Büschenfelde, Franz B, Kanzler S, Gerken G, Dienes HP.: Characterization of the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune hepatitis: evidence for it being a hepatic form of PBC in genetically susceptible individuals. 29: 1078-84, 1999
- 18) Chazouilleres O, Wendum D, Serfaty L, Montembault S, Rosmorduc O, Poupon R.: Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy. 28: 296-301, 1998
- 19) Czaja AJ: Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology* 28: 360-365, 1998
- 20) Nakanuma Y: Necroinflammatory changes in hepatic lobules in primary biliary cirrhosis with less well-defined cholestatic changes. *Human Pathol* 24: 378-383, 1993
- 21) Chazouilleres O, Wendum D, Serfaty L, Rosmorduc O, Poupon R: Long term outcome and response to therapy of primary biliary cirrhosis -autoimmune hepatitis overlap syndrome. *J Hepatol.* 44: 400-6, 2006.
- 22) Beuers U, Rust C. Overlap syndromes *Semin Liver Disease* 25: 311-20, 2005
- 23) Matsumoto T, Kobayashi S, Shimizu H et al. The liver in collagen diseases: pathologic study of 160 cases with particular reference to hepatic arteritis, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis and nodular regenerative hyperplasia of the liver. *Liver.* 20: 366-73, 2000

講 座

呼吸の中枢性化学感受性とカリウムチャネル

独立行政法人国立病院機構 東京医療センター呼吸器科

おやまだ よし たか
小山田 吉 孝

Key Words：中枢性化学感受性，カリウムチャネル，化学感受性ニューロン

はじめに

哺乳類において高炭酸ガス性アシドーシスは換気を増強させる。この増強効果は末梢からの求心性入力を排除した状態でも認められることから、中枢神経自体がPCO₂/pHの変化を感知するものと考えられている。これを呼吸の中枢性化学感受性（central chemosensitivity）と呼ぶ。化学シナプス伝達によらずにPCO₂/pHの変化に反応して膜電位を変化させる、いわゆる化学感受性ニューロン（chemosensitive neurons）は脳幹に広く分布しており、これらのニューロンの電気的活動の変化が呼吸の中枢性化学感受性の本質であると推察されている。本稿では、化学感受性ニューロン、ならびにその化学感受性を規定するうえで重要な役割を担っていると考えられるカリウムチャネルについて概説する。

化学感受性ニューロン

1960～70年代にかけてドイツ Ruhr 大学の Loeschcke らのグループは、酸をしみこませた紙などによる延髄腹外側表面の刺激が実験動物の換気を増強させることを示し、同部位が化学感受性領域であることを明らかにした¹⁾。延髄腹外側は呼吸中枢の一部を成し、呼吸性神経活動に同期した膜電位や発火パターンを呈する呼吸ニューロンが存在することから、これらの呼吸ニューロン自体が化学感受性を有する可能性が長く示唆されていた。その中で1996年にKawaiらは、新生ラット摘出脳幹脊髄標本*における延髄腹外側の呼吸ニューロンが細胞外液の高炭酸ガス性アシドーシスに反応して膜電位を変化させることを初めて明らかにした²⁾。この反応

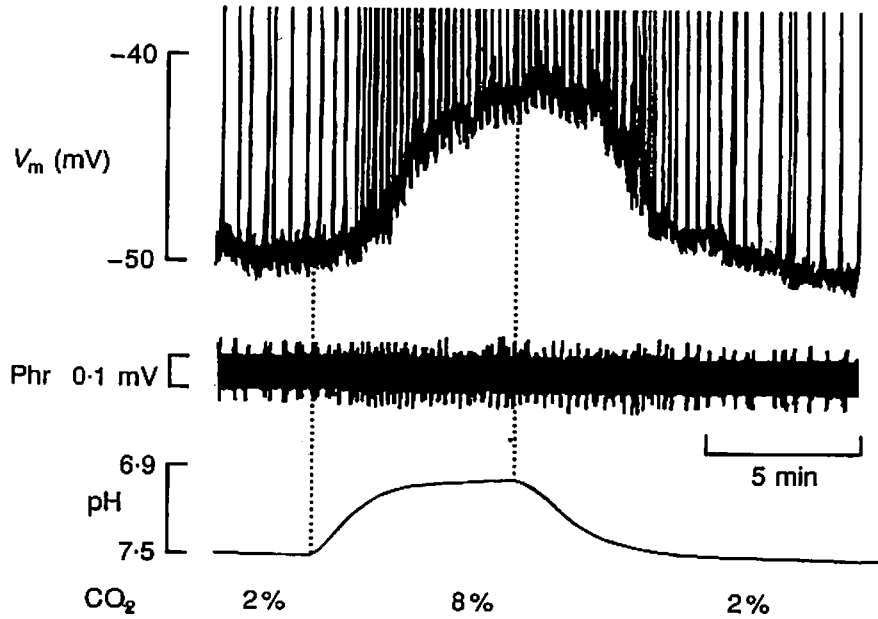
は、呼吸性神経活動に同期して発火する吸息性ニューロンなどで認められる脱分極性（すなわち興奮性）応答（図1）と、呼吸性神経活動に同期して発火が抑制される呼息性ニューロンなどで認められる過分極性（抑制性）応答に分けられたが、いずれの反応も tetrodotoxin (TTX) や低カルシウム高マグネシウム液による化学シナプス伝達遮断の影響を受けなかった。すなわち、これらの反応は化学シナプス伝達を介したものではなく呼吸ニューロン固有の性質に由来するものと考えられた。このことは、とりもなおさず延髄腹外側の呼吸ニューロン自身が化学受容器（PCO₂/pH センサー）として機能していることを示している。

Oyamada らは、それまで呼吸調節とあまり関係がないと考えられていた橋背側の青斑核を構成するニューロンが、新生ラット摘出脳幹脊髄標本において呼吸性神経活動に同期した発火パターンを示し、かつ高炭酸ガス性アシドーシスに対して脱分極性応答を呈することを明らかにした（図2, 3）³⁾。この脱分極性応答は TTX や低カルシウム高マグネシウム液による化学シナプス伝達遮断や carbenoxolone による電気シナプス伝達遮断の状況下でも保たれていた^{3), 4)}。すなわち、青斑核ニューロンも延髄腹外側の呼吸ニューロン同様、化学受容器としての機能を備えた呼吸関連ニューロンであることが明らかとなった。

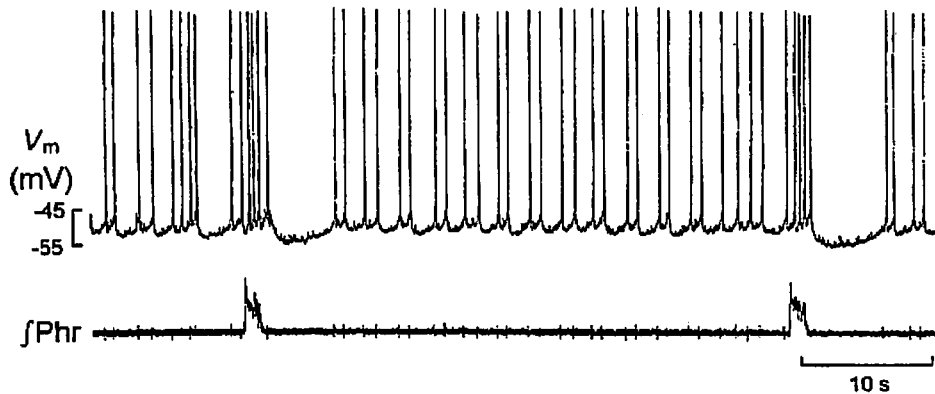
このほかにも延髄背側の孤束核や延髄腹側正中線上に位置する縫線核を構成するニューロンで、高炭酸ガス性アシドーシスに対する同様の興奮性応答（膜の脱分極あるいは発火頻度の増加）が認められている^{5), 6)}。

Acetazolamide の微量注入によるこれらの化学感受性領域の局所酸性化は、迷走神経切断術を施されたネコ

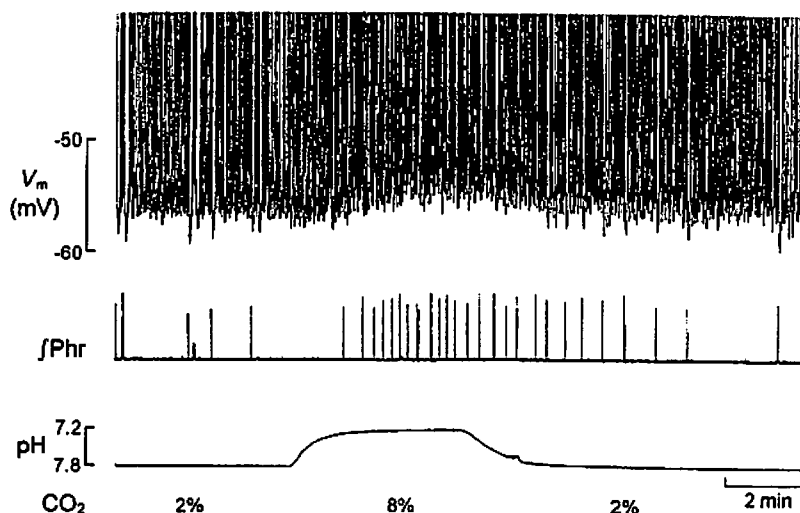
*新生ラット摘出脳幹脊髄標本：新生ラット（1～5日齢）から脳幹と脊髄を一塊として摘出し、人工脳脊髄液で灌流するもの。この標本では、呼吸性神経活動が横隔神経の周期的な発火として長時間にわたって観察される。



第1図 高炭酸ガス性アシドーシスに対する延髄吸息性ニューロンの反応
横隔神経 (Phr) の吸息性神経活動 (一過性の振幅の増加) に一致した発火パターンを有する吸息性ニューロンが高炭酸ガス (8% CO_2) 性アシドーシスにより脱分極性応答を示している。Vm: 膜電位。
(Kawai A et al: J Physiol 492: 277-292, 1996の Fig2A を許可を得て転載)



第2図 青斑核ニューロンの膜電位 (Vm) ・発火パターン
横隔神経 (fPhr) の吸息性神経活動 (基線から上方への振れ) に一致した発火頻度の増加と引き続き膜の過分極および発火の抑制が認められる。
(Oyamada Y et al: J Physiol 513: 381-398, 1998の Fig2A を許可を得て転載)



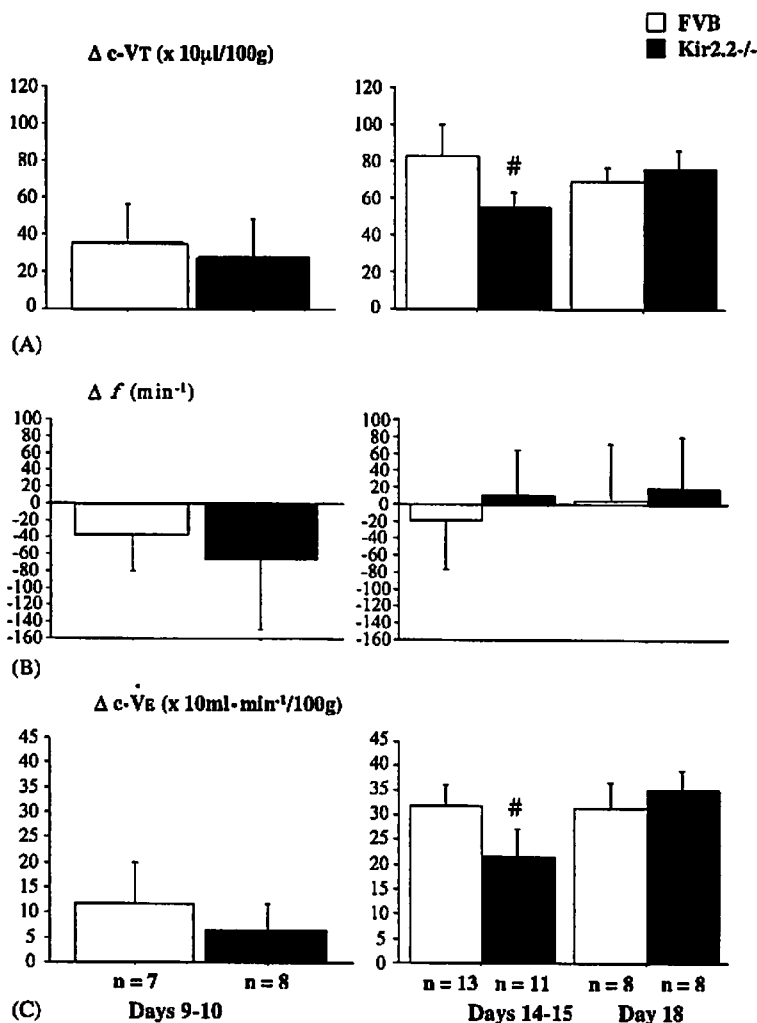
第3図 高炭酸ガス性アシドーシスに対する背斑核ニューロンの反応
 高炭酸ガス性アシドーシス（8% CO₂, pH 7.2）により背斑核ニューロンは脱分極し、発火頻度が増加している。
 V_m：膜電位、fPhr：横隔神経活動。
 (Oyamada Y et al : J Physiol 513 : 381-398, 1998の Fig7A を許可を得て転載)

あるいはラットにおいて、その換気を増大させる^{7), 8)}。また、新生ラット摘出脳幹脊髓標本において背斑核の電気刺激は呼吸性神経活動の発火頻度（呼吸数）を増加させ、TTXなどによる薬理的な不活性化は呼吸数を減少させる⁹⁾。これらの知見は、化学感受性ニューロンの電氣的活動の変化が呼吸の中枢性化学感受性の本質であることを示唆している。

ニューロンの化学感受性とカリウムチャンネル

高炭酸ガス性アシドーシスに対する延髄腹外側の呼吸ニューロンあるいは孤束核ニューロンの脱分極性応答は、膜抵抗の増大、すなわち膜コンダクタンスの低下をともなっていた^{2), 5)}。静止膜電位を規定する主なイオンはカリウムイオンであり、カリウムチャンネルのコンダクタンスの低下は膜を脱分極させることから、カリウムチャンネルがニューロンの化学感受性を規定している可能性が示唆される。事実、背斑核ニューロンでは高炭酸ガス性アシドーシスによって内向き整流性カリウムチャンネル(Kir)のコンダクタンスが低下する¹⁰⁾。また、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させたKirの電気生理学的検討から、Kir1.1, Kir2.3, Kir4.1といったサブタイプで細胞内あるいは細胞外アシドーシスによりコンダクタンスが低下することが示された^{11), 12)}。最近では、

TASK-1やTASK-3といったtwo-pore-domainカリウムチャンネル(K_{2P})でも、細胞外アシドーシスによってコンダクタンスが低下することが明らかにされた^{13), 14), 15), 16)}。今後はこれらのpH感受性カリウムチャンネルがどのように呼吸の中枢性化学感受性に関与しているのか（あるいは関与していないのか）を明らかにする必要がある。電気生理学的にはpH感受性が検討されていないものの、Kir2.2のノックアウトマウスでは野生型マウスに比し高炭酸ガス換気応答が発育の過程で一過性に低下することが示されており（図4）¹⁷⁾、このようなアプローチが他のカリウムチャンネルに対しても必要であると思われる。また、ラットの中枢神経ではKirのサブタイプによって発現する部位が異なることが知られている^{18), 19)}。呼吸ニューロンの種類によって発現するカリウムチャンネルに差異があるのか否かを検討することも呼吸の中枢性化学感受性のメカニズムを考えるうえで重要と思われる。



第4図 Kir2.2 ノックアウトマウス (Kir2.2^{-/-}) と野生型マウス (FVB) における高炭酸ガス換気応答。高炭酸ガス (10% CO₂) 負荷による一回換気量, 分時換気量の増加 (それぞれ $\Delta c\text{-}V_T$, $\Delta c\text{-}\dot{V}_E$) は14-15日齢において野生型マウスに比し Kir2.2 ノックアウトマウスで有意に少ない, Δf : 高炭酸ガス負荷による呼吸数の増加。

(Oyamada Y et al : Respir Physiol Neurobiol 145 : 143-151, 2005の Fig5 を許可を得て転載)

参考文献

- 1) Loeschke HH : Central chemosensitivity and the reaction theory. J Physiol 332 : 1-24, 1982.
- 2) Kawai A, Ballantyne D, Mückenhoff K, Scheid P : Chemosensitive medullary neurons in the brainstem-spinal cord preparation of the neonatal rat. J Physiol 492 : 277-292, 1996.
- 3) Oyamada Y, Ballantyne D, Mückenhoff K, Scheid P : Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of Locus coeruleus neurons in the *in vitro* brainstem-spinal cord of the neonatal rat. J Physiol 513 : 381-398, 1998.
- 4) Oyamada Y, Andrzejewski M, Mückenhoff K, Scheid P, Ballantyne D : Locus coeruleus neurons *in vitro* : pH-sensitive oscillations of membrane potential in an electrically coupled network. Respir Physiol 118 : 131-147, 1999.
- 5) Dean JB, Lawing WL, Millhorn DE : CO₂ decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarii. Exp Brain Res 76 : 656-661, 1989.
- 6) Richerson GB : Response to CO₂ of neurons in the rostral ventral medulla *in vitro*. J Neurophysiol 73 : 933-944, 1995.
- 7) Coates EL, Li A, Nattie EE : Widespread sites of

- brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75 : 5-14, 1993.
- 8) Bernard DG, Li A, Nattie EE : Evidence for central chemoreception in the midline raphe. *J Appl Physiol* 80 : 108-115, 1996.
 - 9) Hakuno H, Oyamada Y, Murai M, Ito Y, Yamaguchi K : Effects of inactivation and stimulation of locus coeruleus on respiratory activity of neonatal rat. *Respir Physiol Neurobiol* 140 : 9-18, 2004.
 - 10) Pineda J, Aghajanian GK : Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience* 77 : 723-743, 1997.
 - 11) Xu H, Cui N, Yang Z, Qu Z, Jiang C : Modulation of Kir4.1 and Kir5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis. *J Physiol* 524 : 725-735, 2000.
 - 12) Zhu G, Liu C, Qu Z, Chanchevalap S, Xu H, Jiang C : CO₂ inhibits specific inward rectifier K⁺ channels by decreases in intra- and extracellular pH. *J Cell Physiol* 183 : 53-64, 2000.
 - 13) Chapman CG, Meadows HJ, Godden RJ, Campbell DA, Duckworth M, Kelsell RE, Murdock PR, Randall AD, Rennie GI, Gloger IS : Cloning, localization and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Molecular Brain Research* 82 : 74-83, 2000.
 - 14) Kim Y, Bang H, Kim D : TASK-3, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *J Biol Chem* 275 : 9340-9347, 2000.
 - 15) Lesage F, Lazdunski M : Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279 : F793-F801, 2000.
 - 16) Rajan S, Wischmeyer E, Xin Liu G, Preisig-Muller R, Daut, J, Karschin A, Derst C : TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem* 275 : 16650-16657, 2000.
 - 17) Oyamada Y, Yamaguchi K, Murai M, Hakuno H, Ishizaka A : Role of Kir2.2 in hypercapnic ventilatory response during postnatal development of mouse. *Respir Physiol Neurobiol* 145 : 143-151, 2005.
 - 18) Karschin C, Dismann E, Stühmer W, Karschin A : IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci* 16 : 3559-3570, 1996.
 - 19) Karschin C, Karschin A : Ontogeny of gene expression of Kir channel subunits in the rat. *Mol Cell Neurosci* 10 : 131-148, 1997.
-

学会展望

第 29 回慶應外科フォーラム総会

日 時 平成 18 年 1 月 28 日 (土) 13 時～18 時 30 分
場 所 東京コンファレンスセンター
主 催 慶應外科フォーラム総会
事務局 慶應義塾大学医学部一般消化器外科内
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

13:00	開会の辞	会長 北島 政樹
13:05～13:54	学術講演 (I) 1～5	座長 島田 敦
13:45～14:25	学術講演 (II) 6～10	座長 諏訪 達志
14:25～14:40	－休 憩－	
14:40～15:28	学術講演 (III) 11～16	座長 山高 浩一
15:28～15:40	－休 憩－	
15:40～16:44	学術講演 (IV) 17～24	座長 安井 信隆
16:44～17:00	－休 憩－	
17:00～18:00	特別講演 『食道癌治療の現況と将来展望』 東海大学医学部 外科 教授 幕内 博康	司会 北島 政樹
18:05～18:15	前田賞授与式	
18:15～	閉会の辞	会長 北島 政樹

1. 幽門側胃切除後 Roux-en-Y 法再建の手技と成績

栃木県立がんセンター外科

高橋常浩, 稲田高男, 飯田修史,
麻賀創太, 富川盛啓, 松井孝至,
安藤二郎, 尾澤 巖, 菱沼正一,
固武 健二郎

本邦においては、幽門側胃切除術後の再建方法として Billroth-I 法 (B-I) が広く普及している。しかしながら近年、十二指腸液の残胃への逆流が少ない、縫合不全がおこりにくいなどの利点から Roux-en-Y 法 (R-Y) 再建を行う施設が増えつつある。今回、当センターで行っている器械吻合による R-Y 再建の要点と B-I との周術期成績の相違について報告する。

[再建手技] 吻合予定部とする胃大弯側は、断端鉗子を用いて切離し、更に小弯側は linear stapler を用いて切断する。次いで残胃大弯側の吻合予定部に circular stapler (29mm) の anvil head を挿入・固定を行う。Treitz 靱帯より約 20cm の空腸を切離し、肛門側空腸を結腸前に挙上する。挙上空腸断端より circular stapler の本体を挿入し、端側にて残胃と空腸を吻合し、空腸断端は linear stapler で閉鎖する。R-Y の脚部は、残胃空腸吻合部より約 30 cm 肛門側にて、吸収系を用いて通常の Albert-Lembert 2 層吻合を行う。

[周術期成績] 2004 年 1 月から 2005 年 9 月の間に根治度 A, B の幽門側胃切除が施行された B-I: 75 例, R-Y: 51 例を対象とし、入院期間、手術時間、出血量、術後経過などを比較検討した。R-Y では、B-I と比較し、平均手術時間 (R-Y: 201.3, B-I: 170.7 min) は長い、出血量 (R-Y: 287.9, B-I: 245.8 ml) には差が認められなかった。経鼻胃管 IPOD 排液量 (R-Y: 76.7, B-I: 149.8 ml) は R-Y 法で少なく、抜去日 (R-Y: 1.7, B-I: 3.6 日) も早かったが、排ガス・排便日 (R-Y: 4.0, 5.5, B-I: 4.3, 6.1 日) は両群間で差はなく、飲水、食事開始日 (R-Y: 5.3, 6.4, B-I: 6.2, 7.9 日) にも有意差はなかった。術後合併症の発症率は差を認めなかったが、吻合部トラブルに関しては、吻合部狭窄が B-I: 7 例 (9%), R-Y: 3 例 (6%), 縫合不全が B-I: 3 例 (4%), R-Y は 0 例と、有意性は無いものの R-Y において少ない傾向であった。術後在院日数は R-Y: 19.9, B-I: 25.5 日と有意差を認めた。

[結語] R-Y では、術後在院期間の延長を招く吻合部トラブルが少ない傾向にあり、また、経鼻胃管を早期抜去可能することで、飲水・開食を早め、さらに入院期間短縮を導き得ると考えられた。

2. 上部消化管内視鏡検査から見た早期噴門部腺癌の特徴

慶應義塾大学外科

金 龍学, 吉田 昌, 才川義朗,
北川雄光, 中村哲也, 中村理恵子,
北島政樹,

同内視鏡センター

熊井浩一郎

同包括先進医療センター

久保田哲朗

同救急医学

石川秀樹

背景：噴門部癌の発症機序は、その環境の特殊性から他の胃癌、食道癌と異なることが想定されている。早期噴門部癌を食道-胃接合部 (Esophago-gastric Junction) で食道側 (above EGJ 腺癌)、胃側 (below EGJ 腺癌) に分けて、逆流性食道炎、食道裂孔ヘルニア、噴門形態、胃粘膜萎縮の内視鏡分類で比較し、検討した。

対象および方法：慶應義塾大学病院内視鏡センターにおける上部消化管内視鏡検査を受けた早期噴門部癌症例と早期胃癌症例を検討した。内視鏡的な逆流性食道炎は Los Angeles 分類で、食道裂孔ヘルニアは幕内らの K-form にて、噴門形態は Ismail らの V-grades 分類にて評価した。V-grades: V0; 正常, V1; 下部食道の締めりは良好で、小さな食道裂孔ヘルニアを認める, V2; 噴門は開大しているが、食道裂孔ヘルニアは認めない, V3; 噴門から下部食道まで開大し、嚢状の食道裂孔ヘルニアを認める。K-form: Grade 0; 正常, Grade C; 胃粘膜が非全周性に挙上, Grade B; 3 cm 未満の全周性挙上, Grade A; 3 cm 以上の全周性挙上。胃粘膜の萎縮範囲は木村-竹本分類で評価した。above EGJ 腺癌と below EGJ 腺癌は食道-胃接合部の上下 2 cm に存在する腺癌とし、食道-胃接合部は食道柵状血管の下端で判断した。

結果：above EGJ 腺癌と below EGJ 腺癌とその他の胃癌に分けて行った検討では、below EGJ 腺癌が噴門まで萎縮が達した木村-竹本分類 open type の胃粘膜に発生していた。それに対し、above EGJ 腺癌には、多くの場合、食道裂孔ヘルニアを伴い、噴門形態が悪く、胃粘膜の萎縮範囲が比較的狭い、closed type であった。

考察および結論：below EGJ 腺癌は胃粘膜の萎縮と関連を持ち、above EGJ 腺癌は、胃液の逆流との関連が推察された。

3. 全身麻酔下 ESD 症例の検討

国立病院機構東京医療センター 外科

島田 敦, 磯部 陽, 川口義樹,
大住幸司, 岸 真也, 徳山 丞,
北條 隆, 金 史英, 竹内裕也,
大石 崇, 池内駿之, 窪地 淳,
松本純夫

同麻酔科

青山康彦, 小林佳郎

同病理

前島新史, 廣瀬茂道, 倉持 茂

当院では 2003 年より早期胃癌に対し内視鏡的粘膜下層切開剥離法 (以下 ESD) を導入した。現在, ESD の適応を胃癌治療ガイドラインの EMR 適応基準の病変径を越えるいわゆる拡大適応を採用している。このため, 治療時間が長時間に及ぶ症例もあり, 事前に治療が 2 時間以上見込まれる症例に対しては全身麻酔下で ESD を行っている。

これまでに 13 症例 16 病変に対し麻酔科管理の下, 内視鏡室にて ESD を施行した。患者の平均年齢は 71.7 歳で, 全身麻酔下で ESD を行った理由の内訳は, 病変が 3 cm を越えるものが 5 例, 病変が治療困難な位置にあるもの (残胃後壁, 胃管内, 食道胃接合部) が 3 例, 胃内多発病変が 2 例, その他 3 例であった。病変が 3 cm を越える 5 例では, 平均切除径は 44.4 mm (36~57 mm) で平均所要時間は 170 分であったが, 全例深達度 m の高分化型管状腺癌で LM (-), VM (-), ly 0, v 0 であった。また全 16 病変中 13 病変で一括切除が行えた。ESD に伴う穿孔や輸血を必要とする出血も認めず, また全身麻酔に伴う合併症も 1 例もなく, 全例 8 日目に退院した。

ESD では, その手技の困難さや術中の出血に対する止血操作などから, 長時間を要する症例もあり, conscious sedation も長時間となるとそのコントロールに難渋することも多い。2 時間以上を要すると予想される ESD の場合, 全身麻酔下にての治療は非常に有用であると考えられた。

4. Stage IV 胃癌に対し術前化学放射線療法により根治術が可能であった一例

済生会中央病院外科

大島 剛, 鳥海史樹, 今津嘉宏,
村山剛也, 越田佳朋, 米山公康,
戸枝弘之, 赤松秀敏, 茂木克彦,
大山麻平

慶應義塾大学医学部外科

才川義朗, 北島政樹

慶應義塾大学病院包括先進医療センター

久保田 哲朗

はじめに: 当科にて化学放射線療法を施行後, 根治術が可能であった Stage IV 胃癌の 1 症例を経験したので報告する。

症例: 前庭部の全周性 3 型胃癌を認めた 62 歳男性で, 腹部 CT にて肝転移と傍大動脈リンパ節転移を指摘された。これに対し TS-1 120 mg を 3 週間投与, CDDP 10 mg を 5 投 2 休で 3 週間投与, 放射線照射は 2 Gy/日 で合計 40 Gy を照射した。1 クール終了後の評価で肝転移の縮小率は 90 % であった。2 クール目以降は TS-1, CDDP による化学療法を継続した。4 クール終了後, 画像上遠隔転移は完全に消失したため手術を施行した。術式は幽門側胃切除術 (D2), 16a2 リンパ節生検で, 術中迅速病理にて転移陰性であった。病理診断では tub2 > por2, 5×4 cm, SS, ly1, v1, n0, pathological grade1 であった。初回治療より 18 ヶ月経過した現在, 再発の兆候なく外来で TS-1 の内服にて経過観察となっている。

考察: 本症例は高度進行胃癌に対して集学的治療により治療し得た貴重な症例であると考え文献的考察を踏まえて報告する。

5. 2nd-line chemotherapy としての docetaxel 単剤投与により多発肝転移, Virchow, 腋窩リンパ節転移が消失し, 根治手術を施行しえた進行胃癌の一例

国立病院機構神奈川病院外科

安藤祐一郎, 徳原秀典, 増田大介,
櫻井嘉彦, 柿崎 徹, 加勢田 静

症例は 62 歳, 男性。前医での上部内視鏡検査にて, 胃体上部前壁に桑実様腫瘤あり, 平成 16 年 6 月 2 日当院を紹介受診した。触診上, Virchow リンパ節転移が疑われた。その後の CT にて多発肝転移, 1, 2 群リンパ節ならびに 16 番リンパ節転移を疑わせる所見を認めた。原発巣の生検の病理診断は, 高分化型腺癌であった。根治手術の適応はなく, TS-1+CDDP+レンチナンを 1 クール施行するも肝転移果は増大, さらに 4 cm 大の左腋窩リンパ節転移が出現した。このため, 2nd-line chemotherapy として docetaxel 単剤投与を開始 (60mg/m²/3week) した。4 クール施行後, 1 群リンパ節転移は縮小, Virchow, 左腋窩リンパ節転移は消失した。6 クール後には, 原発巣, 肝転移果, 16 番リンパ節転移に関しても CR を得た。その後 9 クールまで原発巣, 遠隔転移果の CR の維持を確認。1 群リンパ節は PR であったが, FDG-PET にて集積を認めなかった。十分な IC のもと, 平成 17 年 3 月 24 日, 胃全摘術 (D2) を施行した。病理学的には, 胃に腫瘍細胞の残存はなく, 1 群リンパ節に 2 個の転移を認めるのみで根治手術を施行しえた。術後, 追加で 7 クールを施行後一時休業中であるが, 現在再発を認めていない。2nd-line chemotherapy としての docetaxel 単剤投与により多発肝転移, Virchow, 左腋窩リンパ節転移が消失し根治手術を試行しえた進行胃癌の一例を経験したので若干の文献的考察を加えて報告する。

座長のまとめ—学術講演 (I) (演題1~5)

国立病院機構東京医療センター外科

島田 敦

本セッションは、胃に関する演題5題であった。栃木県立がんセンターの高橋は、幽門側胃切除後の再建で同時期に施行されたB-I法とRoux Y法との周術期成績を比較検討し、Roux Y法では縫合不全を認めずまた吻合部トラブルが少ないなど、この再建の有用性を示した。慶應義塾大学の金は、早期噴門部腺癌をEG junctionの口側、肛側とで分類し内視鏡所見から比較検討し、口側では胃液の逆流、肛側では胃粘膜の萎縮との関連性を指摘した。GERD研究会からも近年多施設共同研究で萎縮性胃炎、食道裂孔ヘルニアとBarrett食道の相関性に関する報告がなされており、その結果を反映するものであった。島田は、ここ数年の内視鏡治療の話題であるESDに関し、長時間を見込まれる症例を全身麻酔下で行いその成績と有用性を報告した。北島教授より、sm2や脈管侵襲症例での追加治療として胃切除の際のsentinel node navigation surgeryの応用へのコメントをいただいた。済生会中央病院の大島と国立病院機構神奈川病院の安藤からは、遠隔転移を有するStageIV胃癌にそれぞれ化学放射線療法、化学療法を行いその後の根治切除を施行した一例が報告された。大島はS-1/low dose CDDP+放射線照射により遠隔転移が消失し根治切除をしえているが、前々回の当フォーラムでも慶大外科よりこの方法での8割近い奏効率とCR症例の報告もあり、その有効性が示されている。また、安藤は2nd lineとしてDocetaxelを使用しての報告であったが、近年S-1(+CDDP)無効例に対して2nd lineとしてTaxan系を用いる施設も増えている。今回の両者のように集学的治療により根治術が可能となった症例の今後の経過や例数を重ねての更なる検討が期待される。

6. 傍食道型食道裂孔ヘルニアに対し腹腔鏡下にメッシュを用い根治した一例

公立福生病院 外科

根本 淳, 五月女恵一, 宮崎洋史,
古川秋生, 仲丸 誠, 三好 玲,
平野敦史, 諸角強英

症例は63歳女性、1ヶ月前より嚥下困難を自覚していた。近医受診し、胸部レントゲン施行したところ胃泡が胸部に認められ、当院紹介受診となった。MDLでは胃前庭部が胸部に突出していた。GIFでは胃体部~前庭部が挙上している印象であった。また逆流性食道炎はみられなかった。以上より食道裂孔ヘルニアの診断にて入院。腹腔鏡下ヘルニア根治術を施行した。手術所見としては径3cm程の食道裂孔より胃前庭部、胃結腸間膜と思われる部位が縦隔内に突出していた。それらを腹腔内に戻し、ヘルニア嚢を切除し、ヘルニア門をメッシュにて閉じた。術後6日目に退院。症状は消失した。術後1ヶ月に施行したMDLでは、胃、十二指腸は生理

的位置に存在していた。

食道裂孔ヘルニアは高齢化に伴い増加傾向であり日常診療においてよく遭遇する疾患となっている。自験例は分類上傍食道型でありその頻度は5~10%とされている。傍食道型では急性嵌頓の危険性も報告されている。今回我々は腹腔鏡下に根治術を施行したので報告する。

7. 混合型食道裂孔ヘルニアに対して腹腔鏡下根治術を施行した一例

多摩丘陵病院外科

岡村 誉, 白部多可史, 清水芳政,
今井達郎

滑脱型食道裂孔ヘルニアに伴う胃食道逆流症に対する噴門形成術は腹腔鏡下に行われることが標準術式となりつつあるが、巨大な食道裂孔に伴う傍食道型や混合型食道裂孔ヘルニアに対する腹腔鏡下根治術の報告は少ない。今回、われわれは巨大な混合型食道裂孔ヘルニアに対して腹腔鏡下に根治術を施行した症例を経験したので若干の文献的考察を加えて報告する。

症例は84歳の女性で近医にて10年前より食道裂孔ヘルニアを指摘され投薬を受けていた。2005年9月12日心窩部痛で当院初診した。胃の2/3が縦隔内に入り込んだ巨大な混合型の食道裂孔ヘルニアを認めたため、同年10月11日入院とし10月14日手術を施行した。手術は5本のトロッカーを挿入し縦隔内に入り込んだ胃を腹腔内に引き出した後、胃穹隆部を授動してNissen法に準じた噴門形成術を施行した。さらに食道裂孔が巨大なため単純な縫縮は困難と判断しcomposix meshを用いて食道裂孔を補強した。手術時間は2時間11分で出血もほとんどなく終了した。術後経過は良好で3PODより食事を開始し11PODの10月25日に軽快退院した。術後1ヶ月しか経過していないが、長く悩まされていた心窩部不快感が消失し元気に社会復帰している。腹腔鏡下Nissen手術に関しては既に手技が完成された感があるが、傍食道型や混合型ヘルニアでは大きなヘルニア門の修復がポイントとなる。大きな食道裂孔はヘルニア嚢を剥離・反転しなければ確実に縫縮することは不可能であり、その手技を腹腔鏡下に行うことは困難である。今回、われわれはcomposix meshを用いた簡便なヘルニア門修復手技を工夫したのでビデオで供覧する。

8. 食道未分化癌4例の治療経験

一本疾患の特徴と治療方針についての検討—

水戸赤十字病院外科

山本立真, 諏訪達志, 岡田健一,
佐々木貴浩, 捨田利外茂夫, 内田智夫,
佐藤宏喜, 古内孝幸, 竹中能文,
佐久間正祥

食道未分化癌(UEC)は、急速に発育して早期に遠隔転

移を来すことから予後不良であり、未だに標準的な治療方法が確立していない。過去に4例の UEC の治療経験があるが、化学放射線療法 (CRT) を施行して現在まで CR が約 10 ヶ月間持続している T2N1 の 1 例を最近経験した。4 例の UEC の治療経験を報告する。また、本疾患の一般的な特徴や治療法などについて報告例を集計して検討する。

【当院 CR 症例】67 歳男性。Mt 右壁中心 1/2 周の 4 cm の 2 型の病変。生検で食道未分化癌と診断。CT で 106rR に転移を認めた。手術による UEC のコントロールは困難と判断。CDDP30mg×5 days, 5FU1000mg×5 days と long T での放射線照射 30Gy を 1 コースとして、2 コースの CRT を施行 (2 コース目の照射は 20Gy)。その後 CR が得られ、現在まで 10 ヶ月間再発していない。

【方法】Pubmed と医学中央雑誌の検索により UEC の報告例を全て集計し、それに自験例 4 例を加えて、本疾患の特徴や治療について検討した。

【結果と考察】性差においては、女性患者の比率が UEC では 23.2% であり、食道癌全体における女性患者の比率 12.4% の 2 倍近くの頻度を示した。予後については、診断から平均 9.3 ヶ月であり、1991 年の集計での平均 5.3 ヶ月からの延長が認められた。UEC の多くは小細胞型だが、非小細胞型も 11.3% において認められた。UEC の占拠部位は、Ce: 2.2%, Ut: 9.6%, Mt: 48.5%, Lt: 37.5%, Ae: 2.2% であり、食道癌全体と比べるとやや上部に少ない傾向を示した。UEC の肉眼型は 0 型表在癌 17.9%, 1 型 35.7%, 2 型 35.7%, 3 型 10.7% であり、4 型は報告がなかった。食道癌全体と比較して、1 型が多く、隆起を主体とした病変を示すことに特徴があった。悪性度が高く systemic disease としての取り扱いが推奨される本疾患の治療においては、化学療法が重要であるとされている。今回、CRT により CR を得られた UEC の貴重な 1 症例を経験した。

9. 当院における食道癌に対する化学放射線療法の現状

大田原赤十字病院外科

小熊潤也, 松井淳一, 河又 寛,
森 和亮, 本多克行, 白土裕之,
青木真彦, 細田 桂, 城戸 啓,
雨宮 哲, 納賀克彦

国立病院機構栃木病院

田村明彦

川崎市立川崎病院

川久保博文

浜松北病院

松田純一

【目的】食道癌に対する化学放射線療法 (CRT) は、従来より高度進行例を中心に行われてきたが、手術適応とされていた症例に対する有用性も報告されるようになった。一方高齢者や high risk 症例に対しては放射線療法 (RT) を行う場合もある。われわれは、当院における食道癌に対する

CRT および RT の現状を検討した。

【対象および方法】2000 年 1 月から 2005 年 11 月までに、当院で CRT を施行した食道癌 16 症例および RT を施行した 13 症例を対象に、その臨床背景および治療成績を検討した。なお当院では、化学療法 regimen は CDDP 5 mg/body, 5-FU 250 mg/body の Low-dose FP で、放射線療法は Co 照射で行っている。

【結果】表在癌は 4 例で、CRT と RT が各 2 例ずつであったが、全例 CR かつ無再発生存中である (観察期間の中央値 35 ヶ月)。進行癌のうち CRT は 14 例、平均照射量は 56.6Gy で、効果は CR 1 例、PR 6 例 (奏効率 50%) であった。毒性は 3 例 (21.4%) のみに認められた。RT は 11 例、平均照射量は 52.0 Gy で、効果は CR 2 例、PR 5 例 (奏効率 63.6%) であった。特記すべき毒性の出現はなかった。Stagell/III (nonT4) は 10 例で CRT 6 例、RT 4 例であった。奏効率は 80% で CR は 3 例あったが、うち 2 例は再発している。MST は 14 ヶ月であった。

【考察および結論】EMR 不能な T1N0 の食道表在癌に対しては、十分な IC のもとで、積極的に CRT または RT を行うべきである。進行食道癌に対する CRT および RT は、T4 症例や手術困難例に対して施行する機会が多いが、毒性の出現頻度は少なく、適応症例を慎重に選択することで積極的に施行すべきと考える。Stagell/III (nonT4) 食道癌については、CR 症例でも再発しうることを念頭に入れた治療戦略が必要と考える。

10. 外科侵襲・炎症における HMGB-1 の意義

慶應義塾大学外科

須田康一, 北川雄光, 小澤壯治,
才川義朗, 上田政和, 北島政樹

同呼吸器内科

石坂彰敏

【目的】High-mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB-1) は、エンドトキシンショックや出血性ショックなどによる臓器不全の発症における後期メディエーターとして重要な役割を果たしていることが判明してきた。今回我々は、手術侵襲下における HMGB-1 の臨床的意義、治療標的としての抗 HMGB-1 療法の有用性に関して検討した。

【対象および方法】(1)臨床的検討: 右開胸開腹胸部食道全摘術症例 24 例を対象に血清 HMGB-1 値の経時的変化と術後臨床経過との関連を検討した。(2)SD ラット (8 週齢, 雄, 250~300 g) 盲腸結紮切断モデルを用いて、閉腹直後に抗 HMGB-1 抗体 3 mg を皮下投与した中和抗体投与群 (n=11) の生存率をコントロール抗体投与群 (n=11) と比較した。

【結果】(1)24 例中 2 例は敗血症性ショックを、1 例は急性肺損傷を合併し、この 3 例を合併症群とした。血清 HMGB-1 値は、2POD 以外の全時点において合併症群が非合併症群よりも有意に高値であった (p < 0.05)。また、HMGB-1 の

術前値とICU収容期間、人工呼吸管理期間、SIRS期間が相関した ($p < 0.05$)。②中和抗体投与群においてはコントロール抗体投与群に比して最終時点での血清 HMGB-1 値が有意に抑制され ($p < 0.05$)、10日生存率は有意に改善した (中和抗体投与群: 55%, 6/11, コントロール抗体投与群: 9.1%, 1/11: $p < 0.01$)。

【考察および結論】高度の手術侵襲により HMGB-1 が一過性に血清中に出現することが明らかとなった。また、HMGB-1 が手術侵襲に伴う臓器障害の進展に関与している可能性が示唆された。ラットにおいて重症病態発症後における抗 HMGB-1 療法の有用性が明らかとなった。HMGB-1 を指標・標的として、侵襲に対する生体反応の個別化した評価・制御を行える可能性が示唆された。今後、HMGB-1 の簡易・迅速診断系の開発、および、ヒトに応用可能な抗 HMGB-1 療法の開発が期待される。

座長のまとめ 学術講演 (II) (演題6~10)

水戸赤十字病院外科

諏訪達志

食道領域からの5演題を担当させていただきました。食道裂孔ヘルニアに対する腹腔鏡下手術についての報告が2題あり、演題6は傍食道型、演題7は混合型の巨大な食道裂孔ヘルニアに対して、メッシュを用いて修復したという内容の報告であった。傍食道型や混合型で胃が脱出している場合には upside-down stomach の状態になり、摂食不良の原因となったり、嵌頓の危険が生じたりするため、手術適応となる。最近では食道裂孔ヘルニアの腹腔鏡下手術が一般化してきて、その手技も標準化してきている。演題6の症例は63歳であり、内視鏡陰性の潜在的逆流性食道炎の可能性も考慮して fundoplication を追加することが望ましいと指摘された。巨大なヘルニアで経過が長い場合にはヘルニア嚢が縦隔に強固に癒着していて腹腔鏡下に剥離が困難なこともあり、演題7のようにヘルニア嚢を残して出血を避けることも必要であろう。演題8は食道未分化癌の治療経験4例についての報告であった。食道未分化癌は極めて悪性度が高く、診断から平均9ヶ月の予後しか得られていない。T1bの2例には手術が行われたが全身転移で1年以内に亡くなったことと、化学放射線療法でCRの得られたT2N1の1例についての報告があった。食道未分化癌については、今のところ効果を期待できる化学療法の regimen も存在しないため、全身転移した場合の治療が困難である。演題9は関連病院における食道癌に対する化学放射線療法についての報告であり、食道表在癌にも適応を拡大して良好な治療成績が得られているとのことであった。演題10では High-mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB-1) についての研究成果が報告された。HMGB-1 の血清値が臓器障害と関連していることが示され、抗 HMGB-1 療法開発の可能性も期待されている。

11. 膵・胆管合流異常に中腸回転異常と輪状膵を合併した一例

川崎市立井田病院外科

山邊健太郎, 鹿子生 祥子,
立松秀樹, 石川修人, 山高浩一,
櫻井孝志, 有澤淑人, 山本貴章,
川原英之

【目的】膵・胆管合流異常に中腸回転異常と輪状膵を合併した一例を経験したので報告する。

【対象】24歳、女性。生来健康。2005年9月上旬に食後の腹痛を主訴に近医受診し、血清AMYが3031と高値だったため、急性膵炎を疑い精査、加療を進めた。上部消化管造影では十二指腸の水平脚が見られず、小腸は身体の右側にあった。MRCPでは肝門部肝管、総胆管のそれぞれが嚢腫状に拡張しており、主膵管も拡張していた。以上より、膵・胆管合流異常による膵炎に中腸回転異常が合併したものと判断し、胆道膵管分離のために開腹手術を行なった。

【結果】術前の画像所見に加えて、輪状膵およびLadd靭帯の近位における十二指腸の拡張がみられ、上行結腸は壁側腹膜に固定されていなかった。嚢腫の末梢側の胆管を膵管との合流部まで露出し、胆道と膵管を分離した。肝門部肝管嚢腫は可及的に切離し、嚢腫断端を空腸と端吻吻合し、Roux-Y空腸吻合を行なった。輪状膵の口側と肛側の十二指腸とを側々吻合した。術後胆道造影にて嚢腫空腸吻合部に狭窄は見られなかった。

【考察および結論】膵・胆管合流異常に中腸回転異常および輪状膵を合併した比較的まれな症例を経験した。本症例は今回の発症まで無症状であったが拡張胆管と周囲との癒着が軽度で、胆石がなかったことから、先天性胆道拡張症のI型(嚢腫状拡張)と考えられる。中腸の無回転は軸捻転を起こすことがあり、先天性胆道拡張症には術後胆管癌の発生も報告されているため今後の定期的なフォローアップが必要と思われる。

12. 膵・胆管合流異常4例の経験

伊勢原協同病院外科

中安邦夫, 篠田政幸, 飯尾 宏,
横山剛義, 西岡道人, 別所 隆

膵・胆管合流異常は「膵管と胆管が十二指腸壁外で合流する先天奇形であり、機能的に十二指腸乳頭部括約筋の作用が合流部に及ばないため、膵液と胆汁の相互混入(逆流)が起こり、胆道ないし膵にさまざまな病態を引き起こしうるもの」と定義されている。胆道粘膜が障害され、過形成、化生、異形成などの上皮変化をもたらし、最終的に発癌するといわれている。膵・胆管合流異常は胆道癌のハイリスク因子のひとつである。2002年からこれまで4例の膵・胆管合流異常を経験したので報告する。

症例1: 72歳、女性。閉塞性黄疸で内科入院精査。胆嚢

腫瘍を認め、2002年5月15日手術。胆嚢癌。拡大胆摘・リンパ節郭清・肝管空腸吻合施行。Stage IVa。根治度C。退院後大腿骨頸部骨折。在宅療養。術後4ヶ月にて死亡。

症例2：54歳。女性。症状なし。CTで総胆管拡張をみとめ内科入院精査。合流異常を認めた。2002年10月16日分流手術施行。病理検査で悪性所見なし。経過良好。

症例3：74歳。女性。健診の腹部エコーで胆管拡張をみとめた。内科入院精査し合流異常と診断された。2003年11月26日分流手術施行。病理検査で総胆管嚢腫。悪性所見なし。転院。

症例4：49歳。男性。大腸憩室出血で内科入院。CTで総胆管拡張を認めた。胆道系症状なし。胆嚢腫瘍あり。2005年9月22日手術。胆嚢癌。胆摘・リンパ節郭清・肝管空腸吻合施行。Stage III。根治度C (pHM₂)。経過観察中。

4例のうち2例で進行胆嚢癌 (stage III) を発癌していた。2例では総胆管嚢腫をみとめ、分流手術 (胆嚢摘出・肝外胆管切除・再建) を行った。膵・胆管合流異常はとくに症状なく、他の病変の精査で偶然発見されることが多い。合流異常の胆道癌発生率は一般の胆道癌に比べて5～35倍高い。なかでも胆嚢癌の発生が高い。合流異常に対しては手術をふくめた治療をすすめている。

13. CA19-9が高値を示した胆嚢腺筋症の1症例

東京電力病院外科

栗原直人、隈元雄介、菊池 潔、

露木 晃、藤城保男

慶應義塾大学医学部外科

田辺 稔、北島政樹

慶應義塾大学医学部病理

池田栄二

〔はじめに〕 CA19-9は肝胆膵悪性疾患に上昇が認められる腫瘍マーカーの一つである。今回、胆嚢良性疾患である胆嚢腺筋症においてCA19-9高値が認められたので報告する。

〔症例〕 43歳。女性。婦人科にて右卵巣腫瘍でフォローアップ中、CA19-9が155 (平成17年5月6日) (正常値37未満) と高値を示し、精査目的にて外科受診した。上腹部超音波検査では胆嚢底部に壁の肥厚が認められ腫瘤性病変が疑われた。CA19-9は183 (6月27日) と増加傾向が見られた。腹部CT検査では胆嚢底部に壁肥厚が認められ、また、頸部には壁に結石と思われる小粒状石灰化が認められ、胆嚢腺筋症が疑われた。ダイナミックCTにおいては明らかな悪性所見は認められなかった。MRI (MRCP) 検査では胆嚢底部型腺筋症が疑われた。肝内胆管を含めた胆道系、膵管には異常な所見は認められなかった。造影MRIでは胆嚢底部のRASの拡張と壁肥厚が認められ、胆嚢の長軸断で底部に線上の内腔がT2Wで高信号として同定されることから胆嚢腺筋症が強く示唆された。腹部超音波再検査では胆嚢頸部に限局する壁肥厚とコメントサインが見られたが悪性を示唆する

所見は認められず胆嚢腺筋症の診断であった。以上からCA19-9高値の増加傾向が認められるが (CA19-9は265.9 (8月8日)) 画像診断から悪性を示唆する所見が乏しく、胆嚢腺筋症が疑われることから、8月30日腹腔鏡下胆嚢摘出術施行した。術中迅速病理診断にて悪性所見は認められず、胆嚢腺筋症と診断された。CA19-9は第6病日に135と減少していた。術後経過は良好で第7病日退院した。永久標本による病理診断では主として胆嚢底部に肥厚した壁内、特に漿膜下層に内腔の拡張した腺管が認められたが、腺管上皮には異型は認められず胆嚢腺筋症の所見であった。CA19-9に対する免疫組織検査では陽性であった。

〔考察〕 CA19-9と良性胆道疾患についてはCA19-9の上昇と急性胆嚢炎との関連性、胆嚢癌における背景胆嚢粘膜にCA19-9が強陽性であったとの報告が認められる。一方、本症例のような胆嚢腺筋症とCA19-9の関連性については報告がない。今後、これらの関連性について臨床病理学的検討が必要であると思われた。

14. 肝部分切除マウスモデルにおける血中アンモニア濃度上昇のメカニズム - TJ-48投与による抑制効果 -

東京電力病院外科

栗原直人

慶應義塾大学医学部漢方医学講座

戸田雄大、築地謙治、渡辺陽子、

石毛 敦、渡辺賢治

星薬科大学薬学部

杉山 清

株式会社ツムラ 中央研究所

三浦尚子、山本雅浩

済生会中央病院外科

今津嘉宏

〔目的〕 高アンモニア血症は肝機能障害を有する患者の肝におけるアンモニア代謝の機能低下が主な原因であると考えられている。血中アンモニア (NH₃) 濃度はアミノ酸代謝、腸内のアンモニア産生菌の活動、肝におけるNH₃代謝のバランスにより成り立つ。今回、肝部分切除マウスモデルにおける血中NH₃値の変化および腸内細菌の変動、更にTJ-48投与による血中NH₃上昇抑制効果について検討した。

〔方法〕 7週齢、雄のBALB/cマウスを用いて、肝部分切除 (以下、肝切) (約25-30%) を施行した。Sham群 (n=6)、肝切群 (n=6)、肝切+TJ-48投与群 (n=6) に分け、術前、術後の血中NH₃濃度を経時的に測定した。肝機能評価はGOT、GPT、TBにより比較した。各群間の腸内細菌の変動をT-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いて比較した。

〔結果〕 血中NH₃値はSham群と比較して肝切群において術後3日目をピークとする有意な上昇が認められた。肝切+TJ-48投与群では肝切群と比較して血中NH₃値の上昇を抑制した (171.5±7.9vs101.5±5.6, p<0.01)。肝切による

肝機能障害については、肝切群、肝切+TJ-48投与群間で差は認められなかった。T-RFLP法を用いた検討では、肝切群ではSham群と比較して腸内細菌の変動が認められたが、肝切+TJ-48投与群ではこれらの変動が抑制された。

【考察】①肝切後の血中NH₃値の上昇がTJ-48投与により抑制されたこと、②肝切後の腸内細菌の変化はTJ-48投与により抑制されたこと、③肝切後の肝機能障害にはTJ-48投与の影響が少ないことから、肝切が腸内細菌に影響を及ぼすことで血中NH₃濃度の上昇を惹起し、この変化をTJ-48投与が抑制する可能性が示唆された。今後、変化が認められた腸内細菌の同定、ウレアーゼ活性の有無、TJ-48の腸内細菌に与える機序について更なる検討が必要であると思われる。

15. 特異な形態を呈した脾動脈瘤の1例

慶應義塾大学外科

和多田 晋, 松本賢治, 小野滋司,
服部俊昭, 松原健太郎, 尾原秀明,
北島政樹

【目的】脾動脈瘤は腹部内臓動脈瘤の中では、最も頻度の高い疾患であるが、今回われわれは、特異的な形態を呈した脾動脈瘤の1例を経験したので報告する。

【症例】64歳、男性。2005年7月頃より右下腹部痛を認め、近医で施行したCT検査にて脾動脈瘤を指摘され、治療目的に当院紹介となった。右下腹部痛はその後自然軽快した。瘤は脾動脈中樞から末梢へとそれぞれ径10mm, 40mm, 20mmと3個認め、最大径40mmの瘤は八つ頭状の形態を示した。今後、破裂の危険性が高いと判断し、手術目的で2005年9月20日に入院となった。

【入院後経過】2005年9月28日、開腹手術を施行した。瘤周囲は炎症性癒着が著しく、脾動脈は蛇行し石灰化した瘤を認めた。手術は、脾臓摘出術、脾動脈瘤空置術を施行した。脾動脈よりの分枝は、瘤を開窓して処理した。

【考察】脾動脈瘤の原因としては、動脈硬化性や肺炎に伴うもの、妊娠中に発生するものなどが知られている。本症例では、飲酒歴とアルコール性肝炎の既往があったが、術中所見および臨床検査上肺炎の所見は認められず、動脈硬化性の瘤が疑われた。本症例のように、特異な形態を呈した脾動脈瘤の報告は稀であり、若干の文献的考察を加え報告した。

16. 小腸穿孔をきたした壊死性血管炎の2例

北里研究所病院外科

加藤雄治, 金田宗久, 首村智久,
大作昌義, 浅沼史樹, 上里一雄,
山田好則, 宮川 健

北里研究所病院病理

森永正二郎

小腸穿孔による腹膜炎をきたし、小腸切除を施行した壊死性血管炎の2例を報告する。

【症例1】26歳男性、3歳時川崎病既往あり、2005年3月頃より下腹部痛を認めたが、腹部エコー、CT、注腸等異常所見なく原因不明であった。8月5日強度の下腹部痛、腹膜刺激症状にて入院し、虫垂炎の診断で開腹術施行した。腹腔内に黄色混濁した浸出液あり、虫垂切除後、腹腔内精査し、回腸末端より60cm口側に小腸の全周性の狭窄、さらに60cm口側に小穿孔を認め、2ヶ所の小腸切除を行った。病理にて小腸内腔にみられた潰瘍周辺の漿膜下や粘膜下の筋性動脈に好中球やリンパ球の浸潤とフィブリノイド壊死を認め、壊死性血管炎と診断した。血清学的にはANCA陰性で、ANA80倍陽性以外に特記すべき所見は認めなかった。術後経過は良好で一旦退院したが、1ヶ月後に軽い腹痛で入院した際の腹部血管造影にて、小腸から大腸にかけて広範な末梢動脈の瘤形成と狭窄を認めた。

【症例2】39歳男性、36歳時に大腸穿孔にて右半結腸切除の既往あり、1998年6月より便秘傾向を認め、6月12日腹痛が出現し次第に増強したため入院した。レントゲン上free airを認め消化管穿孔による腹膜炎の診断にて開腹術施行した。トライツから約30cmの小腸に穿孔を認め、近傍の小腸は循環不全を伴い、一部は壊死しており、病変部位を含め小腸を約1.5m切除した。病理は、腸間膜や粘膜下層の主として動脈に器質性血栓および新鮮血栓を認め、一部に壊死性血管炎の像を認めた。血清学的にはANCA陰性で凝固系異常も認めなかった。術後経過は良好であったが、四肢末端の壊死、冠動脈造影にて左前下行枝の狭窄と鈍縁枝の完全閉塞、肺血流シンチにて肺血栓塞栓症の所見等が認められた。内科にて多発性血管炎重複症候群として、ステロイド、免疫抑制剤等の治療を行い外来通院していたが、2005年3月気管内血性痰貯留による窒息のため死亡した。

【考察】壊死性血管炎に伴う消化器症状は中小動脈の血管炎による虚血が原因といわれ、外科的治療の後は原疾患の診断と病状に応じた治療が必要と考えられた。

座長のまとめ—学術講演(III)(11~16)

川崎市立井田病院外科
山高浩一

本セッションでは、肝・胆・膵関連4題と、血管2題の発表がありました。

「11：膵・胆管合流異常に中腸回転異常と輪状膵を合併した1例」では、まれな3つの先天異常を合併した、本邦初の症例を報告されました。「12：膵・胆管合流異常の4例の経験」では、4例とも総胆管拡張例で、膵・胆管合流異常は胆道癌のリスクが高く、無症状でも胆摘と分流手術が必要であると報告されました。総胆管非拡張例においては、胆管癌の頻度が少なく、胆摘術だけでよいとする意見もありますが、非拡張型合流異常の術式については、未だ議論の残るところであります。

「13：CA19-9が高値を示した胆嚢腺筋症の1症例」では、画像上、胆嚢腺筋症の診断であったが、CA19-9

が 265 まで増加したため腹腔鏡下手術を施行した症例を報告されました。術後の CA 19 - 9 は、術前の約半分まで減少したものの、正常値までは減少せず、これには卵巣腫瘍の存在が関与しているものと思われました。「14 : 肝部分切除マウスモデルにおける血中アンモニア濃度上昇のメカニズム - TJ - 48 投与による抑制効果 -」では、肝切除が腸内細菌に影響を及ぼすことにより高アンモニア血症がおり、TJ - 48 は、その腸内細菌の変動を抑制することにより血中アンモニア濃度を下げると報告されました。TJ - 48 の新たな効果を含め、今後の研究成果が期待されます。「15 : 特異な形態を呈した脾動脈瘤の 1 例」では、八つ頭状の形態を示した脾動脈瘤に対する手術症例を報告されました。この症例では、脾門部の動脈瘤が脾に接していたため脾摘を余儀なくされましたが、脾臓との距離が十分あれば、脾動脈を切除しても短胃動脈からの血流により脾臓を温存できると述べられました。「16 : 小腸穿孔をきたした壊死性血管炎の 2 例」では、小腸切除術後の経過は良好でしたが、原疾患に予後不良な全身性の血管炎が存在するため、ステロイドや免疫抑制剤の継続治療が必要であると報告されました。以上の興味深い演題に対し、フロアから多数のご質問、ご意見をいただき、有意義なセッションとなりました。

17. 外科的治療が奏効した Cronkhite-Canada 症候群の 1 例

国立病院機構霞ヶ浦医療センター外科

井澤菜緒子、矢野和仁、壁島康郎、
戸泉 篤、田村洋一郎、影山隆久

今回我々は外科的治療が奏効した Cronkhite-Canada 症候群の一例を経験したので報告する。

症例は 50 歳、女性、家族歴、既往歴に特記事項なし。2002 年 12 月中旬より腹痛、食欲低下、味覚異常が出現し、当院内科を受診、以後通院となった。翌年 1 月より両手指の皮膚色素沈着、爪甲萎縮、舌炎を自覚。また同時期より下痢、倦怠感および 2 ヶ月間で約 10 kg の体重減少を認め、3 月に入院となった。下部消化管内視鏡検査で大腸にびまん性ポリポーシスを認め、Cronkhite-Canada 症候群と診断した。高カロリー輸液により症状は改善し、同年 4 月退院となった。

以後外来で経過観察していたが、2003 年 5 月頃より徐々に血清アルブミン値が低下、2.3 g/dl となり、下痢と浮腫も出現したため 2004 年 2 月から 7 月まで高カロリー輸液、副腎皮質ホルモンによる入院治療を行った。同年 11 月に再び低アルブミン血症 (2.1 g/dl) と下痢の増悪を認めたため入院となった。保存的治療を施行するも改善を認めず、次第にイレウス症状を呈し始めた。下部消化管検査を施行し、回腸から上行結腸にかけて広範な多発性顆粒状隆起と回腸末端部の閉塞を認めた。同部の生検では Hyperplastic glands with edematous inflammatory stroma の診断であった。イレウス症状改善を目的とし、2005 年 2 月、腹腔鏡補助下回盲部切除術を施行した。切除標本では回腸に約 25 cm に

及ぶ炎症性ポリープと高度な浮腫を認めた。病理組織検査では Inflammatory polyps の診断であった。また、盲腸には早期癌の合併が認められた。

術後の経口摂取は良好で、7POD の血清アルブミン値は 3.3 g/dl に改善し、2POM には 4.4 g/dl と著明に改善した。また、体重は増加し、下痢、色素沈着、脱毛、爪甲萎縮はいずれも治癒した。

内科的治療抵抗性 Cronkhite-Canada 症候群に対し、外科的切除が有力な治療法である可能性が示唆された。

18. 外傷性腸間膜損傷により小腸壊死をきたした 1 例
平塚市民病院外科

西 知彦、金井歳雄、坂田道生、
高林 司、中川基人

症例：42 歳男、飲酒後にバイクを運転中、停車しているトラックに衝突し当院救急外来搬送された。来院時、vital は安定、意識レベルは GCS12 点 (E3V3M6) であり、左側頭痛、左胸部痛、左肩関節痛を訴えるも腹部は平坦かつ軟、自発痛、圧痛は意識障害があるため明らかではなかった。頭部 X 線写真で頭蓋骨骨折、頭部 CT で急性硬膜外血腫および外傷性くも膜下出血を認めたため脳外科に入院した。受傷後 12 時間後に 38 度の発熱を認め、受傷後 36 時間後より腹痛を訴え始めた。受傷 60 時間後筋性防御および反跳痛認め、腹部 X 線写真で niveau、腹部 CT 上腹水の所見を認めたため、腹膜炎の疑いで外科転科し開腹手術を行った。開腹所見では腹腔内出血約 100 ml を認め、回腸間膜の一部が断裂していた。その支配域である回盲部より口側約 110 cm の部位に約 40 cm にわたる回腸壊死が認められた。穿孔は認められなかった。壊死部回腸切除術および洗浄ドレナージ術を施行した。切除標本の病理組織学的所見では、回腸の全周性の壊死が認められ、日本外傷学会消化管損傷分類Ⅲa (A,V1) と診断した。術後経過は良好で、頭部外傷も保存的に軽快し、術後第 18 日に退院した。本症例では、アルコール飲酒、頭部外傷、他の部位の疼痛により来院時腹痛を訴えず、また、腸管の穿孔がなく、栄養動脈の末梢分枝の損傷であり出血量が多量ではないために急性期に症状がなかったが、外傷性腸間膜損傷によって小腸血流障害が生じたために遅発性に小腸壊死が引き起こされたと考えられた。腸間膜損傷後に開腹手術が必要となる病態として、急性期の出血、亜急性期の腸管壊死、遅発性の腸管狭窄の 3 つがあるが、腸間膜損傷による亜急性期の腸管壊死は稀であり、検索しえた限りでは自験例を含めて 6 例の本邦論文報告例があった。多発外傷例では、亜急性期に発症する本症例も念頭に置いて診療することが重要と考えられた。

19. Von Recklinghausen 病に合併した gastrointestinal stromal tumor の1例

独立行政法人国立病院機構栃木病院外科

五十嵐高広, 赤津友佳子, 橋本健夫,
田村明彦, 森 光生, 勝又貴夫,
山崎 晋

同内科

上原慶太

今回われわれは腹腔内腫瘍, 敗血症の診断にて開腹手術施行し, 病理組織学的検査により GIST と診断した von Recklinghausen 病患者の1例を経験したので報告する。

【症例】65歳男性, 全身倦怠感を主訴に来院し, 血液検査にて白血球 29,000, Hb7.0, CRP9.57 と著明な炎症と貧血を認め緊急入院した。既往歴, 家族歴に von Recklinghausen 病を指摘されていた。入院後の腹部 CT 検査にて臍前面に不均一に造影される最大径 9 cm の腫瘤性病変を認め, その内部は気泡を含む low density area であったことより腹腔内腫瘍と診断した。上部, 下部消化管内視鏡では腫瘍性病変, 壁外性圧迫像を認めなかった。腹腔内腫瘍, 敗血症の診断で緊急開腹手術施行し, 術中所見により Treiz 靱帯近傍の空腸由来の腫瘍と診断した。肛門側の空腸にも小結節を数個認め, 腫瘍切除, 小腸部分切除施行した。他の腹腔内臓器には腫瘍を認めなかった。腫瘍は肉眼的に充実性病変であり, 内部は壊死して膿瘍を形成し, 小腸と交通していた。病理標本では, 腫瘍は筋層に連続して増殖しており, 紡錘形の腫瘍細胞が種々の方向に交錯していた。免疫染色にて c-kit, CD34 とともに陽性であり, GIST と診断した。核分裂像を 10 視野に 2 個認め, 大きさ, 壊死空洞の存在からも悪性と判断した。現在術後 8 ヶ月経過し, 遠隔転移を認めていない。

【考察】Von Recklinghausen 病に合併した GIST の報告例は自験例を含め 20 例であり, 多発例, 悪性例, 小腸発生例が多く見られた。その病態については不明な点が多く, 更なる症例の集積が望まれる。

20. 腸閉塞を来した虫垂原発内分泌細胞癌の1例

東京歯科大学市川総合病院外科

戸張正一, 青木成史, 正村 滋,
佐藤道夫, 小川信二, 原田裕久,
宮田量平, 安藤暢敏

同臨床検査科

宮内 潤

腸閉塞を契機に発見した, 虫垂原発内分泌細胞癌の1例を経験したので報告する。症例は 62 歳の女性, 主訴は腹痛・嘔吐。画像診断にて, 上行結腸まで進展する盲腸癌に起因する腸閉塞, 上腸間膜リンパ節および大動脈周囲リンパ節転移陽性と診断し, イレウスチューブ留置による腸閉塞症状の改善後, 右結腸切除術を施行した。病理組織学的検査では, 腫

瘍は虫垂を主座とし, 盲腸から回盲弁部にかけて粘膜下を浸潤していた。このため腸閉塞を来したと考えられた。深達度 ss, n (+), stage IV。腫瘍は一部に腺腔形成や粘液癌の像も認められたが, 全体的には分化傾向の極めて乏しい, シート状増殖を示し, 特殊染色の結果も併せ内分泌細胞癌と診断した。術後 8 か月に多発肝転移, 腹膜播種により死亡した。虫垂原発内分泌細胞癌はこれまでに本邦では 1 例の報告をみるのみであり, また腸閉塞症状を来す虫垂癌もまれである。

21. 9 回手術施行した後腹膜脂肪肉腫の一例

けいゆう病院外科

藤村直樹, 嶋田昌彦, 森岡 徹,
松山正浩, 関 博章, 吉津 晃,
安井信隆, 松本秀年, 石川廣記

同病理

里 梯子

目的: 後腹膜脂肪肉腫は比較的稀な疾患だが, 悪性後腹膜腫瘍の中で最も多く, 10~20% を占める。治療には外科的切除しかないが, 後腹膜は surgical margin がとりにくく, 局所再発のコントロールが困難となることが多い。また予後は組織型により, 大きく異なる。今回我々は長期経過をたどり, 16 年間に 9 回手術施行することとなった後腹膜脂肪肉腫の一例を経験したので, その病理組織学的特徴をふまえて報告する。

対象及び方法: 症例は 51 歳, 女性。1989 年 1 月 13 日卵巣癌の診断にて産婦人科にて手術中, 後腹膜腫瘍と判明し, 外科依頼となった。外科にてそのまま腫瘍摘出術を行い, 病理にて liposarcoma と診断された。その後, 局所再発を繰り返し, 1989 年 1 月 13 日から 2005 年 4 月 28 日までに計 8 回の手術を行った。しかし 2005 年 9 月の CT にて臍頭部背側を中心に再び再発を認め, 10 月頃より急激に腹満が強くなったため, 10 月 27 日に 9 回目の手術を施行した。

結果: 術式は腫瘍摘出術+空腸合併切除で, 切除腫瘍総重量は 930 g であった。術後一時的に麻痺性イレウスと創感染を認めたが, 保存的に改善し, 11 月 24 日軽快退院となった。

考察及び結論: 本症例は 16 年間で 9 回の手術を行ったが, 経過とともに粘液型が主体で, 高分化型が混在している組織像から徐々に悪性度が増し, 2005 年 4 月には脱分化型が出現した。脱分化型の 5 年生存率は 28% と報告されており, 今回の手術でも, より脱分化型の組織が占める割合が増加しており, 今後予後が厳しいことが予想され, 長期経過をたどる脂肪肉腫の症例では, その組織型の変化に十分な注意が必要と思われる。

22. 切除不能・再発大腸癌に対する UFT/LV+CPT-11 の併用第1相試験 (KODK7 中間報告)

慶應義塾大学外科

石川真未, 長谷川博俊, 西堀英樹,
石井良幸, 遠藤高志, 岡林剛史,
鶴田雅士, 北島政樹

われわれは切除不能・再発大腸癌に対する UFT/LV+CPT-11 併用時の CPT-11 の最大耐量 (MTD), 推奨用量 (RD) の推定を行う目的で, 併用第1相試験 (KODK7) を行った。対象は PS0-1, 75 歳以下の切除不能・再発大腸癌症例とした。UFT/LV の投与量は本療法の推奨用量である UFT 300 mg/m², LV 75mg/body/day (分3) を3週投与1週休業とし, CPT-11 は第1日目および第15日目に90分で点滴投与した。CPT-11 の開始用量を 60 mg/m²として, 20 mg/m²ずつ増量する計画とした (Level 0,1,2,3,4: 40, 60, 80, 100, 120 mg/m²)。第1コースにおける Grade 4 の血液学的毒性または Grade 3 以上の非血液毒性を DLT と規定し試験を行った。Level 1,2 に6例ずつ Level 3 に3例の登録を行った。Level 1 において1例の DLT (肺塞栓), Level 2 においても1例の DLT (下痢) を認めたがいずれも MTD に達しておらず現在 Level 4 に症例を追加している。Level 1 に1例の PR, Level 2 に2例の PR, Level 3 に1例の PR を認め, 本療法は切除不能・再発大腸癌に対する有望な化学療法となりうると考えられた。

23. SSI に対する創縁保護ドレープの有用性に関する検討

足利赤十字病院外科

入野誠之, 大山隆史, 藤崎真人,
高橋孝行, 平畑 忍, 前田 大,
戸倉英之, 花田英崇, 佐野真規

【目的】手術部位感染 (Surgical Site Infection: SSI) の発症には様々な危険因子が関与し, 一度発症すると 2,3 週間の入院期間の延長をもたらす患者の QOL は著しく損なわれる。今回, 我々は術中に創縁保護ドレープを使用し, SSI 発症に対する有用性を検討した。

【対象および方法】平成 15 年 6 月から平成 16 年 12 月までに当院で施行された開腹手術症例 342 例を対象として, 手術創汚染度により準清潔群, 汚染群及び不潔群の 3 群に分類した。準清潔群は予定手術症例で, 上部消化管手術 117 例, 下部消化管手術 144 例であった。汚染群, 不潔群はいずれも緊急手術症例で, 前者は穿孔を伴わない虫垂炎 63 例, 後者は消化管穿孔 10 例, 虫垂炎穿孔 8 例であった。SSI の診断は CDC ガイドラインに基づき行い, 各カテゴリーにおける創縁保護ドレープの使用の有無と SSI 発症の関係を統計学的に比較検討した。

【結果】手術創汚染群では創縁保護ドレープ使用により SSI 発症は有意に低かった ($p < 0.05$, χ^2 検定)。しかし準清潔群及び不潔群では統計学的有意差は認められず, 手術部位

別検討においても上部, 下部消化管ともに有意差は認められなかった。

【考察および結論】創縁保護ドレープを使用することにより, 穿孔に至っていない急性虫垂炎などの汚染手術症例においては, SSI 発症のリスクを軽減することができると考えられた。しかしながら, 予定の消化管手術や既に感染が成立している症例においては, 直接的な創汚染よりも, その他の因子が SSI 発症に関与していることが示唆された。

24. 術前化学療法後乳房温療法症例の検討

慶應義塾大学外科

高橋洋子, 神野浩光, 菅家大介,
嶋田俊之, 高橋麻衣子, 高山 伸,
池田 正, 北島政樹

同病理診断部

向井萬起男

(背景および目的) 術前化学療法の利点として, 乳房温存率の上昇が挙げられるが, 上昇率は数%である。そこで今回, 術前化学療法後に乳房温存術を施行した症例の特徴を乳房切除術例と比較検討した。

(対象と方法) 1998 年 6 月から 2005 年 10 月の間に当院において術前化学療法後に手術を施行した腫瘍径 3 cm 以上, N0-3 の原発性乳癌患者 128 例を

対象とした。用いたレジメンは weekly paclitaxel: paclitaxel 80 mg/m² を 12 サイクル, docetaxel/CA: docetaxel 60 mg/m² を day 1 に cyclophosphamide 500 mg/m² と doxorubicin 50 mg/m² を day 22 に投与し 6 週間毎 2 サイクル, docetaxel/5'-DFUR: docetaxel 60 mg/m² を day 1 に投与し 5'-DFUR 800 mg/m² を day 1 から 15 まで内服を 3 週間毎 4 サイクルの 3 レジメンであった。

(結果) 128 例全体における奏効率は 68.8% (88 例) であり, 48 例 (37.5%) に乳房温存術が施行可能であった。レジメン別に検討すると docetaxel/5'-DFUR 群において奏効率, 乳房温存率ともに高かった。乳房温存群と乳房切除群を比較したところ温存群では化学療法前後とも有意に腫瘍径が小さく, 奏効例が多かったが, 他の臨床病理学的因子には差を認めなかった。

(結語) 術前化学療法による乳房温存術施行可能性に関する予測因子は腫瘍径と奏効率のみであった。

座長のまとめ—学術講演 (IV) (17 ~ 24)

けいゆう病院外科

安井信隆

演題 17 病巣部の外科的切除により症状の改善した Cronkhite-Canada 症候群の 1 例が報告された。本疾患のほとんどは内科的治療により症状の改善が期待できるが, 外科的切除を選択する場合の適応基準が議論された。

演題 18 交通事故後に遅発性に小腸壊死をきたした外傷

性腸管膜損傷の1例が報告された。血行障害により小腸壊死きたす場合には受傷時に腹部症状の訴えが強くなく、診断の難しさが確認された。

演題 19 Von Recklinghausen 病に合併した GIST の1例が報告された。Von Recklinghausen 病に消化管の神経原性腫瘍が合併することはよく知られているが、近年 GIST の疾患概念が広まり、神経原性腫瘍とされていたものが GIST と診断され、同様の症例報告が最近になり増加している。

演題 20 非常に稀な虫垂原発内分泌細胞癌の1例が報告された。予後が非常に不良で、化学療法にも効果がほとんど認められないことから、治療の難しさが議論された。

演題 21 16年の間に9回手術を施行した後腹膜脂肪肉腫の症例が報告された。繰り返す再発巣の組織像が、次第に脱

分化していく過程が提示され、このような症例は予後が不良なことが報告された。

演題 22 慶應義塾大学外科学教室の腸癌により、切除不能・再発大腸癌に対する UFT/LV+CPT-11 療法の第 I 相試験の成績と今後の展望が報告された。

演題 23 術後の入院期間延長の原因として注目されている SSI に対する予防法は様々な報告がされているが、本演題では創縁保護シートの有用性が検討された。会場からは費用対効果などについての追加検討の要望もあった。

演題 24 慶應義塾大学外科学教室の乳腺癌により、術前化学療法後の乳房温存手術の施行率が報告された。術前化学療法の施行により乳房温存療法が可能となる予測因子が提示された。

学会展望

第 12 回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会

日 時 平成 18 年 1 月 28 日 (土) 14 時～17 時
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 : 20	研究	座長 佐藤 博子
14 : 20～14 : 50	下肢	座長 三鍋 俊春
14 : 50～15 : 00	－休憩－	
15 : 00～15 : 30	乳房	座長 陳 建穎
15 : 30～16 : 00	顔面・その他	座長 佐久間 恒
16 : 00～16 : 50	特別講演「乳房再建の現況」	座長 田中 一郎

14:00~14:20 研究

座長：独立行政法人国立病院機構東京医療センター
形成外科 佐藤博子

1. ノックアウトマウスを用いた MMP-9 及び MMP-13 の
機能解析

慶應義塾大学形成外科

服部典子, 中島龍夫

同整形外科

高石官成

同病理

岡田保典

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase = MMP) は、細胞外マトリックスの代謝に重要な役割を果たしている分子として、近年注目を集め、多くの分野で研究がされている。創傷治癒の場合、重要な役割を果たしているとされているが、どの MMP が、いつ、どのような機序で創傷治癒に関与しているかは、まだはっきりと解明されていない。そこで、マウスにおけるコラゲナーゼ群の MMP-13 とゲラチナーゼ群の MMP-9 のそれぞれのノックアウトマウスを用いて、創傷治癒の実験を行い、上皮化、炎症反応、肉芽形成、血管新生、瘻痕についての解析を行った。MMP-9、MMP-13 ノックアウトマウスでは創傷治癒が遅延し、更にこれらのダブルノックアウトマウスでは、劇的に創傷治癒が遅延した。MMP-9 と MMP-13 ともに keratinocyte での発現を認め、ノックアウトマウスでは上皮化が遅延し、keratinocyte の migration に関与していることが示唆された。炎症反応においては、有意な差を認めなかった。MMP-13 ノックアウトマウスでは、血管新生が抑制されていたことから、MMP-13 が何らかの形で、血管新生に寄与していることが考えられる。現在、その機序を解明中である。

(質疑応答)

Q 中島：MMP 13 が作用するのは血管新生のどの時期か？

A 服部：幼若血管が形成される際に作用すると考えている。

Q 佐藤：どのように臨床応用できるのか。

A 服部：創傷治癒を促進する薬剤になりうる可能性がある。ただしマウスの創傷治癒はヒトに比較して良好すぎる傾向があるので、マウスに置ける結論がすぐにヒトに応用できるとは限らない。ヒトにおける臨床応用にいたるまでにはさらに検証が必要かも知れない。

2. cone beam CT を用いた片側唇裂術後患者の上顎形態と
外鼻変形の研究

：梨状孔縁の陥凹と鼻翼基部の前後位置について

慶應義塾大学形成外科

宮本純平, 永竿智久

中島龍夫, 緒方寿夫

【目的】唇裂患者の梨状孔縁の陥凹は術後外鼻変形の大きな原因のひとつと考えられている。しかし梨状孔縁の陥凹が外鼻形態にあたえている影響ははっきりしていない。

【方法】我々はコーンビーム CT をもちいて、顎裂骨移植前の片側唇裂術後患者 52 人に対して計測を行った。解析は唇顎口蓋裂群と唇顎裂群に分けて行い、梨状孔縁の陥凹の程度とそれに伴う鼻翼基部の前後方向の位置関係を調べた。

結果：全例で患側梨状孔縁は健側と比べ陥凹していた。唇顎口蓋裂群でも唇顎裂群でも梨状孔縁の陥凹が強いほど鼻翼基部は後方へある傾向があった。しかし、骨組織の陥凹にも関わらず患側鼻翼基部は 52 例中 35 例で健側より前方にあった。

【結論】我々の研究では梨状孔縁の陥凹は必ずしも鼻翼基部の陥凹につながっていなかった。適切な口輪筋再建が行われれば、唇裂術後の鼻翼基部の位置は骨陥凹とは独立して保つことができる。加えて唇裂児ではもともと alar crease の形成不全があり、Nasalis をはじめとした筋肉の付着異常のため paranasal triangle も術後に挙上しやすい。このため鼻翼の境界は不明瞭となり、鼻翼が陥凹した印象をあたえていると考えられた。

(質疑応答)

Q 金子：測定の基準点はどのように取ったのか。

A 宮本：患者の体軸に垂直な面で 3D イメージをスライスした。

Q 宮本：どのように鼻翼基部を作成すれば美しくなるのか、質問者(金子)にお聞きしたい。

A 金子：患側の組織が余剰にならないように気をつけている。

(コメント)

谷野：鼻翼基部の正しい位置に糸をかければ適切な鼻翼が作成できると考えている。また、鼻翼の形態を保つために盲目的に骨を梨状孔縁に移植する傾向があるが、田嶋らはこの傾向を強く批判している。私も田嶋の考えは賛成である。

中島：鼻筋の固定のほかに、京都大学の鈴木らが主張しているように、垂直方向に走行する鼻翼下制筋の操作も必要な場合もある。

14:20~14:50 下肢

座長：埼玉医科大学総合医療センター
形成外科・美容外科 三鍋俊春

3. 治療に難渋した足底再建の一例

済生会中央病院形成外科

陳 建穎

【目的】治療に難渋した足底再建を経験したので報告する。

【症例】55 歳、男性。10 歳時に車に轢かれて右足関節以下の複雑骨折を受傷、当時の医者に下腿切断を勧められたが

拒否し、皮膚欠損部の植皮以外は時間をかけて保存的に治癒させた。以後初診時まで補助なしで歩行可能であった。当科初診の 8 年前より足底部に潰瘍が出現したため当科受診。生検したところ扁平上皮癌の診断であったため、治療を開始した。腫瘍から 1 cm 離して踵骨も一部合併切除した後、遊離傍肩甲皮弁にて再建した。術後経過は良好であったが、半年後、外顆部に新たな潰瘍が出現。遊離前外側大腿皮弁移植を行ったが、静脈閉塞のため皮弁は全壊死となった。次に皮膚欠損部に植皮を行ったが生着せず、再度、遊離前外側大腿皮弁移植を行った。

【結果】最終的には創は完治し、現在、日常歩行は問題ない。

【考察】下腿の交通外傷（轢創）後であり、動脈、静脈とも損傷されており、複数回の手術という要素も加え、吻合血管がかなり制約された。患者の職業上、靴が履けるような薄い皮弁での再建をしなければならなかったこと、などが治療に難渋した原因と考えられた。下腿の再建時は recipient vessels の犠牲を最小限にし、静脈潯滞を解消するために、可能な限り動脈の端側吻合や、Flow-through 型の血行再建を行うことが良いと考えられた。

(質疑応答)

Q 貴志：前外側大腿皮弁が静脈血栓のために壊死に陥ったとのことであるが、静脈に関しては術前に検索を行わなかったのか。

A 陳：行わなかった。安全のためには行うべきだったと考えている。

Q 田中一郎：初回手術でももう少し周辺の瘻痕を切除していれば再発を防止することができたのでは？

A 陳：その可能性もある。皮膚科医の意見に従ったが、切除範囲の変更も考慮すべきであった。

(コメント)

三鍋：posterior calf の VAF も有用な選択と思う。

4. アンチトロンビン III 欠乏症が原因と考えられた深部静脈血栓症の 1 例

大田原赤十字病院形成外科

佐久間 恒

アンチトロンビン III はトロンビン、活性化凝固第 X 因子などに対する生理的阻害因子であり、プロテイン C とともに血液凝固制御において重要な役割を果たしている。今回、アンチトロンビン III 欠乏が原因で深部静脈血栓症を繰り返していたと考えられた症例を経験したので、文献的考察を加えて報告する。

症例：22 歳、男性

主訴：左下腿潰瘍

既往歴：右下腿血栓性静脈炎（平成 15 年 2 月）、職業：調理師

家族歴：特記すべきことなし

現病歴：約 2 年前から左下腿内側に色素沈着を認めていた。平成 16 年 12 月、同部位が潰瘍化してきたため、12 月 15 日当科初診となった。外来通院にて軟膏処置、弾性包帯による圧迫療法を行っていたが、1 ヶ月の通院後、来院することなく放置していた。その後徐々に潰瘍が拡大してきたため、平成 17 年 6 月 6 日再診、6 月 8 日入院となった。

入院経過：順行性静脈造影にて 3 本の Cockett 不全交通枝、小伏在静脈の弁不全を認めたため、6 月 21 日、不全交通枝結さつ、小伏在静脈 stripping、分層植皮術を施行した。7 月 10 日より腰部・殿部痛が出現し、下肢まで疼痛が広がってきたため、下肢 CT 施行したところ両側大腿静脈から下大静脈にかけて広範な血栓形成を認めたため下大静脈フィルターを腎静脈分岐部に留置した。また血液検査所見上、AT III 活性の著明な低下（28%）を認めたため、AT III 投与、血栓溶解・抗凝固療法を開始した。凝固亢進状態が改善されたのちに再度 AT III を計測したところ 55% と低値であったことから、自験例は AT III 欠乏症と診断した。

考察：本症は常染色体優性の遺伝性疾患であり、頻度は 600~5000 人に一人とされ、DVT 発症に大きく関与し、外傷、手術、妊娠などを契機に 10~35 歳で血栓症を初発するとされている。自験例は AT III 欠乏による血栓性素因が原因で DVT を引き起こし、立位の長時間による仕事により静脈還流障害がさらに増悪した結果、血栓後遺症として二次的に下腿の交通枝弁不全および皮膚潰瘍が生じたものと考えられた。

(質疑応答)

Q 曾根：アンチトロンビン III は通常術前検査としては検査をしないと思う。なんらかの方法でスクリーニングはできないか。

A 佐久間：検査によるスクリーニングは困難である。家族歴が参考になると考えている。

Q 三鍋：植皮術後、弾性ストッキングを装着していれば血栓形成は防ぐことができたのではないか？

A 佐久間：患者は調理師であり、勤務上立位の時間が長い。したがって保存的予防は困難であったと思う。

5. 静脈血栓塞栓症予防措置に関連した皮膚潰瘍症例の検討

独立行政法人国立病院機構東京医療センター

内川裕美子

同形成外科

佐藤博子、玉田一敬

同 WOC Nurse

山本亜矢

【目的】近年、周術期の静脈血栓塞栓症予防に対する関心

が高まっており、当院でも2年前より予防措置がとられるようになったが、その後、これらに起因すると思われる皮膚障害の症例が形成外科に紹介されるようになった。そこで今回、各症例の臨床経過を検討するとともに、当院における予防措置の現状について調査、検討を行った。

【方法】平成17年7月1日から現在までに当院形成外科に紹介された、静脈血栓塞栓症予防措置に関連した皮膚障害と考えられる症例のうち代表的な2例の経過を提示し、発症に至った経緯とその背景を考察した。また、病棟での予防措置の指示の現状や、予防措置開始後の管理状況を把握すべく、当院研修医と看護師を対象としたアンケート調査を行った。

【結果】検討した症例に共通して見られる背景として、ガイドラインに沿った指示が出ていないことや、予防措置開始後に着用部位の観察が十分に行われていないことが考えられた。アンケートの結果からは、指示を出す医師の知識不足やガイドラインの解釈に個人差が生じていること、着用後の着用部位観察の頻度や観察範囲に看護師による個人差が生じていることが示された。

【考察・結語】周術期における静脈血栓塞栓症の予防措置により皮膚潰瘍が形成されることがあり、その発生には患者の全身状態だけでなく、指示を出す医師の知識不足や予防措置開始後の観察不足という要因も関与していると考えられた。我々は、この現状を院内委員会に報告するとともに医師、看護師の啓蒙活動を行っている。

(質疑応答)

Q 谷野：発表された患者では血管病変はベースになかったのか？

A 佐藤（共同演者）：Yグラフトがなされていたが、本症例で紹介した潰瘍の直接的原因となっていたとは考えにくい。本症例で紹介した潰瘍の原因は、圧をかけた事そのものよりも、加圧装置の金属部分が患者の足に直接当たっていたことが原因である。

14：50～15：00 休憩

15：00～15：30 乳房

座長：済生会中央病院形成外科 陳 建穎

6. Perforator mapping に基づいた自家組織による乳房再建

埼玉医科大学総合医療センター形成外科・美容外科
三鍋俊春, 原科孝雄
慶應義塾大学解剖学
今西宣晶, 相磯貞和
同形成外科
中嶋英雄
杏林大学形成外科・美容外科
波利井清紀
メルボルン大学形成外科

G. Ian Taylor

乳癌術後の乳房再建には人工物（インプラント）または自家組織（皮弁）が用いられる。体内異物となるインプラントに比べて、自家組織はいったん生着すると生涯にわたって安定した質感と形態が得られるというのが最大の利点である。しかし、皮弁血流障害を生ずる可能性が20%程度あり、移植組織の部分壊死により再建乳房の大きさや形態を十分に得られない場合がある。この合併症は想定される範囲内とはいえ、患者や医療側の負担は決して軽いものではなく、是非とも発生率を低減する必要がある。そこで、乳房再建用の皮弁（広背筋皮弁、腹直筋・穿通枝皮弁）採取部の皮膚皮下筋組織の詳細な血管解剖の同定 perforator mapping を解剖実習用新鮮死体の全身血管造影像で行い、そのevidenceに基づいて皮弁の作成し、また移植床においてマイクロサージャリーにより適宜血行を付加した。その結果、治療成績の向上をみたため報告する。

(質疑応答)

Q 井上：動脈・静脈ともにsuper chargeを行うのか。

A 三鍋：両方行っている。

7. Becker型乳房エキスパンダー（永久留置型）による合併症の一経験

埼玉医科大学総合医療センター形成外科・美容外科
三鍋俊春, 原科孝雄
国立病院機構東京医療センター形成外科
佐藤博子
和乃会小倉病院 外科・乳腺外科
足立幸博

症例は、38歳女性、左乳癌患者で、身長146cm体重46kg。乳房下垂を伴うEからFカップのいわゆる巨乳であった。平成15年12月左乳房C領域の7cm大の腫瘍を主訴に乳腺外科を受診。化学療法にて5cmに縮小したところで、平成16年3月胸筋温存乳切+大胸筋下エキスパンダー留置による即時乳房再建を施行した。しかし、術後創部に感染徴候が出現して切開排膿処置が施行され、その際にエキスパンダーが損傷・偏位した。エキスパンダーは除去せず、感染徴候が完全に鎮静し、術後化学療法後に腫瘍の再発のないことを確認した同年7月に再度乳房再建目的で形成外科を再診した。乳房部皮膚の伸展が不良のため、永久留置型乳房エキスパンダー(Becker 35, 290 ml, 幅12.0 cm 高さ10.5 cm)により一回の手術(8月施行)で乳房再建を図った。しかし、術後2週ごろより、再度乳房頂部に限局的発赤を生じ始め、6週に皮下膿瘍を認めたため切開排膿を施行、エキスパンダーが露出した。感染が遷延するため、術後10週でエキスパンダーの除去を余儀なくされ、径5cm大の胸部皮膚潰瘍を生じた。なお、放射線治療は行っていない。本患者は、体型の

わりにきわめて大きな乳房、術前・術後化学療法、初回術後感染、シリコンアレルギーの可能性、形成外科受診頻度が少ないなど、人工物による乳房再建への影響因子が考えられた。

(コメント)

岩平：写真を拝見すると、乳腺切除の際に皮膚を薄く残しすぎたように思える。また、エキスパンダー挿入とインプラント挿入の間隔が短すぎたのではないかな？

コメント(谷野)：岩平先生の意見に同感である。最低でも2回の手術間隔を、1年間は空けるべきであったと考えている。

8. 急速進展型乳房外ページェット病の1例

東海大学外科学系形成外科

鈴木沙知, 今川孝太郎,
宮坂宗男, 谷野 隆三郎

【はじめに】乳房外ページェット病の多くは進展が緩やかで、表皮内にとどまることが多く、この場合、切除にて完治が見込まれる。しかし、浸潤癌へと進行したケースでは予後が悪いとされており、臨床的に注意が必要な疾患である。また、一部の症例で、原発巣は小型で、腫瘤形成もないが、初診時にすでにリンパ節や遠隔転移を生じている急速進展型が存在する。今回我々は、この急速進展型と考えられる症例を経験したので報告する。

【症例】77歳、男性。3年ほど前より左陰茎基部の小皮疹あり、平成15年1月より左下肢の浮腫が出現し、当院へ紹介受診となった。同年3月当院にて生検を行い、乳房外ページェット病の診断を得た。同年4月1日に広範囲切除、左浅鼠径リンパ節郭清を施行した。浅鼠径リンパ節13/13の転移を認めた。5月16日に左骨盤内リンパ節郭清(外腸骨リンパ節7/7、総腸骨リンパ節1/1に転移)を施行し、左鼠径、骨盤、大動脈周囲に放射線治療を行った。7月22日に右鼠径、骨盤リンパ節に転移が疑われ、郭清術を行った(鼠径3/11、外腸骨1/6)。以後、経過観察となったが肺転移が認められ、平成16年4月(初診後13ヶ月)死亡した。

【考察】乳房外ページェット病の発生病理は不明な点が多く、また、進行期症例に対する化学療法も有効なものがない現状である。近年の報告では腫瘍細胞がアンドロゲン受容体を発現しており、発癌に関連しているとするものや、自験例のような急速進展型、浸潤癌において癌遺伝子のerbB-2が高率に発現していることが報告されており、進行の予測に役立つ可能性があるといわれている。今回我々は、乳房外ページェット病には自験例のような、急速進展型が存在し、临床上、注意が必要と痛感した症例を経験したので報告した。

(質疑応答)

Q 曾根：真皮内に浸潤していたのであれば Paget 病ではなく、Paget 癌ではなかったのか。

A 鈴木：定義的にはそのように考えられる。

15:30~16:00 顔面・その他

座長：大田原赤十字病院 形成外科 佐久間 恒

9. 小児例にたいする顔面神経麻痺動的再建術
— 頬筋神経に神経縫合した遊離広背筋弁による —
国立成育医療センター形成外科

清水雄介, 金子 剛, 三浦麻由佳

先天性の顔面神経麻痺に対する治療は、患児の健全な社会生活と精神発達を助けるために小児期に行うことが望ましい。しかしながら現在のところ標準的な手術法はない。

我々は今回6歳4ヶ月の男児に遊離広背筋弁移植による動的再建を行い、運動神経として同側の頬筋神経を選択したところ、術後2ヶ月で移植筋の収縮が得られた。本法は必ずしも新しい方法ではないが、移植筋の収縮が速やかに得られる点は特筆に値し、小児では成人例で問題となるジスキネジアも少ないとされており、小児に適した再建法と思われる。

症例を供覧し若干の文献的考察を加えて報告する。

(質疑応答)

Q 大城：顔面神経麻痺になってどのくらい経過したのか。

A 清水：先天性である。

Q 谷野：成長の過程で神経麻痺の程度には変化はなかったのか？

A 金子(共同演者)：一貫して完全麻痺が存在していた。

Q 田中一郎：手術年齢を6歳に設定したのはなぜか？

A 金子：術後のリハビリが円滑に行える年齢まで待機する必要があると考えたからである。

Q 三鍋：反対側の顔面神経を使用しない積極的理由があるのか？

A 金子：反対側に、再建に適切な顔面神経が発見できることは実際には少ない。少なくとも、本手術においては良好な吻合条件を有する咬筋神経が同定できたので術式の選択は成功であったと考えている。

10. 自己硬化型人工骨(バイオベックス・)

と眼窩再建用アバタイトによる陳旧性眼球陥凹の治療
— カテーテルバルーンを用いた眼球陥凹修正シミュレーションの有用性 —

慶應義塾大学形成外科

緒方寿夫, 宮本純平,
小林尚史, 中島龍夫

【目的】頬骨骨折後の陳旧性眼球陥凹の修正には、人工補填剤がしばしば用いられ、補填剤の選択、補填方法、量、部位などさまざまな報告がある。今回、補填剤の留置量予測と留置法に若干の工夫を行ったので報告する。

【方法】症例は23歳女性。21歳時に頬骨骨折にて観血的整復固定手術を受けたが眼窩容積の拡大による眼球陥凹が残存した。睫毛下縁切開による眼窩アプローチにより、眼窩下壁および内外側剥離し、同部骨膜下にバルーンを留置した。生食注入によるバルーン expansion によって眼球陥凹改善状況をシミュレーションすることで修正に必要な眼窩内補填量を予め把握した。同部に眼窩床再建用アパタイト (セラタイト®) を留置しその下面に自己硬化型人工骨 (バイオベックス®) を必要量注入した。

【結果】再建眼窩床の形態はセラタイト・によって規定し、眼球陥凹修正に必要な補填量をバイオベックス・によって充填することで、再建床の良好な形態と眼球陥凹改善が得られた。術中バルーンの利用は、必要な補填剤の量と安全性を予測でき、良好な眼球陥凹修正と手術時間の短縮をもたらした。

【考察】頬骨骨折変形治癒に伴う陳旧性眼球陥凹の修正は、健側と同様の眼窩形状を再建することが理想ではあるが実際には容易でない。そのため症例に応じて、補填剤で眼窩容積を縮小させる方法が行われ、自己硬化型人工骨は任意の量を補填できる利点がある。本手技は、補填量の決定を容易にし、良好な再建眼窩床形態を得られる利点があり有効な方法と考えられた。

(質疑応答)

Q 佐藤：アパタイトを挿入する際に、下眼窩神経はどのように処理したのか。

A 緒方：下眼窩神経は最初から切れていた。

Q 金子：丸いバルーンで容積の正確な予測ができるのか？

A 緒方：容積測定にはさまざまな方法が報告されている。平たい容積測定器を使用した報告もある。

Q 三鍋：自家骨を使用して眼窩下壁を再建することは考えなかったのか？

A 緒方：自家骨を使用するには欠損の大きさが大きすぎたと思う。

(コメント)

谷野：自家骨を使用するのであれば肋軟骨が良好な成績が得られる。腸骨は吸収されるから、使用しないほうが良い。

11. 短鼻症に対する手術治療

名古屋形成クリニック

上 敏明, 長谷川 時生

近年、美容外科、形成外科の普及により、一般の人が鼻の形態の細部まで気にし、その治療を希望して我々形成外科医の門をたたく機会が増えている。

最近、我々は鼻が短い、いわゆる短鼻症に対し、手術を行ない良好な結果を得たので報告する。

①先天的に鼻が短いと気にし、鼻の孔が見える、あぐらをかいた鼻となっているなど整容上の改善を望む症例。②数次

に及ぶ鼻形成手術を受け、その結果として鼻背部に癒痕形成をきたし、鼻尖部が頭側へ移動し短鼻症となった症例などが今回経験した症例である。

これらに対し、大鼻翼軟骨や鼻中隔に切開を入れ、鼻尖を尾側へ移動して鼻の延長をはかった。組織欠損部には助軟骨や耳甲介軟骨の移植を行った。

本報告では手術法の詳細と若干の検討を述べるつもりである。

(コメント)

谷野：肋軟骨を入れる向きは水平より垂直の方が良いと考えている。

(コメント)

原科：肋軟骨を使用する部位を工夫すれば術後の変形を防止することができる。

12. 有毛性母斑細胞母斑の治療法の工夫

—キュレタージュ手術とレーザー治療の病診連携—

慶光会大城クリニック

佐々木克巳, 藤井俊史, 大城貴史

日本レーザー研究所

大城俊夫

慶應義塾大学形成外科

貴志和生, 中島龍夫

当院では1975年のクリニック開設以来、母斑細胞母斑の治療に取り組んできた。約30年間で3209例を経験してきたが、79.1%の症例が10才を過ぎてから来院するためレーザー単独の治療では、限界がみられる症例もある。一方慶應義塾大学形成外科では、8年前より生後2ヶ月までの有毛性母斑細胞母斑に対し積極的にキュレタージュ手術を行い、成果を上げている。しかしながらキュレタージュ手術自体は生体に対する侵襲が大きく、更に生後2ヶ月から6ヶ月以内に行われるため基本的に手術は1回しか出来ないとされている。更に部位に依っては、治療後の肥厚性癒痕を生じることがあり十分に掻爬出来ない場合がある。当院は、慶應義塾大学形成外科と連携を図りキュレタージュ後に残った有毛性母斑細胞母斑の治療を複数のレーザーで行っている。症例を供覧し治療の有効性について報告したい。

(質疑応答)

Q 陳：キュレタージュ後再発した場合に、Qスイッチのほかにアレックスレーザーも初期の段階から使用した方がよいのか？

A 佐々木：いかなるレーザーを使用するかということよりも、初回キュレタージュ手術の際に、必要十分な範囲を切除することが必要だと思う。

Q 清水：生後2ヶ月以前で、キュレタージュ手術を行わずにUCO2レーザーとQスイッチルビーレーザーを使用するという選択はありえないのか。全身麻酔が不要というメリット

があると思うが、

A 佐々木：全身麻酔を使わないでレーザー治療を行うと、深度が一定しないので熱傷状態を作り出す可能性もあり、危険である。

16:00~16:50

特別講演「乳房再建の現況」

座長：慶應義塾大学形成外科 田中一郎
医療法人社団プレストサージャリクリニック
院長 岩平桂子

昨今、本邦においても乳癌の増加に伴い乳房再建の需要も増加している。

マスコミの医療話題の氾濫やインターネットの普及により、患者の医療に対する姿勢も変化し、再建に対しても事前に多くの知識を準備して受診する患者も少なくない。患者の多くの要望は①体にこれ以上傷を増やしたくない、②家庭、仕事に支障がないように再建したいという二つが圧倒的で、これを集約すると「人工物による日帰り手術」が理想とされる。これに対して多くの医療施設では、乳癌手術が縮小化されて人工物による再建が可能であっても、腹直筋皮弁などの自家組織による再建を勧める傾向があり、当然のことながら入院、2週間以上の運動や生活制限が必要となっている。

一方演者がティッシュエキスパンダーの治験に参加し認可を受けてから既に10年過ぎた。その後品質、材質改善がなされたにもかかわらず、いまだに旧来のエキスパンダーが頻用されているのは、厚生労働省の医療行政のハードルの高さを言い訳にした業者の怠慢とともに医師側の意識の低さに他ならない。

演者は2003年4月から乳房再建専門のクリニックを開業し、人工物による日帰りの再建手術のみを行ってきた。患者

の内訳をみるとマスコミ、患者間の情報で来院した患者が半数以上を占め、また他院で「自家組織」と言われて再建自体を諦めていた患者も少なくない。開業以来約600例の再建を終了しているが、社会保険制度に頼る医療のみを本当に患者が求めているかというところでもないことがわかる。

医療側、患者側の両面からみた『乳房再建の現況』について報告したい。

特別講演（質疑応答）

Q 三鍋：一回使用したシリコンは再使用できるか？

A 岩平：使用していない。サンプルとして使用している。

Q 三鍋：乳頭は上側に移動することが多いが、皮下茎皮弁以外にコンポジットグラフトはだめか？

A 岩平：コンポジットグラフトは立体感に欠ける印象がある。

Q 貴志：4分の1切除ではシリコンによる再建は困難ではないか？

A 岩平：2分の1以上乳腺が切除されている症例が適応と考えている。4分の1切除では自家組織が良いと思う。

Q：貴志：大胸筋の下にインプラントを入れると動きは気にならないか？

A 岩平：大きな問題にはならない。

（コメント）

（谷野）：大胸筋の肋骨への付着部を切断すれば動きの問題は解決できる。

Q 金子：保険の問題にはどのように対応しているか、

A 岩平：自費で行っている。混合診療にすることを希望している。エキスパンダーは患者個人で購入してもらえることが望ましいと考えている。

慶應医学学会平成17年度庶務・会計報告

平成18年2月15日(水)慶應義塾大学病院新棟11階第五会議室において17時より理事会・評議員会が開かれ、平成17年度庶務・会計決算報告ならびに平成18年度予算が承認された。

承認事項は下記の通りである。

○会費：年額5,000円(ただし、無給教員と大学院生は3,000円)

○平成17年度庶務報告(平成17年1月1日～12月31日)

会 員：2,737名(学内854名,学外1,873名,海外10)

物故会員：計7名

総 会：(第85回)平成17年11月11日(金)15時開会

シンポジウム『医療提供体制の改革』を開催した。入場者数約150名

例 会：56回(平成17年1月1日～12月31日)

理事会・評議員会：平成17年2月14日(月)＜平成16年度決算報告＞

平成17年10月31日(月)＜平成17年度中間報告＞

編集会議：年6回開催

雑 誌：『慶應医学』第82巻1号～4号まで発刊

○平成18年度事業計画(平成18年1月1日～12月31日)

1) 学術雑誌『慶應医学』編集発行

2) 慶應医学学会総会(平成18年11月10日予定)

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

4) 理事会・評議員会,毎年2回(中間報告・決算報告)開催

5) 定例編集会議,必要に応じて開催

○平成 17 年度会計決算報告（平成 17 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

収入の部				支出の部			
勘定科目	予算(A)	実績(B)	差額(B)-(A)	勘定科目	予算(A')	実績(B')	差額(B')-(A')
補助金収入	1,600,000	1,600,000	0	原稿費	900,000	477,773	△ 422,227
会費収入	10,500,000	11,009,000	509,000	査読費	250,000	288,881	38,881
広告料収入	600,000	512,720	△ 87,280	論文掲載補助費	840,000	1,170,000	330,000
掲載料収入	5,000,000	7,711,611	2,711,611	業務委託費	1,535,000	1,534,627	△ 373
雑収入	50,000	188,539	138,539	印刷費	9,000,000	10,978,678	1,978,678
仮受金*1		64,000		発送費	940,000	1,201,370	261,370
				会議費	35,000	33,005	△ 1,995
				学会費	2,300,000	1,598,946	△ 701,054
				事務費	900,000	868,041	△ 31,959
				備品費	50,000	0	△ 50,000
				予備費	1,000,000	0	△ 1,000,000
当期収入合計	17,750,000	21,085,870	3,335,870	当期支出合計	17,750,000	18,151,321	401,321
前期繰越額	25,567,694	25,567,694	0	当期収支差額	0	2,934,549	2,934,549
収入合計	43,317,694	46,653,564	3,335,870	次期繰越収支差額	25,567,694	28,502,243	2,934,549

* 1 KJM 会費・慶應医学会会費誤請求入金分

○平成 18 年度予算（平成 18 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

収入の部			支出の部		
勘定科目	平成 16 年度予算	平成 17 年度予算	勘定科目	平成 16 年度予算	平成 17 年度予算
補助金	1,600,000	1,600,000	原稿費	900,000	900,000
会費収入	10,500,000	10,100,000	査読費	250,000	250,000
広告料収入	600,000	500,000	論文掲載補助費	840,000	840,000
掲載料収入	5,000,000	5,500,000	業務委託費	1,535,000	1,535,000
雑収入	50,000	50,000	印刷費	9,000,000	9,000,000
			発送費	940,000	940,000
			会議費	35,000	35,000
			学会費	2,300,000	2,300,000
			事務費	900,000	900,000
			備品費	50,000	50,000
			予備費	1,000,000	1,000,000
当期収入計	17,750,000	17,750,000	当期支出計	17,750,000	17,750,000
前期繰越収支差額	26,104,446	25,943,979	次期繰越収支差額	26,104,446	25,943,979
合計	43,854,446	43,693,979	合計	43,854,446	43,693,979

* 平成 18 年度収入の部の前期繰越収支差額は決算見込み数字とする。

○慶應医学会役員

(任期：平成17年1月1日～平成18年12月31日)

会 長 池田 康夫
理 事 相磯 貞和 (副会長)
岡田 保典 (会計担当)
末松 誠 (渉外担当)
戸山 芳昭 (総務担当)
監 事 鹿島 晴雄
村井 勝
編集委員 林 松彦 (編集委員長)
上田 政和
梅澤 明弘
斎藤 英胤
村田 満
村松 太郎
饗庭 了

○評議員

(任期：平成17年1月1日～平成18年12月31日)

小川 聡
小林 紘一
末舛 恵一
武田 純三
比企 能樹
矢部 裕

○慶應医学会会則 (昭和59年11月改訂)

第1条：本会は慶應医学会と称する。
第2条：本会の目的は医学の進歩と啓発を図るにある。
第3条：本会は慶應義塾大学医学部の出身者、関係者な

らびに本会の目的に賛同する医師およびその他の者で組織する。

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

第5条：本会に監事2名を置く。監事は会長が指名し、任期は2年とする。

第6条：本会に評議員若干名を置く。評議員は会長が委嘱し、任期は2年とする。

第7条：本会の事務所は慶應義塾大学医学部に置く。

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

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

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

第11条：本会の会計年度は毎年1月1日から始まり、同年12月31日に終る。

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

第13条：本会則は総会の決議を経なければ変更することが出来ない。

雜 報

慶應医学会例会第 1450 回

日 時 平成 17 年 12 月 20 日 (火) 午後 5 時
 場 所 新棟 11 階臨床講堂兼大会議室
 演 題 Cell migration and malformations of the CNS
 演 者 Jeffrey Golden, MD
 Associate Professor, Developmental Neuro-
 pathology, Children's Hospital of Philadelphia,
 University of Pennsylvania, Philadelphia, PA,
 USA
 担 当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1451 回

日 時 平成 18 年 1 月 12 日 (木) 午後 6 時 30 分
 場 所 新教育研究棟 4 階 講堂 3
 演 題 Human T Lymphotropic Viruses (HTLVs) :
 Clinical Features and Pathogenic Properties
 演 者 William W. Hall, MD, PhD
 Vice President and Professor, Centre for
 Research in Infectious Diseases, School of
 Medicine and Medical Science, University
 College Dublin, Dublin, Ireland
 担 当 内科学教室 (消化器)

慶應医学会例会第 1452 回

日 時 平成 18 年 1 月 24 日 (火) 午後 6 時 00 分
 場 所 総合医科学研究棟 1 階 ラウンジ
 演 題 Intestine-specific transcription factors regulate
 proliferation and cell-cell adhesion by modula-
 tion of beta-catenin function
 演 者 John P. Lynch, MD, PhD
 Assistant Professor of Medicine, Division of
 Gastroenterology, University of Pennsylvania,
 Philadelphia, PA, USA
 担 当 内科学教室 (消化器)

慶應医学会例会第 1453 回

日 時 平成 18 年 1 月 30 日 (月) 午後 5 時 30 分
 場 所 総合医科学研究棟会議室 4
 演 題 ①Allogeneic Stem Cell Transplantation for
 Chronic Myelogenous Leukemia(CML) in the
 Imatinib Era
 ②Molecular Mechanisms and Practical
 Management of Imatinib Resistance in Chronic
 Myeloid Leukemia
 演 者 ①Richard T. Maziarz, MD
 Professor of Medicine, Oregon Cancer Institute,

Oregon Health & Science University, Portland,
 OR, USA

②Dong-Wook Kim, MD, PhD
 Associate Professor, Department of Hemato-
 logy, Uijeongbu St.Mary's Hospital, The
 Catholic University of Korea, Seoul, Korea

担 当 内科学教室 (血液)

慶應医学会例会第 1454 回

日 時 平成 18 年 1 月 30 日 (月) 午後 6 時 00 分
 場 所 講堂 1 (新教育研究棟 2 階)
 演 題 Immunological and Non-Immunological Risk
 Factors in Renal Transplantation
 演 者 Susan V. Fuggle, DPhil, FRCPath
 Director of Clinical Transplant Immunology,
 Oxford Transplant Centre, Churchill Hospital,
 Oxford, UK
 担 当 泌尿器科学教室

慶應医学会例会第 1455 回

日 時 平成 18 年 1 月 30 日 (月) 午後 6 時 30 分
 場 所 総合医科学研究棟 1 階 ラウンジ
 演 題 Genetics of Sudden Cardiac Death
 演 者 Ramon Brugada, MD, FACC
 Associate Professor of Medicine, Canadian
 Research Chair Genetics of Arrhythmias,
 University of Montreal, Director of Clinical
 Cardiovascular Genetics Center, Montreal
 Heart Institute, Montreal, QC, Canada
 担 当 法医学教室

慶應医学会例会第 1456 回

日 時 平成 18 年 2 月 23 日 (木) 午後 6 時 ~ 午後 7 時
 場 所 新教育研究棟 4 階 講堂 3
 演 題 Imaging of brain microcirculation and trans-
 planted adult stem cells
 演 者 Jacques Seylaz, MD, PhD
 Director Emeritus of Research at CNRS,
 INSERM U689 at the University PARIS 7,
 France
 担 当 内科学教室 (神経)

慶應医学会例会第 1457 回

日 時 平成 18 年 3 月 3 日 (金) 午後 6 時
 場 所 総合医科学研究棟 1 階 ラウンジ
 演 題 Immune control of matrix metalloproteinases

and ulcer formation in inflammatory bowel disease
演者 Thomas T MacDonald, BSc (Hons), PhD,
FRCPATH, FMedSci
Dean for Research and Professor of
Immunology, Institute of Cell and Molecular
Science, Barts and The London, Queen Mary's
School of Medicine and Dentistry, London, UK
担当 内科学教室 (消化器)

慶應医学会例会第 1458 回

日時 平成 18 年 3 月 7 日 (火) 午後 6 時
場所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ
演題 ADAMTS proteases and molecular networks in
extracellular matrix
演者 Suneel S. Apte, MD, PhD
Biomedical Engineering (ND20), Cleveland
Clinic, Cleveland, OH, USA
担当 病理学教室

慶應医学会例会第 1459 回

日時 平成 18 年 3 月 8 日 (水) 午後 6 時
場所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ
演題 Role of Smad and p38 MAPK Signaling
Pathways in Regulation of Invasion of Head
and Neck Squamous Carcinoma Cells
演者 Veli-Matti Kahari, MD, PhD
Department of Dermatology and Venereology,
University of Turku
Turku University Central Hospital, Finland
担当 病理学教室

慶應医学会例会第 1460 回

日時 平成 18 年 3 月 10 日 (金) 午後 7 時
場所 講堂 3 (新教育研究棟 4 階)
演題 上位頸椎の再建手術
演者 Chao Wang
Professor of Orthopaedic Department, Peking
University Third Hospital, Beijing, China
担当 整形外科学教室

慶應医学会例会第 1461 回

日時 平成 18 年 3 月 13 日 (月) 午後 6 時 30 分
場所 北里講堂
演題 "Benefits of Medical Research - Now and in the
Future" -*Helicobacter pylori*; the discovery
story and Japanese connections with the future
perception on implications to the wider scientific
community-

演者 2005 年 ノーベル医学生理学賞受賞者
Barry J. Marshall 教授
University of Western Australia
(2002 年 第 7 回慶應医学賞 受賞)
担当 内科学教室 (消化器)

慶應医学会例会第 1462 回

日時 平成 18 年 3 月 16 日 (木) 午後 6 時
場所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ
演題 MMPs in Tissue Injury and Repair
演者 Jeanine D'Armiento, MD, PhD
Assistant Professor, Associate Dean for Gender
Equity and Faculty Development, Columbia
University, New York, USA
担当 病理学教室

慶應医学会例会第 1463 回

日時 平成 18 年 3 月 27 日 (月) 午後 7 時
場所 新棟 11 階 中会議室
演題 The Role of Transgenic Animal Models in
Providing Rationale for Beta Adrenergic
Receptor Blockade Therapy in Heart Failure
演者 Stephen F. Vatner, MD
The Cardiovascular Research Institute,
Department of Cell Biology and Molecular
Medicine, University of Medicine and Dentistry
New Jersey, New Jersey Medical School, USA
担当 内科学教室 (呼吸・循環器)

慶應医学会例会第 1464 回

日時 平成 18 年 3 月 22 日 (水) 午後 6 時 30 分
場所 新棟 11 階 大会議室
演題 The Ethics of Research and the Growth of
Bioethics in the United States
演者 ①Jeffery Kahn, PhD
Professor of Medicine and Director, Center for
Bioethics, University of Minnesota
②Anna C. Mastroianni, JD, MPH
Assistant Professor, University of Washington
Schools of Law and Medicine
担当 医学教育統轄センター

慶應医学会例会第 1465 回

日時 平成 18 年 4 月 3 日 (月) 午後 6 時
場所 孝養舎 2 階 マルチメディアカンファレンスル
ーム
演題 The White Coat Ceremony and the Fostering
Humanism in Medicine
演者 Arnold P. Gold, MD

Professor of Clinical Neurology and Pediatrics,
Columbia University, President of The Arnold
P. Gold Foundation, Eaglewood Cliffs, NJ, USA

担 当 医学教育統轄センター

慶應医学会例会第 1466 回

日 時 平成 18 年 4 月 6 日 (木) 午後 7 時

場 所 中央棟 5 階 カンファレンスルーム

演 題 Molecular Pharmacology of T-type Calcium
Channels

演 者 Edward Perez-Reyes, PhD

Department of Pharmacology, University of
Virginia, USA

担 当 内科学教室 (呼吸・循環器)

慶應医学会における個人情報の取扱いについて

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

1.個人情報の利用目的

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

2.個人情報の取得方法

慶應医学会では、以下の方法で会員の皆さまの個人情報を取得しております。

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

3.個人情報の第三者への提供

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

4.個人情報の適切な管理

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

以上

『慶應医学』投稿規定

本誌は原著論文、学位申請論文、綜説、講座、シンポジウム、症例報告あるいは座談会の記録、学会または研究会の抄録、話題、雑報などを掲載します。原著論文は、その内容が過去に他誌に掲載されたり（ただし、抄録のみの掲載は該当しない）、あるいは現在投稿中もしくは掲載予定でないものに限ります。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ます。掲載の採否は編集委員会にて決定し、採用となった場合は速やかに掲載証明書を発行し掲載巻号を通知いたします。

原稿はオリジナルとコピーを一部ずつ下記あてに届けて下さい。

〒160-0016

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

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9：00～午後 5：00

(土曜日は受付をしません)

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

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

論文原稿の作成上の注意

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

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

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

3. Key Word 英語を原則とし Index Medicus の subjects にあるもので、5 項目以内を留意する。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）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、A 4 判の紙に貼付する。特に大きさや配置に希望のある場合は明記すること。原寸大として図に書き込まれている字の大きさは、最低 1.5 mm の高さが必要である。これ以下の大きさは印刷不可。

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

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

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

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

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

1) O'Connor M and Woodford FP : Writing scientific papers in English, *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へ申請されたい。これらの場合（印刷中、印刷済み）には、当該論文の一部あるいは全部が、学位申請者の学位申請論文として使用されることにつき、共著者の承認が必要である。この書式も編集部へ申請されたい。ただし、学位申請者がファーストオーサーでない場合には、学位申請者がその論文の主たる貢献者であることを証明する共著者の署名も必要である。これらの書類への記入はできる限り手書きを避けること。

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

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

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

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

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

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

なお、ご不明の点については事務局に問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

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

編集後記

研修医制度の改革に伴って各科の新入局者の数や志向が大きく変わったとの声をよく聞きます。今後 medical science の担い手となっていく彼らの動向を、慶應医学の内容にも反映させるようにする必要を感じています。

(饗庭 了)

編集委員 (◎副会長, ○理事)

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

平成 18 年 6 月 18 日 印刷

平成 18 年 6 月 25 日 発行

編 集 者 池 田 康 夫

発 行 者

印 刷 所 学術図書出版株式会社

電話 (3948) 7516 番

印 刷 者 富 田 進

発 行 所 慶 應 医 学 会

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

慶應義塾大学医学部企画室

電話(3353)1211(大代)内線64023

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

複写される方へ

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

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

著作物の転載・翻訳のような、複写以外の許諾は、直接本会へご連絡下さい。

アメリカ合衆国における複写については、次に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA
Phone 1-978-750-8400 FAX 1-978-646-8600

Notice about photocopying

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

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)
6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan
TEL: 81-3-3475-5618 FAX: 81-3-3475-5619 E-mail: naka-atsu@mju.biglobe.ne.jp

In the USA Copyright Clearance Center, Inc.
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA
Phone: (978)750-8400 FAX: (978)750-4744

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

慶應医学 第83巻第2号別頁
平成18年6月25日

学位論文

慶應医学会

学位論文

女性性器癌細胞における β 1, 4-ガラクトース転移酵素の発現と
その細胞生物学的特性におよぼす影響

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

やま した ひろし
山 下 博

(平成 17 年 2 月 17 日受付)

Key Words : β -1, 4-galactosyltransferase, ovarian cancer, endometrial cancer, metastasis, cell adhesion

β 1, 4-ガラクトース転移酵素 (以下 β 1, 4-GT) は, N-アセチルグルコサミンにガラクトースを β 1 \rightarrow 4 結合させる糖転移酵素であり, ラクト系列 II 型糖鎖と呼ばれている糖鎖群の合成に関与している. 一方, β 1, 3-ガラクトース転移酵素 (以下 β 1, 3-GT) は, N-アセチルグルコサミンにガラクトースが β 1 \rightarrow 3 結合する反応を触媒しており, ラクト系列 I 型糖鎖と呼ばれる糖鎖群の合成に関与している. I 型, II 型糖鎖には, 血液型糖鎖抗原やシアリル Lewis 系の各種の腫瘍マーカー抗原がある. 一般に I 型糖鎖を多く発現している癌は, II 型糖鎖を多く発現している癌に比べ予後が良いことが知られており, 女性性器癌においても一般的に予後良好である子宮体癌においては β 1, 3-GT 活性は高いが, β 1, 4-GT の活性は低く, 予後不良である卵巣癌においては逆に β 1, 4-GT の活性は高く, β 1, 3-GT 活性は低いことを我々は明らかにしてきた^{1), 2)}.

血清中の β 1, 4-GT 活性は種々の癌患者において非癌患者よりも高いことが報告されており^{3), 4)}, 我々が卵巣癌患者の腹水より分離同定した β 1, 4-GT の isoform である GAT (galactosyltransferase associated with tumor) は卵巣癌に対する腫瘍マーカーとして現在広く臨床応用されている⁵⁻⁸⁾. また, SCC 抗原 (Squamous cell carcinoma related antigen) がセリンプロテアーゼ阻害活性を有すること⁹⁾や CA19-9 (Carbohydrate antigen 19-9) や SLX (Sialyl lewis X) が e-セレクトインのリガンドとしての機能を有し大腸癌の血行性転移

と密接な関係があることが報告され^{10), 11)}, 腫瘍マーカー分子そのものが癌の細胞生物学的特性に深く関与していることが明らかになっている. SLX は GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β 1 - 分岐側鎖にガラクトースと GlcNAc が交互に結合したポリ-N-アセチラクトサミン (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow). や, 糖脂質 nLc, セラミド (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc-Cer) といった構造の上に発現しており, 合成に β 1, 4-GT が関与していることより, β 1, 4-GT は癌の浸潤や転移といった細胞生物学的特性に関与していると予想される. この蛋白は, 他の糖転移酵素と同様にゴルジ体に膜結合型蛋白として存在するが, 細胞膜表面にも存在し, 細胞間あるいは細胞・細胞外基質間の接着因子としての機能も有するという報告も過去にはみられたが^{12), 13)}, 最近では精子表面の β 1, 4-GT と卵子の透明帯蛋白である ZP3 との接着に関する報告のみがみられており, 体細胞あるいは腫瘍細胞に関する報告はみられない. 精子表面に発現する β 1, 4-GT の働きについても接着に関与するというよりも尖体反応を惹起する分子として報告されており, 接着分子としては否定的な見解を示している報告もある^{14), 15)}.

本研究においては, 以上の背景を踏まえ, β 1, 4-GT が女性性器癌細胞においてどのような細胞生物学的特性に関与しているのかを明らかにするために, (1) β 1, 4-GT の発現が少ない子宮体癌細胞株に当該遺伝子を導入し, 過剰発現させることにより β 1, 4-GT 高発現株を

本論文は, Yamashita H, Kubushiro K, Ma J, Fujii T, Tsukazaki K, Iwamori M, Nozawa S : Alteration in the metastatic potential of ovarian cancer cells by transfection of the antisense gene of β -1, 4-galactosyltransferase. *Oncol Rep.* 10(6) : 1857-62, 2003 の一部を含む.

作成し、過剰発現による細胞特性の変化の有無を検討した。

(2) $\beta 1, 4$ -GT の発現量の多い卵巣癌細胞において本酵素がどのような細胞生物学的な特性に関与しているのかを検討するために、アンチセンス遺伝子を導入し $\beta 1, 4$ -GT 低発現株を作成し、当該遺伝子の発現抑制が卵巣癌細胞に与える影響につき *in vitro* および *in vivo* において検討した。

方 法

1. 遺伝子導入

pCAGGS 発現ベクターに挿入された full length のヒト $\beta 1, 4$ -GT cDNA (米国 Burnham 研究所 Michiko N. Fukuda 博士より御供与)¹⁶⁾ (第1図) を子宮体癌細胞株である SNG-M¹⁷⁾ に、また後述する方法で作製された $\beta 1, 4$ -GT のアンチセンス cDNA を卵巣明細胞腺癌株である RMG-II¹⁸⁾ にリポフェクション法を用いて導入した。親株を 35 mm ディッシュに 1.5×10^5 個撒き 18 時間前培養した。無血清 DMEM で洗浄後、 $10 \mu\text{g}$ $\beta 1, 4$ -GT cDNA-pCAGGS ベクタープラスミドと pSVneo、あるいはコントロール細胞作成用にインサートのない pCAGGS ベクターのみを $30 \mu\text{g}$ のリポフェクション、Opti-MEM 培養液とともに添加し 20 時間培養した。続いて血清含有 DMEM 培養液で 48 時間培養した後、G418 を添加し 2 週間培養を行い、耐性のコロニーを得

た。更に *in situ* β ガラクトシダーゼ染色を行い pSVneo のみがトランスフェクションされたコロニーを除外した。

2. $\beta 1, 4$ -GT アンチセンスプラスミドの作製

pCAGGS 発現ベクターに挿入された $\beta 1, 4$ -GT cDNA を制限酵素 EcoRI によってプラスミドより切り出し、電気泳動の後 5.0 kb のベクターと 1.46 kb のインサートに分離精製した。分離したベクターは、self ligation を起こさないように 5' 側をアルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化した。その後 $\beta 1, 4$ -GTcDNA と pCAGGS ベクターの ligation を行い、生成物を大腸菌に導入し、プレーティングした。miniprep 法にて抽出したプラスミドを電気泳動し、6.46 kb のプラスミド DNA 10 クロオンを選別した。その後、これらのクロオンより、制限酵素 AccI を用いた restriction endonuclease digestion analysis によりアンチセンスプラスミドを選別した。

3. ノザンプロット法による遺伝子導入細胞の解析

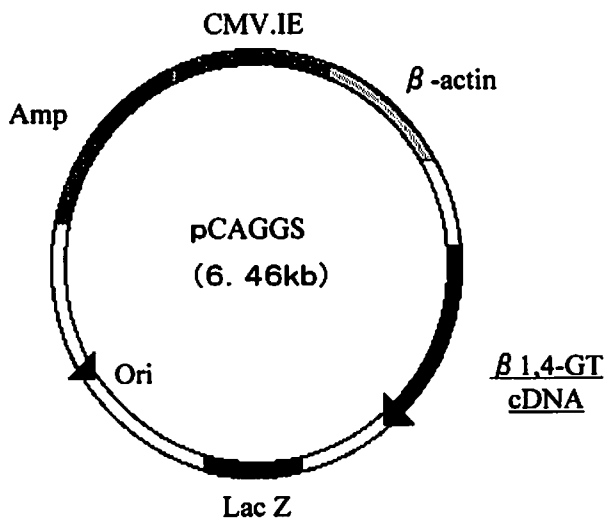
各クロオンより RNeasy キット (キアゲン社) を用いて総 RNA を抽出した。SNG-M のトランスフェクタントについては、得られた総 RNA $10 \mu\text{g}$ を 1% アガロース/ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動しナイロンメンブレンにトランスファーした。RMG-II のトランスフェクタントについては、ドットプロット法によりナイロンメンブレンに吸着させた。メンブレンはサケ精子 DNA $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ とプレハイブリダイゼーションした後に BcaBEST ラベリングキット (宝酒造) を用い [α -³²P]-dCTP で標識した $\beta 1, 4$ -GTcDNA プローブとハイブリダイゼーションを行った。メンブレンは SNG-M のトランスフェクタントにおいては -70°C で X 線フィルムに感光し、RMG-II のトランスフェクタントにおいては BAS2000 (FUJIFILM) を用いて放射活性を測定した。

4. サザンプロット法による導入遺伝子の確認

ゲノム DNA を SNG-M のトランスフェクタントは制限酵素 BamHI 処理し、RMG-II のトランスフェクタントは制限酵素 EcoRI 処理し、サザンプロット解析をおこなった。メンブレンはサケ精子 DNA $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ とプレハイブリダイゼーションした後に BcaBEST ラベリングキット (宝酒造) を用い [α -³²P]-dCTP で標識した $\beta 1, 4$ -GTcDNA プローブとハイブリダイゼーションを行った。

5. 細胞増殖能の検討

トランスフェクタント各々 1.0×10^5 個を 16 枚の 35 mm ディッシュに撒き、24 時間毎に 120 時間目まで 4 枚ずつ細胞数を計測し、それらの細胞数より対数増殖期における細胞倍加時間を算出した。



第1図 pCAGGS 発現ベクターに挿入されたヒト $\beta 1, 4$ -GT cDNA

6. 細胞外基質に対する接着性の検討

SNG-M トランスフェクタントでは、細胞外基質コート 24 ウェルプレートに 1×10^5 個の細胞を撒き 1 時間 37°C で静置した。培養液を捨て、PBS で 2 回洗浄した後に 25% グルタルアルデヒドで固定し、0.05% クリスタルバイオレット/20% メタノール溶液で 10 分間染色し蒸留水にて洗浄後に 405 nm での吸光度を測定した。

RMG-II トランスフェクタントでは、細胞外基質コート 96 ウェルマイクロプレートに細胞懸濁液を 2.0×10^5 個撒き、 37°C 1 時間培養した後、PBS (Ca/Mg 含有) で洗浄し、0.2% クリスタルバイオレット 100 μl を各ウェルに添加し、5 分間室温にて放置染色した。その後再度 PBS にて洗浄後、1% SDS 含有 PBS 100 μl を各ウェルに加え、振蕩することによって細胞を融解し、色素を溶出させた後に、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm の吸光度を測定した。

7. Boyden chamber を用いた浸潤能の検討 (In vitro invasion assay)

10 μg のマトリゲル (Becton Dickinson 社) でおおわれた 8 μm の細孔の開いた直径 13 mm のディスクを上側のチャンバーにのせ、下側のチャンバーを chemoattractant として NIH3T3 細胞由来の conditional medium (DMEM 5% FCS) で満たした。SNG-M および SNG-M トランスフェクタント細胞 (5×10^5 cells/ml) を上側のチャンバーに入れ、24 時間インキュベーションした後フィルターをエタノールにて固定、ヘマトキシリンにて染色した。フィルターを浸潤した細胞数は顕微鏡下 (200 倍) で 10 視野を計測した。

8. ノードマウスへの腹腔内注射による造腫瘍能の検討

各細胞株より細胞懸濁液を調製し、 6.0×10^6 個を 1 細胞株当り 5 匹、計 15 匹の Balb/c ノードマウスに腹腔内注射し、3 週間後エーテル麻酔殺後、解剖し、腹腔内に形成された腫瘍を摘出し、その湿重量を計測すると共に、横隔膜に形成された肉眼的転移巣の数を計測した。また、摘出された腫瘍についてはホルマリン固定後にヘマトキシリンエオジン染色を施行し、形態学的な検討をおこなった。

9. 統計学的手法

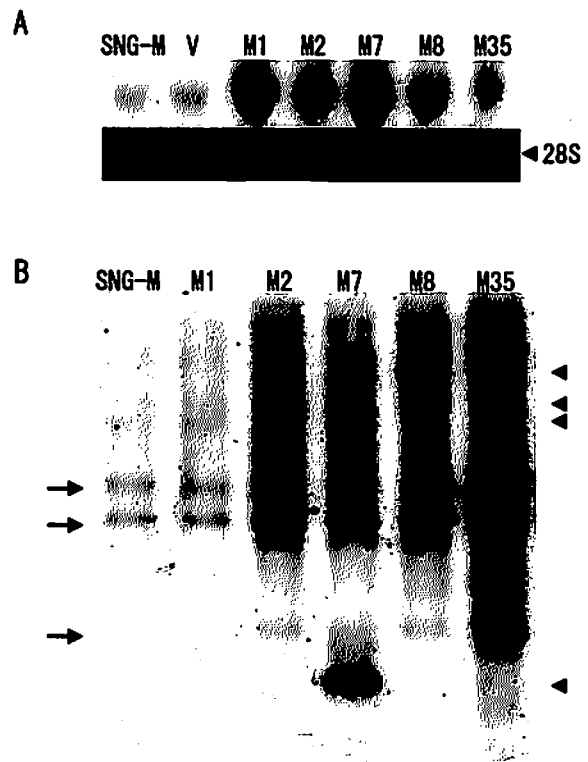
細胞倍加時間、細胞外マトリックスへの接着、ノードマウスに対する造腫瘍能の各実験結果の統計学的解析として、2 群間の比較には t 検定を用い、3 群間の比較には分散分析を行った後に post-hoc テストを用いた多重比較を行った。

結 果

子宮体癌細胞株における $\beta 1, 4$ -GT の過剰発現

1. サザンプロット法およびノザンプロット法による導入遺伝子の検証

pCAGGS ベクターおよび $\beta 1, 4$ -GT- pCAGGS ベクターを子宮体癌細胞株 SNG-M にリポフェクチン法によりトランスフェクトした。G418 存在下に 2 週間のセレクトションを行い 5 種類の耐性クローン (M1, M2, M7, M8, および M35) および空ベクターを導入したコントロールクローン (V) を得た。ノザンプロット解析の結果、5 種類の SNG-M トランスフェクタント細胞の $\beta 1, 4$ -GT mRNA 量は、コントロール細胞 (V) の量の 6 倍以上であった (第 2 図 A)。また、トランスフェクタント細胞 DNA に挿入された外来遺伝子をサザンプロット解析にて調べたところ、 $\beta 1, 4$ -GT mRNA レベルの高い細胞株にのみ transgene が認められた (第 2 図 B)。



第 2 図 SNG-M トランスフェクタント細胞のノザンプロット解析 (A) とサザンプロット解析 (B)。5 種類の SNG-M トランスフェクタント細胞の $\beta 1, 4$ -GT mRNA 量は、コントロール細胞 (V) の量の 6 倍以上であった。 $\beta 1, 4$ -GT mRNA レベルの高い細胞株にのみ transgene が認められた。(矢印は内因性の $\beta 1, 4$ -GT 遺伝子、矢頭は transgene を示す)

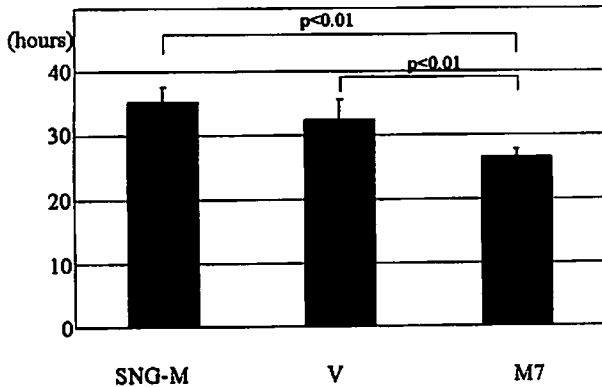
以後の実験においては最も $\beta 1, 4$ -GT の発現量が多いクローン細胞 M7 を使用した。

2. 細胞増殖能の比較

親株である SNG-M, V, および M7 の対数増殖期における細胞倍加時間を比較した結果, それぞれ 35.5 ± 2.21 時間, 32.6 ± 3.15 時間, および 26.7 ± 1.01 時間であり, M7 は V および SNG-M に比べて有意に細胞倍加時間が短縮していた (第3図)。

3. $\beta 1, 4$ -GT 高発現株 M7 の細胞外基質に対する接着性

細胞外基質であるラミニンと4型コラーゲンに対する接着性を M7 と V で比較した (第1表), ラミニンに対する接着性は M7 と V でそれぞれ 0.222 ± 0.017 , 0.024 ± 0.009 であり, M7 は V に対して有意に接着性が亢進していた。同様に4型コラーゲンに対しても M7 と V でそれぞれ 0.137 ± 0.009 , 0.025 ± 0.007 と M7 は V に対して有意に接着性が亢進していた。



第3図 SNG-Mトランスフェクタント細胞の細胞増殖能 SNG-M, V, および M7 の対数増殖期における細胞倍加時間を比較した結果, M7 は V および SNG-M に比べて有意に細胞倍加時間が短縮していた。

第1表 細胞外基質分子に対する子宮体癌細胞株の接着性に与える $\beta 1, 4$ -GT 遺伝子の影響

cells	laminin	collagen type 4
V	0.024 ± 0.009	0.025 ± 0.007
M7	0.222 ± 0.017	0.137 ± 0.009

V : コントロール細胞株, M7 : 高発現株, * $p < 0.01$

第2表 子宮体癌細胞株のマトリゲルへの浸潤性に与える $\beta 1, 4$ -GT 遺伝子の影響

Cells	No. of invading cells (mean \pm S.D.)
V	29.1 ± 23.3
M7	69.7 ± 25.4

V : コントロール細胞株, M7 : 高発現株, * $p < 0.01$

4. Boyden chamber を用いた浸潤能 (In vitro invasion assay) の比較

マトリゲルをコートした膜の裏面まで浸潤した細胞数を V と M7 の間で比較した。浸潤細胞数はそれぞれ 29.1 ± 23.3 および 69.7 ± 25.4 であり, V に対し M7 は浸潤能が有意に亢進していた (第2表)。

卵巣癌細胞株における $\beta 1, 4$ -GT 発現の抑制

$\beta 1, 4$ -GT の発現が少ない子宮体癌細胞株において, $\beta 1, 4$ -GT を過剰発現させることにより細胞外基質との接着性が亢進したことから, $\beta 1, 4$ -GT が癌細胞の特性, 特に浸潤・転移といった現象に関与している可能性があると考えられた。そこで, 本来 $\beta 1, 4$ -GT を多く発現している卵巣癌細胞において, その発現を抑制することにより卵巣癌細胞の特性を変化させられるのではないかと考え, 卵巣癌細胞株である RMG-II にアンチセンス遺伝子の導入を試みた。

1. $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子導入卵巣癌細胞の検証

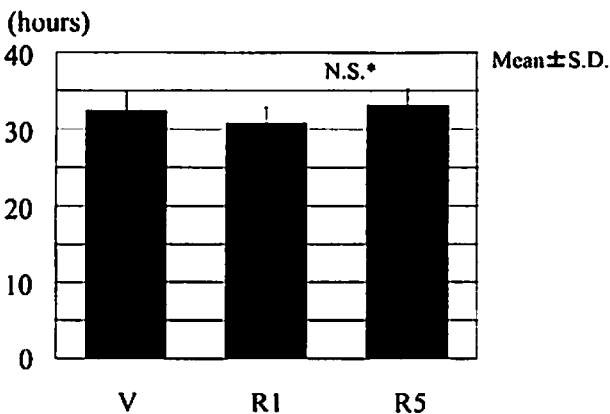
$\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子をリポフェクション法にて導入した R1 から R6 までの各トランスフェクタントについてノザンドットプロット法により, $\beta 1, 4$ -GT mRNA の多寡につき検討した結果, R1 および R5 においては mRNA レベルがコントロール細胞 V に比べ, それぞれ 41.3%, 52.0% に減少していることが確認された。また, mRNA の減少していた R1 および R5 と mRNA の減少していなかった R2 および V より抽出した DNA を用い, $\beta 1, 4$ -GT cDNA をプローブとしたサザンプロット法による解析の結果, R1 および R5 には transgene が明らかに認められ, 遺伝子導入が成功していることが裏付けられた。一方, R2 には transgene は認められなかった (第4図)。そこで, 以降の実験においては上記の R1, R5 を用いた。

2. $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子導入が細胞増殖能に与える影響

前項のようにして確認された $\beta 1, 4$ -GT 遺伝子抑制モデルである R1 および R5 細胞について, $\beta 1, 4$ -GT 遺



第4図 RMG-IIトランスフェクタント細胞のサザンブロット解析
3種類の $\beta 1, 4$ -GTアンチセンス遺伝子導入クローン(R1, R2, およびR5)のサザンブロット解析をおこなったところR1およびR5にtransgeneが認められた(矢印)。(Yamashita H et al : Oncology Report 10(6) : 1857-1862, 2003のFigure 1を許可を得て転載)



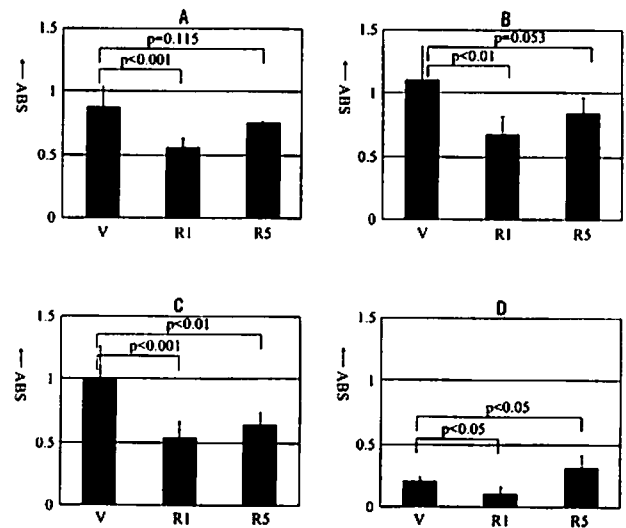
第5図 RMG-IIトランスフェクタント細胞の細胞増殖能
アンチセンス遺伝子を導入したR1およびR5とコントロール細胞(V)の間には細胞倍加時間に有意差は認められない。(Yamashita H et al : Oncology Report 10(6) : 1857-1862, 2003のFigure 2を許可を得て転載)

伝子の抑制が卵巣明細胞腺癌細胞株の細胞生物学的特性にどのような影響を与えるのかを検討するために、まず、細胞増殖能に与える影響を検討した。

細胞増殖能の検討は、対数増殖期における細胞倍加時間をパラメーターとして比較した。コントロール細胞V株の 32.5 ± 2.32 時間(mean \pm S.D.)に対して、R1株は 30.8 ± 2.14 時間、R5株は 33.3 ± 2.22 時間であり、3群間に統計学的な有意差は認められなかった(第5図)。したがって、 $\beta 1, 4$ -GTアンチセンス遺伝子は細胞増殖抑制あるいは促進効果を持っているとは言えない。さらに、これらのトランスフェクタントの細胞形態を検討した結果、各細胞株間に形態学的な相違は認められなかった。

3. $\beta 1, 4$ -GTアンチセンス遺伝子導入が細胞外基質との接着に与える影響

癌の浸潤・転移における間質との反応性に、 $\beta 1, 4$ -GTが影響を与えているか否かについて検討するために、細胞外基質に対する接着能について検討した(第6図)。コントロール細胞株および $\beta 1, 4$ -GTアンチセンスcDNA導入株の1型コラーゲンに対する接着能は吸光



第6図 細胞外基質分子に対する卵巣癌細胞の接着性におよぼす $\beta 1, 4$ -GTアンチセンス遺伝子の影響。
細胞外基質分子がコートされたプレート上で1時間培養し、接着細胞数を吸光度で評価した。1型コラーゲン(A)、4型コラーゲン(B)、およびフィブロンectin(C)においてアンチセンス遺伝子導入細胞は接着細胞数がコントロール細胞よりも少ない傾向が認められた。ラミニン(D)に対しては一定の傾向が認められなかった。(Yamashita H et al : Oncology Report 10(6) : 1857-1862, 2003のFigure3を許可を得て転載)

度で比較すると、V: 0.868 ± 0.165 , R1: 0.547 ± 0.081 , R5: 0.754 ± 0.010 (mean \pm S.D.) とアンチセンス導入株においては、接着能が低下する傾向にあり、R1 においては有意に低下していた ($p < 0.001$) (第6図A)。4型コラーゲン、フィブロネクチンに対する接着能に関しても同様の結果が得られた。すなわち4型コラーゲンに対しては、V: 1.103 ± 0.270 , R1: 0.665 ± 0.157 , R5: 0.839 ± 0.126 であり、R1 に関しては統計学上有意差をもって接着能が低下しており ($p < 0.01$)、R5 に関しても接着能の低下が認められた ($p = 0.0531$) (第6図B)。フィブロネクチンに関しては、V: 1.01 ± 0.250 , R1: 0.519 ± 0.064 , R5: 0.632 ± 0.102 であり、R1, R5 共に V に比べ、接着能は有意に低下していた ($p < 0.001$, $p < 0.01$) (第6図C)。ラミニンについては、V: 0.194 ± 0.035 , R1: 0.094 ± 0.056 , R5: 0.301 ± 0.094 となり、R1 の接着能は、V に比べて有意に低下していたが ($p < 0.05$)、R5 に関しては逆に接着能が有意に亢進しており ($p < 0.05$)、2種類の $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス導入株において相反する結果となった (第6図D)。

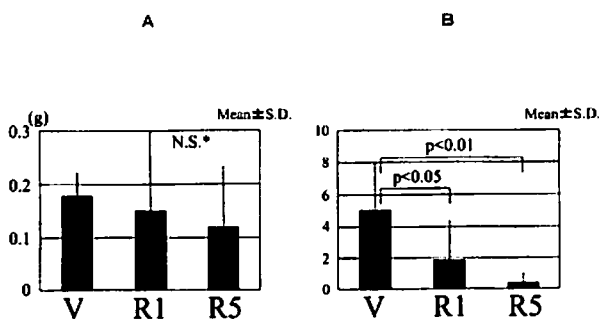
4. 腹腔播種モデルを用いた $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子導入細胞株の造腫瘍能

卵巣癌の播種性転移モデルとして、コントロール細胞株 V、およびアンチセンス遺伝子導入株である R1, R5 を各々5匹ずつの Balb/c ノードマウスに腹腔内接種し、その造腫瘍能につき検討した。その結果、V を腹腔内接種した群においては、5匹全てに腫瘍を形成したのに

対し、R1, R5 群においては、それぞれ4/5, 3/5 にしか腫瘍の形成が認められなかった。形成された腹腔内腫瘍の総重量は、V: 0.176 ± 0.044 g, R1: 0.161 ± 0.137 g, R5: 0.119 ± 0.113 g (mean \pm S.D.) と各群間に有意差は認められなかった (第7図A)。また、腫瘍の HE 染色標本においては、何れの群においても、明細胞はあまり認められず、大部分が hobnail pattern を呈す腺癌細胞で占められており、各群間に明らかな差異はなかった。一方、肉眼的所見として、コントロール V 細胞接種マウスに対し、 $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス導入株である R1, R5 細胞接種マウスでは、播種巣の数が少なかったため、これを客観的に評価する目的で、横隔膜における転移巣の数を肉眼的に比較した (第7図B)。横隔膜転移の数は、V, R1, R5 各群においては、それぞれ 5.0 ± 2.6 , 1.8 ± 2.5 , 0.4 ± 0.6 であり、コントロール群に対し $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子導入群においては横隔膜転移が有意に抑制されていた。

考 案

本研究においては女性性器癌において $\beta 1, 4$ -GT がどのように癌の細胞生物学的特性に関与しているのかを明らかにするため、 $\beta 1, 4$ -GT の発現の低い子宮体癌細胞株 SNG-M に $\beta 1, 4$ -GT を過剰発現させる方法、また $\beta 1, 4$ -GT 発現の高い卵巣癌細胞株 RMG-II にアンチセンス遺伝子を導入する方法を用いてそれら細胞株の細胞生物学的特性の変化を検討した。癌の細胞生物学的特性として細胞増殖能、浸潤・転移能が挙げられる。細胞増殖能については SNG-M においては $\beta 1, 4$ -GT の過剰発現により細胞倍加時間が短縮されており、 $\beta 1, 4$ -GT が細胞増殖能を亢進させる結果となった。一方 RMG-II にアンチセンス遺伝子を導入した場合においては、細胞倍加時間の有意な変化は認められず、 $\beta 1, 4$ -GT 発現の変化は細胞増殖能に影響を与えなかった。 $\beta 1, 4$ -GT が細胞増殖において促進的に作用するのか抑制的に働くのかという議論には以前よりいくつかの報告がみられる。マウスの耳下腺の過形成を誘導すると腺房細胞の $\beta 1, 4$ -GT 活性が上昇することや²⁰⁾、 $\beta 1, 4$ -GT の阻害剤を添加することにより細胞増殖が抑制されることから²⁰⁾、 $\beta 1, 4$ -GT には細胞増殖を促進する作用があるとする報告がみられる。また、反対に $\beta 1, 4$ -GT の過剰発現により細胞増殖が抑制されるため、 $\beta 1, 4$ -GT は細胞増殖に対し抑制的に働くとする報告もある²¹⁾。細胞増殖のシグナル伝達経路は細胞膜表面の増殖因子受容体から核における Myc などの細胞増殖因子発現までのリン酸化により制



第7図 腹膜播種に対する $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス遺伝子の影響。各トランスフェクタント細胞を Balb/c ノードマウスに腹腔内注射することにより腹膜播種モデルを作成した。腹腔内に形成された腫瘍の総重量は3群間に有意差は認められなかった (A)。一方、横隔膜への播種病巣の数について $\beta 1, 4$ -GT アンチセンス導入細胞 (R1, R5) はコントロール細胞と比較して有意に減少していた (B)。(Yamashita H et al: Oncology Report 10(6): 1857-1862, 2003 の Figure 4 を許可を得て転載)

御されていると考えられているが、近年糖転移酵素も細胞増殖シグナルの制御に関与していることが明らかになってきている。EGF レセプターファミリーは受容体そのものが $\beta 1, 4$ -GT の関与する糖鎖修飾を受け、二量体の形成を促したり他のレセプターを介した EGFR のトランスアクティベーションに必須であることが報告されている²²⁻²⁴。SNG-M においてみられた $\beta 1, 4$ -GT 過剰発現の細胞増殖促進効果はこの細胞株が細胞増殖を行う際に、 $\beta 1, 4$ -GT が関与する糖鎖修飾によりその機能を制御されている細胞表面の増殖因子受容体からのシグナル伝達の影響を受けている可能性を示唆している。一方 RMG-II においては細胞増殖は $\beta 1, 4$ -GT の多寡に影響されないため、 $\beta 1, 4$ -GT による糖鎖修飾の影響を受けない増殖因子受容体からの細胞増殖シグナルが伝達されているか、あるいはリガンドの必要の無いようなシグナルの活性化が起こっている可能性が示唆される。

$\beta 1, 4$ -GT と浸潤・転移能の関係については、腫瘍細胞が原発巣より離脱する過程の一つである間質浸潤の指標として、子宮体癌株については細胞外基質との接着性とマトリゲルへの浸潤能について検討し、卵巣癌株では細胞外基質との接着性について検討した。さらに卵巣癌株においては原発巣より離脱した卵巣癌細胞の播種性転移モデルとして各トランスフェクタントのヌードマウスへの腹腔内投与を行った。細胞外基質との接着性は、子宮体癌細胞においては $\beta 1, 4$ -GT の過剰発現により接着性が亢進し、さらにマトリゲルへの浸潤能も亢進した。一方卵巣癌においても $\beta 1, 4$ -GT のアンチセンス導入による発現抑制により細胞外基質に対する接着性は低下したことより、どちらの細胞株においても $\beta 1, 4$ -GT が細胞外基質との接着において重要な役割を担っているものと考えられる。細胞外基質と $\beta 1, 4$ -GT との関連は諸家の報告と今回の結果とを考慮すると 2 つの仮説が考えられる。第一に、 $\beta 1, 4$ -GT が前述のように細胞膜表面に存在する接着因子としての役割を有する場合であり¹²⁻¹⁴、体癌においては過剰発現により細胞表面の $\beta 1, 4$ -GT 蛋白が増加し接着分子としての $\beta 1, 4$ -GT 蛋白と細胞外基質との接着の亢進がみられ、卵巣癌においては発現抑制により細胞膜表面の $\beta 1, 4$ -GT 蛋白が減少することにより接着性が低下することになる。本研究においては $\beta 1, 4$ -GT の細胞内局在については検討していない。 $\beta 1, 4$ -GT の総量に変化しても細胞膜表面の $\beta 1, 4$ -GT 発現量は変化しないとする報告もみられるため¹²、本実験で得られた細胞株についても検討してみる必要があると考えられた。しかし、 $\beta 1, 4$ -GT が接着分子として機能する場合、本研究結果ではリガンドとしての色々な細胞外基

質に対する特異性が認められず通常の細胞膜表面受容体が高いリガンド特異性を有しているという事実に照らした場合非常に不自然である。第 2 の可能性は、細胞外基質に対する接着分子として広く認められているインテグリンに対する影響である。現在までにインテグリンの機能調節がインテグリンの糖鎖修飾、特に N-glycosylation によるとする報告が見られる。トランスフォームされた乳腺上皮由来の S115 細胞株は、 β インテグリンが N-glycosylation をうけており、特にポリ-N-ラクトサミノグリカン鎖の構造が重要であるという報告がある²⁵。また、Zheng らによると、N グリコシド型糖鎖の除去により、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの分離が起こり、フィブリノーゲンに対する接着能が失われるという報告もある²⁶。したがって、N-アセチルラクトサミン合成に重要な $\beta 1, 4$ -GT が過剰発現された子宮体癌株においてはインテグリンの糖鎖修飾が積極的に行われ、インテグリンの機能が亢進することにより、細胞外基質との接着性も亢進している可能性がある。また、同様に卵巣癌細胞株においてもインテグリンの糖鎖修飾が低下することによりインテグリンの機能低下を招き、結果的に細胞外基質に対する接着能を低下させている可能性がある。今後、今回得られたトランスフェクタントにおけるインテグリンの発現とその糖鎖修飾について検討する必要があると考えられる。

ヌードマウスによる腹膜播種モデルにおける播種性転移能の検討においては、アンチセンス遺伝子を導入した R1 および R5 は転移巣の認められないマウスが存在したり、横隔膜への転移数がコントロールに比べて少ないことより $\beta 1, 4$ -GT の抑制は転移能に対しても抑制的に作用することが示唆された。 $\beta 1, 4$ -GT の抑制によって腹膜播種転移巣の数が減少したことに対する分子機構を明らかにすることは今後の課題であるが、卵巣癌細胞表面の糖鎖であり、 $\beta 1, 4$ -GT が合成に関与している Lewis^x 抗原が腹膜への転移に重要であるとする報告や²⁷、中皮より分泌される細胞外基質であり、インテグリンのリガンドであるフィブロネクチンが卵巣癌細胞の運動を亢進するという報告もあり²⁸、 $\beta 1, 4$ -GT により合成される糖鎖が卵巣癌細胞の転移能に関与している可能性が考えられる。

総括

女性性器癌において $\beta 1, 4$ -ガラクトース転移酵素が細胞生物学的特性にどのように関与しているのかを明らかにする目的で、子宮体癌細胞に対しては $\beta 1, 4$ -GT のセ

ンス遺伝子を導入し、また卵巣癌細胞に対してはアンチセンス遺伝子を導入し以下の事実を明らかにした。

1. 子宮体癌細胞においては β 1, 4-GTは細胞増殖能を亢進するが卵巣癌細胞では β 1, 4-GTは細胞増殖に関与していない。

2. 子宮体癌細胞、卵巣癌細胞のいずれにおいても β 1, 4-GT発現の多寡は細胞外基質との接着性に正の相関を示した。

3. 卵巣癌細胞においては β 1, 4-GTを抑制することによりヌードマウスによる腹膜播種モデルにおける播種の広がりが抑制された。

以上の結果より、 β 1, 4-GTは女性性器癌細胞の浸潤・転移という細胞特性に関与していることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、また御指導御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導、御鞭撻をいただきました近畿大学理工学部岩森正男教授、慶應義塾大学医学部産婦人科学教室塚崎克己助教授、久布白兼行講師に深謝いたします。

なお、本研究の一部は第52回日本産科婦人科学会総会(2000年、徳島)、第42回日本臨床細胞学会秋期大会(2003年、横浜)において発表した。

文 献

- 1) Yoshiki J, Kubushiro K, Tsukazaki K, Udagawa Y, Nozawa S, Iwamori M : High expression of uridine diphosphate-galactose : Lc3Cer beta 1-3 galactosyltransferase in human uterine endometrial cancer-derived cells as measured by enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography-immunostaining. *Jpn J Cancer Res* 88 : 669-77, 1997
- 2) Ma J : Expression of human β 1, 4- galactosyltransferase in gynecologic cancer cell lines. *Int J Oncology* 11 : 117-122, 1997
- 3) Uemura M, Winant RC, Sikic BI, Brandt AE : Characterization and immunoassay of human tumor-associated galactosyltransferase isoenzyme II. *Cancer Res* 48 : 5325-34, 1988
- 4) Uemura M, Winant RC, Brandt AE : Immunoassay of serum galactosyltransferase isoenzyme II in cancer patients and control subjects. *Cancer Res* 48 : 5335-41, 1988
- 5) Podolsky DK, Weiser MM : Galactosyltransferase activities in human sera : detection of a cancer-associated isoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 65 : 545-51, 1975
- 6) Uemura M, Sakaguchi T, Uejima T, Nozawa S, Narimatsu H : Mouse monoclonal antibodies which recognize a human (beta 1-4)galactosyl-transferase associated with tumor in body fluids. *Cancer Res* 52 : 6153-7, 1992
- 7) Nozawa S, Yajima M, Sakuma T, Udagawa Y, Kiguchi K, Sakayori M, Narisawa S, Iizuka R, Uemura M : Cancer-associated galactosyltransferase as a new tumor marker for ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Res* 50 : 754-9, 1990
- 8) Udagawa Y, Aoki D, Ito K, Uejima T, Uemura M, Nozawa S : Clinical characteristics of a newly developed ovarian tumour marker, galactosyltransferase associated with tumour (GAT). *Eur J Cancer* 34 : 489-95, 1998
- 9) Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, Kato H : Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 181 : 51-8, 1991
- 10) Tyrrell D, James P, Rao N, Foxall C, Abbas S, Dasgupta F, Nashed M, Hasegawa A, Kiso M, Asa D, et al. : Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 : 10372-6, 1991
- 11) Iwai K, Ishikura H, Kaji M, Sugiura H, Ishizu A, Takahashi C, Kato H, Tanabe T, Yoshiki T : Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer* 54 : 972-7, 1993
- 12) Evans SC, Lopez LC, Shur BD : Dominant negative mutation in cell surface beta 1, 4-galactosyltransferase inhibits cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 120 : 1045-57, 1993
- 13) Lopez LC, Youakim A, Evans SC, Shur BD : Evidence for a molecular distinction between Golgi and cell surface forms of beta 1, 4-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 266 : 15984-91, 1991
- 14) Shi X, Amindari S, Paruchuru K, Skalla D, Burkin H, Shur BD, Miller DJ : Cell surface beta-1, 4-galactosyltransferase-I activates G protein-dependent exocytotic signaling. *Development* 128 : 645-54, 2001
- 15) Rebeiz M, Miller DJ : Porcine sperm surface beta1, 4galactosyltransferase binds to the zona pellucida but is not necessary or sufficient to mediate sperm-zona pellucida binding. *Mol Reprod Dev* 54 : 379-87, 1999
- 16) Masri KA, Appert HE, Fukuda MN : Identification of the full-length coding sequence for human galactosyltransferase (beta-N-acetylglucosaminide : beta 1, 4-galactosyltransferase). *Biochem Biophys Res Commun* 157 : 657-63, 1988
- 17) Ishiwata I, Nozawa S, Inoue T, Okumura H : Development and characterization of established cell lines from primary and metastatic regions of human endometrial adenocarcinoma. *Cancer Res* 37 : 1777-

85, 1977

- 18) Yajima M : Establishment of an ovarian mesonephroid carcinoma cell line (RMG-II) and production of anti-RMG-II monoclonal antibody. *J Keio Med Soc* 66 : 817-826, 1989
- 19) Humphreys-Beher MG, Schneyer CA, Zelles T : Alpha-lactalbumin acts as a bimodal regulator of rat parotid acinar cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 147 : 174-81, 1987
- 20) Humphreys-Beher MG, Schneyer CA, Kidd VJ, Marchase RB : Isoproterenol-mediated parotid gland hypertrophy is inhibited by effectors of 4 beta-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 262 : 11706-13, 1987
- 21) Hinton DA, Evans SC, Shur BD : Altering the expression of cell surface beta 1, 4-galactosyltransferase modulates cell growth. *Exp Cell Res* 219 : 640-9, 1995
- 22) Tsuda T, Ikeda Y, Taniguchi N : The Asn-420-linked sugar chain in human epidermal growth factor receptor suppresses ligand-independent spontaneous oligomerization. Possible role of a specific sugar chain in controllable receptor activation. *J Biol Chem* 275 : 21988-94, 2000
- 23) Fernandes H, Cohen S, Bishayee S : Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association : a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 276 : 5375-83, 2001
- 24) Konishi A, Berk BC : Epidermal growth factor receptor transactivation is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 278 : 35049-56, 2003
- 25) Leppa S, Heino J, Jalkanen M : Increased glycosylation of beta 1 integrins affects the interaction of transformed S115 mammary epithelial cells with laminin-1. *Cell Growth Differ* 6 : 853-61, 1995
- 26) Zheng M, Fang H, Hakomori S : Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J Biol Chem* 269 : 12325-31, 1994
- 27) Kiguchi K, Iwamori M, Mochizuki Y, Kishikawa T, Tsukazaki K, Saga M, Amemiya A, Nozawa S : Selection of human ovarian carcinoma cells with high dissemination potential by repeated passage of the cells *in vivo* into nude mice, and involvement of Le(x)-determinant in the dissemination potential. *Jpn J Cancer Res* 89 : 923-32, 1998
- 28) Rieppi M, Vergani V, Gatto C, Zanetta G, Allavena P, Taraboletti G, Giavazzi R : Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 80 : 303-7, 1999

学位論文

知覚変容発作に関する研究：抗精神病薬の副作用とする立場から

慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室

(指導：野澤志明教授)

うちだ ひろゆき
内 田 裕 之

(平成 17 年 10 月 26 日受付)

Key Words : Paroxysmal Perceptual Alteration, dystonia, antipsychotics, oculogyric crisis, side-effect

脳内のドパミン神経系は、その分布により、中脳辺縁系、中脳皮質系、黒質線状体系、下垂体漏斗系に大別され、幻覚や妄想などの精神病症状は中脳辺縁系におけるドパミンの過剰が関与していると考えられ、抗精神病薬は、その中脳辺縁系のドパミン D2 受容体を遮断することにより抗精神病効果を発揮する、と推測されている¹⁾。しかし、同時に他の経路も遮断するため、黒質線状体系を遮断することによる錐体外路症状等をはじめとする副作用を引き起こすことも多い¹⁾。ただし、そうした運動系に対する副作用は広く知られていたが、感覚、特に視覚に影響を与えることはこれまであまり報告されていなかった。山口ら (1985 年) は、抗精神病薬を服用中の統合失調症患者が、主に視覚領域の感覚過敏を特徴とする発作を経験することを報告し、知覚変容発作 (以下、本発作) と名づけ報告した²⁾。彼らは本発作の特徴として、(1) 急性発症、(2) 数分から数時間の経過で徐々に軽快、(3) 夕刻、疲労時に好発、(4) 症候の内容は知覚過敏化、視覚・聴覚・身体感覚に関わる変容を主体とする、(5) 非妄想型の症例に多い、という点を挙げた。彼らは、本発作を呈する患者がすべて統合失調症と診断されていたため、本発作を統合失調症の一症状と捉えた²⁾。次いで、樋口らは、錐体外路症状を軽減させる抗パーキンソン病薬により本発作が消失した統合失調

症患者 2 例を報告し、本発作が抗精神病薬の副作用である可能性を示唆した³⁾。その後、本発作の病因および病態生理をめぐり、統合失調症の一症状とする立場と、抗精神病薬の副作用であるとする立場に大別されるようになったが、症例報告のみで系統だった研究はなく、いまだその結論を見ていない³⁾。また、日本以外でのこの症状の報告はなく、議論は深まっていないのが現状である。しかし、本発作は、発作自体が患者にとって極めて苦痛であるのみならず、「発作が再度起こるのではないか」という予期不安もしばしば引き起こし、生活の質も大いに低下させるため³⁾、⁷⁾、⁸⁾、病因を含めた更なる調査が望まれている。なぜなら、本発作の病因を明らかにすることは、治療選択、さらにはその後の患者の生活の質に大きな影響を与えると考えられるからである。すなわち、本発作が抗精神病薬の副作用であるにもかかわらず、統合失調症の症状と考えて抗精神病薬を増量した場合、本発作は当然悪化するであろう。逆に、本発作が統合失調症の一症状であるにもかかわらず、抗精神病薬の副作用と考え減量した場合、統合失調症が悪化する可能性が高い。既述のとおり、本発作の病因はいまだ明らかではないが、錐体外路症状であるジストニアの一型である眼球上転発作が知覚変容発作に合併する症例の報告もあり、抗精神病薬との密接な関連が予想される⁵⁾、⁹⁾。そこで著

本論文は、Uchida H, Suzuki T, Tanaka KF, Watanabe K, Yagi G, Kashima H. Paroxysmal perceptual alteration in patients treated with antipsychotic agents. *J Clin Psychopharmacol* 23(10) : 496-499, 2003 の一部、Uchida H, Suzuki T, Watanabe K, Kashima H. Antipsychotics-induced paroxysmal perceptual alteration. *American J Psychiatry* 160(12) : 2243-2244, 2003 の一部、Uchida H, Suzuki T, Watanabe K, Kashima H. Antipsychotics-induced hypersensitivity of visual perception. *European Psychiatry* (in press) の一部、Uchida H, Suzuki T, Yamazawa R, Tomita M, Nemoto T, Kimura Y, Watanabe K, Imasaka Y, Kashima H. Reducing the dose of antipsychotic agents ameliorates visual hypersensitivity attack : an ideal treatment option in terms of the adverse effect. *J Clin Psychopharmacol*. (in press) の一部を含む。

者は、本発作の病因および治療アプローチを検討するために、まず罹患率等の基礎調査を行い、次に本発作を有する非統合失調症患者の症状を検討し、最後に本発作を有する患者に投与されている抗精神病薬を治療的アプローチとして減量し、その効果について検討した。

方 法

(1) 罹患率および処方傾向に関する検討 (横断研究)

統合失調症、気分障害、神経症性障害 (ICD-10)¹⁰⁾のいずれかの診断を満たし、抗精神病薬による治療を受けている、大泉病院 (東京都)、武蔵野病院 (埼玉県)の外来または入院患者で、本研究の趣旨を理解し書面同意が得られた者に聞き取り調査を行い、本発作の罹患率および本発作を有する患者の処方の特徴を調査した。聞き取り調査は、非構造化面接で行われ、知覚変容発作の有無およびその発作の内容に関して調査された。知覚変容発作の診断基準は、(1) 視覚領域の感覚過敏、(2) 症状が自己違和的、(3) 持続時間は数分から数時間、(4) 直近のエピソードは調査時より3ヶ月以内、(5) 抗精神病薬による治療開始後に症状が出現、とした²⁾。また、重篤な身体疾患、精神遅滞、物質乱用の既往、脳波およびCTでの異常を有するものは除外した。患者からの情報は診療録により補足され、患者の現在の精神状態はアメリカ精神医学会の精神疾患の診断・統計マニュアル第4版のGlobal Assessment of Functioning (GAF) 評点 (1-100点)¹¹⁾によって評価した。発作を有する患者の評価は他の精神科医によって再評価され、さらに定期的コンセンサス会議でも検討された。1 mgがクロルプロマジン 10 mg以上に相当する抗精神病薬は「高力価」と、その他の抗精神病薬は「中・低力価」と定義した。また、抗精神病薬、抗パーキンソン病薬、抗不安薬は、稲垣らの等価換算表¹²⁾に基づき、各、クロルプロマジン、ピペリデン、ジアゼパム等価量に換算された。稲垣らの当価換算表は過去の臨床試験における臨床効果に基づき、換算値を決定している。2剤以上の抗精神病薬で治療されている場合、クロルプロマジンに換算して投与総量の半分以上を占めている薬剤を主剤とみなした。

発作を有する患者と有さない患者の背景情報は、 χ^2 検定またはMann-Whitney U検定を用いて比較し、両側 $p < 0.05$ で有意とした。なお、本研究は各実施施設の倫理委員会の承認を得た。

(2) 非統合失調症患者で知覚変容発作を有する患者の症状の検討

気分障害または神経症性障害 (ICD-10)¹⁰⁾のいずれかの診断を満たし、上記研究 (1) の本発作の診断基準を満たす患者2名の症状を日常臨床の範囲内で調査し、治療による反応も同時に観察した。なお、両患者から治療経過の公表に関して書面同意を得た。

(3) 抗精神病薬の減量が本発作に与える影響の検討 (縦断研究)

本研究は36週にわたるランダム化比較対照オープン試験で、東京近郊の精神科3施設 (大泉病院、武蔵野病院、あさか台メンタルクリニック) で行った。上記施設において抗精神病薬による治療中で、統合失調症、統合失調感情障害、妄想性障害、気分障害または神経症性障害 (ICD-10)¹⁰⁾と診断されている18歳以上75歳未満の外来または入院患者に聞き取り調査を行い、知覚変容発作を有する患者のうち、研究参加への書面同意が得られたものを対象とした。知覚変容発作の診断基準は上記研究 (1) と同様の基準を用いた。重篤な身体疾患、精神遅滞、物質乱用の既往、脳波およびCTでの異常を有するものは除外した。なお、本研究は各実施施設の倫理委員会の承認を得た。

対象となる患者は、減量群か対象群に無作為に割り付けられた。減量群では、抗精神病薬を12週間かけて減量し、その後24週間は処方を変えせず経過観察した。減量の速度および用量は精神症状と過去の症状に基づき決定した。また、抗パーキンソン病薬や抗不安薬などの抗精神病薬以外の薬剤は変更しなかった。一方、対象群は、36週間にわたり、開始時の処方を維持した。症状の悪化に伴う向精神薬の増量の必要があった場合を再発と定義し、脱落とみなした。研究開始前に減量群の患者には、減量により発作が改善または悪化する二つの可能性を説明した。すなわち、減量により発作が改善するという我々の仮説に関する情報が患者に伝わらないように配慮した。

無作為化は、本研究に関係のない精神科医により作成された乱数表を用い、無作為化のあとは本質的にはオープン試験として実施された。

本発作の重症度は、アメリカ国立精神保健研究所 (NIMH) のClinical Global Impression (CGI) のSeverity of Illness (SOI) とGlobal Impression (GI)¹³⁾、頻度および持続時間を記載した自己報告を用いて評価した。SOIは「正常、全く病的でない」の1点から「極度に病的」の7点まで7段階評価であり、GIは

「著明改善」の1点から「著明悪化」の7点までの7段階評価で、「不変」は4点である。患者には、発作の頻度および持続時間、眼球上転発作のような付随症状を日記に記載するように要請した。統合失調症患者の精神症状は、陽性・陰性症状評価尺度 (Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS))¹⁴⁾、他の診断を有する患者はCGIを用いて評価した。PANSSは、陽性尺度7項目、陰性尺度7項目、総合精神病理尺度16項目から構成され、各項目に0 (正常) から7点が与えられ、症状が重篤なほど高得点となる。また、日常生活レベルはGAF、錐体外路症状は薬原性錐体外路症状評価尺度 (Drug-induced extrapyramidal symptoms scale (DIEPSS))¹⁵⁾により評価した。DIEPSSは計8症状を評価する8項目から構成され、各項目に0 (正常) から4点が与えられる。なお、全ての評価は、開始時および36週経過時に行った。抗精神病薬、抗パーキンソン病薬、抗不安薬の投与量は、稲垣らの等価換算表に基づき、各、クロルプロマジン、ピペリデン、ジアゼパム等価量に換算された。2剤以上の抗精神病薬で治療されている場合、クロルプロマジンに換算して投与総量の半分以上を占めている薬剤を主剤とみなした。

減量群と対照群の背景情報はMann-Whitney U検定、Student's t検定またはFisher検定を用いて比較し、両側 $p < 0.05$ で有意とした。開始時と36週経過時の症状の比較は、SOIとDIEPSSに関してはWilcoxon signed-rank検定を用い、発作の頻度、持続時間、抗精

第1表：患者の背景

	平均 (範囲)
年齢	54.8 (18-88)
性別	
男性/女性	163/175
診断 (ICD-10)	
統合失調症	291
気分障害	27
神経症性障害	20
GAF	38.4 (12-90)
罹病期間 (年)	26.6 (0.4-61)
抗精神病薬 (mg/日) (クロルプロマジン換算)	580.9 (2-3363)
抗パーキンソン病薬投与量 (mg/日) (ピペリデン換算)	2.3 (0-8)
抗不安薬投与量 (mg/日) (ジアゼパム換算)	1.0 (0-42)

ICD=International Classification of Disease ;
GAF=Global Assessment of Functioning
(Uchida et al : J Clin Psychopharmacol 23 : 469-499, 2003
の第1表を許可を得て転載)

神病薬の投与量、PANSSおよびGAFは正規分布を取っていたため、paired-t検定を用いた。また、両側 $p < 0.05$ で有意とした。

結 果

(1) 罹患者および処方傾向に関する検討 (横断研究)

344名に研究への参加を依頼したところ、6人が拒否し、338名が書面同意をした上で参加し、338名中11名 (3.25%) が本発作を有した。患者の背景は第1表および付録に記載したとおりであり、11名の全ては統合失調症と診断されていた。発作の罹患者は、高力価抗精神病薬で治療されている場合3.91% (10/256名) 名、

第2表：知覚変容発作の罹患者

	罹患者
全体の罹患者 (N=338)	3.25% (11名)
治療薬剤	
高力価抗精神病薬治療群 (N=256)	3.91% (10名)
中力価・低力価抗精神病薬治療群 (N=82)	1.22% (1名)

(Uchida et al : J Clin Psychopharmacol 23 : 469-499, 2003
の第2表を許可を得て転載)

第3表：知覚変容発作を有する群と有さない群の背景の比較

	発作群 (n=11) ; 平均 (範囲)	非発作群 (n=327) ; 平均 (範囲)
男性の比率 (%)	36.4%	48.3%
年齢	39.1 (23-57)**	55.2 (18-88)
GAF	62.3 (35-90)**	37.7 (12-90)
罹病期間 (年)	14.1 (0.4-29)*	27.0 (1-61)
抗精神病薬投与量 (mg/日) (クロルプロマジン換算)	783.9 (300-3363)	573.0 (2-4706)
抗パーキンソン病薬投与量 (mg/日) (ピペリデン換算)	2.55 (0-6)	2.31 (0-10)
抗不安薬投与量 (mg/日) (ジアゼパム換算)	0.45 (0-5)	1.05 (0-50)

** $p < 0.001$ * $p < 0.05$, Mann-Whitney's U test による
GAF=Global Assessment of Functioning.
(Uchida et al : J Clin Psychopharmacol 23 : 469-499, 2003
の第3表を許可を得て転載)

中・低力価の場合1.22% (1/82名)であった(第2表)。また、11名中4名(36.4%)が眼球上転発作を同時に経験した。なお、発作を有する患者は、有さない患者と比較し、第3表に示したとおり、有意に若く、GAFは高く、罹病期間は短かったが、抗精神病薬、抗パーキンソン病薬および抗不安薬の用量に有意な差はなかった。

(2) 非統合失調症患者で知覚変容発作を有する患者の症状の検討

症例1

49歳女性。遺伝負因無し。初診時、全般性不安障害(ICD-10)に2年間罹患しており、不安、めまい、耳鳴を主訴としていた。なお、眼科、耳鼻科、神経内科的に器質的異常を認めず、視力にも異常はなかった。その後、数種類の抗うつ薬や抗不安薬を使用するも症状に改善は得られず、症状への執着も強くなったため、すでに処方されていたベンゾジアゼピン系抗不安薬のアルプラゾラム1.2mgに加え、抗精神病薬のハロペリドール0.5mgを追加投与したところ、投与開始2日後より、次のような症状が出現した。患者は、「壁や天井の細かい模様がいっつもより鮮明に見えます。紙の輪郭やほこりのような細かいものも際立って見えます。毎晩突然起こって、1時間くらい続いてつらいです。」と語った。

この症状は、ハロペリドール中止2日後に消失した。その後再度、様々な抗うつ薬や抗不安薬を投与するも、当初から存在する原疾患の不安症状に改善は見られなかった。そこで抗精神病薬のレボメプロマジン10mgを処方したところ、投与後2日目から前回と同様の視覚過敏症状が出現し、患者は「また同じ発作が出ました。光がキラキラ見えて、ちりやしみのような細かいものが、毎晩1-2時間際立って見えます。非常に気持ちが悪くつらいです。」と訴えた。この発作症状は、レボメプロマジン中止に伴い、翌日より消失した。

症例2

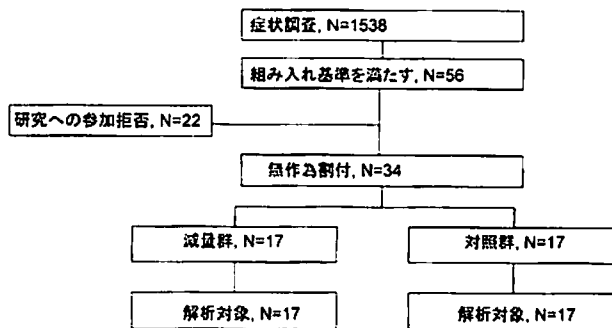
24歳女性。遺伝負因無し。初診時、全般性不安障害(ICD-10)に6年間罹患しており、不安と重度の不眠を訴え、2年間の治療歴があった。なお、眼科、耳鼻科、神経内科的に器質的異常を認めず、視力にも異常はなかった。数種類の抗うつ薬や抗不安薬を投与するも症状は改善しなかったため、抗精神病薬のプロペリシアジン45mgを投与したところ、不安と不眠は大幅に改善した。しかし、投与開始2ヵ月後、反復性の不快な発作症状が出現し、同時に眼球上転発作も出現し、患者は、「細かいものが際立って見えて私に向かってくるような感じに

なります。発作中は光がキラキラ見えて、壁の細かい模様がやたら鮮明に見えます。週1回くらい、夜、突然始まって、30分くらい続いて恐いです。発作のときに、目が上がってしまいます。」と訴えた。

この症状は、抗パーキンソン病薬のビペリデン2mgを筋注することにより一時的に改善し、その後プロペリシアジンの用量を5mgに減量したところ、発作症状と眼球上転発作の両者が2日後より消失した。原疾患である全般性不安障害は、その後寛解状態を維持していたが、1年後再発した。そこで、プロペリシアジンを45mgに増量し、ビペリデン3mgを同時に投与した。原疾患の不安症状は再度改善したものの、処方変更2週間後から同様の発作症状が出現し、患者は次のように訴えた。「また同じ症状が起きました。週1回夜に30分くらい、光がキラキラして細かいものがやたらはっきりと見えます。色が圧倒されるくらい鮮やかに見えて恐いです。でも今回は目は上がりません。」また、患者が、この発作症状を改善させるためにプロペリシアジン5mgを発作中に追加して服用したところ、症状は増悪した。そこで、ビペリデンの用量を3mgから5mgに増量したところ、約2週間でその発作症状は消失した。

(3) 抗精神病薬の減量が本発作に与える影響の検討(縦断研究)

第1図に示したとおり34人が本研究に参加し、減量群(17名)と対照群(17名)に無作為に割り付けられた。全患者が脱落せず、再発はなかった。両群において、男女比、年齢、罹病期間、入院患者の割合、その他の背景に有意な差はなかった(第4表)。また、全ての患者が統合失調症と診断されていた。



第1図. 減量研究のCONSORTダイアグラム
(Uchida et al : J Clin Psychopharmacol 26 (in press), 2006の第1図を許可を得て転載、一部改変)

第4表：患者の背景*

	減量群 (N=17)	対照群 (N=17)
性別		
男性	9	5
女性	8	12
年齢：平均（標準偏差）	40.1 (15.4)	43.9 (12.3)
罹病期間：平均（標準偏差）	15.8 (13.3)	17.8 (9.4)
入院患者/外来患者数	2/15	2/15
診断		
統合失調症, N	17	17
抗精神病薬		
クロルプロマジン換算（/日）	703.0 (400.6)	669.4 (502.4)
平均（標準偏差）		
知覚変容発作		
CGI；Severity of Illness：	4.06 (3-6)	3.88 (3-5)
（/日）：平均（標準偏差）		
持続時間（時間）（/日）：平	1.92 (1.56)	1.82 (1.37)
均（標準偏差）		
頻度（/週）：平均（標準偏	2.59 (2.34)	1.95 (1.79)
差）		
PANSS 評点		
総点：平均（標準偏差）	55.0 (18.0)	59.9 (22.1)
陽性尺度：平均（標準偏	12.9 (4.5)	13.0 (5.1)
差）		
陰性尺度：平均（標準偏	18.2 (7.0)	19.6 (8.0)
差）		
総合精神病理：平均（標	23.9 (8.1)	26.6 (13.2)
準偏差）		
GAF 評点：平均（標準偏差）	51.0 (16.2)	56.1 (20.5)
DIEPSS,総点：平均（標準偏	2.18 (3.47)	3.24 (2.86)
差）		

*すべての項目において有意差はなし

PANSS=Positive and Negative Syndrome Scale, GAF=Global Assessment of Functioning, DIEPSS=Drug-Induced Extrapyrimalidal Symptoms Scale

(Uchida et al : J Clin Psychopharmacol 26 (in press), 2006 の第1表を許可を得て転載, 一部改変)

第5表：抗精神病薬および知覚変容発作の変化

	減量群 (N=17)		対照群 (N=17)	
	開始時	36週経過時	開始時	36週経過時
抗精神病薬投与量（/日）（クロルプロマジン換算）：平均（標準偏差）	703.0 (400.6)	412.5 (333.2)**	669.4 (502.4)	669.4 (502.4)
減量率（%）		41.3%		
知覚変容発作				
CGI；Severity of Illness：平均（範囲）	4.06 (3-6)	1.77 (1-4)**	3.88 (3-5)	3.88 (3-5)
Global Improvement		1.71 (1-4)		4 (3-5)
1-3：改善, N		16		1
4：不変, N		1		14
5-7：悪化, N		0		1
持続時間（時間）（/日）：平均（標準偏差）	1.92 (1.56)	0.66 (1.14)*	1.82 (1.37)	1.99 (1.54)
頻度（/週）：平均（標準偏差）	2.59 (2.34)	0.82 (1.81)*	1.95 (1.79)	1.93 (1.80)

**p<0.001 *p<0.01, Wilcoxon signed rank 検定または paired-t 検定による

CGI=Clinical Global Impression

(Uchida et al : J Clin Psychopharmacol 26 (in press), 2006 の第1表を許可を得て転載, 一部改変)

第6表：精神症状の変化

	減量群 (N=17)		対照群 (N=17)	
	36週経過 開始時 平均 (標準偏差)	36週経過 時 平均 (標準偏差)	36週経過 開始時 平均 (標準偏差)	36週経過 時 平均 (標準偏差)
PANSS				
総点	55.0 (18.0)	52.0 (17.65)	59.9 (22.1)	60.0 (22.3)
陽性尺度	12.9 (4.5)	12.4 (4.2)	13.0 (5.1)	12.5 (4.8)
陰性尺度	18.2 (7.0)	17.1 (7.1)	19.6 (8.0)	19.7 (7.7)
総合精神 病理	23.9 (8.1)	22.6 (8.1)	26.6 (13.2)	27.2 (13.4)*
GAF	51.0 (16.2)	53.5 (16.7)	56.1 (20.5)	55.7 (20.2)

*p<0.05, paired-t 検定による

PANSS=Positive and Negative syndrome scale, GAF=Global Assessment of Functioning (Uchida et al : J Clin Psychopharmacol 26 (in press), 2006 の第1表を許可を得て転載, 一部改変)

減量群では、16名(94.1%)において知覚変容発作が改善し、うち7人(41.1%)では完全に消失した。GIでは、8名(47.1%)が著明改善、7名(41.2%)が中等度改善、1名(5.9%)が軽度改善を示した。発作の持続時間および頻度は、減量群で有意に減少したが、対照群で有意な変化はなかった(第5表)。

PANSS 総点、PANSS 陽性、陰性、総合精神病理尺度、GAF は、減量群において有意な変化はなく、対照群では PANSS 総合精神病理尺度で有意な増加を認め、その他の評点において有意な変化はなかった(第6表)。また、減量群で PANSS の 30 にわたる下位項目においても有意な変化を呈した項目はなかった。

DIEPSS 総点は、減量群でのみ有意に改善し、下位項目ではジストニア評点のみが改善した(第7表)。全患者のうち13名(38.2%)(減量群6名、対照群7名)が、本発作と眼球上転発作を同時に経験した。減量群の6名の本発作と眼球上転発作は、減量により両方とも改善したが、対照群の7名では変化はなかった。

第7表：DIEPSS の変化

	減量群 (N=17)		対照群 (N=17)	
	36週経過時 開始時 平均 (標準偏差)	36週経過時 平均 (標準偏差)	36週経過時 開始時 平均 (標準偏差)	36週経過時 平均 (標準偏差)
総点	2.18 (3.47)	1.06 (1.75)*	3.24 (2.86)	3.06 (2.77)
下位項目				
歩行	0.29 (0-3)	0.24 (0-1)	0.82 (0-3)	0.82 (0-3)
動作緩慢	0.71 (0-3)	0.53 (0-2)	1.18 (0-3)	1.12 (0-3)
流涎	0.06 (0-1)	0 (0)	0.24 (0-2)	0.24 (0-2)
筋強剛	0.12 (0-1)	0.06 (0-1)	0.12 (0-2)	0.24 (0-1)
振戦	0.29 (0-3)	0.12 (0-1)	0.29 (0-2)	0.18 (0-2)
アカシジア	0 (0)	0 (0)	0.18 (0-2)	0.18 (0-2)
ジストニア	0.82 (0-3)	0.24 (0-1)*	0.76 (0-3)	0.76 (0-3)
ジスキネジア	0.06 (0-1)	0.06 (0-1)	0.18 (0-2)	0.18 (0-2)

*p<0.05, Wilcoxon signed rank 検定による

DIEPSS=Drug-Induced Extrapyramidal Symptoms Scale

(Uchida et al : J Clin Psychopharmacol 26 (in press), 2006 の第1表を許可を得て転載, 一部改変)

考 察

(1) 罹患率と処方との関連

本調査により、抗精神病薬投与中の患者における本発作の罹患率が3.25%であることが判明し、高力価抗精神病薬で治療中の場合の罹患率(3.91%)は、中・低力価抗精神病薬の場合(1.22%)よりも高いことが明らかになった。また、36.4%の患者で眼球上転発作を伴った。

この結果は、本発作は抗精神病薬、特にドパミン受容体遮断作用の強い高力価抗精神病薬と関連があり、その一部はジストニアと関係があることを示唆している。また、我々の研究報告^{7), 8), 16), 17)}を受けて、スペインで行われた本発作の罹患率調査¹⁸⁾によると、抗精神病薬による治療を受けているコーカサス人における本発作の罹患率は3.9%(4/103名)で、うち1名が眼球上転発作を有しており、我々の結果とほぼ同様であった。ゆえに、本発

作の罹患率、および本発作と眼球上転発作との関係は、人種差はないものと推測される。

本発作を有する患者はより社会機能が高く、罹病期間が短かった。この結果は、本発作の内容を詳細に説明するためには高い機能を要するために、実際には本発作を有していても機能が低いために説明できない患者がいた場合、我々がその存在を捕捉出来なかったため、見かけ上、本発作を有する患者の社会機能が高くなっている可能性も否定できない。本発作が社会機能の低い患者には起こらない可能性も否定はできないが、結論で記したように本発作は極めて多彩であり、そのような複雑な経験を機能の低い患者が言語化するのには困難なのかもしれない⁹⁾。

本発作は抗精神病薬の副作用である可能性は高いが、発作群および非発作群の間で抗精神病薬の総投与量に有意な差を見出さなかった。しかし、副作用の頻度は投与量に必ずしも比例せず、むしろ各個体の脆弱性によることが多い。加えて、本発作を有さない患者は、既往のとおり機能が低いため、そのようなより重篤な患者はより多量の抗精神病薬で治療されている可能性も高い。ゆえに、発作を呈する患者は社会機能が高くもともと投与量が少ないために、罹患率と投与量との関係を分かりにくくしたのかもしれない。

(2) 眼球上転発作との関連

本研究および過去の報告から、本発作と眼球上転発作の共通点をいくつか見出した。第一に、夕方から夜にかけて突然出現し、数分から数時間持続する、という特徴が挙げられる²⁾、¹⁹⁾、²⁰⁾、²¹⁾。本研究で発作を呈した患者はすべて夕方から夜に症状を呈する一方、Mazurek²²⁾は急性ジストニアの80%以上が午後0時から午後11時の間に起こると報告した。第二に、両者に対する患者の対処行動、すなわち不快な感覚を軽減するために、臥床したり休養をとったりする行動が共通していた²⁾、²¹⁾、²³⁾。第三に、両者の体験は、抗精神病薬の他の副作用と同様に、自我に受け入れがたく調和しない、すなわち自我違和的で不快である点が挙げられる²⁾、⁶⁾、²⁰⁾、²³⁾、²⁴⁾。統合失調症による症状の場合は、比較的自我に調和する形で体験されるため、この点で異なる。よって、患者は本発作を原疾患による異常体験と明確に区別し、統合失調症に対する病識や病感のない患者でも、本発作の症状に関しては治療者に治療を求める場合が多い。第四に、両者共に、錐体外路症状を改善する抗パーキンソン病薬により軽減される⁶⁾、²⁰⁾、²⁴⁾。第五に、両者共に高力価抗精神病薬でより引き起こされる点が挙げられよう²⁰⁾、²⁴⁾。Swett

ら²⁵⁾によると、ジストニアの頻度は、高力価抗精神病薬であるハロペリドール、フルフェナジンで多く、低力価のクロロプロマジンで低かった。我々の結果では、本発作の罹患率は、高力価抗精神病薬治療群においてより高く、Swettらの報告に共通しているといえよう。

以上の多岐にわたる共通点から、本発作と眼球上転発作は何らかの共通の機序を有する可能性が示唆された。本発作を有する患者の36.4%が眼球上転発作を呈する結果は、この推測を支持しているといえよう。この両者において推測される共通する機序に関しては後述する。

(3) 診断との関連

横断調査、縦断調査では発作を有する患者のすべてが統合失調症と診断されたが、結果の症例報告に示したように、非統合失調症患者2例で、抗精神病薬の投与期間中のみ本発作を呈した。両者とも、再投与により再度発作が出現しており、抗精神病薬との関連が強く疑われた。また、症例2では、1回目のエピソードでは本発作と眼球上転発作の両者を呈し、2回目は本発作のみが出現した。これらの結果から、本発作は抗精神病薬投与中であれば診断に関係なく起こり、また眼球上転発作とも強い関連があることが示唆された。

(4) 薬物減量との関連

縦断研究において、抗精神病薬の減量により本発作は大幅に改善した。本発作は、統合失調症の症状の一つであるとみなされることがいまだ少なくないが、もしその仮説が正しければ、本発作の消退に伴い減量群では、PANSS 評点、特に幻覚や妄想を評価する陽性尺度評点に改善が見られるはずである。しかし、減量群では、PANSS 総点、およびその他の下位項目すべてにおいて有意な変化は認めなかった。減量群において、本発作が原疾患の変化無しに改善した事実は、発作が抗精神病薬の副作用である、という仮説を支持しているといえよう。また、抗精神病薬を平均41.3%減量したにもかかわらず、原疾患の悪化は一切見ず、再発することもなかった。これは本発作が抗精神病薬の過量投与の臨床上的指標になりうることを示している。対照群では、PANSS 総合病理尺度において、26.6から27.2と微増したが、この程度の増加は臨床的には意味はなく、原疾患の自然経過における症状の動揺の範囲内といえるかもしれない。

また、DIEPSS 総点は減量群で有意に改善し、下位項目ではジストニア評点のみが改善した。既往のとおり、本発作とジストニアの一型である眼球上転発作には共通点が多く、この結果はそれを補強したといえる。しかし、

ジストニアの中でなぜ眼球上転発作のみが本発作と関連しているは現時点では不明である。

(5) 予測されるメカニズム

本発作は、抗精神病薬やジストニアとの関連が強い。ため、ドパミンがその病態生理において重要な役割を担っていることは明らかである。ドパミンが視覚処理の多くの段階で機能調整を行っている神経伝達物質であることは知られているが、ドパミンの欠乏はむしろコントラストの検出機能を障害する^{26), 27)}。パーキンソン病患者のコントラスト検出機能の低下はL-dopaによって改善するが、抗精神病薬に代表されるドパミン受容体遮断薬の投与により再び低下することによっても明らかである。よって、本発作のメカニズムは、視覚処理レベルよりも、本発作と眼球上転発作の共通点に基づいて機序を推測したほうが妥当かもしれない。眼球上転発作を含めた抗精神病薬誘発性ジストニアの発生機序はいまだ明確ではないが、基底核がその病態生理において重要な役割を果たしていると考えられている²⁸⁾。その部位におけるドパミン低下状態が大きく関与しているとされているものの、L-dopaが逆にジストニアを引き起こすことがあるように、単にドパミンの活動状態の高低のみで説明付けることは困難である²⁹⁾。つまり、基底核におけるドパミン神経系の活動の高低のみに単純化することは出来ないが、その不均衡が抗精神病薬誘発性ジストニアに関与している、と考えられている。また、基底核は様々な機能を有し、運動機能のみならず、恐怖、嫌悪、不安、覚醒度などの感情にも影響することが報告されている³⁰⁻³²⁾。よって、ドパミンの不均衡により引き起こされた覚醒度の上昇が、視覚過敏および不快な感情を惹起しているかもしれない。ゆえに、抗精神病薬による基底核におけるドパミンの不均衡が、運動症状としての眼球上転発作を、感覚症状としての本発作を引き起こしている可能性が推測される。

(6) 限界

第一に、減量研究が盲検ではないことがあげられる。ただし、我々は既述のように、我々の仮説が患者に伝わらないように配慮したため、患者は結果を予想できなかったと思われる。減量群の改善は劇的なものではあったが、今後更なる大規模なランダム化比較対照試験が望まれる。第二に、本発作を検出する妥当な手法が存在しないため、観察者バイアスを許した可能性がある。本発作のより洗練された診断基準が今後必要である。第三に、発作の頻度および持続時間が患者の自己報告によるため、正確さ

を欠いた可能性はある。しかし、一日中患者に付き添うことは実際無理であろう。第四に、減量研究において、減量の標的用量が標準化されていないことが挙げられる。抗精神病薬の副作用は必ずしも用量依存的ではなく、むしろ各個人に異なった閾値があるため、均一の減量手法を導入することができなかった。ゆえに、標的用量は現在及び過去の臨床症状に基づいて決定した。

(7) 治療方法

抗精神病薬の減量により、現疾患の症状の悪化を見ることが無しに、本発作は軽快または消失した。抗パーキンソン病薬によっても本発作は軽快するが、その薬剤によって消化器系副作用や認知障害といった新たな副作用を引き起こす可能性も否定できない。ゆえに、本発作の出現は、抗精神病薬の過量投与という臨床上の指標になりうる可能性があり、抗精神病薬の減量が治療上有用であると考えられる。

総 括

本発作が、統合失調症の症状ではなく、抗精神病薬の副作用であることを証明するために、まず、罹患率および他の付随症状に関して、聞き取り調査を行った。ついで、非統合失調症における本発作の症状経過を詳細に観察した。最後に、本発作を有する患者に処方されている抗精神病薬を減量し、それにとりま本発作の重症度の変化を調査、検討し、以下の結果を得た。

1. 本発作の罹患率は、抗精神病薬が投与されている患者において、3.25%であり、高力価抗精神病薬治療中の場合、中・低力価に比較してより罹患率が高かった。また、本発作を有する患者の36.4%で眼球上転発作をもなった。
2. 本発作は、抗精神病薬で治療を受けている場合、現疾患の診断に関わらず出現しうるということが明らかになった。すなわち、非統合失調症患者においても本発作が出現することが認められた。
3. 本発作を有する患者において、投与されている抗精神病薬を減量することによって、現疾患の悪化を見ることがなしに本発作は、軽快または消失した。本発作は、抗精神病薬の過量投与の指標になりうる可能性が示唆された。
4. 本発作は、症候学および抗精神病薬との関連において、眼球上転発作との数多くの共通点を有し、その責任病巣として基底核が関与している可能性が示唆された。

付録：罹患率調査における主剤の内訳

高力価抗精神病薬	N	中・低力価抗精神病薬	N
haloperidol	150	levomepromazine	23
risperidone	60	chlorpromazine	14
fluphenazine	18	perphenazine	10
bromperidol	17	sulpiride	8
pimozide	5	zotepine	6
spiperone	4	pipamperone	6
timiperone	2	mosapramine	4
		sultopride	3
		propericyazine	3
		thioridazine	2
		oxypertine	2
		moperone	1

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室鹿島晴雄教授に深謝いたします。また、本研究を直接御指導頂いた翠星ヒーリングセンター総長八木剛平先生、慶應義塾大学医学部精神・神経科渡邊衛一郎講師に深く感謝いたします。さらに、終始御協力と御助言を頂いた大泉病院石井弘一院長をはじめ医局の先生方、井之頭病院鈴木健文先生に御礼申し上げます。

本研究の一部は、第11回日本臨床精神神経薬理学会(2001, 広島), XXIII Collegium Internationale Neuro-psychopharmacologicum (2002, Canada), 第12回日本臨床精神神経薬理学会(2002, 新潟), 第13回日本臨床精神神経薬理学会(2003, 弘前)で発表した。

文 献

- 1) Stahl SM : Essential Psychopharmacology. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
- 2) 山口直彦, 中井久夫 : 分裂病者における知覚潰乱発作について. 分裂病の精神病理 14 (内村幸雄編集). 東京大学出版会, 東京, p. 295-314, 1985
- 3) 山口直彦 : 分裂病者の訴える知覚変容を主とする“発作”症状について. 精神科治療学 1 : 117-125, 1986
- 4) 樋口久, 清水徹男, 菱川泰夫 : 知覚変容発作体験を伴った反復性「発作症状」を示した精神分裂病の2症例—「発作症状」の特徴と biperiden の効果. 精神医学 30 : 1213-1219, 1988
- 5) 渡辺憲 : 抗精神病薬使用中にみられる発作性の知覚変容を中心とする症候群. 精神科治療学 6 : 135-148, 1991
- 6) Higuchi H, Shimizu T, Hishikawa Y : Recurrent

- paroxysmal episodes characterized by perceptual alteration in three schizophrenic patients on neuroleptic medication. Psychiatry Clinical Neurosci 51 : 99-101, 1997
- 7) Uchida H, Suzuki T, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : Antipsychotic-induced paroxysmal perceptual alteration. Am J Psychiatry 160 : 2243-2244, 2003
- 8) Uchida H, Suzuki T, Watanabe K, Kashima H : Antipsychotics-induced hypersensitivity of visual perception. Eur Psychiatry 2005
- 9) 渡辺憲 : 慢性期分裂病における眼球上転発作ならびに発作性知覚変容体験について. 精神神経学雑誌 93 : 151-189, 1991
- 10) World Health Organization : The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. Diagnostic Criteria for Research. WHO, Geneva, 1993
- 11) The American Psychiatric Association : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Ed. APA, Washington D.C., 1984
- 12) 稲垣中, 稲田俊也, 藤井康男, 八木剛平, 吉尾隆, 中村博幸, 山内惟光 : 向精神薬の等価換算. 星和書店, 東京, 1999
- 13) Guy W : ECDEU assessment manual for psychopharmacology. Department of Health, Education and Welfare, Washington DC, p. 217-222, 1976
- 14) Kay SR, Fiszbein A, Opler LA : The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. Schizophr Bull 13 : 261-276, 1987
- 15) 稲田俊也 : 葉原性錐体外路症状の評価と診断. 星和書店, 東京, 1996
- 16) Uchida H, Suzuki T, Yamazawa R, Tomita M, Nemoto T, Kimura Y, Watanabe K, Imasaka Y, Kashima H : Reducing the dose of antipsychotic agents ameliorates Visual Hypersensitivity Attack : an ideal treatment option in terms of the adverse effect. J Clin Psychopharmacol 26 : 2006
- 17) Uchida H, Suzuki T, Tanaka KF, Watanabe K, Yagi G, Kashima H : Recurrent episodes of perceptual alteration in patients treated with antipsychotic agents. J Clin Psychopharmacol 23 : 496-499, 2003
- 18) Magarinos M, Carballo JJ, Garcia-Parajua P : Prevalence of paroxysmal perceptual alterations with antipsychotics. Presented at the 2005 annual meeting of American Psychiatric Association 2005
- 19) Bumpass ER, Knoll JM : Emotional Factors in Oculogyric Crisis. J Nerv Ment Dis 170 : 366-370, 1982
- 20) Raja M : Managing antipsychotic-induced acute and tardive dystonia. Drug Safety 19 : 57-72, 1998
- 21) Ouvrier RA : Progressive Dystonia with Marked Diurnal Fluctuation. Ann Neurol 4 : 412-417, 1978
- 22) Mazurek MF, Rosebush PI : Circadian pattern of acute, neuroleptic-induced dystonic reactions. Am J Psychiatry 153 : 708-710, 1996
- 23) Fahn S : Concept and Classification of Dystonia. Adv Neurol 50 : 1-8, 1988

- 24) van Harten PN, Hoek HW, Kahn RS : Acute dystonia induced by drug treatment. *BMJ* 319 : 623-626, 1999
 - 25) Swett C : Drug-induced dystonia. *Am J Psychiatry* 132 : 532-534, 1975
 - 26) Masson G, Mestre D, Blin O : Dopaminergic modulation of visual sensitivity in man. *Fundam Clin Pharmacol* 7 : 449-463, 1993
 - 27) Bodis-Wollner I : Visual deficits related to dopamine deficiency in experimental animals and Parkinson's disease patients. *Trends Neurosci* 13 : 296-307, 1990
 - 28) Borison RL, Diamond BI : Neuropharmacology of the extrapyramidal system. *J Clin Psychiatry* 48 : 7-12, 1987
 - 29) 寺尾安生, 宇川義一 : ジストニアの病態整理. *脳と科学* 24 : 821-827, 2002
 - 30) Adolphs R : Neural systems for recognizing emotion. *Curr Opin Neurobiol* 12 : 169-177, 2002
 - 31) Davis M, Shi C : The extended amygdala : are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Ann N Y Acad Sci* 29 : 281-291, 1999
 - 32) Afifi AK : The basal ganglia : a neural network with more than motor function. *Semin Pediatr Neurol* 10 : 3-10, 2003
-

慶應医学 第83巻第2号号外
平成18年6月25日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第180号

慶應義塾大学

論文の内容および審査要旨公表

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

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成18年 3月23日 慶大博士甲第2497号	朝 倉 敬 子	昭和47年 1月17日
同 同 第2506号	内 田 裕 之	昭和48年12月 2日
同 同 第2507号	川 口 治 子	昭和48年 1月29日
同 同 第2508号	久 保 田 義 顕	昭和49年12月 3日
同 同 第2510号	茅 野 分	昭和47年11月 1日
同 同 第2515号	八 木 満	昭和49年 9月15日
同 同 第2538号	岡 田 誠 司	昭和48年 7月27日
同 同 第2539号	小 野 寺 成 実	昭和37年12月31日
同 同 第2540号	木 村 章 子	昭和50年10月19日
同 同 第2541号	神 山 淳	昭和52年 6月 9日
同 同 第2543号	辻 美 保 子	昭和49年11月11日
同 同 第2544号	庭 田 聖 子	昭和52年 6月16日
同 同 第2545号	森 定 徹	昭和47年12月13日
同 同 第2546号	吉 田 理 恵	昭和48年 6月28日
同 同 第2547号	四 津 真 人	昭和51年 5月13日
同 同 第2610号	出 来 尾 格	昭和49年 6月15日
同 同 第2611号	羽 鳥 英 樹	昭和48年 1月22日
同 同 第2612号	藤 岡 正 人	昭和51年 4月 5日

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成18年 3月23日 慶大博士甲第2613号	保科光紀	昭和45年 1月23日

論文の内容および審査要旨公表

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

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成18年 3月13日 慶大博士乙第4033号	黒田健司	昭和45年 4月14日
同 第4034号	坂巻弘之	昭和31年 1月14日
同 第4035号	清水健太郎	昭和40年 4月27日
同 第4036号	橋口さおり	昭和39年 4月19日
平成18年 4月10日 慶大博士乙第4037号	杳木章二	昭和38年11月 2日
同 第4038号	鳥海史樹	昭和47年 3月30日
同 第4039号	平林健	昭和38年 1月26日
平成18年 5月 8日 慶大博士乙第4043号	池上健	昭和49年 8月18日
同 第4044号	西脇徹	昭和48年 7月22日

目 次

朝倉 敬子	TEL/AML1 Overcomes Drug Resistance Through Transcriptional Repression of Multidrug Resistance-1 Gene Expression (白血病関連キメラ遺伝子 <i>TEL/AML1</i> による薬剤耐性遺伝子 (<i>MDR-1</i>) の発現抑制機構) 5
内田 裕之	知覚変容発作に関する研究：抗精神病薬の副作用とする立場から 6
川口 治子	Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice (骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞の純化とマウス心臓への移植) 7
久保田義顕	Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development (アンジオポエチン様因子1および2のゼブラフィッシュ血管発生における協調的作用) 8
茅野 分	Relation between social functioning and neurocognitive test results using the Optional Thinking Test in schizophrenia (統合失調症における社会機能とOptional Thinking Testを用いた認知機能検査結果の関係性について) 9
八木 満	DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells (DC-STAMPは破骨細胞と異物巨細胞の融合に必須である) 10
岡田 誠司	In vivo imaging of engrafted neural stem cells : its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury (脊髄損傷に対する移植神経幹細胞のバイオイメージング) 11
小野寺成実	Identification of tissue-specific vasculogenic cells originating from murine uterus (マウス子宮由来の組織特異的血管形成細胞の分離および同定) 12
木村 章子	A comparative study of most suitable miniplate fixation for mandibular symphysis fracture using a finite element model (下顎正中骨折ミニプレート固定方法の安定性に関する有限要素解析による比較研究) 13
神山 淳	Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: Live monitoring and significance in neural development (Notchシグナルの可視化：Notchシグナルの中枢神経発生における時間空間的制御と重要性について) 14
辻 美保子	Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis (可逆性および不可逆性抗Thy-1腎炎モデルのマイクロアレイ解析) 15
庭田 聖子	Prevalence of inappropriate medication using Beers criteria in Japanese long-term care facilities (日本の介護保険施設におけるBeers criteriaに基づく薬剤不適切使用の割合) 16
森定 徹	Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation (アンジオポエチン-1はLYVE-1陽性リンパ管の形成を促進する) 17
吉田 理恵	Association of Cryptorchidism with a Specific Haplotype of the Estrogen Receptor α Gene: Implication for the Susceptibility to Estrogenic Environmental Endocrine Disruptors (停留精巣とエストロゲン受容体 α 遺伝子特定ハプロタイプの関連性：内分泌攪乱物質のエストロゲン作用に対する個体の遺伝的感受性の関与について) 18

四津 真人	The Caudal Migratory Stream: A Novel Migratory Stream of Interneurons Derived from the Caudal Ganglionic Eminence in the Developing Mouse Forebrain (尾側細胞移動経路：マウス発生期終脳における尾側基底核原基に由来する抑制性神経細胞の新しい細胞移動経路)	19
出来尾 格	Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling (培養を介さない分子生物学的プロファイリング法を用いた新規ヒト皮膚常在細菌の探索)	20
羽鳥 英樹	Association of nicotinic acetylcholine receptors with central respiratory control in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats (新生ラット摘出脳幹脊髄標本におけるニコチン性アセチルコリン受容体の中枢性呼吸調節機構への関与)	21
藤岡 正人	Proinflammatory Cytokines Expression in Noise-Induced Damaged Cochlea (音響外傷蝸牛における炎症性サイトカインの発現)	22
保科 光紀	司法解剖例における心中の検討	23
黒田 健司	Prevention of Cancer Cachexia by a Novel Nuclear Factor κ B Inhibitor in Prostate Cancer (前立腺癌における新規NF- κ B阻害剤による癌悪液質の抑制)	24
坂巻 弘之	Clinical and Behavioral Impact of Implementing Community-Based Diabetes Disease Management in Japan (日本での地域糖尿病管理の導入による臨床ならびに患者行動に及ぼす影響)	25
清水健太郎	Spinal Kyphosis Causes Demyelination and Neuronal Loss in the Spinal Cord A New Model of Kyphotic Deformity Using Juvenile Japanese Small Game Fowls (脊柱後弯変形は脱髄と脊髄神経細胞の脱落を生じさせる：小軍鶏を用いた新しい後弯変形の動物モデル)	26
橋口さおり	Effects of morphine and its metabolites on immune function in advanced cancer patients (末期がん患者におけるモルヒネとその代謝産物の免疫機能に及ぼす影響)	27
杓木 章二	Relation between Chromosomal Aberrations and Radiation Dose during the Process of TBI (白血病骨髄移植時全身照射施行時の染色体変異と照射線量との関係)	28
鳥海 史樹	Thymidylate Synthetase (TS) Genotype and TS/dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Level as an Indicator in Determining Chemosensitivity to 5-Fluorouracil in Advanced Gastric Carcinoma - (進行胃癌における5-フルオロウラシル感受性決定因子としてのチミジル酸合成酵素 (TS) 遺伝子多型とTS/ジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼメッセージRNAレベル) -	29
平林 健	Colorectal Motility Induction by Sacral Nerve Electrostimulation in a Canine Model (仙骨神経電気刺激による結腸・直腸運動の誘発)	30
池上 健	Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graftcell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury (ラット脊髄損傷に対するChondroitinase ABC投与と神経幹/前駆細胞移植の併用は移植細胞の移動とgrowth-associated protein-43陽性線維の伸長を促進する)	31
西脇 徹	Reduced Expression of Thrombospondins and Craniofacial Dysmorphism in Mice Overexpressing Fra1 (Fra1高発現マウスにおけるThrombospondin減少と頭蓋形成異常)	32

TEL/AML1 Overcomes Drug Resistance Through Transcriptional Repression of Multidrug Resistance-1 Gene Expression

(白血病関連キメラ遺伝子TEL/AML1による薬剤耐性遺伝子(MDR-1)の発現抑制機構)

朝 倉 敬 子

内容の要旨

白血病の最も重要な予後因子として染色体異常、すなわち遺伝子異常のタイプが挙げられる。一方、白血病の薬剤耐性獲得機序の一つとして、多剤耐性遺伝子(multidrug resistance-1(MDR-1)遺伝子)の高発現があり、MDR-1遺伝子発現レベルの低い白血病症例は予後良好とされている。

予後良好な白血病に見られる染色体異常の一つに、急性骨髄性白血病(AML)のt(8;21)転座がある。t(8;21)を有する白血病は化学療法に高い感受性を示す。この染色体異常により生じるAML1/MTG8キメラ蛋白は転写因子の作用を有し、*in vitro*ではMDR-1遺伝子の発現を抑制することが報告されている。同様に、化学療法高感受性で予後良好な白血病に、t(12;21)転座を有する急性リンパ性白血病(ALL)がある。この転座によりTEL/AML1キメラ遺伝子が生じるが、TEL/AML1キメラ蛋白も転写因子として働くと考えられる。TEL/AML1蛋白にもAML1/MTG8蛋白と同様にMDR-1遺伝子発現に対する抑制作用があるのではないかと予想し、検証を行った。

はじめに、TEL/AML1蛋白のMDR-1プロモーターへの結合を、ゲルシフトアッセイとChIPアッセイで確認した。TEL/AML1蛋白は転写因子AML1のDNA結合領域を含んでおり、MDR-1プロモーター中のAML1結合配列に結合することが予想された。両方のアッセイにおいて、予想通り、TEL/AML1蛋白が配列特異的にMDR-1プロモーターに結合することが示された。さらに、K562細胞にTEL/AML1蛋白の発現プラスミドおよびMDR-1遺伝子のプロモーター領域をサブクローニングしたレポータープラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TEL/AML1はMDR-1遺伝子の転写活性を、約50%に抑制した。また、TEL/AML1を強制発現させたアドリマイシン耐性のK562/Adr細胞では、MDR-1遺伝子産物であるP糖蛋白の発現量が低下した。K562/Adr細胞はP糖蛋白を恒常的に強く発現しており、アドリマイシンによる細胞死が起こりにくいが、TEL/AML1を強制発現させることで薬剤感受性が回復した。

臨床検体におけるMDR-1 mRNA量をreal-time PCR法で測定したところ、TEL/AML1遺伝子を有する小児ALL症例においては、持たない症例と比較してMDR-1 mRNA量が低い傾向が見られた。

以上の結果より、TEL/AML1蛋白によるMDR-1遺伝子発現の抑制は、t(12;21)転座を有するALLの化学療法高感受性、良好な予後を説明する一つの機序と考えられた。

論文審査の要旨

白血病の予後因子として、染色体異常は最も重要である。t(12;21)転座の結果生じるTEL/AML1遺伝子を有する急性リンパ性白血病は、化学療法に対する感受性が高く予後良好であるが、この理由の一つが、TEL/AML1キメラ蛋白による多剤耐性遺伝子(MDR-1遺伝子)の発現抑制であることが明らかにされた。TEL/AML1キメラ蛋白はMDR-1遺伝子のプロモーター領域にあるAML1結合配列に結合し、転写抑制因子として機能していた。

審査では、まず、本研究で使用されているK562細胞への遺伝子導入の効率について質問された。造血器腫瘍の細胞株は浮遊細胞で遺伝子導入が困難なものが多く、導入効率は高くないことが予測された。ルシフェラーゼアッセイおよびウエスタンブロッティング、薬剤感受性回復の確認で遺伝子導入を行った細胞を使用している。いずれもTEL/AML1蛋白の有無によるMDR-1遺伝子発現量の変化は、2倍程度であったが、導入効率が改善されれば、この変化がさらに大きく観察できる可能性が示唆された。また、臨床検体におけるMDR-1 mRNA量についてTEL/AML1陽性症例と陰性症例と比較しているが、この場合、検体中の白血球細胞比率により、TEL/AML1の遺伝子発現に対する影響の強度が変わってくるのが指摘された。研究の背景に関することとしては、正常のAML1やTELの機能、TEL/AML1のleukemogenesisへの関与について質問があった。TEL/AML1はそれのみが存在するだけでは白血病を発症しないことがマウスの実験などで証明されており、TELのsecond hitが白血病化に必要であることが知られている。また、TEL/AML1と同様にAML1を含む、AML1/MTG8キメラ蛋白の発現している細胞では、MDR-1遺伝子の発現量が5分の1程度に抑制されるが、TEL/AML1発現例では2分の1程度であり、この違いについて質問された。両キメラ蛋白ともAML1結合配列に結合し、転写因子として機能することは共通であるが、転写因子に結合するcofactor(この場合corepressor)に違いがあるためと考えられた。さらに、MDR-1遺伝子の発現調節については明らかにされていない部分が大きく、研究中使用された薬剤耐性細胞株の薬剤耐性の機序について確認されるべきであったこと、MDR-1以外の薬剤耐性に関わる因子についての検討の必要性についても指摘された。

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、急性白血病における特定の染色体異常と、抗癌剤高感受性という白血病の臨床的特徴との直接的な関連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 池田 康夫
発生・分化生物学 須田 年生 先端医科学 河上 裕
薬剤学 谷川原祐介

学力確認担当者:

審査委員長: 須田 年生

試問日: 平成17年11月8日

知覚変容発作に関する研究：抗精神病薬の副作用とする立場から

内 田 裕 之

内容の要旨

抗精神病薬を服用中の慢性統合失調症患者において、発作性の視覚を中心とした多彩な知覚変容体験が出現することを山口（1985）が最初に報告し、知覚変容発作（以下「本発作」）と名づけた。その後、抗精神病薬を服用中の躁うつ病患者にも生じることが数例報告され、現在この発作をめぐる見解として、統合失調症固有の症状であるとする精神病理学的立場と、抗精神病薬の薬理作用が関係しているとする精神薬理学的立場に大別できる。この発作は、きわめて自己違和的で苦痛や恐怖を伴い、その予期不安のために生活の質を著しく低下させることが多いが、これまでの報告はほとんど症例報告であり、系統だった研究は皆無であった。そこで、我々は本発作の病因および治療アプローチを検討するために、まず罹患率等の基礎調査を行い、次に本発作を有する非統合失調症患者の症状を検討し、最後に本発作を有する患者に投与されている抗精神病薬を減量し、その効果について検討した。抗精神病薬による治療を受けている患者338名の中で、本発作の罹患率は3.25%であり、特に高力価抗精神病薬において3.91%と高かった（中・低力価では1.16%）。また眼球上転発作を伴う率は36.4%であり、ジストニアとの関連が強く示唆された。また、非統合失調症患者で本発作を有する2名は、共に抗精神病薬の治療中のみ本発作が出現し、1名は抗精神病薬の中止により、もう1名は抗パーキンソンの服用により本発作は消失した。さらに、抗精神病薬の減量が本発作に与える影響に関する縦断研究において、減量群（17名）のうち、16名（94.1%）において知覚変容発作が改善し、うち7名（41.1%）では完全に消失した。また、発作の持続時間および頻度は、減量群で有意に減少したが、対照群で有意な変化はなかった。陽性・陰性症状評価尺度（Positive and Negative Syndrome Scale（PANSS））総点、PANSS陽性、陰性、総合精神病理尺度、Global Assessment Functioningは、減量群において有意な変化はなく、対照群ではPANSS総合精神病理尺度で有意な増加を認め、その他の評点において有意な変化はなかった。薬原性錐体外路症状評価尺度総点は、減量群でのみ有意に改善し、下位項目ではジストニア評点のみが改善した。このように、本発作を有する患者において、投与されている抗精神病薬を減量することによって、現疾患の悪化を見ることなしに本発作は、軽快または消失した。そこで、本発作は抗精神病薬の過量投与の指標になりうる可能性が示唆された。また、本発作は、症候学および抗精神病薬との関連において、眼球上転発作との数多くの共通点を有し、その責任病巣として基底核が関与している可能性が示唆された。

論文審査の要旨

知覚変容発作（以下、本発作）は、統合失調症固有の症状か、抗精神病薬の副作用かこれまで結論を見ることはなく、治療手段の確立に至ることはなかった。本研究では、本発作の罹患率等の基礎調査を行ない、続いて抗精神病薬で治療中に本発作が出現した非統合失調症患者の症状と処方との関連を検討した。さらに、本発作を有する患者に対して投与中の抗精神病薬の減量することによる症状の変化を検討した。その結果、本発作の罹患率は3.25%であり、特に高力価抗精神病薬において高かった。また眼球上転発作を伴う率は36.4%であり、ジストニアとの関連が強く示唆された。また、非統合失調症患者で本発作を有する2名は、抗精神病薬の治療中のみ本発作が出現した。減量研究においては、抗精神病薬の減量により、現疾患の悪化を見ることなしに、本発作は軽快または消失した。以上の結果から、本発作は抗精神病薬の副作用である可能性が強く示唆され、抗精神病薬の過量投与の指標になりうる可能性が示された。

審査では、まず抗精神病薬の換算表の出典についての質問がなされた。本研究で使用した稲垣らの換算表は過去の臨床試験に基づき算出され、本邦で使用されている全ての抗精神病薬を網羅しているために使用したとの回答がなされた。続いて抗精神病薬の各薬剤間における本発作の出現頻度の差異に関して質問がされ、各薬剤間に有意な差はないと回答された。また抗精神病薬の抗コリン作用により惹起された散瞳による視覚過敏との差異についての指摘があり、本発作は発作性に短時間のみ持続するが、散瞳による症状は終日持続する点で異なると回答された。次に、海外における本発作の位置づけに関して質問され、これまで海外での報告はなかったが、今回の一連の研究をうけて行われたスペインでの調査によれば、罹患率は本研究とほぼ同等の値であり、人種差は見出されなかったと回答された。また、本発作が若年で社会機能の高い患者に多い理由について問われたが、本発作の内容を詳細に説明するためには高い機能を要するため、見かけ上、本発作を有する患者の社会機能が高くなっている可能性があるとの回答された。また本発作はドパミン受容体のどのサブタイプが関与しているかの問いに対しては、抗精神病薬との密接な関連から、ドパミンD2受容体の関与が推測されると回答された。PANSSやDIEPSSなどの不連続変数に対して、正規分布を前提とする検定を使用したことについては、正規分布をとることを確認したうえで使用したと回答された。病態生理に関し後頭葉との関連につき問われたが、後頭葉のドパミン受容体の遮断により、動物レベルにおいてはむしろコントラスト感受性を下げるため、後頭葉と本発作との関連は薄いと考えられると回答された。また、てんかんを含めた脳波異常との関連に関して質問がされ、本研究で本発作を有する患者はすべて脳波異常がなかったと回答された。今後の課題として、疾患の特性上、減量研究に関しては、さらなる長期転帰の調査が望ましいとの指摘がなされた。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、知覚変容発作の位置づけおよび治療手段を明らかにし、抗精神病薬の適正使用に応用しうる可能性を示唆した点で、臨床的に有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 精神神経科学 鹿島 昭雄
内科学 鈴木 則宏 外科学 河瀬 斌
薬剤学 谷川原祐介

学力確認担当者：

審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成17年12月27日

Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice

(骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞の純化とマウス心臓への移植)

川口 治子

内容の要旨

近年、胚性幹細胞や骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋細胞の再生が可能となりつつあり、再生心筋細胞は細胞移植の手段として重要な役割を果たすと考えられる。しかし、現在細胞移植に用いられている細胞は、幹細胞を含む分化した様々な細胞の集団であり、目的以外の細胞が多数含まれている。より安全に心臓に細胞を移植するためには、心筋細胞に分化した細胞を選択的に回収し、移植をせねばならない。

当研究室ではこれまで骨髄中に存在する間葉系幹細胞から心筋細胞に分化誘導し得るCMG (cardiomyogenesis) 細胞を樹立した。本研究では、このCMG細胞より心筋細胞を分化誘導し、分化した心筋細胞を効率よく分離し、移植する方法を確立するとともに、分離した細胞が如何なる性状を有するかを解析し、マウス心臓への移植後の組織学的解析を行うことを目的とした。

心室筋細胞特異的な発現をするmyosin light chain-2v (MLC-2v) 遺伝子のプロモーターの下流に蛍光色素EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) 遺伝子を繋いだ組み換えプラスミドをCMG細胞に遺伝子導入し、マーキングしたCMG-EGFP細胞を作製した。このCMG-EGFP細胞を分化誘導すると、心筋細胞に分化した細胞のみ緑色の蛍光を発し、細胞特異的の標識が可能となった。さらにFACSにより99%以上の純度で心筋細胞のみを回収することができた。回収したCMG-EGFP細胞を3週間継続培養したところ、自律拍動を呈した。FACSにより回収したCMG-EGFP細胞は α -skeletal actin、 β -myosin heavy chain、MLC-2v、CaV1.2などの心筋特異的の遺伝子を発現することがわかった。活動電位を記録すると、心室筋様であった。また回収したCMG-EGFP細胞へのBrdUの取り込みを調べると、培養7日目で取り込みが停止し、その後全くBrdUは取り込まれなかった。このことから移植後、cardiosarcomaに変異する危険性はなく、移植に適した細胞であることがわかった。そこで、このCMG-EGFP細胞を成獣マウスの左室自由壁に注射針を用いて細胞移植したところ、レシピエントの心筋細胞の細胞間隙に移植され、周囲の細胞とGAP結合を介して結合していることが明らかになった。また、これらの細胞は長期間レシピエントの心臓に生着することも示された。

本研究は、成獣および成人の骨髄から単離、かつ分化させた再生心筋細胞が、胎児心筋細胞の代替細胞として、心筋細胞移植のツールとして使用可能であることを示したものである。今後の心臓疾患の治療のための有効なモデルであると考えられる。

論文審査の要旨

近年、再生医療の発展により骨髄幹細胞や胚性幹細胞を用いた心筋細胞の再生が可能となり、虚血性疾患の細胞移植治療への臨床応用が行われ始めている。しかし、移植に用いる細胞は心臓以外の様々な組織へと分化する細胞が混在したものが多く、本研究では、骨髄中に存在する間葉系幹細胞から分化誘導した再生心筋細胞であるCMG (cardiomyogenesis) 細胞を純化する方法を開発し、心臓への移植を行った。心筋細胞特異的の蛋白質であるMLC-2vのプロモーター領域に蛍光蛋白であるEGFP遺伝子をつないだpMLC-2v-EGFPを作製し、CMG細胞のマーキングを行った。ソーティングにより心筋細胞にのみ分化するCMG-EGFP細胞を純化することに成功した。回収したCMG-EGFP細胞は心室筋特異的の遺伝子の発現、心室筋特異的の転写因子の発現、connexin 43の発現、活動電位等から胎児心室筋様の性質を持つことが明らかとなった。さらにCMG-EGFP細胞を成獣マウスの心臓へ移植し、4週間後に心臓を摘出し、組織学的解析を行ったところ、レシピエントの心筋細胞とgap junctionを介して結合し、長期間生着することが示された。

論文審査においては、pMLC-2v-EGFPシステムにより純化して得られたCMG-EGFP細胞を分化のどの段階で移植に用いるのが適切か、移植後に起こりうる不整脈の危険性に関する考察が論点となった。本研究では純化して得られたCMG-EGFP細胞を5日間培養したものをを用いたが、分化早期の細胞を移植すると不整脈を起こしうる危険性があるとの指摘を受けた。また、CMG-EGFP細胞の分化に伴う各種イオンチャンネルの発現についての検討が不十分であれば不整脈の発症頻度が増加するという問題提起もなされた。分化早期のCMG-EGFP細胞ではL-type Ca^{2+} チャンネルが発現していると回答された。K⁺チャンネルの発現が不十分であると不整脈が発症しやすくなるので、移植に用いるCMG-EGFP細胞がどの分化段階に達したときに移植すべきか、詳細な検討が必要であると指摘された。また、gap junctionの指標であるconnexin 43の発現パターンを移植後、時間経過に応じて調べておく必要があることも指摘された。本研究では、移植後4週目に関して、レシピエントの細胞とCMG-EGFP細胞がgap junctionを介して結合することを示した。しかし、細胞の分化に伴い、gap junctionの発現部位が細胞周囲全体から細胞の両端へと移動をすることから、移植後早期からconnexin 43の発現パターンを検討する必要があると指摘された。また、シート工学との比較についても質問されたが、治療法としてはどちらの方法も有効であると考えられるが、細胞移植の方がカテーテルなどを利用でき手技的に簡便であると回答された。さらに、将来的に、純化して得られたCMG細胞を臨床応用するためにはどのようなプロセスが必要か質問されたが、移植後、年単位での経過観察を行うこと、また移植に用いる細胞のin vitroでの大量培養システムの確立、ブタなどの中型動物を用いた移植実験の実施等が必要であると回答された。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき課題を残しているものの、骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞を純化する方法の開発と成体への移植適応を示したという点で有意義であり、今後の発展が期待されると評価された。

論文審査担当者 主査 医化学 末松 誠
内科学 小川 聡 外科学 四津 良平
発生・分化生物学 須田 年生
学力確認担当者：
審査委員長：小川 聡

試問日：平成17年12月5日

Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development

(アンジオポエチン様因子1および2のゼブラフィッシュ血管発生における協調的作用)

久保田 義 頭

内容の要旨

論文審査の要旨

アンジオポエチン様因子 (Angptl) はアンジオポエチンファミリーと類似の構造を持つ分泌性タンパクとして、哺乳類において Angptl1 から Angptl6 までの6種類が見出されており、アンジオポエチンと同様、血管をはじめとする様々な組織において重要な機能を有することが示唆されているが、現在受容体は同定されておらず、その機能に関しては殆ど理解されていない。その中で Angptl1 と Angptl2 は特に相同性が高く、推定受容体結合領域であるフィブリノゲン様ドメインにおいては約80%の相同性を有し、共通の受容体を介した協調的または競合的作用の存在が示唆されている。今回われわれはゼブラフィッシュの系において、アンチセンス法 (モルフォリーノ) による両遺伝子のノックダウンを行うことで、両遺伝子の生理的機能につき検証した。

まず、われわれのクローニングしたゼブラフィッシュ Angptl1 と Angptl2 遺伝子の全長の塩基配列をもとに、それぞれの転写を特異的に阻害するモルフォリーノを作成し、これらをゼブラフィッシュ受精卵に注入することで、両遺伝子のノックダウンを試みた。その結果、Angptl1 と Angptl2 各々単独のノックダウンでは表現型は現れなかったが、両者を同時にノックダウンした場合、背側大動脈から発芽する節間血管が欠失し、それ以降の血管の発生が進行せず、受精後約72時間で心嚢液貯留をきたし死亡した。また、節間血管の欠失は同血管の血管内皮細胞のアポトーシスによって引き起こされており、それ以前の血管発生、すなわちヘマンジオブラストの出現、背側大動脈、後主静脈の形成過程には異常は無かった。In vitro の系において Angptl1 と Angptl2 タンパクは血管内皮細胞株 (HUVEC) に競合的に結合し、この細胞株に対してPI3キナーゼ/Akt経路を介した抗アポトーシス作用を有することを見出した。さらにはゼブラフィッシュの系において、恒常活性化型Akt (myristoylated Akt) のmRNAを Angptl1 と Angptl2 両者のノックダウンの個体に注入することで、血管の異常が有意に救済されることも確認した。

以上の結果より、ゼブラフィッシュ血管発生において Angptl1 と Angptl2 はPI3キナーゼ/Akt経路を介した抗アポトーシス因子として血管内皮細胞に協調的に作用することが示された。

アンジオポエチン様因子はアンジオポエチンファミリーと類似の構造をもつ分泌性タンパクであるが、現在受容体は同定されておらず、その機能に関しては殆ど理解されていない。そのファミリーの中で Angptl1 と Angptl2 は特に相同性が高く、協調的または競合的作用の存在が示唆されている。本研究は、その両遺伝子の発生期における生理的機能につきゼブラフィッシュの系を用いて検証された。近年、ゼブラフィッシュは、血管発生研究においても、その発生の早さ、血管構築の可視化の容易さ、遺伝子操作の簡便性などから広く利用されている。本研究においては、それらの利点が最大限に生かされ、Angptl1 と Angptl2 がゼブラフィッシュ血管発生においてPI3キナーゼ/Akt経路を介した抗アポトーシス因子として血管内皮細胞に協調的に作用することが示された。これにより、ヒトを含めた哺乳類の血管発生において、この2分子の協調的作用が必須であることが示唆された。

審査ではまず、両遺伝子のノックダウンの手段として用いたモルフォリーノの特異性の評価について質問がなされた。これに対しては、蛋白レベルでの発現低下を評価するためにはゼブラフィッシュ蛋白に対する抗体を作成し、ウエスタンプロットなどで定量化することが直接の証明になり得るが、本研究ではその抗体の作成まで至っていないものの、両遺伝子の他の塩基配列を標的として作成したモルフォリーノでほぼ同じ結果が得られること、5塩基置換型のモルフォリーノで表現型が現れないことなど、間接的な証明がなされていると回答された。次いで、受精卵に注入したモルフォリーノの持続期間、および他組織への非特異的影響について問われた。これに対し、ゼブラフィッシュの発生過程で細胞分裂は哺乳類同様、活発に繰り返されるものの、個体全体としての大きさは殆ど変わらないため、注入物質が希釈されていく程度は低く、また糖鎖の付加により分解されにくい構造として合成されており、一般的に注入後48時間は効果を持続することができると考えられている旨説明された。また、全身への影響に関しては、注入量が過剰になれば他の組織における異常も見られるものの、少量の注入では血管に選択的に異常が見られることや、少なくとも心臓、体節、消化管には異常が見られないことを確認していると回答された。最後に今後の本研究の展開についての展望について問われた。これに対しては、両遺伝子に関して哺乳類にも共通した協調的作用が存在するか否か検討すべく、ダブルノックアウトマウスの解析が必須であり、現在それを作成中であるとの説明がなされた。

以上のように本研究は今後さらに検討すべき点はあるものの、ゼブラフィッシュ血管発生における Angptl1 と Angptl2 の協調的作用を明らかにした点で、血管生物学の分野において大変価値のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 発生・分化生物学 須田 年生
構造生物学 福田 恵一 眼科学 坪田 一男
皮膚科学 天谷 雅行
学術確認担当者：
審査委員長：福田 恵一

試問日：平成17年12月22日

Relation between social functioning and neurocognitive test results using the Optional Thinking Test in schizophrenia

(統合失調症における社会機能とOptional Thinking Testを用いた認知機能検査結果の関係性について)

茅野 分

内容の要旨

統合失調症の研究において、認知機能に関する知見は多いが、社会的認知に関する知見は少ない。社会的認知の中で問題解決能力は社会機能を発揮する上で重要な能力である。そこで本研究では、問題解決能力の処理技能における代替思考に焦点を当て、認知機能と社会機能との関係性を検討した。代替思考は拡散思考の一つと考えられ、回答が限定しない問題により測定する。我々は拡散思考の階層構造を調べるため、Letter Fluency Test (Letter FT), Category Fluency Test (Category FT), Optional Thinking Test (OTT) を施行した。OTTは、現実的な生活問題における代替案の測定尺度で、これまでに統合失調症の患者に用いられたことはない。

統合失調症患者36名と健常対照者25名に、Letter FT, Category FT, OTTを施行し、更に認知機能の評価としてMini-Mental State Examination (MMSE), Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT), Letter Cancellation Test (LCT), 精神症状の評価としてPositive and Negative Syndrome Scale (PANSS), 社会機能の評価としてGlobal Assessment of Functioning (GAF), Social Functioning Scale (SFS), Life Assessment Scale for the Mentally Ill-Interpersonal Relations (LASMI-I)を施行し、結果を両群間で比較検討した。

統合失調症患者群は健常対照者群に比較してMMSE, RAVLT, LCT (時間), Fluency Tests, OTTの得点が明らかに低値であった。またOTTの統合方略はLCT (正答数) と相関した。OTTの回答を定性的に問題解決の方略別に分類したところ、両群において各方略の割合に差異は認められなかった。すなわち統合失調症患者群の回答は、健常対象者群と比較して問題解決の方略に定性的な差異はないものの、定量的には有意に少なかった。

OTTの得点はGAF, SFS, LASMI-Iなどの社会機能の評価とは相関しなかった。OTTで評価される代替思考は社会機能に反映するものではなく、要素的な認知機能との関係が認められた。先行研究において、処理技能のうち方法・目的思考を評価するMEPS (Means-Ends Problem-Solving) の得点が社会機能と相関していた結果とは対照的であった。今後は更に統合失調症の問題解決能力を精査し、社会機能を回復するための手段を考える必要性が示唆された。

論文審査の要旨

本研究では、統合失調症の問題解決能力における代替思考へ焦点が当てられ、認知機能と社会機能の関係性が検討された。代替思考は知能における拡散思考の一つで、答えが限定されない問題により測定される。現実的な生活問題における代替の解決方略を測定する尺度にOptional Thinking Test (OTT) がある。本研究では、統合失調症36名と健常対照者25名にOTT、認知機能の評価として全般的知能、記憶、注意、各種Fluencyに関する検査、精神症状の評価としてPANSS、社会機能の評価としてGAF, SFS, LASMI-Iの各スケールが施行された。統合失調症群は健常対照群に比較して全般的知能、記憶、注意、各種Fluencyに関する検査、OTTが低値であった。統合失調症群のOTTはGAF, SFS, LASMI-Iなどの社会機能と相関せず、Fluency Testsなどの認知機能と相関し、さらに統合方略は注意検査 (正答数) と相関していた。問題解決の方略の割合に差異は認められなかった。すなわち、統合失調症群の回答は健常対照群と比較し、問題解決の方略に定性的な差異はないものの、定量的には有意に少なかった。

審査ではまず対象として、統合失調症群が若年、軽症例であることが問題とされた。これには、検査の性質上、研究に同意して検査が可能な対象として、老年、重症例は不適当であり、長期間の罹病や服薬の影響を受けていない者となったと回答された。しかし統合失調症の全体像を考慮した場合、状況が許す範囲で、今後、対象を拡大し比較、検討することも必要であると指摘された。また健常対照群について、特に認知機能とOTTとの相関も検討すべきとの指摘がなされた。今回は先行研究を踏まえ、まずは健常対照群と統合失調症群との差異についてのみ注目したが、今後は健常対照群に加え、他の精神疾患群との比較も行いたいと回答された。次にOTTの評価方法として、消極的方略が不適切な回答として除外されたことについて、統合失調症群ではこの方略を用いる場合が少なくないと思われ、これが結果にも影響を及ぼしたのではないかと質問がなされた。これには本来の課題設定が消極的方略を認めるものではなく、実際に方略数としても多くはなかったことが回答された。しかし今後は、全回答を考慮の上、除外された回答についても検討を加えることが、統合失調症の思考や行動の特徴をより明らかにするためには有用であるとの示唆があった。統計については、対象や結果の一部、評価者間信頼性などについて今回と異なった方法が提案され、今後の課題として指摘された。結果に関し、年齢や罹病期間、神経遮断薬量、さらに病気の種類や重症度などについても検討すべきとの意見が述べられ、統計的手法によるOTTの質的な解析も行うべきとの提案がなされた。

以上、本研究は幾つかの検討すべき課題を残しているが、統合失調症の問題解決能力における代替思考に焦点を当て、認知機能と社会機能の関係性について確認し、今後の治療的介入に有益な示唆を与える点で、臨床的に価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 精神神経科学 鹿島 晴雄
内科学 鈴木 則宏 外科学 河瀬 斌
衛生学公衆衛生学 大前 和幸
学力確認担当者：

審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成17年12月27日

DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells (DC-STAMPは破骨細胞と異物巨細胞の融合に必須である)

八 木 満

内容の要旨

破骨細胞は生体で唯一骨吸収能を持つ細胞であり、細胞融合により多核の巨細胞を形成する。しかし細胞融合の制御機構は知られていない。われわれはすでに破骨細胞とマクロファージが共通の前駆細胞から分化することを見出し、これら発現分子の非常に似た細胞間でDNAサブトラクション法を行うことにより、破骨細胞に特異的な分子を同定した。そこで破骨細胞の融合に必須な分子を特定するために、分化に伴って強く発現が誘導され、破骨細胞に特異的に発現している新規分子DC-STAMP (Dendritic Cell Specific Transmembrane Protein) に注目した。この遺伝子の生理的機能を解明するためにDC-STAMP遺伝子欠損マウスを作成し、以下の実験を行った。

DC-STAMP欠損マウスはosteopetrosisであった。骨形成能は正常であったが、骨吸収能の低下と破骨細胞の形態異常が観察された。電子顕微鏡を用いて詳細に検討すると破骨細胞は骨吸収に必須である波状縁等を正常に持つ成熟破骨細胞であることがわかった。一方でそれぞれの破骨細胞は単核であった。そこでin vitroで培養するとDC-STAMP欠損マウスの破骨細胞はTRAPをはじめとする既存の破骨細胞分化マーカーや機能分子は発現しており細胞増殖能も正常であったが、多核の破骨細胞を完全に欠いており、骨吸収効率が著明に低下していた。DC-STAMP欠損マウス由来のマクロファージは高密度培養やサイトカインの大量投与等を行っても多核の破骨細胞は形成されなかった。したがって、DC-STAMPは細胞の凝集能や未知の細胞融合に必須な分泌因子等に影響しているのではなく、破骨細胞同士が接触し融合する現象で直接働き、他の因子では補填できないことを見出した。以上から、DC-STAMP欠損マウスでは破骨細胞前駆細胞が融合できず、多核の破骨細胞が完全に欠除するため骨吸収能が低下し、osteopetrosisを呈することを解明した。また、DC-STAMPは破骨細胞の融合に必要であり、生理的骨量調整に必須の分子であることを明らかにした。またマクロファージは慢性炎症に反応して巨細胞を形成することが知られているが、DC-STAMP欠損マウスの皮下に異物を包埋し異物反応を惹起しても多核の異物巨細胞がまったく形成されず、またin vitroでも巨細胞が形成されず、破骨細胞と異物巨細胞等のマクロファージ系細胞の融合がDC-STAMPを介した共通の現象であることを明らかにした。

関節リウマチや癌の骨転移では、生理的に形成される破骨細胞より巨大な破骨細胞が形成され、これら巨大な破骨細胞による病的な骨吸収が病態となっていることが知られている。DC-STAMPを介した破骨細胞の融合制御機構の解明が、関節リウマチや癌の骨転移の病態解明の手がかりとなると考えられる。

論文審査の要旨

破骨細胞は生体で唯一骨吸収能を持つ細胞であり、細胞融合により多核の巨細胞を形成する。しかし細胞融合の制御機構は知られていない。そこで破骨細胞とマクロファージの間でDNAサブトラクション法を行うことにより、破骨細胞に特異的な分子であるDC-STAMP (Dendritic Cell Specific Transmembrane Protein) を同定し、遺伝子欠損マウスを作製した。DC-STAMP欠損マウスの破骨細胞は骨吸収に必須である波状縁を正常に持つ成熟破骨細胞であったがすべて単核であった。そこでin vitroで培養するとDC-STAMP欠損マウスの破骨細胞は既知の破骨細胞マーカーや機能分子は発現しており細胞増殖能も正常であったが、破骨細胞の融合が起こらないために、骨吸収効率が著明に低下していた。したがって、DC-STAMPは破骨細胞の融合に必須な受容体であり、DC-STAMP欠損マウスでは破骨細胞の融合が起こらないために骨吸収能が低下し、osteopetrosisを呈することを解明した。またマクロファージは慢性炎症に反応して巨細胞を形成することが知られているが、DC-STAMP欠損マウスの皮下に異物を包埋し異物反応を惹起しても多核の異物巨細胞が形成されず、またin vitroでも巨細胞が形成されないことから、破骨細胞と異物巨細胞等のマクロファージ系細胞の融合がDC-STAMPを介した共通の現象であることを明らかにした。

審査では まずDC-STAMPの局在と発現時期に関する質問がなされた。DC-STAMPは血液系細胞では破骨細胞の分化に伴い細胞融合の前段階から成熟破骨細胞まで破骨細胞に特異的に発現しており、各臓器でも発現が確認されているが、細胞レベルでは破骨細胞以外では発現は明らかでないと回答された。また、受精や肝細胞の融合等の他の生体内の細胞融合におけるDC-STAMPの役割についての質問がなされ、受精時や筋芽細胞の融合には影響しないが、肝細胞とマクロファージの融合等に関しては検討中であるとの回答がなされた。さらに癌の骨転移部や骨巨細胞腫における発現や役割についての質問がなされ、骨巨細胞腫においてDC-STAMPが強く発現しているとの報告があり、局所の破壊性骨疾患におけるDC-STAMPの役割が示唆されると回答された。続いて、細胞融合時のDC-STAMPを介したシグナルに関する質問がなされ、DC-STAMPのC'末端が重要であるが詳細は不明であるとの回答がなされた。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、DC-STAMPが破骨細胞の融合に必須であることが示された点および、DC-STAMPを介した破骨細胞の融合制御機構の解明が、将来的に関節リウマチや癌の骨転移の病態解明の手がかりとなると考えられる点で評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 亨宇
形成外科学 中島 龍夫
学力確認担当者：
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成17年12月28日

In vivo imaging of engrafted neural stem cells : its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury

(脊髄損傷に対する移植神経幹細胞のバイオイメージング)

岡田 誠司

内容の要旨

医療分野に於いて様々な疾患に対する細胞移植療法の有用性が研究されている。特に近年、これまで治療法の存在しなかった脳や脊髄といった中枢神経系の外傷に対し、新しい治療法として神経幹細胞移植が注目を浴びている。しかしながら、移植細胞の生存や体内移動などの経時的動態評価は組織切片に基づくもので、何個の細胞が正確に移植されたか、あるいは何%の細胞が生着しているかを動物を生かしたまま解明するのは困難であった。これらのことが解明できれば神経幹細胞の性質に関する基礎的研究を前進させるのみならず、より効果的な移植の方法やタイミングなど、将来の臨床応用へのプロトコル作成に有用であることは間違いない。そこで我々は蛍光の原理を利用したバイオイメージングシステムを利用して、マウスの損傷脊髄に移植した神経幹細胞の動態を観察することを目的とした。このイメージングシステムは発光酵素であるfirefly luciferaseとその基質であるluciferinの反応による微弱な発光を超高感度CCDカメラにより検出するというもので、この反応が酵素とATP依存性であるため生きた細胞のみしか発光しない。そのためMRIなどの他のイメージングシステムとことなり正確な移植細胞の生存率を求めることができる。我々はレトロウイルスの一種であるレンチウイルスを用いて、蛍光と発光を同時に呈するレポーター遺伝子を神経幹細胞に導入し、この細胞の性質を検討した。その結果、レポーター遺伝子を導入してもニューロンやグリアへの分化率は変化しないことや、in vitroではわずか100個程度の細胞数で十分に検知できることを確認した。これらの細胞の発光強度は非常に強く、これまでは腫瘍細胞や感染巣等、移植後に発光が経時的に増加する系でしかこのイメージングシステムは適応されていなかったが、我々は損傷脊髄への移植のような移植後に細胞数が激減する系においても有用であることを初めて示した。損傷脊髄へ移植された細胞の80%近くは移植後数日で死滅してしまうが、残った細胞は移植部位に生着し長期にわたり比較的安定した発光を保つことが明らかになった。また、損傷直後と損傷後亜急性期で移植した場合では細胞の生存率は変化なかったものの、細胞の生着部位や分化の割合には差が見られた。とくに亜急性期に移植した場合には移植細胞の移動も動物を生かしたまま観察できた。優れたイメージングの手法は医学的研究を大きく発展させるが、我々の本論文での方法は理論上すべての細胞移植療法研究に適応できるものであり、今後の発展応用が期待される。

論文審査の要旨

これまで細胞移植の研究領域では移植細胞の生存や体内移動などの経時的動態評価は組織切片に基づくもので、それぞれのtime pointで動物をsacrificeするため膨大な個体数が必要であり、また個体間のばらつきもあるため解析は非常に労力を要するものであった。動物を生かしたまま同一個体で移植細胞の生存や動態を把握することができれば非常に強力な研究ツールと成り得る。我々はまず、Luciferase遺伝子を有するトランスジェニックマウス由来の神経幹細胞とレンチウイルス・ベクターによりLuciferase遺伝子を導入した神経幹細胞の発光強度を比較検討したが、前者に比べ後者では5000倍高い発光強度が

得られた。さらにこれらの細胞の発光強度が細胞数と相関することをin vitro, in vivoにて示した。レポーター遺伝子をウイルス導入した神経幹細胞をin vitroにて分化させても分化形態に影響を与えないことを確認した。16匹のマウス脊髄内に、neurosphere法により増殖した後に50万個に細胞数を調整した神経幹・前駆細胞を移植し、その直後に発光量を測ることで正確に移植が行われているかを確認した。その結果、同量の細胞数を移植したつもりでも発光量にある程度のばらつきが見られた(236,000-8,474,000 photon/sec, $4.60 \pm 0.45 \times 10^6$ photon/mouse/sec)が、標準誤差が9.7%と実験精度には問題ないと判断した。急性期移植群と亜急性期移植群で移植後の発光強度を測定したが、両者とも移植後4日でそれぞれ20.5%, 22.1%に減弱が見られ、移植後6週では16.4%, 14.6%であった。両群の細胞生存率に有意差は見られなかったが、生着細胞のうち、急性期移植群ではニューロンやオリゴデンドロサイトへの分化率はそれぞれ0.99%, 1.27%であったが、亜急性期移植群ではそれぞれ8.33%, 11.8%であった。

審査では、移植細胞の発光強度は細胞の生存率の他にどのような因子によって影響されるのかとの質問がなされた。これに対して、移植部位の血流動態および移植部位から体表面までの距離が大きく発光強度に影響するとの回答がなされた。さらに、移植後に細胞が拡散する場所、たとえば循環器系に移植された場合これを長期に追跡することが可能かとの質問に対しては、移植後に増殖する造血幹細胞などの追跡であれば十分可能であるとの回答がなされた。損傷脊髄に移植された細胞の移動に関してどこまで正確にイメージングで反映できるのかとの指摘に対しては、ある程度以上の細胞数が移動しなければイメージングには反映されないため、細胞の正確な局在等に関してはMRIとの併用によるin vivoイメージングを行うことが望ましいと回答された。また、これまでの報告ではラット脊髄損傷においては急性期移植と亜急性期移植で細胞の生着率に差があるのに対し、本研究においてマウス脊髄損傷では差がなかった理由についても質問がなされたが、ラット等では損傷中心部に空洞が形成されるため移植細胞が生着しないがマウスでは結合組織癒着が形成されこれに移植細胞がトラップされるため急性期移植でも細胞の生着が見られたのだろうとの回答がなされた。さらに、急性期移植と亜急性期移植で細胞の分化形態の違いは見られたがこれが機能的回復にどのような影響を与えたのかとの質問に対しては、本研究では未検討であるが今後生着細胞のみを選択的にablationする系をこのイメージングシステムと組み合わせることで明らかにしたいとの回答があった。さらに、亜急性期移植群では運動機能回復傾向が持続的に認められたため、より長期に運動機能評価を継続するべきであったとの指摘がなされた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき点を残しているものの、非侵襲的かつ簡便に移植細胞の追跡が可能で本システムは、幅広い研究領域に応用でき再生医学研究に於いて強力なツールと成り得るという点で非常に有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 生理学 岡野 栄之
内科学 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範
外科学 河瀬 斌

学力確認担当者：
審査委員長：鈴木 則宏

試問日：平成18年1月19日

Identification of tissue-specific vasculogenic cells originating from murine uterus

(マウス子宮由来の組織特異的血管形成細胞の分離および同定)

小野寺 成実

内容の要旨

子宮内膜は月経に伴う剥脱および再生が繰り返し行われることから、「再生能の高い成体の組織」と考えられる。これは、子宮内に組織の再生に必要な幹細胞あるいは前駆細胞が含まれていることを示唆するものである。そこで本研究では、マウス子宮内に存在する組織特異的血管形成細胞の有無とその分化能について検討することを目的とした。

まず、マウスの子宮を酵素処理し子宮由来の細胞群を得た後、細胞表面マーカーであるCD34およびCD45抗体を用いたフローサイトメトリーにより、CD34+/45- (Ut-34)、CD34-/45- (Ut-DN) およびCD45抗体陽性細胞群 (CD34+/45+およびCD34-/45+) の4分画に分離した。Ut-34およびUt-DN細胞群は、血管内皮細胞関連マーカー (Flk-1、c-kit、VE-cadherin) は陰性であったが、Ut-DN細胞群には同じく血管内皮細胞マーカーであるCD31陽性の細胞が約2.8%認められたため、Ut-DN細胞群をさらにCD31陽性分画と陰性分画に分離した。

GFP遺伝子導入マウスよりUt-DN/CD31陽性、Ut-DN/CD31陰性、Ut-34細胞群を得た後、生体での分化能を検討するため、同系野生型マウスの前脛骨筋重度損傷モデルに直接筋内移植した。移植4週間後、Ut-DN/CD31陰性細胞群において、ドナー由来 (GFP陽性) の血管平滑筋細胞 (α -smooth muscle actin抗体陽性) および血管内皮細胞 (CD31抗体陽性) がレシビエントの損傷筋で認められた。同様の結果がUt-34細胞群においても認められたが、同群では血管平滑筋細胞への分化が優先的に認められた。これら2群とは対照的にUt-DN/CD31陽性細胞移植群ではドナー由来細胞の血管内皮細胞への優先的分化が認められ、Ut-DN/CD31陽性細胞が既存の血管内皮細胞の前駆細胞である可能性が示唆された。また、これら3つの細胞群において同様の分化傾向が培養系においても、認められた。

これらの細胞群と子宮内に存在する骨髄由来細胞との関連性を検討するため、骨髄移植実験を施行した。放射線照射後にGFP陽性骨髄細胞を移植したマウス (キメリズム85%以上) の子宮内にはドナー由来 (GFP陽性) のUt-DN/CD31陽性、Ut-DN/CD31陰性およびUt-34細胞群は認められなかった。このことから、Ut-DN/CD31陽性、Ut-DN/CD31陰性およびUt-34細胞群は骨髄由来ではないことが示された。

以上により、組織特異的血管形成幹細胞あるいは前駆細胞は骨髄に由来する細胞ではなく、マウスの子宮内に存在することが明らかとなり、これらの細胞は異なる組織の微小環境においても血管を形成できると考えられた。

論文審査の要旨

子宮内膜は再生と剥脱が周期的に行われることから再生能の高い組織と考えられ、組織の再生に必要な幹細胞あるいは前駆細胞が存在することが示唆される。本研究ではマウス子宮内の組織特異的血管形成細胞の有無とその分化能について検討することを目的とした。子宮由来細胞をCD34抗体およびCD45抗体を用いたフローサイトメトリーによりCD34+/45- (Ut-34)、CD34-/45- (Ut-DN) およびCD45陽性細胞群に分離した。Ut-DN細胞群に血管内皮マーカーであるCD31陽性細胞が2.8%認められたためUt-DN群をさらにCD31陽性分画と陰性分画に分離した。細胞移植実験によりUt-DN/CD31-細胞群では血管内皮細胞および血管平滑筋細胞への分化、Ut-34細胞群では血管平滑筋細胞への優先的分化、Ut-DN/CD31+細胞群では血管内皮細胞への分化が認められ、同様の分化傾向が培養系においても認められた。これらの血管形成細胞は骨髄細胞移植実験により骨髄由来細胞ではなく子宮組織特異的であることが示された。

審査では、まずマウスの性周期のどの時期の子宮を用いたのかとの質問がなされ、フローサイトメトリーによる細胞の分布パターンおよび各細胞群の分化能には性周期による変化が認められなかったため、子宮を採取する時期を統一しなかったとの回答がなされた。この点に関して、人為的に性周期をコントロールした上で性ステロイドの影響を検討すべきであるとの指摘もなされた。次に、血管再生の研究をする際、CD31およびCD34はマクロファージを含め、未分化な細胞から分化した細胞まで広く発現するため分化能の検討には注意を要するとの指摘がなされた。また、骨格筋ではなく子宮に細胞移植するべきではなかったのかとの指摘がなされた。これに対し、子宮に移植した際に移植細胞が異物として認識されてしまう傾向があり分化能の評価が困難であったとの回答がなされた。これに関連し、内膜の再生という観点からは、子宮全体からではなく内膜のみから細胞を分離すべきであり、同所性に移植すれば異物として認識されなかったのではないかと指摘がなされ、これらについては今後検討すべき課題とされた。また、内膜の再生において血管の再生機序をどのように捉えているのかとの質問がなされた。内膜の再生に伴う血管形成は既存の血管内皮細胞の増殖による血管新生によるものと考えられてきたが、子宮由来の血管形成細胞が自ら血管を構築する細胞に分化し、内膜再生過程における血管形成の一端を担う可能性があるとの回答がなされた。

以上、本研究には今後の検討すべき課題が残されているものの、子宮内に分化能力の異なる血管形成細胞が存在し、それらの細胞が組織特異的であることを示すことで、子宮内膜の再生に伴う血管形成の機序の一端を明らかにしたという点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 青木 大輔

産婦人科学 吉村 泰典 病理学 坂元 亨字

発生・分化生物学 須田 年生

学術確認担当者:

審査委員長: 吉村 泰典

試問日: 平成18年 1月30日

A comparative study of most suitable miniplate fixation for mandibular symphysis fracture using a finite element model

(下顎正中骨折ミニプレート固定方法の安定性に関する有限要素解析による比較研究)

木村 章子

内容の要旨

下顎正中部は、下顎骨骨折の約20%を占め好発部位のひとつである。偏位の大きい骨折は観血的整復術の対象となるが、その際重要なのは咀嚼負荷に耐える安定した固定を得ることである。これまでは術者の経験的判断により、下顎前面のミニプレート1ないし2枚固定が行われてきた。

本研究では、下顎正中骨折においてコンピューターモデルを作成し、咀嚼時にかかる応力解析を行い、ミニプレートの使用枚数、固定部位による安定性の差異につき検討した。

ヒト乾燥頭蓋骨のCT前頭断面画像から8個の3次元無歯下顎モデルを構築し、コンピューターで下顎正中骨折を作成後、ミニプレートの数、位置を変えた下顎モデルを設定した。比較群は、下顎前面ミニプレート1枚固定(1枚群)、下顎前面ミニプレート2枚固定(平行2枚群)、下顎前面・下面ミニプレート各1枚固定(垂直2枚群)の3群とした。

左臼歯相当部に300Nの垂直荷重をかけ、3次元有限要素解析を行い、骨折面上縁のずれ幅、プレート/スクリューの最大発生応力、ネジ穴周囲の最大発生応力の3点について統計学的有意差を検討した。

応力分布：正常モデルでは正中部への応力発生はわずかだったが、正中骨折モデルでは、固定法によらず荷重側骨縁のスクリューに応力が集中した。

骨折面上縁のずれ幅：1枚群(中央値0.29mm)と比べ、平行2枚群(0.25mm)は有意差がなかったが、垂直2枚群(0.17mm)は有意にずれ幅が少なかった。骨折面のずれ幅と骨折治癒に関しては、動物実験より正常な治癒にはずれ幅が0.15mmを超えないようにすべきとの報告があるが、垂直2枚群が最もその値に近かった。ミニプレートを2枚使用する場合、異なる2つの面で固定した方が、より安定していると言える。

プレート/スクリューに発生する最大応力：最大応力が発生した負荷側骨縁のスクリューの応力値は、1枚群(中央値15.5MPa)、平行2枚群(10.3MPa)、垂直2枚群(8.0MPa)の順に小さくなったが、グループ間に有意差を認めなかった。

ネジ穴周囲の最大応力：最大応力が発生した負荷側骨縁のネジ穴周囲の応力値は、1枚群(中央値13.9MPa)、平行2枚群(6.6MPa)、垂直2枚(2.6MPa)の順に小さくなり、垂直2枚群の値は残り2グループに比べ有意に小さかった。

これらの結果より発生応力に関しては、骨折部位を固定するプレートシステム上に生じる応力に有意差はないが、付随して生じるネジ穴への発生応力にはミニプレートの固定方法による有意差が生じており、骨への負担は、2枚使用した場合では、前面に2枚固定するより前面と下面にわけて固定した方が、骨への負担が少ないと考えられる。

本研究により、下顎正中骨折においてミニプレートによる固定を行う場合、スクリュー周囲の骨への負担を最小限にし、かつ力学的に安定させるには、下顎前面1枚、下顎前面2枚、下顎前面・下面に各1枚の中では、下顎前面と下面にそれぞれ1枚ずつ固定するのが良い可能性が示唆された。

論文審査の要旨

下顎正中部骨折は、偏位が大きい場合は観血的整復術の対象となる。その際重要なのは咀嚼負荷に耐える安定した固定を得ることである。これまでは術者の経験的判断による手術が行われてきた。

本研究では、下顎正中骨折のコンピューターモデルを作成し、咀嚼時にかかる応力解析を行い、ミニプレートの使用枚数、固定部位による安定性について検討した。その結果、骨折部位を固定するプレートシステム上に発生する応力に有意差はないが、付随して生じるネジ穴への発生応力にはミニプレートの固定方法による有意差が生じており、下顎正中骨折でスクリュー周囲骨への負担を最小限にし、かつ力学的に安定させるには、下顎前面1枚、下顎前面2枚、下顎前面・下面に各1枚の中では、下顎前面と下面にそれぞれ1枚ずつミニプレート固定するのが良いと結論づけられた。

審査では、まず実験に用いた8個の下顎モデルの違いについて質問がなされ、モデルのもとになった乾燥頭蓋骨の人種や性別の情報はないが、モデル毎に、モデル全体の高さや幅が異なるとの説明がなされた。

また、軟部組織を伴う新鮮死体を用いた実測による検証をしなかった理由につき質問がなされたが、軟部組織を伴った状態でかつ本研究のモデルに相当する条件に合致した新鮮死体で実測するのは現実的に困難であり、ダミー人形などで検討していきたいとの回答がなされた。

次いで、垂直2枚固定では下顎下面のネジの引き抜きも考慮されるが、どの程度でぬけるのかとの質問がなされた。これについて、今回はミニプレート/スクリューおよびネジ穴に発生した応力のみを検討したため、この間には追加の検討を要するが、解析プログラムの設定により答えを導くことは可能であるとの説明がなされた。

また4穴ミニプレートのみで比較検討したが、6穴プレートや形状の異なるプレートとの比較をするべきでないかとの質問に対し、手術侵襲を一定にするため今回は形状の一定な4穴プレートのみの実験を行ったとの回答がなされた。

最後に無歯顎で1本のインプラントを片側臼歯部に埋入した状況設定は、実際のどのような患者を想定したのかとの質問がなされ、今回はプレート固定方法の差異を比較することが目的であり、また固定に歯牙を用いないため、条件設定をより簡素化したとの回答がなされた。また、切歯部での咀嚼負荷によるシミュレーションも並行して行っていることが追加された。それに対し、1箇所での咬合は現実的ではなく、咀嚼負荷を検討する上では、両側臼歯部、片側臼歯部、前歯部で検討するのが好ましいとの助言がなされた。

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、術者の経験的判断により行われてきた下顎骨折のミニプレート固定に対し、有限要素法によるコンピューター解析により手術法の説明を行ったことは手術手技の改善につながり、臨床的意義があると評価された。

論文審査担当者 主査 形成外科学 中島 龍夫
歯科・口腔外科学 中川 種昭 耳鼻咽喉科学 小川 郁
整形外科 戸山 芳昭

学力確認担当者：

審査委員長：中川 種昭

試問日：平成18年 1月30日

Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: Live monitoring and significance in neural development

(Notchシグナルの可視化：Notchシグナルの中樞神経発生における時間空間的制御と重要性について)

神 山 淳

内容の要旨

哺乳類中樞神経系の組織構築は一層からなる神経上皮が増殖、分化などの過程を経ることで完成される。この過程においてNotchシグナルが重要な役割を果たすことが知られる。近年、過剰発現系や遺伝子欠損マウスなどを用いてNotchシグナルの中樞神経発生における役割の解析が進んでいる。しかしながら、Notchシグナルの作用は発生段階依存的に異なるため、このような手法はNotchシグナルの中樞神経系組織構築における作用のダイナミズムを解析するには最適とは言えない。そこで申請者はNotchシグナルの活性化を可視化する手法を開発し、生体内でのNotchシグナル活性化部位の同定、およびNotchシグナルによる神経幹細胞系譜の時間・空間的制御の解析に着手した。

申請者はNotchシグナルの標的遺伝子*hes1*プロモーターおよびNotchシグナルの下流転写因子RBP-Jの結合配列制御下に改変型YFP (Yellow Fluorescent Protein) 蛋白質VenusのDNA配列を結合した遺伝子を持つレポーターシステムを作成した。さらにタンパク質の不安定性をもたらすPEST配列をVenusに結合させ (dVenus)、半減期の短いレポーターも同時に作成し、Notchシグナルの活性化のon/offをより精妙に感知する手法を確立した。このレポーター遺伝子を胎生14日目のマウス胎児に電気穿孔法を用いて導入するとNotchの活性化は未分化神経幹細胞において選択的に生じていることが分かった。さらに、神経幹細胞の増殖能、自己複製能を評価するニューロスフェア法により、Notchシグナルの活性化が神経幹細胞の未分化維持能、多分化能に相関していることが明らかとなった。さらに、胎生後期より産生されるアストロサイトの分化とNotchシグナルの活性化との関係調べたところ、Notchシグナルの活性化は成熟したアストロサイトには観察することができなかった。また出生後直後のマウスに活性化Notchを電気穿孔法により大脳に導入するとアストロサイトの成熟が遅れることが分かった。しかしながら、Notchシグナルの活性化を阻害する γ -セクレターゼ阻害剤で処理すると神経幹細胞からアストロサイト分化は阻害されることから、Notchシグナルはアストロサイト分化に関しては神経幹細胞からアストロサイトへの初期誘導においては重要であるが、成熟にはむしろ阻害的であり、さらにNotchシグナルの活性化の度合いが低下することがアストロサイトの成熟に必要なことが示唆された。

これらのことから申請者が開発したNotchレポーターシステムにより中樞神経系のみならず、他の臓器・組織においても各発生段階における生理的なNotchシグナルの活性化部位およびその役割を生きたままの細胞、組織で解析することが可能となった。

論文審査の要旨

哺乳類中樞神経系の組織構築は一層からなる神経上皮が増殖、分化などの過程を経ることで完成される。この過程においてNotchシグナルが重要な役割を果たすことが知られる。しかしながら、Notchシグナルの作用は発生段階依存的に異なるため、申請者はNotchシグナルの活性化を可視化する手法を開発し、生体内でのNotchシグナル活性化部位の同定、およびNotchシグナルによる神経幹細胞系譜の時間・空間的制御の解析に着手した。

申請者はNotchシグナルの標的遺伝子*Hes1*プロモーターおよびNotchシグナルの下流転写因子RBP-Jの結合配列制御下に改変型YFP

(Yellow Fluorescent Protein) 蛋白質VenusのDNA配列を結合した遺伝子を持つレポーターシステムを作成した。このレポーター遺伝子を電気穿孔法などにより発生期中樞神経系において解析したところ、未分化な神経幹細胞においてNotchシグナルの活性化が起こり、神経幹細胞の自己複製能、多分化能に相関していることが分かった。次に、胎生後期より産生されるアストロサイトの分化とNotchシグナルの活性化との関係を調べた。まず、Notchシグナルのアストロサイト分化系への影響を、Notchシグナルの活性化を阻害する γ -セクレターゼ阻害剤を用いて検討したところ、成熟アストロサイトのマーカーであるGFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) の出現が抑制された。しかしながら、レポーター遺伝子を用いて解析するとNotchシグナルの活性化は成熟したアストロサイトには観察することができなかった。培養系、個体における恒常活性型Notchの過剰発現系においてアストロサイトの成熟が遅れることから、Notchシグナルはアストロサイト分化に関しては神経幹細胞からアストロサイトへの初期誘導においては重要であるが、成熟にはむしろ阻害的であり、さらにNotchシグナルの活性化の度合いが低下することがアストロサイトの成熟に必要なことが示唆された。

審査では、Notchシグナルのレポーターシステムに*Hes1*のプロモーターを利用することの妥当性に関して質問があった。これに対して、*Notch1*の遺伝子欠損マウスにおいて*Hes1*の発現が低下していないことから*Hes1*がNotchシグナル以外にも制御されているという報告もあるが、今回使用したプロモーターはNotchシグナルによって制御される重要な領域のみを用いていること、さらにNotchシグナルの応答配列に変異を加えたプロモーターを併用することでより正確にNotchシグナルの活性化を検出するような手法を取り入れているとの回答がなされた。また、Notchのレポーターシステムで蛍光が観察された細胞において、活性化Notch抗体で染色される細胞数の割合はどの程度かとの質問がなされた。これに対して、70%程度の蛍光陽性細胞において活性化Notch抗体の染色が確認されたと回答された。また、発生段階依存的に異なるNotchの作用が分子レベルでどのように説明できるのかとの質問がなされた。これに対して、細胞外からのNotchシグナルの入力以外にも、クロマチン構造レベルでの違いが細胞内在性のプログラムとしてNotchシグナルの作用の違いを生み出しているという予備的な知見があるとの回答がなされた。さらに、Notchレポーターシステムを用いることでNotchシグナルのレセプターのうち*Notch1*以外のレセプターによるNotchの活性化が検出できるかとの質問がなされた。これに対して*Notch1*に限らず、転写因子RBP-Jを介して作用すると考えられる他のNotchレセプターによる活性化も検出できるが、今回の研究では検討していないという回答がなされた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき点を残しているものの、個体発生に重要な役割をすると考えられるNotchシグナル活性化の可視化技術の開発を試みており、本システムは中樞神経系のみならず、他の臓器の発生過程に置けるNotchシグナルの役割の解析も可能であることから幅広い研究領域に応用でき発生研究に於いて強力なツールと成り得ると非常に有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 生理学 岡野 栄之
構造生物学 福田 恵一 発生・分化生物学 須田 年生
解剖学 仲嶋 一範
学力確認担当者：
審査委員長：福田 恵一

試験日：平成18年 1月26日

Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis

(可逆性および不可逆性抗Thy-1腎炎モデルのマイクロアレイ解析)

辻 美保子

内容の要旨

末期腎不全から血液透析などの腎代替療法を必要とする患者は年々増加し続けている。その主要な原疾患である糖尿病性腎症や慢性糸球体腎炎では進行性の腎機能低下を認め最終的に末期腎不全にいたる。しかしながら進行性腎障害の共通像である糸球体硬化や尿細管間質線維化の機序は充分には解明されていない。我々は進行性腎障害の進展に関わる分子機構を解明することを目的とした。

抗Thy-1モノクローナル抗体1-22-3 (mAb 1-22-3) を静脈内投与すると可逆性のメサンギウム増殖性糸球体腎炎(可逆性抗Thy-1腎炎)が惹起される。これに対して片腎摘出後に抗体を投与すると腎障害は遷延し、進行性の糸球体硬化、尿細管間質変化が不可逆的に進行する。近年、遺伝子発現差異の検討を目的とした技術開発が盛んであるが、特にcDNA/オリゴヌクレオチドマイクロアレイは一度に何千もの遺伝子発現プロファイルの作成を可能にし、生物学的パスウェイに重要な遺伝子の同定および新規遺伝子の機能的解析を行う上で有用である。不可逆性に進展する進行性腎障害において重要な役割を果たす遺伝子を同定するために、これら2つのモデル間での遺伝子発現差異をマイクロアレイ解析により検討した。

6週齢のWistarラットに片腎摘出、もしくは偽手術をおこない1週間後にmAb 1-22-3を投与して不可逆性および可逆性Thy-1腎炎モデルを各々を作製し、抗体投与後4、7、14、42、56日後に屠殺した。腎臓より抽出したmRNAを用いてcDNAプローブを作製し4854種類の遺伝子がプリントされたオリゴヌクレオチドマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。その結果、両モデル間での遺伝子発現に2倍以上差のあった遺伝子数は189個であり、これらは各遺伝子の発現パターンにより5つのクラスターに分類された。この中で、不可逆性モデルにおいて強く発現した遺伝子で構成されるクラスターにはosteopontin、kidney injury molecule-1、thymosin β 10が含まれていた。定量的PCRの結果から、これらの遺伝子は正常腎臓においてほとんど発現を認めないが、不可逆性モデルにおいては可逆性モデルと比べてより強い発現を認めた。また免疫組織染色の結果からthymosin β 10は主に線維化した尿細管間質のマクロファージに強く発現していた。

可逆性および不可逆性Thy-1腎炎モデル間での遺伝子発現差異をマイクロアレイ解析で検討し、腎疾患の進行に関わる分子機構を検討した。マクロファージの遊走因子であるosteopontinやthymosin β 10の発現上昇からマクロファージの浸潤や活性化が腎疾患の進展に重要な役割を担うことが推察された。さらなる解析により腎障害進展機序の本質に迫ることが出来ると思われる。

論文審査の要旨

進行性腎障害の共通像である糸球体硬化や尿細管間質線維化の機序は充分には解明されていない。そこで進行性腎障害の進展に関わる分子機構を解明することを目的として本研究は行われた。抗Thy-1モノクローナル抗体1-22-3 (mAb 1-22-3) の静脈内投与により可逆性の糸球体腎炎が惹起されるが、片腎摘出後に抗体を投与すると進行性の糸球体硬化、尿細管間質変化をとともなう不可逆性腎炎モデルが作製される。進行性腎障害において重要な役割を果たす遺伝子を同定するために、この2つのモデル間での遺伝子発現差異をマイクロアレイ解析で検討した。その結果、2群間の遺伝子発現に2倍以上差のあった遺伝子は189個あり、各遺伝子の時間的経過に伴う発現パターンにより5つのクラスターに分類された。この中で、不可逆性モデルにおいて強く発現した遺伝子で構成されるクラスターにはosteopontin、KIM-1、thymosin β 10などが含まれていた。Thymosin β 10は主に線維化した尿細管間質のマクロファージに強く発現し、片側尿管結紮モデルにおいても発現上昇を認めた。Thymosin β 10は活性化したマクロファージを介し腎線維化に関与し腎疾患の進展に重要な役割を担うことが示唆された。

審査ではまず、遺伝子発現差を検討する手法として選択したマイクロアレイ解析について、個体により誤差範囲が大きくなりうること、ラットマイクロアレイはスライドに掲載される遺伝子数が総ゲノム数と比較して少ないことなど、スクリーニングを行う上でのマイクロアレイの問題点について指摘がなされた。またマイクロアレイ解析の実験デザインとして本研究ではThy-1抗体投与直後の遺伝子発現差を解析していないが、この時期すでに発現差が生じている可能性があり、検討することが望ましかったとの助言がなされた。

次に解析の結果に関連して、発現差のある遺伝子数が尿蛋白や組織所見にほとんど差を認めない初期において多く、これらに著明な変化が現れる後期において少ないことへの意味づけについて質問がなされた。これに対して初期の遺伝子発現差が疾患の不可逆性を決定づけている可能性があると考えられ、このことは不可逆性Thy-1腎炎モデルにおいて病初期に治療した場合においては、その後の硬化性病変が有意に抑制されたとする報告からも支持されるとの回答がなされた。続いて免疫組織染色を用いた検討で、Day4、Day7など初期での、可逆性モデルにおけるThymosin β 10の発現パターンについて質問がなされた。不可逆性モデルにおいては尿細管間質のマクロファージに発現を認めたが、可逆性モデルにおいてはほとんど発現を認めなかったと回答がなされた。これに対しThymosin β 10の進行性腎障害における臨床的な意義付けをするために、不可逆性モデルを用いてThymosin β 10の機能抑制を行うなど、in vivoにおける検討を行うことが望ましいとの助言がなされた。

以上のように、本研究はin vivoにおける機能解析など、今後検討されるべき課題を残しているものの、進行性腎疾患の進展に関わる遺伝子としてThymosin β 10を同定し、その局在性を明らかにしており、進行性腎障害進展のメカニズム解明に有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫
泌尿器科学 村井 勝 病理学 岡田 保典
分子生物学 清水 信義
学力確認担当者：
審査委員長：村井 勝

試問日：平成18年 1月12日

Prevalence of inappropriate medication using Beers criteria in Japanese long-term care facilities

(日本の介護保険施設におけるBeers criteriaに基づく薬剤不適切使用の割合)

庭田 聖子

内容の要旨

高齢者に対して、不適切な処方となる可能性のある薬剤の使用実態を把握するための基準が複数開発されており、その中で最もよく用いられるのがBeers criteriaである。諸外国では、このBeers criteriaに基づき、在宅高齢者や施設入所者における実態が多数報告されてきた。しかしわが国の介護保険施設では、入所者の特性と処方に関するデータが制度的に収集されていないため、同様の報告は未だない。

そこで本研究では、研究事業の一環として、米国で開発された包括的アセスメント表MDS (Minimum Data Set) の日本版、MDS2.1施設ケアアセスメントマニュアルを通常の業務の中で利用し、データを収集していた介護保険施設を対象に調査を行った。MDSには入所者の健康状態などのほか、過去7日間の使用薬剤を記入する薬物治療調査票が含まれるので、介護保険施設における薬剤使用の実態を入所者特性と併せて初めて把握することが可能となった。

対象となった介護保険施設は17であり、1669名の入所者よりMDSアセスメントデータを収集し、Beers criteria 2003年版に基づいて「疾患・病態によらず不適切な薬剤」および「特定の疾患・病態において不適切な薬剤」の使用割合を求めた。さらに、前者に対して、不適切な使用に関わる要因について多変量ロジスティック回帰分析を行った。

その結果、「疾患・病態によらず不適切な薬剤」がいずれか一つ以上使用された入所者は356名(21.1%)であり、抗血栓薬チクロピジンの使用割合が最も高かった。一方「特定の疾患・病態において不適切な薬剤」が一つ以上使用された入所者は300名(18.0%)であり、便秘に対するカルシウム拮抗剤などの使用割合が最も高かった。「疾患・病態によらず不適切な薬剤」の有無を目的変数とした多変量ロジスティック回帰分析では、「向精神薬の使用」「一日あたり薬剤費の増加」「一日あたり使用薬剤数の増加」「年齢の低下」に伴って、それぞれcriteria該当薬剤の使用のリスクが上昇した。

本研究の結果を諸外国の既存研究と比較すると、個々のcriteria該当薬剤の使用割合については、チクロピジンの代替薬が未認可であったことによる不適切使用の高まり、逆に抗不整脈薬アミオダロン処方規制があったための低下等による差異が認められた。しかしながら、全体としてのcriteria該当薬剤の使用割合、および「疾患・病態によらず不適切な薬剤」の使用に関連する要因については、諸外国における既存研究とほぼ同様な結果が示された。

今後は、より広範なデータベースを構築し、さらに不適切とされる薬剤を使用した場合のアウトカム等について探求する必要がある。

論文審査の要旨

高齢者に対して不適切な処方となる可能性のある薬剤について、使用実態を把握するための基準として最もよく用いられるのがBeers criteriaであり、諸外国では施設や在宅の高齢者における実態が多数報告されてきた。しかしわが国の介護保険施設では、入所者特性および処方に関するデータが制度的に収集されないため調べられていない。本研究では包括的アセスメント表MDS (Minimum Data Set) 2.1を使用する介護保険施設を対象に調査を行った。MDSには入所者の状態のほか使用薬剤を記入する調査票が含まれるので、介護保険施設入所者の薬剤使用と入所者特性を併せて把握することが可能となる。

対象は17介護保険施設とし、入所者1669名についてアセスメントデータを収集して、Beers criteria 2003年版による「疾患・病態によらず不適切な薬剤」および「特定の疾患・病態において不適切な薬剤」の使用割合を求めた。さらに前者に関して、該当薬剤の使用に関連する要因を明らかにするため多変量ロジスティック回帰分析を行った。

その結果、個々の薬剤について既存研究と比較すると、代替薬が国内未発売であったことによる差異などが認められたが、該当薬剤全体の使用割合や、その使用に関連する要因は、諸外国とほぼ同様であった。

審査では、まず方法論として、Beers criteriaについて調査時より後に公表された版を用いた理由が質問された。これに対し、日本ではcriteriaの知名度が低いことから、最新の知見を反映させることを重視したと回答された。次に、本研究で適用された変数減少ステップワイズ法による多変量ロジスティック回帰分析以外に、説明変数間の共線性を考慮し、変数増減法の適用、単変量による施設種間比較等の追加解析が望ましいと助言された。また分析対象として頓用薬を含めた理由が質問された。これに対し、履修内容審査において、criteriaにある睡眠薬などは頓用でも多く用いられるため除外すべきでないとの指摘を受け、頓用薬を含めて分析を行ったと回答された。考察としては、諸外国における既存研究の結果はばらつきが大きいが、諸外国との比較を行った際、具体的にはどのような文献と比較したか質問された。これに対し、主に本研究と同じBeers criteria 2003年版による研究との比較を行った旨の回答があったが、医療制度や施設・在宅の差異などを考慮し、母集団が本研究と類似したものを選んで比較すべきであったと指摘された。最後に将来の研究の方向性として、施設種ごと、または疾患ごとに層別化し、より焦点を絞って分析を行うことが重要との助言があった。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているもの、薬剤使用に関してBeers criteriaを用いた本邦初の実証的研究として有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 医療政策・管理学 池上 直己

薬剤学 谷川原祐介 衛生学公衆衛生学 大前 和幸

衛生学公衆衛生学 武林 亨

学力確認担当者：

審査委員長：谷川原 祐介

試問日：平成18年1月11日

Angiopoietin-1 promotes LYVE-1 – positive lymphatic vessel formation

(アンジオポエチン-1はLYVE-1陽性リンパ管の形成を促進する)

森 定 徹

内容の要旨

悪性腫瘍のリンパ行性転移やリンパ浮腫などの病態の解明のためにリンパ管形成の分子機構を理解することは重要であるが、近年までリンパ管を同定する特異的な抗体などの研究材料が存在しなかったため、リンパ管形成については未知の部分が多かった。一方、血管形成においては、既にVEGFやAngiopoietin等の複数の血管新生関連分子が階層性、相互性を持って作用していることが詳細に解析されており、特にAngiopoietin-1 (Ang-1) とその受容体Tie2のシグナルは、胎生期の血管構造の成熟過程に重要な機構であることがわかっている。しかしながら現在までのところ、リンパ管形成におけるAng-1シグナルに関する検討は充分になされていない。そこで本研究では、リンパ管の同定とリンパ管内皮細胞の単離のために新たにリンパ管内皮細胞に特異的に発現する分子LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) に対するモノクローナル抗体を作成し、この抗LYVE-1抗体を用いてAng-1のリンパ管形成における機能について検討を行った。

まず、マウスLYVE-1の細胞外ドメイン蛋白を抗原としてラットに免疫を行い、ハイブリドーマの選別から抗LYVE-1モノクローナル抗体を確立した。そしてこの抗体がリンパ管内皮細胞に対して免疫組織化学染色のみならずフローサイトメトリー (FACS) による解析にも有用であることを確認した。

次に、マウス胎児組織から得られた細胞を、作成した抗LYVE-1抗体と血管内皮・血液細胞の細胞表面分子に対する抗体で多重蛍光染色し、FACSを用いてリンパ管内皮細胞を単離、純化した。純化したリンパ管内皮細胞のRT-PCRによる遺伝子発現解析にて、リンパ管内皮細胞に受容体Tie2が発現していることを見出した。さらに、FACSによる経時的な解析により、リンパ管内皮細胞におけるTie2の発現強度が胎児発生段階により変化していることを見出した。

このリンパ管内皮細胞を支持細胞 (OP9細胞) の存在下で共培養する系を確立し、外因性にAng-1を添加したところ、リンパ管内皮細胞のコロニー形成は有意に促進された。さらにマウス角膜を用いた *in vivo* の実験にて、角膜内に埋包したAng-1がLYVE-1陽性のリンパ管新生を誘導することを見出した。

以上より、今回作成した抗LYVE-1抗体を用いてリンパ管内皮細胞の単離に成功し、Tie2受容体が血管内皮細胞と同様にリンパ管内皮細胞にも発現し、Ang-1がリンパ管内皮細胞に作用してリンパ管形成を促進することが明らかとなった。リンパ管内皮細胞におけるTie2の発現は発生段階や臓器により異なることから、リンパ管形成におけるAng-1/Tie2シグナルは時間的・空間的に制御されていると考えられた。

論文審査の要旨

悪性腫瘍や慢性炎症などの病態に関与する血管新生ならびにリンパ管形成の分子機構を理解することは重要であるが、リンパ管の分子基盤についてはいまだ詳細に解明されていない。一方、血管新生のプロセスは複数の分子により制御されていることが知られており、その一つであるAngiopoietin (Ang) は受容体Tie2を介して発生の血管再構築の過程に重要な働きを持つことが明らかにされている。そこで本研究ではまず、リンパ管内皮細胞に特異的な膜表面分子LYVE-1に対するモノクローナル抗体を作成し、免疫組織化学染色およびフローサイトメトリーにてこの抗体の特異性を確認した。次いでこの抗体を用いてマウス胎児組織からリンパ管内皮細胞を単離し、支持細胞 (OP9細胞) との共培養の系を確立した。さらにこの系においてAng-1がリンパ管内皮細胞のコロニー形成を促進すること、またマウス角膜法の実験においてAng-1がリンパ管新生を惹起することを明らかにした。

審査ではまず、この抗LYVE-1抗体のリンパ管内皮細胞への特異性に関する質問があった。これに対し、ウェスタンブロットングによる特異性の確認は現在検討中であるが、今回の実験の組織化学的検討において、本抗体が血管とは明らかに異なるリンパ管に特異的に反応することを確認しているとの回答がなされた。次に共培養実験で用いている支持細胞のOP9細胞はどのような役割を持つのかという質問があり、OP9細胞自体が内因性にVEGF-Cなどのリンパ管新生因子を発現していることを確認しているため、それらとAng-1が協調的に作用した結果を評価しているのであろうとの回答がなされた。また、マウス角膜法の実験に関して、角膜のリンパ管新生には角膜内に存在する他の細胞成分の関与はないかとの質問があり、これに対し、実際、角膜のリンパ管新生にマクロファージなどの血球細胞が関与するという報告が散見されており、角膜内に介在する細胞の役割についても検討する必要があるとの回答がなされた。さらにリンパ管形成についてVEGF-CとAng-1はどの程度の相互性を持って寄与するのかという質問があり、それに対してはいまだ確たる論拠は無いこと、ただし、同じ脈管である血管の発生のメカニズムから類推してリンパ管形成にも複数の分子による階層的な制御機構が存在しうるとの回答がなされた。

以上のように、本研究はいくつかの検討課題を残しているものの、解析が不十分であったリンパ管形成の分子機構についてその一端を明らかにすることで、さらなるリンパ管形成のメカニズムの解明に繋がる可能性を示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 産婦人科学 青木 大輔
産婦人科学 吉村 泰典 病理学 岡田 保典
病理学 坂元 亨字

学術確認担当者:

審査委員長: 吉村 泰典

試問日: 平成18年1月14日

Association of Cryptorchidism with a Specific Haplotype of the Estrogen Receptor α Gene: Implication for the Susceptibility to Estrogenic Environmental Endocrine Disruptors

(停留精巣とエストロゲン受容体 α 遺伝子特定ハプロタイプの関連性：内分泌攪乱物質のエストロゲン作用に対する個体の遺伝的感受性の関与について)

吉田 理恵

内容の要旨

停留精巣を含む雄性性機能障害発症率は近年増加し、その原因として大部分の内分泌攪乱物質が有するエストロゲン様作用の関与が推測されている。そして、これらのエストロゲン様内分泌攪乱物質がエストロゲン受容体を介して効果を発揮することから、同受容体遺伝子多型は、内分泌攪乱物質に対する遺伝的感受性に関与すると推測される。本研究では、この作業仮説を検証する第一歩として、停留精巣患者と対照男児を用いてエストロゲン受容体 α 遺伝子 (*ESR1*) のハプロタイプ解析を行った。

患者 (停留精巣を有する日本人男児) 63例および対照 (正常外陰部を有する思春期前男児) 47例において、*ESR1*遺伝子全長 (>300kb) にわたり6-38kb間隔に存在し、マイナーアレル頻度15%以上のSNP15個 (SNP1-SNP15) の遺伝子型を決定した。遺伝統計学的手法を用いて連鎖不平衡領域を同定し、この領域におけるハプロタイプ解析を行った。また、*ESR1*遺伝子の全エクソンおよび近傍のイントロンの配列をPCR-直接シーケンシング法で決定した。

患者、対照ともに、SNP10から14を包含する約50kbの連鎖不平衡領域が同定された。この領域に存在するAGATAハプロタイプの推定頻度は、患者では34.0%、対照では21.3%と患者に多く認められた ($P=0.037$)。そして、このハプロタイプは、劣性効果を有すると仮定した場合、有意に停留精巣発症と関連した ($P=0.006$)。さらに、AGATAハプロタイプホモ接合体頻度は、患者では10/63、対照では0/47と患者に多く認められた ($P=0.0042$)。なお、AGATAハプロタイプホモ接合体患者10例において、*ESR1*遺伝子全エクソンおよび近傍のイントロン配列に構造変化は認められなかった。

本研究の成績は、*ESR1*遺伝子には連鎖不平衡領域が存在し、この領域内の特定ハプロタイプホモ接合体が停留精巣発症と相関することを示唆する。この特定ハプロタイプホモ接合体は、内分泌攪乱物質のエストロゲン様作用を増強することで停留精巣発症感受性を亢進すると推測される。文献的には、エストロゲン様作用が増強すると、ライディッヒ細胞における*INSL3*遺伝子発現抑制により精巣導体形成が障害されること、また、同細胞におけるアンドロゲン分泌低下により頭側懸垂帯遺残および外陰部発達障害が生じることが報告されている。特定ハプロタイプがエストロゲン様作用を増強する機序として、*ESR1*遺伝子翻訳領域の構造変化は否定的であり、その説明は、今後の研究課題である。また、現在、マイクロペニス、尿道下裂、精子形成障害などの雄性性機能障害において、*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプとの関連性が再現されるか否かを解析中である。

論文審査の要旨

停留精巣を含む雄性性機能障害発症率は近年増加し、その原因として大部分の内分泌攪乱物質が有するエストロゲン様作用の関与が推測されている。そして、エストロゲン様作用がエストロゲン受容体を介して発揮されることから、内分泌攪乱物質に対する個体の遺伝的感受性にはエストロゲン受容体 α 遺伝子 (*ESR1*) 多型が関与していると考えられる。本研究は、内分泌攪乱物質に対し高い遺伝的感受性を有する男児が雄性性機能障害を発症しやすいという作業仮説を検証する第一歩として、停留精巣患者および対照男児を用いて*ESR1*遺伝子ハプロタイプ解析を行い、*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体が停留精巣発症と強く相関することを示した。

審査では、第一に、停留精巣患者と対照男児における環境因子の調査方法について質問された。停留精巣患者と対照男児両群において問診表への記載内容の確認および外来での十分な問診を行い、両群における環境因子をほぼ等しくしたと回答された。

第二に、内因性エストロゲンあるいはエストロゲン様作用を有する化学物質への暴露量の違いが停留精巣発症に関与している可能性について質問された。本研究結果からその可能性を完全に否定できないため、機能解析実験を行い、*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体がエストロゲン受容体を介する作用を増強することを確認する必要があり、と回答された。

第三に、男児または男性において、*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体を診断することの臨床的意義について質問された。*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体はエストロゲン様作用を有する化学物質への暴露による雄性性機能障害発症のリスクが高いと推測される。したがって、エストロゲン様作用を有する化学物質への暴露量を可能な限り少なくすることで雄性性機能障害発症を予防することが可能と考える、と回答された。

第四に、他の雄性性機能障害における*ESR1*遺伝子ハプロタイプ解析結果について質問された。現在までに小陰茎を対象として同様の解析を終了し、停留精巣発症と関連した*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体が小陰茎発症にも関与していることが見出された、と回答された。

また、本研究結果から停留精巣発症におけるエストロゲン様作用の関与は示唆されたが、停留精巣発症と内分泌攪乱物質の関連性を述べるためには内分泌攪乱物質を用いた直接的な検討が必要である、との指摘があった。

以上、本研究は停留精巣とエストロゲン様作用を有する内分泌攪乱物質の関連性について今後さらに検討すべき課題を残しているものの、停留精巣発症における*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプの関連性を示した点で有意義な研究であり、エストロゲン様作用を有する内分泌攪乱物質への暴露による停留精巣発症機序の解明につながることを期待される、と評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 孝雄
産婦人科学 青木 大輔 医化学 末松 誠
産婦人科学 吉村 泰典
学力確認担当者：
審査委員長：青木 大輔

試問日：平成17年12月26日

The Caudal Migratory Stream: A Novel Migratory Stream of Interneurons Derived from the Caudal Ganglionic Eminence in the Developing Mouse Forebrain

(尾側細胞移動経路：マウス発生期終脳における尾側基底核原基に由来する抑制性神経細胞の新しい細胞移動経路)

四 津 真 人

内容の要旨

脳の神経細胞には、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞とがある。マウスの大脳の発生過程において、抑制性神経細胞は腹側の基底核原基ganglionic eminence (GE)で誕生して脳表面に平行に移動して大脳皮質、海馬、嗅球などに進入することが知られている。GEは解剖学的特徴と遺伝子発現パターンの特徴から3つの細胞産生領域[内側基底核原基medial ganglionic eminence (MGE), 外側基底核原基lateral ganglionic eminence (LGE), 尾側基底核原基caudal ganglionic eminence (CGE)]に分けることが出来る。MGEが主要な抑制性神経細胞の産生領域であるが、LGE、CGEも大脳皮質、海馬、嗅球の抑制性神経細胞を産生する。近年、GEに由来する抑制性神経細胞の細胞移動機構を明らかにする試みが盛んになされて来たが、その三次元的な移動プロフィールは明らかでなく、また、これらの研究がMGE/LGE由来の抑制性神経細胞を対象としていたため、CGEに由来する抑制性神経細胞の細胞移動機構は未だほとんど分かっていない。本研究ではマウス発生期終脳における各GEに由来する抑制性神経細胞の細胞移動経路、特にCGEに由来する抑制性神経細胞の細胞移動経路を明らかにするために以下の実験を行った結果、CGEから海馬へと続く抑制性神経細胞の新しい細胞移動経路を発見し、“尾側細胞移動経路Caudal Migratory Stream (CMS)”と命名した。

本研究で用いた手法としては、GEの各部分に由来する抑制性神経細胞の細胞移動経路を3次元的に解析することを可能にするために、大脳半球の小さな限られた部位に遺伝子を導入することが出来る“局所電気穿孔法”を新たに確立した。この技術を用いて胎生13.5日目のマウス大脳半球のMGEまたはCGEに赤色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを導入し、全大脳半球培養法をもちいて40時間培養し解析した。さらに培養後の大脳半球のタイムラプス解析、*in vivo*における免疫組織学的解析、移植実験によりCMSを通る抑制性神経細胞の細胞移動の特徴を解析した。

実験結果としては、MGEに由来する抑制性神経細胞は外側方に移動し大脳皮質全体に広がって分布したのに対して、CGEに由来する抑制性神経細胞の大部分は大脳半球の最尾側端に向かって尾側に移動した。タイムラプス解析と*in vivo*における免疫組織学的解析により、CGEに由来する抑制性神経細胞の少なくとも一部が、CGEより尾側に移動し海馬にまで達する細胞移動経路に沿って移動することを見いだした。移植実験により、CGEに由来する抑制性神経細胞の尾側方向への細胞移動は胎生13.5日目までに細胞内在的に決定され、CGEという環境もこの尾側方向への細胞移動に必要であることが分かった。このCGE由来の抑制性神経細胞のGEから海馬へと続く細胞移動経路は、これまでよく知られていたMGE/LGEからの抑制性神経細胞の移動経路とは異なるため、この新規の細胞移動経路をCMSと名付けた。

本研究で確立した局所電気穿孔法は、既存の方法に比べて、①抑制性神経細胞等特定の細胞群への様々な遺伝子導入が可能であるため、強制発現法やRNA干渉法によりそれらの細胞の移動・分化に関わる分子メカニズムの解析が可能である、②脳の任意の局所への遺伝子導入が可能であるため特定の構造や細胞集団についての解析が可能である、③大脳等における細胞移動を三次元的に解析できる、などの特徴がある。

本研究ではCGE由来の抑制性神経細胞が実際に尾側に移動することを直接的に証明した。さらにCGE由来の抑制性神経細胞の少なくとも一部は海馬または尾側大脳皮質に向かって移動することを示した。このことは、海馬及び大脳皮質における抑制性神経細胞の起源について新しい知見を与えるものである。CMSの細胞移動の分子機構の解明が今後の課題である。

論文審査の要旨

脳の神経細胞には、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞とがある。マウス大脳の発生過程において、興奮性細胞は外套の脳室帯で誕生して放射状に脳表面へと移動し、皮質に進入するのに対して、抑制性神経細胞は腹側の基底核原基ganglionic eminence (GE)で誕生して脳表面に平行に移動して大脳皮質、海馬などに侵入することが知られている。本研究では、新たに“脳局所に対する電気穿孔による遺伝子導入法”を考案し、全大脳半球培養法と組み合わせる新しい実験系を確立した。それによって、GEに由来する抑制性神経細胞の三次元的細胞移動経路を明らかにするとともに、特に尾側基底核原基caudal ganglionic eminence (CGE)に由来する抑制性神経細胞の新しい細胞移動経路を発見した。すなわち、内側基底核原基medial ganglionic eminence (MGE)に由来する抑制性神経細胞は、外側方に移動し大脳皮質全体に広がって分布したのに対して、CGEに由来する抑制性神経細胞の大部分は大脳半球の最尾側端に向かって尾側に移動した。そこで、この尾側に向かう新規の細胞移動経路をcaudal migratory stream (CMS)と命名した。CMSはCGEから海馬へと続く細胞移動経路であり、このCMSの一部はcalbindin陽性細胞であること、CMSは胎生13.5日目までに細胞内在的に決定され、CGEという環境もCMSに必要であることを見いだした。

審査では、まず本研究で用いられた全大脳半球培養法では細胞移動に影響を与える可能性のある髄膜が保持されているのかどうか、また、従来知られていなかったCMSを発見できた理由について質問がなされた。それに対し、全大脳半球培養法では髄膜を保持したまま培養し、三次元観察できること、従来のスライス培養法では本来三次元的に移動する神経細胞の動きを限定してしまっている可能性が高く、本来の移動経路を見逃していたと考えられるとの回答がなされた。次に、CMSを制御する分子機構について、何が細胞の移動方向を決定しているのか、具体的にはエフリン-Eph系の関与の可能性、足場となる構造の有無について質問がなされ、これらは今後検討すべき課題として残っているとの回答がなされた。続いて、CGEとMGEの移動の違いはどの時期に決定され、最終的に機能まで異なる細胞になるのかどうか質問がなされた。それに対し、CGEとMGEは発現する転写因子が異なることから、細胞が誕生するかなり早期から異なる性質を獲得すべく運命付けされる可能性が考えられること、また最終的には機能の異なる細胞群になると考えられているが、成体のどの構造のどの細胞になるのかは今後検討すべき課題として残っているとの回答がなされた。また、新規の細胞移動経路であるCMSの意義について質問がなされ、海馬における細胞起源の検討、成体におけるニューロン新生との関わりなど、今後検討すべき課題であるとの回答がなされた。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき点を残しているものの、マウス大脳発生過程においてCGEから海馬へと続く新規の細胞移動経路caudal migratory stream (CMS)を見出し、海馬及び大脳皮質における抑制性神経細胞の起源について新しい知見を与えた点で有意義であると評価された。

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

試問日：平成18年 2月 2日

Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling

(培養を介さない分子生物学的プロファイリング法を用いた新規ヒト皮膚常在細菌の探索)

出来尾 格

内容の要旨

論文審査の要旨

【緒言】 皮膚の常在微生物は、*Staphylococcus epidermidis*などの好気性細菌、*Propionibacterium acnes*などの通性嫌気性細菌、*Malassezia furfur*などの真菌からなるが、それぞれがアトピー性皮膚炎、さ瘡などの病態に関与しており臨床的に重要である。しかし従来の常在微生物の知見は培養法に基づいているため、これまで難培養難分離性の微生物については解析されておらず、その存在についてすら明らかではない。著者は、難培養難分離性の細菌を含む皮膚常在細菌の全体像を明らかにするため、培養を介さない細菌16S rRNA遺伝子の種間多様性を用いたプロファイリング解析を試み、培養法による解析と比較した。

【材料・方法】 5人の健康成人の前額部皮膚より、滅菌したプラスチック製の円筒と液体培地を含ませた滅菌綿棒を使用して、皮膚擦過サンプルを採取した。これをTS培地（好気）、EG培地（嫌気）、BL培地（嫌気）に接種して培養可能な細菌について解析する一方、サンプルから直接DNAを抽出し、細菌種ごとに異なる配列をもつ16S rRNA遺伝子のクローンライブラリを構築した。クローンごとに塩基配列を解析し、DDBJ遺伝子データベース上の既知種16S rRNA遺伝子との相対性検索により、サンプル中に含まれる細菌種を推定した。

【結果】 培養法による解析では、全サンプルから*P. acnes*と*Staphylococcus* sp.が培養同定された。菌数は1 cm²あたり3.7×10⁴から1.2×10⁶CFUで、過去の報告と同等であった。一方、クローンライブラリ法による解析では、培養法で検出された種に加えて、多彩な難培養難分離性の細菌が検出された。得られた計416個の16S rRNA遺伝子配列を解析したところ、これらは19の既知種と13の難培養難分離性の細菌群 (phylotypes) 由来であった。検出された19の既知種には、皮膚常在細菌として過去に報告がある10種のほか、皮膚常在細菌としての報告がない9種が含まれていた。一方で13のphylotypesが検出されたが、この中でもっとも多く検出されたphylotype Aは、3つのサンプルで検出され、特に1つのサンプルでは全菌種中もっとも多く検出された。得られた塩基配列の系統樹解析においては、検出された細菌はfirmicutes、actinobacteria、cyanobacteria、bacteroidetes、proteobacteriaの5つのcladeに属していた。

【考察】 本研究において、細菌16S rRNA遺伝子を用いたプロファイリング法により、ヒト皮膚常在細菌の全体像が難培養難分離性の細菌群を含む多彩なものであることが明らかになった。特にphylotype Aは5サンプル中3サンプルに検出され、クローン数と検出頻度のいずれもphylotypesの中で最も多く、重要な細菌と考えられた。これはヒトの皮膚に高頻度で存在する細菌である可能性があり、特異的プライマーを用いた分子生物学的な解析を含めた更なる検討が必要であろう。

【結論】 細菌16S rRNA遺伝子を用いた分子生物学的プロファイリング法により、ヒト皮膚常在細菌として19の既知種と13のphylotypesを検出した。うち9の既知種と13のphylotypesは新規の皮膚常在細菌の可能性がある。この培養を介さない手法は、今後皮膚常在細菌の解析に有用な技術となることが期待される。

細菌16S rRNA遺伝子は全ての細菌に存在するが、系統発生を反映した多様性を持ち、種の同定に有用である。本研究において、5例の健康人の顔面皮膚サンプルより細菌16S rRNA遺伝子のクローンライブラリを作成した。得られた416個の遺伝子の塩基配列データを解読したところ、従来知られている皮膚常在細菌に加え、通常の方法では分離・培養が困難な細菌を含めた多様な細菌種が検出された。またその後、細菌16S rRNA遺伝子を用いたterminal RFLP法により健康人とアトピー性皮膚炎患者の皮膚細菌叢の解析が進められ、健康人・患者それぞれの細菌叢の構成の差が明らかにされつつあることが簡潔に示された。

審査ではまず、1クローンのみ検出された塩基配列が、分離・培養が困難な細菌種由来ではなくPCR増幅などの技術的なエラーに起因する可能性はないかとの質問がなされた。これに対し、2種のプライマーを用いて同じ部分の配列を二重に読んだことと、異なる16S rRNA遺伝子の塩基配列のキメラを検出するソフトを用いてキメラ配列を除外したことが、解読のエラーを最小限にするために行われていると説明された。しかし誤判断につながる解読エラーやキメラ配列が存在する可能性は残されており、実際は分離・培養が困難な細菌種が検出されたものより少ない可能性はあると回答された。

次に、サンプル採取の状況により、環境由来の微生物が混入している可能性はないかと質問があった。これに対し、皮膚細菌叢の解析には水道水や塵芥などに含まれる微生物の混入が避けられず、これは培養法を含む皮膚常在微生物の解析の不可避の問題点であるが、混入の影響を小さくするため菌数の多い顔面皮膚を用いたことが回答された。

さらに、抗生剤の内服等による細菌叢の個人内変動と個体間較差のどちらが大きいかについて質問がなされた。これに対し、過去の培養法による報告では、日内変動や抗菌ペプチドに起因すると思われる培養結果の不安定性のため、個人内変動と個体間較差の比較が不可能であったことが回答された。一方で論文作成後に施行された16S rRNA遺伝子を用いたterminal RFLP法を用いた解析により、日内変動に関わらず細菌種の数比は保たれており個人内変動は個体間較差に比べ小さいと判明したことが示された。

最後に、DNAチップを用いた解析キットの実用化の可能性について質問があった。これに対し、チップ作成の前提として菌種ごとの特異的プライマーを作成する必要があり、チップ作成に至るまでには時間がかかるものの、信号強度を段階的に検出できる検出系を用いれば実用的な解析ができる可能性は十分にあり、10種程度の細菌を検出するチップであれば臨床応用が可能であろうと回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、ヒト皮膚の細菌叢の解析に初めて分子生物学的な網羅的解析法を用い、新規な皮膚常在細菌の検出に成功した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 皮膚科学 天谷 雅行
分子生物学 清水 信義 微生物学・免疫学 小安 重夫
臨床検査医学 村田 満
学力確認担当者：
審査委員長：清水 信義

試問日：平成18年2月8日

Association of nicotinic acetylcholine receptors with central respiratory control in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats

(新生ラット摘出脳幹脊髄標本におけるニコチン性アセチルコリン受容体の中枢性呼吸調節機構への関与)

羽 鳥 英 樹

内容の要旨

(背景) ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介して呼吸神経回路網を含む中枢神経系活動に影響を及ぼし、様々な呼吸症状を引き起こす。nAChRには多くのサブタイプがあり、呼吸調節を司る延髄には $\alpha 4\beta 2$ 及び $\alpha 7$ nAChRが存在していることが知られている。しかし、これらnAChRの中枢性呼吸調節機構における働きは十分に解明されていない。そこで本研究では、新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いて中枢性呼吸調節機構におけるnAChRサブタイプの機能的役割を検討した。

(方法と結果) 新生ラット摘出脳幹脊髄標本を酸素化した人工脳脊髄液で灌流し、中枢性呼吸活動の指標として第4頸髄前根から神経活動を記録した。人工脳脊髄液にnAChR作動薬または拮抗薬を添加し、その影響を観察した。 $\alpha 4\beta 2$ nAChR選択性作動薬であるRJR-2403 (0.1-1.0 μ M) を灌流すると呼吸数は濃度依存性に増加した。非選択性nAChR拮抗薬であるmecamylamine (0.1-100 μ M)、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR選択性拮抗薬であるdihydro- β -erythroidine (0.1-100 μ M)、 $\alpha 7$ nAChR選択性拮抗薬であるmethyllycaconitine (0.1-100 μ M) 及び α -bungarotoxin (0.01-1.0 μ M) の灌流ではいずれも呼吸数は濃度依存性に減少した。次に、ブラインド穿孔パッチクランプ法による呼吸ニューロンの細胞内記録を行った。dihydro- β -erythroidine 20 μ Mの灌流により前吸息性及び吸息性ニューロンの呼息相における膜電位は過分極し、intra-burst firing frequency (呼吸リズムに同期した活動電位発火頻度) は減少した。一方methyllycaconitine 20 μ Mの灌流効果は、前吸息性ニューロンにおいてはdihydro- β -erythroidineと同様であったが、吸息性ニューロンにおいてはintra-burst firing frequencyの減少のみであった。

(考察と結論) 本研究では $\alpha 4\beta 2$ 及び $\alpha 7$ nAChRがともに中枢性呼吸調節機構に関与していることが示された。前吸息性ニューロン及び吸息性ニューロンの活動に対する $\alpha 4\beta 2$ nAChR拮抗薬の作用は同様であったのに対し、 $\alpha 7$ nAChR拮抗薬の作用に差が認められた。特に、前吸息性ニューロンの膜電位は過分極したが、吸息性ニューロンの膜電位は変化しなかった。このことから、前吸息性ニューロンにおいては $\alpha 4\beta 2$ と $\alpha 7$ の双方のnAChRが、また吸息性ニューロンにおいては $\alpha 4\beta 2$ nAChRが存在し、呼吸神経回路網の活動を調節していると考えられた。

論文審査の要旨

本研究では、新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いて中枢性呼吸調節機構におけるニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) サブタイプの機能的役割を検討した。その結果、 $\alpha 4\beta 2$ 及び $\alpha 7$ nAChRがともに中枢性呼吸調節機構に関与していることが示された。前吸息性ニューロン及び吸息性ニューロンの活動に対する $\alpha 4\beta 2$ nAChR拮抗薬の作用は同様であったのに対し、 $\alpha 7$ nAChR拮抗薬の作用に差が認められた。特に前吸息性ニューロンの膜電位は過分極側に変位したが、吸息性ニューロンの膜電位は変化しなかった。このことから、前吸息性ニューロンにおいては $\alpha 4\beta 2$ と $\alpha 7$ の両方のnAChRが、また吸息性ニューロンにおいては $\alpha 4\beta 2$ nAChRが呼吸神経回路網の活動を調節していると考えられた。

審査では、標本の周期的な発火現象が何により引き起こされるかが問われた。これに対して、この現象が灌流液中の二酸化炭素やpHにより影響を受けることから、これらが周期的な発火を引き起こしている可能性があると回答された。また、延髄より上位の脳幹が呼吸にどのように関与しているかとの質問に対しては、標本に橋を橋を保存させると呼吸回数が減少することから延髄の呼吸ニューロンに対して抑制性伝達をしている可能性があることが回答された。さらに脳幹部網様体は標本の呼吸活動に影響するかとの質問に対しては、この実験系の維持には薬剤を必要とせず、標本作成時に投与した薬剤の影響の有無に関わらず一定した呼吸回数を数時間間隔で記録することができることから、その影響は少ないと予想されると回答された。中枢性呼吸調節機構においてnAChR以外の働きについての質問には、ムスカリン性AChRが呼吸調節に関与していることが明らかになっており、 γ -アミノ酪酸については現在研究中であることが回答された。本研究により非脱分極性筋弛緩薬などのnAChR拮抗薬が中枢性呼吸抑制を来しうることが明らかにされたが、これに対する治療手段について質問がなされた。これに対して、血液脳関門を通過して脳内アセチルコリン濃度を増加させるドネペジルなどの薬剤が治療手段となりうること、またその研究も現在進行中であると回答された。

本研究に対して、今後パッチクランプした状態の呼吸ニューロンに色素注入を行って形態学的な評価を加えたり、延髄より上位の脳幹部を残存させ、よりin vivoに近い状態での実験を行うなど発展性の余地がある研究との評価がなされた。また、呼吸ニューロンにおける発火現象がそれぞれ呼吸活動においてどのような意味を持つのかなどこの研究で明らかにされていない問題もあり、今後の課題とされた。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、中枢性呼吸調節機構におけるnAChRの関与を受容体サブタイプのレベルで明らかにした有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 麻酔学 武田 純三
生理学 岡野 栄之 内科学 鈴木 則宏
解剖学 仲嶋 一範

学力確認担当者:

審査委員長: 岡野 栄之

試問日: 平成18年 2月28日

Proinflammatory Cytokines Expression in Noise-Induced Damaged Cochlea (音響外傷蝸牛における炎症性サイトカインの発現)

藤岡 正人

内容の要旨

過大音曝露は蝸牛性の感音難聴の原因の一つとして古くから知られている。临床上この難聴は音響外傷性難聴と診断され、治療にはステロイド大量療法が経験的に用いられる。しかしその効果は低く副作用が大きいと、病態生理に基づいた新規治療法が望まれている。ここ数年、音響外傷急性期における蝸牛局所への炎症細胞浸潤が動物実験レベルで報告され、急性期における抗炎症治療の重要性が再認識されるようになったが、その一方で治療標的となりうる炎症反応関連分子の発現に関する知見は未だ乏しい。今回我々は、音響外傷急性期における障害局所での炎症性サイトカイン発現を検討した。

4～6週齢のSprague-Dawleyラット雄に、無麻酔下で4kHz中心124dB SPLの1オクターブ幅のバンドノイズを負荷した。負荷前および直後、3、6、12、24時間、3、5、7、14、28日後に断頭し蝸牛を摘出し、RT-PCR法により7種類の炎症関連物質の発現を検討したところ、TNF- α 、IL-1ファミリー、IL-6に発現を認めた。IL-12 p40、GM-CSFの発現は認めなかった。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6の発現をTaqMan法で定量したところ、音響負荷後3時間でIL-1 β 、IL-6に有意なRNAの発現上昇を認めた。ウェスタンブロット法では、IL-6はやや遅れた6時間で有意な上昇を認めた。免疫組織染色では12時間未満で蝸牛外側壁の最外側にあたるtype IV、III線維細胞の細胞質にIL-6の発現を認め、その後外側壁に広域に分布した。この発現は活性型炎症細胞の表面抗原分子であるIba-1の発現と一致しなかった。らせん神経節でもNeuN陽性の神経細胞の細胞質に12時間～24時間後でIL-6の発現を認めた。

過去の報告から、音響外傷後の蝸牛ではマクロファージをはじめとした単球優位の炎症細胞浸潤が生じ、蝸牛内で障害を受けた細胞を食食することが明らかにされている。他方、ノックアウトマウスの検討から、IL-6には障害局所へ炎症細胞浸潤を促進する役割があることが他臓器で知られている。急性感音難聴において広範囲な副作用を有するステロイド剤が大量投与される現状を考えると、発現分子特異的阻害剤による抗炎症治療には、より選択的で副作用の小さい新規治療法としての可能性がある。とくに昨今上梓されたIL-6阻害剤は、臨床治験において副作用が極めて少ないことが確認されており、今後IL-6シグナルの阻害による当モデルへの影響を検討することが急務と考えられた。

論文審査の要旨

炎症反応は組織障害に際して臓器・障害の種類を問わず、局所から生じる普遍的な生理反応である。炎症反応急性期に障害局所に生じる炎症性サイトカインに関する研究は、その阻害・抑制によって続発する一連の炎症反応を抑制し得るという意味で、臨床的観点から極めて重要である。他方、進行した感音難聴は不可逆であり、難聴や耳症状(耳鳴・耳閉塞感など)に生涯悩まされることとなるため、急性期における蝸牛障害の抑制は耳科学の重要なテーマである。昨今の音響外傷急性期における蝸牛局所での炎症細胞浸潤に関する報告に鑑み、今回、病態生理に基づいた副作用の少ない感音難聴に対する新規抗炎症治療標的を探索する目的で、音響外傷蝸牛急性期における炎症性サイトカインの発現を検討した。

審査では、まず本研究の前半部において、有意な発現上昇が定量RT-PCRで確認されているIL-1 β のタンパク質レベルでの検討も進め

るべきとの助言がなされた。次にIL-6の有意な発現上昇にRT-PCRでは音響負荷後3時間、ウェスタンブロットでは6時間と差があることに関して質問がなされ、何らかのtranslationalな調節がなされている可能性があるとの回答がなされた。続いて免疫組織染色では12時間で蝸牛外側壁に広域に発現した後24時間で減弱したことに関連し、IL-6タンパク質の安定性について質問がなされた。これに対し、蝸牛内での分解やタンパク自体の半減期は明らかではないが、蝸牛リンパ液は脳脊髄液へ還流されることから、今回検討したIL-6も同様の経路で排泄されている可能性があるとの回答がなされた。早期の発現部位であったIV型、III型線維細胞の機能について、前者が蝸牛内でのカリウムイオンのリサイクルを担う細胞の一員であることが述べられると同時に、後者はaquaporinの発現が報告されているので、おそらく蝸牛内のリンパ液環境の恒常性維持に何らかの関与をしているであろうとの回答がなされた。初期において外側壁に局限した発現が見られることの機序や生理的意義についての質問には、自己免疫性難聴モデルでも蝸牛外側壁の線維細胞において炎症反応関連分子の発現上昇が報告されていることを挙げ、本来、蝸牛線維細胞そのものに細胞レベルで炎症を惹起する性質があるのだろうという推察がなされた。またコルチ器下面の線維細胞にもIL-6が強く発現していたことが述べられ、音響負荷による振動刺激からIL-6発現が誘導される可能性が述べられた。これに対し、蝸牛外側壁は血管に富んでいることから、炎症関連物質の産生や炎症細胞浸潤には、血管収縮や血流障害も関与しているであろう、との助言がなされた。

次に、IL-6発現部位の周囲にIba-1陽性細胞が分布したことに関連して、この細胞の由来について質問がなされた。これに対し、過去の報告から外側壁に分布する同細胞はCD45陽性CD11b陽性であり、骨髄由来の浸潤細胞と考えられるとの回答がなされた。浸潤細胞の種類に関する質問には、過去の報告から単球優位で、リンパ球の浸潤に関する報告はないとの回答がなされ、その原因として、音響外傷蝸牛で発現上昇が報告されているMCP-1などの好中球遊走因子の関与の可能性が述べられた。

最後に、これらの現象は音圧によるコルチ器障害に続発するものであって、外側壁障害による直接の現象ではないのではないかと、この質問がなされた。これに対し、今回検討したモデルでは音響負荷は2時間連続して負荷しているためおそらくはコルチ器の障害とは独立して外側壁に物理的侵襲が生じていると考えられるが、両者の関係を明らかにするためには、予め耳毒性薬物などでコルチ器を障害した個体で音響外傷モデルを作成して、IL-6発現に変化が生じるかを比較検討する必要があるだろうとの回答がなされた。

以上のように当研究には未だ検討すべき課題が残されているものの、音響外傷に際して蝸牛外側壁から炎症性サイトカインの発現を伴う炎症反応が生じるということを初めて示した研究として、有意な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 耳鼻咽喉科学 小川 郁
外科学 河瀬 斌 微生物学・免疫学 小安 重夫
解剖学 仲嶋 一範
学力確認担当者：
審査委員長：河瀬 斌

試問日：平成18年2月15日

司法解剖例における心中の検討

保 科 光 紀

内容の要旨

〈目的〉我が国では「心中」という言葉は古くは相思相愛の男女が相互の合意のもとに「自殺」という意味で理解されてきた。最近ではむしろ母子心中という言葉が報道でよく聞かれるようになっていく。一方、海外では心中事例そのものが少なく、法医学領域では加害者と被害者という視点からmurder followed by suicide、すなわち加害者が殺人の後に自殺する事例、精神医学領域ではsuicide pact、すなわち合意のある事例が中心であり、それぞれ関心のある事例が異なっている。本研究では、慶應義塾大学医学部法医学教室での司法解剖例における無理心中及び合意のある心中の事例を調べ、全体像やそれぞれの中での加害者と被害者の関係、殺人の手段、動機等を示すとともに、海外文献との比較を行うことや、現在のところ統一された心中の定義がないため、筆者としての定義を提案すること、更に心中の防止策を検討することを目的とした。

〈方法〉1945年9月から2003年12月までの期間に慶應義塾大学医学部法医学教室で施行された司法解剖(総数7276体)の解剖記録を調査し、心中事例を抽出した。これをもとに加害者と被害者の関係、動機、手段、年齢分布等について分析した。また、情報を補うため、1984年以降の事例は新聞のデータベースを検索し、該当事件について参照した。

〈結果〉298例の心中事例が抽出され、そのうち259例が無理心中であった。加害者と被害者の関係では、母子心中が110例と最も多く、恋愛関係の男女間の事例はわずか16例であった。動機は母子心中では育児ノイローゼが最も多く、高齢の夫婦の心中では健康問題、経済困難、一家心中では経済困難が最も多かった。殺人の手段は絞首が最も多く、母子心中や合意のある者同士の心中では一酸化炭素中毒、睡眠薬中毒などの暴力的でない手段が多かった。海外では夫婦、恋人の間での無理心中が最も多く、動機の主たるものは関係の破綻であり、手段は銃が最も多いなど我が国とは大きな違いが見られた。

〈考察〉心中の定義が統一されていないため、研究によって無理心中として扱う事例の範囲が異なっていた。このため、無理心中の定義を「加害者が被害者を殺害した後に自殺する意志を持っていた事例」と明確にする必要があると考えられた。また、わが国では無理心中の中で最も多い母子心中を防止することが重要であり、母親の孤立を防ぐために看護的な介入が有効であると考えられた。

論文審査の要旨

本研究は慶應義塾大学医学部法医学教室で司法解剖となった事例のうち、心中事例を調査し、その特徴を明らかにし、さらに海外の事例との比較を試みたものである。1945年9月から2003年12月までの期間の7276例の司法解剖例のうち心中事例は298例見られ、内訳は無理心中が259例、合意のある心中が39例であった。無理心中の中では母子心中が110例と最も多く、従来我が国に特徴的と考えられていた恋人同士の場合は16例しか見られなかった。手段は絞首の116例が最も多かった。母子心中や合意のある心中では一酸化炭素中毒や薬物中毒など暴力的でなく、両者が同時に企図出来る手段が多かった。しかし、手段には時代による変遷が見られ、近年では一酸化炭素中毒や薬物中毒は見られなくなっている。また、海外との比較では、心中自体が稀とされているが、配偶者や恋人同士の心中が最も多く、手段は銃器によるものが最も多いなど我が国の事例との相違が見られ、これには手段の入手の容易さや文化的な背景の違いが反映されていると考えられた。

審査ではまず、無理心中の定義を「加害者が自殺する意志をもって殺人を犯した事例」とした点について、どのように意志を確認するのかとの質問があった。これに対し、解剖記録の記載や新聞のデータベースを参照したものの、加害者が死亡していたり、記録の不備などから意志の確認が困難な事例もあり、事例抽出の限界であると回答された。また、母子心中の防止に看護師による訪問指導などの介入が有効であると考察した点に関して、本研究の結果と考察が一致していないのではないかと指摘があった。この点については文献的な記述のみを根拠としているが、母子心中の背景の調査から母親の孤立を防ぐことが防止策として有効であると示唆されるとの説明がなされた。さらに、近年一酸化炭素中毒や薬物中毒による心中事例が見られなくなっているとの結果について、事件性のない事例は東京都の場合、監察医務院での行政解剖になっている可能性が高く、実際に減少しているとは言えないのではないかと指摘があった。これに対し、司法関係者の判断により司法解剖に至らない心中事例がありうるという研究上の限界が存在すると回答された。今後の課題として監察医務院の事例を含めたより多数例での検討が必要であると指摘された。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、我が国での多数例における心中の特徴を明らかにし、海外の事例との比較を行い、将来の研究のために無理心中と合意のある心中の定義を提案し、有効と考えられる予防策を示唆したという点で有意義とされた。

論文審査担当者 主査 精神神経科学 鹿島 晴雄
法医学 藤田 眞幸 医療政策・管理学 池上 直己
解剖学 相磯 貞和
学力確認担当者：
審査委員長：藤田 眞幸

試問日：平成18年1月27日

Prevention of Cancer Cachexia by a Novel Nuclear Factor κ B Inhibitor in Prostate Cancer

(前立腺癌における新規NF- κ B阻害剤による癌悪液質の抑制)

黒田 健司

内容の要旨

論文審査の要旨

癌悪液質は前立腺癌患者において、その治療を困難なものとし死因の一つとなり得るものであるが、最近の研究からinterleukin 6 (IL-6) を初めとするサイトカインの異常産生及び放出が、悪液質の誘導に関与していると考えられている。本研究では前立腺癌患者におけるIL-6と悪液質との関連性について検討し、ホルモン抵抗性前立腺癌細胞株を用いた動物実験において新規NF- κ B阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)のIL-6及び悪液質に対する抑制効果について検討した。

(材料・方法) 患者群の前立腺癌患者98例において、IL-6値や悪液質のパラメーターを測定した。細胞株はホルモン抵抗性前立腺癌細胞株JCA-1細胞を用い、薬剤は新規NF- κ B阻害剤DHMEQを使用した。

動物実験では、JCA-1細胞(1×10⁷個)をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍径が10mmに到達した時点でマウスを無作為に3群に分類した。3群はそれぞれ薬剤DHMEQ投与群(8 mg/kg, n=12)、溶媒DMSO投与群(n=16)、薬剤非投与群(n=11)とした。DHMEQ、DMSOは25日間連日腹腔内投与した。また腫瘍を移植せず、また薬剤も投与しないコントロール群(n=14)を設け、4グループのマウス群で実験を進めた。実験期間中、全てのマウスの体重を一日おきに測定した。また、屠殺時に全てのマウスの腫瘍、腓腹筋重量、精巣上体脂肪重量、ヘマトクリット値、トリグリセリド値、アルブミン値、IL-6値を測定した。

(結果) 前立腺癌再燃患者群は、IL-6値、PSA値、アルブミン値、ヘマトクリット値、body mass index、performance statusの全てにおいて未治療群、寛解群に比し、有意な差を示した。

動物実験では、担癌薬剤非投与マウス群及び担癌DMSO投与マウス群の体重が経時的な減少を認めたのに対し、担癌DHMEQ投与マウス群の体重は有意な減少を示さなかった。実験第26日目の時点で、担癌DHMEQ投与マウス群の体重、腓腹筋重量、精巣上体脂肪重量は有意に他の担癌マウス2群よりも高値であり、ヘマトクリット値、トリグリセリド値も同様に他の担癌2群よりも有意に高値であった。またIL-6値は、他の担癌2群よりも有意に低値であった。アルブミン値は、担癌DHMEQ投与マウス群において担癌薬剤非投与マウス群より有意に高値であった。

(結論) 進行性前立腺癌患者においてIL-6値と悪液質との関連性が示され、また基礎実験においてDHMEQがIL-6産生を抑制し、悪液質の進行を抑制することが示された。新規NF- κ B阻害剤DHMEQは進行性前立腺癌における悪液質に対する新たな治療薬となり得ると考えられた。

前立腺癌患者における血清IL-6値と悪液質との関連性について検討するとともに、ホルモン抵抗性前立腺癌細胞株を用い、新規NF- κ B阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)のIL-6産生及び悪液質に対する抑制効果について検討した。前立腺癌患者98例の検討において、再燃群ではIL-6値が高値であり、悪液質を示す検査値、ヘマトクリット(Hct)、アルブミン(Alb)の低値を認めた。またIL-6高値群では有意に予後不良であった。前立腺癌細胞JCA-1移植ヌードマウスにおいて、DHMEQ投与により体重、精巣上体脂肪重量、腓腹筋重量の減少が有意に抑制されるとともに、Hct値、Alb値、トリグリセリド値は有意に高値を示し、IL-6値は有意に低値を示した。以上より、進行性前立腺癌患者においてIL-6値と悪液質との関連性が示され、動物実験においてDHMEQがIL-6産生を抑制し悪液質を改善したことが示された。

審査では、本研究にホルモン抵抗性前立腺癌細胞株を使用する意義について問われ、アンドロゲン非依存性で増殖が速やかな、癌悪液質の動物実験に適した細胞株の必要性が説明された。また再燃癌患者におけるIL-6値が有意に高値である点については、癌細胞の性質がホルモン依存性から非依存性へと変化するのに伴い、IL-6産生能を有する癌細胞がオートクライン及びパラクライン的に増殖していくためと考えられると回答された。また他のサイトカイン抑制の有無を確認すべきではなかったかという指摘に対しては、既知の報告では前立腺癌におけるIL-1、TNF- α 等と悪液質との関連性も示唆されるが、癌悪液質の動物実験においてはIL-6の重要性を示唆した報告例が多いとの回答がなされた。また実験期間中担癌マウス間の腫瘍体積に有意差がないにもかかわらずIL-6値に有意差が現れた結果について問われ、DHMEQにより腫瘍細胞のIL-6産生が有意に抑制されていたものと考えられると回答された。実験期間途中、担癌マウスのうちDMSO投与群の体重と薬剤非投与群の体重間に有意差が認められた点については、実験終了までDMSO投与マウスの体重減少は抑制されず、最終的にDHMEQ投与群の体重との間に有意差が認められたことから、DMSOは悪液質に対し特別な効果はないと判断したと答えられた。本研究においてはマウス腫瘍細胞の病理組織学的検討も考慮すべきであったとの指摘がなされた。

以上、本研究ではさらに検討すべき課題を残しているものの、前立腺癌患者における悪液質とIL-6値との関連性を示し、動物実験においてDHMEQにより悪液質パラメーターの改善が認められたことで、進行性前立腺癌における悪液質に対する新たな方向性を示唆し得る有用な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝
病理学 坂元 亨宇 先端医学 河上 裕
外科学 北島 政樹
学力確認担当者: 池田 康夫、坂元 亨宇
審査委員長: 坂元 亨宇

試問日: 平成18年2月9日

Clinical and Behavioral Impact of Implementing Community-Based Diabetes Disease Management in Japan

(日本での地域糖尿病管理の導入による臨床ならびに患者行動に及ぼす影響)

坂 巻 弘 之

内容の要旨

目的：欧米で注目されている疾病管理の概念をもとに、島根県安来市における糖尿病管理プログラムの効果を臨床的指標ならびに患者行動、QOLの面から検討し、それらに影響を与える要因を検討することを目的とした。同プログラムは、地域での診療標準と共通教育ツールの作成、登録された患者について「糖尿病手帳」を用いた医療機関連携における患者情報の共有とモニタリングを中心としている。

方法：登録された2型糖尿病患者のうち、ベースライン（2002年1月～2月実施）と介入後（2003年1月～2月実施）の両アンケート調査に回答の得られた316例を対象とした。調査に先立ち、安来市立病院倫理委員会での審査を受けた。患者の日常生活管理をサポートするためのツールとして「ライフスタイルノート」（以下「ノート」という）とよぶ日記を作成し、患者の日常生活上のリスクに応じた到達目標の設定、達成状況の定期的チェックを中心とした介入を行った。介入効果は、臨床的指標（体重、BMI、血圧、HbA1c、血清脂質）を糖尿病手帳から、患者行動（食事・運動指導への順守、糖尿病に関する知識、食生活状況の自己評価）およびQOL尺度としてPAID（Problem Areas in Diabetes；疾病特異的尺度）ならびにEQ-5D（包括尺度）を、それぞれアンケート調査によってデータ収集し、分析した。

結果：対象患者の男女比は男50.6%、登録時年齢 59.6 ± 8.1 歳、経口剤治療32.0%、インスリン治療14.9%であった。介入前後の各指標をみると、拡張期血圧（ $P < 0.001$ ）、HbA1c（ $P < 0.001$ ）、中性脂肪（ $P = 0.038$ ）、食生活スコア（ $P < 0.001$ ）、糖尿病に対する知識（ $P = 0.012$ ）において有意な改善が認められた。QOLについては、PAIDは有意に改善（ $P < 0.001$ ）したが、EQ-5Dは有意に悪化した（ $P = 0.026$ ）。介入後の臨床的指標、患者行動との関係をみると、指導への順守状況のよいものではHbA1c（ $P = 0.022$ ）、食生活スコア（ $P < 0.001$ ）、知識スコア（ $P < 0.001$ ）のいずれも有意に良好な値であった。またノート使用有無でみると、介入後の食生活スコアでノート使用群が非使用群に比べ有意に優れていた（ $P = 0.002$ ）。

考察と結論：ライフスタイルノートによる生活習慣指導を中心とした介入によって検査値と食生活、知識について有意な改善が認められた。しかしながら、QOLについてはPAIDについては改善がみられたのに対し、EQ-5Dについては悪化しており、QOLについての解釈の難しさが明らかになった。本地域での糖尿病管理プログラムは、医師主導型で医療機関を中核とした地域での疾病管理モデルとして簡便で現実的な方法と考えられるが、今後、医療費等への影響も含めたより長期にわたる検討が必要である。

論文審査の要旨

島根県安来市における地域での糖尿病に対する疾病管理の効果を臨床的指標ならびに患者行動、QOLの面から検討し、それらに影響を与える要因を検討することを目的とした。対象患者は、登録された2型糖尿病患者のうち、介入前後2回のアンケート調査に回答の得られた316例である。患者の日常生活管理をサポートするために、生活上の改善目標を設定し管理を行うためのツールとして「ライフスタイルノート」（以下「ノート」という）を用いた介入を行った。効果の評価尺度は、臨床的指標（BMI、臨床検査値）、患者行動・糖尿病に対する知識、およびQOLを用いた。その結果、HbA1c、拡張期血圧等の検査値と食生活スコア、知識スコアにおいて有意な改善が認められた。しかしながら、QOLについては、糖尿病疾病特異的尺度であるPAIDは改善がみられたのに対し、包括尺度であるEQ-5Dは悪化しており、QOL尺度の解釈の難しさが明らかになった。さらに、ノート使用有無でみると、介入後の食生活スコアでノート使用群が非使用群に比べ有意に優れており、食生活習慣改善に対して本介入方法が有効であることが示唆された。

審査では、第1に、2回のアンケートに回答した集団の代表性について質問があった。これに対し、性・年齢、検査値等はデータが得られるものの、患者の行動、知識、QOLはアンケートでしか把握できないため、代表性の検証を十分できないで行わなかったと説明された。第2に、ノート配布方法について質問され、ノート配布は当該地域の糖尿病患者ほぼ全員に配布されていることが説明された。第3に、介入を標準化するための方法とその検証をどのように行ったかについて質問があった。これに対して、医師・看護師に対してノート使用における患者の目標設定や指導方法に関して事前説明会を実施しているものの、匿名化されているために、医療機関毎の指導内容について確認を行うことができなかったと説明された。第4に、QOLについて、PAIDの改善とEQ-5Dの悪化という、相反する結果が得られたことの解釈について質問された。これに対して、PAIDは心理的負担面を計測しているの、生活指導により心理的負担感の改善がもたらされたと推測されるのに対し、EQ-5Dでは5質問中1項目でも悪化するとスコアが大きく減少することの影響の可能性があると回答された。最後に、本手法の有効性を客観的に示すためには他地域で再現性を検証すべきであったとの指摘があったが、患者データを継続して収集できる地域が他になく、新たなデータ収集の協力体制を得ることが困難であったため、1地域に止まざるをえなかったと説明された。

以上のように、本研究にはさらに検討されるべき課題を残しているものの、わが国初の地域での疾病管理の効果を検証した研究として評価された。

論文審査担当者 主査 医療政策・管理学 池上 直己
衛生学公衆衛生学 大前 和幸 衛生学公衆衛生学 武林 亨
精神神経科学 鹿島 晴雄
学力確認担当者：池田 康夫、大前 和幸
審査委員長：大前 和幸

試問日：平成18年3月3日

Spinal Kyphosis Causes Demyelination and Neuronal Loss in the Spinal Cord

A New Model of Kyphotic Deformity Using Juvenile Japanese Small Game Fowls

(脊柱後弯変形は脱髄と脊髄神経細胞の脱落を生じさせる：小軍鶏を用いた新しい後弯変形の動物モデル)

清水 健太郎

内容の要旨

脊柱変形による選発性脊髄麻痺は臨床上しばしば経験する病態である。麻痺発生のメカニズムはなお不明な点が多いが、その一因は今まで適切な動物モデルがなかったために基礎的研究ができなかったことが挙げられる。本研究では、幼若動物を用いて手術的に頸椎の局所後弯変形を発生させる新しい動物モデルを確立し、このモデルを用いて後弯変形に伴う脊髄の組織学的変化を検討した。

研究には、生後5週齢(約200~300g)の小軍鶏75羽を用いた。全身麻酔下に、C4-5高位の傍脊柱筋を剥離横切したのち当該高位の椎弓切除及び椎間関節破壊を行った。術後、経時的に4%パラホルムアルデヒドを用いた経心臓的灌流固定を行い、脊椎と脊髄を一塊として摘出した。画像評価として、頸椎部の側面単純X線を撮影した。後弯の頂点をはさむ椎体長軸のなす角度を計測し後弯角とした。病理組織学的評価として、脊髄のみを取り出し、最大圧迫部の横断切片を作製しHE染色、Toluidine blue染色を行った。さらに電子顕微鏡による観察を行った。画像解析としては、コンピュータ画像解析装置(WinRoof)を用い、前角細胞、髄鞘を定量化した。後弯角と脊髄扁平率(前後径/横径)、脱髄の程度(髄鞘面積率)ならびに前角細胞数の相関を検討した。また微細血管の検討のために、手術8週後に、10%ゼラチン加墨汁(0.5ml/g体重)を造影剤として用いた経心臓的全身血管造影を行った。

術後、全例で頸椎に進行性の後弯変形が生じた。後弯変形は術後3週まで進行し、その後は固定した角度のまま安定化した。脊髄は後弯の頂点で最も高度に扁平化し、腹側より圧迫されていた。後弯角と脊髄扁平率に強い相関($r=-0.91$)が認められた。灰白質の前角細胞は萎縮、脱落し、前索部に軸索の脱髄と空胞変性が認められた。脱髄は、後弯がより高度になるにつれて、前索、側索、後索の順に進行した。後索部では後弯変形が顕著で脊髄が扁平化しても髄鞘は温存されていた。血管造影では扁平化した脊髄の血管網の途絶、血管数の減少、尿管の縮小などの変化を認めた。これらの所見は脊髄の腹側に顕著で、後弯が高度になるほど顕著であった。

慢性脊髄圧迫の動物モデルとしてtwymouseがよく知られているが、自然発症モデルであるため、圧迫方向や再現性に問題がある。また過去に報告された動物実験における脊髄麻痺はほとんどが急性圧迫によるものであった。本モデルは二足動物である幼若鳥類を用いて、頸椎に手術的操作を加えることにより成長と共に再現性のある進行性の後弯変形を生じるもので、後弯に伴う脊髄の病態を解明する上で極めて有用なモデルといえる。本研究では、頸椎後弯変形の進行に伴い脊髄の扁平化が顕著になり、灰白質では前角細胞の脱落、白質では脱髄、空胞変性が生じ、脱髄変化は前索→側索→後索へと進行することを明らかにした。これらの脊髄内の組織学的変化は腹側からの持続的な機械的圧迫に加え血流障害によるものと考えられた。

本研究の結果は、カリエス、骨粗鬆症などに臨床みられる選発性脊髄麻痺の病態解明に大きな一助となるものと考えている。

論文審査の要旨

脊髄は一般に慢性圧迫に対して強い抵抗性を示すが、脊椎カリエスや骨粗鬆症性脊椎圧迫骨折後に生じる選発性脊髄麻痺は、臨床上しばしば経験する病態である。しかし、このメカニズムを解明するための適切な動物モデルはこれまで存在しなかった。過去の研究は、急性の脊髄圧迫による動物モデルがほとんどであり、twymouseなど他の慢性圧迫モデルも圧迫の再現性、臨床例との類似性などで問題点を有していた。本研究では、幼若鳥類の頸椎に手術的に進行性の局所後弯変形を発生させる新しい動物モデルを作製し、このモデルを用い、変形による脊髄圧迫障害の病態を検討した。実験には生後5週齢の小軍鶏75羽を使用した。全身麻酔下にC4~C5高位の頸椎に椎弓切除及び椎間関節破壊を行うと、術後、同部に再現性のある進行性の後弯変形が生じ、脊髄圧迫を来した。脊髄は頸椎後弯の頂点で腹側より圧迫され扁平化し、後弯変形の進行にともない脊髄の扁平化も顕著になり、それに伴い前角細胞の脱落、脱髄、空胞変性などの組織変化が生じ、その変化が前索→側索→後索の順に進行することが明らかになった。また微細血管造影では、扁平化した脊髄の血管数の減少、尿管径の縮小などの変化を認め、圧迫を受けた脊髄の組織学的変化には、持続的な機械的圧迫に加え、血流障害も関与している可能性が示唆された。

審査では、まず小軍鶏の脊髄の解剖について質問がなされた。これに対して、基本的にはヒトと同じであり、血流も前脊髄動脈、分節動脈が脊髄に還流していると回答された。このモデルの将来の応用についての質問には、慢性圧迫には急性圧迫と異なる代償作用が存在する筈で、今後はヒトの脊髄障害における病態、たとえば高度な圧迫や後弯を呈しMRIでT2高輝度変化を認めてもしばしば無症状の症例が存在する原因の解明等につなげたいと回答された。実験方法と再現性についての質問には、後方の支持組織のみを破壊し脊髄に侵襲を加えない点が原則であり、手術操作により後弯変形は容易に再現できると回答された。また運動麻痺の起きなかった理由について質問がなされた。これに対して、鳥類の運動伝導路の局在が不明で圧迫部位と異なる可能性、圧迫のみならず不安定性やtetheringが関与する可能性が考えられること、また小軍鶏が羽根(上肢)を動かさない鳥であることが運動評価を困難にしていると回答された。臨床で、脱髄の修復や治療効果の評価などにもこのモデルは有用と考えられ、今後の発展として、MRIの画像などを取り入れた評価や、最大圧迫部より上下での組織血流評価も行うべきだと指摘がなされた。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、二足動物である鳥類を実験動物に選び、後弯変形による緩徐な脊髄圧迫を来す有意義なモデルを開発し、今後の臨床例の病態解明につながる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
内科学 鈴木 則宏 解剖学 仲嶋 一範
外科学 河瀬 斌

学力確認担当者: 池田 康夫、鈴木 則宏
審査委員長: 鈴木 則宏

試問日: 平成18年2月7日

Effects of morphine and its metabolites on immune function in advanced cancer patients

(末期がん患者におけるモルヒネとその代謝産物の免疫機能に及ぼす影響)

橋 口 さ お り

内容の要旨

モルヒネはがんによって代表される激しい疼痛の治療に広く使用される一方で、その副作用として免疫抑制作用があることが注目されている。しかし、これまでの研究のほとんどは基礎的な生体外分析や動物実験のデータであり、ヒトの末期がん患者を対象に、その免疫機構に対してモルヒネ及びその活性代謝産物がどのような影響を及ぼすかは不明であった。そこで本研究では末期がん患者を対象とし、モルヒネとその活性代謝産物であるMorphine-3-glucuronide (M-3-G) 及びMorphine-6-glucuronide (M-6-G) が免疫機構に及ぼす影響について検討した。

【対象】慶應義塾大学病院ペインクリニックを受診した癌性疼痛を有する末期がん患者15名。

【方法】初回受診時またはモルヒネ投与量、投与経路など治療方針変更前、変更1週間後、変更3週間後に静脈血採血を行った。血漿モルヒネ濃度、血漿M-3-G濃度、血漿M-6-G濃度と、細胞性免疫の指標としてCD4⁺、CD8⁺、NK細胞活性、PHA刺激リンパ球幼若化試験、液性免疫の指標としてIgG、IgMを測定した。

【結果】本研究への参加の時点で、それまでモルヒネを投与された既往がない患者6名をI群とし、既に1ヶ月以上モルヒネを投与されていた患者9名をII群とし、両群の血漿モルヒネ及び活性代謝産物濃度と免疫機能の関連を比較した。研究期間中、両群ともに疼痛は平均4/10 (visual analogue scale) であったものが2/10にコントロールされていた。I群はII群と比較してM-3-GおよびM-6-Gは有意に低値であったが、免疫学的指標は両群とも有意な差が認められなかった。I群においては活性代謝産物と免疫グロブリンおよびPHA刺激リンパ球幼若化試験において負の相関関係が認められたが、II群では認められなかった。

【考察】末期がん患者において、モルヒネ投与初期にモルヒネの活性代謝産物によって液性免疫、細胞性免疫の両方に抑制作用を持つ可能性が示唆されたが、一ヶ月以上の長期にわたってモルヒネを投与された患者では免疫抑制作用は認められなかった。これは、慢性的にモルヒネを投与された場合、免疫抑制作用に対しても耐性が形成されるといふ動物実験による結果を支持するものである。本研究において負の相関を示したいずれの免疫指標もほぼ正常値の範囲内での変動となっており、疼痛を適切に治療することによる免疫抑制の回避と、モルヒネやその活性代謝産物による免疫抑制作用のバランスにおいて、末期がん患者へのモルヒネの投与は許容され得るものと考えられる。

論文審査の要旨

末期癌患者を対象とし、モルヒネとその活性代謝産物であるmorphine-3-glucuronide (M-3-G) 及びmorphine-6-glucuronide (M-6-G) が免疫機構に及ぼす影響について検討した。初回受診時、モルヒネ投与量変更1週間後、変更2週間後に採血を行い、モルヒネ、M-3-G、M-6-Gの血中濃度と、CD4⁺、CD8⁺、IL産生能、NK細胞活性、phytohemagglutinin (PHA) リンパ球幼若化反応、IgG、IgMを測定した。モルヒネ投与の既往がない患者をI群、モルヒネを投与されていた患者をII群とし、モルヒネ及び活性代謝産物濃度と免疫機能の関連を比較した。I群では活性代謝産物とIgMおよびPHA刺激リンパ球幼若化反応に負の相関関係が認められたがII群では認められなかった。末期癌患者においてモルヒネ投与初期に活性代謝産物によって液性免疫、細胞性免疫の両方に抑制作用を持つ可能性が示唆されたが、免疫指標は正常値の範囲内での変動となっており、末期癌患者へのモルヒネの投与は許容され得るものと考えられた。

審査ではまず脱落症例の理由と結論への影響について明確にされるべきとの指摘があった。また放射線療法や化学療法を受けた患者が含まれており影響を検討すべきとの指摘があり、症例数が少なく多変量解析が困難であったと回答された。採血は服薬後一定の時間にすべきとの指摘があった。免疫指標の変化が正常範囲内であったことについての解釈が問われ、数値は下がっているが臨床的に問題のない変動であり、患者の背景は様々であるが免疫抑制作用は大きく影響を与えない旨の回答であった。次に代謝産物の血中濃度のばらつきについて、肝転移による代謝への影響が出ているのではないかと指摘があった。肝機能障害指標が軽度上昇し肝機能が転化した症例もあり、代謝に影響した可能性がある旨の回答があった。進行癌患者の免疫状態について、個々の癌については検討されているので、考察に加えるべきであったとの指摘があった。また坐薬の投与方法について、挿入の深さによって薬物の吸収に差が出るので、今後は投与方法を十分指導すべきとの助言があった。モルヒネが判別分析で有意ではなくなった点についての解釈について質問には、生体ではモルヒネとその代謝産物が単独で存在することはなく、其々の影響の程度を解析する必要があるために判別分析を行い、モルヒネより代謝産物の影響が大きいと解釈できると回答された。また、IgMは抑制されたがIgGは抑制されなかったことについて、IgMに続きIgGが誘導される過程でT細胞の関与があり興味深いとのコメントがあった。

以上、本研究は様々な課題を残しているが、これまで主に基礎研究で指摘されていたモルヒネの免疫抑制作用について、臨床的に最も使用されている末期癌患者で検討されたものであり、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 麻酔学 武田 純三
微生物学・免疫学 小安 重夫 薬剤学 谷川原 祐介
外科学 北島 政樹

学力確認担当者: 池田 康夫、小安 重夫
審査委員長: 小安 重夫

試問日: 平成18年2月27日

Relation between Chromosomal Aberrations and Radiation Dose during the Process of TBI

(白血病骨髄移植時全身照射施行時の染色体変異と照射線量との関係)

杏 木 章 二

内容の要旨

今日の癌診療ではあらゆる場面で放射線が関わっている。希ではあるが全身被曝事故が起こる事もあり、その際の被曝線量の推定は治療方針の決定に欠くことは出来ない。今回我々は①これまでは報告の無い高線量域(5~10Gy)での染色体変異の出現頻度を明らかにする事と②白血病患者さんに全身照射(TBI)を行った場合(*in vivo*照射)と、全身照射に先立って同一患者さんより提供された血液を体外で照射した場合(*in vitro*照射)での染色体変異の出現頻度を比較しその相違を明らかにすることを目的として、検討を行った。

骨髄移植前に全身照射(TBI)を施行することとなった白血病患者8名に協力頂いた。TBI(*in vivo*照射)は12Gy/6Fr/3Daysのスケジュールにて行った。TBI施行前および毎回の照射直後に採血してこれを検体とし、プロトコールに従って処理(培養・固定・染色)して標本とした。各々の観察点(線量)から作成した標本を検鏡し、末梢血リンパ球染色体に生じた二動原体と断片を観察・計測して、その観察点での全てのリンパ球数で除して染色体異常の出現頻度とした。TBI前の採血で得た検体を用いて、TBIと同じスケジュールの照射を試験管内でも行い(*in vitro*照射)、TBIの際に行ったのと同様の方法にて染色体異常の出現頻度を算出して比較した。染色体変異の出現頻度の算出には約2000個のリンパ球を用いたが、今回の検討にあたって観察したリンパ球の総数は10000個前後に及んだ。

照射線量の増加に伴い十分な数の分裂期リンパ球の観察が困難となった3名を除いた5名について検討した。①5~10Gyまでの線量域において、照射線量が増加するに従い二動原体と断片の出現頻度も増加していた。②*in vivo*照射と*in vitro*照射の何れにおいても、照射線量が増加するにつれて二動原体と断片の出現頻度は増加していたが、*in vitro*照射での出現頻度の方が高かった。

従来は検討が困難とされていた高線量域においても、末梢血リンパ球に生じる不安定型染色体変異が照射線量と併に増加していることを明らかにした。更に*in vitro*照射にては*in vivo*照射よりも染色体変異の出現頻度が高く、この傾向は断片にて強く見られた。この事は、*in vivo*照射と*in vitro*照射では染色体変異の出現頻度に差異があることを支持する所見と考えられた。

①高線量域(5~10Gy)にても、照射線量の増加と併に不安定型染色体変異も増加していることを明らかにする事が出来た。

②一方で、*in vitro*照射での染色体変異の出現頻度は*in vivo*照射のそれに比して高い傾向が認められたことから、従来の*in vitro*照射を標準曲線とした被曝線量の推定では過小評価となる可能性があり、*in vivo*照射での標準曲線の確立が必要と考えられた。

論文審査の要旨

従来より、放射線被曝事故の際の線量評価には、*in vitro*実験系で求められた線量反応関係が利用されている。しかし*in vitro*試験管内照射での線量反応関係が生体内での線量反応関係を忠実に再現出来ているのか、疑問が残る。本研究では診療で行なわれる全身照射の機会を利用して①これまでは報告の無い5Gy以上の高線量域にて、放射線照射線量の増加に伴い末梢血リンパ球染色体変異出現も増加していることを、*in vivo*で初めて明らかにし②*in vivo*照射と*in vitro*照射では線量反応関係に差異がある可能性を示した。このことから、従来行なわれている*in vitro*実験系を基にした被曝線量の評価では、生体の実際の被曝線量が誤評価される恐れが考えられる。

審査ではまず、高線量域にて評価対象となる末梢血リンパ球分裂像が十分得られなかったことに対して質問がなされた。これに対して、高線量域では標本作成数を増したが、放射線の照射線量増加に伴う急激なリンパ球数の減少により、PHAを用いた分裂刺激では十分な数の染色体分裂像を得られなかったと回答されたが、さらに標本数を増したり培養方法を工夫するなどして、十分な数の評価対象となる染色体分裂像を得る必要があるとの指摘がなされた。また今回はMay-Giemsa染色にての評価であるが、FISH法を用いれば、高線量域でも十分な数のリンパ球染色体変異を検出出来るのではないかと、この質問がなされた。これに対して、最近ではFISH法による染色体変異の評価が一般的となっており、現在では我々もFISH法を試みているが、FISH法は専門的な技術や機材・スタッフ配置が必要となるため、広く症例数を蓄積して臨床応用を目指すにはMay-Giemsa染色などの平易な手法の方が向いていると考え、本研究が遂行されたと説明された。次に、症例数が8例と少なく統計解析の正確性に問題があるのではとの指摘がなされたが、年間を通じての全身照射症例が20例前後であり適格条件を満たす症例が集まりにくいことからやむを得ないが、今後症例を追加しての本研究の継続が期待された。また、*in vivo*照射と*in vitro*照射での染色体変異出現頻度に関する有意差について質問がなされた。これに対して、症例数が少なく統計学的有意差は論じられないが、これまで行なわれていた*in vitro*実験系では生体内での反応を再現できていない可能性を示唆した意義は大きいと考えられるとの説明がなされた。最後に、本研究と二次発癌をはじめとする晩期合併症の予測法の関連についての質問がなされた。これに対して、発癌は癌関連遺伝子の転座や欠失と関連していることから、転座や欠失と同様の機序で生じる二動原体染色体変異発現頻度も発癌頻度に相関することが予測される一方、放射線による晩期合併症の基礎にある正常組織の線維化も、照射による染色体変異と相関していると考えられ、放射線晩期合併症を予測することの可能性が示唆される旨の説明が、追加報告としてなされた。

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、これまでは報告の無い高線量域での放射線照射線量と染色体変異出現頻度の関係について*in vivo*で初めて明らかにし、これが*in vitro*実験系とは差異があることを示唆した点で、放射線生物学上、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 放射線医学 久保 敦司
放射線医学 栗林 幸夫 内科学 池田 康夫
病理学 坂元 亨宇
学力確認担当者：池田 康夫、栗林 幸夫
審査委員長：栗林 幸夫

試問日：平成18年3月9日

Thymidylate Synthetase (TS) Genotype and TS/dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Level as an Indicator in Determining Chemosensitivity to 5-Fluorouracil in Advanced Gastric Carcinoma

— (進行胃癌における5-フルオロウラシル感受性決定因子としてのチミジル酸合成酵素 (TS) 遺伝子多型とTS/ジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼメッセンジャーRNAレベル) —

鳥海 史樹

内容の要旨

5-fluorouracil (5-FU) の代謝・分解関連酵素およびその遺伝子多型が、5-FU感受性を分子生物学的に予測する可能性について検討した。Thymidylate synthetase (TS) は5-FUの標的酵素の一つであり、dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) は分解律速酵素として5-FUの耐性に関与することが知られている。TS遺伝子のpromoter領域には28塩基対を基本構造とする繰り返し配列 (tandem repeat) が2個または3個存在し、TS genotypeとしては、2R (double repeat) と3R (triple repeat) の組み合わせにより、3R/3R, 2R/3R, 2R/2Rの3種類が知られている。これまで3R/3RがTS mRNAおよびTS酵素活性の発現量が高く、5-FU感受性が低いことが報告されてきた。進行胃癌を対象とし、tandem repeatの多型性と、腫瘍内TS/DPD mRNA発現レベルと5-FU感受性との相関性を解析した。2001年9月より、当院外科において切除術が施行された進行胃癌症例22例を対象とした。遺伝子解析については当学倫理委員会承認 (12-33) による文書による同意を得て行った。末梢血から単核球を分離しDNAを抽出し、PCRによって得られた増幅産物を用いてTS遺伝子プロモーター領域の繰り返し配列のgenotypingを行った。また癌部と非癌部のTS/DPD mRNA発現量をreal time PCR法により測定し、TS genotypeとTS mRNAの関連を検討した。さらに腫瘍検体の一部を使用して抗癌剤感受性試験 (MTT assay) を行い、癌部mRNAと5-FU感受性の相関性を検討した。TS-1による補助化学療法を受けた症例の無再発生存期間を観察し、各種遺伝子パラメーターと生存転帰の関連を検討した。TS genotypeは3R/3Rが19例、2R/3Rが3例であり、3R/3R症例の癌部・非癌部におけるTS mRNA発現は、2R/3R症例に比して推計学的に有意に高値であった。5-FU感受性との相関では、TS mRNAは推計学的に有意な相関を示さなかったが、DPD mRNA高値群には5-FU感受性症例は認められなかった。癌部と非癌部のTS mRNAは推計学的に有意に相関したが、DPD mRNAは相関しなかった。またTS mRNAとDPD mRNAの間には相関関係は認められなかった。無再発生存期間に影響を及ぼしたのはDPD mRNAであり、高DPD mRNA症例は短期に再発する傾向が認められた。胃癌および非癌部のTS mRNAはTS tandem repeatの多型性に制御されていたが、5-FUの感受性には相関しなかった。DPD mRNA高値は5-FU低感受性に帰結し、高再発危険群と考えられた。

論文審査の要旨

著者らは5-fluorouracil (5-FU) の標的酵素thymidylate synthetase (TS) の遺伝子多型および分解律速酵素dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の遺伝子解析により、5-FU感受性を予測する可能性について検討した。5-FU標的酵素であるTS genotypeには3R/3R, 2R/3R, 2R/2Rの3種類のtandem repeat多型性が知られている。進行胃癌症例を対象とし、末梢血TS genotype、腫瘍内TS/DPD mRNA発現レベルと5-FU感受性、術後無再発生存期間との関連を検討した。TS genotypeは3R/3Rが19例、2R/3Rが3例であり、3R/3R症例の癌部・非癌部におけるTS mRNA (TR) 発現は2R/3R症例に比して有意に高値であった。DPD mRNA (DR) 高値群には5-FU感受性症例は認められなかった。癌部と非癌部のTRは推計学的に有意に相関したが、DRは相関しなかった。胃癌および非癌部のTRはTS tandem repeatの多型性に制御されていたが、5-FUの感受性には相関しなかった。DR高値は5-FU低感受性に帰結し、早期に再発する傾向が認められた。

審査においては無再発生存期間とDNA合成酵素遺伝子であるTR発現は相関しないのかという質問に対し、TRと予後に関しては統一した見解はなく症例数が少ないということからも有意な相関は認められなかったと回答された。DRが低いにもかかわらず低感受性である症例の機序に関し、5-FU耐性についてはDPDのみならずTSの発現量や他の代謝酵素の発現量も関与している可能性が示された。2Rと3Rの機能的相違については、3Rは2Rに比べTS遺伝子の翻訳効率が2～3倍高いことが提示された。組織採取は全層で行っているが各層別検討の必要性が指摘され、粘膜・粘膜下層・筋層・漿膜など各層における酵素・遺伝子発現の検討が今後の課題として示唆された。DRの発現量は癌部、非癌部ではどちらが高いのかという質問があり、当研究室での以前のデータではDRは非癌部で高いという結果であったと回答された。Tandem repeatには人種間格差があり3R/3Rの多い日本人には5-FUが効きにくいのか、また副作用の発現に差はあるのかという質問に対し、5-FUの抗癌性・副作用における人種差は明確ではなく、これについてもTSのみでは説明できない因子があることが回答された。

以上のように本研究は症例数が少なく2R群が少ないために有意差が出にくいという問題点は残しつつも、汎用される抗癌剤である5-FUを用いて遺伝子多型や遺伝子発現から癌治療をオーダーメイド化する基礎的研究として、今後臨床腫瘍学の発展に寄与する有用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
産婦人科学 青木 大輔 病理学 坂元 亨宇
内科学 日比 紀文
学力確認担当者: 池田 康夫、青木 大輔
審査委員長: 青木 大輔

試問日: 平成18年2月13日

Colorectal Motility Induction by Sacral Nerve Electrostimulation in a Canine Model (仙骨神経電気刺激による結腸・直腸運動の誘発)

平 林 健

内容の要旨

便秘治療機ならびにそれにおける仙骨神経系の役割の解明、および便秘・強度の便秘等の排便障害に対する結腸ペースメーカー治療機について、雑種成犬を用いて、検討を行なった。

体重約10kgの雑種成犬8匹(雌5匹、雄3匹)を実験に用いた。全身麻酔下に、フォーストレンジを、近位結腸、遠位結腸、S状結腸、直腸、内肛門括約筋に横軸方向に縫着し、自然排便時および仙骨神経電気刺激時の腸管運動を計測・記録・解析した。仙骨神経電気刺激は全身麻酔下に推弓切除を加え、直視下で行った。

術後3週間後より自然排便の観察を行った。4匹の犬で、26回の自然排便を観察し、24回の排便で巨大収縮運動(GMC: Giant Migrating Contraction)の分析が可能であり、3種類の特徴的な運動パターンが観察された。①遠位結腸より口側に生じたGMCが肛側に伝播し、便が排泄された。②便意を催すと同時に、直腸は緩徐に弛緩しはじめ、GMCに先行して大きく弛緩した。③内肛門括約筋の弛緩がGMC伝播する間に認められた。

108回の仙骨神経電気刺激により、3種類の反応パターンが得られた。①直腸方向へ伝播する結腸の収縮反応と肛門管の弛緩反応が20回観察された。②結腸の伝播を伴わない収縮反応と肛門管の弛緩反応が11回観察された。③直腸方向へ伝播する結腸の収縮反応と、それに先行する直腸・肛門管の弛緩反応が認められた。収縮反応の持続時間・伝播速度ならびに弛緩反応の持続時間は自然排便で観察されたものに近似していたが、収縮・弛緩の振幅は小さかった。

今回の実験の結果、自然排便は、結腸・直腸・内肛門括約筋の協調運動によって形成されていることが明らかとなった。このような組織された消化管運動は腸管神経系によってプログラムされたものと推察される。自然排便時の結腸・直腸・内肛門括約筋の運動パターンと類似した反応が仙骨神経電気刺激によって再現された。以上から、自然排便時には、仙骨神経を介して結腸腸管神経系に存在する排便運動のプログラムが起動されると考えられ、仙骨神経系は、自然排便において、中枢神経と結腸腸管神経系を繋ぐ重要な回路の一つと考えられた。今回は、臨床的な埋め込み実験ではなく、急性実験であったが、実際に排便が見られたこともあり、排便ペースメーカー作成の可能性がより強く示唆された。

以上により、仙骨神経系は自然排便において、中枢神経と結腸腸管神経系を繋ぐ重要な回路の一つと考えられた。

論文審査の要旨

申請者は、従来より、排便時の消化管運動・仙骨神経と直腸肛門反射の関係の研究をおこなってきた。今回審査対象となった論文は、雑種成犬を用いストレンジトランスデューサー(以下SG)を結腸・直腸・内肛門括約筋に縫着することによって、生理的な状態で自然排便時の結腸・直腸・肛門管運動の観察を行なったものである。本研究の結果、自然排便は結腸に生じる肛門方向へ伝播する巨大収縮運動(以下GMC)と、それに運動する直腸・肛門管の弛緩運動によって形成されることが明らかとなり、このような一連の消化管運動は腸管神経系によってプログラムされたものと推察されることを示した。さらに、仙骨神経に電気刺激を加えることにより、この協調運動と類似した運動パターンを再現した。以上から、自然排便は、仙骨神経を介して結腸腸管神経系に存在する排便運動のプログラムが起動されると考えられた。また、本研究に基づき便秘・強度の便秘等の排便障害に対する治療機として仙骨神経刺激を用いた結腸ペースメーカー作成の可能性が強く示唆された。

審査ではまず、排便時のGMCの開始部位について質問された。今回の実験においては、上行結腸と下行結腸の間にはSGを装着しなかったが、最近の知見を併せると、主として仙骨神経支配領域範囲の結腸においてGMCは開始すると考えられるが、個体間さらには同一個体間にも違いがあり、今後さらなる研究を要すると回答された。続いて、仙骨神経電気刺激時に見られた反応が、いくつかのパターンに分かれた点、排便時のGMCに比較して、刺激で得られた結腸の収縮運動の振幅が小さかった点、刺激時の排便の有無についても質問された。本実験は、生体内でなされたため、全身麻酔、併せて結腸内容の有無にも影響を受け、いくつかのパターンに分かれ、振幅も小さかったと推測されると説明し、実際に排便も見られた例もあったことも示した。また、自然排便時に観察された緩徐な直腸の弛緩運動が、仙骨刺激によって再現されなかったことが質問された。この排便時の緩徐な直腸の弛緩運動は、便が直腸に貯留することによって生じた受容性弛緩と推察され、直腸壁が伸展され、その刺激が中枢神経において便意と認識されたと考えられると説明された。それに対し、刺激の求心路についても質問され、直腸からの自律神経系の求心路に併せて、腹壁などからの体性神経からの求心路も考えられると説明された。

続いて、本研究の臨床応用(結腸ペースメーカー作成の可能性)について質問された。本実験においては、仙骨神経に直接刺激を与えたが、今後は磁気刺激・経皮電極などを用いた方法に研究を進めていきたいと説明された。また、薬剤による排便誘導と比較して何らかの利点はあるかと質問されたが、薬剤と比較して、より効率的に結腸・直腸内容の排泄が行なわれると考えられると回答された。さらに、より効果的に刺激を加えるためには、直腸内容を計測する必要があり、インピーダンス等を用いた直腸容量測定器などの周辺機器の開発も進めていく必要性の指摘があった。

以上、本研究は今後検討されるべき課題、特に臨床的治療機器の開発においていくつかの問題点を残しているが、排便時の消化管運動を生理的な状況下で観察し、それに対する仙骨神経系の役割を研究し、さらに臨床的な治療機器である結腸ペースメーカー作成の可能性を強く示唆した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 日比 紀文 生理学 柚崎 通介
解剖学 相磯 貞和
学力確認担当者: 池田 康夫、日比 紀文
審査委員長: 日比 紀文

試問日: 平成18年3月7日

Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury

(ラット脊髄損傷に対するChondroitinase ABC投与と神経幹/前駆細胞移植の併用は移植細胞の移動とgrowth-associated protein-43陽性線維の伸長を促進する)

池 上 健

内容の要旨

我々は現在まで、成体ラットとサルの脊髄損傷モデルを用いて神経幹/前駆細胞(以下NSPC)の移植が損傷脊髄の修復に寄与することを報告してきた。しかし個体によっては、多くの細胞が空洞壁に貼りつくのみで母床脊髄内に移動しないことがある。本研究では、脊髄損傷後に強く発現するグリア瘢痕を構成する成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(以下CSPG)が、*in vivo*でNSPCの移動を阻害する可能性に注目した。そこで、脊髄損傷後にchondroitinase ABC(以下C-ABC)を投与しCSPGを分解することにより、移植細胞の移動と神経突起伸長が促されるのではないかと仮定し、以下の実験を行った。まず*in vitro*でNSPCの移動性解析を行った。CSPGをコートされたwell上ではNSPCの移動性は阻害されたが、その阻害効果はwellを予めC-ABCによって処理することによって減じられ、細胞の移動性は回復した。次に*in vivo*で成体ラット損傷脊髄に対するC-ABC投与とNSPC移植の併用療法を行い、免疫組織化学的に検討した。不活化C-ABC投与では、CSPG免疫陽性の瘢痕によって移植細胞の母床脊髄への移動が妨げられていたが、C-ABC投与によって移植細胞の移動が促され、この結果は*in vitro*の移動性解析の結果と一致していた。CSPGが豊富な部位を避けつつ損傷脊髄の白質に移動した細胞の一部は、母床脊髄とよく融合して突起を伸ばし、これらの移動した細胞は損傷を免れた母床脊髄白質のneurofilament陽性線維に沿って配列し、それらの線維と接触していた。さらにこの併用療法では、NSPC移植単独療法に比べて、損傷中心部でのgrowth-associated protein-43陽性線維の伸長が促進され、有意に多くの線維が観察された。これらの結果から、C-ABC投与がグリア瘢痕の軸索伸長および細胞移動に対する抑制効果を減じることによって、損傷脊髄に対するNSPC移植の効果を高める可能性が示唆された。このC-ABC投与とNSPC移植の併用療法は、損傷脊髄の再生において、将来重要な治療戦略の一つになりうると考えられた。

論文審査の要旨

現在まで、成体ラットとサルの脊髄損傷モデルを用いて神経幹/前駆細胞(NSPC)の移植が損傷脊髄の修復に寄与することを報告してきた。今回我々は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の分解を介した軸索伸長促進効果を有するchondroitinase ABC(C-ABC)を併用することにより、脊髄損傷に対するNSPC移植効果の向上を試みた。

まず*in vitro*でNSPCの移動性解析を行った。CSPGをコートされたwell上ではNSPCの移動性は阻害されたが、その阻害効果はwellを予めC-ABCによって処理することによって減じられ、細胞の移動性は回復した。次に成体ラット脊髄損傷に対するC-ABC投与とNSPC移植の併用療法を行い、免疫組織化学的に検討した。不活化C-ABC投与では、CSPG免疫陽性の瘢痕によって移植細胞の母床脊髄への移動が妨げられていたが、C-ABC投与によって移植細胞の移動が促され、この結果は*in vitro*の移動性解析の結果と一致していた。移動した細胞は突起を伸ばし、母床脊髄白質の神経線維に沿って配列していた。さらにこの併用療法では、NSPC移植単独療法に比べ、損傷中心部で有意に多くの再生軸索が観察された。これらの結果から、C-ABC投与がグリア瘢痕の軸索伸長および細胞移動に対する抑制効果を減じることによって、損傷脊髄に対するNSPC移植の効果を高める可能性が示唆された。

審査では、まず脊髄損傷後に強く発現するCSPGの生理的意義について質問がなされた。これに対して、CSPGはグリア瘢痕の1成分であり、2次損傷をpackingする可能性があるかと回答された。またC-ABCにはCSPGの分解というメカニズム以外に直接軸索伸長を促す作用はないのかと質問がなされ、本実験において、また過去の文献においても確かめられておらず、検証を要すと回答された。C-ABC投与と内在性神経幹細胞の賦活化のみでは十分な併用療法効果は期待できないかという質問に対しては、内在性の神経幹細胞のみでは量的に不足であり、またその多くは生理的条件下ではアストログリアに分化誘導されてしまうため、十分な治療効果は期待できないだろうと回答された。また今後の課題として、この併用療法がlong tractの線維に対しても軸索伸長効果があるか検証する必要があるとの指摘がなされた。さらに脊髄損傷治療への臨床応用に向けた発展として、運動機能評価を行うべきだとの指摘がなされた。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、グリア瘢痕を克服することにより移植細胞の生着を向上させ、脊損に対する神経幹細胞移植療法を改良しえた点、数多く提唱されている脊髄損傷治療法のうち2つの治療法の併用効果を証明することによって、臨床応用に一步近づけたという点で評価された。

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

試問日: 平成18年4月5日

Reduced Expression of Thrombospondins and Craniofacial Dysmorphism in Mice Overexpressing Fra1

(Fra1高発現マウスにおけるThrombospondin減少と頭蓋形成異常)

西 脇 徹

内容の要旨

論文審査の要旨

転写因子AP-1ファミリーの1つであるFra1を全身で高発現させたトランスジェニックマウスは、骨形成能が骨芽細胞において亢進していることにより骨硬化症を発症する。さらにこのマウスでは骨基質タンパクであるmatrix gla protein (Mgp)の産生増加が知られている。そこで、Fra1トランスジェニックマウスの骨芽細胞において発現異常をきたしている遺伝子を同定し、本マウスの骨形成能との関連を解析した。

まずFra1を強制発現させた骨芽細胞培養系でその骨形成能に対する影響を観察した。その結果、石灰沈着様式が対照群と比較してより均一化することが分かり、骨基質組成の変化が示唆された。そこで骨基質の組成を定量PCR法、ウェスタンブロット法で解析した。Fra1トランスジェニックマウス由来の骨および骨芽細胞では骨基質タンパクであるthrombospondin-1 (Thbs1)、thrombospondin-2 (Thbs2)の発現が著明に減少していた。

Thbs1およびThbs2遺伝子のプロモーター領域にはAP-1結合配列があることからレポーターアッセイを行ったところ、Fra1遺伝子導入によりThbs2のプロモーター活性は変化しなかったがThbs1プロモーター活性は抑制された。

以上の結果より、Fra1トランスジェニックマウスの石灰沈着および骨基質タンパクの組成は野生型マウスと異なることが分かった。そこで骨基質の被吸収能を調べるため、卵巣摘出術を施行し骨形態計測を行ったところ、卵巣摘出群では骨基質の組成が変化しているにもかかわらず野生型マウスと同様に骨形成・骨吸収が亢進することが明らかになった。

Thbs2ノックアウトマウスは骨形成が増加することが知られているため、Fra1トランスジェニックマウスとThbs1/Thbs2ダブルノックアウトマウスにおいて共通の表現型を検索した。このマウスでは骨密度の有意な上昇は見られなかったものの、両者に咬合異常が見い出された。さらに頭蓋冠および下顎の前後径・横径を計測したところ、頭蓋形成異常が見い出された。以上より、Fra1トランスジェニックマウスにおけるThbs1およびThbs2の発現低下がその頭蓋形成異常の原因となることが示唆された。すなわち、本研究によりはじめて非コラーゲン性骨基質タンパクであるthrombospondinの発現異常が骨形態形成の異常につながる可能性が示された。

転写因子Fra1を全身で高発現させたトランスジェニック (Tg) マウスは、骨芽細胞の骨形成能が亢進し骨硬化症を発症する。そこで、骨芽細胞で発現異常をきたしている遺伝子を同定し、本マウスの表現型との関連を解析した。

Fra1を強制発現させた骨芽細胞培養系では石灰沈着様式が対照群と比較してより均一化することが分かり、骨基質組成の変化が示唆された。骨基質組成の変化は、培養系でもマウス個体レベルでもFra1 Tgマウス由来の骨が易吸収性であることから示唆された。そこで骨基質の組成を定量PCR法、ウェスタンブロット法で解析した。Fra1 Tgマウス由来の骨・骨芽細胞では骨基質タンパクthrombospondin-1 (Thbs1)、thrombospondin-2 (Thbs2)の発現が著明に減少していることが分かった。さらに骨基質組成の変化とマウスの表現型の関連を探るためにFra1 TgマウスとThbs1/Thbs2ダブルノックアウトマウスにおいて共通の表現型を検索した。Thbs2ノックアウトマウスは骨形成が増加することが報告されているが、Thbs1/Thbs2ダブルノックアウトマウスでは骨密度の有意な上昇は見られなかった。しかしFra1 Tgマウスでみられる頭蓋形態異常がThbs1/Thbs2ダブルノックアウトマウスでも見いだされたことから、Thbs1とThbs2の減少が頭蓋形成異常の原因であることが示唆された。

審査では、まず培養系での石灰沈着様式の変化とマウスの表現型の関係に関する質問がなされた。Fra1 Tgマウスの石灰沈着はナノ構造レベルでは低いと報告されており培養系での石灰濃度の低下と一致しているが骨量の増加、頭蓋形成異常との関わりは不明であると回答された。また、Fra1 Tgマウスの骨硬化症に対する破骨細胞の影響について質問がなされ、Fra1 Tgマウス由来の破骨細胞は培養系で分化亢進が見られるが、間葉系細胞の移植実験で過剰な骨形成が再現されることから骨芽細胞の異常が主たる原因と考えられると回答された。骨基質が易吸収性である理由について質問がなされ、骨基質組成が変化したことにより被吸収性が変化し、種々の骨基質成分の遺伝子改変マウスの例から考えられると回答された。さらに、頭蓋形成異常がおこる機序について質問がなされ、膜性骨化で形成される頭蓋冠と内軟骨性骨化で形成される頭蓋底・下顎骨間でゆがみが生じていることからFra1により膜性骨化あるいは内軟骨性骨化になんらかの影響がある可能性が示唆されると回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、Fra1 Tgマウスにおいて骨基質組成が変化しており、Thbs1とThbs2の発現低下が頭蓋形態異常の原因となることを示唆した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科 戸山 芳昭
発生・分化生物学 須田 年生 病理学 岡田 保典
形成外科学 中島 龍夫
学力確認担当者: 池田 康夫、須田 年生
審査委員長: 須田 年生

試問日: 平成18年4月4日



広範囲経口抗菌製剤

指定医薬品、処方せん医薬品※

クラビット[®]錠・細粒

Cravit[®] (レボフロキサシン製剤)

薬価基準収載

※注意—医師等の処方せんにより使用すること

★効能・効果、用法・用量、禁忌および使用上の注意等につきましては、製品添付文書をご参照ください。

いのち、ふくらまそう。



資料請求先
〒103-8234 東京都中央区日本橋三丁目14番10号
ホームページアドレス
<http://www.daiichipharm.co.jp/>

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



前立腺肥大症に伴う
尿勢低下にも、
夜間頻尿にも。

【禁忌(次の患者には投与しないこと)】

- (1) 本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者
- (2) 塩酸バルデナフィル水和物を投与中の患者

【効能・効果】前立腺肥大症に伴う排尿障害
【用法・用量】通常、成人には塩酸タムスロシンとして0.2mgを1日1回食後に経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減する。

【使用上の注意】(抜粋)

- 1.慎重投与(次の患者には慎重に投与すること) (1)起立性低血圧のある患者[症状が悪化するおそれがある。] (2)重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)本剤が口腔内で崩壊するが、口腔の粘膜から吸収されることはないため、唾液又は水で飲み込ませること。 (2)本剤の過剰投与により血圧低下が予想されるので、投与量には注意すること。 (3)立位血圧が低下することがあるので、体位変換による血圧変化に注意すること。 (4)本剤による治療は原因療法ではなく、対症療法であることに留意し、本剤投与により期待する効果が得られない場合は、手術療法等、他の適切な処置を考慮すること。 (5)めまい等が

あらわれることがあるので、高所作業、自動車の運転等危険を伴う作業に従事する場合には注意させること。 (6)本剤投与開始時に降圧剤投与の有無について問診を行い、降圧剤が投与されている場合には血圧変化に注意し、血圧低下がみられたときには、減量又は中止するなど適切な処置を行うこと。

- 3.相互作用 【併用禁忌】(併用しないこと)塩酸バルデナフィル水和物(レビトラ)
- 【併用注意】(併用に注意すること)降圧剤、クエン酸シルデナフィル
- 4.副作用 ハルナールカプセル承認時及び市販後の使用成績調査における調査症例4,724例中、ハルナールカプセルとの関連が疑われる副作用(臨床検査値異常を含む)は104例(2.2%)に発現し、主なものはめまい、胃不快感等であった。(ハルナールカプセル再審査終了時) (1)重大な副作用 1)失神・意識喪失(頻度不明):血圧低下に伴う一過性の意識喪失等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止し適切な処置を行うこと。 2)肝機能障害、黄疸(頻度不明):AST(GOT)上昇、ALT(GPT)上昇、黄疸等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。

■その他の使用上の注意等につきましては、製品添付文書をご参照ください。

前立腺肥大症の排尿障害改善剤(塩酸タムスロシン口腔内崩壊錠) 薬価基準収載

ハルナール[®]D錠 0.1mg
0.2mg

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



製造販売 **アステラス製薬株式会社**
東京都板橋区蕨根3-17-1

【資料請求先】本社/東京都中央区日本橋本町2-3-11