

学内グラント 終了時報告書

平成19-20年度 学内グラント報告書

乳癌の内分泌療法抵抗性獲得メカニズムの解明

研究代表者 池田 和博（埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター）

分担者 井上 聡¹⁾, 佐伯 俊昭²⁾

はじめに

乳癌は近年増加傾向を示しており、わが国においては女性が罹る癌の中で最も頻度が高くなっている。乳癌の発症原因としては性ステロイドホルモンであるエストロゲンによる暴露が重要な危険因子として考えられている¹⁾。すなわち、初潮年齢の低下、初産年齢の上昇、出産児数の減少、遅い閉経などが乳癌の発生率を上昇させていると考えられている。乳癌の多くはエストロゲン受容体 (ER) を発現しており、エストロゲン依存性の増殖を示すことが知られている。ERは細胞核内に存在するリガンド依存性の転写因子であり、ゲノム中のエストロゲン応答配列 (ERE) に結合してその近傍の標的遺伝子の発現量を直接制御することによりエストロゲンの作用を媒介していると考えられている²⁾。従って、ERとその機能を制御する関連因子ならびにエストロゲン標的遺伝子の発現制御と機能を明らかにすることは、乳癌の診断と治療に密接に関わると考えられる。現在、乳癌の内分泌療法として抗エストロゲン製剤であるタモキシフェンやアロマターゼ阻害剤が臨床応用されており、効果を発揮している。しかしながら、これらの内分泌治療薬の長期投与によって耐性を獲得する癌が生じることが問題となっており、このような癌に対しては有効な治療方法が存在しない。加えて、乳癌の中にはもともとERを発現していないものも存在しており、内分泌療法が奏効しない症例も存在している。このような乳癌のエストロゲン非依存性の増殖機構、ならびに、エストロゲン依存性から非依存性を獲得する過程におけるスイッチングのメカニズムに関しては全く解明されていない現状である。

乳癌の多くはエストロゲン受容体 (ER) およびプロゲステロン受容体 (PR) 陽性であり、エストロゲン応答性の増殖を示すことが知られている。ERとPRはリ

ガンド依存性の転写因子として機能する核内受容体のメンバーであり、ヒトでは48種の核内受容体ファミリーが存在している。そのうち、ERとの相同性が最も高いエストロゲン関連受容体 α (ERR α)は、乳癌の55%で発現しており、予後不良のバイオマーカーとして報告されている³⁾。しかしながら、ERを除くその他の核内受容体の乳癌における作用はほとんど明らかになっていない。また、核内受容体は、その他の転写因子と相互作用し、複雑なネットワークを形成していると考えられている。最近、フォークヘッド転写因子 (FOX) が、ERまたはアンドロゲン受容体 (AR) と結合し、転写を調節することが明らかになり注目されているが⁴⁾、乳癌におけるその転写ネットワークの解明は十分ではない。本研究では、乳癌サンプルならびに内分泌療法抵抗性の乳癌細胞モデルを用いて、ERをはじめとする核内受容体およびそれらを制御する関連因子の発現機能解析を行い、乳癌の内分泌療法抵抗性獲得に関わる分子の解析を行った。

研究方法

乳癌の臨床サンプルを用いた解析は、国際医療センター乳腺腫瘍科との共同研究として行った。パラフィン包埋した乳癌組織を薄切後、定法に従って脱パラフィンと親水化を行った後、121℃で10時間の抗原賦活化処理を行った。その後、抗ER α 抗体、抗ERR α 抗体をはじめとし、ERに関連する因子の抗体を用いて免疫染色を行い、ポリマー試薬法 (Envision, DAKO社) で発色を行い、解析した。

ER α を発現し、エストロゲン応答性を有することが知られているMCF-7細胞を抗エストロゲン剤であるタモキシフェン (10^{-6} M) を含むDMEM培地で2ヶ月間継代培養することにより、タモキシフェン耐性株 (Tam-R) を複数樹立した。また、MCF-7細胞をフェノールレッドを含まないDMEM培地にチャコール処理血清を添加した培地で4ヶ月間培養することにより、エストロゲン枯渇耐性株 (Long Term Estrogen Deprived,

1) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター

2) 埼玉医科大学 国際医療センター 乳腺腫瘍科

LTED)を複数樹立した。

Tam-R細胞の細胞増殖速度の解析は生細胞数測定試薬SF(ナカライテスク社)を用いて行った。4000個の細胞を24 well-plateに播種してタモキシフェン存在下または非存在下で培養した。その後、24, 72, 120時間後にWST-8試薬を10 μ l混合し、2時間37℃で培養した後、450 nmの吸光度を測定し、細胞増殖を評価した。また、Tam-R細胞をウエスタンブロット用サンプルバッファーにて溶解し、SDS-PAGEを用いて分離後、抗ER α 抗体(Cell Signaling Technology社)を用いてウエスタンブロット解析を行い、ER α タンパク質の発現量を定量化した。Tam-R細胞およびLTED細胞における遺伝子のmRNAの発現量は、これらの細胞より採取したRNAからcDNAを合成し、遺伝子特異的プライマーを用いた定量的PCR法(ABI PRISM 7000, アプライドバイオシステムズ社)により解析を行った。

研究結果と考察

はじめに、内分泌療法を施行し臨床効果が評価できる乳癌サンプルを用いて免疫染色を行い、ERならびに関連因子の発現と臨床効果とに関連があるか解析を行った。本研究では、2004年11月から2007年7月までに乳腺腫瘍科において浸潤性乳癌と診断され治療を行った閉経後患者のうち、内分泌療法を施行し、臨床効果が評価可能であった20例を用いた。これら20症例は年齢：57～89歳(中央値77歳)、病期：I～III期18症例、IV期2症例であり、ホルモン受容体の発現はER陽性且つPR陽性が13症例、ER陽性でPR陰性が7症例であった。治療薬としてはアロマターゼ阻害剤であるレトロゾール投与：2症例、アナストロゾール投与：3症例、エキセメスタン投与：15症例であった。これらの症例においてER α 陽性は12症例(60%)であったが、ER α の発現と治療効果との相関には一定の傾向は認められなかった。今後さらに症例数を増やして検討する必要があると考えられた。

MCF-7細胞をタモキシフェン存在下(10^{-6} M)で2ヶ月間継代培養することにより、タモキシフェン耐性株(Tam-R)を18個樹立した。このうち6クローンについて、細胞増殖アッセイ(WST-8 assay)とエストロゲン受容体などの発現量を解析し、基礎的な性状解析を行った。その結果、これらのタモキシフェン耐性株はMCF-7細胞に比較して、タモキシフェン存在下においても、エストロゲン存在下においても細胞増殖速度が亢進していることが明らかになった。また、これらのタモキシフェン耐性株においてはER α タンパク質の発現がやや亢進している傾向がウエスタンブロット解析によって観察された。また、Tam-R株とMCF-7細胞におけるエストロゲン受容体を含めた核内受容体の発現変化ならびにエストロゲン応答性について定量的PCR法を用いて解析を行った。そ

の結果、ER α mRNAの発現およびエストロゲン応答性は両者で大きく変化しなかった。前述のウエスタンブロット解析においてはTam-R細胞でER α タンパク質の発現量の亢進が観察されたことから、タンパク質レベルでの制御機構の関与が示唆された。一方、ER β mRNAの発現はTam-Rで上昇傾向が観察された。また、その他の核内受容体においては、プロゲステロン受容体(PR)の発現量がTam-R株で低下している一方で、グルココルチコイド受容体(GR)の発現量が亢進していることなどが明らかとなり、複数の核内受容体の発現変動が検出された。PRはエストロゲン受容体と同様に多くの乳がんで発現しており、内分泌療法施行の診断マーカーと考えられている。GRは乳がんの進行に伴い発現量が減少することが報告されているほか、そのリガンドであるグルココルチコイドは乳腺細胞に対してはアポトーシスを抑制することが知られている³⁾。Tam-R細胞においてこれらの核内受容体の発現変動が生じていることは、内分泌療法抵抗性獲得との関係に関与している可能性が示唆された。また、最近のゲノム研究から、Forkhead box (FOX) 転写因子群が核内受容体と相互作用してその転写活性を調節することが判明し、注目されている⁴⁾。特に、FOXA1はERおよびアンドロゲン受容体(AR)と結合してERの転写を促進する作用を有することが知られている。Tam-Rにおいては、FOXA1の発現亢進が観察された。

さらにMCF-7細胞をチャコール処理血清とフェノールレッド無添加培地で長期間培養することによりエストロゲン枯渇耐性株(LTED)を数クローン樹立した。これらのLTEDにおけるER α 、ER β 、FOXA1の発現を解析したところ、ER β とFOXA1の発現はTam-Rの場合と同様に親株であるMCF-7細胞より発現が上昇していた。一方、ER α の発現はTam-Rと異なる傾向を示し、LTEDではER α の発現が増加していた。これらの結果から、タモキシフェン耐性乳がんの細胞モデルとなるTam-Rならびにアロマターゼ阻害剤耐性モデルとなるLTEDの解析によって、ER α 、ER β 、PR、GRの核内受容体ならびにそれらの活性を制御すると想定されるFOX転写因子の発現変動が示されたことは、核内受容体とFOX転写因子による遺伝子発現ネットワークが、乳癌細胞の治療薬抵抗性と密接に関連していることが示唆された。

おわりに

臨床サンプルおよび内分泌療法抵抗性の細胞モデルを用いた解析により、乳癌のエストロゲン応答性に関わる遺伝子がエストロゲン非依存性を獲得した際に発現変動を示すことを明らかにした。これらの解析は、乳癌が治療に対して抵抗性を獲得する際のスイッチング機構の解明をもたらし、内分泌療法に抵抗性を示す

乳癌の新たな診断や創薬に応用可能な分子標的へと展開できると考えられた。

研究成果リスト

論文

1. Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S. Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* 2007;26:4453-63.
2. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Yagi K, Okazaki Y, Inoue S. Estrogen-related receptor α modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:813-8.
3. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 2007;39:239-47.
4. Kubo M, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor γ during adipocytic differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1789:71-7.
5. Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, Ouchi Y, Inoue S. FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:388-93.
6. Takayama K, Tsutsumi S, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Kaneshiro K, Fujimura T, Kumagai J, Urano T, Sakaki Y, Shirahige K, Sasano H, Takahashi S, Kitamura T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S. Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res* 2009;69:137-42.
7. Takeo C, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Identification of Igfbp2 and Enpp2 as Estrogen-Responsive Genes in Rat Hippocampus. *Endocrine J* 2009;56:113-20.
8. 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡 脂肪細胞分化におけるエストロゲン関連受容体の機能的役割 第28回日本肥満学会 2007年10月19-20日 東京都
9. 竹尾愛理, 池田和博, 菱沼俊樹, 堀江公仁子, 井上聡 ラット海馬におけるエストロゲン標的遺伝子の解析 第15回日本ステロイドホルモン学会 2007年11月23-24日 仙台市
10. Nobuhiro Ijichi, Mayumi Kubo, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie-Inoue, and Satoshi Inoue. Functional role of estrogen-related receptor family in adipocyte differentiation 第13回アディポサイエンス研究会 シンポジウム 平成20年8月22日 豊中市
11. Nobuhiro Ijichi, Kazuhiro Ikeda, Kayoko Murakami, Kuniko Horie-Inoue, Jun Kawai, Yoshihide Hayashizaki, Satoshi Inoue. Gene expression profiles of nuclear hormone receptors regulated by estrogen in human breast cancer MCF-7 cells The 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research September22-24, 2008, Kurashiki, Okayama, Japan
12. 窪麻由美, 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 竹田省, 井上聡 脂肪細胞分化モデルとマウス高脂肪食モデルを用いたエストロゲン関連受容体 ERR γ の機能解析 第29回日本肥満学会 2008年10月17-18日 大分市
13. Kazuhiro Ikeda, Nobuhiro Ijichi, Mayumi Kubo, Kuniko Horie-Inoue, Satoshi Inoue. Estrogen-related receptors in fats and adipogenesis. CBI Annual Meeting 2008 International Symposium August 22-24, 2008 Tokyo
14. 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡 EPAS1/HIF2 α はグルココルチコイドにより発現が誘導され, 骨芽細胞分化を抑制する 第16回ステロイドホルモン学会 2008年11月22日 福井市
15. 上山和也, 池田和博, 堀江公仁子, 竹田省, 井上聡 エストロゲン応答遺伝子 Efp を標的とする二本鎖核酸分子による乳癌・子宮癌細胞の増殖, 腫瘍形成抑制効果 第16回日本ステロイドホルモン学会 2008年11月22日 福井市
16. 池田和博, 伊地知暢広, 村上佳代子, 堀江公仁子, 河合純, 林崎良英, 井上聡 乳癌細胞 MCF7 における核内受容体およびフォークヘッド転写因子のエストロゲンによる発現調節と機能 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 2008年12月9-12日 神戸市
17. 池田和博, 井上聡 Glutamate receptor subunit 2D (Grin2d) 遺伝子の脳における発現制御と機能解析 遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ (転写研究会共催) 2009年1月19-21日新潟県湯沢町

学会発表

1. 池田和博, 池田秀利, 三谷幸之介, 井上聡 ウイルス抵抗性における TRIM5 α と Efp (TRIM25) 遺伝子の共通もしくは特異的な作用メカニズム 第55回日本ウイルス学会 2007年10月21-23日 札幌市

12. 池田和博, 上山和也, 堀江公仁子, 竹田省, 井上聡
ホルモン依存性がんの治療をめざしたエストロ
ゲン応答遺伝子Efpを標的とする二本鎖核酸分子の
開発 第9回関東ホルモンと癌研究会 2009年1月
24日 東京都
13. 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡 ヒト
乳癌細胞におけるエストロゲン刺激による核内受
容体ならびにフォークヘッド転写因子の包括的
発現機能解析 第9回関東ホルモンと癌研究会
2009年1月24日 東京都
- 2) Lone RO, Frith MC, Karlsson EK, Hansen Rosen U.
Mol Endocrinol 2004;18:1859-75.
- 3) Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T,
Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H. Estrogen-related
receptor alpha in human breast carcinoma as a
potent prognostic factor. Cancer Res 2004;64:4670-6.
- 4) Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR,
Eeckhoutte J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC,
Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V,
Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS, Brown M.
Genome-wide analysis of estrogen receptor binding
sites. Nat Genet 2006;38:1289-97.
- 5) Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR, Pang D,
Karrison T, Conzen SD. Microarray analysis reveals
glucocorticoid-regulated survival genes that are
associated with inhibition of apoptosis in breast
epithelial cells. Cancer Res 2004;64:1757-64.

参考文献

- 1) Huang WY, Newman B, Millikan RC, Schell MJ,
Hulka BS, Moorman PG. Hormone-related Factors
and Risk of Breast Cancer in Relation to Estrogen
Receptor and Progesterone Receptor Status. Am J
Epidemiol 2000;151:703-14.

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

悪性リンパ腫の新規予後因子 nm23 に対する
分子標的治療法の開発

研究代表者 新津 望（埼玉医科大学 国際医療センター 血液内科）

緒 言

悪性リンパ腫の治療成績は向上し、Hodgkin リンパ腫では約80%の症例で治癒可能となってきた。そのため、不妊や二次性発癌といった晩期有害事象の発現をおさえるための治療法が選択されており、また、抗CD30抗体などの分子標的治療の開発が盛んに行なわれている。一方、非ホジキンリンパ腫はWHO分類により40種類以上に細分類されており、近年各々の病型に対する病型特異的治療が行なわれ、治療成績の改善が見られている。現在は、B細胞性リンパ腫に対しては抗CD20抗体であるrituximabの臨床応用により治療成績は改善したが、それでも約30%の症例では再発あるいは治療抵抗性を認め、高用量化学療法を併用した末梢血幹細胞移植、同種骨髄移植、ミニ移植などが必要となっている。また、リンパ腫患者は年々増加し、全腫瘍死亡率の第6-7位を占め、白血病の3倍の発生頻度とも言われている。また、高齢化社会を反映してリンパ腫患者の年齢中央値は60-65歳と言われ、高齢者に対する有害事象の少なく、より効果のある分子標的治療法の開発は急務である。近年腫瘍細胞の生物学的特性に基づく予後因子が明らかにされ、それによる予後の判定が行われ、個々の患者に最適と考えられる治療方法の選択が行われつつある。また、DNAマイクロアレイを用いた予後因子の検討が行われているが、DNAマイクロアレイは、高価であり、検査に時間がかかるため、治療前に行うことは難しく、臨床応用にはまだ時間がかかり、治療前に簡便に使用できる予後因子が臨床の場では重要である。また、分子標的療法による予後因子は一般的な化学療法による予後因子と異なる可能性が考えられる。

nm23 遺伝子は、高転移性がん細胞において低い発現を示す転移抑制遺伝子として単離され、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ活性及び白血病の分化誘導抑制因子活性などを示す多機能性蛋白である。nm23-H1

およびnm23-H2は88%のアミノ酸配列にホモロジーを持ち、これらは17q21染色体上に認められる。我々は、以前埼玉がんセンター研究所との共同研究で急性骨髄性白血病においてnm23-H1 mRNA発現レベルが高い程有意に予後不良であることを報告してきた。しかし、nm23-H1のmRNAレベルでの発現を検討することは時間および手間がかかり、治療開始前に予後予測し治療方法を検討することは難しい。特にリンパ腫では、リンパ節およびリンパ組織の再生検をすることは患者さんへの侵襲も大きく、ほとんど不可能である。そのため、我々は簡単に測定できる血清でのnm23の測定が可能かどうかを検討し、血中にnm23-H1蛋白が検出されることを見出し、少量の血清を短時間で定量的に測定できる系をELISA法で作成し報告してきた¹⁾。その結果、急性骨髄性白血病および悪性リンパ腫患者で正常対照に比し高値を示し、新しい優れた予後不良因子となることを明らかにし報告した^{2,3)}。その後、血清nm23-H1はindolentリンパ腫およびNK/T細胞性リンパ腫に対しても単独で有意な独立した予後因子であることを報告した^{4,5)}。また、細胞表面および細胞質内nm23についても検討し、血清nm23-H1とそれぞれが相関することを見いだした^{6,7)}。また、再発例に対する予後因子になるかどうかとも検討し、再発あるいは難治性高齢者T細胞性リンパ腫における予後不良因子であることを報告した^{8,9)}。非ホジキンリンパ腫は節外性に発症することが約半数あり、それぞれの節外臓器によって予後が異なることより、臓器別の予後因子として細胞質内nm23を検討し、甲状腺では非胚中心型とは独立した予後不良因子になることを見いだした¹⁰⁾。しかし、いまだ悪性リンパ腫におけるnm23-H1の機能については不明な点が多い。そのため、今回は分子標的治療の標的分子の同定として、Hodgkinリンパ腫の病型別のnm23の発現と予後、および血清nm23値と細胞質内nm23の発現との相関について検討した。

対象および方法

対象は、Hodgkinリンパ腫133例（うち結節性リンパ球優位型Hodgkinリンパ腫5例，古典的Hodgkinリンパ腫128例）であり，パラフィン切片に対する免疫組織化学染色（CD3, CD15, CD20, CD30, Ki-67, TIA-1, nm23-H1）を行った．Hodgkin-Reed-Sternberg細胞30個の染色態度を検討し，20個以上染色されている症例を陽性とした．また，血清nm23-H1は我々が確立したELISA法により測定した^{1,2)}．

結果

1) nm23-H1の免疫組織化学染色の結果

図1に示すように反応性リンパ節では，リンパ濾胞の胚中心領域，濾胞間領域，および髄索に着色がみられた．弱拡大では胚中心の中心芽細胞，濾胞間領域の大型リンパ球，および髄索の形質細胞にnm23-H1発現がみられ，マントル領域の細胞は陰性であった．一方，Hodgkinリンパ腫ではReed-Sternberg細胞およびHodgkin細胞に発現を認めた．表1に結節硬化型（NS），混合細胞型（MC），結節性リンパ球優位型Hodgkinリンパ腫（NLP）の各病型のCD15, CD30, CD20, Ki-67, EBER, TIA-1, nm23-H1の染色結果を示す．EBERはMCで有意に陽性率が高く，一方nm23-H1はMCでの陽性率が低かった．

2) nm23-H1と臨床的特徴との関係（表2）

nm23-H1発現は，International prognostic score (IPS)の因子が4つ以上（ $p=0.003$ ），bulky mass有り（ $p=0.005$ ），B症状あり（ $p=0.006$ ）で有意に高率であった．しかし，年齢，性別，血清LDH値，病期，

白血球数，血清アルブミン値，ヘモグロビン値とは相関を認めなかった．また，nm23-H1陽性例の完全奏功（CR）割合は57.3%であり，陰性例に比し有意に低率であった（ $p<0.019$ ）．

3) 血清nm23-H1と細胞質内nm23-H1の検討

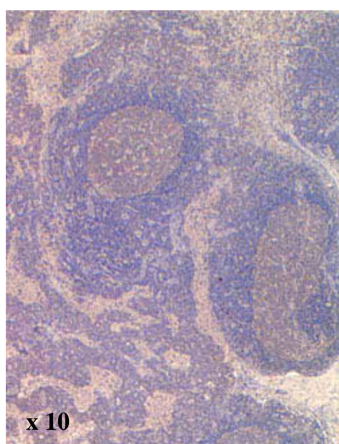
細胞質内nm23-H1発現が陽性であった77例の血清nm23-H1値は 56.24 ± 27.52 ng/ml (mean $\pm$ SD)であったが，細胞質内nm23-H1発現が陰性であった51例では血清nm23-H1は 22.56 ± 15.45 ng/mlであり，細胞質内nm23陽性例で有意に高値であった（ $p=0.0005$ ）（図2）．この結果から，血清nm23-H1はリンパ腫細胞から直接産生されている可能性が示唆された．

4) nm23-H1と予後

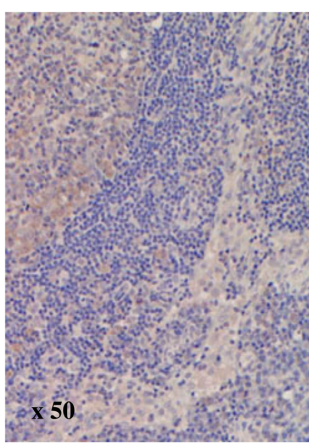
128例全症例の5年生存割合は85.1%，5年無増悪進行割合は77.6%であった．MCとNSで有意差を認めなかったが，TIA-1陽性例の5年無増悪生存割合は41.7%，陰性例のそれは83%と有意差を認めた（図3）．全症例に対する細胞質内nm23陽性例と陰性例の検討では，陽性例の5年無増悪生存割合は63.4%，陰性例は93.8%であった．また，MCに限って検討したが，陽性例の5年無増悪生存割合は36.1%，陰性例は88.1%であった．（図4）同様にNSに関して検討したが，nm23陽性例68.4%，陰性例86.1%であった．

血清nm23-H1に対する検討では，nm23-H1が80 ng/ml以上の31例の5年無増悪生存割合は49.8%，80 ng/ml未満の97例では94.1%と有意に血清nm23-H1が高値例で予後不良であった（ $p=0.0001$ ）．EBV陽性例と陰性例では生存期間に有意差を認めなかった．

反応性

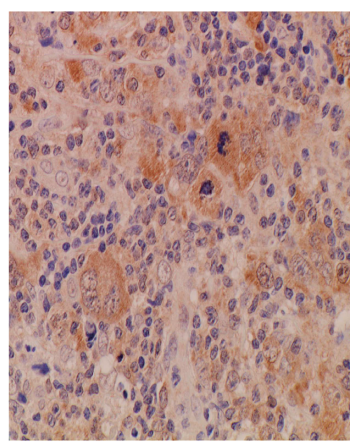


リンパ濾胞の胚中心領域，濾胞間領域，および髄索に着色がみられる．



胚中心の中心芽細胞，濾胞間領域の大型リンパ球，および髄索の形質細胞にnm23-H1発現がみられる．マントル領域の細胞は陰性である．

Hodgkin



Reed-Sternberg細胞およびHodgkin細胞に発現を認める．

図1. nm23-H1 immunostaining.

表 1. Immunohistochemistry of Hodgkin Lymphoma

	NS (n=87)	MC (n=41)	NLP(n=5)	P-Value
CD15	69(79%)	32(78%)	0(0%)	0.87
CD30	85 (98%)	40(98%)	0(0%)	0.96
CD20	9 (10%)	5(12%)	5 (100%)	0.75
Ki-67	81(93%)	38(93%)	4 (80%)	0.93
EBER	16 (18%)	28(68%)	0(0%)	<0.001
TIA-1	9 (10%)	5 (12%)	0(0%)	0.75
nm23-H1	64 (78%)	13(32%)	3(60%)	<0.001

NS; Nodular sclerosis, MC; Mixed cellularity, NLP; Nodular lymphocyte-predominant, p; Fisher's exact probability, NS vs.MC

表 2. nm23-H1 Levels and Clinicopathological Factors

Factors		No. of Patients(n=128)	nm23-H1 Positive (n=77)	P-Value
Age (yr)	≥ 45	67	40 (59.7%)	N.S.
	< 45	61	37 (60.7%)	
Gender	Male	84	53 (63.1%)	N.S.
	Female	44	24 (54.5%)	
Serum LDH level	Normal	56	36 (64.2%)	N.S.
	> Normal	72	41 (56.9%)	
Ann Arbor stage	I-III	104	61 (58.7%)	N.S.
	IV	24	16 (66.7%)	
WBC counts	≥ 15,000/ μ l	31	17 (54.8%)	N.S.
	< 15,000/ μ l	97	60 (59.4%)	
Serum albumin level	> 4g/dl	92	54 (58.7%)	N.S.
	≤ 4g/dl	36	23 (63.9%)	
Hemoglobin level	> 10.5 g/dl	113	67 (59.3%)	N.S.
	≤ 10.5g/dl	19	11 (57.9%)	
International prognostic score	0-3	107	61 (57%)	0.003
	≥ 4	21	16 (76.2%)	
Bulky mass	Absent	101	58 (55.2%)	0.005
	Present	27	20 (74.1%)	
B symptoms	Absent	77	40 (51.9%)	0.006
	Present	51	37 (72.5%)	
Therapeutic response	CR	117	67 (57.3%)	0.019
	Non-CR	11	10 (90.1%)	

Abbreviations : CR; complete remission, Mann-Whitney U-test

5) 単変量解析および多変量解析

無増悪生存に対する予後不良因子は、病期IV, performance status 2以上, 貧血, アルブミン低下, 45歳以上, TIA-1発現, nm23-H1発現であった。また, 有意な予後因子に対する多変量解析の結果ではTIA-1 (hazards ratio, 5.09, 95% CI, 1.85 to 7.25; p=0.0001) と nm23-H1 発現 (Hazards ratio, 3.31, 95% CI, 1.23 to 5.87; p=0.0032) が独立した予後因子となった。

考 察

nm23 遺伝子は, 1988 年 Steeg ら¹¹⁾ によりマウスメラノーマ細胞株において, 低転移性株で発現が高く, 高転移性株において逆にその発現が低下している遺伝

子として単離され, がん転移抑制遺伝子として報告された。その後この遺伝子産物は nucleoside diphosphate kinase (NDPK) 活性を有し, 増殖促進, 分化抑制, 転写調節, c-myc 転写活性 (PuF), ショウジョウバエの形態形成 (awd 遺伝子), 接着分子などの機能があることが判明した。また, nm23-H1 の高発現が, 肺癌, 黒色種, 卵巣がん, 口腔がん, 直腸がんなどの11種類のがんで転移が抑制されることが知られている。これらの機序として, nm23-H1 が過剰発現によりインスリン様成長因子 (IGF), 血小板由来成長因子 (PDGF), リゾフォスファチジル酸 (LPA) を含む血清由来の化学遊走物質ががん細胞の細胞運動能を無効にして, 転移と浸潤を減らすと考えられている¹²⁾。また, *in vitro* では nm23-H1 は乳癌, 結腸がん, 前立腺がんなどのコ

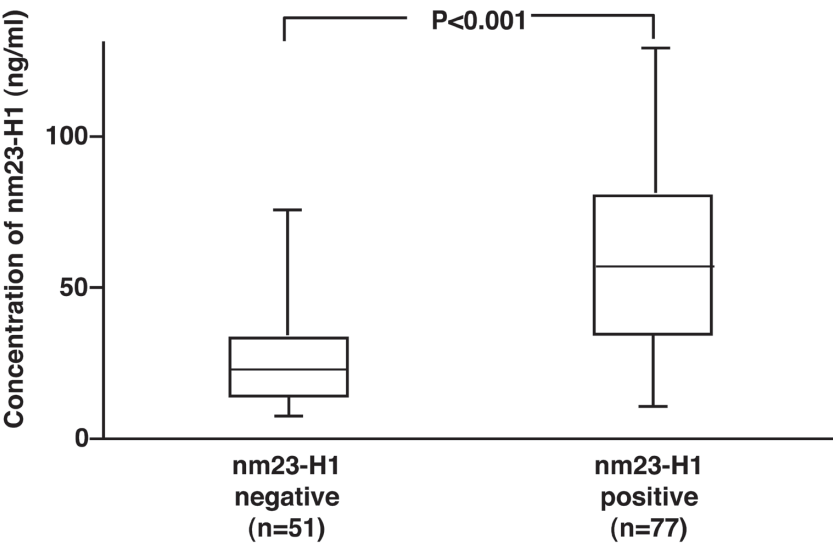


图 2. Relationship between the Serum nm23-H1 Level and Cytoplasmic nm23-H1 Expression.

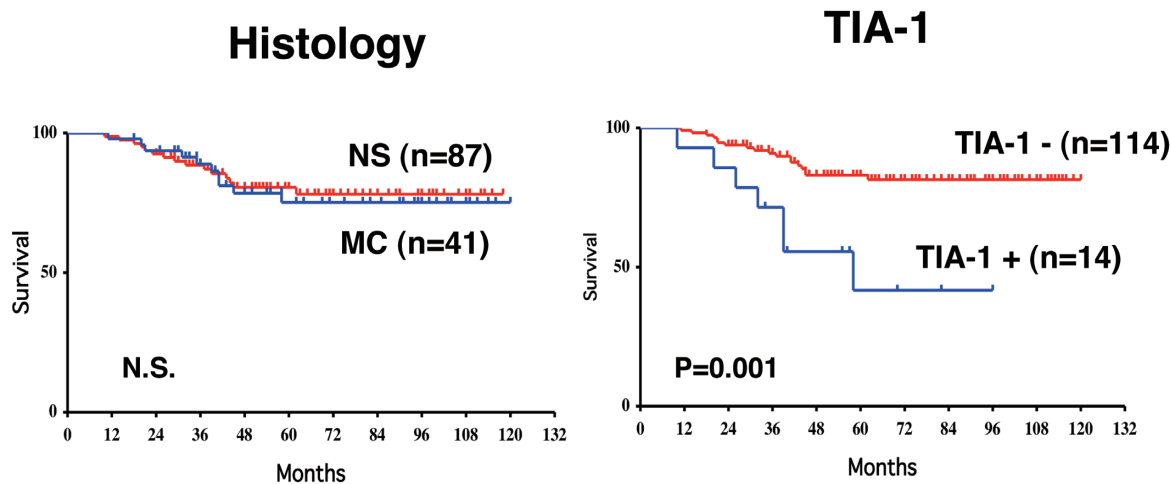


图 3. Progression-Free Survival Curve of Patients with Classical Hodgkin Lymphoma according to the Histology or TIA-1.

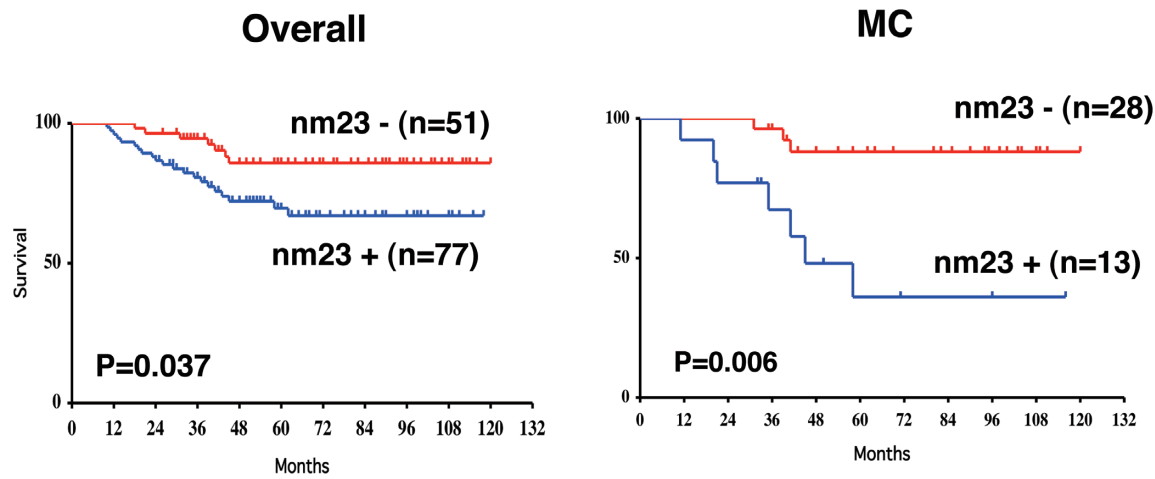


图 4. Progression-Free Survival Curve of Patients with Classical Hodgkin Lymphoma according to the Cytoplasmic nm23-H1.

ロニー形成を抑制する。最近, nm23-H1 下流分子が, 乳癌細胞の転移を抑制することが報告されている。また, nm23-H1 ファミリーのシグナル伝達経路の報告もあり, グリセルアルデヒド3リン酸塩脱水素酵素, Hsc70, テロメア, ROR(レチノイン酸関連オーハン受容体), Rad, Ras 関連 GTPase などのいろいろな細胞内蛋白との関連が報告されている¹³⁾。このように nm23-H1 に関するいろいろな機序が徐々に解明されつつあるが, 未だ不明な点が多い。近年, いろいろな癌において免疫組織染色による nm23 の発現と予後との検討が行われている。悪性黒色腫, 乳癌, 胃癌などでは, nm23 の発現と患者の生存率との間に有意な逆相関を認めたが, 一方神経芽細胞腫, 大腸癌, 膵癌では病期進行とともにむしろ発現が増強し予後不良となることが報告されている。埼玉県立がんセンター角ら¹⁴⁾は, マウスの分化抵抗性骨髄性白血病細胞 (M1 細胞) の培養上清中から分化誘導抑制因子 (inhibitory factor; I-factor) を検出し, M1 細胞の分化能を制御する重要な因子として精製し, それが nm23 蛋白と同一ものであることを見出した。そのため, 我々は白血病やリンパ腫などの造血器腫瘍に対する nm23 の意義に着目し, 現在予後因子としての意義の検討や分子標的治療への応用を検討している。

本研究では, Hodgkin リンパ腫の病理組織標本を用い, 免疫組織化学的検討を行った。細胞質内 nm23-H1 発現と血清 nm23-H1 値が相関していることより, 血清 nm23-H1 の一部はリンパ腫細胞が直接産生している可能性が示唆された。また, 細胞質内 nm23-H1 発現は, 血清 nm23-H1 と同様に重要な予後因子であり, 治療戦略を考える上でも有用であることが示唆された。

我々は以前, 血清 nm23-H1 の ELISA 法による測定系を作成し^{1,2)}, 非ホジキンリンパ腫および急性骨髄性白血病の予後因子となることを見いだした。血清 nm23-H1 は, 正常対照に比し悪性リンパ腫で高値を示し, 特に末梢性 T 細胞性リンパ腫 (peripheral T-cell lymphoma; PTCL) および成人 T 細胞白血病/リンパ腫で高値を示した。aggressive lymphoma において nm23-H1 高値群と低値群に分けて全生存割合, 無増悪生存割合について検討したが, nm23-H1 高値群では低値群に比し有意に予後不良であった³⁾。様々な非ホジキンリンパ腫の病型に対して血清 nm23-H1 高値例が予後不良因子となり, リンパ腫では腫瘍細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

本研究では, Hodgkin リンパ腫に対する血清 nm23-H1 を測定し, 血清 nm23-H1 高値症例では有意に予後不良であり, 特に MC 群での予後不良因子となることが示唆された。血清 nm23-H1 は少量の血清で簡単に測定できるが, 細胞質内 nm23-H1 はリンパ腫の診断時の免疫染色と同時にこなえるメリットがある。nm23-H1 発現

は血清 nm23-H1 と同様に重要な予後因子であり, 治療戦略を考える上で有用であることが示唆された。

文 献

- 1) Niitsu N, Okabe-Kado J, Kasukabe T, Yamamoto-Yamaguchi Y, Umeda M, Honma Y: Prognostic Implications of the Differentiation Inhibitory Factor nm23-H1 Protein in the Plasma of Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 1999;94:3541-50.
- 2) Niitsu N, Okabe-Kado J, Nakayama M, Wakimoto N, Sakashita A, Maseki N, Motoyoshi K, Umeda M, Honma Y: Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm23-H1 protein and their clinical implications in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2000;96:1080-6.
- 3) Niitsu N, Okabe-Kado J, Okamoto M, Takagi T, Yoshida T, Aoki S, Hirano M, Honma Y: Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor in aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001;97:1202-10.
- 4) Niitsu N, Okamoto M, Okabe-Kado J, Takagi T, Yoshida T, Aoki S, Honma Y, Hirano M: Serum nm23-H1 protein as a prognostic factor for indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2001;15:832-9.
- 5) Niitsu N, Okamoto M, Honma Y, Nakamine H, Tamaru JI, Nakamura S, Yoshino T, Higashihara M, Hirano M, Okabe-Kado J: Serum levels of the nm23-H1 protein and their clinical implication in extranodal NK/T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2003;17:987-990.
- 6) Niitsu N, Honma Y, Iijima K, Takagi T, Higashihara M, Sawada U, Okabe-Kado J: Clinical significance of nm23-H1 proteins expressed on cell surface in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2003;17:196-202.
- 7) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, Akamatsu H, Higashihara M, Honma Y, Okabe-Kado J, Hirano M: Clinical Significance of Intracytoplasmic nm23-H1 Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2482-90.
- 8) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, Akamatsu H, Honma Y, Higashihara M, Okabe-Kado J, Hirano M: Expression of nm23-H1 is associated with poor prognosis in peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003;123:621-30.
- 9) Niitsu N, Kohori M, Higashihara M, Bessho M: Phase II study of the irinotecan (CPT-11), mitoxantrone and dexamethasone regimen in elderly patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2007;98:109-12.
- 10) Niitsu N, Okamoto M, Nakamura N, Nakamine H, Bessho M, Hirano M: Clinicopathologic correlations

- of stage IE/IIIE primary thyroid diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2007;18:1203-8.
- 11) Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al: Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:200.
 - 12) Horak CE, Lee JH, Elkahoul AG, et al. Nm23-H1 suppresses tumor cell motility by down-regulating the lysophosphatidic acid receptor EDG2. *Cancer Res.* 2007;67:7238.
 - 13) Seong HA, Jung H, Ha H. NM23-H1 tumor suppressor physically interacts with serine-threonine kinase receptor-associated protein, a transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor-interacting protein, and negatively regulates TGF-beta signaling. *J Biol Chem.* 2007;282:12075.
 - 14) Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, et al. Purification of a factor inhibiting differentiation from conditioned medium of nondifferentiating mouse myeloid leukemia cells. *J Biol Chem.* 1988; 263:10994.

研究成果リスト

論文

- 1) Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Hirano M. Clinicopathologic features and treatment outcome of primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res.* 2008;32:1837-41.
- 2) Niitsu N, Nakamine H, Okamoto M, Tamaru J, Hirano M. A clinicopathological study of nm23-H1 expression in classical Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol.* 2008;19:1941-6.
- 3) Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical significance of 8q24/c-MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2008 Nov 25. [Epub ahead of print]
- 4) Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. : *Leukemia.* 2009 Jan 8[Epub ahead of print]

学会発表

- 1) N Niitsu, M Okamoto, I Miura, M Hirano, Clinical features and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24 translocations. 10th International Conference on Malignant Lymphoma. 2008.6. Lugano, Switzerland.
- 2) N Niitsu, M Okamoto, M Bessho, I Miura Clinical features and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2008.
- 3) 新津望, 岡本昌隆, 萩原由貴, 田苗健, 田丸淳一, 中峯寛和, 中村直哉, 平野正美. 乳腺原発びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫30例の臨床病理学的検討. 第45回癌治療学会総会. 2007.10. 京都.
- 4) 新津望, 岡本昌隆, 萩原由貴, 田苗健, 中峯寛和, 角純子, 平野正美. Hodgkinリンパ腫における細胞質内nm23-H1の検討. 第105回日本内科学会講演会. 2008.4. 東京.
- 5) N Niitsu, M Okamoto, H Nakamine, J-I Tamaru, T Yoshino, M Hirano. A clinicopathological study of nm23-H1 expression in classical Hodgkin lymphoma. 第67回日本癌治療学会学術総会. 名古屋2008.10.
- 6) 新津望, 萩原由貴, 田苗健, 岡本昌隆, 田丸淳一, 吉野正, 中峯寛和. 末梢性T細胞リンパ腫における細胞質内nm23-H1の臨床的意義. 第46回日本癌治療学会総会. 名古屋2008.10.

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

アジュバント活性の多様性とその応用

研究代表者 東 丈裕 (埼玉医科大学 医学部 免疫学)

研究分担者 松下 祥¹⁾, 水野 洋介²⁾, 酒井 輝行³⁾, 竹井 眞一郎⁴⁾

緒 言

アレルギー疾患は特定のアレルゲンに対するIgEクラスの抗体が産生されることにより引き起こされる。このIgEクラスの抗体が産生されるためにはT細胞の中でもTh2細胞が分化誘導される必要がある。免疫学における近年のトピックスは、Th2細胞の強力で有効な分化には特定の性質を持った樹状細胞 (Dendritic cells: DC) の存在が分かった点にある。このような樹状細胞をDC2と呼ぶ¹⁾。他方Th1細胞を誘導するDCはDC1と呼ばれる²⁾。それに対応した用語としてTh1/Th2アジュバントも用いられている。これまで、住血吸虫由来のphosphatidylserine、環境ホルモン、エストロゲンやプロスタグランジンE2などはTh2アジュバントとして知られている。DCは生体内でも、表皮や粘膜直下という、環境と直接接する場所に多く存在し、感染性物質や環境化学物質などの影響を直接受けており、DCの分化の解析を行えば、Th1/Th2アジュバントとしての評価が可能であると結論できる。

アトピー性皮膚炎 (AD) は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因をもつ。アトピー素因とはアレルギー疾患の家族歴・既往歴とIgE抗体を産生しやすい素因とされている。つまり、ADそのものが、IgEを産生しやすい素因を有するということができる。ADは多彩な遺伝要因と環境要因が複雑に絡み合って発症し、その症状が維持されていくと考えられている。環境要因に関しては、化学物質、感染性微生物、食品などの外的環境要因のほかにも、これらに影響されて形成される腸内細菌叢、皮膚黄色ブドウ球菌などの内的環境要因の関与が推測されている。これまで、様々なIgEクラスの抗体の上昇を認めるADにおいて、T細胞はTh2に、またDC2に分化しているかどうかについて

のコホートを用いたこれら内的環境要因の質的評価を伴う大規模研究は未だ行われていない。

そこで、我々はTh1/Th2アジュバント活性の検討をin vitroで大規模にかつ定量的に解析する方法を確立し、乳幼児期のAD患者及び健常者を対象として、コホートを用いたこれら内的環境要因の質的評価を伴う大規模研究を行った。

材料及び方法

1) 細胞株 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) にて48時間刺激を行い、抗原提示様細胞を誘導した。このPMA処理THP-1細胞にTh1アジュバントの代表格であるLPS、Th2アジュバントの代表格であるforskolinにて10分刺激し、細胞を溶解して、ELISAにより細胞内cAMPを測定した。

2) 次に、1)で確立した方法を用いて、生後6ヶ月の時点でのatopic dermatitis (AD) (+) 群55例、AD(-)55例の生後4日目における母乳の有するアジュバント活性の検討を行った。

(この研究は千葉大学倫理委員会の承認を得ている。)

具体的には、PMA処理THP-1細胞 (DC-like line) を母乳で30分刺激し、細胞内cAMP濃度をELISAで定量した。

(PMA処理THP-1細胞+母乳のcAMP濃度) - (母乳のみのcAMP濃度) をPMA処理THP-1細胞内に誘導されたcAMPとして、Mann-WhitneyのU検定にて比較した。

結 果

まず、様々な濃度のPMAでTHP-1を48時間刺激し、誘導したPMA処理THP-1細胞を様々な濃度のforskolinで刺激し、細胞内cAMPを測定した (図1)。cAMP濃度は50 ng/mlをピークにPMA濃度依存性に上昇した (図2)。またforskolinに関しては、5-10 μ Mをピークに濃度依存性に上昇した。この結果より、以後の検討をすべてPMA 50 ng/mlで前処理を

1) 埼玉医科大学 医学部 免疫学

2) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター

3) キリンビール株式会社 医薬カンパニー・医薬探索研究所

4) 埼玉医科大学 医学部 第4内科

行った。

PMA 処理 THP-1 細胞内 cAMP 濃度は, forskolin (Th2 アジュバント) にて上昇するのに対し, LPS (Th1 アジュバント) では上昇も低下も認められなかった (図 3)。更には, LPS は forskolin に拮抗して, 濃度依存性に細胞内 cAMP 濃度を減少させた。これらのことから Th2 アジュバント活性を有する物質は, PMA 処理 THP-1 細胞内の cAMP 濃度を上昇させ, Th1 アジュバント活性を有する物質はそれに拮抗することが考えられた。

次にこの方法を用いて母乳の有するアジュバント活性についての検討を行った。AD 有群の母乳は AD 無群の母乳に比し, PMA 処理 THP-1 細胞内 cAMP 濃度が, 優位に高かった。これは AD 有群の摂取した母乳は, AD 無群のそれより, 高い Th2 アジュバント活性を有すると考えられた。

考 察

これまで adjuvant の評価法としては,

- Mixed lymphocyte reaction (MLR) を用いて, dendritic cell (DC) による T 細胞分化誘導を行い, 産生するサイトカインを測定する方法
- adjuvant 暴露による抗原提示細胞内の Notch ligand 発現を評価する方法

が報告されている^{3,4)}が, これらの方法は個体差を排除できない, 1 度に大量の検体を処理できないなどの欠点がある。今回の我々が行った, PMA 処理 THP-1 細胞内の cAMP 濃度を測定し, アジュバント活性を観る方法は,

- 細胞株を用いるため, 個体差を排除できる
- 暴露時間が 10 分と短時間であるため, 母乳のような生菌を含むような検体でも測定可能である
- 1 度に大量の検体を処理できる
- 定量的である

といった利点がある。しかしながら, 生理学的な反応を観察しているわけではないため, スクリーニングとしては優れているが, 生理学的な反応については MLR を組み合わせて検討すべきであると考えられる。

母乳に関しては, 米国小児科学会 (AAP) 栄養・アレルギー・免疫委員会によると⁵⁾, 母乳栄養と atopic dermatitis (AD) の発症リスクの関連性には一定の見解が得られていない。

しかし本研究により得られた結果は, 一部の AD 患児が摂取した母乳は Th2 adjuvant 活性が高い事を示唆するものであり, 非常に興味深い。今後母乳の有する Th2 アジュバント活性物質の同定などが必要であるが, 乳幼児期の AD 発症の予防の寄与する可能性があるとして示唆された。

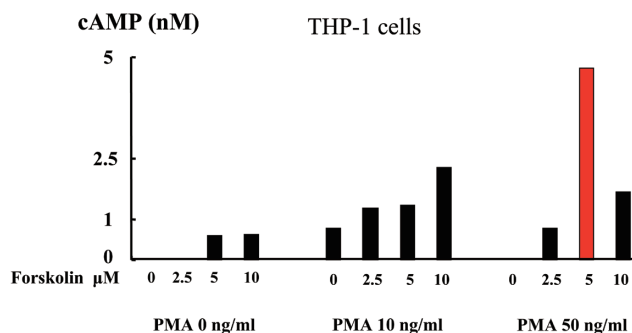


図 1.

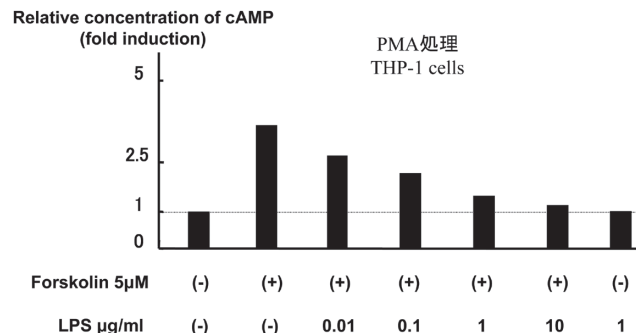


図 3.

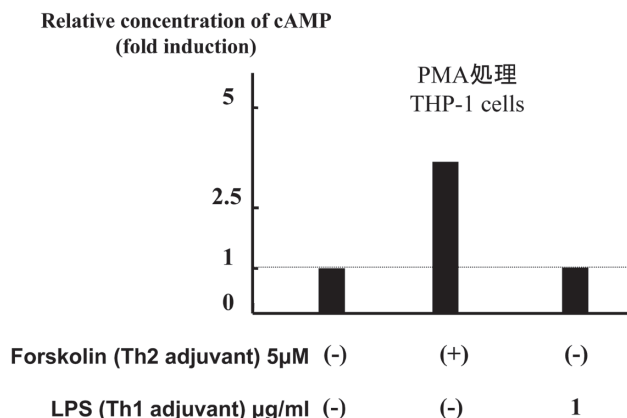


図 2.

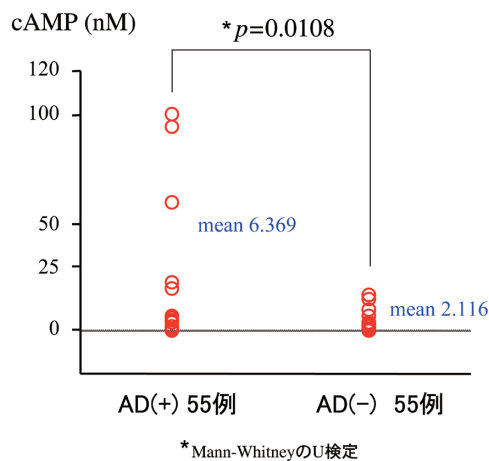


図 4.

参考文献

- 1) Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a + CD83 + dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998;161:2804-9.
- 2) Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1589:1-13.
- 3) Matsushita S, Liu T, Wakui M, Uemura Y. Adjuvants that enhance Th2 or Tr responses. *Allergol Int.* 2005;54:507-13.
- 4) Wakui M, Nakano K, Matsushita S. Notch ligand mRNA levels of human APCs predict Th1/Th2-promoting activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358:596-601.
- 5) Greer FR, Sicherer SH, Burks AW. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics.* 2008;121:183-91.
- 5) Tanaka Y and Matsushita S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;373:286-91.
- 6) Matsushita S. and Higashi T. Human Th17 cell clones and natural immune responses. *Allergol. Int.* 2008;57(2):135-40.
- 7) Higashi T, Wakui M, Nakano K, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y and Matsushita S. Evaluation of adjuvant activities using human antigen presenting cells in vitro. *Allergol.* 2008;Int.57:219-22.
- 8) Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol.* 2009;21:645-54.
- 9) Hashimoto K, Inoue T, Higashi T, Takei S, Awata T, Katayama S, Takagi R, Okada H, Matsushita S. Dopamine D1-like receptor antagonist, SCH23390, exhibits a preventive effect on diabetes mellitus that occurs naturally in NOD mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;383:460-3.

学会発表

論文発表

- 1) Mizobe T, Tsukada J, Higashi T, Mouri F, Matsuura A, Tanikawa R, Minami, Y, Yoshida Y, Tanaka Y, Constitutive association Myd88 to IRAK in HTLV-I-transformed T cells. *Exp Hematol.* 2007;35(12):1812-22.
 - 2) Mouri F, Tsukada J, Mizobe T, Higashi T, Yoshida Y, Minami Y, Izumi H, Kominato Y, Kohno K, Tanaka Y. Intracellular HMGB1 transactivates the human IL1B gene promoter through association with an Ets transcription factor PU.1. *Eur J Haematol.* 2008;80(1):10-9.
 - 3) Takagi R, Higashi T, Hashimoto K, Nakano K, Mizuno Y, Okazaki Y and Matsushita S. B-cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. *J. Immunol.* 2008;181:186-9.
 - 4) Nakano K, Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y and Matsushita S. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;373:286-91.
 - 5) Matsushita S. and Higashi T. Human Th17 cell clones and natural immune responses. *Allergol. Int.* 2008;57(2):135-40.
 - 6) Higashi T, Wakui M, Nakano K, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y and Matsushita S. Evaluation of adjuvant activities using human antigen presenting cells in vitro. *Allergol.* 2008;Int.57:219-22.
 - 7) Nakano K, Higashi T, Takagi R, Hashimoto K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol.* 2009;21:645-54.
 - 8) Hashimoto K, Inoue T, Higashi T, Takei S, Awata T, Katayama S, Takagi R, Okada H, Matsushita S. Dopamine D1-like receptor antagonist, SCH23390, exhibits a preventive effect on diabetes mellitus that occurs naturally in NOD mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;383:460-3.
- ・ 東丈裕, 橋本久実子, 高木理英, 田中良哉, 下条直樹, 河野陽一, 松下祥. アトピー性皮膚炎患児摂取母乳の試験管内アジュバント活性評価法を用いたコホート研究(ミニシンポジウム). 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008年11月
 - ・ 高木理英, 東丈裕, 橋本久実子, 中野和久, 水野洋介, 岡崎康司, 松下祥. Th17細胞特異的に発現するB細胞chemoattractant CXCL13. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008年11月
 - ・ 東丈裕, 橋本久実子, 高木理英, 田中良哉, 下条直樹, 河野陽一, 松下祥. 株化細胞を用いた試験管内アジュバント活性定量的評価法とその応用. 第38回日本免疫学会総会 京都 2008年12月
 - ・ Rie Takagi, Takehiro Higashi, Kumiko Hashimoto, Kazuhisa Nakano, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki, Sho Matsushita. B-cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. 第38回日本免疫学会総会 京都 2008年12月

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

発癌および化生における RNA 転写制御に関わる染色体高次構造の解析

研究代表者 村田 晋一（埼玉医科大学 医学部 病理学）

緒 言

近年、細胞の遺伝子発現を制御するメカニズムの1つとして、細胞核内の染色体構造、特に高次構造が注目を浴びている。すなわち、正常細胞においては、23対の染色体は核内にランダムに存在するのではなく、遺伝子濃度に準じて、核内の一定部位に配置(chromosome territory)している。また、各染色体領域での短腕・長腕、セントロメア、テロメアの位置は、無秩序に形成されているのではなく、一定の規則性のもとに形成されていることが明らかになってきた^{1,3)}。

さらに、特定の遺伝子はchromosome territoryの範囲から外へ出て(subchromosomal positioning)、微小環境を変化させることにより、RNA転写をより容易に行うシステムが存在することが明らかになってきた^{4,5)}。例えば、Epidermal differentiation complex (EDC)は、1番染色体上に存在する遺伝子で、small proline-rich proteins (SPRRs)、Loricrin、Involucrin、S100Aなど扁平上皮細胞の分化やcornified envelopeに関与する蛋白をコードしている。EDC遺伝子は、培養リンパ球では1番染色体のchromosome territory内に存在するのに対して、培養扁平上皮細胞では1番染色体のchromosome territoryの外に存在することが多い。このことから、EDC遺伝子は、染色体領域内での存在部位(subchromosomal positioning)を変化させることによって、転写活性亢進を引き起こし、タンパク発現を制御していると考えられている。

以上のように培養正常細胞では、細胞核内の染色体構造、特に高次構造がRNA転写制御に関わることが明らかされつつあるものの、腫瘍を含む病的状態にある細胞における細胞形質の変化と核内染色体の高次構造の解析はいまだ報告がほとんどなく、不明な点が多い。本研究では、1) 悪性甲状腺腫瘍における10番、18番および19番のchromosome territory、2) 扁平上皮化生におけるEDC遺伝子のsubchromosomal positioningを

解析し、腫瘍細胞および化生細胞におけるRNA転写制御に関わる染色体高次構造の変化を検討した。

材料と方法

対象は、正常甲状腺組織(4例)、乳頭癌(6例)、未分化癌(2例)、慢性子宮頸管炎(1例)で、いずれも外科的に摘出された材料から得た。凍結置換法(表1)にて材料を固定、パラフィン包埋した後、4 μ mの切片標本作製した⁶⁾。1番、10番、18番、19番染色体およびEpidermal differentiation complex (EDC) 遺伝子の視覚化には、Multicolor FISH法(表2)を用いた(図1、図2)⁷⁾。用いたprobesは1番(biotinラベル)、10番(biotinラベル)、18番(FITCラベル)、19番(Cy3ラベル)染色体に対するpainting probes (Cambio社)とEDCに対応するPAC clone (P1-derived artificial chromosome; RP1-148L21とRP1-13P20)から作成したprobe (digoxigeninラベル)を用いた。FISH染色標本は、蛍光顕微鏡(Olympus BX50)下に観察した後、白黒CCDカメラ(Olympus, DP30BW)を使って、染色体およびEDC遺伝子染色像を別々の白黒デジタル画像を採取した後、疑似カラーを付け、重ね合わせ、FISH染色画像とした。図3に示されるように、10番、18番、19番染色体のchromosome territoryを、染色体数と核縁からの直径比で10%の領域に存在するか否かによって、4つのパターンに分類し、それぞれのパターンを示す細胞の頻度をカウントした。EDC遺伝子のsubchromosomal positioningに関しては、EDC遺伝子が、1番染色体のchromosome territoryの内部(center)、内部辺縁(periphery)、外部近傍(neighborhood)、外部(outside)のいずれに位置するかによって分類し、それぞれのパターンを示す細胞の頻度をカウントした。切片標本のため、EDC遺伝子からのシグナルが1つの細胞と2つの細胞が認められたが、1つのシグナルを持つ細胞のみについて検討した。

表 1. 凍結置換法のプロトコール

1) Preparation of isopentane-propane cryogen (-193°C) by air propane in isopentane cooled in liquid nitrogen
2) Plunging the tissue samples into the cryogen
3) Preparation of chilled freeze-substitution solution (-80°C) of pure acetone containing 2% paraformaldehyde
4) Moving the frozen tissue samples to the freeze-substitution solution (48 hrs)
5) Gradual elevation of the temperature to room temperature
6) Incubation in acetone, ethanol and xylene
7) Embedding in paraffin

表 2. Multicolor FISH 法のプロトコール

1) Pretreatment 0.3% pepsin / 0.01N HCl (37°C , 30 min) 4% PFA/0.1M PBS RT, 5 min 0.1% NP-40/2xSSC (37°C , 30 min) denature (85°C , 5 min)
2) Hybridization (37°C , overnight) PAC probes for EDC (RP1-13P20 or RP1-148L21) Whole chromosome No 1 painting probe (Cambio)
3) Washes 50% Formamide + 0.1% Tween20/2xSSC (45°C , 10 min, twice) 1x SSC (65°C , 10 min, twice)
4) Visualization using fluorescence (FITC, Cy3, Alexa Fluor 647)

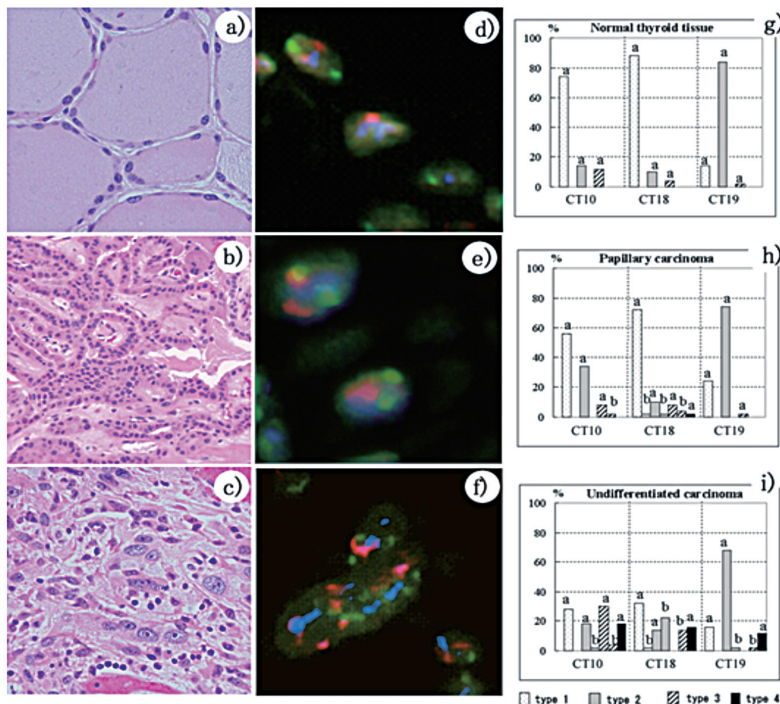


図 1. 甲状腺の正常組織，乳頭癌症例，未分化癌症例それぞれのHE組織像(a, b, c)，10番(CT10；赤擬似色)，18番(CT18；緑擬似色)，19番(CT19；青擬似色)染色体のmulticolor FISH像(d, e, f)，およびchromosome territoryの分布(g, h, i)。

結果

1) 甲状腺病変における10番，18番，19番染色体のchromosome territory

図1は代表的甲状腺病変における10番，18番，19番染色体の代表的FISH画像と各染色体のchromosome territory分布パターンである。また，正常甲状腺，乳頭癌および未分化癌における10番，18番，19番染色体のchromosome territoryの分布パターンの解析結果

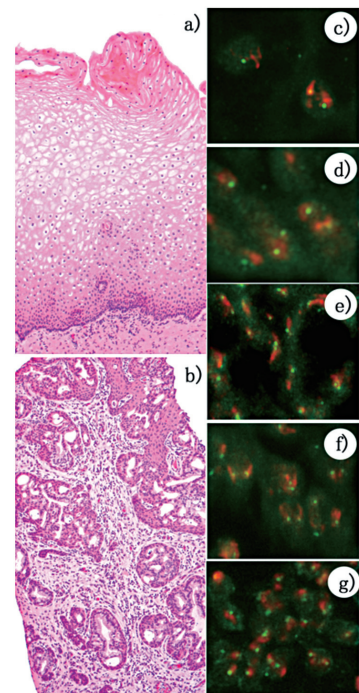


図 2. 子宮頸部の扁平上皮，腺細胞，扁平上皮化生細胞およびリンパ球における1番染色体内のEpidermal differentiation complex (EDC) 遺伝子のsubchromosomal positioning. HE組織像(a, b)とmulticolor FISH像(棘細胞(c)，基底細胞(d)，腺細胞(e)，扁平上皮化生細胞(f)およびリンパ球(g)). Multicolor FISH染色にはBACから作成したprobes (RP1-148L21 c, d); RP1-13P20 e, f, g)を用いた。1番染色が赤擬似色で，RP1-148L21およびRP1-13P20が緑擬似色で示されている。

を図4に示す。正常甲状腺では、10番染色体は約60%以上の細胞で核縁に、18番染色体は約80%以上の細胞で核縁に、19番染色体は約80%以上の細胞で核中央に存在した。乳頭癌においても、正常甲状腺と類似した傾向が見られたが、19番染色体が核縁に存在する細胞が増加した。未分化癌においては、染色体増幅を示す細胞やchromosomal territoryの乱れを示す細胞が多数認められた。

2) 子宮頸部組織におけるEDCのsubchromosomal positioning

子宮頸部組織における1番染色体とEDC遺伝子の代表的FISH画像を図2に示す。内部(center), 内部辺縁(periphery), 外部近傍(neighborhood), 外部(outside)に分類されたEDCのsubchromosomal positioningの解析結果が図5に示されている。どの種類の細胞においても、1番染色体のchromosome territoryの内部辺縁と外部近傍(periphery and neighborhood)にEDC遺伝子が存在する細胞の頻度が最も高かった。正常の扁平

上皮では、基底層、中層および表層においてやや異なるものの、38-54%の細胞において、EDC遺伝子は1番染色体のchromosome territoryの外側(外部近傍と外部)に存在した。一方、腺上皮では26-32%の細胞において、リンパ球では28%の細胞において、また、腺上皮から扁平上皮への形質変換である扁平上皮化生細胞では38-42%の細胞において、EDC遺伝子は1番染色体の外側に存在した。

考 察

核内で染色体DNAが形成する最も大きな高次構造である染色体領域(chromosome territory)が、遺伝子発現と密接に関係し、細胞の機能や分化を制御するメカニズムの1つとして働いていることが明らかにされはじめた^{3, 8-10)}。染色体の構造は、オングストロームレベルの微細構造およびマイクロメートルレベルの高次構造の観点から論じられる。いずれのレベルの構造の異常もRNA転写の制御、ひいてはタンパク発現の制

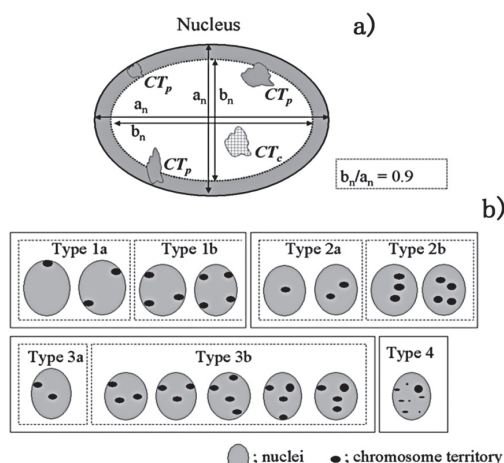


図3. 10番, 18番, 19番染色体のchromosome territory分布パターン分類。直径比で核縁側10%領域にchromosome territoryの少なくとも一部が含まれるものをCTp, それ以外をCTcと定義した。Type 1-3は含まれる染色体数が4個以下のもの, type 4は5個以上のもので, type 1は全ての染色体がCTp, type 2は全ての染色体がCTc, type 3と4はCTpとCTcが混在するものである。

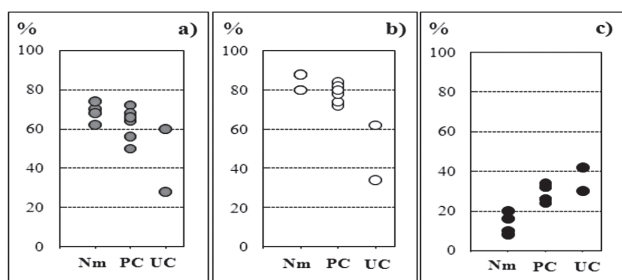


図4. 甲状腺の正常(NM)組織群, 乳頭癌(PC)症例群, 未分化癌(UC)症例群の10番(a), 18番(b), 19番(c)染色体のchromosome territoryの分布解析結果。

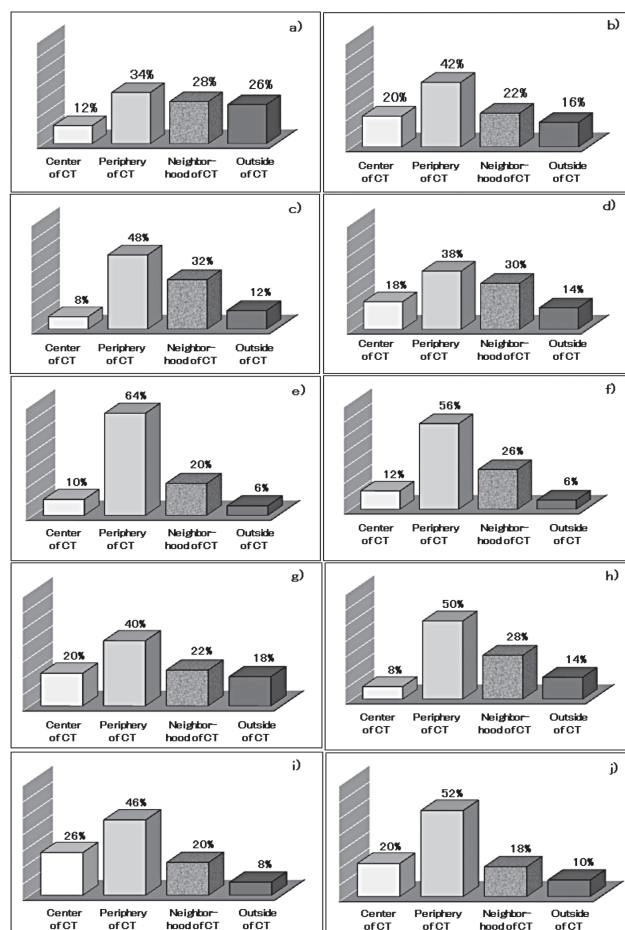


図5. 棘細胞(a, b), 基底細胞(c, d), 腺細胞(e, f), 扁平上皮化生細胞(g, h)およびリンパ球(i, j)における1番染色体内のEpidermal differentiation complex (EDC)遺伝子のsubchromosomal positioning解析結果。RP1-148L21による解析結果(a, c, e, g, i)とRP1-13P20による解析結果(b, d, f, h, j)。

御を通じて、発癌メカニズムや癌細胞の細胞生物学的特性の発現に大きな影響を与えていると考えられる。我々は、ヒト甲状腺癌を中心とした癌細胞の細胞生物学的特性および発癌メカニズムについて、Texture analysisやMicroscopic FRET(fluorescence resonance energy transfer)法の技術を応用し、染色体の微細構造の解析を行ってきた¹¹⁻¹⁷⁾。本研究では、我々が従来行ってきた研究成果に、染色体の高次構造の解析を加え、癌細胞核や化生細胞などの形質変換を来した細胞核における染色体高次構造の変化と、悪性度、細胞増殖、RNA転写制御、核クロマチン形態などの細胞特性との関係を解析した。

染色体の高次構造の1つであるchromosome territoryは、間期細胞核における各染色体の核内配置である。正常細胞では18番染色体と19番染色体はほぼ同じ大きさの染色体であるが、遺伝子を多く含む19番染色体は核の中心部に、遺伝子の少ない18番染色体は核辺縁に存在するというように、染色体は含まれる遺伝子の密度に従って一定の規則性をもって核内に存在することが明らかにされている。一方、核クロマチン分布異常を示す腫瘍細胞におけるchromosome territoryを解析した報告はほとんど見られない。本研究では、正常甲状腺および乳頭癌の大部分の細胞では、18番染色体は核縁に、10番および19番染色体は核中央部に配置した。ただし、乳頭癌細胞では、正常甲状腺細胞と比較して、核中央部に配置する18番染色体や核縁に配置する10番および19番染色体を持つ細胞が増加した。未分化癌では、各染色体の数が増加し、かつ、chromosome territoryの規則性が失われていた。これらの結果より、甲状腺の腫瘍化において、細胞異型に乏しく悪性度の低い高分化癌では多くの細胞でchromosome territoryの基本的規則性は保たれるものの、一部に乱れが生じている。一方、細胞異型が強く悪性度の高い未分化癌では多くの細胞でchromosome territoryの乱れが顕著になることが示された。

Subchromosomal positioningは、間期細胞核における遺伝子のchromosome territory内あるいは外での位置であり、染色体の高次構造の1つである。先に述べたように、細胞はある種の遺伝子のsubchromosomal positioningを変化させることによって、RNA転写活性、引いてはタンパク発現や細胞形質発現をコントロールしていると考えられている。ほとんどのsubchromosomal positioningの研究は培養細胞を用いた研究であり、実際のヒト組織内で形質変換を示した細胞のsubchromosomal positioningを解析した報告はまれである。本研究では、ヒト子宮頸部組織において扁平上皮の分化と関連するEDC遺伝子のsubchromosomal positioningが、細胞の種類および分化によって変化することが示された。すなわち、扁平上皮細胞では、腺上皮細胞やリンパ球と比

較して、1番染色体のchromosome territoryの外側(外部近傍と外部)にEDC遺伝子が存在する細胞の頻度が高かった。さらに、腺上皮からの形質転換した扁平上皮化生細胞では、腺上皮よりも1番染色体のchromosome territoryの外側にEDC遺伝子が存在する細胞の頻度が高かった。以上より、腺上皮が扁平上皮化生に際しては、EDC遺伝子のsubchromosomal positioningが変化しており、EDC遺伝子周囲のDNA環境を変化させることによって、EDC遺伝子の発現(RNA転写)亢進、引いてはEDCタンパクの産生亢進を来すことによって、化生が起こされている可能性が示唆された。

以上、1) 癌細胞におけるchromosome territoryは、高分化癌では正常細胞に類似するものの、遺伝子異常が高頻度に認められる甲状腺未分化癌では高度な変化が見られること、2) chromosome territoryを始めとする染色体の高次構造の異常は核形態の異常(核異型)をもたらすこと、3) 腺上皮における扁平上皮化生では、扁平上皮分化と関係するEDC遺伝子のsubchromosomal positioningを変化させること、が明らかとなった。すなわち、chromosome territoryやsubchromosomal positioningといった染色体高次構造の変化が、遺伝子発現(RNA転写)に影響し、蛋白発現の制御を通して、細胞の形態・機能といった形質変化や腫瘍化に関与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Boveri T. Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Archiv für Zellforschung*. 1909;3:181-268.
- 2) Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, Schrock E, et al. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1993;58:777-92.
- 3) Tanabe H, Kupper K, Ishida T, Neusser M, Mizusawa H. Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenet Genome Res*. 2005;108:255-61.
- 4) Williams RR. Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. *Trends Genet*. 2003;19:298-302.
- 5) Williams RR, Fisher AG. Chromosomes, positions please! *Nat Cell Biol*. 2003;5:388-90.
- 6) Ohno N, Terada N, Murata S, Katoh R, Ohno S. Application of cryotechniques with freeze-substitution for the immunohistochemical demonstration of intranuclear pCREB and

- chromosome territory. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:55-62.
- 7) Murata S, Katoh R. Technique and application of FISH method In: *Histochemistry 2008 ed.*. Kyoto: Nakanishi Insatsu, 2008:59-66.
 - 8) Parada LA, McQueen PG, Misteli T. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol.* 2004;5:R44.
 - 9) Solovei I, Schermelleh L, Düring K, Engelhardt A, Stein S, Cremer C, et al. Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma.* 2004;112:410-23. Epub 2004 Jun 2009.
 - 10) Guasconi V, Souidi M, Ait-Si-Ali S. Nuclear positioning, gene activity and cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005;4:134-8.
 - 11) Murata S, Herman P, Lin H-J, Lakowicz J. Fluorescence lifetime imaging of nuclear DNA; Effect of fluorescence resonance energy transfer. *Cytometry.* 2000;41:178-85.
 - 12) Murata S, Kusba J, Piszczek G, Gryczynski I, Lakowicz J. Donor Fluorescence Decay Analysis for Energy Transfer in Double-Helical DNA with Various Acceptor Concentration. *Biopolymers.* 2000;57:306-15.
 - 13) Murata S, Herman P, Lakowicz J. Texture analysis of fluorescence lifetime images of nuclear DNA with effect of fluorescence resonance energy transfer. *Cytometry.* 2001;43:94-100.
 - 14) Murata S, Herman P, Lakowicz J. Texture analysis of fluorescence lifetime images of at- and gc-rich regions in nuclei. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:1443-52.
 - 15) Murata S, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, Nakamura N, Yamashita H, et al. Detection of underlying characteristics of nuclear chromatin patterns of thyroid tumor cells using texture and factor analyses. *Cytometry.* 2002;49:91-5.
 - 16) Murata S, Herman P, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, Nakamura N, et al. Spatial distribution analysis of AT- and GC-rich regions in nuclei using corrected fluorescence resonance energy transfer. *J Histochem Cytochem.* 2003;51:951-8.
 - 17) Murata S, Herman P, Iwashina M, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, et al. Application of microscopic Forster resonance energy transfer to cytological diagnosis of the thyroid tumors. *J. Biomedical Optics.* 2005;10:034008(034001-6).

研究成果リスト

英語論文：

- 1: Shimizu Y, Jin L, Yamaguchi H, Motosugi U, Sannohe S, Nagata K, Sakurai T, Murata S, Yasuda M, Shimizu M. Detection of lymphatic invasion in resected cases of primary pancreatic cancer based on immunohistochemistry of D2-40. *Ann Diagn Pathol.* 2009 Jun;13(3):168-72.
- 2: Motosugi U, Murata S, Shimizu M, Yasuda M, Sakurai T, Shimizu Y, Ban S, Nagata K, Yamaguchi H, Sannohe S. Extranodular background liver parenchyma of focal nodular hyperplasia: histopathological characteristics. *Virchows Arch.* 2009 May;454(5):557-62.
- 3: Motosugi U, Kato T, Kamakura Y, Saze T, Suzuki T, Yajima S, Shimizu Y, Murata S, Shimizu M, Ichikawa T, Araki T. Radiology contributes to better cytological diagnosis of lung tumors. *Lung Cancer.* 2009 Feb 3. [Epub ahead of print]
- 4: Kawasaki T, Nakamura S, Sakamoto G, Murata S, Tsunoda-Shimizu H, Suzuki K, Takahashi O, Nakazawa T, Kondo T, Katoh R. Neuroendocrine ductal carcinoma in situ (NE-DCIS) of the breast-comparative clinicopathological study of 20 NE-DCIS cases and 274 non-NE-DCIS cases. *Histopathology.* 2008 Sep;53(3):288-98.
- 5: Inoue S, Inoue M, Kawasaki T, Takahashi H, Inoue A, Maruyama T, Matsuda K, Kunitomo K, Murata S, Fujii H. Six cases showing radial scar/complex sclerosing lesions of the breast detected by breast cancer screening. *Breast Cancer.* 2008;15(3):247-51.
- 6: Nakazawa T, Murata S, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, Katoh R. Histopathology of the thyroid in amiodarone-induced hypothyroidism. *Pathol Int.* 2008 Jan;58(1):55-8.
- 7: Murata S, Nakazawa T, Ohno N, Terada N, Iwashina M, Mochizuki K, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, Ohno S, Katoh R. Conservation and alteration of chromosome territory arrangements in thyroid carcinoma cell nuclei. *Thyroid.* 2007 Jun;17(6):489-96.
- 8: Kondo T, Nakazawa T, Murata S, Kurebayashi J, Ezzat S, Asa SL, Katoh R. Enhanced B-Raf protein expression is independent of V600E mutant status in thyroid carcinomas. *Hum Pathol.* 2007 Dec;38(12):1810-8.
- 9: Kondo T, Hashi A, Murata S, Fischer SE, Nara M, Nakazawa T, Yuminamochi T, Hoshi K, Katoh R. Gastric mucin is expressed in a subset of endocervical tunnel clusters: type A tunnel clusters of gastric phenotype. *Histopathology.* 2007 Jun;50(7):843-50.

- 10: Nara M, Hashi A, Murata S, Kondo T, Yuminamochi T, Nakazawa K, Katoh R, Hoshi K. Lobular endocervical glandular hyperplasia as a presumed precursor of cervical adenocarcinoma independent of human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol*. 2007 Aug;106(2):289-98.
 - 11: Liu YL, Matsuzaki T, Nakazawa T, Murata S, Nakamura N, Kondo T, Iwashina M, Mochizuki K, Yamane T, Takata K, Katoh R. Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. *Hum Pathol*. 2007 Jan;38(1):171-8.
- 日本語論文：**
1. 村田晋一, 廣川満良. 甲状腺微小癌 update. *病理と臨床* 2009;27(5):448-52.
 2. 大野四季音, 村田晋一, 弓納持勉, 石井喜雄, 中澤久美子, 岩佐敏, 加藤良平 尿中に腫瘍細胞が出現した乳頭状腎細胞癌の一例 *日本臨床細胞学会雑誌* 2009;48(2):61-5.
 3. 村田晋一 FISH法の実際と応用. *組織細胞化学* 2008;59-66.
 4. 村田晋一 組織診および細胞診からみた尿路上皮異形成の取り扱い *病理と臨床* 2008 26巻2号 152-6.
 5. 赤池英憲, 板倉淳, 大澤俊也, 藤井秀樹, 中澤匡男, 村田晋一, 加藤良平 Granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF) 産生腭腺扁平上皮癌の1剖検例 *腭臓* 2008 23巻4号 494-500
 6. 石川めぐみ, 安藤典子, 岩本拓, 原田和俊, 古橋正男, 川村龍吉, 柴垣直孝, 佐藤栄一, 村田晋一, 島田眞路 神経線維腫症1型に合併した悪性末梢神経鞘腫瘍の姉弟例 *臨床皮膚科* 2008 62巻7号 487-9.
 7. 欧陽いく暉, 上條篤, 村田晋一, 遠藤周一郎, 加藤良平, 増山敬祐 好酸球性副鼻腔炎患者におけるシステニルロイコトリエンレセプターの発現 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 2007 25巻2号 150-1.
 8. 三井広, 柴垣直孝, 金重勝博, 村田晋一, 加藤良平, 島田眞路 四肢の紫斑, 潰瘍で発症した多発性骨髓腫 *皮膚病診療* 2007 29巻10号 1157-60.
- 講演**
1. 村田晋一. 尿細胞診の診断アプローチとその細胞生物学的背景 埼玉県細胞診講習会 埼玉 2009年1月24日
 2. 村田晋一. 尿細胞診の誤判定防止の要点 ～診断アプローチと問題点～ 国立病院機構研修会 東京 2009年2月3日
 3. 村田晋一. 細胞診における細胞核異型の分子病理学的背景 -甲状腺と尿路上皮の病変を中心として- 埼玉 埼玉県技師会
 4. 村田晋一. 尿路上皮病変における病理診断の問題点と分子病理学的アプローチ 第12回泌尿器病理研究会 小倉 2008年6月25日
 5. 村田晋一. 尿細胞診の診断アプローチと問題点. 日本臨床細胞診学会山形県支部総会 山形 2008年7月19日

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

CD34 陰性血液幹細胞からの無血清・無ストローマでの
血液分化誘導系の研究

研究代表者 浅田 留美子（埼玉医科大学 医学部 臨床検査医学科）

研究分担者 池淵 研二*

緒 言

我々は、ヒト造血幹細胞として従来のCD34陽性の造血幹細胞に加え、CD34陰性の分画に属する、より未分化と考えられる造血幹細胞の存在を明らかにし(Blood 101:2924-2931, 2003)これに関する研究を行ってきた(Stem Cells 25:1348-1355, 2007)。またCD34陰性造血幹細胞の持つ未分化性から、ES細胞 cell lineの培養系のうちJean Luらの報告による培養条件(以下HESCOと略す)(PNAS 103(15):5688-5693, 2006)に着目し、これをヒト臍帯血CD34陰性細胞の培養に応用を試みた。無血清、ストローマフリーの*in vitro*の培養系にHESCOの培地と数種類のサイトカインを添加して、短期間(3～7日)培養することで3系統の血球系への分化を確認した。この際に見られる分化の過程が、特に赤芽球と一部のリンパ球に関して、コントロールとして培養したCD34陽性の分画からの分化動態と明らかな相違点があることを確認した。両者の異なる点としては、①培養3～4日目以降、GPA陽性細胞の分化・増殖がCD34陰性分画からの培養で優位に認められる、②培養3～4日目においては、CD34陰性分画からの培養でのみIL-7レセプター陽性の小リンパ球様の細胞が認められる、の2点が挙げられた。従来の研究ではCD34陰性細胞は*in vivo*の移植系では骨髄に生着し赤芽球やリンパ球を生成することは証明されているが、*in vitro*系では確認されていない。

以上の背景のもと、本研究ではまずCD34陰性血液幹細胞からの無血清・ストローマフリーでの赤芽球と小リンパ球が確実に分化誘導できる系をそれぞれ確立することを目指した。さらにHESCOに含まれるサイトカインbFGF, BAFF, Wnt3Aの他、血球分化に関わるサイトカインIL-3, G-CSF, SCF, EPO, GM-CSFのうち、何が赤芽球およびリンパ球系細胞増殖に必須のシグナル

であるか、組み合わせを変えて解析を行い解明することとした。

さらに、CD34陰性細胞から同じ培養条件で赤芽球と小リンパ球に分化する細胞が存在することから、共通の元になる幹細胞が存在するのか各々の細胞系の幹細胞が存在するのか、細胞表面抗原マーカーとセルソーティングを用いて単一細胞を培養する系で解析することを目指した。幹細胞が同定された場合には遺伝子発現の解析からも幹細胞を同定することを目指した。解析の候補としてc-kit, GATA-1, survivin(Leung CG, et al. J Exp Med 204: 1603-1611, 2007), HOXB4, Bmi-1, globin, Epo-R, c-Mpl, Nanog, SSEA-1, Oct4等を考えた。

材料と方法

(1) 標的細胞の純化方法

対象細胞として埼玉医科大学倫理委員会によって承認された正常妊婦出産時の臍帯血を用いた。其々のサンプルから単核球分画を比重遠心法で分離し、一旦凍結保存した。解析時には細胞を解凍後に、マグネティックビーズ(Easy Sep negative selection)を用いてlineage陽性細胞を除去後、再度抗lineage (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, GPA, CD4, CD10, CD20, CD41) 抗体, 抗CD45抗体, 抗CD34抗体, 7AADを用いて多重染色後に、本学中央研究施設に設置されているセルソーター (FACS Aria)を用いて目的とする細胞の純化を行う。

(2) *In vitro* 培養系

ソーティングで得られた細胞をbFGF, Wnt3A, BAFF, IL-3, G-CSF, SCF, EPO, GM-CSF, Insulin, transferrin, Albumin, Cholesterol lipid 存在下の培養条件で12, 24または96well plateを用いて37℃, 5% CO₂, 5% O₂で培養する。赤芽球またはリンパ球其々の分化誘導に必須のサイトカインシグナルを調べるため、サイトカインの組み合わせを変えた条件の培養も同時に行う。必要に

* 埼玉医科大学 医学部 臨床検査医学科

応じて細胞をサイトスピンで塗抹標本を作成し形態観察し、増殖能を調べるためにコロニーアッセイも行う。

(3) 解析

実験の目的によって、day2～4またはday7, day14の細胞を回収しGPA, CD34, CD36, CD45, IL-7R, c-kit等の抗体を用いて染色後、フローサイトメーターで解析または、再度ソーティングし目的細胞を得る。再ソーティングで得られた細胞は遺伝子解析のためのサンプルとしてRNAを回収する。サイトスピンの作成も必要に応じて行う。

(4) その他

赤血球系の分化に関しては、正染色赤芽球まではサイトスピン標本で確認されているが、脱核した赤血球までの誘導が可能であるか検討する。

結 果

(1) 標的細胞の純化

ヒト臍帯血を用いて、比重遠心で単核球分離後、マグネティックビーズでlineage陽性細胞を除去後、再度セルソーターにより細胞を分離した際のスキャッターグラムを図1に示す。7AADで死細胞を除去、lineage抗体のカクテル (FITC) とGPAによる染色でlineageとGPA陽性細胞を除いた分画をCD45とCD34抗原の染色で展開した。P7をCD34陽性細胞、P8をCD34陰性細胞として用いて実験を行った。

(2) *In vitro* 培養の条件による細胞の分化

CD34陽性および陰性細胞を其々 HESCO の条件下で培養しday2およびday5にフローサイトメーターで解析を行ったところ、day5の細胞数はCD34陽性細胞で6倍、陰性細胞では約2倍の増加を認め、CD34陽性細胞の培養系ではGPA陽性細胞は20%以下であったのに対し、CD34陰性細胞では70-80%がGPA陽性であった。また、CD34陰性細胞の培養システムでは培養期間中にCD34陽性細胞は生成されなかった。

次に、CD34陽性および陰性細胞を5種 (IL-3, G-CSF, SCF, EPO, GM-CSF) の血球分化誘導サイトカイン存在下に培養した場合と、これら5種のサイトカインにbFGF, BAFF, Wnt-3Aを加えた条件下での培養を比較検討した。day5にCD34陽性細胞の培養系ではCD34陽性細胞が約40%を占めるのに対し、CD34陰性細胞の培養系ではHESCOでの培養と同様CD34陽性細胞は認め

られなかった。

CD36陽性細胞に注目して観察したところ、CD34陽性細胞の培養系では培養細胞の約40%を占めそのほとんどがCD45陽性であったのに対し、CD34陰性細胞の培養系ではほとんど全ての細胞がCD36陽性で、これらはCD45が陰性の集団と弱く発現している異なる集団として分離された。またCD34陽性細胞の培養系では出現しなかったCD61陽性細胞が、CD34陰性細胞の培養系では7%前後の細胞に認められた。

IL-7レセプターの発現に関しては、5種のサイトカインにbFGF, BAFF, Wnt-3Aを加えた条件でのCD34陰性細胞の培養系でのみ1%前後と少数ではあるがIL-7レセプター陽性細胞が認められた (図2)。

GPA陽性細胞をソーティングしサイトスピン標本を作成しメイグムザ染色にて観察したところ、そのほとんどは赤芽球であることが確認できた。ただし脱核した赤血球の確認は困難であった。

(3) コロニーアッセイ

上記の通りCD34陰性細胞の培養ではCD34陽性細胞からの培養と異なり、CD34抗原の発現が培養期間中全く認められないまま、GPA陽性赤芽球に分化することが観察された。両集団の相違およびそれぞれの分化に各種サイトカインが及ぼす影響を知るため、サイトカインの条件を変えて、CD34陽性細胞、陰性細胞を其々コロニーアッセイを行った。①EPO ②EPO + SCF ③EPO + IL-3 ④EPO + SCF + IL-3 + G-CSF + GM-CSFの条件でアッセイを行った際の結果を (表1) に示す。CD34陽性細胞のコロニーアッセイの結果、SCFがあるとMixコロニー形成がフルに刺激され、IL-3があるとG, GMコロニー形成がフルに刺激される傾向があることが分かった。

CD34陰性細胞のコロニーアッセイの結果、赤芽球バースト (BFU-E) のみ形成し、GM, Mixコロニーは形成されない結果が得られた。

4) シングルセルソーティング

CD34陰性細胞の集団の培養結果では、短期間にGPA陽性細胞の分化および増殖が起っているように観察されたが、CD34陰性の細胞集団中に赤芽球コロニー前駆細胞の中の成熟型 (CFU-E) が混入している可能性は否定できない。より詳細な細胞の分化過程を調べるため、CD34陰性細胞を96well plateを用いてシングルセル

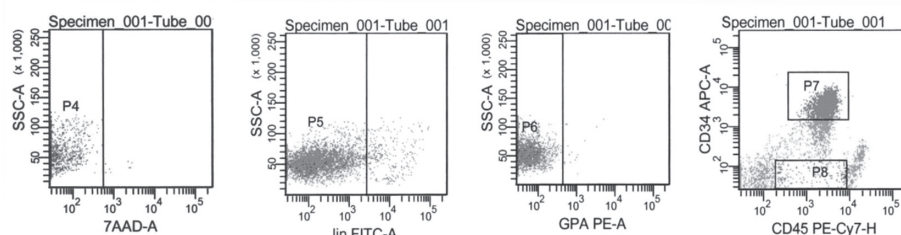


図1. 標的細胞の純化。

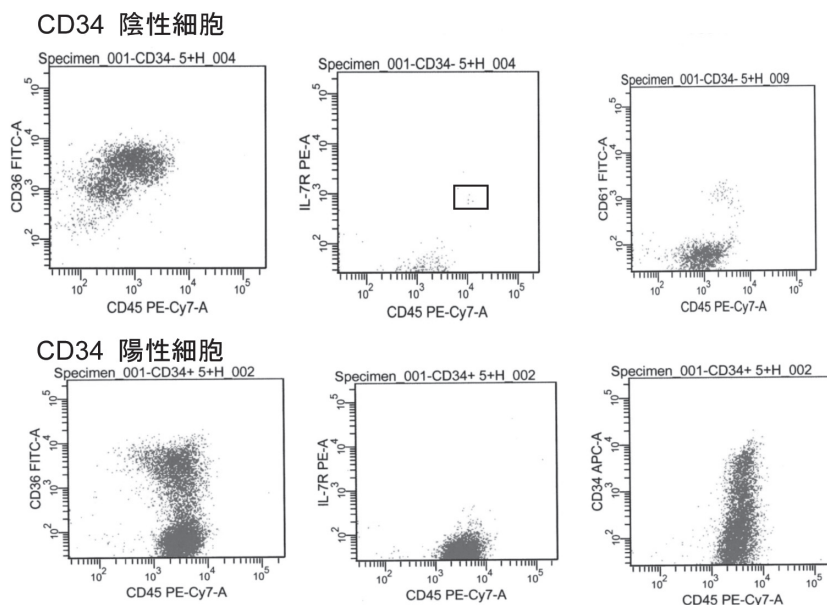


図 2. day5, のCD34 陰性および陽性細胞.

表 1. コロニーアッセイ

	CD34(-)				CD34(+)			
	Epoのみ	Epo+SCF	Epo+IL-3	5cvtokine	Epoのみ	Epo+SCF	Epo+IL-3	5cvtokine
BFU-E	8 (8/8)	9 (8/10)	14 (20/8)	10.5 (6/15)	17 (18/16)	29 (35/23)	44 (45/43)	29 (28/30)
G	0	0	0	0.5 (0/1)	20 (23/17)	21.5 (16/27)	23 (26/20)	31.5 (30/33)
GM	0	0	0	0	4 (6/2)	11.5 (15/8)	22.5 (15/10)	14.5 (14/15)
Mix	0	0	0	0	7.5 (9/6)	18 (17/19)	11 (6/16)	23 (21/25)
Macrophage	0	0	0	0	2.5 (3/2)	1.5 (3/0)	0 (0/0)	2 (1/3)

ソーティングを行い, IL-3, G-CSF, SCF, EPO, GM-CSF の5種のサイトカインと, これにbFGF, BAFF, Wnt-3Aを加えた2条件で培養しday7までの変化を観察した. どちらの条件でも6-7well/plateに細胞の増殖を認め, 各wellで数10倍から数1000倍程度の細胞増殖が確認された. ウェルから回収した細胞を用いてFACS解析したところいずれの培養後細胞でもCD34の発現は認められなかった. CD36の発現については陽性細胞の割合はwellにより異なるものの細胞増殖の見られた全てのwellで増殖した細胞の半数以上が陽性を示した. 一方でIL-7の明らかな陽性細胞は認められなかった. CD61とc-kit(CD117)に関して両抗原ともに発現が弱陽性の細胞が存在するwellが2-3well/plate, c-kitのみ発現している細胞集団を認めるwellが1well/plate見られた.

考 察

生体に移植する*in vivo*アッセイ系を用いた検討では, CD34陰性細胞がより未分化な造血幹細胞を含むことを示す研究成果が発表されている. *In vitro*アッセイ系で

もCD34陽性細胞とCD34陰性細胞の特性の違いを検討する目的で, 両者を無血清, ストローマフリーの培養系で本研究は検討を行ってきた.

結果で示したように, CD34陰性細胞の培養ではCD34抗原の発現はいずれのサイトカイン添加条件でも認められなかった. CD34陰性細胞からの培養の方がGPA抗原の発現が短期間で認められた. 本実験の開始時点では, より未熟なCD34陰性細胞の中に短期間で赤芽球へ分化する特殊な前駆細胞の存在も仮定したが, 現時点ではCFU-E存在の否定も難しく, このような細胞の証明には現在準備を進めている遺伝子解析他, さらに検討が必要である. 培養中に認められたCD36陽性細胞については, CD34陽性細胞ではほぼ全ての細胞がCD45抗原を発現していたのに対して, CD34陰性細胞ではCD45抗原を発現している集団と発現していない両集団が存在していた. 以上から一つの仮定としてCD34陽性細胞が赤芽球への分化において, CD34の発現を失いCD34陰性細胞となり, その後CD36陽性CD45陽性細胞, さらにCD36陽性CD45陰性細胞に変

化することが考えられる。また今回 CD34 陰性細胞の培養でのみ CD61 の発現が認められた。これまでのシングルセルカルチャーの解析では CD61 と CD36 の発現の関係については明らかにされていない。今後の解析では両抗原の発現を同一サンプルで確認する予定である。形態の観察で巨核球様の細胞が認められた well もあり、これも現時点では仮定の域を出ないがシングルセルカルチャーで CD61 陽性細胞と巨核球様細胞が一致し、さらに赤芽球の分化も確認されるとすれば CD34 陰性細胞中に赤芽球と巨核球共通の前駆細胞の存在が疑われることとなり、この分化能を持った細胞の解明が求められる。

IL-7 レセプター陽性の小リンパ球様細胞に関しては CD34 陰性細胞を bFGF, BAFF, Wnt-3A 存在下に培養した際に認められるが、陽性細胞が極めて少数であったため純化細胞として回収することが困難で

あった。今後は培養系をサイズアップして純化細胞として採取できるように改良していきたい。またデータは示さなかったが、培養条件を検討したところ bFGF, BAFF, Wnt-3A のそれぞれを 1 種類ずつ欠いた培養ではどの条件でも IL-7 レセプター陽性細胞は認められず興味深い。今後さらなる検討が必要である。

細胞表面マーカー解析と増殖分化能を解析するのと並行して、培養開始時の CD34 陰性分画の細胞、培養後いくつかのポイントで回収した細胞をサンプルとして、mRNA の発現について RT-PCR で確認し、より詳細な分化過程の解析も行わないと真の解明にはつながらないと考えている。CD34, c-kit, survivin, TAL-1 (SCL), GATA-1, HOXB4, Bmi-1, globin, Epo-R, c-Mpl, Nanog, SSEA-1, Oct4 等の発現の違いについて培養前後の各分画での検討を行なう予定である。

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

HIF-1 α を分子標的とする卵巣癌治療へのアプローチ

研究代表者 安田 政実（埼玉医科大学 国際医療センター 病理診断科）

緒言

卵巣腫瘍を特徴付ける大きな要因に組織型の多彩さがある。このことは治療の個別化を計ることの困難さを招く一義的な要因と思われる。治療の中心は根治的手術であるが、腫瘍の完全摘出ができない場合は術後の化学療法が治療のポイントとなる。

上皮性卵巣腫瘍の一型である明細胞腺癌はしばしば化学療法抵抗性を示し、予後不良であることが知られている。1999-2001年のFIGO annual reportによると明細胞腺癌は全世界的に卵巣腫瘍の5～10%を占めると報告されているが、本邦では卵巣腫瘍全体の21.9%にも及ぶ¹⁾。卵巣腫瘍に対する現在の治療レジメンは患者の個々に対するテーラーメイド医療ではなく、ランダム化試験に基づいたスタンダードなものが適用されている。明細胞腺癌は予てから子宮内膜症との関連性が指摘されており、内膜症を背景として癌化することもしばしばみられる。内膜症を有する患者は定期的に外来受診、検査をすることが多いため、本腫瘍はIa～Ic期といった早期発見例が多い。そのため、進行例を除けば残存腫瘍径1 cm以下のoptimal surgeryが可能であるが、他の組織型に比較すると予後は不良である。明細胞腺癌の化学療法に対する低感受性は予後改善の大きなハードルとなっており、本症の治療において化学療法耐性の克服は重要な課題である^{2,3)}。

上皮性卵巣腫瘍に限らず、様々な悪性腫瘍において細胞の酸素供給は癌が生き延びるために重要な因子の一つであることが知られている。1992年にSemenzaとWangらにより初めて生体における酸素恒常性を司る因子として低酸素誘導因子Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) が報告され⁴⁾、1995年に単離・精製されて以来、分子レベルの研究が加速的に進み、癌の微小環境におけるHIF-1の機能が次々と明らかになってきた⁵⁾。HIF-1はヘリックススループヘリックス構造をもつ α サブユニット(HIF-1 α)と β サブユニット(HIF-1 β)から構成されるヘテロ二量体タンパクである。HIF-1 β は恒常的な核内タンパクであるのに対

し、HIF-1 α は正常組織において正常の酸素濃度分圧下ではプロテアソームによる分解を受けるため、ほとんど検出できない。この分解は402番目と564番目のプロリン残基が2-oxoglutarateを基質として水酸化され、ユビキチンE3リガーゼ複合体の仲介により、von Hippel Lindau 腫瘍抑制タンパク(VHL)がHIF-1 α の酸素依存性分解ドメインに結合することで生じる。しかし、一旦細胞が低酸素に暴露されるとHIF-1 α の転写活性領域のC末端側に位置するアスパラギン残基が水酸化を抑制するため、HIF-1 α のユビキチン化による分解が抑制され、安定化することで、HIF-1 α の急速な蓄積を生じることが明らかとなっている。その後、細胞質に蓄積したHIF-1 α はヒストン脱アセチル化酵素HDAC7(Histone-deacetylase 7)の結合により核内に移行し、 β サブユニットと二量体を形成した後、コアクチベーターであるCBP/p300との複合体を形成し、標的遺伝子Hypoxia responsive elements(HREs)に結合することで血管新生因子の代表格であるVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)や糖の能動輸送に関わるGlucose Transporter-1(GLUT-1)等の様々な増殖因子の転写を誘導する^{6,8)}。HIF-1によって直接発現が誘導される遺伝子は現在までに約60以上が報告されており、これらの遺伝子はプロモーター・エンハンサー領域にHIF-1結合配列(HREs)を有する。このようにHIF-1 α は組織の細胞濃度によりその発現が調節されることで、生体の恒常性の維持を司る。その後の研究からHIF-1 α は虚血性心疾患や低酸素脳症、さらには腫瘍の増殖・進展においても重要な役割を果たすことが明らかとなってきている。また、近年では酸素濃度に依存しないHIF-1 α の発現制御が報告されてきており、とりわけPI3K-Akt-mTORシグナル伝達経路によるHIF-1 α の制御が明らかになりつつあるが⁹⁾、その詳細な分子機構については知られていない。

mTOR(mammalian target of rapamycin)はマクロライド系抗生物質rapamycinの標的遺伝子として同定された、約290 kDaのセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞の分裂や成長、生存における調節因子と

しての役割を果たしており、とりわけ生体の生存能力を維持するための栄養素の利用に不可欠なものである。mTOR阻害剤であるrapamycinは主にリンパ球増殖抑制により免疫応答を阻害し、ラットにおいては腎臓および心臓移植拒絶反応を抑制することが示されている。rapamycinは細胞質タンパクFKBP12(FK506 binding protein)と複合体を形成し、リンパ球増殖に関与するキナーゼ活性を阻害する¹⁰⁾。mTORは生体の様々な機能に不可欠であることから、当初よりその薬剤の使用には懸念があったが、一定量の用量・用法であればこれらの副作用等は容認できるものと報告されている。また免疫抑制剤としての開発途中にはすでにヒト癌細胞株パネルに対する検討が行われており、一部の細胞株ではp53やPTEN等の癌抑制遺伝子の変異ヒト腫瘍細胞において高感受性であること¹¹⁾、さらに他の抗癌剤、とりわけ白金製剤の感受性を改善することが報告されているが、その詳細な作用機序については未だ不明である。さらに近年ではrapamycinがVEGFを介した血管新生の阻害効果を持つことが報告され、その阻害にHIF-1 α の仲介も判明した。Gubaらは免疫抑制に用いられている用量のrapamycinが癌転移モデルおよび腫瘍移植モデルにおいて著明な抑制効果を発揮し、その作用機序として血管内皮細胞の増殖および管腔形成を共に抑制することを報告している¹²⁾。すでにHIF-1の活性にはPI3K経路の関与が報告されているが、HudsonらはmTORがこの活性化経路において正の調節因子として働き、mTORの阻害によってHIF-1 α mRNAの翻訳が抑制されることを示している¹³⁾。これらの結果から、mTORがHIF-1 活性化経路の上流に位置すること、mTOR阻害による抗腫瘍効果にはHIF-1の抑制作用が関与することが推察される。

以上の背景、およびこれまでの我々の研究成果を足がかりにmTOR-HIF-1-VEGF経路の遮断による明細胞腺癌における新たな薬剤としてのrapamycinの可能性について探求した。すなわち、in vitroおよびin vivoにおける本薬剤の有効性について検討した。

材料・方法

・培養株

ヒト卵巣明細胞腺癌由来培養株細胞株RMG-1をin vitroおよびin vivo実験に供した。10% FBS (GIBCO社)と1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO社)を添加したHam's F-12 培地 (GIBCO社) 中にて、37°C・5% CO₂ 下において培養した。

・薬剤

everolimus (NOVARTIS社)をDMSO (Sigma社)を用いて溶解後、Ham's F-12 培地を溶媒とし、各濃度(0 nM, 80 nM, 100 nM)まで段階的に希釈した。

・動物

6週齢(雌)のBALB/c AJcl-nu/nu(日本クレア株

式会社)を1週間馴化飼育し、実験に供した。実験期間中はマウスを12時間の明暗サイクルで、滅菌済み固形飼料および水を自由に摂取させることにより飼育管理を行った。

・HIF-1関連因子の各タンパクおよびHIF-1 α 分解経路、アポトーシス関連因子の発現変化の解析

細胞に各濃度のeverolimusを投与し、回収したサンプルを2 μ g/ μ lの濃度に調整した。その後、10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、PVDF膜へ転写し、下記に示す抗体を用いてImmunoblottingを行った。各バンドから半定量的に各タンパクの発現量の変化について解析を行った。

・everolimusが細胞周期に与える影響についての解析

細胞に各濃度のeverolimusを投与し、6時間後に回収した。回収した細胞をスライドガラスに塗抹し、100%エタノールで固定した。その後、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を行い、Ki-67抗体[1:50 (DAKO社)]を用いて免疫組織化学酵素抗体間接法を行った。さらに顕微鏡下($\times 200$)にて陽性細胞数を計測し、その陽性率から増殖能の変化について解析を行った。

・everolimusが細胞の生存に与える影響についての検討

細胞に各濃度のeverolimusを投与し、6時間後に細胞を回収した。その後細胞液の一部を、トリパンブルー液を用いて染色し、血球計算板上で生細胞数の計測を行うことで、細胞の生存に対する影響について解析を行った。

・明細胞腺癌移植モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

先に示した条件で培養した細胞(1×10^7 cells / 0.2 ml)をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍体積が約150 mm³に達した時点よりeverolimusの投与を開始した。投与はカルボキシメチルセルロースで溶解したeverolimus (2.5 mg/kg)を経口投与し、その後経時的に観察を行った。

結 果

・everolimusが細胞死に与える影響についての検討(図1, 2)

非投与群に比較して投与群の細胞を観察したところ、細胞の形態に大きな変化は認められないものの、付着していた細胞は一部細胞死により培地中に浮遊している様子が観察された。同時に投与6時間後の細胞を回収し、トリパンブルー染色を用いて生細胞数について検討したところ、非投与群では 8.7×10^6 cells認めたが、投与群では 6.6×10^6 cellsと約25%の細胞死を認めた。

・everolimusが細胞増殖能に与える影響についての検討(図3, 4)

細胞増殖能を解析したところ、Ki-67 labeling indexは非投与群において17%であるのに比較して、

薬剤投与群においては11%と低下を認めた。

- everolimusによるHIF-1関連因子の各タンパクおよびHIF-1 α 分解経路, アポトーシス関連因子の発現変化の解析 (図5)

mTORの発現は非投与群, 投与群の両者で発現の変化を認めなかったものの, p-mTORの発現においては非投与群に比較して, 投与群では有意に発現の低下を認めた。また, mTORのエフェクター因子の発現について解析したところ, p-4E-BP1, HIF-1 α , VEGFの発現は非投与群に比較して, 投与群において著明な発現の低下を認めたが, GLUT-1の発現においては両者の間に発現の変化は認めなかった。一方で, HIF-1 α の分解系における薬剤の影響を解析したところ, HIF-1 α のユビキチンリガーであるVHLの発現は非投与群に比較して, 投与群において発現の増

加が認められた。さらに薬剤とアポトーシスの関連性の解析から, cleaved caspase-3の発現は非投与群に比較して, 投与群において発現の増大を認めた。

- 明細胞腺癌移植モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討 (図6)

本検討から薬剤投与群において57% (4/7) で腫瘍の縮小を認めた。とりわけ腫瘍縮小群の中でも50% (2/4) において腫瘍の消失を認め, 他の縮小群50% (2/4) においても腫瘍体積の60~70%の減量を認めた。一方, 非縮小群の中でも67% (2/3) は初回投与において腫瘍の縮小を認めたものの, 2回目以降は縮小傾向を認めず, 腫瘍体積は増大したことから, コントロール不能となった。また, 他非縮小群33% (1/3) においては投与以前より著明な壊死を認め, 初回投与時より縮小傾向は全く認められなかった。

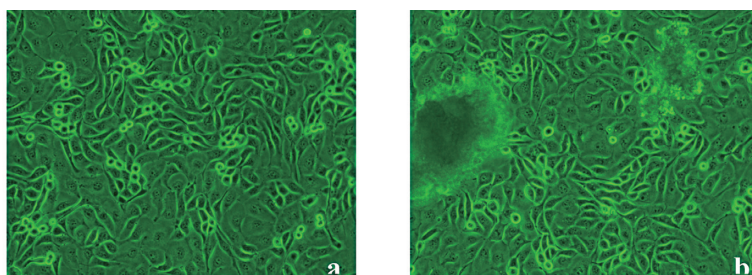


図 1. everolimusによる細胞の変化の様子. a: 非投与細胞 b: 投与細胞 (100nM, 6h)

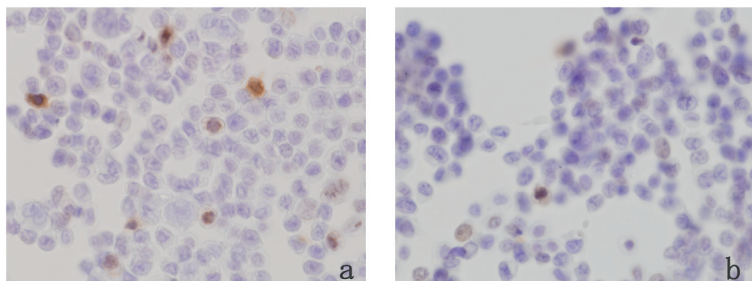


図 3. Ki-67 labeling Indexによるeverolimusが細胞増殖能に与える影響についての解析. a: 非投与細胞 b: 投与細胞 (100nM, 24h)

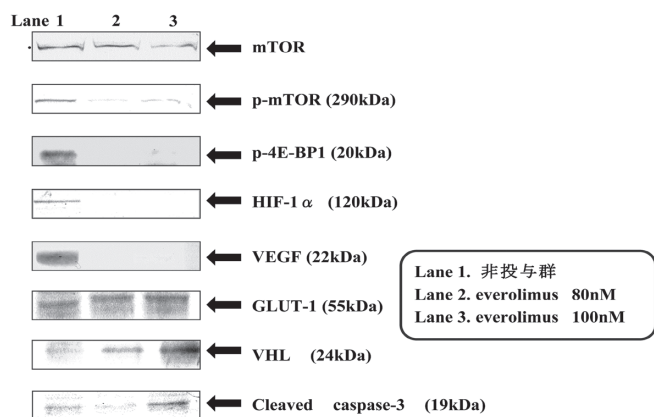


図 5. everolimusによるHIF-1 α 関連因子の各タンパクおよびHIF-1 α 分解経路, アポトーシス関連因子の発現変化。

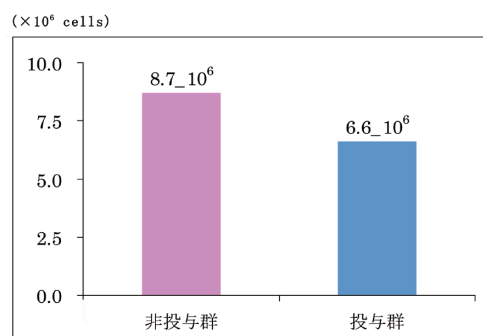


図 2. everolimusによる腫瘍細胞数の変化。

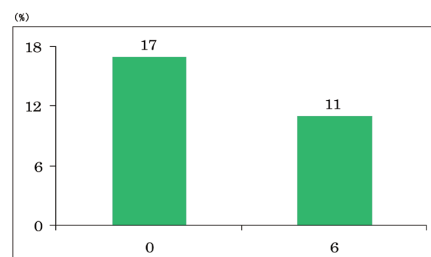


図 4. everolimusが細胞増殖能に与える影響についての解析。

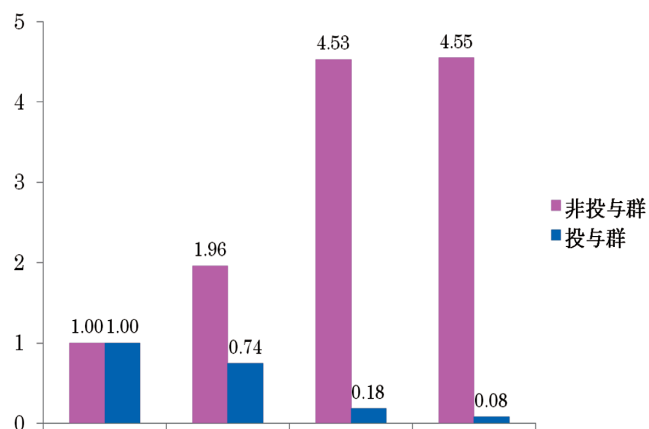


図 6. モデルマウスにおけるeverolimus投与による腫瘍体積の変化。

考 察

HIF-1 α は低酸素応答を通じた生体の恒常性の維持のみならず腫瘍の増殖、進展において重要な役割を担っていることが知られている。我々は現在までに上皮性卵巣腫瘍におけるHIF-1 α の発現解析から明細胞腺癌が他の組織型に比して発現が優勢であり、明細胞腺癌の予後不良因子の一つである可能性を報告してきた。近年、このHIF-1 α の発現制御にmTORの存在が報告され⁹⁾、実際に明細胞腺癌においてphosphorylated-mTORの発現が亢進しておりmTOR-HIF-1シグナル伝達の活性化が推察されたことから、mTOR阻害に力点を置いた明細胞腺癌および他の卵巣腫瘍患者への新たな治療法の確立を目指して検討を遂行してきた^{14,15)}。

悪性腫瘍は、無秩序な増殖能を有することで自らをより低酸素な環境へと導き、これに順応するために複雑な分子機構を発動しながら浸潤性に進展していくものと考えられる。低酸素環境下で機能する分子には多くの腫瘍に共通性があるが、一方で腫瘍間ないしは組織型間で、発現分子に程度の違いがあることが推察される。悪性腫瘍の微小環境は酸素やグルコースの濃度、pHなどにより位置づけられており、腫瘍細胞の旺盛な増殖が微小血管の新生を惹起するものの、形成される血管が未熟で分布が不十分なために容易に虚血領域が生じる。その結果として、悪性度の高い腫瘍では広範に出血や壊死 necrosis を来しやすい。低酸素下で発現する分子の代表として「低酸素誘導性因子 HIF-1」がある。HIF-1は低酸素状況に応じて、血管新生因子である VEGF やグルコースの能動輸送に関わる GLUT-1、あるいは赤血球増生を促す Erythropoietin (EPO) などを

誘導し個々の微小環境への適応を図っている^{6,8)}。

これまで我々は、「甲状腺腫瘍を対象にした GLUT-1 の発現解析」に端を発して「卵巣腫瘍における HIF-1 α とその関連因子の発現に着目した解析」を行ってきた。GLUT-1は甲状腺良性病変では基本的に発現しないのに対して、悪性腫瘍とりわけ乳頭癌において高度に発現することが認められ、臓器外進展とリンパ節転移にも密接に関わっていることを報告した¹⁶⁾。一方、上皮性卵巣腫瘍では、GLUT-1の発現がHIF-1 α によって概ね制御されており、これらの発現は乳頭状増殖を特徴とする漿液性腺癌および明細胞腺癌で顕著であることが明らかにされた¹⁷⁾。また、HIF-1 α とGLUT-1の発現は、腺腫・境界悪性・悪性へと腫瘍が進展するにしたがって増強し、その程度が粘液性腫瘍に比べて明らかに漿液性腫瘍で強いことを証明した¹⁸⁾。したがって、以上の結果から、HIF-1 α ・GLUT-1の発現は、良悪のみと関連するのではなく、組織型(腫瘍細胞の表現型)および増殖動態(胞巣構築・間質の多寡)に依存性が高いことが示唆された。さらに、免疫組織化学レベルでの半定量的結果を踏まえて、HIF-1 α の定量的解析を行い、「明細胞腺癌では他の組織型よりもHIF-1 α の発現量が多いこと」、「HIF-1 α の発現と腫瘍の大きさとの相関性は低いこと」、および「判定量的評価がほぼ定量的解析結果と合致していること」などを明らかにした¹⁹⁾。

昨今では治療に鑑みて、「低酸素環境下で発現する因子を抑制する薬剤の臨床応用」が漸次進行しつつある。なかでも、「第3の免疫抑制剤として注目されているマクロライド系抗生物質のラパマイシンに抗腫瘍効果がある」ことが近年明らかにされ、米国では既にラパマイシンの誘導体を用いた臨床試験での成果が発表されつつある。婦人科領域の腫瘍では子宮内膜癌での臨床応用が米国で試験的に進められている。すなわち、低酸素下でのHIF-1 α の活性化には、ラパマイシン標的タンパクmTORが正の調節因子として機能していることから、mTORを阻害することによるHIF-1 α の抑制作用が期待されている。その根拠に、ラパマイシンが癌転移・腫瘍移植モデルにおいて血管内皮の増殖抑制があげられている¹²⁾。我々が行った卵巣明細胞癌再発株を用いた予備実験でも、ラパマイシンによってHIF-1 α およびVEGFの抑制が確認された。これを基に、明細胞腺癌ではリン酸化されたmTOR(phosphorylated-mTOR)が優勢に発現していることを発見し、さらにはラパマイシンの抗腫瘍効果をin vitroおよびin vivoで証明した^{14,15)}。

卵巣上皮性悪性腫瘍のなかでも従来の抗癌剤に抵抗性が高く、予後が相対的に不良で、かつ日本人に多いとされる明細胞腺癌を、「HIF-1 α と関連分子の発現」において特徴付けられたことは、今後の治療戦略の切り口になり得ると思われる。in vitroでの検討・動物移植腫瘍片での解析結果は、ラパマイシンが明細胞腺癌においても有効な薬剤であり得ることを示唆している。



図 7. モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討。
(著効例) a: 投与前 b: 著効例

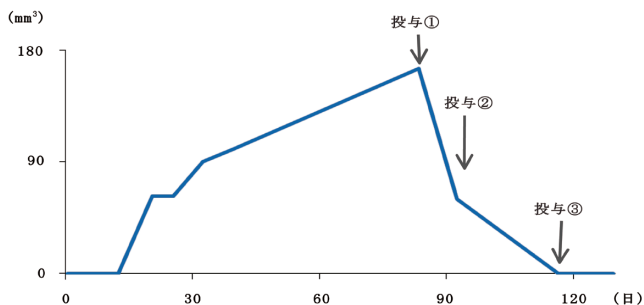


図 8. モデルマウスにおける everolimus 投与による腫瘍体積の変化。

先述のように、ラパマイシンの抗腫瘍効果を期待して、既に幾つかの固形腫瘍を対象にした臨床治験が米国を中心に行われ、その成果が認められている。しかしながら、本邦では卵巣腫瘍のみならず、実験的モデルレベルからの臨床応用可能なevidenceの報告には至っていない。本研究は、「本来、個別に行われるべき治療戦略の選択・決定に対しての病理的情報提供」を視野においたもので、我々の検討はHIF-1 α とその下流にある分子が包括的な治療標的になりうるか否かを解析するという点で独創的であるとともに、国際的臨床研究に大きく貢献できるものと確信する。

参考文献

- 1) Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 2000;88:2584-9.
- 2) Itamochi H, Kigawa J, Sugiyama T, Kikuchi Y, Suzuki M, Terakawa N. Low proliferation activity may be associated with chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol* 2002;100:281-7.
- 3) Itamochi H, Kigawa J, Akeshima R, Sato S, Kamazawa S, Takahashi M, Kanamori Y, Suzuki M, Ohwada M, Terakawa N. Mechanisms of cisplatin resistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Oncology* 2002;62:349-53.
- 4) Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol cell Biol* 1992;12:5447-54.
- 5) Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7.
- 6) Semenza GL. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol* 2006;91:803-6.
- 7) Semenza GL. Regulation of tissue perfusion in mammals by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol* 2007;92:988-91.
- 8) Ikeda E. Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. *Pathol Int* 2005;55:603-10.
- 9) Pore N, Jiang Z, Shu HK, Bernhard E, Kao GD, Maity A. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1 α expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol Cancer Res* 2006;4:471-9.
- 10) Chiu MI, Katz H, Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12574-8.
- 11) Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes dev.* 2000;14:34-44.
- 12) Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Janch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002;8:128-35.
- 13) Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002;22:7004-14.
- 14) Fujita M, Yasuda M, Kitatani K, Miyazawa M, Hirabayashi K, Takekoshi S, Iida T, Hirasawa T, Murakami M, Mikami M, Ishiwata I, Shimizu M, Osamura RY. An up-to-date anti-cancer treatment strategy focusing on HIF-1 α suppression: its application for refractory ovarian cancer. *Acta Histochem Cytochem* 2007;40:139-42.
- 15) Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, Kajiwar H, Hirabayashi K, Takekoshi S, Hirasawa T, Murakami M, Ogane N, Kiguchi K, Ishiwata I, Mikami M, Osamura RY. Therapeutic strategy targeting at mTOR-HIF-1 α -VEGF pathway for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Pathol Int* 2009;59:12-27.
- 16) Yasuda M, Ogane N, Hayashi H, Kameda Y, Miyagi Y, Iida T, Mori Y, Tsukinoki K, Minematsu T, Osamura Y. Glucose transporter-1 expression in the thyroid gland: clinicopathological significance for papillary carcinoma. *Oncol Rep* 2005;14:1499-504.
- 17) Yasuda M, Miyazawa M, Fujita M, Kajiwar H, Iida T, Hirasawa T, Muramatsu T, Murakami M, Mikami M, Saitoh K, Shimizu M, Takekoshi S, Osamura RY. Expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and glucose transporter-1 (GLUT-1) in ovarian adenocarcinomas: difference in hypoxic status depending on histological character. *Oncol Rep* 2008;19:111-6.
- 18) Iida T, Yasuda M, Miyazawa M, Fujita M, Osamura RY, Hirasawa T, Muramatsu T, Murakami M, Saito K,

Mikami M. Hypoxic status in ovarian serous and mucinous tumors: relationship between histological characteristics and HIF-1 α /GLUT-1 expression. Arch Gynecol Obstet 2008;277:539-96.

- 19) Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, Hirasawa T, Kajiwar H, Hirabayashi K, Ogane N, Shimizu M, Asanuma H, Murakami M, Takekoshi S, Mikami M, Osamura RY. Association of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) expression with histology in epithelial ovarian tumors: A quantitative analysis of HIF-1. Arch Gynecol Obstet 2008 (in press).

研究成果

論文

- 1) Kajiwar H, Kumaki N, Hirabayashi K, Miyazawa M, Nakamura N, Hirasawa T, Muramatsu T, Mikami M, Yasuda M, Osamura RY. A case of oncocyctic carcinoma of the endometrium. Arch Gynecol Obstet 2009;279:733-8.
- 2) Kajiwar H, Hirabayashi K, Miyazawa M, Nakamura N, Hirasawa T, Muramatsu T, Mikami M, Yasuda M, Osamura RY. Immunohistochemical expression of somatostatin type 2A receptor in neuroendocrine carcinoma of uterine cervix. Arch Gynecol Obstet, 2009;279:521-5.
- 3) Hirabayashi K, Yasuda M, Kajiwar H, Itoh J, Miyazawa M, Hirasawa T, Muramatsu T, Murakami M, Mikami M, Osamura RY. Alterations in mucin expression in ovarian mucinous tumors: immunohistochemical analysis of MUC2, MUC5AC, MUC6, and CD10 expression. Acta Histochem Cytochem 2008;41:15-21.
- 4) Yasuda M, Miyazawa M, Fujita M, Kajiwar H, Iida T, Hirasawa T, Muramatsu T, Murakami M, Mikami M, Saitoh K, Shimizu M, Takekoshi S, Osamura RY. Expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and glucose transporter-1 (GLUT-1) in ovarian adenocarcinomas: difference in hypoxic status depending on histological character. Oncol Rep 2008;19:111-6.
- 5) Iida T, Yasuda M, Miyazawa M, Fujita M, Osamura RY, Hirasawa T, Muramatsu T, Murakami M, Saito K, Mikami M. Hypoxic status in ovarian serous and mucinous tumors: relationship between histological characteristics and HIF-1 α /GLUT-1 expression. Arch Gynecol Obstet 2008;277:539-46.
- 6) Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, Hirasawa T, Kajiwar H, Hirabayashi K, Ogane N, Shimizu M, Asanuma H, Murakami M, Takekoshi S, Mikami M, Osamura RY. Association of hypoxia-inducible

factor-1 (HIF-1) expression with histology in epithelial ovarian tumors: A quantitative analysis of HIF-1. Arch Gynecol Obstet 2008 (in press).

- 7) Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, Kajiwar H, Hirabayashi K, Takekoshi S, Hirasawa T, Murakami M, Ogane N, Kiguchi K, Ishiwata I, Mikami M, Osamura RY. Therapeutic strategy targeting at mTOR-HIF-1 α -VEGF pathway for ovarian clear cell adenocarcinoma. Pathol Int 2009;59:19-27.
- 8) Hirabayashi K, Yasuda M, Kajiwar H, Nakamura N, Sato S, Nishijima Y, Mikami M, Osamura RY. Clear cell adenocarcinoma arising from adenomyosis: A case report. Int J Gynecol Pathol. 2008 (in press).
- 9) Mori Y, Tsukinoki K, Yasuda M, Miyazawa M, Kaneko A, Watanabe Y. Glucose transporter type 1 expression are associated with poor prognosis in patients with salivary gland tumors. Oral Oncol 2007;43:563-9.
- 10) Fujita M, Yasuda M, Kitatani K, Miyazawa M, Hirabayashi K, Takekoshi S, Iida T, Hirasawa T, Murakami M, Mikami M, Ishiwata I, Shimizu M, Osamura RY. An up-to-date anti-cancer treatment strategy focusing on HIF-1 α suppression: its application for refractory ovarian cancer. Acta Histochem Cytochem 2007;40:139-42.
- 11) Yasuda M, Shimizu M, Fujita M, Miyazawa M, Tang X, Kajiwar H, Osamura RY, Shoji S, Tokunaga M, Terachi T. Usefulness of hypoxia inducible factor-1 α in evaluating the prostatic adenocarcinoma viability following neoadjuvant hormone therapy. Cancer Detect Prev 2007;31:396-401.

学会発表

1. Masanori Yasuda, Shinichi Hori, Masaki Miyazawa, Hiroshi Kajiwar, Naoki Ogane, Michio Shimizu. Activated status of mTOR-HIF-1 α -VEGF pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. 98th Annual meeting of United States and Canadian Academy of Pathology, March 7-13, 2009, Boston.
2. 安田政実, 藤田麻里子, 宮澤昌樹, 平林健一, 梶原博, 平澤猛, 村松俊成, 村上優, 三上幹男. 卵巣明細胞腺癌・漿液性腺癌におけるHIF-1 α 活性化経路の探索. 第44回日本婦人科腫瘍学会学術集会. 平成20年7月17～19日. 名古屋.
3. 宮澤昌樹, 藤田麻里子, 梶原博, 平林健一, 平澤猛, 西島義博, 村松俊成, 村上優, 浅沼秀樹, 大金直樹, 槻木恵一, 木口一成, 安田政実, 長村義之. 卵巣明細胞腺癌におけるmTOR-HIF-1 α 経路抑制による抗腫瘍効果の検討. 第97回日本病理学会総会. 平成20年5月15～17日. 金沢.

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

医師の診療活動記録・解析システムの構築

代表研究者 菅野 義彦(埼玉医科大学 医学教育センター)

分担研究者 椎橋 実智男*

緒言

近年医学教育における変革が進んでいるが、臨床診療活動についても従来の大学病院の体制では対応できない事が起こりつつある。特に平成16年度から導入された新医師初期臨床研修制度では本学大学病院でも年間30名程度の研修医を受け入れているが、かれらは従来の大学講座や診療科、医局といった人事単位に所属せずに病院内をローテートするため、研修委員会がEPOC(Evaluation system of Postgraduate Clinical training-オンライン臨床研修評価システム)などを用いてその臨床活動を管理しているものの、現実にはその正確な研修内容を把握することは困難である。従来大学病院においては卒業生がそのまま母校で研修を続けることが多かったため、必ずしも研修施設としての実績や評価を客観的なデータで示す必要はなく、在学中を含めた主観的な印象をもとに評価されることが多かった。しかしながらマッチングシステムの導入により、全国の研修医療機関と同列に比較を受けることになったため、大学病院がどれだけの臨床経験を提供することができるかということを客観的かつ正確に把握し、これを公開する必要性が生じている。本学大学病院は国内でも希有の大きな病床数(1185床)を誇り、年間約2万人の入院患者、5万人の外来患者と大学病院としては群を抜いた臨床経験を提供できるにもかかわらず、病歴管理などの面で機械化、合理化に遅れており、患者数や診療数などの客観的なデータが必ずしも各部署で有効に活用されているとはいえなかった。こうした情報提示が不十分であることも、当院での臨床研修志望者に他大学出身者が少ない理由のひとつと考えられる。平成17年度に電子カルテシステムが導入されたことを契機として臨床活動の記録が電子データ化しやすくなったものの、臨床診療活動を個人別、診療科別に解析するには至っておらず、今後研修医療機関として全国から優秀な人材を確保するためには、本

学大学病院での臨床研修でどれだけの臨床経験を提供できるかということを明確に公表して、本来受けるべきである研修施設としての高い評価を得る必要がある。

本研究においては電子カルテシステムに蓄えられている豊富なデータを用いて、本学大学病院における臨床研修で提供できる臨床経験を客観的かつ正確な情報として全国に公表するために、あらたなデータベースシステムを確立し、現在の教職員に大きな負担をかけることなく、これらのデータを収集、解析、呈示する方法およびシステムの確立を目標とする。

材料と方法

診療データの抽出

診療情報管理室に診療情報二次使用申請の手続きを行い、埼玉医科大学電子カルテシステムより初期臨床研修医の研修期間における診療記録を抽出した。すべての診療記録から入院要約の担当医の項目に研修医名が記載されている症例を経験症例として研修医個人別のファイルを作成した。

データベースシステムの作成

新医師初期臨床研修制度では、研修期間に経験すべき症例はカテゴリー別になっているが、実際の傷病名は多岐にわたり、そのカテゴリーと傷病名をリンクさせるデータベースの構築が必要である。今回マイクロソフト社の表計算ソフト、エクセル2007のマクロ機能を用い、研修期間に経験した傷病名をデータベースに照合し、経験症例をカウントするシステムを構築した。

データベースシステムの構築

カテゴリー化された傷病名と経験した傷病名をリンクさせる際に、部分一致を用いることにより、データベースをより容易に構築できる工夫を行った。具体的には、「痴呆」のキーワードのみで「アルツハイマー性痴呆」、「脳血管性痴呆」などを同時にカウントできるようにした。また電子カルテ上の疾患名は6疾患まで

*埼玉医科大学 医学情報施設

記載可能となっているが、このうち一番目と二番目に記載された疾患名を経験疾患としてカウントした。これにより実際の経験症例数を超えた疾患経験数がカウントされることになるが、総症例数を付記することにより実際の経験症例数を把握できるようにした。

傷病名のカテゴリー化は厚生労働省が初期臨床研修において経験目標とした疾患表をもとに、当院での診療の現状を加味して項目名などを調整して作成した。

集計システムの構築

研修医個人の経験症例数は個別のエクセルシートとして出力されるが、これを串刺し集計することにより診療科の研修内容、研修プログラム自体の評価にもデータを供出できるよう、前研修医の平均経験症例数なども算出できるようにシステムを作成した(図)。

結 果

データベースシステムの構築

マイクロソフトエクセルのマクロ機能を用いて、電子カルテ内の情報から研修期間に担当した患者の疾患群別症例数をほぼ自動的に集計できるシステムを構築した。表に示すとおり、厚生労働省が初期臨床研修制

度の経験目標と定めた疾患群をもとに、重複なく分類しやすいように修正を加えた。

19年度初期臨床研修の診療経験

表は当院の19年度初期臨床研修医30名が二年間に当院で経験した症例の疾患群別平均数を示す。国際医療センター、総合医療センターなど院外での診療経験は含まれていない。その結果埼玉医科大学病院が診療の中心となっている呼吸器疾患、消化器疾患、腎尿路疾患、産婦人科疾患、内分泌疾患、感染症の領域では平均経験数が10例以上であり、充実した研修を送っているものと考えられた。また入院要約を経験数カウントの元データとしたために、入院期間が比較的長く、1-2ヶ月の研修期間内に退院数が少ないと思われる血液、精神神経科領域では平均経験数は5例以下となっているが、これは実際の診療経験を示していない可能性がある。

考 察

これまでに医師の臨床経験を評価することは非常に困難とされてきたため、こうした分野に関する研究はほとんど行われていない。またごく一部の医師が自ら

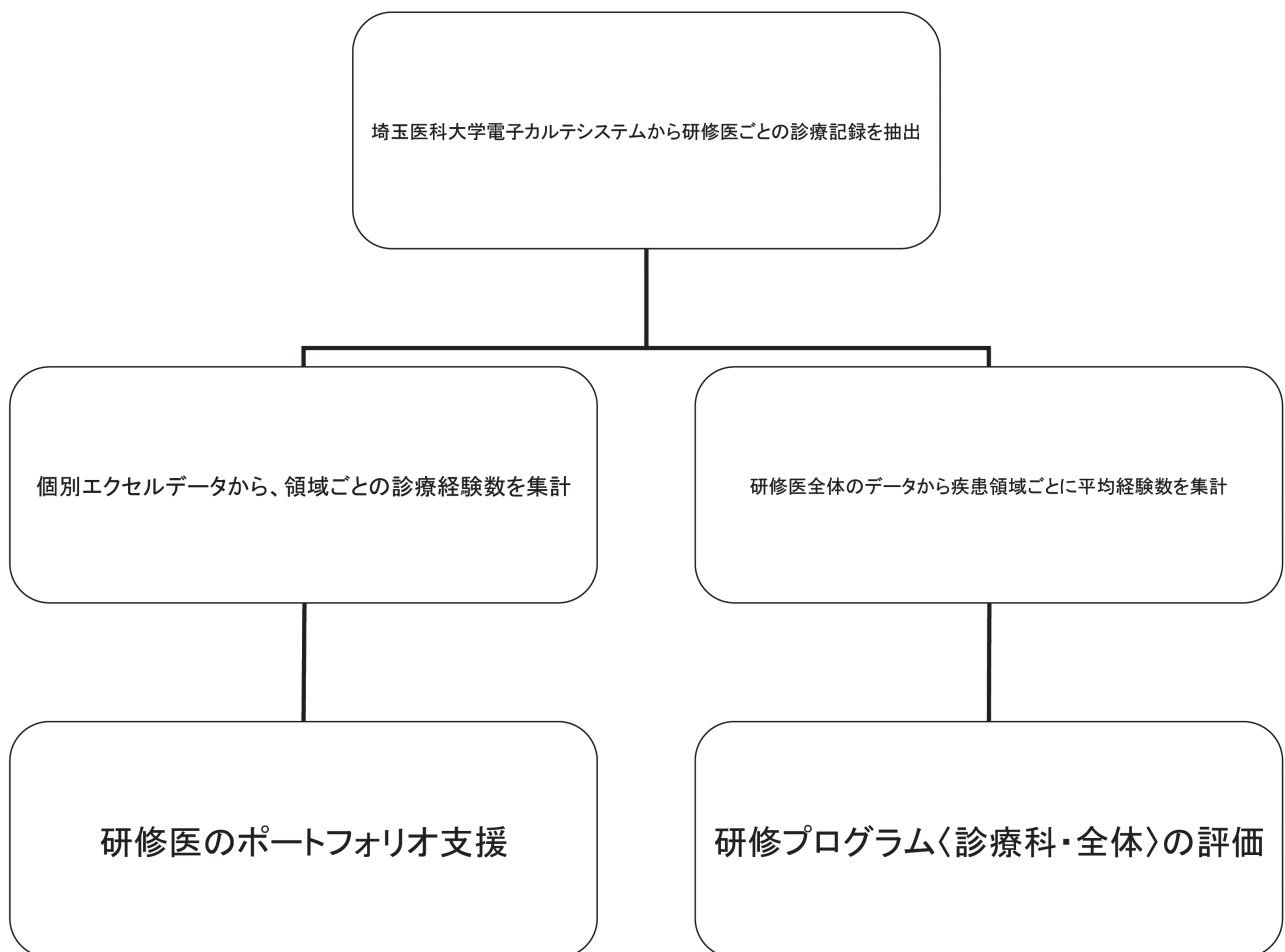


図.

は自らの医師としての診療経験をきちんと記録、整理するための有用なシステムが皆無であることによる。また医師の所属する組織においても、その医師の診療経験を把握することは、診療活動の充実、さらに教育システムの整備にとって非常に有用となる。これを臨床研修に応用するとすれば、当院での研修システムにより到達する目標を観念的な理想像だけではなく、どの診療科でどの疾患を何例経験したか、どういう手技を何回経験したかといった客観的なデータとして呈示することが可能である。現状では教育機関、研修施設としての評価法が定まっていないために、施設としてのランク付けにも明らかな根拠がないが、今後はこうした客観的なデータでの情報開示が評価法に必ず加わってくるものと予想される。その際に正確なデー

研修医名	
研修期間	
受持ち総症例数	182.0 例

系列	分類	経験症例数	うち小児
(9)	妊娠分娩と生殖器疾患		
-1	妊娠分娩（正常妊娠、流産、早産、正常分娩、産科出血、乳腺炎、産褥）	20.9	
-2	女性生殖器及びその関連疾患（月経異常〔無月経を含む。〕、不正性器出血、更年期障害、外陰・陰・骨盤内感染症、骨盤内腫瘍、乳腺腫瘍）	12.2	
-3	男性生殖器疾患（前立腺疾患、勃起障害、精巣腫瘍）	2.1	
(10)	内分泌・栄養・代謝系疾患		
-1	視床下部・下垂体疾患（下垂体機能障害）	1.2	
-2	甲状腺・副甲状腺疾患	2.2	
-3	腎臓疾患	0.4	
-4	糖代謝異常（糖尿病、糖尿病の合併症、低血糖）	9.6	
-5	高脂血症	0.6	
-6	蛋白及び核酸代謝異常（高尿酸血症）	0.1	
(11)	眼・視覚系疾患		
-1	屈折異常（近視、遠視、乱視）	0.0	
-2	角膜炎・結膜疾患	0.0	
-3	水晶体疾患（白内障）	0.0	
-4	網膜疾患	0.1	
-5	緑内障、高血圧・動脈硬化による眼圧変化	0.0	
-6	その他	0.6	
(12)	耳鼻・咽喉・口腔系疾患		
-1	難聴をきたす疾患	0.1	
-2	めまいを生ずる耳疾患	0.3	
-3	鼻・副鼻腔の炎症性疾患	0.3	
-4	鼻出血	0.0	
-5	咽頭・喉頭の炎症性疾患	2.5	
-6	その他	0.0	
(13)	精神・神経系疾患		
-1	症状性・器質性精神障害	0.2	
-2	物質使用による精神障害	0.3	
-3	統合失調症・妄想性障害	1.5	
-4	気分感情障害	1.0	
-5	神経症障害	0.8	
-6	躁うつ病・不眠症	0.4	
-7	その他	0.2	
(14)	感染症		
-1	ウイルス感染症（インフルエンザ、麻疹、風疹、水痘、ヘルペス、流行性耳下腺炎）	2.3	
-2	細菌感染症（ブドウ球菌、MRSA、A群レンサ球菌、クラミジア）	4.0	
-3	結核	1.0	
-4	真菌感染症（カンジダ症）	0.5	
-5	性感染症	0.0	
-6	寄生虫疾患	3.2	
(15)	免疫・アレルギー疾患		
-1	全身性エリテマトーデスとその合併症（全身性結合組織疾患）	1.2	
-2	慢性関節リウマチ（炎症性多発関節炎）	2.2	
-3	アレルギー疾患	2.2	
(16)	物理・化学的因子による疾患		
-1	中毒（アルコール、薬物）	1.2	
-2	アナフラキシー	0.2	
-3	環境要因による疾患（熱中症、寒冷による障害）	0.0	
-4	熱傷	0.1	
(17)	小児疾患		
-1	染色体異常・遺伝疾患	0.2	
-2	新生児疾患	0.9	
分類不能	アルコール性せん妄、赤痢、慢性けいこ、腎臓炎、高カリウム血症、腸管内出血の疑い、腎臓腎炎、壊疽、長時間尿閉症候群、髄膜炎の疑い、ギランバレー症候群、鼻出血、鼻淵、胆道感染、帯状疱疹、急性腎臓不全、呼吸性アシドーシス、心不全等症、急性虫歯病、結核菌肺結核の疑い、皮膚病（接触性アレルギー）、非典型性アルファドリンゲ症、不明熱、高カルシウム血症、顔生複製増殖、持続性くも膜下出血、術後脳浮腫、急性小脳萎縮症、心収縮多数症の疑い、閉塞性虚脱、特異性多発性。	22.3	

タを呈示できないことは、研修施設としての機能を疑われる可能性すらある。現在電子カルテによって診療情報の磁気データ化が飛躍的に進歩しつつあり、患者および医師の個人情報に注意をしながらこれを連携させることにより、従来の紙ベースの診療情報からのデータ化よりも簡便かつ正確に行うことが可能である。

今回のシステム構築により、まずは初期臨床研修医、後期臨床研修医、そして段階的に本学大学病院での個々の医師の診療経験がデータベース化されれば、2年間の研修での目標到達度や、何年間の研修によりどのような症例をどれだけ経験したか、またカンファレンスなどの記録を応用して、診療内容を検討報告する機会をどれだけ提供されているか、についての解析が可能になる。そしてこの結果本学大学病院の教育システムおよび研修施設としての機能を自ら評価し、改善の重要な指標になることは間違いない。とくに今後全国の医療機関が後期研修施設としての名乗りを上げてくることになるが、その際に客観的な評価指標としては症例の経験数の他、専門医制度に対する取り組

みなど、これまで診療科ごとに取り扱われ、施設全体としては協議されなかったような項目が非常に重要になる可能性が高い。こうしたデータを現時点から準備することは、他施設との差別化においてきわめて有利に働くと思われる。また卒前臨床実習にもクリニカルクラークシップ制の導入という大きな変革の流れがあるが、本学ではすでに臨床実習において学生の電子カルテシステム使用を開始しているため、解析項目の変更によりこれにも対応が可能である。

データベース構築が予定よりも遅れたために終了時の報告内容は十分なものではないが、今後研修医数の増加につれ解析データも膨大化するため、徐々に自動化機能を付加するとともに経験症例以外の診療経験もデータベース化できるよう本研究を継続してゆきたい。

研究成果リスト(論文, 学会発表, 特許出願等)

研究終了時には未発表。報告書内容を中心に第42回医学教育学会および第30回医療情報学連合大会で発表予定。

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

乏突起膠腫の診断と治療反応性の予測に有用な
分子マーカーの探索

研究代表者 安達 淳一（埼玉医科大学 医学部 脳神経外科）

研究分担者 西川 亮*, 松谷 雅生*

緒 言

乏突起膠腫 (oligodendroglioma) 及び退形成性乏突起膠腫 (anaplastic oligodendroglioma) の原発性脳腫瘍の中における頻度は「脳腫瘍全国集計調査報告書 (10版)」によると1.2%で、神経膠腫 (glioma) に占める頻度は4.7%である¹⁾。米国の脳腫瘍登録 (CBTRUS; The Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994) では原発性脳腫瘍の3.2%, 神経膠腫の6.6%と報告されている²⁾。

最近の遺伝子解析技術は本腫瘍の分子病理学に画期的な知見をもたらした。すなわち、oligodendrogliomaではastrocytic tumorと異なりTP53遺伝子異常の頻度が少ない(<10%)こと、染色体1p, 19qの欠失が約40~80%に見られるということである³⁾。そして、この染色体1pと19qが同時に欠失しているoligodendrogliomaは予後が良いと言われている⁴⁾。

しかしながら、1pと19qの共欠失しているoligodendrogliomaの中には早期に再発をきたすものもある。そのような腫瘍に特徴的な染色体・遺伝子異常を見い出すため本研究を行った。

材料と方法

2000年以降現在まで、当科で治療を行った染色体1p及び19q lossを認めるoligodendroglioma (OL) 6例, anaplastic oligodendroglioma (AO) 8例を対象とした (Table 1)。治療は摘出手術の後に、初期治療として全例で放射線照射 (60Gy) と化学療法 (ACNU + VCR + Procarbazineを8コース) を行った。OL2例とAO2例が初期治療中ないし終了直後に再発を来した。これらの腫瘍に対して、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法とCGH (Comparative genomic hybridization)-Arrayを用いたゲノムワイドな手法で遺

* 埼玉医科大学 医学部 脳神経外科

伝子異常の解析を施行した。FISHのprobeとしては、1p (1p36.3), 19q (19q13.3), EGFR (7p12), 10q (10q23.3) 上のprobeをBacterial artificial chromosome (BAC) からNick translation法を用いて作成した。CGH-Array法についてはGenoSensor Array 300 (Vysis)を用い、再発4例中3例と、非再発ではOL3例とAO2例に施行した。また、EGFRタンパク質の発現に関しては免疫組織染色も行った。

結 果

再発OL, AOとも全例でEGFR遺伝子の増幅が見られた (Table 2, 3, Fig.1, 3)。しかし、この内でEGFRの免疫染色で明らかに陽性を呈した例は2例であった (Fig.2, Table 4)。また、再発AOの2例とも染色体10qのlossを認めた (Fig.2, Table 4)。これらの異常は非再発OLやAOでは見られなかった。

考 察

形態的に典型的な1p及び19q lossを有するoligodendrogliomaであっても、EGFR遺伝子増幅や10q lossなどのGlioblastomaで多く見られる遺伝子異常を持つ症例が早期に再発するものと思われ、このような症例は注意深いフォローアップが必要と思われた。現在、さらに症例を集積し統計学的解析を行う予定である。

FISH法は免疫染色で判然としないEGFR遺伝子の微妙な増幅を検出できる優れた方法であった。

文 献

- 1) The Committee of Brain Tumor Registry of Japan : Report of brain tumor registry of Japan (1969-1993), Neurologia Medico-chirurgica, 40 (Suppl), 2000.
- 2) Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG.

Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: Results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994, *Neuro-Oncology* 1 : 14-25,1999.

- 3) Reifenberger G, Kros JM, Louis DN, Collins VP: Oligodendroglioma. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK(eds), Lyon, IARC Press, 2007.
- 4) Kleihues P, Cavenee WK (eds) : Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon, IARC Press, 2000.

研究成果リスト

- Matsutani M, Adachi J and Nishikawa R. MRI findings of oligodendroglioma tumors. 5th. Meeting of the Asian Society for Neuro-oncology, Istanbul, Turkey. November 4, 2007.
- Adachi J, Uemiyama N, Totake K, Mishima K, Suzuki T, Matsutani M and Nishikawa R. Genetic profile in 1p- and 19q-deleted oligodendroglioma with short relapse-free survival. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Hakodate, Japan. June 10, 2008.

Table 1. Oligodendrogliomas with 1p and 19q chromosomal loss

Cases	Age (Y)	Sex	Site	% of removal	Outcome	OS (mo)	PFS (mo)
OL-1	62	Male	Lt. frontal	50	PD	48	35
OL-2	61	Male	Blt. frontal	70	ST	37	36
OL-3	25	Female	Lt. frontal	95	CR	26	25
OL-4	33	Male	Lt. frontal	80	PD	31	23
OL-5	52	Male	Lt. frontal	90	ST	28	27
OL-8	41	Male	Lt. parietal	20	ST	15	15
AO-1	62	Male	Rt. frontal	95	ST	84	83
AO-2	64	Male	Lt. frontal	95	PD	35	12
AO-3	47	Female	Rt. frontal	100	CR	63	62
AO-4	42	Male	Lt. frontal	100	CR	69	68
AO-6	46	Male	Rt. frontal	95	PD	27	20
AO-7	27	Male	Rt. frontal	100	CR	15	14
AO-8	45	Female	Rt. frontal	90	ST	9	8
AO-9	42	Female	Lt. parietal	30	ST	7	6

OL: Oligodendroglioma grade 2 AO : Anaplastic oligodendroglioma

 Recurrent cases

Table 2. OL cases

Genosensor Report (287 of 287 targets)					
	Name	Location	Mass Ratio Mean	CV(%)	Mean Ref (c/s)
OL-1	IL6	7p21	1.07	0.8	133.8
	EGFR	7p12.3-p12.1	1.34	4.4	214.2
	EGR2	10q21.3	1.07	2.1	287.7
	PTEN	10q23.3	0.99	2.1	59.9
	FGFR2	10q26	1.12	1.6	237.9
	DMBT1	10q25.3-q26.	1.17	0.9	230
OL-2	IL6	7p21	1.06	1.1	181.9
	EGFR	7p12.3-p12.1	1.02	3	178.7
	EGR2	10q21.3	1.01	2.9	279.3
	PTEN	10q23.3	0.99	0.9	72.7
	FGFR2	10q26	1.08	5.1	272.6
	DMBT1	10q25.3-q26.	1.06	0.9	260.5
OL-3	IL6	7p21	0.98	2.8	61.8
	EGFR	7p12.3-p12.1	1.11	2.3	78.4
	EGR2	10q21.3	1.1	2.9	95.6
	PTEN	10q23.3	0.98	3.1	28.6
	FGFR2	10q26	1.12	2.1	129.9
	DMBT1	10q25.3-q26.	1.17	1.2	145.9
OL-4					
OL-5	IL6	7p21	1	0.4	169.6
	EGFR	7p12.3-p12.1	0.99	0.6	420
	EGR2	10q21.3	0.94	2.1	393.1
	PTEN	10q23.3	0.97	4.3	107.8
	FGFR2	10q26	1.01	0.5	292.6
	DMBT1	10q25.3-q26.	1.08	0.7	366.3

- Adachi J, Uemiya N, Totake K, Mishima K, Suzuki T, Matsutani M, Nishikawa R. Genetic profile in 1p-and 19q-deleted oligodendroglioma with short relapse-free survival. 8th. Congress of the European Association for Neuro-Oncology (EANO), Barcelona, Spain. September 13, 2008.

Table 3. AO cases

Genosensor Report (287 of 287 targets)					
	Name	Location	Mass Ratio Mean	CV(%)	Mean Ref (c/s)
AO-2	IL6	7p21	1.03	1.4	113.5
	EGFR	7p12.3-p12.1	10.09	6.2	162.7
	EGR2	10q21.3	0.86	0.3	177.4
	PTEN	10q23.3	0.67	1.5	43.9
	FGFR2	10q26	0.72	1.8	226.1
	DMBT1	10q25.3-q26.	0.82	0.5	239.5
AO-6	IL6	7p21	1.08	4.7	27.4
	EGFR	7p12.3-p12.1	1.47	4.9	107.1
	EGR2	10q21.3	1.27	2.8	38.6
	PTEN	10q23.3	0.53	7.8	147.2
	FGFR2	10q26	1.07	7.3	60.5
	DMBT1	10q25.3-q26.	1.24	1.5	88.2
AO-8	IL6	7p21	1.36	1.3	124.2
	EGFR	7p12.3-p12.1	1.34	1	195.4
	EGR2	10q21.3	0.96	1.7	263.8
	PTEN	10q23.3	0.98	1.1	46.9
	FGFR2	10q26	1.02	0.2	222
	DMBT1	10q25.3-q26.	1.09	0.6	257.1
AO-9	IL6	7p21	0.98	1.8	185.2
	EGFR	7p12.3-p12.1	1.08	0.8	301.8
	EGR2	10q21.3	0.94	1.9	294.5
	PTEN	10q23.3	0.99	1.8	55.3
	FGFR2	10q26	0.92	0.9	285.2
	DMBT1	10q25.3-q26.	0.99	0.8	360.1

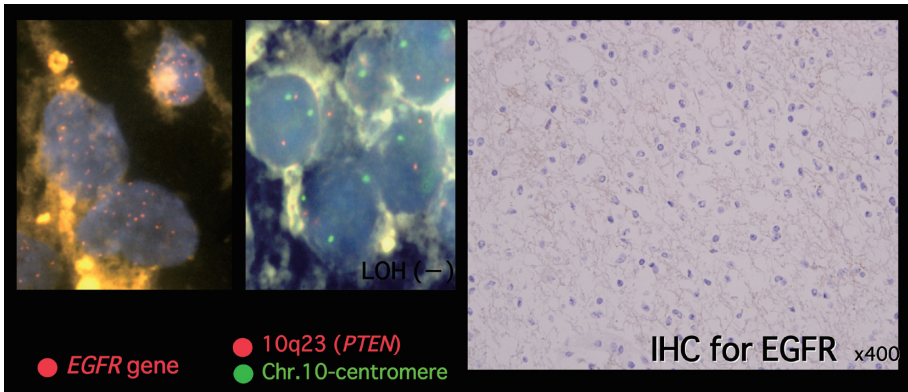


Fig. 1. OL-4.

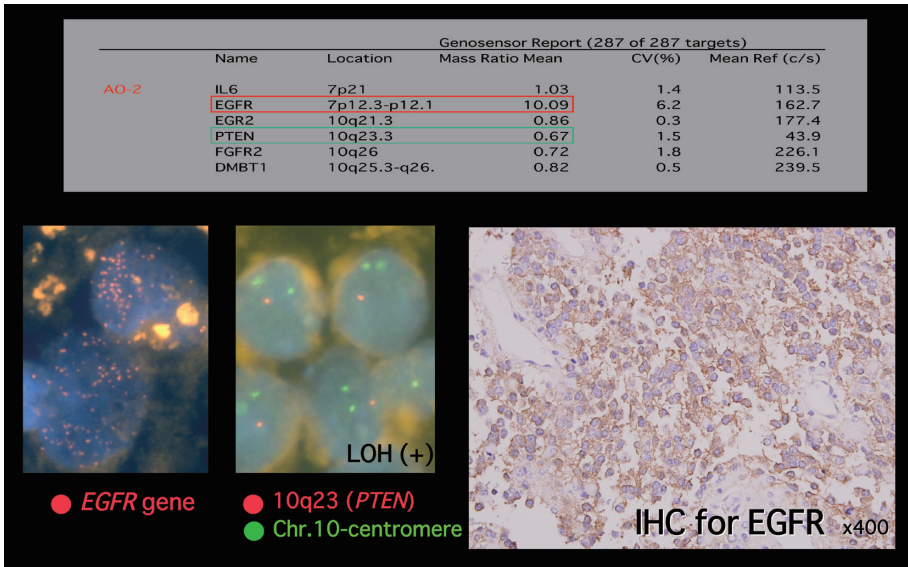


Fig. 2. AO-2.

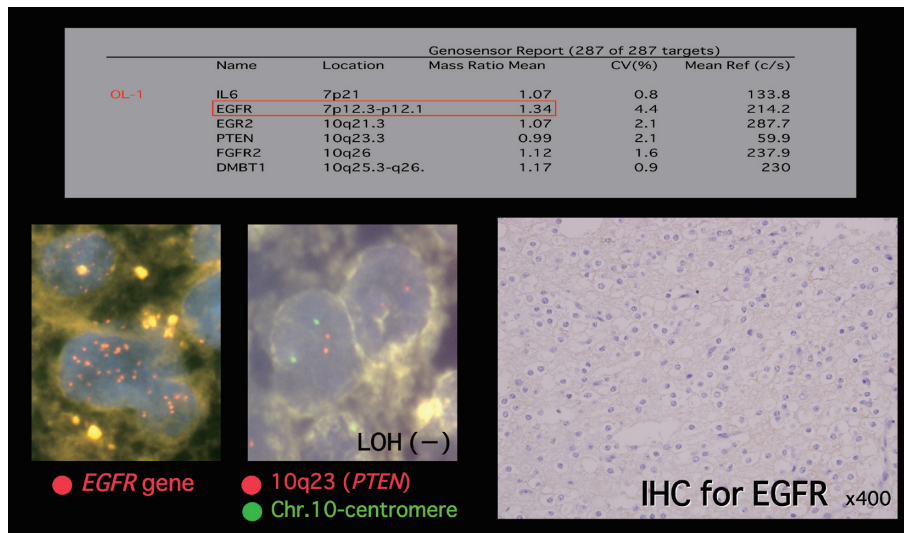


Fig. 3. OL-1.

Table 4. Summary of cases

Cases	Age (Y)	Sex	Site	% of removal	Outcome	EGFR	10q (PTEN)
OL-1	62	Male	Lt. frontal	50	PD	AMP	R
OL-2	61	Male	Blt. frontal	70	ST	NA	R
OL-3	25	Female	Lt. frontal	95	CR	NA	R
OL-4	33	Male	Lt. frontal	80	PD	AMP	R
OL-5	52	Male	Lt. frontal	90	ST	NA	R
OL-8	41	Male	Lt.parietal	20	ST	NA	R
AO-1	62	Male	Rt. frontal	95	ST	NA	R
AO-2	64	Male	Lt. frontal	95	PD	AMP	LOH
AO-3	47	Female	Rt. frontal	100	CR	NA	R
AO-4	42	Male	Lt. frontal	100	CR	NA	R
AO-6	46	Male	Rt. frontal	95	PD	AMP	LOH
AO-7	27	Male	Rt. frontal	100	CR	NA	R
AO-8	45	Female	Rt. frontal	90	ST	AMP	R
AO-9	42	Female	Lt. parietal	30	ST	NA	R

AMP : amplified, NA : not amplified
R : retained

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

地域住民の健康意識向上のためのプログラムの開発

研究代表者 柴崎 智美(埼玉医科大学 地域医学・医療センター)

研究分担者 鈴木 洋通¹⁾, 河津 捷二²⁾, 大野 洋一¹⁾, 菅野 義彦³⁾,
荒木 隆一郎¹⁾, 宮崎 孝¹⁾

はじめに

国が2010年を目標に展開している健康日本21は、国民の健康づくり対策の中心として位置づけられているが、2005年の中間評価では、肥満等を始め、多くの健康指標の改善は見られていない。こういった状況の中で市町村保健センターは地域保健の中でも身近な保健サービスを提供する実施主体となっており、今後の地域住民の健康づくりを広くサポートしていく中心的な役割を持つことになる。

平成18年度よりは、高齢者に対する介護予防スクリーニングが健診に導入され、保健から介護の中継ぎの役割までを保健センターが果たすことになった。平成20年度以降、メタボリックシンドロームをターゲットとした特定健康診査と、その後のリスクの程度に応じた積極的な特定保健指導が40歳以上の健康診断に導入され、この健診の実施主体が市町村から医療保険者に移ることになった。この一連の対策は、生活習慣病の予防対策を発症の予防から要介護状態の予防までの一連の流れとしてとらえ、国民ひとりひとりのQOLの向上を目指していくという予防重視の視点からの取り組みである。また一方で、医療保険者を実施主体とするという点から、医療保険者が特定健診実施計画を策定し、5年後までに十分な対策が実施されない場合には罰則に当たる規程が設けられており、医療保険者は積極的に対策に取り組まなければいけない状況に追い込まれている。こういったことから、特に市町村国民健康保険組合は、健診受診率向上のための方策を立てることが急務となっており、同時にこれまで健診を主導してきた市町村保健センターは、こういった変革のなかで、どのように住民の健康づくりに携わってい

くのかという点で役割が見直されることになった。

このような社会的な状況の変化が起きている中で、埼玉医科大学が位置する毛呂山町は、従来より住民健診(老人基本健診)の受診率が20%前後と低く(図1)、また、埼玉医科大学を除く地域の医療機関の医師数は、人口10万対20.3人と大変少ない。健診受診率が低いことは、地域住民の健康意識が低いことを意味することが多いが、毛呂山町の場合は、こういった地域医療過疎の状況が影響している可能性がある。本研究では、本学が地域に根付いてプライマリから高度先進医療までを担当しているという特色を生かして行う地域住民のための健康推進活動を通して、健康意識向上や健診受診率向上に関係する要因を明らかにし、今後のわが国の生活習慣病予防対策や健康づくり対策に関する資料を提供することを目的とする。

方 法

町の特定健康診査等実施計画策定にあわせ、平成19年11月に40歳以上75歳未満の国民健康保険加入者7,842人のうち3,000人を無作為抽出し、過去の健診、保健指導の受診状況、現在の健康状態、生活習慣についての自記式質問票を作成し、返信用封筒を同封して郵送した。調査内容は、性、年齢、地区、就業状況、健診の受診状況、今後の健診受診、保健指導受診に対する意向、疾病の有無、喫煙歴、飲酒歴、食行動、身長、体重、理想体重の認識の程度、適性飲酒・受動喫煙・喫煙に関する知識、町が行う保健活動の認識並びに保健活動への参加意欲等である。平成20年1月までに回収された1,700人のうち、無回答をのぞく1,667人55.9%について性別、年齢階級別に集計を行い、平成18年度の健診受診の有無と関連する要因についてロジスティック回帰分析を用いて検討した。

結 果

1) 埼玉医科大学 地域医学・医療センター
2) 埼玉医科大学 健康管理センター
3) 埼玉医科大学 医学教育センター

(1) 対象者の概要

集計対象者は、男 705 人、女 962 人であった。職業は男では自営が最も多く 33.6%，次いで無職年金等が 22.3%，会社員 14.3%，アルバイト・パート等が 14.2% となっており、女では、主婦・家事等が 33.1% と最も多く、次いでパートアルバイト等が 22.1%，であった。家族、親戚に医療関係者がいる者は、男 23.5%，女 22.9% である。自己申告による最近の体格は BMI25 以上の肥満が男 27%，女 18.6%，40 歳代男で肥満の割合が 32.8% と高かった。

(2) 健康診断の受診状況

平成 18 年度の健診を受診した者の割合は男 43.7%，女 50.1%，かかりつけの病院等で受診した者が 40.1% と最も高く、年齢が高いほどかかりつけの病院等で健診を受けるものが多かった。町ではかかりつけ医療機関での個別健診を 70 歳以下では実施していないため、かかりつけ医療機関で健診受診したものを除くと、受診率は男 26%，女 29.9% となった（図 2）。健診を受診しなかった理由は、「忙しいから」が 30.0%，「病院にかかっているから」が 31.5%，「自分は健康だから」が 20.0% であった。その他 50 歳代男と 40 歳代女では、「受ける必要がないと思っている」がそれぞれ 13.9%，

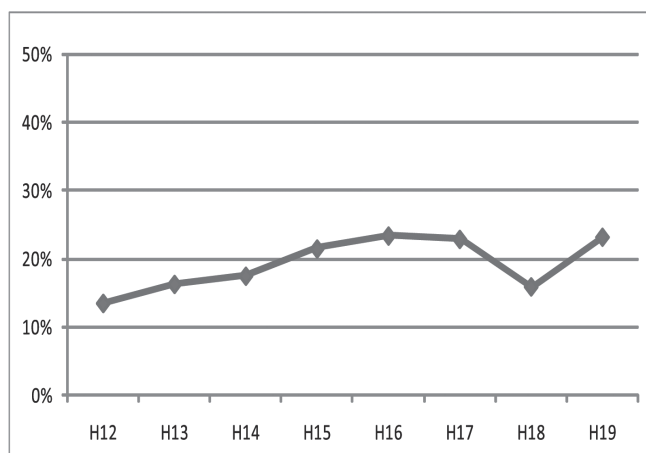


図 1. 毛呂山町の健診受診率の年次推移。

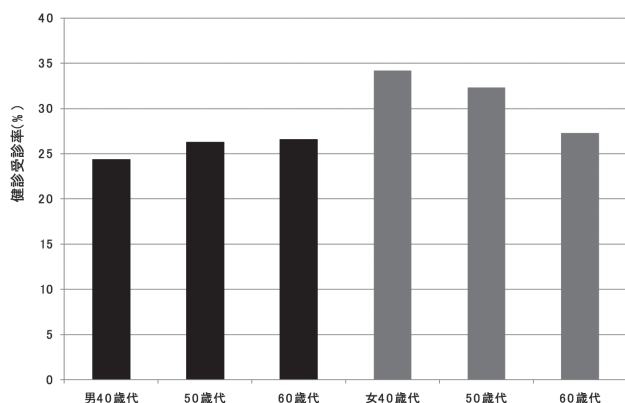


図 2. 平成 18 年度性年齢階級健診受診率。

11.1% を占めている。健康診断を受けることが大切だと思う者の割合は 95.7% であったが、50 歳代男では 6.4%，40 歳代女では 5.1% が「思わない」と回答していた。今後健康診断を受けようと思う者は、毎年受けるが 57.9%，何年かに 1 回受けるが 28.0%，受けないが 9.8% であった。「受けない」と回答した者の割合は、男では 50 歳代で 13.6%，60 歳代で 10.0%，女では 40 歳代で 12.0% と 1 割を超えていた。

(3) 現在の健康状態について

自分は健康であると答えた者は、全体の 61.5% を占め、女の方が男よりどの年齢も高く、男女ともに 40 歳代が最も高かった。これまでに指摘された疾患では、脳卒中 2.8%（男 4.1%，女 1.9%），心臓病 4.0%（男 5.1%，女 3.1%），慢性腎不全 1.0%（男 1.6%，女 0.5%），高血圧 27.4%（男 30.9%，女 24.8%），高脂血症 28.2%（男 25.2%，女 30.4%），糖尿病（予備軍含む）12.4%（男 17.6%，女 8.5%）である。最大体重（BMI）が肥満であった者は 39.5%（男 46.8%，女 34.2%）である。この 1 年間で体重が 3 キログラム以上増減した者は 25.0%（男 25.1%，女 24.9%）であり、40 代女は 35.9% と女の中では最も高かった。

日常生活で健康に注意している者は全体の 89.4% で、男では 50 歳代が 77.1% と最も低く、女では 40 歳代が 86.3% と最も低い。どの年齢も女の方が男よりも高くなっている。気をつけている内容としては、「バランスよく食べる」64.7%，「食べ過ぎない」61.5%，「体重を増やさない」57.8%，「定期的に運動する」43.1% であった。健康増進のために仲間同士で運動・行事等に参加している者は 19.1% で、40 代女 13.7%，50 代男 11.0% と低くなっている。60 歳代女では 25.9% と 4 人に 1 人は参加している。

(4) 生活習慣について

1) 食生活

食事にかかる時間は、10 分以上 20 分未満が最も多く 49%，20 分以上 30 分未満が 29.4%，10 分未満が 11.8% であった。特に男では 10 分未満が 17.9% を占めていた。朝食を欠食する割合は、男 22.7%，女 17.0% であり、男女ともに年齢が低いほど欠食率が高くなり、40 歳代の男では 42.9%，女では 29.9% である。食事の時間が規則正しいのは、男 71.2% 女 74.7% と年齢が高いほど高くなる。お腹いっぱい食べる者の割合は、男 22.8%，女 30.0% である。めん類の汁等をほとんど残さず飲む者の割合は、男 58.0%，女 36.5% で若年者ほど高い。間食をほぼ毎日とる者は、男 15.9%，女 32.5% である。就寝 2 時間以内に夕食を取る者は男で 38%，女 24.3% であり、年齢が低いほど高い。夕食後に間食する者の割合は、男 17.4%，女 18.9% である。

2) 運動

軽く汗をかくくらいの運動をしている者は 31.8% で男女ともに年齢が高くなると高い。特に女では、40

歳代で17.1%と、若年女で運動していない。運動習慣（1回30分以上週2日以上運動）有りの者の割合は17.6%（男18.9%，女16.6%）で、全国の男30.9%，女25.8%と比較して低い（図3）。1日の平均歩数は男5652歩，女4897歩で若年ほど歩数が少ない。現在の運動で足りていると思う者は男24.5%，女21.8%，40歳代では男女ともに低くなっている。

3) 飲酒

飲酒している者は40.7%（男61.8%，女25.2%），以前飲酒していたが今は飲まないは8.5%（男9.6%，女7.6%）である。週3日以上，1回日本酒1合以上の飲酒習慣ありの割合は，男38.6%，女7.9%で全国の男38.2%，女7.1%とほぼ同じ割合であるが，1日平均純アルコール60グラムを超えて多量に飲酒する人の割合は，男10.4%，女1.8%で，全国の男4.1%，女0.3%と比較して高い（図4）。

4) 喫煙

現在喫煙者は男42.1%，女16.3%で，過去喫煙者は男35.6%，女8.4%である。40歳代女では，現在と過去の喫煙者あわせて46.1%と高い。現在習慣的喫煙者は男34.0%，女7.6%，過去習慣的に喫煙していた者は男34.0%，女11.0%で全国の喫煙習慣者と比較して女の過去喫煙習慣者の割合が高い。特に40歳代女の現在喫煙習慣者11.1%，過去喫煙習慣者29.9%は，全国の13.7%，6.0%と比較して高い（図5）。

5) 行動変容のステージ

男では運動，食生活等の生活習慣を改善するつもりはないが最も多く42%，概ね6か月以内に改善するつもりであるが27.1%となっている。女では，概ね6か月以内に改善するつもりであるが31.2%と最も多く，次いで改善するつもりはないが27.9%である。既に改善に取り組んでいる者の割合は男11.9%，女14.5%である。

(5) 健康に関する認識と情報について

肥満がいろいろな生活習慣病の危険を高めること

を知っている者の割合は，男94.6%，女96.8%であり，認識は高い。喫煙が肺がんなどの様々ながんの原因になることを知っている者の割合は，男96.0%，女96.8%，喫煙が循環器病の原因になることを知っている者の割合は，男94.0%，女95.0%であった。健康に関する情報に関心がある者は，男89.5%，女94.8%と女で高い。

(6) 健診受診動向と関連のある要因について

平成18年度の健診受診と関連があるのは，「仕事が会社員，アルバイトパート」が性年齢調整オッズ比0.45，「20歳から10kg以上体重が増加」1.34，「現在喫煙」0.69，「現在飲酒」1.35，「健診を受けることが大切」が4.78，「自分が健康である」1.66，「健康増進のためにサークル等に参加している」1.52，「健康に関する情報に関心がある」0.57であった。（表1-4）

考 察

特定健診，特定保健指導の導入により，市町村ごとに健康づくりに取り組む方法も多様化した。今回対象となった毛呂山町では，生活習慣病健診受診率向上に向けて取り組むための方法について検討することが緊

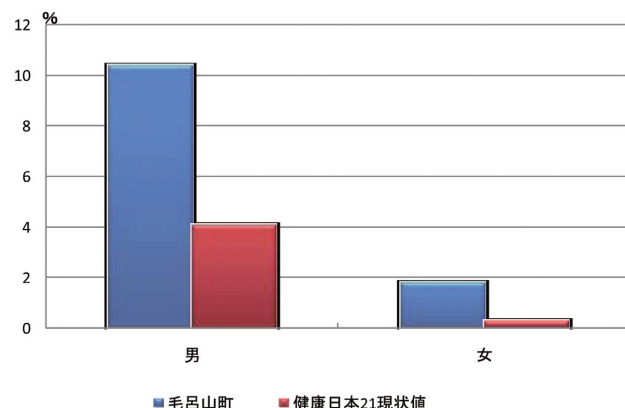


図 4. 多量飲酒者の割合の全国との比較。

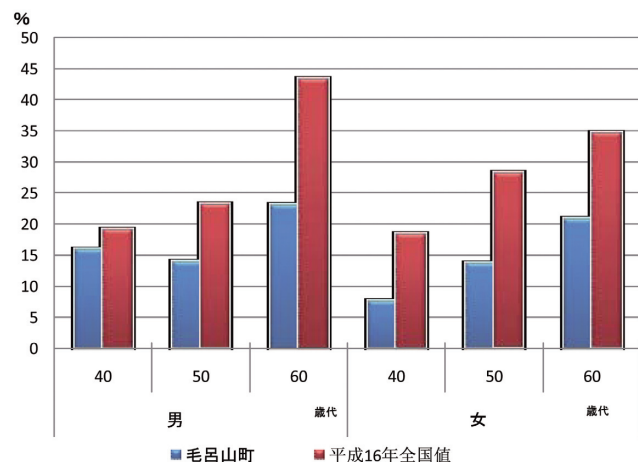


図 3. 運動習慣者の割合の全国との比較。

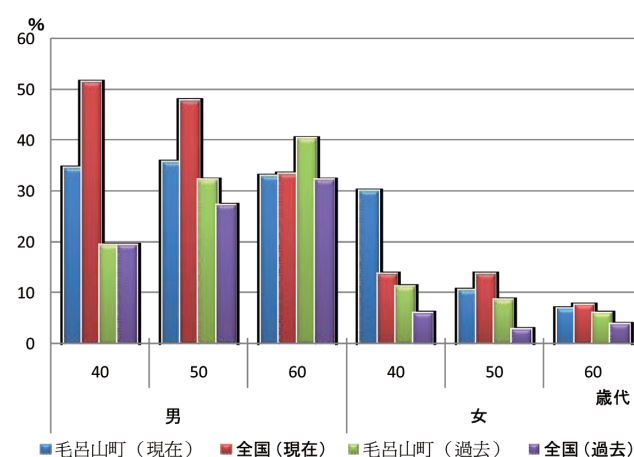


図 5. 習慣的喫煙者（現在，過去）の割合の全国値との比較。

急の課題であった。そこで、地域住民の健康に対する意識、生活習慣の現状を把握し、それらが健診受診行動とどのような関連を持つのかを検討した。

健診についての意識では、健診を受診することが大切と思うものは男女ともに95%をこえて高いが、受診しない理由として40歳代で「忙しいから」が50%をこえ、50歳代男、40歳代女で「必要がないと思う」が10%をこえており、さらに今後健診を「毎年受ける」が60%弱ということからも、健診を受診することの必要性についての教育・広報が必要と考えられる。

健康であると感じる者は全体の60%であり、日常生活で健康に気をつけている者は89.4%、健康増進のための活動に参加している者は19.1%でともに女で高い。しかし、ここでも40歳代女と50歳代男では若干ではあるが低い傾向がある。

生活習慣の現状に関しては、運動習慣有りの者の割合が、男女ともに全国値より低く、また1日平均歩数も少なくなっている。今後歩きやすい環境の整備、機会の充実等の対策が必要である。飲酒習慣者は全国と比べ同程度の割合であるが、多量飲酒者の割合が、健康日本21で示された全国値より男女とも高い。喫煙習慣については、現在習慣的喫煙者の割合は男は60歳代を除き全国値より低い、40歳代女は29.9%と全国の13.7%より高値である。朝食欠食率は、男女ともどの年代でも全国の値と比べて高く、特に40歳代では男42.9%、女29.9%と高い。

当初想定していた、家族等に医療機関関係者が多いことは受診行動とは明らかな関連は認められず、かえって、忙しい等の理由により、正しい知識を得ることができていない可能性がある。これらから、健診受

表 1. 健診受診行動と関連する要因(性年齢調整オッズ比)

	オッズ比	95%信頼区間			p値
		下限	～	上限	
仕事が会社員、アルバイト、パート、非常勤職員等である	0.45	0.36	～	0.57	<0.0001
家族、親戚に医療関係者がいる	1.05	0.82	～	1.36	0.695
20歳の頃と比較して10kg以上体重が増加した	1.34	1.07	～	1.68	0.010
現在の体格					
やせている	0.54	0.31	～	0.95	0.033
太っている	0.82	0.63	～	1.07	0.135
正常	1				

表 2. 健診受診行動と関連する要因(性年齢調整オッズ比)

	オッズ比	95%信頼区間			p値
		下限	～	上限	
喫煙習慣					
現在たばこを吸う	0.69	0.52	～	0.93	0.014
過去に吸っていた	0.95	0.69	～	1.30	0.739
吸わない	1				
飲酒習慣					
現在飲酒している	1.35	1.05	～	1.73	0.018
過去に飲酒していた	1.03	0.68	～	1.56	0.887
飲酒しない	1				
多量飲酒者	0.92	0.54	～	1.57	0.760
適正飲酒者	1.29	0.97	～	1.72	0.078
運動習慣					
軽く汗をかくくらいの運動を1日1回30分以上している	1.21	0.91	～	1.59	0.186
自分の運動は足りている	1.04	0.80	～	1.34	0.777
食習慣					
毎日3食食べている	0.77	0.57	～	1.02	0.072
朝食を食べないことがある	1.31	0.99	～	1.75	0.061
食事の時間は規則正しい	1.13	0.88	～	1.44	0.341
毎食の献立に野菜料理が入っている	0.78	0.55	～	1.10	0.156
外食や仕出しあるいはコンビニのお弁当を食べることがある	0.93	0.75	～	1.17	0.541
砂糖入りのコーヒーやジュース等を毎日飲む	1.06	0.84	～	1.35	0.618
果物を毎日とる	0.80	0.63	～	1.00	0.051
就寝前2時間以内に夕食をとることがある	1.09	0.86	～	1.39	0.472
夕食をとることがある	0.98	0.74	～	1.29	0.875

表 3. 健診受診行動と関連する要因(性年齢調整オッズ比)

	オッズ比	95%信頼区間			p値
		下限	～	上限	
健康診断を受けることが大切だと思う	4.78	1.71	～	13.38	0.003
今後健診を何年かに1回以上受けようと思う	38.26	9.44	～	155.01	<0.0001
今後健診を毎年受けようと思う	6.14	4.60	～	8.18	<0.0001
自分が健康だと思う	1.66	1.30	～	2.11	<0.0001
健康に気を付けている	1.16	0.78	～	1.73	0.467
肥満がいろいろな生活習慣病の危険性を高めることを知っている	0.34	0.12	～	0.99	0.047
喫煙が肺がんなどのがんの原因になることを知っている	1.16	0.44	～	3.08	0.769
喫煙が循環器疾患の原因になることを知っている	1.16	0.69	～	1.95	0.576
健康に関する情報に関心がある	0.57	0.33	～	1.00	0.049
健康増進のためサークル活動等に参加している	1.52	1.17	～	1.97	0.002
家族以外の人と交流がある	0.74	0.50	～	1.08	0.121

表 4. 健診受診行動と関連する要因(性年齢調整オッズ比)

	オッズ比	95%信頼区間			p値
		下限	～	上限	
運動や食習慣を改善するつもりはない	1				
概ね6か月以内に改善するつもりである	1.43	1.09	～	1.89	0.011
近いうちに改善するつもりである	1.69	1.20	～	2.37	0.003
すでに改善に取り組んでいる(6か月未満)	1.36	0.81	～	2.29	0.242
すでに改善に取り組んでいる(6か月以上)	1.49	0.99	～	2.24	0.053

診率向上のためには、健康、あるいは健康づくりに関する正しい知識の普及が必要である。特に、健診の目的・意義について、具体的には、病気の予防の重要性、通常の医療との違いについて様々な方法で周知していく必要がある。特に40歳代女は、健診受診率や、今後の健診受診の意向も低く、生活習慣にも問題がみられており、若年であること、この年代の女性の家庭における役割などを考えると、これらの年代にターゲットを絞った対策についても検討が必要と考えられた。

平成20年度の特健康診査は、健診会場を地区集会所2か所を含む4か所と増やし、住民の利便性を考えて実施したところ、受診率は40%弱と、前年度の約2倍となり、特定保健指導も積極的支援対象者に対して、糖負荷試験、血管年齢測定などのオプション検査を追加するなど、魅力ある健診、保健指導を計画して実施している。21年度は動機付け支援対象者への働きかけなど、さらに利便性を重視した特定健診・保健指

導に取り組んでおり、さらに、40歳代女性など、生活習慣に課題を持っている年齢層にターゲットを絞ったアプローチを検討していく予定である。

謝 辞

研究遂行に当たっては、毛呂山町保健センター保健師、職員の皆様、毛呂山町住民課国保年金係の職員の皆様に多大なるご協力をいただきましたことをここに深謝申し上げます。

研究成果リスト

学会発表

柴崎智美 大野洋一 荒木隆一郎 宮崎孝 羽生真由子 佐藤真喜子 鈴木洋通；国民健康保険加入者の健診受診動向に影響する要因に関する検討，第67回日本公衆衛生学会総会2008年11月，福岡

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

呼気炭酸ガス分析による極低侵襲心拍出量測定法の開発

研究代表者 澤野 誠

(埼玉医科大学 総合医療センター 高度救命救急センター)

研究分担者 間藤 卓¹⁾, 中田 一之¹⁾,
西岡 利彦²⁾

【緒言】

心拍出量測定は集中治療, CCU, 麻酔など多くの領域において循環不全患者の管理に用いられている。しかしながら, 心拍出量測定法のGolden Standardである肺動脈カテーテルを用いた熱希釈法(以下「肺動脈カテーテル法」)による心拍出量のモニタリングが, 重症循環不全患者の予後を改善するか否かについては否定的なRandomized Controlled Trial (RCT)が相次いでいる(Harvey S, et al. Assessment of the clinical effectiveness of pulmonary artery catheters in management of patients in intensive care (PAC-Man): a randomised controlled trial. Lancet.2005 Aug 6-12;366(9484):472-7.など)。循環管理における心拍出量測定の有用性は広く認められているにもかかわらず, これらのRCTにおいて予後の改善が示されなかった最大の理由は, 肺動脈カテーテル法の侵襲が大きく, 合併症の頻度が高いことにある, という点で多くの報告は一致している。近年, 国内外にて肺動脈カテーテル法に替わるより侵襲の小さい心拍出量測定法として色素希釈法(DDG法), 炭酸ガス再呼吸法など数多くの試みが報告されているが, 精度, 再現性, 測定の煩雑さなどが問題となり, 臨床応用は進んでいない。

研究代表者(澤野)らは, 以前より非侵襲的検査法である呼気分析の血行動態モニタリングへの応用に取り組み, 一酸化炭素ヘモグロビン(CoHb)濃度の非侵襲連続測定法(CoHb-EGA法)を開発し, その循環赤血球量および循環血液量測定への応用を報告した(Sawano M, Mato T, Tsutsumi H. Bedside red cell volumetry by low-dose carboxyhaemoglobin dilution using expiratory

gas analysis. British Journal of Anaesthesia Vol.96 p186-94 2006)。さらに澤野は, CoHb-EGA法をCOHb希釈法に応用した非侵襲的心拍出量測定(呼気CO心拍出量測定法)の開発にとりくみ, 平成19年度より3年間科学研究費補助金の交付を受けている。

しかしながら, 呼気CO心拍出量測定法には, 中心静脈および動脈カテーテルが不要であり極低侵襲であること, COHbの分布が血管内に厳密に限定されることによる測定精度が高いこと, という大きな利点とともに, あらかじめ自己血を採血し, これをCOガスにて飽和した後静脈注射する必要がある手順が煩雑で測定に時間がかかること, COHbの血中半減期が長く, 短時間での繰り返し測定が困難なこと, などの難点がある。そこで澤野らは, さらなる低侵襲化ならびに, 繰り返し測定を可能とすることを目標として, 血中半減期が極めて短い炭酸ガス希釈法(重炭酸ナトリウム希釈法)による心拍出量測定法(呼気炭酸ガス心拍出量測定法)を考案した。

本研究は, 呼気炭酸ガス心拍出量測定法の測定精度の検証を, 肺動脈カテーテルを用いた熱希釈法との同時測定によりおこなうことを目的とした

【対象と方法】

1. 研究の対象

本研究開始に先立ち, 研究の計画, 対象, 方法, 予測される危険性, 説明と同意の方法などを埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会に提出し, その承認を既に得ている。(平成19年4月10日承認, 申請番号99)

本研究の対象は, 埼玉医科大学総合医療センター高度救命救急センターに研究期間中に入院した患者のうち, 循環管理のため診療上の必要性から肺動脈カテーテルを留置した患者で, 主治医の承諾を得た後, 本人またはその代理人に, 本研究の主旨, 方法, 予測さ

1) 埼玉医科大学 総合医療センター 高度救命救急センター
2) 埼玉医科大学 総合医療センター 心臓内科

れる危険性, 研究への参加を拒否した場合にも一切の不利益を受けないこと, 何時でも同意を撤回できること, などを研究代表者または共同研究者が文書により説明し同意を得た20名とした. また研究に必要な採血は, 診療上必要な採血時におこない, 本研究のために肺動脈カテーテルを留置することや, 採血をおこなうことはなかった.

2. 呼気炭酸ガス心拍出量測定法の手順

- 1) 末梢静脈より8.4%重炭酸ナトリウム溶液(メイロン)0.4 ml/kg (20-30 ml)を急速静注した.
- 2) 重炭酸ナトリウム溶液注入前後に, 図1に示したような, 一方弁マスク回路または人工呼吸器の呼吸回路(呼気側)にて呼気を分離し, 連続CO/CO₂濃度測定装置(株式会社タイヨウ製 Carbolizer mBA-2000)にて呼気中のCO/CO₂濃度を1秒毎に連続測定した.
- 3) 連続CO/CO₂濃度測定データより澤野が開発したReference Gas Method のアルゴリズムを用い, 論理的呼気CO₂濃度曲線(=肺循環血液中炭酸ガス濃度曲線)を得た(図2).
- 4) 重炭酸ナトリウム(炭酸ガス)注入量および肺循環血液中炭酸ガス濃度曲線よりStewart-Hamilton法にて心拍出量を算出した.

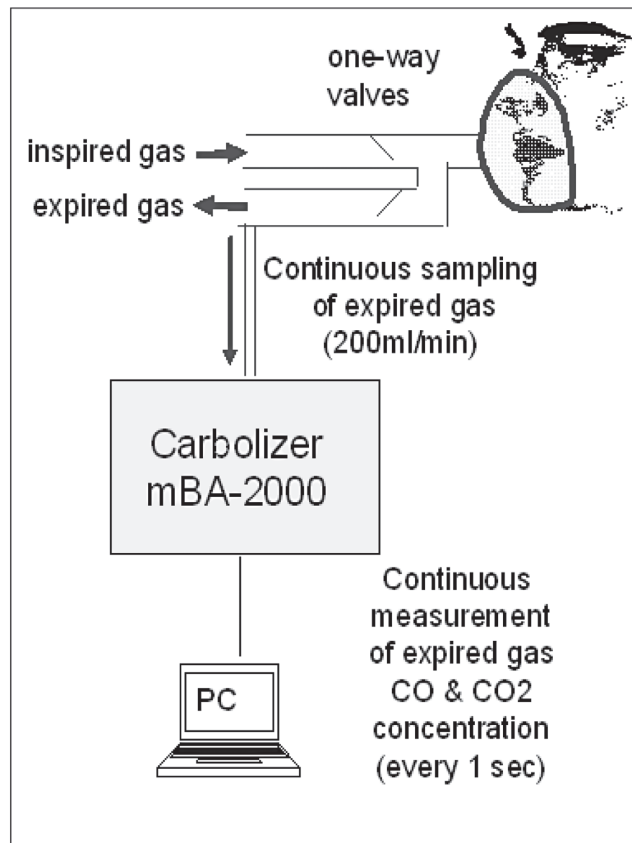


図1. 一方弁を用いた呼気の分離・採取およびCarbolizer mBA-2000によるCO・CO₂濃度の連続測定.

3. 統計的処理

呼気炭酸ガス心拍出量測定法および肺動脈カテーテル法(3回測定の平均値). にて同時測定した心拍出量のagreementをBland-Altman法により統計的に解析した.

【結 果】

表1に20例における, 呼気炭酸ガス法(ECO₂)ならびに肺動脈カテーテル法(PAC)により測定した心拍出量, 両者の平均(MEAN), 差(DIFFERENCE), 差の平均に対する百分率(% DIFFERENCE)を示す. 両法の差のbiasは+1.7 L/min, limits of agreementは-0.6 L/minおよび+3.9 L/minであった. 両法の差の平均に対する百分率では, biasは+20.6%, limits of agreementは+5.0%および+36.2%であった.

図3には, 呼気炭酸ガス法(ECO₂)ならびに肺動脈カテーテル法(PAC)により測定した心拍出量の差を縦軸に, 両法の平均を横軸にプロットしたBland-Altman diagramを示す.

図4には, 呼気炭酸ガス法(ECO₂)ならびに肺動脈カテーテル法(PAC)により測定した心拍出量の差の平均に対する百分率を縦軸に, 両法の平均を横軸にプロットしたBland-Altman diagramを示す. 図4には各プロットの回帰直線を示した.

【考 察】

近年, 肺動脈カテーテル法に替わる, より低侵襲な心拍出量測定法がいくつか開発されているが, いずれも中心静脈カテーテル, 動脈カテーテルのいずれかあるいは両方を必要とする技術である. それに足し, 本研究でとりあげた呼気炭酸ガス心拍出量測定法では, 唯一の侵襲は末梢静脈からの8.4%重炭酸ナトリ

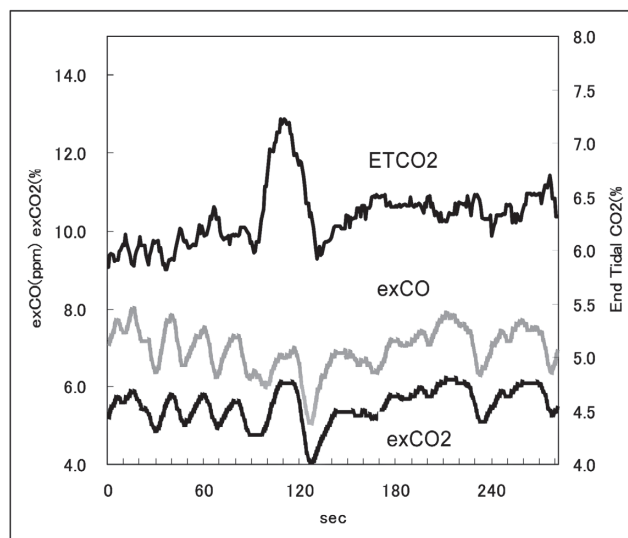


図2. 連続測定した呼気CO/CO₂濃度(exCO, exCO₂)および算出した呼気終末CO濃度(ETCO₂)曲線.

ウム液 25 ～ 36 ml の注入である。この量の重炭酸ナトリウム（商品名 メイロン注）は、薬事法で認められている用法・用量と比較しても少量であり、本法は圧倒的に安全かつ低侵襲である。

本研究にて示した呼気炭酸ガス法 (ECO2) ならびに

肺動脈カテーテル法 (PAC) により測定した心拍出量の差の平均に対する百分率 (% difference) の limits of agreement ($+20.6 \pm 15.6\%$) を、肺動脈カテーテル法による心拍出量測定値の再現性を示す coefficient of repeatability (文献的には $\pm 15 \sim 22\%$ 、本研究では $\pm$

表 1. 20 例における呼気炭酸ガス法 (ECO2) ならびに肺動脈カテーテル法 (PAC) により測定した心拍出量、両者の平均 (MEAN)、差 (DIFFERENCE)、差の平均に対する百分率 (% DIFFERENCE) を示す。

SUBJECT	ECO2 (L/MIN)	PAC (L/MIN)	MEAN (L/MIN)	DIFFERENCE (L/MIN)	%DIFFERENCE (%)
#1	5.3	4.5	4.9	0.8	16
#2	5.8	5.2	5.5	0.6	11
#3	7.8	6.8	7.3	1	14
#4	12.5	10.1	11.3	2.4	21
#5	13.2	10.5	11.9	2.7	23
#6	10.2	7.8	9.0	2.4	27
#7	5.8	4.6	5.2	1.2	23
#8	4.5	3.8	4.2	0.7	17
#9	5.8	5.4	5.6	0.4	7
#10	8.1	7.2	7.7	0.9	12
#11	8.5	6.8	7.7	1.7	22
#12	3.5	2.9	3.2	0.6	19
#13	6.4	5.4	5.9	1	17
#14	15.1	10.2	12.7	4.9	39
#15	11.2	8.9	10.1	2.3	23
#16	8.1	6.2	7.2	1.9	27
#17	7.2	5.7	6.5	1.5	23
#18	6.8	6.1	6.5	0.7	11
#19	12.1	8.9	10.5	3.2	30
#20	10	7.4	8.7	2.6	30

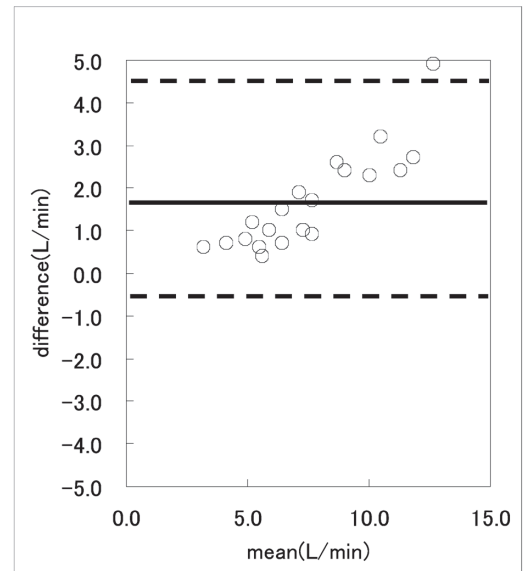


図 3. 呼気炭酸ガス法 (ECO2) ならびに肺動脈カテーテル法 (PAC) により測定した心拍出量の差 (difference) を縦軸に、両法の平均 (mean) を横軸にプロットした Bland-Altman diagram. 実線は bias を、点線は limits of agreement を示す。

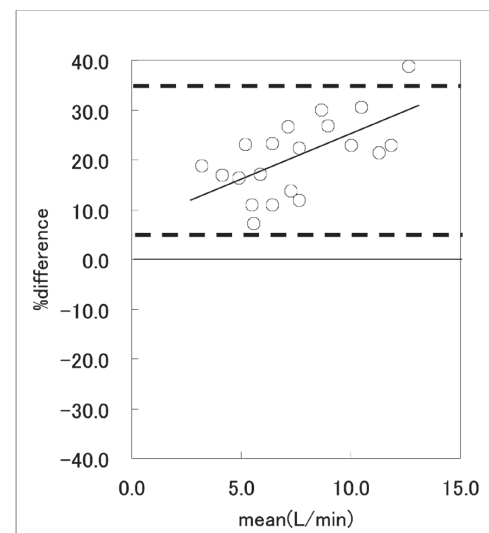


図 4. 呼気炭酸ガス法 (ECO2) ならびに肺動脈カテーテル法 (PAC) により測定した心拍出量の差の平均に対する百分率 (% difference) を縦軸に、両法の平均 (mean) を横軸にプロットした Bland-Altman diagram. 実線は一次曲線 (回帰直線) による bias を、点線は limits of agreement を示す。

17%)と比較すると、両法の間の大きなbiasを考慮しなければ、呼気炭酸ガス法による心拍出量測定精度(正確性)は、肺動脈カテーテル法と同等以上であると評価される。したがって、両法の間のbiasを補正すれば、心拍出量測定において呼気炭酸ガス法は肺動脈カテーテル法より低侵襲かつ低コストな代替法と充分なりうると結論される。

両法の間の比較的大きなbiasの原因は、静注された重炭酸ナトリウム溶液中の NaHCO_3 が肺動脈に達するまでの時間では、全量炭酸ガス(CO_2)に代謝・変換されないことにあると考えられる。静注された NaHCO_3 は、血中で Na^+ および HCO_3^- にイオン化され、ついで HCO_3^- が CO_2 と OH^- (H^+ と反応し消去)に代謝される過程で、 CO_2 が萌出される。この過程の反応速度は、血液の酸塩基平衡(pH)などにより変化しうる。心拍出量の高い例で、両法の較差が相対的に大きくなる(図4)現象は、高心拍出量のもとでは末梢静脈に注入された重炭酸ナトリウムが肺動脈に達するまでの時間が相対的に短く反応が進む時間が不足することにより説明される。

今後の課題としては、さらに肺動脈カテーテルとの対照試験を大規模におこない、両法の間のbiasについて様々な条件下でデータを蓄積し、補正式を確立することが挙げられる。このbias補正が可能となれば、呼気炭酸ガス心拍出量測定法の実用化ならびに臨床応

用への道が開け、循環不全患者に対する診療水準の向上のみならず、医療安全にも大きく寄与するものである。さらに尿素呼気試験とほぼ同等の安全さ簡便さにて心拍出量のリアルタイム測定が可能となることから、その低侵襲性を生かし、軽症患者や外来患者、さらにはスポーツの現場などまで、その応用範囲が広がることが期待される。

【研究成果リスト】

原著論文

- ・澤野誠 循環動態モニタリングへの呼気分析の応用 新しい低侵襲測定技術の開発安定同位体と生体ガス: 医学応用(1883-2393)1巻1号 Page32-8(2008.09)
- ・澤野誠 呼気分析による極低侵襲心拍出量測定法の開発 呼気生化学の進歩(1881-5987)10巻 Page11-5(2008.03)
- ・澤野誠 CO , その他 呼気一酸化炭素分析の心拍出量測定への応用 呼気分析は肺動脈カテーテルを超えるか? 呼気生化学の進歩(1881-5987)9巻 Page23-6(2007.03)

学会発表

- ・澤野誠, 間藤卓, 中田一之, 森脇龍太郎, 大森達人, 山口充, 堤晴彦 呼気分析を応用した極低侵襲心拍出量測定法の開発 第36回救急医学会総会 2008.10.13 ~ 15 札幌

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

地域学校保健情報に基づく 小児好発感染症全数調査システムの構築と応用

研究代表者 荒木 隆一郎(埼玉医科大学 地域医学・医療センター)

研究分担者 羽生 真由子*, 柴崎 智美*, 佐藤 真喜子*,
大野 洋一*, 宮崎 孝*, 鈴木 洋通*

緒言

現在小児好発感染症・学校感染症のサーベイランスは、主として小児科専門施設での定点観測と各校での学級閉鎖の状況把握に基づいて行われている。学校感染症はしばしば学級・学校・小地域単位での流行が見られ、学級・学校ないし学区・市町村単位での流行状況把握は、感染症の発生および伝播の様相を探り有効な予防対策・流行拡大の抑止策を講じる上で有用な情報となる。

感染症には、学齢期児童(小・中学生)での罹患率が他の年齢階級と比較して高く、かつ他の年齢階級にも感染拡大しやすいものがあり(とくにインフルエンザ)、地域の小・中学校が「培養器」となってその地域での感染症流行拡大を助長している可能性がある。したがって流行状況の迅速な把握と分析に基づく対策が重要と考えられる。しかしながら公的機関による感染症発生動向調査では、流行状況把握から公開までのタイムラグが大きいこと、小地域毎の情報が提供されないことなど制限が大きい。また現在の学校感染症サーベイランスにおいて、各校毎に集計した欠席情報は、学校保健法省令・教育委員会訓令に基づき教育委員会への届出が行われるが、その情報の地域での集積・学校現場への迅速な還元は現実には十分に行われているとは言い難い。

本研究は、学校感染症動向の一次情報を各校で直接把握する各校養護教諭が、インターネットに接続されている各校のPCからウェブ経由で感染症情報サーバに入力することにより、出席停止の対象となる感染症については定点観測対象疾患を含めて全数把握し、学校保健および地域の感染症対策の現場への迅速な情報

還元を目的の一つとする。またこれに基づいて、日々の地域での感染症流行伝播の様相を探り、行政的・医療的な介入の効果を予測・評価することで地域の健康水準を高める手段を明らかにし、さらに地域での、新興感染症を含む感染症への対応策について検討することを目的としている。

なお本研究は、当初2ヶ年計画として感染症情報収集システムの立ち上げ、およびその後の長期に渡るサーベイランスにより蓄積される感染症情報の解析計画を立案したが、学内グラント選考委員会・医学研究センター研究支援管理部門の決定により単年度助成となった。したがって本稿は、研究計画途上の進捗状況報告であることを付記する。

調査対象と方法

本研究では調査対象を、埼玉医科大学病院の位置する毛呂山町を中心に大学病院および関連病院がカバーしている二次保健医療圏とする計画である。平成20年度は立ち上げ年度として、毛呂山町立小学校4校・中学校2校および坂戸市立小学校13校・中学校8校を対象とした。

感染症情報収集システムとして、html, PHP, およびJavaScriptを用いウェブサーバ上に構築された対話式的情報登録・集計・閲覧システムを用い、インターネットに接続された各校のPCからウェブブラウザを用いて入力・閲覧する方式を取った。入力された情報はMySQLを核として保存・管理され、フロントエンドからの問い合わせに応じて過去の入力履歴・感染症情報の集計結果等をウェブブラウザに表示させた。ウェブサーバには、学外レンタルサーバを利用した。入力者は各校養護教諭または担当者であり、各校毎に「感染症情報登録」および「集計結果閲覧」メニューに

* 埼玉医科大学 地域医学・医療センター

アクセス可能な制限ID・パスワードを発行した。遠隔管理用IDはさらに「CSV形式データ出力」および「ユーザマスタメンテナンス」メニューにアクセス可能とした。図1に、本システムにログイン後表示されるメニュー画面を示す。収集した感染症情報は、「集計結果閲覧」メニューから参照可能なものの他、週報として各校担当者および教育委員会にフィードバックした。



図1. 感染症情報収集システムメニュー画面。各校担当者には制限IDが発行され、「感染症情報」および「集計結果閲覧」メニューにアクセス可能である。また遠隔管理用IDはさらに、CSV形式での「データ出力」および「ユーザマスタメンテナンス」メニューにアクセス可能とした。

結果と考察

現在、2009年第24週までの学校感染症情報を把握しており、感染症情報サーバの「集計結果閲覧」メニューへのアクセスにより、データ入力後即時閲覧可能な感染症発生状況の他、週毎に金曜までの動向を埼玉県および全国の感染症流行状況と併せて1-2ページに要約した「埼玉医科大学感染症情報収集システム週報」を発行し、各校および教育委員会に還元している(図2, 図3)。なお、本システムでは、新規情報入力後リアルタイムでの流行状況閲覧が可能ではあるものの、地区別・学校別の流行状況表示等のウェブブラウザ上での閲覧については今後の課題となる。また、初等・中等教育の現場におけるコンピュータ支援教育は従来より進められて来ているものの、学校保健現場でのコンピュータ/インターネットリテラシーやIT技術活用のためのインフラは未だ十分とは言い難く、そのためインターネット経由(メールおよびウェブ)以外にFAXも併用してデータエントリー・情報還元を実施してきている。

2009年6月時点で、学校保健現場での一次利用者である各校養護教諭に本システムによる還元情報をどのように利用しているか・今後学校関係者だけでなく一般への公開可否等についてアンケート調査を実施した。利用方法については、「職員会議で提示」、「掲



図2. 2009年5月27日～2009年6月16日の毛呂山町におけるA群溶血性連鎖球菌咽頭炎の発生状況。「集計結果閲覧」メニューから参照可能となっている。

示板に掲示」,「他校の状況を知り感染症拡大の予防に役立てる」,「保護者への情報提供」などの回答が多く,また一般公開については「条件付で賛成」が大半であった。公開する際の条件として,「学校名を伏せる」,「保護者・学校関係者・医療機関等に限定」とするものが多かった。本システムにより集積された情報の一般公開については,今後関係者と意見交換ならびに調整

を図り,適切な情報還元とその活用を進めてゆきたいと考えている。

謝 辞

本研究は平成20年度埼玉医科大学学内グラント(20-3-1-06)の補助を受けて行われた。本研究の遂行にあたり御協力頂きました毛呂山町立・坂戸市立小中学

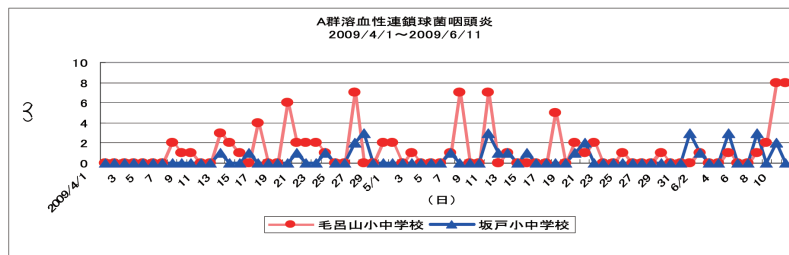
埼玉医科大学感染症情報収集システム

毛呂山町・坂戸市の週報(6月5日～6月11日)

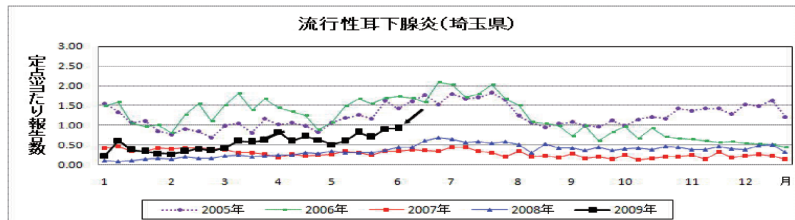
今週も季節性インフルエンザによる出席停止報告数はありませんでした。その他の感染症は、A群溶血性連鎖球菌咽頭炎 28 件 (〇〇小 5 件、〇〇小 1 件、〇〇小 2 件、〇〇小 14 件、〇〇小 2 件、〇〇小 3 件、〇〇小 1 件)、感染性胃腸炎 1 件 (〇〇中)、流行性耳下腺炎 1 件 (〇〇中 1 件)、水痘 3 件 (〇〇小 1 件、〇〇小 1 件、〇〇小 1 件)、伝染性紅斑 1 件 (〇〇小)、伝染性膿痂疹 1 件 (〇〇小) の報告がありました。A群溶血性連鎖球菌咽頭炎が毛呂山町で急増しています。主に飛沫感染で、症状は突然の発熱、咽頭痛、嘔吐、腹痛です。予防のためうがい、手洗いを励行しましょう。埼玉県内では流行性耳下腺炎が流行しています。

【新型インフルエンザ情報】

世界保健機構(WHO)は、世界的大流行の「フェーズ6」へ警戒度を引き上げました。6月11日時点で国内発生は20都府県で累積508人に達しました。成田空港の検疫で見つかった10人を含めると累積518人です。埼玉県内では4人の感染が確認されています。政府は当面対策の大きな方向は変わらないとしています。国内での感染も地域・人数共に少しずつ増加しています。引き続き情報収集と、予防対策を行っていきましょう。



埼玉県の感染症流行状況(6/1～5/7)



感染症流行状況

疾患	推移	流行状況	疾患	推移	流行状況
インフルエンザ	↓	★	伝染性紅斑	→	★
RSウイルス感染症	→	★	突発性発しん	→	★
咽頭結膜熱	→	★	百日咳	→	★
A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	→	★★	ヘルパンギーナ	→	★
感染性胃腸炎	→	★★	流行性耳下腺炎(おたふくかぜ)	→	★★
水痘(みずぼうそう)	↓	★★	急性出血性結膜炎	↑	★
手足口病	→	★	流行性角結膜炎	↑	★

埼玉県衛生研究所感染症情報センターホームページ (<http://www.pref.saitama.lg.jp/A04/BA30/eiken/surveillance/srv/ippann/2009/srv-week0910.htm>) より 発行: 埼玉医科大学地域医学・医療センター 電話: 049-276-1168, FAX: 049-294-6907 2009年6月12日

図 3. 2009年第24週の「埼玉医科大学感染症情報収集システム週報」。学校名は伏せ字とした。

校養護教諭ならびに教育委員会関係者各位に深謝いたします。

研究成果リスト

学会発表

- ・ 荒木隆一郎, 羽生真由子, 柴崎智美, 佐藤真喜子, 宮崎孝, 大野洋一, 鈴木洋通, 全数把握を目的とした小児好発感染症情報収集システムの構築に関する検討, 日本公衆衛生雑誌, 2008;55(10):pp450 (第67回日本公衆衛生学会総会抄録集)
- ・ 羽生真由子, 佐藤真喜子, 鈴木幸子, 荒木隆一郎, 宮崎孝, 大野洋一, 柴崎智美, 鈴木洋通, 地域におけるインフルエンザ発生状況と迅速診断検査の有用

性, 日本公衆衛生雑誌, 2008;55(10):pp450 (第67回日本公衆衛生学会総会抄録集)

- ・ 羽生真由子, 佐藤真喜子, 荒木隆一郎, 宮崎孝, 大野洋一, 柴崎智美, 鈴木洋通, 学校感染症出席停止状況からみた2008/2009シーズンインフルエンザの特徴, 日本公衆衛生雑誌, 2009;56(10), 印刷中 (第68回日本公衆衛生学会総会抄録集)
- ・ 柴崎智美, 羽生真由子, 佐藤真喜子, 荒木隆一郎, 宮崎孝, 大野洋一, 鈴木洋通, 学校感染症出席停止状況からみた2008/2009シーズンインフルエンザの特徴 第2報, 日本公衆衛生雑誌, 2009;56(10), 印刷中 (第68回日本公衆衛生学会総会抄録集)

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

トポイソメラーゼIの概日リズム性発現の解析： 時間治療の分子基盤確立を目指して

研究代表者 池田 正明（埼玉医科大学 医学部 生理学）

研究分担者 佐々木 康綱¹⁾，藤田 健一¹⁾，楊 芳²⁾，熊谷 恵³⁾，
中島 芳浩⁴⁾，近江谷 克裕⁴⁾

Keywords: Topoisomerase I, Circadian rhythm, clock genes, chronotherapy, Camptothecine

要 旨：

トポイソメラーゼI（トポI）はDNAの2重螺旋構造を解くのに必須の酵素であるが，細胞周期の全期間に亘って核に発現し，抗がん剤のカンプトテシン（CPT）の標的としても知られている．最近，トポIが概日リズム性の発現を示し，しかもその発現は内因性のグルココルチコイドレベルに依存していること，また，CPTの抗がん作用は，トポI活性が上昇した時に増強されることが報告された．しかし，トポIの概日リズム性発現が時計遺伝子によるものであるかは明らかではない．また，抗がん剤CPTの時間治療を確立するためには，トポIの概日リズム性発現の分子機構を明らかにすることが重要である．そこで私たちは，先ず細胞レベルでトポIが概日リズム性発現をすることを確認するため，NIH3T3細胞に2時間のデキサメサゾン刺激を同調刺激として加え，この刺激から24から48時間後のトポI mRNAを測定し，それが概日リズム性の発現を示すことを確認した．次に転写レベルでの発現調節を解析するため，ヒト，マウスのトポIのプロモーター領域を比較し，エクソン1の両方で配列が高度に保存されている領域内に2カ所のE-box（E1, E2）および1カ所のD-boxがあることを見いだした．ゲルシフトアッセイによって，E2配列およびD-boxにはBMAL1/CLOCKヘテロ二量体およびDBPがそれぞれ結合することが示された．次に，トポIプロモーター下流にPEST配列を

含むルシフェラーゼ遺伝子を挿入し，NIH3T3細胞にトランスフェクションを行い，その活性変動を，発光を指標にリアルタイムで計測（クロノス）し，このプロモーターに自律的な概日リズム性発現があることを確認した．またこの発現位相は*Per2*と極めて近いことが示された．更にこれらのE-boxおよびD-boxの変異体を作成し，クロノス解析を行ったところ，E2, E1/E2, D, E1/D, D, E1/E2/Dを欠失させたトポIプロモーターは，振幅が60%以上低下した．以上の結果より，トポIは，細胞レベルにおいて，E2およびD-boxを介して時計遺伝子によって自律的に概日リズム性発現することが示された．本研究で得られた結果は，トポIの発現とカンプトテシン感受性との関連を分子レベルで解析する為の実験的証左を提供するものであり，同薬物による腫瘍の時間治療に，分子レベルでの手がかりを与えることが期待される．

緒 言

二本鎖のDNAは生理的な条件では二重らせん構造を形成しており，この二重らせんにはねじれが生じていることが知られている．このねじれ構造を超らせん構造というが，このDNAの立体構造を変える酵素として，トポイソメラーゼがある．トポイソメラーゼにはIとIIがあり，2本鎖の片方だけを切断して再結合させるトポイソメラーゼI（トポI），両方を切断して再結合させるタイプのトポイソメラーゼII（トポII）がある．

トポIは二重らせん構造を変化させる機能があるが，このような機能を通して，DNA複製などに関与していることが知られている．また，JUNなどの転写因子によるRNAポリメラーゼIIの活性化にもコファク

1) 埼玉医科大学 国際医療センター 腫瘍内科
2) 埼玉医科大学 大学院 生物医学専攻（生理学）
3) 埼玉医科大学 医学部 生理学
4) 産業技術総合研究所・関西センター セルエンジニアリング研究部門 セルダイナミクス研究グループ

ターとして関与することも報告されている。さらに、CPTの誘導体である抗がん薬イリノテカン (irinotecan) の標的分子で、トポI活性阻害を介して抗がん作用が発現することことも広く知られている¹⁾。さらに、肺小細胞がんや卵巣がんなど様々ながん細胞でその発現が増加していることが報告されており、またこの発現量はカンプトテシン感受性とも関連することが指摘されている。カンプトテシンの感受性や副作用は、生体に投与する時間帯によって変動することが知られており²⁾、この変動はトポIの発現動態と関連している可能性が指摘されている。カンプトテシンによるがん治療に時間治療を応用するためには、カンプトテシンの吸収、代謝ばかりでなく、その標的因子であるトポIの発現動態を解析する必要がある。Kuramotoらはマウス肝臓におけるトポI RNAの変動に日内リズムがあること、またそのリズムは副腎の摘出で消失することから、トポI RNAの日内変動は副腎皮質ホルモンのリズムによって制御されている可能性を報告している^{3,4)}。しかし、トポIの概日リズム性発現を、転写レベルで解析した報告はなく、概日リズム性発現調節機構を分子レベルで解析するためには、トポIのプロモーター解析を行なう必要がある。本研究ではマウス トポIのプロモーター^{5,6)}をクローニングし、継続的に長時間プロモーター活性を計測可能な系を本研究に応用することにより、時計遺伝子によるリズム発現機構を明らかにした。

材料と方法

マウス トポIプロモーターのクローニングと変異体の作成

マウス トポIプロモーターはマウスゲノム由来DNA (Novagen) を鋳型として、プロモーター領域に設定したプライマーを用いてPCRを行ない、得られたPCR産物はEluc-PEST-T (Toyobo) に導入した。E-box および D-box 時計遺伝子結合領域の変異体は、QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) によって変異導入用プライマー

mTopoI-E1mut:5'-

CACGCTTCAATCCAGGGTGTGGGGGGCAGAGGC-3';

mTopoI-Dbox-mut: 5'-

GAAATGCGAACTTAGGCTGGGACACAACCTGCTGGG-3';

mTopoI-E2mut: 5'-

GAACTTAGGCTGTTACATTACTGCTGGGGTCTGTTC-3';

mTopoI-E2/Dmut: 5'-GAACTTAGGCTGGGACATTACTGCTGGGGTCTGTTC-3'

をそれぞれ用いて作成した。

ルシフェラーゼアッセイ

レポーターコンストラクトおよび一過性細胞発現

コンストラクトはLipofectamine (Invitrogen) によってNIH3T3細胞に導入した。NIH3T3細胞は24 wellプレートにトランスフェクションの前日に1 wellあたり5万個となるように播種した。培地は10%のウシ胎児血清、ペニシリン (25 U/ml), ストレプトマイシン (25 µg/ml) を加えたDMEM (Invitrogen) を用いた。発現効率の補正のため内部標準としてphRG-TK (Promega) を共発現させた。典型的なアッセイでは1 wellあたり60 ngのレポーターベクター、50 ngの発現ベクター、6 ngのphRG-TKベクターを混合し、さらに最終のDNA濃度を一定にするためpcDNA3を加えて合計260 ngとした。トランスフェクション後24時間経過した時点において、細胞はPBSで洗浄後、Passive Lysis buffer (Promega) を用いて溶解し、Dual Luciferase Assay kit (Promega) によってホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。測定にはFluoroskan Ascent FLルミノメーター (Labsystems) を使用した。

時計遺伝子プロモーター活性のリアルタイム計測

トランスフェクション前日に NIH3T3 細胞を35 mm プレートに30万個になるように播種し、lipofectamine PLUS (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。24時間後、細胞は0.1 µMデキサメサゾン (Nakalai Tesques) で2時間処理し、10%ウシ胎児血清、10 mM HEPES バッファー (pH 7.2), 0.1 mM ルシフェリン (Toyobo), 25 U/ml ペニシリン, 25 µg/ml ストレプトマイシンを含むDMEMで置き換え、クロノス (AB2500 Kronos; ATTO) によって10分間隔で発光量を測定した。細胞は4日以上培養し発光量は10ポイント移動平均をとり、12時間の移動平均を用いてデトレンドを行った。

リアルタイムRT-PCRによるRNAの定量

NIH3T3細胞はデキサメサゾン2時間処理し、処理から24時間経過した時点から4時間間隔で24時間にわたって同細胞からRNAを抽出した。RNA抽出にはISOGEN (日本ジーン) を用いた。RNAは逆転写酵素で1本鎖DNAを合成後、トポIおよびGAPDH 特異的プライマー、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用いてABI 7300 (Applied Biosystems) により定量化した。

ゲルシフトアッセイ

CLOCK, BMAL1, DBPタンパクはTNT T7 coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) によってCLOCK/pCR3.1, BMAL1/pcDNA3, DBP/pcDNA3.1を用いて合成した。トポIプロモーター/エンハンサー領域にある2箇所のE-box, 1箇所のD-box周辺領域配列を合成後、二本鎖としプローブとして用いた。二本鎖オリゴヌクレオチドはT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara) を用いて [γ -³²P] ATP (Amersham) によりラベルした後、各蛋白と結合バッファー (5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-

HCl (pH 7.5), 0.25 ug/ul poly dIdC in 20% glycerol) 中で 4°C, 20 分間インキュベーションし, 6% ポリアクリルアミドゲルで 130 V の条件で電気泳動した. 泳動後ゲルはゲルドライヤーで乾燥し, BAS-5000 画像解析システム (Fuji Photo Film) を用いて解析した. ゲルシフトに用いたプローブの配列は以下の通りである. 下線は時計遺伝子結合コア配列およびその配列に対応する変異導入配列を示している.

mTopo-E1: 5'-

GCCTTTAAGGCCTACCACGTGGCCGCCCGGGTG-3';

mTopoI-E1-mut: 5'-

GCCTTTAAGGCCTACGGTGTGGCCGCCCGGGTG-3';

mTopoI-E2: 5'-

GAAGTTAGGCTGTTACACAACTGCTGGGGTCTGTTC-3';

mTopoI-E2-mut: 5'-

GAAGTTAGGCTGTTACATTACTGCTGGGGTCTGTTC-3';

mTopoI-D: 5'-

GAAATGCGAACTTAGGCTGTTACACAACTGCTGGGG-3';

mTopoI-D-mut: 5'-GAAATGCGAACTTAGGCTGGGACACAACTGCTGGGG-3'

結果および考察

トポI RNAおよびプロモーターはNIH3T3 細胞でリズム発現する

リアルタイム RT-PCR によって NIH3T3 細胞におけるトポI RNA の発現を解析したところ, デキサメサゾン刺激終了後 24 時間目より発現の増加がみられ, 約 32 時間目でその発現はピークに達し, その後 48 時間までの間に徐々に低下した (Fig. 1A). 統計解析 (one-way ANOVA) ではこの発現変動に有意差 ($P < 0.05$) がある

ことが示された. 次にトポIのプロモーターにリズム発現があることを確認するため Kronos を用いたプロモーター活性リアルタイム測定を行なった. この解析ではトポIプロモーター活性のピークがデキサメサゾン添加の約 30 時間後にみられ, RNA リズムのピークより約 2 時間早く活性のピークが出現することが示された (Fig. 1B). これら 2 種類の解析により, トポI発現には細胞レベルで概日リズムがあること, このリズムはグルココルチコイドの変動とは独立のものであることが明らかとなった⁷⁾.

トポIのプロモーター領域配列の解析

マウスのトポIプロモーター領域をゲノムデータベースより抽出し, 転写因子結合部位を MatInspector (Genomatix) を用いて解析したところ, 2 箇所の E-box (E1: CACGTG, E2: CAAGT) と 1 箇所の D-box があることが明らかになった. これらの時計遺伝子結合配列^{8,9)}のうち, E2, D-box は転写開始点より下流のエクソン 1 に存在していた (Fig. 2A, B). マウスのトポIプロモーター領域をヒトの同領域と比較すると, E1, E2 および D-box の配列は両種で 100% 一致することが示され, 時計遺伝子結合配列は極めて高く保存されていることが明らかになった (Fig. 2C). リアルタイムプロモーター活性の測定解析の結果を合わせると, この領域は強いプロモーター活性を示すとともに, リズム発現のための必要かつ十分な領域も含まれていることが裏付けられた.

E-boxおよびD-boxはトポIのリズム発現に必要である

トポIのプロモーター領域にある E-box (E1, E2) および D-box が, 概日リズム性発現に関与していることを確認するため, これらの配列に変異を導入したプロモーターを 5 種類 (E1, E2, D, E1/E2, E1/D, E1/E2/D-box) 作成した. E1, E2 および D-box の各 1 箇所に変異を導入したプロモーターでは, E2 および D-box の

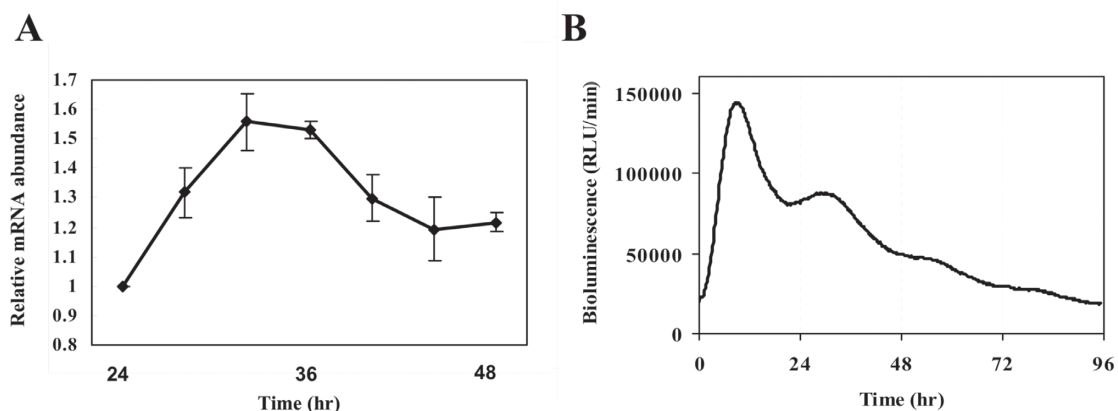


Fig. 1. NIH3T3細胞におけるトポイソメラーゼI (トポI) の発現. (A) トポIのRNA発現レベルをリアルタイムPCRによって解析した. RNAはデキサメサゾン刺激24時間後に4時間毎に細胞から抽出し, トポI RNAを定量した. エラーバーは標準偏差を示す. リズム性発現は, 継続的にサンプリングしたデータをone-way ANOVAにより解析 ($P < 0.05$) した. (B) トポIプロモーターレポーターを NIH3T3 細胞にトランスフェクションし, クロノスによって10分間隔で継続的にプロモーター活性を計測した. 同調には 0.1 μ M デキサメサゾンを2時間添加した.

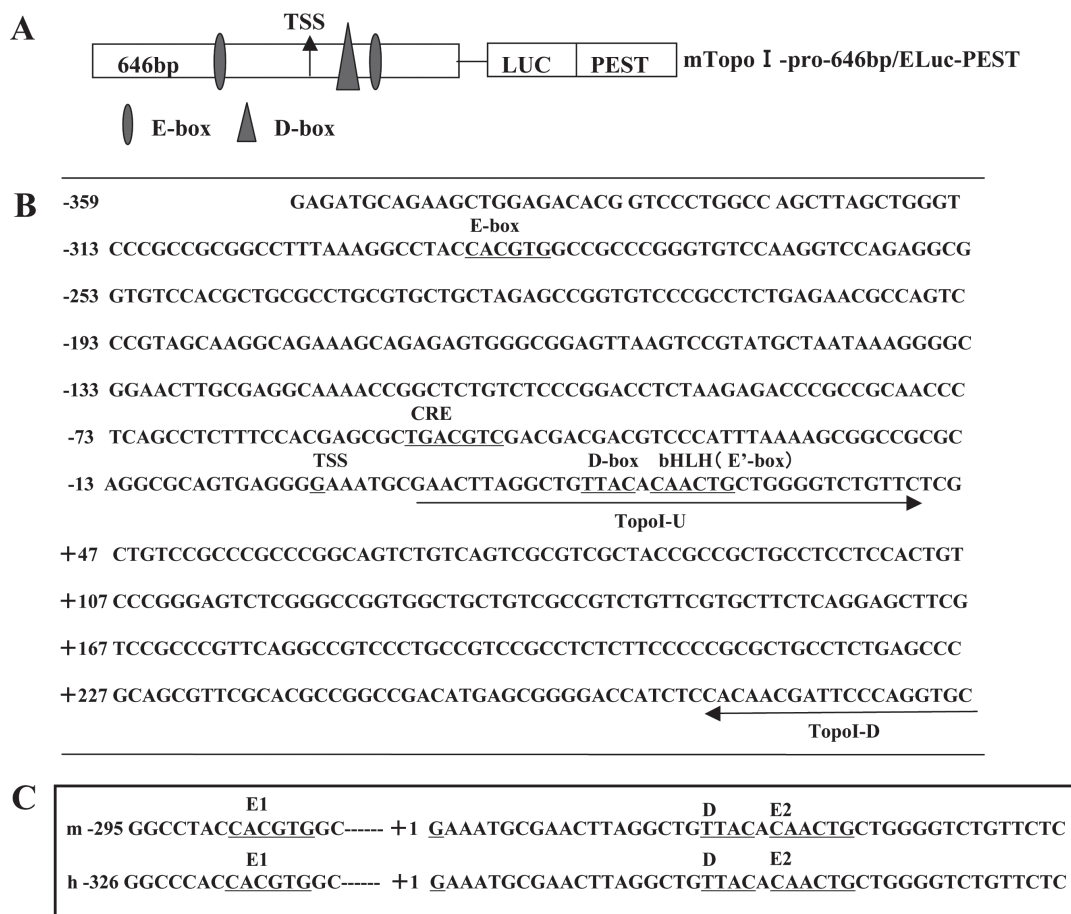


Fig. 2. マウス トポI プロモーターの構造と転写因子結合部位. (A) マウス トポI プロモーター構造の模式図. マウス トポI のプロモーター配列はマウスゲノムDNAを鋳型にしてPCRによって得た. PCR断片はTA法によりレポーターベクター (ELuc-PEST-T-vector) に導入した. 646bpの配列には2箇所のE-box (E1, E2) とD-boxがあることがMatInspectorによる解析から示された. (B) マウス トポI プロモーター領域の塩基配列と転写因子結合部位. マウス トポI プロモーターにはE-box, D-boxを始めCREがあることが示された. E2, D-boxは転写開始点 (TSS) より下流のエクソン1に存在する. (C) マウスとヒトのトポI プロモーター領域の比較. E-box (E1, E2) とD-boxの配列, 位置および周辺配列が両者間で極めて保存されている.

変異体で60%以上の振幅の低下が見られた. これに対してE1の変異では大きな低下はなく, リズム発現にはE2およびD2が主に関与していることが示唆された (Fig. 3). 時計遺伝子結合配列に2箇所以上変異を導入したコンストラクト (E1/E2, E1/D, E1/E2/D-box) は著しく振幅が低下した (Fig. 3). 以上の結果よりリズム発現にはE2およびD-boxの両者が協調的に機能してプロモーターレベルでリズム性の転写発現制御を行っていることが示された.

トポIはCLOCK/BMAL1ヘテロダイマーおよびDBPによって転写活性化される

時計遺伝子による転写制御を確認するため, ルシフェラーゼアッセイによってトポIプロモーターがCLOCK/BMAL1およびDBPによって転写制御を受ける可能性を検索した. NIH3T3細胞にトポIプロモーターレポーターコンストラクトとCLOCK/BMAL1あるいはDBP発現コンストラクトを同時にトランス

フェクションし, ルシフェラーゼ活性を測定したところ, CLOCK/BMAL1のトランスフェクション量依存的にレポーター活性の増加がみられた (Fig. 4A). またDBPも同様にトポIプロモーターレポーターの活性を増加させた (Fig. 4A). 以上より, トポIは時計遺伝子CLOCK/BMAL1およびDBPによって転写が増加することを確認した.

CLOCK/BMAL1およびDBPはそれぞれE1およびD-boxに結合する

トポIのプロモーター領域にある時計遺伝子結合配列E1, E2およびD-boxに時計遺伝子産物が結合することを確認するため, ゲルシフト法で解析した. 時計遺伝子産物は網状赤血球ライゼートの系で合成し, トポIのプロモーター領域由来のE1, E2およびD-box配列に対する時計遺伝子産物の結合を検討した. CLOCK/BMAL1はE2に対してはバンドシフトが見られたが, E1に対しては結合はみられなかった (Fig. 4B). E1,

E2 変異体を用いたクロノスによるリズム解析において、E1 変異体では殆ど振幅変化が見られなかったことを考え合わせると、E1 配列はBMAL1/CLOCKが結合してリズム発現調節を行なっている可能性は極めて低いことが示唆された。これに対してE2, D-boxにはCLOCK/BMAL1, DBPがそれぞれ結合する結果が得られ、クロノスによる変異体の解析によってE2, D-box変異が振幅を著しく低下させた結果と合わせると、トポIはプロモーター領域にあるE2, D-boxを介して、時計遺伝子CLOCK/BMAL1, DBPによってリズム発現していることが強く示唆された。

概日リズムは*Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry*によって構成される転写、翻訳からなるネガティブフィードバック機構によって、作り出されていると考えられている^{8,9)}。生体内で概日リズム性発現する遺伝子は、時計遺伝子によって直接転写制御を受けることによってリズム発現するものと、副腎皮質ホルモンの濃度変化に応答してリズム発現するものの2種類に大きく分けられるとされている⁷⁾。本研究からトポIは細胞レベルでリズム発現すること、プロモーターがNIH3T3細胞で自律的にリズム発現すること、変異体の実験からプロモーター領域にあるE2, D-boxを介して時計遺伝子によるリズム発

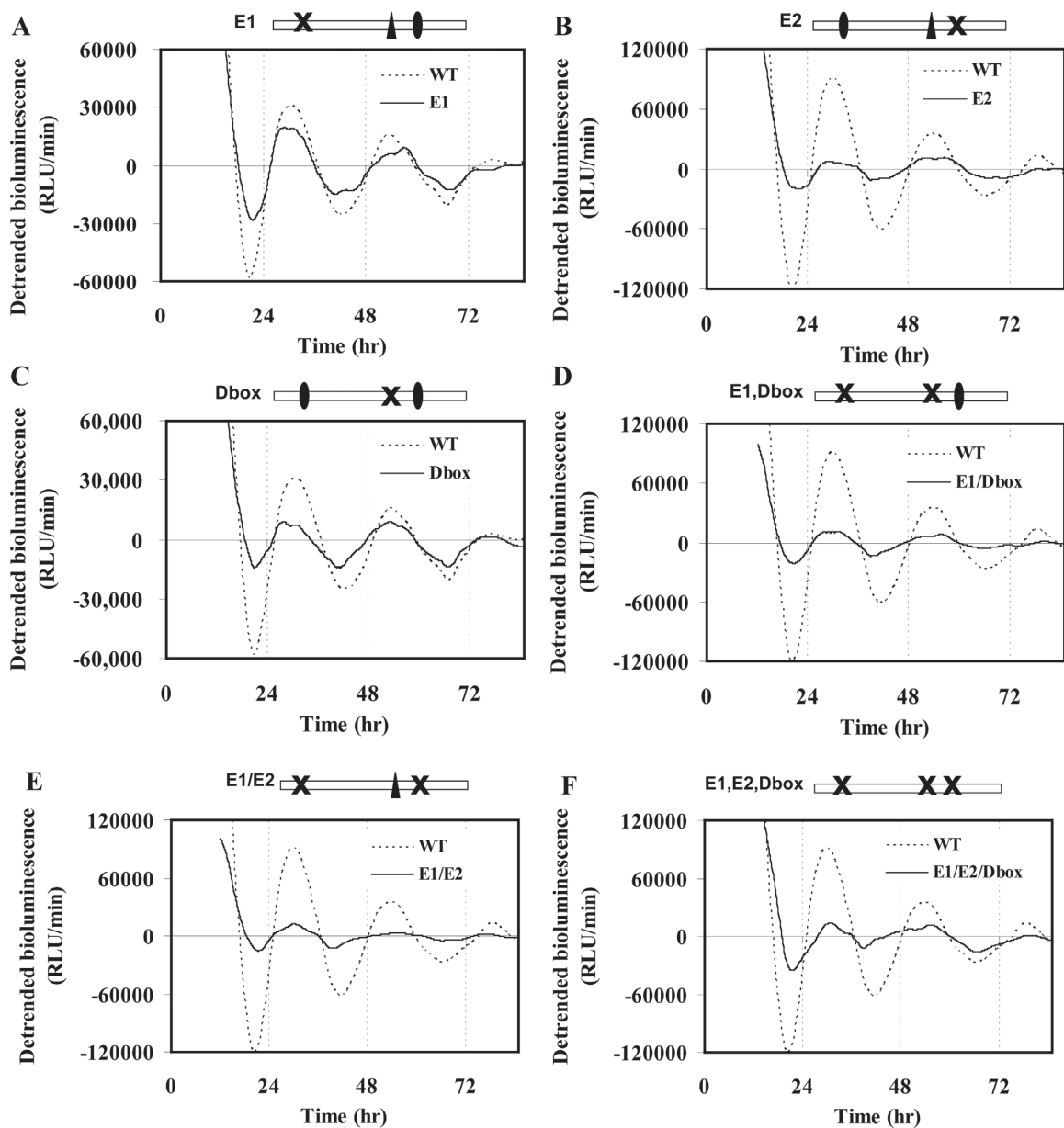


Fig. 3. リアルタイムレポーター活性測定によるトポIプロモーターの概日リズム性転写活性変動とE, D-boxの関与。NIH3T3細胞にトポIプロモーターベクターをトランスフェクションし、デキサメサゾンによる同調刺激を加えた後、クロノス(Kronos)によりリアルタイムでレポーター活性を測定した。プロモーター領域にあるE1, E2 およびD-boxは変異導入を行い、変異体を作成してリズム発現を解析した。A; E1変異体, B; E2変異体, C; D-box 変異体, D; E1/D-box 変異体, E; E1/E2 変異体, F; E1/E2/D-box 変異体。

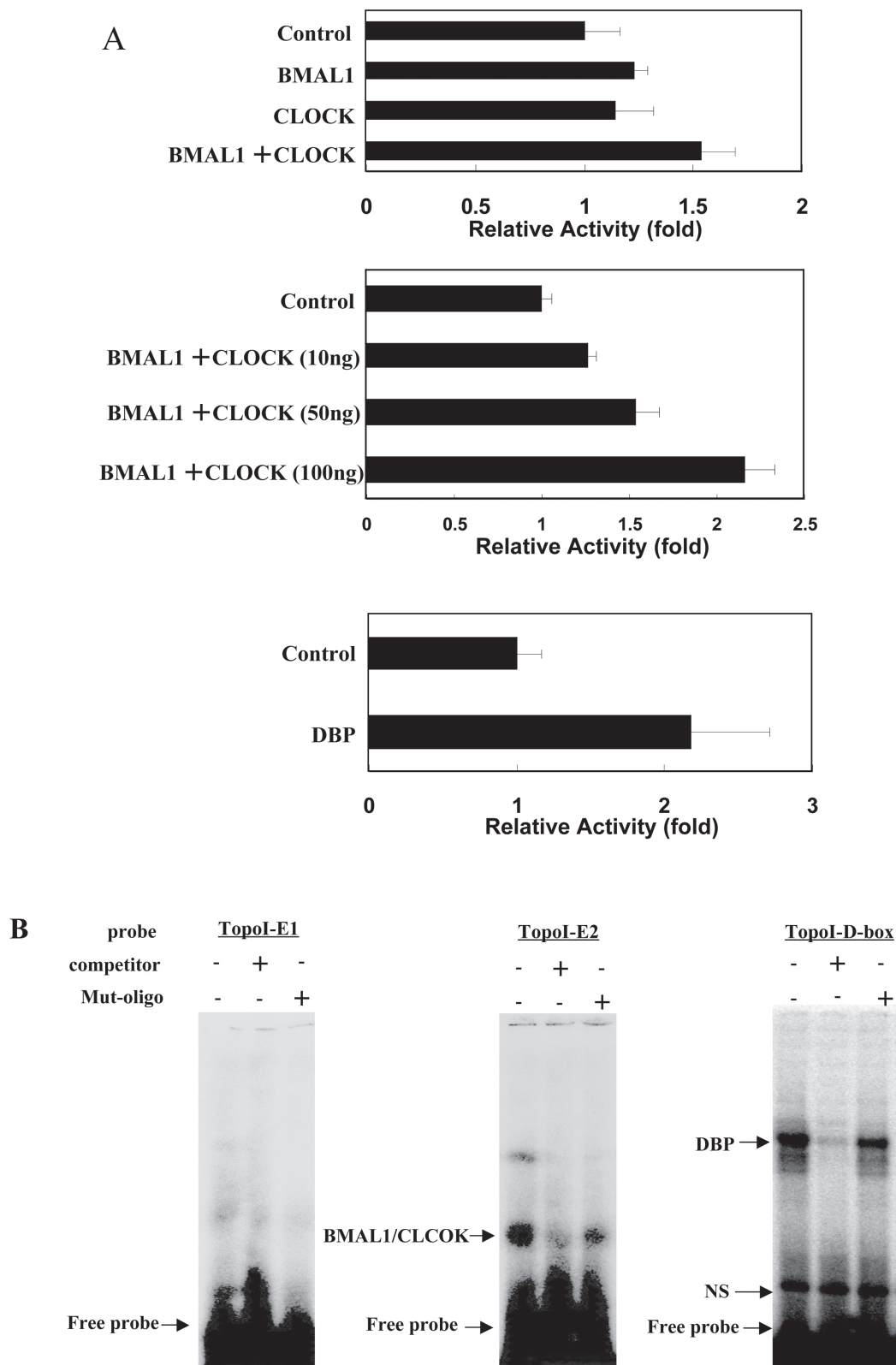


Fig. 4. トポIプロモーターはBMAL1/CLOCK, DBPによって転写制御される。(A) ルシフェラーゼアッセイによるトポIプロモーターのBMAL1/CLOCK, DBPによる転写調節の解析。BMAL1/CLOCK発現ベクターのトランスフェクション量に依存して転写活性化が起こる。DBPによって約2倍の転写活性化が見られる。(B) ゲルシフトアッセイによるBMAL1/CLOCK, DBPのトポIプロモーター内に存在する時計遺伝子結合候補配列への結合実験。BMAL1/CLOCKはE2に結合するがE1配列には結合能が見られない。また、DBPはD-boxに特異的に結合する。

現制御を受けていることが明らかになった。カンプトテシンはトポI活性の高い腫瘍細胞で感受性が高いことが知られており、正常細胞と腫瘍細胞においてトポIのリズム発現位相が異なる場合は、腫瘍細胞における発現のピークに薬物を投与することで薬物への感受性が高く、正常細胞に対する影響を最小にすることが可能である¹⁰⁻¹³⁾。今後は種々の腫瘍と正常細胞・臓器との間のトポI位相の相違、カンプトテシン感受性の概日リズムを解析し、腫瘍に対する時間治療を確立するための分子基盤を確立していく予定である。

結 語

トポIは細胞レベルでリズム発現すること、プロモーターがNIH3T3細胞で自律的にリズム発現すること、変異体の実験からプロモーター領域にあるE2, D-boxを介して時計遺伝子によるリズム発現制御を受けていることが明らかになった。トポIの概日リズム性発現の分子機構が明らかになったことから、トポIを標的としているカンプトテシンなどの抗がん剤による時間治療について、分子レベルでの理解が進む可能性がある。

謝 辞

本研究の多くは埼玉医科大学ゲノム医学研究センタープロジェクト研究部門分子時計プロジェクトで実施された。実験施設と機器を提供していただいたゲノム医学研究センターの皆様へ感謝します。本研究は平成20年度学内グラントにより支援を受けて実施された。

文 献

- 1) Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 1989;58: 351-75.
- 2) Ohdo S, Makinosumi T, Ishizaki T, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, et al. Cell cycle-dependent chronotoxicity of irinotecan hydrochloride in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283:1383-8.
- 3) Kuramoto Y, Hata K, Koyanagi S, Ohdo S, Shimeno H, Soeda S. Circadian regulation of mouse topoisomerase I gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1155-61.
- 4) Filipinski E, Lemaigre G, Liu XH, Mery-Mignard D, Mahjoubi M, Levi F. Circadian rhythm of irinotecan tolerability in mice. *Chronobiol Int* 2004;21:613-30.
- 5) Kunze N, Klein M, Richter A, Knippers R. Structural characterization of the human DNA topoisomerase I gene promoter. *Eur J Biochem* 1990; 194:323-30.
- 6) Baumgartner B, Heiland S, Kunze N, Richter A, Knippers R. Conserved regulatory elements in the type I DNA topoisomerase gene promoters of mouse and man. *Biochim Biophys Acta* 1994;1218:123-7.
- 7) Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N, Ishida N. Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res*. 2005;12:191-202.
- 8) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al. CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 1998;280:1564-9.
- 9) Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet*. 2005;37:187-92.
- 10) Lévi F. The circadian timing system, a coordinator of life processes. implications for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;Suppl:6736-9.
- 11) Lévi F, Filipinski E, Iurisci I, Li XM, Innominato P. Cross-talks between circadian timing system and cell division cycle determine cancer biology and therapeutics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:465-75.
- 12) Qvortrup C, Yilmaz M, Ogreid D, Berglund A, Balteskard L, Ploen J, et al. Chronomodulated capecitabine in combination with short-time oxaliplatin: a Nordic phase II study of second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer after failure to irinotecan and 5-fluorouracil. *Ann Oncol*. 2008 J;19:1154-9
- 13) Ohdo S. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: chronopharmacological findings on antitumor drugs. *J Pharmacol Sci*. 2007;103:155-8.

研究成果リスト

学会：

- 1) Yang F, Nakajima Y, Kumagai M, Ikeda M. The molecular mechanism regulating circadian rhythm of TopI expression in NIH3T3 cells.
第15回 日本時間生物学会学術大会 平成20年11月8-9日 岡山

原著：

- 1) Yang F, Nakajima Y, Kumagai M, Ohmiya Y, Ikeda M. The molecular mechanism regulating the autonomous circadian expression of Topoisomerase I in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;380:22-7.

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

マイクロアレイ解析を用いた脳腫瘍における
ポルフィリン代謝経路の解析

研究代表者 鈴木 智成(埼玉医科大学 医学部 脳神経外科)

研究分担者 脇谷 健司¹⁾, 安達 淳一¹⁾, 三島 一彦¹⁾, 松谷 雅生¹⁾,
西川 亮¹⁾, 江口 英孝²⁾, 西山 正彦²⁾

緒言

原発性脳腫瘍の中で、神経膠芽腫を代表とした悪性脳腫瘍の治療成績は、診断治療法が進歩した現在でも目立った改善は得られていない。予後を決定する最大の要素は組織の悪性度であるが、治療に関する予後因子としては手術での摘出率が重要であると言われている。しかし、特に悪性神経膠腫は極めて浸潤性が高く、たとえMRIにて境界明瞭に造影される腫瘍であっても、実際の手術においては肉眼的に脳腫瘍と正常脳との境界は判然とせず、専ら術者の主観と経験に基づいて摘出術が行われてきた。

そこで、客観的な判断に基づく腫瘍組織の選択的摘出の一つとして、光感受性物質を用いた術中蛍光診断による腫瘍摘出法が注目を集めている。5-ALA (5-aminolevulinic acid) は天然に存在するヘモグロビンの前駆体であり、これを手術に先立ち経口摂取させ体内に吸収させると、腫瘍特異的にヘム合成系によるポルフィリン合成が行われ、蛍光性のPpIX (protoporphyrin IX) の蓄積が認められる。腫瘍と疑われる組織に波長405 nmの青紫色のレーザー励起光を照射すると、PpIXが蓄積した部位では635 nmにピークを持つ赤色蛍光を呈する。これにより正常部と腫瘍の判別を容易にし、腫瘍部位の選択的摘出を可能とする。

実際、Stummerらは332人の無作為化第III相比較試験を行い、5-ALAを用いた蛍光ガイド下の脳腫瘍摘出は白色光下でのみ摘出を行ったコントロール群と比べ、造影部分すべてが摘出された割合が有意に高く(65% vs 36%, オッズ比(OR):3.28, 95%

CI:1.99-5.40, $P < 0.0001$), Karnofsky スコアがORで3.20 (95% CI:1.98-5.40, $P = 0.0001$)と改善が認められ、また6ヶ月の無増悪生存割合は21.1%から41.0%と有意に改善を示した($P = 0.0003$)と報告している。

腫瘍におけるPpIX蓄積の機序として、これまで悪性脳腫瘍細胞におけるヘム合成酵素系の異常、例えばferrochelataseの活性低下、prophobilinogen deaminaseの活性上昇、ミトコンドリアへの移送に関係するperipheral benzodiazepine receptorの発現上昇によるPpIXの産生上昇あるいは分解抑制などが提唱されているが、これまで統合的な解析は行われておらず、その全体像については未だ明らかになっていない。

実際の手術において、神経膠芽腫など悪性度の高い腫瘍は蛍光の陽性率が高く、低悪性度神経膠腫では陰性であることが多い。さらに、同一個体の腫瘍の中にも良好に蛍光を発する部位とそうでない部位が混在する症例や、同じ組織型であっても陽性と陰性を示す症例が存在する。

このように神経膠腫同一組織型や同一固体において蛍光の陽性・陰性の差が生じる機序について検討するため、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

材料と方法

1) 対象症例

平成17年2月より平成20年7月の間に研究課題:「手術で取り出した脳・脊髄腫瘍の標本と血液の保存および研究への利用に関するお願い」における将来の医学的研究の同意を文書で得られたもの(A群試料)で、5-ALAによる術中蛍光診断を行い、病理学的に神経膠芽腫と診断された26症例を対象とした。

2) アミノレブリン酸の投与

1) 埼玉医科大学 国際医療センター 脳神経外科
2) 埼玉医科大学 国際医療センター トランスレーショナルリサーチセンター

手術当日に術開始約4時間前に5-ALA 20 mg/kgを電解質溶液に溶解し経口投与を行った。経口投与が困難な症例については、全身麻酔導入直後に同量の5-ALAを生理食塩水に溶解し胃管より投与した。

3) 蛍光診断および検体採取

開頭手術にて腫瘍を観察し、半導体レーザー装置 (VLD-M1 ver.3.0 SP:M and M 社) より出力 140 mW、振幅波長 405 nm の violet-blue 励起光にて腫瘍が疑われる部位を照射し、分光解析装置 (BW-Spec Operating Software (B and W Tec.)) を用いて、PpIX 特異的波長ピーク (635 nm) を検出した。摘出部位は肉眼所見による執刀医の判断により行った。術中蛍光診断による手術組織の蛍光陽性・陰性を記録し、検体を陽性陰性の各部位に分けて凍結保存した。

4) マイクロアレイ

凍結保存手術検体に対し、分光解析装置のレーザー光をあて、診断時の蛍光陽性・陰性記録と一致するか確認を行った。その後、全ての検体から NucleoSpin RNA 抽出キット (Macherey-Nagel) を用いて全 RNA を調整し、Bioanalyzer (Agilent) にて RNA が分解されていないかを検査した。マイクロアレイ実験に適した良質な RNA 検体 (RNA Integrity Number > 7.0) のみについて、Quick Amp Labeling Kit (Agilent) で cRNA 合成によるラベリングを行い、Whole Human Genome 44 k (Agilent) マイクロアレイにて遺伝子発現プロファイルを得た。GeneSpring GX (Agilent) 解析ソフトウェアを用いて遺伝子発現データを標準化し、バイオインフォマティクス的手法や統計学的手法 (SAM: Significance Analysis of Microarray, WAD: Weighted Average Difference) によって陽性検体と陰

性検体の2群間比較を行った。

結 果

神経膠芽腫 26 検体のうち、励起レーザー光照射下での蛍光について、同一個体で蛍光陽性および陰性を示した手術組織が 5 例あり、その他はすべて蛍光陽性症例であった。Bioanalyzer による RNA 品質確認において、26 検体のうち、6 検体で RNA の顕著な分解が認められたため、残りの 20 検体をマイクロアレイ解析に供した。標準化した遺伝子発現プロファイルデータを基に、陽性検体群と陰性検体群に対して 1) 同一個体において陽性と陰性の組織部位が存在する検体を用いたペア解析と、2) 全ての検体を解析対象とした 2 群間比較解析を行い、それぞれの解析において有意に発現量の異なっている 1000 遺伝子を抽出した。1), 2) の両解析で共通して有意な発現量の差異が認められたものは 16 遺伝子であった。そのうち、アノテーションが付与されている 12 遺伝子を 5-ALA による蛍光診断における陽性・陰性規定候補遺伝子として選定した。(Table 1, Fig.1)

考 察

神経膠腫の手術において、正常脳との判別にアミノレブリン酸による蛍光診断が有用であるという報告は多いが、実際の手術では蛍光が極めて微弱な症例や肉眼的には明らかに腫瘍と思われても蛍光を示さないことがある。このような不安定な蛍光発色は、術中蛍光診断法において改善が望まれるところであり、そのためにはアミノレブリン酸による蛍光発色の分子メカニズムを明らかにする必要がある。

Table. 1. Candidate genes of the fluorescence diagnosis by 5-ALA in the glioblastoma

GeneSymbol	Description
HSPA1A	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA [NM_005345]
DHCR24	Homo sapiens 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24), mRNA [NM_014762]
UBQLN1	Homo sapiens ubiquilin 1 (UBQLN1), transcript variant 2, mRNA [NM_053067]
RHOBTB3	Homo sapiens Rho-related BTB domain containing 3 (RHOBTB3), mRNA [NM_014899]
ACCN2	Homo sapiens amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal (ACCN2), transcript variant 1, mRNA [NM_020039]
GPSM3	Homo sapiens G-protein signalling modulator 3 (AGS3-like, C. elegans) (GPSM3), mRNA [NM_022107]
TLCD1	Homo sapiens TLC domain containing 1 (TLCD1), mRNA [NM_138463]
MMP17	Homo sapiens matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted) (MMP17), mRNA [NM_016155]
ASCL1	Homo sapiens achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila) (ASCL1), mRNA [NM_004316]
ITM2A	Homo sapiens integral membrane protein 2A (ITM2A), mRNA [NM_004867]
SLC16A9	Homo sapiens solute carrier family 16, member 9 (monocarboxylic acid transporter 9) (SLC16A9), mRNA [NM_194298]
KRTAP5-8	Homo sapiens keratin associated protein 5-8 (KRTAP5-8), mRNA [NM_021046]

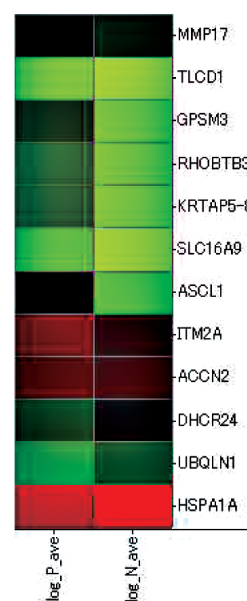


Fig. 1. Signal intensity of candidate genes.

今回、候補として挙げた12遺伝子について、既報に基づき、アミノレブリン酸代謝あるいは癌等疾病との関連を検討した。

まず、*HSPA1A*は第6染色体上にあるheat shock protein 遺伝子であり、パーキンソン病や痴呆など中枢神経系疾患との関連がこれまでに報告されている。また肝細胞癌での発現上昇が認められており、発癌や薬剤耐性への関与が示唆されている。神経膠芽腫においては温熱療法やシスプラチンなどの抗腫瘍治療により同遺伝子の発現が抑制される。また、*HSPA1A*の高発現により、グルコース代謝が活発化されるという報告もある。

一方、*SLC16A9*はモノカルボン酸トランスポーター遺伝子であり、アミノレブリン酸の輸送への関与も考えられる。5-ALA取り込みによる蛍光発色の有無が輸送蛋白質の発現と関与するか、極めて興味深い。

今後、これらのマイクロアレイにより選定された候補遺伝子について、TaqMan Probeを用いたReal time RT-PCR法によって定量的遺伝子発現解析を行い検討する予定である。また、マイクロアレイデータを基に候補遺伝子のネットワーク解析を行い、ポルフィリン

代謝経路やその他の機能ネットワークとの関連についても検討を進める。(Fig.2)さらに、培養細胞を用いたノックダウン実験や強制発現実験による機能解析を進め、術中蛍光診断での陽性・陰性を示す作用機序を明らかにできれば、将来の手術精度向上や、患者の予後改善が期待される。

研究成果リスト

- 1) 鈴木智成, 石原正一郎, 杉山達也, 中島弘之, 根木宏明, 脇谷健司, 安達淳二, 三島一彦, 西川亮, 松谷雅生: 神経内視鏡下腫瘍生検時における脳室壁観察の重要性 第15回日本神経内視鏡学会 2008.7月(学会発表)

謝 辞

本研究は平成20年度埼玉医科大学、学内グラントにより行われた。遺伝子解析およびネットワーク解析において、ご高配を賜りましたトランスレーショナルリサーチセンター 和田智先生に深謝いたします。

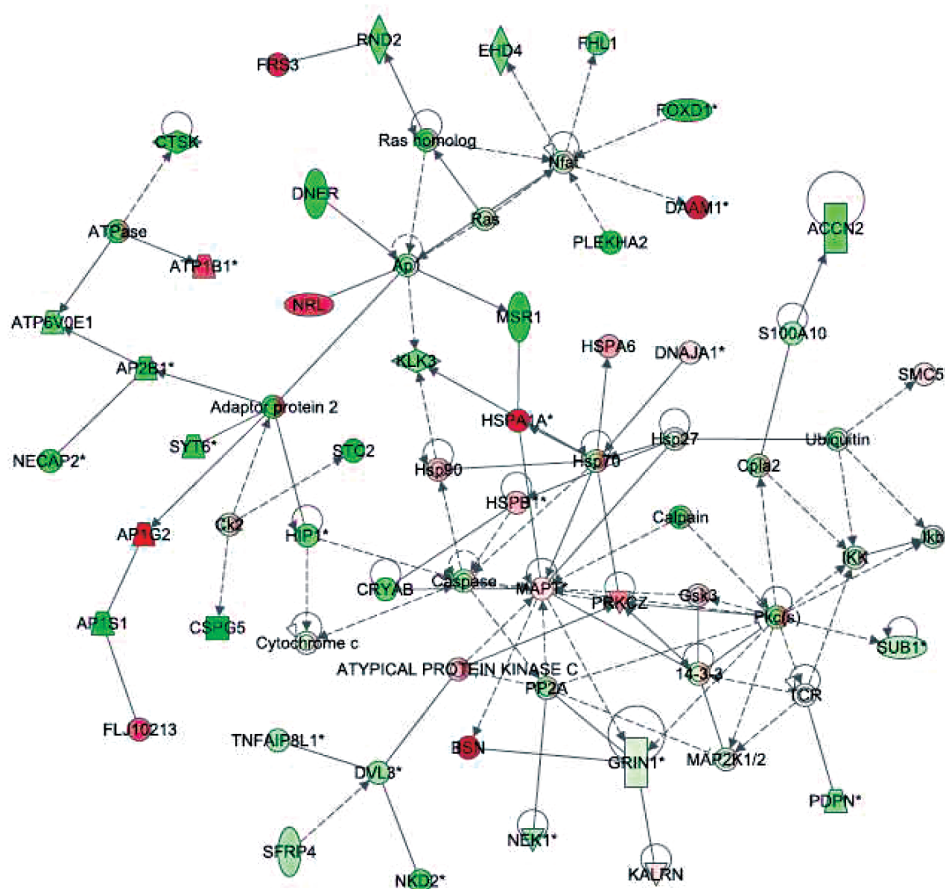


Fig. 2. Network analysis of candidate genes.

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

生体吸収性ポリマーによる胃壁の再生

研究代表者 合川 公康

(埼玉医科大学 国際医療センター 消化器病センター 消化器外科)

研究分担者 宮澤 光男*, 岡田 克也*, 鳥井 孝宏*,
利光 靖子*, 小山 勇*

緒言

近年、胃に発生する腫瘍性病変は、診断、治療機器の進歩により、低侵襲治療が可能となっているが、低分化癌や粘膜下腫瘍では、小さな病変でも胃壁の全層切除が必要になることが多い。胃はその形態的特徴のため、切除部位によっては直接縫合閉鎖を行うと変形や狭窄を起こし、たとえ広範囲の胃を温存可能でも、術後のquality of life を著しく悪化させる。そこで、我々は胃壁欠損部を代用胃壁により修復し、変形や狭窄を最小限にとどめれば、過大な胃切除が不要となり、生体機能を温存させた根治術が可能になると考えた。本研究においては、我々が開発している生体吸収性ポリマー (Bioabsorbable polymer; 以下BAP) を用い、代用胃壁 (Artificial gastric wall; AGW) を作成、広範な胃壁欠損部に移植し、胃壁を再生させることが可能を検討した。

材料と方法

研究計画調書概要における方法を一部改訂し実験を行った。今回使用するAGWはポリカプロラクトンとポリ乳酸の50:50共重合体をポリグリコール酸の繊維で補強したもので、約8週間で分解吸収される。厚さは約5 mm、繊維構築が異なる2種のシートによる多層構造になっている。雑種ブタ (n = 9) を全身麻酔下に開腹し、胃体中部前壁を8X8cm (48 cm²) 切除し (ブタ胃体中部の約1/3周)、ここに同サイズのAGWをパッチ状に移植し欠損を閉鎖した。移植1週間後に上部消化管内視鏡検査を施行し、移植4週後 (n = 3)、8週後 (n = 3)、12週後 (n = 3) に、胃を全摘出し、移植部を肉眼的、組織学的に観察した。結果:ブタは全例

(n = 9)、体重の減少なく犠牲死させるまで生存した。移植4週後、移植部は平均13.95 cm²の潰瘍を形成していた。移植8週後、移植部は平均0.92 cm²の潰瘍を形成しており、潰瘍周囲の粘膜は多量の粘液分泌を伴う不揃いな腺管構造を呈し、潰瘍部は結合組織増生と炎症細胞の浸潤が認められた。移植12週後、肉眼的に移植部の胃壁厚はnativeに比較して薄かったが、変形はなく、漿膜面、粘膜面ともにnative胃と同様であった。結合組織は著明に減少しており、粘膜、粘膜下層、固有筋層ともにnative同様に再生していた。

考察

消化管壁を代用できる素材の探求は現在までに様々な検討がなされており、代用素材として非吸収性素材と吸収性素材に大別される。非吸収性素材の代表的なものはpolytetrafluoroethylene (PTFE) であり、これを用いた消化管欠損部修復の報告では短期的に問題ないとしているが、恒久的に異物が消化管壁に残ることは、慢性炎症反応による硬化や狭窄などの有害事象をひきおこすことが予想される。代表的な生体吸収性素材としてはブタ由来small intestinal submucosa (SIS) やコラーゲンスポンジなどが報告されている。マウスの胃壁欠損をSISで修復した検討では、約3週目で犠牲死させ欠損部の閉鎖を確認している。しかし、欠損部はgranulationとfibrosisにより閉鎖されており正常な胃壁構造が再生したことは証明されていない。本実験では、AGWは胃欠損部を全層性に再生させることができる素材であることが確認できた。今後は、詳細に組織学的所見を検討し、再生過程の解明を行いたい。

結語

本研究の結果より我々が用いたAGWは移植後早期

* 埼玉医科大学 国際医療センター 消化器病センター 消化器外科

にも縫合不全や通過障害がなく, また移植後 12 週にて粘膜がほぼ正常に再生しており, 広い範囲の胃壁欠損の修復に使用可能であることが示唆された.

研究成果リスト

論 文

合川公康, 宮澤光男, 小山勇, 他. 生体吸収性ポリマーによる胃壁の再生. 日消外誌 2009;42(1):139.

学会発表

- 1) 生体吸収性ポリマーを利用して胃を作製することが可能である: 合川公康, 宮澤光男, 小山勇ら:

人工臓器学会, 東京 2008/11/29.

- 2) 生体吸収性ポリマーを利用し広範囲に胃を再生させることが可能である: 合川公康, 宮澤光男, 小山勇ら: 創傷治癒学会, 東京 2008/12/06.
- 3) Tissue engineeringを応用した胃の再生: 合川公康, 宮澤光男, 小山勇ら: 日本再生医療学会, 東京, 2009/03/06.
- 4) 生体吸収性ポリマーによる胃壁の再生: 合川公康, 宮澤光男, 小山勇ら: 日本外科学会総会, 福岡, 2009/04/02.

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

環境有機リン曝露の加齢，視機能低下に及ぼす影響

研究代表者 坂本 安(埼玉医科大学 中央研究施設)

研究分担者 米谷 新¹⁾，廣澤 成美²⁾

【緒言】

有機リン系殺虫剤であるフェニトロチオンは，日本ではスミチオンという商品名で販売され，稲のウンカ，野菜・果物のアブラムシ，桜のアメリカシロヒトリなどの殺虫剤として広く使われている．国内では，佐久病などの子供の眼疾患（近眼等の視力障害）の原因とも指摘されている（大藤ら，眼科学会雑誌1971;75(8):1944-51.）．この他にも，記憶力低下などの神経毒性の報告（菅谷ら，農村医学1981;29:724-47.）もあり，小中学校に近接した農地への空中散布や，校庭内の庭木への散布による子供への影響が懸念されている．

また，近年では内分泌攪乱作用として，抗アンドロゲン作用が指摘されており，ヒト培養細胞による実験の結果，フェニトロチオンのアンドロゲン受容体への結合阻害の強さは前立腺ガン治療薬として使われているフルタミドに匹敵するという報告がある（Tamura H, et al. Toxicological Sciences 2001;60:56-62.）．さらに子供は農薬等に対し，大人よりも強く影響を受けるため，生体曝露への影響に関して現状を把握しより詳細に研究する必要があると考えられ，各種農産物の残留農薬の検出と視機能への影響と生体曝露量を知るためにまず，有機リン剤の尿中生体内代謝産物の定量方法について検討した．

【材料と方法】

1 農産物の残留農薬の検出

1.1 試料

輸入および国内産の野菜と果物は，毛呂山町内で購入した．

1.2 残留農薬の検出

野菜・果物類の残留農薬の検出には，残留農薬（有機リン・カーバメート系）検査キット アグリケム

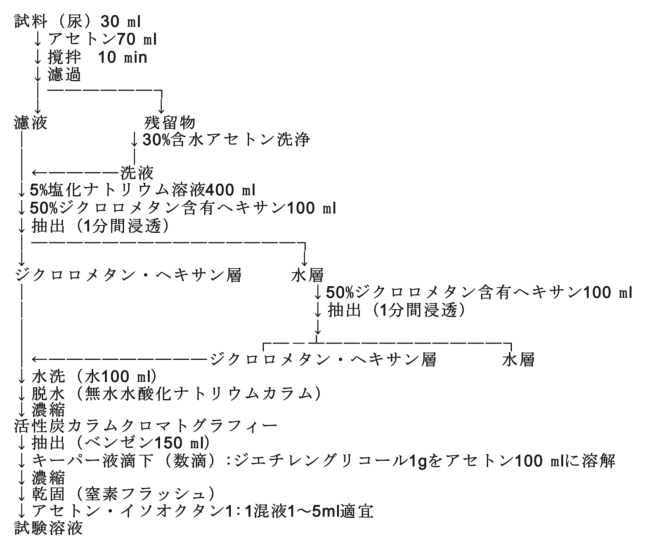
(Institute of Microchemical Technology Co. Ltd) を用いた．

2 有機リン系農薬の代謝産物の尿中濃度測定に関する検討

2.1 試料

雄ラット（Wistar-Imamichi）に，フェニトロチオンを10 mg/kg, 1 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0 mg/kg を1群3匹とし，投与した．代謝ゲージを用いて，24時間毎に，3日間尿を収集し，尿試料とした．

2.2 試料調整



2.3 フェニトロチオン代謝産物の検出

フェニトロチオン代謝産物の3-Methyl-4-nitrophenol (MNP) の検出は，Liquid Chromatography- Mass spectrometry (LC-MS) [HPLC: Magic 2000 (AMR), Mss spectrometry: T100LC(JEOL)] を用い，以下の条件で遂行した．

2.3.1 LC側溶出条件

溶出液A：0.1%酢酸，溶出液B：0.1%酢酸 100% アセトニトリル，グラジエント：(0～20分；3%→95% B) (20～30分；95% Bを維持) (30～35分；95%→3% B)，流速：50 ul/分，カラム：CAPCEL

1) 埼玉医科大学 医学部 眼科

2) 埼玉医科大学 中央研究施設

PACK C1 1.5 ϕ X 50 mm

2.2.3 MS側測定条件

ESI(electro ion spray), Positive ion mode

3 結果

3.1 野菜・果物類の残留有機リン系農薬の検出

17種類の野菜・果物類について有機リン系残留農薬の検出試験を遂行した結果を表1に示す。

3.2 フェニトロチオン代謝産物MNPの検出試験

最も主要な代謝産物と考えられているMNPのLC-MS スペクトルを図1に示す。また、ラット尿より抽出されたMNPの溶出パターンを図2に示す。

4 考察

4.1 野菜・果物類の残留有機リン系農薬量

野菜・果物各試料は、日常的に摂取する一般的なものを選定した。果物類からの残留農薬は検出されなかったが、アスパラを除く葉物系野菜における様に残留農薬量は、弱陽性または陽性であった(表1)。特にコマツナ、ベビーリーフ、レタスに関しては、比較的強い陽性を示し、葉物野菜の商品価値を配慮し使用農薬量が多いものと推定され、これらの野菜の各残留農薬量は、100 ppb以上と考えられる。これは野菜類の基準値(200 ~ 500 ppb)を上回るものではないが、今後ヒトの時間的な曝露量について検討する上で極めて重要な情報である。また、今回、尿中の有機リン系農薬の代謝産物について検討したが、検出イオンの分

子量が理論値 $m/z = 154.0$ であるのに対して151.0が検出されるためイオン化の際に、何らかの副反応が生じていると考えられ現在検討中である(図1)。しかしながら、投与量の最も多いラット尿から同様の質量数が検出されており、実用化することは可能であると判断される(図2)。LC-MSを有機リン代謝産物の検出に応用した例は無く、今後体内濃度と視機能障害との関係を検討する上できわめて重要なツールとなるものと期待される。また、最近有機リン系のLC-MS解析のための専用カラムが市販され、一定の溶出条件等も定まりつつあるため分離系をそちらに変更することに関しても検討中である。

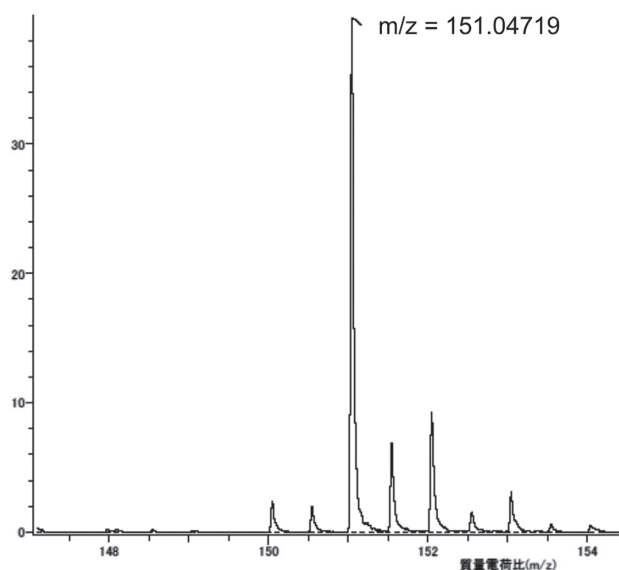


図1. 3-Methyl-4-nitrophenolのESIマスペクトル。

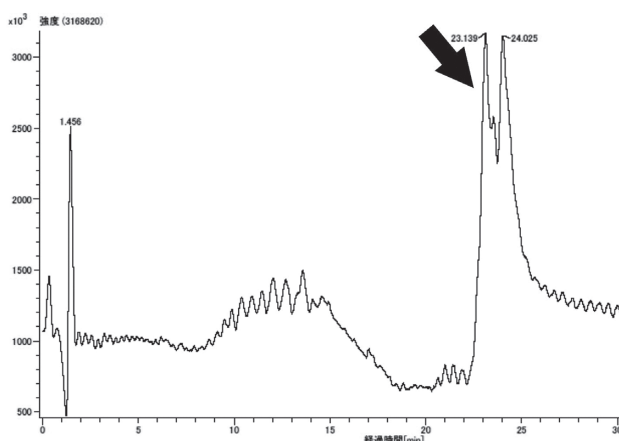


図2. フェニトロチオン投与ラット尿より抽出された3-Methyl-4-nitrophenolのTotal Ion Chromatogram. 矢印は、3-Methyl-4-nitrophenolの溶出位置を示している。

表1. 野菜、果物類の残留農薬検出試験

種類	残留農薬検出量判定 (- 陰性 +弱陽性 ++陽性)
バナナ1	-
バナナ2*	-
キウイ1	-
キウイ2*	-
グレープフルーツ	-
ピーマン	-
ナス	-
キュウリ	-
コマツナ	++
ホウレンソウ	+
チンゲンサイ	+
ミニトマト	+
キャベツ	+
ベビーリーフ	++
レタス	++
アスパラ	+

* 有機栽培品

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

サブスタンス P による血小板凝固活性亢進の分子機構と 痛み治療の役割の検討

研究代表者 東 俊晴(埼玉医科大学 医学部 麻酔科)

研究分担者 菊地 博達*, 成田 弥生*, 塚本 真規*

緒 言

科学的根拠に基づいた疼痛の制御は麻酔科診療の根幹をなしている¹⁾。今日では麻酔・疼痛治療が周術期の短期的・長期的予後に影響を与える可能性が示唆されており、神経ブロックによる鎮痛は静脈血栓塞栓症(VTE)などの血栓症に起因する周術期の致命的合併症を有意に減少することなどが報告されている²⁾。

周術期VTEの本邦における発症頻度は2762件に1件であり、現在ではそれほど稀な合併症ではないと認識されている。死亡率は21.8%であり、発症すると救命は甚だ困難である³⁾。そのため、現在の周術期診療では血栓の発生予防に管理上の重点が置かれている。周術期VTEの原因となる深部静脈血栓症(DVT)を予防するためには、抗凝固薬の使用がもっとも有効であるが、脊椎手術など一部の術式では周術期の抗凝固治療は推奨されていない。また前述のように、神経ブロックによる疼痛治療はVTEに由来する周術期合併症の発生を減少するが、神経ブロックにともなう医原性血腫の発症リスクは抗凝固治療により劇的に増大するため、これらの併用は禁忌である。これらのことから、麻酔・疼痛治療が止血機能を修飾するのであれば、よりよい疼痛管理は周術期の致命的合併症を減少させる有効な手段となりえる。

最近、痛みの伝達物質であるサブスタンスP(SP)の受容体(NK1受容体)アンタゴニストは開腹術後の腹腔内癒着を有意に抑制することが、動物実験により示された⁴⁾。NK1受容体は血小板にも存在し、血小板凝集を惹起することも報告されている^{5,6)}。しかしながら、痛みやSPがどのような分子薬理的機序によりフィブリン形成や止血機能を修飾するか、についての詳細は未だ不明である。

血小板機能のひとつに、血小板表面に特定のリン

脂質(ホスファチジルセリン)を表出させ血液凝固を促進する作用である、血小板凝固活性(platelet procoagulant activity)が知られている⁷⁾。われわれは血小板凝固活性を定量評価するための測定系を構築し、実験的研究を継続してきた。これまで得られた知見から、(1)SPは血小板凝固活性を亢進すること、(2)SPが血小板凝固活性を亢進する作用はNK1受容体を介して起こること、(3)そこに白血球が関与すること、などが確認されている^{8,9)}。

また、若干の周術期患者ならびにペインクリニック診療中の患者から得られた知見により、(1)SPによる血小板凝固活性の亢進には個人差があるが、(2)SPによる血小板凝固活性の亢進と全血中NK1受容体のmRNA発現レベルとの間に関連があり、(3)NK1受容体のスプライスバリエーションの中でも、炎症により誘導される全長(full-length)NK1受容体の発現が重要であること、(4)手術や急性炎症を介してSPに対する反応性を獲得する患者がいること、などを確認し報告している¹⁰⁾(研究成果リスト2-6,8,9)。

SPの血中レベルは疼痛によって増加するため、周術期の疼痛に関連するVTEの発生に対して、SPによる血小板凝固活性の亢進作用が重要な役割を演じている可能性は高い。そこで、われわれは現在進行中の本研究により、周術期VTEを予防するための薬理的疼痛管理法を探索中である。この報告書では、現時点で得られている所見から、周術期の麻酔管理とNK1受容体を介する血小板凝固活性亢進との関連について中間報告する。

方 法

1. 対象の割り付けと麻酔管理法

全身麻酔下に腰部脊柱管狭窄症に対する脊椎手術を計画された患者を対象とした。倫理委員会の承認を得た後、文書による承諾を受けた12人を無作為にレミ

* 埼玉医科大学 医学部 麻酔科

フェンタニル使用群 (R) と非使用群 (C) の二群に割り付けた。手術室入室後、仰臥位で末梢静脈ラインを確保し、クエン酸採血管 (終濃度 0.38%) ならびにパクスジーン RNA 採血管を用いて麻酔前採血を行った (第一相, Ph1)。通常監視装置 (心電図, 非観血的血圧測定, パルスオキシメトリー, カプノメトリー) の他, 鎮静レベルの指標として bispectral index (BIS) センサーを装着した後, フェンタニル 0.2 mg とプロポフォールの静脈投与 (IV) で全身麻酔導入を行い, ロクロニウム (0.6 mg/kg 体重, IV) で筋弛緩を得た後気管挿管を行った。プロポフォールはコンピューターを内蔵する専用シリンジポンプを用いた血中濃度予測により, 3–5 µg/ml を維持する target-controlled infusion を行った。レミフェンタニルは R 群のみ導入開始時にシリンジポンプを使用して 0.25 µg/kg/min の持続投与 (IV) を開始し, 術野の閉創まで継続した。気管挿管が適切であることを確認した後は, 出来る限り速やかに腹臥位に体位変換した。その際, プロポフォールの持続投与を終了し, セボフルランによる維持を開始した。セボフルランは BIS 値 45–50 を目標に調節した。平均動脈圧 60 mmHg を維持できない場合, エフェドリン 4 mg (IV) を使用した。エフェドリンが無効と判断された場合フェニレフリン 0.1 mg (IV) を使用した。一方, 手術に不適切な高血圧であると判断した場合, ニカルジピン 0.5–1 mg (IV) を使用した。手術の主要操作が終了し, 創洗浄を開始した際に二度目の採血を行った (第二相, Ph2)。

2. 下肢静脈超音波画像診断

術前 DVT の有無を検索するため, 手術の 1–3 日に下肢静脈超音波画像診断を施行した。膝窩部より中枢に血栓が認められた場合, 除外症例とし専門医への紹介を優先した。麻酔導入後と手術終了後にも大腿部から膝窩部まで超音波画像診断を施行し, 高リスク DVT の術中発生の有無を確認した。

3. 血小板凝固活性

血小板凝固活性の指標として, クエン酸化全血のカルシウム再加とセライト刺激に続く経時的粘弾性変化をソノクロット (Sienco 社製) を用いて既報の方法に従い測定した⁹⁾。測定開始直前に専用キューベット内でクエン酸化全血 (250 µl) と各種試薬 (98 µl), 塩化カルシウム (2 M, 2 µl) をセライト粉末と混合した。クロットシグナル (0–200 arbitrary unit, au) は, 試料に浸漬した 1 µm, 200 Hz で振動するディスポーザブルプローブの機械的インピーダンスを電気信号に変換したものであり, これを試料の混合から 15 分間記録した。Ph1 と Ph2 で得られたクエン酸化全血に SP (10^{-8} M) を添加した試料と, SP と同時に NK1 受容体アンタゴニストである Spantide (10^{-6} M) を添加した試料を測定し比較した。フィブリンゲル強度の指標としてクロットシグナルの経時変化を記録した波形下部面積 (AUC) を算

出し使用した。フィブリンゲル形成速度の指標としてクロットシグナルが 20 au に達する時間 (T20) を使用した。また dAUC を (SP を添加した検体の AUC) – (同じ血液試料から得られ SP + Spantide を添加した検体の AUC) と定義し, NK1 受容体を介する SP 刺激によるフィブリンゲル強化の指標とした。dT20 を (SP を添加した検体の T20) – (同じ血液試料から得られ SP + Spantide を添加した検体の T20) と定義し, NK1 受容体を介する SP 刺激によるフィブリンゲル形成促進の指標とした。

ソノクロットにおいて, 血小板ピークは, 血液試料の粘弾性を経時的に記録する際, 単峰性あるいは多峰性の上に凸のカーブとして現れる (図 1)。NK1 受容体を介する SP による血小板ピーク出現の加速の有無を記録し, 後述する full-length NK1 受容体の mRNA レベルの発現と比較した。

4. リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

パクスジーン RNA 採血管で採取した全血は, 採血後二時間以上室温に放置された後, RNA 抽出まで –20°C で保管された。内溶液のうち, 3.6 mL を 15-mL コニカルチューブに移し, 3000 g で 10 分間遠沈した後上清を除去した。得られたペレットを NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel 社製) に付属する lysis buffer (350 µl) に溶解し, 添付マニュアルに従い total RNA を抽出した。RNA 抽出後は TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit を使用して速やかに逆転写を行った。作成した相補的 DNA (cDNA) は PCR 開始まで –20°C で保存した。リアルタイム PCR は ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems 製) を使用した。終量 25 µl の反応溶液を作成し (TaKaRa SYBR Premix Ex Taq, 12.5 µl; sense primer, 10 µM, 0.5 µl; antisense primer, 10 µM, 0.5 µl; cDNA, 1 µl) 95°C • 10 sec で初期変性を行い, 95°C • 15sec, 60°C • 60 sec の条件で 45 サイクルの PCR 反応を行った後, 60°C から 95°C の融解曲線を記録した。表 1 に β -actin と二つの NK1 受容体スプライスバリエーション (truncated と full-length) に対するプライマーを示している。Full-length の NK1 受容体に対する PCR のみ cDNA を 2 µl とした。

5. 統計学的検討

C 群と R 群の比較は対応のない t 検定あるいは χ^2 検定を施行した。ソノクロットの定量的指標である AUC ならびに T20 の評価は多因子分散分析で行い, 水準間比較に Fisher の最小有意差法を施行した。血小板ピークの加速と Full-length NK1 受容体発現の因果関係は χ^2 検定により評価した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

対象患者の背景因子を表 2 に示している。C 群と R 群に属する対象患者の年齢, 男女比, 身長, 体重, 麻酔時間, 手術時間に有意差は認められなかった。両群

のレミフェンタニルを除く麻酔薬使用量, 昇圧薬, 降圧薬の使用率, 輸液量, 出血量, 尿量に有意な差は認められなかった(表3). 術前の下肢静脈超音波画像診断により, VTEの発症リスクが高いとされる膝窩部より中枢の血栓が存在した症例は認められなかったが, R群の一人に右ひらめ筋内のDVTを認めた. 手術前後のDVTスクリーニングで, 新たな血栓の発生が認められた症例はなかった.

ソノクロットで認められる血小板ピーク(図1)の高さは血液試料中に発生したクロットの最大弾性を示し, 血小板数とその機能に依存すると報告されている¹¹⁾. また, ピーク出現までの時間はAnnexin-Vの存在下に遅延する⁹⁾. Annexin-Vは, 血小板細胞膜に豊富に存在するリン脂質であるホスファチジルセリンの阻害薬である. ホスファチジルセリンは血液凝固の最終ステップを触媒するprothrombinase complexと血小板表面で結合し, 血液凝固の足場となる⁷⁾. そのため, ソノクロットにおける血小板ピークの加速は血小板凝固活性を反映していると考えられる⁹⁾. 今回の検討において, SPによる血小板ピークの加速はfull-length NK1受容体のmRNA発現の有無と弱い相関があり($P=0.10$), われわれの過去の報告を支持する結果となった(成果リスト9).

これまでわれわれは, ソノクロット測定において, SPによるNK1受容体を介する血小板ピーク出現の加速と, セライトの添加から一定時間が経過した時点で

のクロットシグナルの変化を評価の対象としてきた⁹⁾. しかしながら, 血小板ピークの発生時間帯は固体ごとに大きなバラつきがある. そこで本研究では, 新たな定量的指標としてAUC(フィブリンゲル強度の指標)とT20(フィブリンゲルの発生速度)を評価した(表4). AUCは麻酔開始前の試料と術中の試料(Ph 1 vs Ph 2)で有意に異なり, Ph 2のAUCはPh 1より有意に低かった. しかし, レミフェンタニルの使用(C群 vs R群)やNK1受容体刺激の有無(SP vs SP + Spantide)に

表 3. 薬物使用量と水分出納

	C 群	R 群	(P)
レミフェンタニル使用量(mg)	0	2.93 ± 0.72	評価せず
プロポフォール使用量(mg)	245 ± 81	238 ± 77	P = 0.876
ロクロニウム使用量(mg)	48.3 ± 11.3	46.7 ± 8.2	P = 0.775
セボフルラン使用量(%min)	406 ± 180	275 ± 150	P = 0.203
エフェドリン使用量(mg)	6.7 ± 4.8	8.7 ± 9.3	P = 0.650
エフェドリン使用率	5/6 (83%)	4/6 (67%)	P = 1.000
フェニレフリン使用率	2/6 (33%)	0/6 (0%)	P = 0.439
ニカルジピン使用率	3/6 (50%)	0/6 (0%)	P = 0.182
アトロピン使用率	0/6 (0%)	1/6 (17%)	P = 1.000
細胞外液輸液量(ml)	2025 ± 660	1683 ± 513	P = 0.340
出血量(ml)	123 ± 109	29 ± 19	P = 0.063
尿量(ml)	113 ± 140	118 ± 115	P = 0.951

表 1. PCR primers

β-actin		
Sense	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'	
Antisense	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	
NK1 受容体		
Truncated		
Sense	5'-TCTTCTTCCTCCTGCCCTACATC-3'	
Antisense	5'-TGGAGAGCTCATGGGGTTGGGATCCT-3'	
Full-length		
Sense	5'-TCTTCTTCCTCCTGCCCTACATC-3'	
Antisense	5'-AGCACCGGAAGGCATGCTTGAAGCCCA-3'	

表 2. 患者背景

	C 群	R 群	(P)
年齢(歳)	73.7 ± 6.0	64.2 ± 13.9	P = 0.156
性別(男/女)	3/3	4/2	P = 1.000
身長(cm)	154 ± 13	162 ± 15	P = 0.372
体重(kg)	57.8 ± 9.5	64.2 ± 16.4	P = 0.432
麻酔時間(分)	250 ± 57	217 ± 81	P = 0.429
手術時間(分)	166 ± 44	135 ± 76	P = 0.409

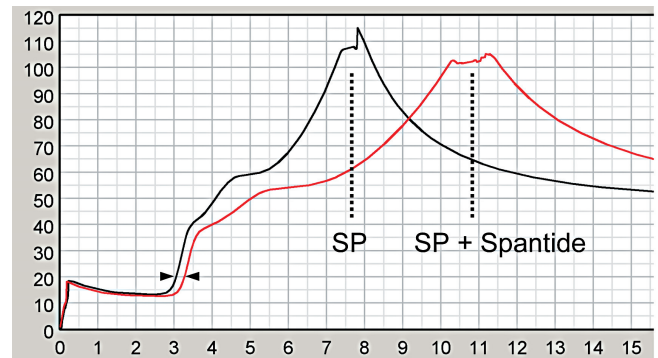


図 1. 典型的なソノクロット波形を示している. 横軸は時間(分). 縦軸はクロットシグナル(arbitrary unit, au). クロットシグナルは試料に浸漬した1 μm, 200 Hzで振動するディスプレイプローブの機械的インピーダンスを電気信号に変換したもの. 専用キューベット内でクエン酸化全血(250 μl)と試薬(98 μl), 塩化カルシウム(2 M, 2 μl)を混合した直後に記録を開始した. この典型例では, 血小板ピークは単峰性の上に凸のカーブとして現れている. サブスタンスP(SP, 10⁻⁸ M)を添加した試料の血小板ピーク(SP)は, SPと同時にSpantide(10⁻⁶ M)を添加した試料の血小板ピーク(SP + Spantide)より早く出現している(血小板ピークの加速). 測定開始からクロットシグナルが20 auを超えるまでの時間をT20(矢印), 測定開始から15分までの波形下部面積をAUCと定義した.

は影響を受けなかった。これらのことから、周術期に発生する血栓の強度は全身麻酔管理という介入によって弱まるが、少なくとも今回の研究では術中オピオイドの使用量には強い影響を受けないことが示唆された。T20 も同様に Ph1 と比較して Ph2 で有意に延長したが、C 群と R 群の群間有意差は認められず、NK1 受容体刺激による有意差も認められなかった。これらのことから周術期の血栓形成速度も全身麻酔管理で延長するが、オピオイド使用量には影響を受けないと考えられた。

NK1 受容体刺激は AUC と T20 を有意に変化させなかった (表 4)。しかしながら前述のごとく、full-length NK1 受容体の発現は血小板凝固活性に影響を与えることが示唆されている。そこで、NK1 受容体を介する SP 刺激による AUC と T20 の変化 (それぞれ dAUC と dT20) に対する full-length NK1 受容体の発現、測定時相 (Ph1 vs Ph2)、レミフェンタニルの使用 (C 群 vs R 群) の影響を検討した。dAUC はこれらの因子による影響を受けなかった。一方 dT20 は個別の要因による影響は受けなかったが、full-length NK1 受容体の発現と測定時相 (Ph1 vs Ph2) の間に相互作用が認められた ($P = 0.01$)。Full-length NK1 受容体が発現している症例では、Ph1 と比較し Ph2 で dT20 の短縮、すなわち、SP によるフィブリンゲル形成の有意な加速が検出された (図 2)。

考 察

われわれはこれまでの一連の予備的研究を通して、痛みの伝達物質である SP が末梢血血小板あるいは白血球の NK1 受容体を介して血小板凝固活性を亢進する可能性を指摘してきた^{8,9)}。今回の研究では、血小板凝固活性の生体侵襲による亢進を制御する方法を模索するため、術中オピオイドの使用に焦点をあてて

表 4. 各要因による AUC ならびに T20 の変化

AUC (au・sec)			(P)
C 群 対 R 群	43316 ± 8925	41437 ± 5620	$P = 0.405$
Ph1 対 Ph2 *	44683 ± 6278	40070 ± 7935	$P = 0.045$
SP 対 SP + Spantide	42115 ± 6887	42638 ± 8090	$P = 0.816$
T20 (sec)			
C 群 対 R 群	212 ± 57	193 ± 24	$P = 0.133$
Ph1 対 Ph2 *	184 ± 20	220 ± 54	$P = 0.007$
SP 対 SP + Spantide	203 ± 38	201 ± 50	$P = 0.866$

ソノクロットで得られた AUC ならびに T20 に対する①レミフェンタニル使用 (C, R)、②測定時相 (Ph1, Ph2)、③刺激薬 (SP, SP + Spantide) の影響。三元配置分散分析により、測定時相は AUC ならびに T20 に有意な影響をあたえたが、他の要因は影響しなかった。Ph1 と比較して Ph2 では AUC は有意に低下し、T20 は有意に延長した (* $P < 0.05$)。

検討を行った。形成される血栓の強度と血栓形成速度は「麻酔を受けること」によって抑制された。このことは、全身麻酔管理が血栓形成を抑制することを示し、麻酔による好ましい抗侵襲作用と受け取ることが出来る。

全身麻酔管理において強力な鎮痛薬として使用されるオピオイドは、SP による G 蛋白を介する細胞内情報伝達を抑制する薬理作用を持つことが知られている。しかしながら今回の検討では、レミフェンタニルの術中使用による有意な血栓形成能の変化は検出されなかった。一方、今回の研究では、両群の患者にセボフルランを使用して鎮静管理を行った。鎮静薬の使用量はオピオイド鎮痛薬によって影響を受ける。そのため、セボフルラン使用量は C 群で $406 \pm 180\%$ min に対し R 群で $275 \pm 150\%$ min ($P = 0.1326$) と統計学的有意に至らなかったが、C 群で平均使用量が多かった。エフェドリンの使用量に有意差は認められなかったが、C 群ではエフェドリンの昇圧効果が不十分のためフェニレフリンを使用した症例が 2 例あった。逆に、高血圧のためニカルジピンを使用した症例が C 群に 3 例あったが、R 群ではこれらの薬は使用されなかった。出血量は C 群で 123 ± 109 ml に対し R 群で 29 ± 19 ml ($P = 0.0617$) と有意水準に至らなかったが、R 群の出血は 50 mL 未満であったのに対して、C 群では 50% の症例で 100 mL を越えた。これらのことから、セボフルラン使用量は患者への侵襲あるいはその制御

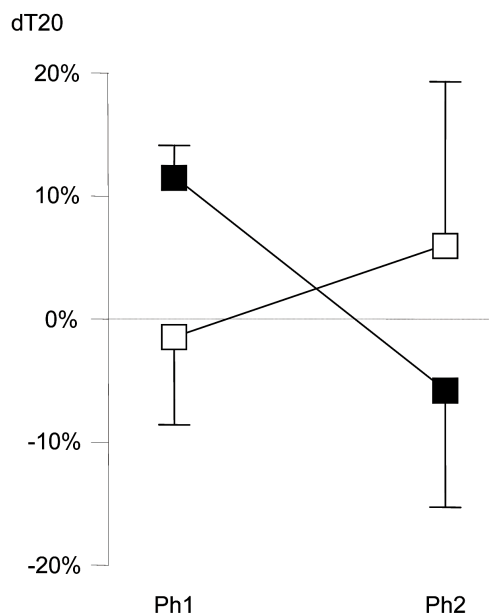


図 2. Full-length NK1 受容体 mRNA が検出された検体 (■) と検出されなかった検体 (□) の二つの測定時相 (Ph1 と Ph2) における dT20。dT20 は (SP を添加した検体の T20) - (同じ血液試料から得られ SP + Spantide を添加した検体の T20) として算出し、SP + Spantide を添加した検体の T20 に対する % の平均値 + 標準偏差として示している。

に対して何らかの影響を与え、オピオイドの効果に対して相互作用を及ぼしている可能性が推測される。これらの疑問を解決するため、現在進行中の同一シリーズの比較試験では、術中に使用する鎮静薬としてセボフルレンと静脈麻酔薬であるプロポフォールと比較検討を行っている。

われわれはこれまでの一連の研究から、full length NK1 受容体の発現がSP 刺激による血栓形成速度に影響を与える可能性を示唆してきた(研究成果リスト9)。今回の研究では、full length NK1 受容体を発現した患者では、SP による血栓形成速度の亢進作用は手術・麻酔によって増強したが、このスプライスバリエントを発現していない患者ではSP による血栓形成速度の変化は認められなかった。

またわれわれは、今回の臨床比較試験と平行してNK1 受容体を介する血小板凝固活性の亢進に関わる分子薬理学的機序の検討作業を進めている。NK1 受容体を介する血小板凝固活性の亢進には、G 蛋白による細胞内情報伝達の介在が示唆されるため、細胞内カルシウム濃度の変化が活性制御に関与すると考えられる。このことに関して、生体内で痛みや温度のセンサーとして機能する細胞膜カルシウムチャネルであるtransient receptor potential (TRP) 受容体が白血球と血小板に発現し、血小板凝固活性に関与するという証拠を得つつある(研究成果リスト11)。今後さらに検討を続けることにより、これらの細胞のNK1 受容体を介した血栓形成の促進ならびに強化の病態生理学的機構を解明し、NK1 受容体スプライスバリエントの発現制御を指標として臨床薬理学的VTE 予防の方法を確立してゆきたい。

引用文献

- 1) Provenzano D, Grass JA. Is epidural analgesia superior to IV-PCA? In: Fleisher LA, editor. Evidence-based practice of Anesthesiology. Pennsylvania: Saunders;2004.p.441-8.
- 2) Rodgers A, Walker N, Schug S, McKee A, Kehlet H, Zundert AV, et al. BMJ 2000;321:1493-7.
- 3) 黒岩政之, 古家 仁, 瀬尾憲正, 入田和男, 澤 智博, 伊藤 誠, 他. 2004 年周術期肺塞栓症発症調査結果からみた本邦における周術期肺血栓塞栓症発症頻度とその特徴. 麻酔 2006;55:1031-8.
- 4) Reed KL, Fruin AB, Gower AC, Stucchi AF, Leeman SE, Becker JM. A neurokinin 1 receptor antagonist decreases postoperative peritoneal adhesion formation and increases peritoneal fibrinolytic activity. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:9115-20.
- 5) Graham GJ, Stevens JM, Page NM, Grant AD, Brain SD, Lowry PJ, et al. Tachykinins regulate the function of platelets. Blood 2004;104:1058-65.
- 6) Jones S, Tucker KL, Sage T, Kaiser WJ, Barrett NE, Lowry PJ, et al. Peripheral tachykinins and the neurokinin receptor NK1 are required for platelet thrombus formation. Blood 2008;111:605-12.
- 7) Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. Blood 1997;89:1121-32.
- 8) 東俊晴. 白血球NK1 レセプターを介した神経キニンによる止血機能の修飾. 侵襲と免疫 2007; 16:123-30.
- 9) Azma T, Matsubara Y, Kinoshita H, Hidaka I, Shiraishi S, Nakao M, et al. Prothrombotic roles of substance-P, neurokinin-1 receptors and leukocytes in the platelet-dependent clot formation in whole blood. J Thromb Thrombolysis 2009;27:280-6.
- 10) Azma T, Matsubara Y, Yamasaki K, Matsumoto C, Nakao M, Hayashida M, et al. Whole Blood mRNA for Full-Length Neurokinin-1 Receptors in Patients with Chronic Pain Treated with Oral Opioids. In: 13th International Pain Clinic Congress World Society of Pain Clinicians. Bologna: Medimond; 2008.p.127-30.
- 11) Saleem A, Blifeld C, Saleh SA, Yawn DH, Mace ML, Schwartz M, et al. Viscoelastic measurement of clot formation: a new test of platelet function. Ann Clin Lab Sci 1983;13:115-24.

研究成果リスト

原 著

- 1) Azma T, Matsubara Y, Kinoshita H, Hidaka I, Shiraishi S, Nakao M, et al. Prothrombotic roles of substance-P, neurokinin-1 receptors and leukocytes in the platelet-dependent clot formation in whole blood. J Thromb Thrombolysis 2009;27:280-6.

著 書

- 2) 東俊晴. 白血球NK1 レセプターを介した神経キニンによる止血機能の修飾. 侵襲と免疫 2007; 16:123-30.
- 3) Azma T, Matsubara Y, Yamasaki K, Matsumoto C, Nakao M, Hayashida M, et al. Whole Blood mRNA for Full-Length Neurokinin-1 Receptors in Patients with Chronic Pain Treated with Oral Opioids. In: 13th International Pain Clinic Congress World Society of Pain Clinicians. Bologna: Medimond; 2008.p.127-30.

国内招聘

- 4) 東俊晴. 痛みはどのような機構を介して止血機能を亢進するか? 日本麻酔科学会第55回学術集会. 横浜. 2008年6月12日-14日.

海外学会発表

- 5) Azma T, Matsubara Y, Yamasaki K, Matsumoto C,

Nakao M, Hayashida M, et al. Whole blood mRNA for full-length neurokinin-1 receptors in patients with chronic pain treated with oral opioids. 13th International Pain Clinic Congress World Society of Pain Clinicians. Seoul, Korea, 2008/5/29 – 6/1.

- 6) Azma T, Yamasaki K, Matsubara Y, Matsumoto C, Nakao M, Ariyama J, et al. Evaluation of acute inflammatory change in neuropathic pain by mRNA for truncated and full-length neurokinin-1 receptors in whole blood. 12th World Congress on Pain. Glasgow, Scotland, UK, 2008/8/17– 22.

国内学会発表

- 7) 東俊晴, 松原由紀, 小村智子, 白石成二, 中尾正和, 松本千香子. サブスタンスPはNK1受容体を介して全血血液凝固を亢進する. 日本麻酔科学会第53回学術集会. 神戸. 2006年6月1日–3日.
- 8) 東俊晴, 松原由紀, 白石成二, 中尾正和, 松本千香子, 小村智子. 周術期患者のサブスタンスPによる止血機能亢進とNK1受容体 mRNA の関係. 日本麻酔科学会第54回学術集会. 札幌. 2007年5月31日–6月2日.
- 9) 東俊晴, 松原由紀, 中尾正和, 成田弥生, 塚本真規, 菊地博達. サブスタンスPによる止血機能亢進への完全長NK1受容体 mRNA レベル変動の関与. 日本麻酔科学会第55回学術集会. 横浜. 2008年6月12日–6月14日.
- 10) 星島宏, 東俊晴, 塚本真規, 佐藤栄留, 岩瀬良範, 菊地博達. 出血傾向をともなわないAPTTの異常延長を認めた緊急開腹症例に対する周術期輸血治療. 日本臨床麻酔学会第28回大会. 京都. 2008年11月20日–22日.
- 11) 東俊晴, 成田弥生, 塚本真規, 杉本由紀, 中尾正和, 菊地博達. サブスタンスPによる血小板凝固活性亢進は白血球依存性に体温付近で増強する. 日本麻酔科学会第56回学術集会. 神戸. 2009年8月16日–18日.

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

未熟児新生児領域における中枢神経系合併症回避に向けた 新たな循環管理法の確立

研究代表者 石黒 秋生(埼玉医科大学 総合医療センター 新生児科)
研究分担者 伊藤 智朗*, 星 礼一*, 高山 千雅子*,
江崎 勝一*, 國方 徹也*, 鈴木 啓二*,
側島 久典*, 田村 正徳*

緒言

未熟児, 特に極低出生体重児は, 出生直後より子宮外環境への突然の移行に加え, 未熟性あるいは様々な合併症等から, 特に超急性期と呼ばれる生後72時間内では, 頭蓋内出血や虚血性低酸素性脳症などの頭蓋内病変の発症のリスクが高く, 短期, 長期予後に多大な影響を及ぼすことが知られている¹⁾.

現在NICUにおいては, 呼吸心拍モニター, 観血, 非観血の動脈血圧測定, 尿量測定, 血中乳酸値測定, 心エコー検査などを指標として, 厳重な循環管理が行われているが, これらの循環指標を用いた循環管理により予後が改善したという明確な報告はない. そこで著者は, 末梢循環の異常そのものが循環不全の原因となりうること, あるいは循環不全時に末梢循環に最も早期に変化が現れることに着目し, これらの児を主たる対象として, レーザードップラー装置を用いて末梢血流量の評価を行っている. これまでに, 極低出生体重児の超急性期における生理的末梢血流の変化の特徴を明らかにし, 末梢血流量が新たな循環指標の一つとして有用であることを報告してきた.

本研究報告では, 医原性高体温が原因と考えられる病的な循環動態の変動について評価したので報告する.

材料と方法

2008年10月から2009年5月までに当院総合周産期母子医療センターNICUに入室した極低出生体重児に対して, 両親の同意が得られ次第, 前額部および右または左足背にレーザードップラー血流量計を装着,

* 埼玉医科大学 総合医療センター 新生児科

最低48時間の血流量測定を行った. このうち, 生後24時間以内に高体温を来した症例8例を対象とした. さらに, 連続した2ポイントで皮膚温38℃以上の高体温が持続した症例を高体温持続群(n=4), 1ポイントのみ38℃以上となりすぐに解熱した症例をコントロール群(n=4)に分類し, 高体温時および解熱時の心拍数, 血圧, 前額部および下肢末梢血流量の変化を比較検討した.

統計学的検討にはStudentのT検定を用いた. 有意水準は $p < 0.05$ とした.

結果

患者背景を表1に示す. 高体温持続群において出生体重が大きい傾向があったが, 在胎週数, カテコラミン投与量には有意な差を認めなかった. 研究期間中, 対象時において敗血症など発熱の原因となりうる疾患の合併を認めなかった.

心拍数, 平均血圧の変化

心拍数

コントロール群, 高体温持続群ともに, 解熱に伴って心拍数の減少を認めた(コントロール群; 高体温時

表1. 対象背景

	コントロール群	高体温持続群	p 値
症例数	4	4	
在胎週数 (週)	29.9(26.7-32.3)	27.5(25.4-29.7)	0.12
出生体重 (g)	823(720-948)	1020(906-1221)	0.04
カテコラミン投与量(γ)	5.1 $\pm$ 6.2	3.6 $\pm$ 2.8	0.63

168 ± 11 回/分, 解熱時 156 ± 12 回/分; $p = 0.047$, 高体温持続群; 高体温時 174 ± 7 回/分, 解熱時 147 ± 11 回/分; $p = 0.02$) (図1).

平均血圧

コントロール群では解熱に伴う血圧の変動を認めなかった (高体温時 40 ± 14 mmHg, 解熱時 40 ± 14 mmHg; $p = 0.07$). 高体温持続群では有意差を認めなかったものの全例で解熱に伴って平均血圧が上昇した (高体温時 34 ± 7 mmHg, 解熱時 40 ± 4 mmHg; $p = 0.06$) (図2).

末梢血流量の変化

前額部血流量

コントロール群では解熱に伴う一定の血流量の変動を認めなかった (高体温時 16.9 ± 2.4 ml/分, 解熱時 18.5 ± 2.5 ml/分; $p = 0.92$). 一方, 高体温持続群では有意差を認めなかったものの全例で解熱に伴って血流量が減少した (高体温時 16.9 ± 2.4 ml/分, 解熱時 18.5 ± 2.5 ml/分; $p = 0.29$) (図3).

下肢末梢血流量

コントロール群においては解熱に伴う一定の血流量の変動を認めなかった (高体温時 17.2 ± 2.8 ml/分, 解熱時 16.8 ± 2.5 ml/分; $p = 0.58$). 一方, 高体温持続群においては有意差を認めなかったものの全例で解熱に伴って血流量が減少した (高体温時 27.2 ± 10.3 ml/分, 解熱時 18.2 ± 5.5 ml/分; $p = 0.08$) (図4).

考 察

コントロール群では, 高体温時に有意な心拍数増加を認めたものの, 平均血圧や末梢血流量に一定の変

動は認められなかった. 一方, 高体温持続群では, 高体温時に有意な心拍数増加を認め, また, 全例で前額および下肢末梢血流は増加し, 平均血圧は低下していた.

一般に, 外的要因により体温が上昇すると, 体温調節中枢の働きにより体温を低下させる反応として, 皮膚血管拡張, 発汗亢進, 心拍数増加が引き起こされる.

体温が維持できなくなり高体温が持続するようになると, 発汗および末梢血管拡張により, 絶対的, 相対的循環血液量の減少をきたし低血圧となりうる. 本研究において高体温持続群では, 解熱とともに末梢血流は減少し, 同時に血圧はコントロール群と同レベルまで上昇していることから, 高体温時の血圧低下は, 発汗による水分喪失ではなく, 末梢血管拡張による相対的循環血液量減少によるものであることが示唆された.

高体温時に限らず, 末梢血管の異常血管拡張による循環不全は, 極低出生体重児の超急性期における循環不全の原因の一つと考えられている²⁾. Yanowitzら³⁾は絨毛羊膜炎合併母体から出生した児における異常な血管拡張を伴う循環不全について報告している.

レーザードップラー装置により測定された末梢血流量は, このような病態の評価に有用な指標となりうると考えられる.

今回の研究では, レーザードップラー装置により末梢血流量の変化を鋭敏にとらえることが可能であり, 末梢血流量が循環不全の病態をより詳細に評価する上で有用な指標となりうることを示された. 今後, 循環不全児の末梢血流に関するデータを蓄積して従来の循

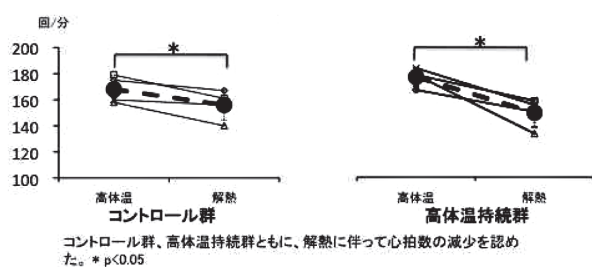


図 1. 心拍数の変化.

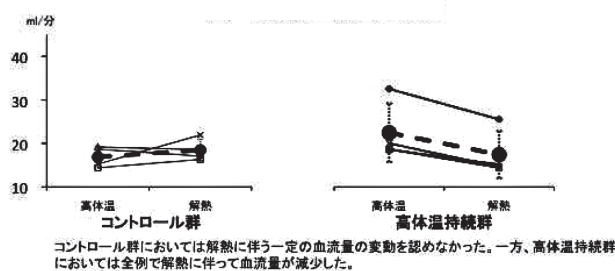


図 3. 前額部血流量の変化.

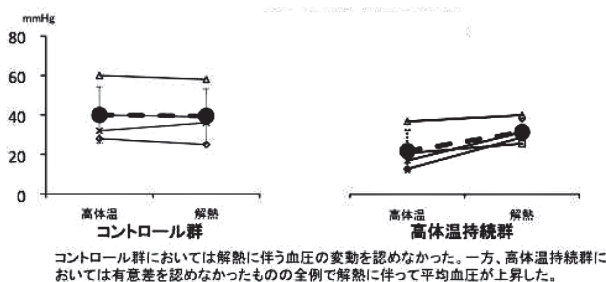


図 2. 平均血圧の変化.

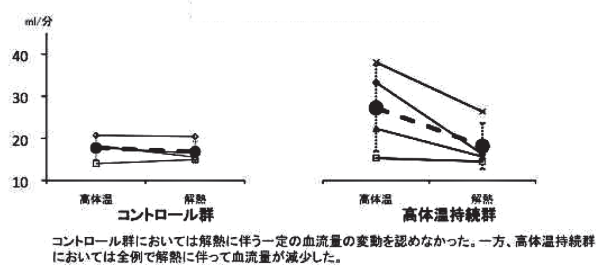


図 4. 下肢末梢血流量の変化.

環パラメータとの関連を明らかにし、新たな循環モニタリングシステムの構築を目指す。

参考文献

- 1) Seri I, Evans J. Controversies in the diagnosis and management of hypotension in the newborn infant. *Curr Opin Pediatr.* 2001;13:116-23.
- 2) Seri I. Systemic and pulmonary effects of vasopressors and inotropes in the neonate. *Biol Neonate* 2006;89:340-2.
- 3) Yanowitz TD, Jordan JA, Gilmour CH, Towbin R, Bowen A, Roberts JM, Brozanski BS. Hemodynamic disturbances in premature infants born after chorioamnionitis: association with cord blood cytokine concentrations. *Pediatr Res.* 2002;51:310-6.