

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

家族性慢性糸球体腎炎症候群の責任遺伝子の同定

研究代表者 岡田 浩一（埼玉医科大学 腎臓内科）

研究分担者 井上 勉¹⁾，岩佐 泰靖²⁾

緒 言：

わが国の毎年3万人にのぼる新規透析導入患者の原疾患の32.4%を慢性糸球体腎炎が占めており、糖尿病性腎症につぐ透析導入の主要な原疾患となっている。慢性糸球体腎炎は慢性糸球体腎炎症候群と呼ぶべき多数の疾患の総称であり、その中心となる主要疾患がIgA腎症である。IgA腎症の発症には人種差が認められ、わが国を含めた環太平洋に位置するアジアオセアニア諸国、および南部ヨーロッパ諸国に集中しており、アフリカ系アメリカ人に有意に少ないことから、遺伝的因子の関連が示唆される。一方、大多数の症例が家族内集積を示さない散発例であることから、遺伝的因子以外の様々な要因が関連した多因子疾患と推定される。このような場合、ランダムな対象サンプルから遺伝的因子を明らかにするためには、連鎖不平衡解析や大規模な相関解析を行う必要があり、単一施設での検討は困難である。そこで今回、我々は現在追跡中および今後組み入れる慢性糸球体腎炎多発家系の罹患者サンプルを用い、homozygosityハプロタイプ(HH)法を用いたノンパラメトリック連鎖解析を行う。まず埼玉医科大学呼吸器内科の萩原弘一教授が作成し、同大学ゲノム医学研究センター・トランスレーショナル研究部門で運用しているHH解析プログラムを用いて、罹患者間に共有されるゲノム領域を絞り込む。この際、家族内で共有される広範なゲノム領域が検出されてくるものと想定され、その縮小のために非罹患者と罹患者間で共有される領域を同定し、その疾患ゲノムを含まないと考えられる領域を罹患者間で共有されるゲノム領域よりサブトラクションする。その結果得られる、罹患者間でのみ共有されているゲノム領域内に責任遺伝子が含まれている可能性が高く、その領域内の候補遺伝子群の塩基配列や発現情報、機能情報等か

ら慢性糸球体腎炎関連遺伝子同定を試みる。

方 法：

- 1: 埼玉医科大学病院およびその関連施設に通院中で、血縁関係者に既知の遺伝性腎疾患が否定された慢性糸球体腎炎患者が4例以上認められる家系の内、少なくとも1例が慢性腎不全（維持透析例を含む）を呈している家系を対象家系とする。罹患者、非罹患者に埼玉医科大学倫理委員会で承認された説明文書（申請番号498）を用いて本研究への参加、DNA検体の提供を依頼し、文書による同意を得る。
- 2: 全血10 mlよりゲノムDNAを精製し、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター・トランスレーショナル研究部門にてヒトSNP解析用のマイクロアレイ（Affymetrix社：GeneChip Human Mapping 500K Array Set）による精密SNPタイピングを行う。
- 3: SNPタイピングデータを用いてhomozygosity ハプロタイプ法により、同一家系内の罹患者間で共有されているゲノム領域の絞り込みを行う。さらに非罹患者家族と罹患者間で共有されているゲノム領域を、候補領域よりsubtractionする。
- 4: PosMed databaseを用いて、責任遺伝子を含む可能性の高いゲノム領域に含まれる、慢性糸球体腎炎の発症／進展に関わるキーワードと関連して報告されている候補遺伝子进行を特定する。
- 5: 患者DNAを用いてリストされた候補遺伝子のエクソンシーケンスを行い、変異が検出された遺伝子を最終候補遺伝子とする。

結 果：

第1家系 (FCGN_1)

第1家系の家系図をFig.1に示す。DNAサンプルを集めている段階で、罹患者 (Pt-2, Pt-4) の腎生検よりAlport症候群であることが判明し、サンプリングを中止し、以後の検討は行わなかった。

第2家系 (FCGN_2)

1) 埼玉医科大学 腎臓内科

2) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター・トランスレーショナルリサーチ部門

第2家系の家系図をFig. 2に示す。罹患者4例 (Pt-1～4) と非罹患者2例 (Ct-1, 2) よりDNAサンプルを取得し、マイクロアレイを用いたSNPタイピングを施行した。まず最初に罹患者のデータでHH法を施行し、罹患者間で共有されるゲノム領域を同定したところ、かなり広範なゲノム領域が該当した。(Fig. 3) その後、罹患者と非罹患者間で共有されるゲノム領域を差し引いて、罹患者間のみで共有されるゲノム領域を同定したところ、最終的にはかなり絞り込むことができた。(Fig. 4)

第8, 11, 12および17番染色体上の比較的大型の共有領域 (> 15 Mb) に関して、PosMed database (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) で物理的位置情報と慢性糸球体腎炎に関連したキーワード (glomerulonephritis, nephropathy, proteinuria, hematuria) を用いて、候補遺伝子を探索した。参考文献も参照し、第一段階でエクソンシーケンスを行うべき候補遺伝子が、以下のようにリストされた。(Table 1)

第3家系 (FCGN_3)

第3家系の家系図をFig. 5に示す。第2家系と並行してSNPタイピングとHH解析を終了しており(データは省略)、現在、候補遺伝子のエクソンシーケンスを進めている。

考 察：

現在までにエクソンシーケンスを終了した候補遺伝子からの変異の検出はなく、責任遺伝子としての検証は行っていない。今後、変異が検出された場合、その最終候補遺伝子の機能評価を、*in vitro*の系を用いて検討する。具体的には、特にアミノ酸置換型の変異の場合、full-length cDNAに変異を導入してアデノウイルスベクターに組み込み、*in vitro*で発現させたミュータントペプチドと野生型ペプチドの機能を比較検討する予定である。

今回の検討で同定が期待される家族性慢性腎炎症候群の責任遺伝子は、その家族内の慢性糸球体腎炎のみならず、その他の非家族性慢性糸球体腎炎の発症／進展にも部分的に関与している可能性があり、また直接の因果関係が証明されなくても慢性糸球体腎炎の発症／進展メカニズムの解明に大きく貢献することが期待される。

研究成果：

(現在、第2, 3家系の候補遺伝子のエクソンシーケンスを継続中である。)

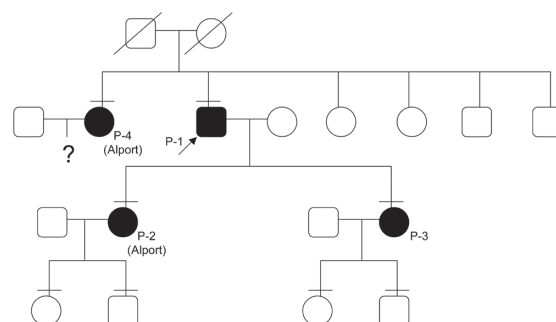


Fig. 1. The family tree of FCGN_1.

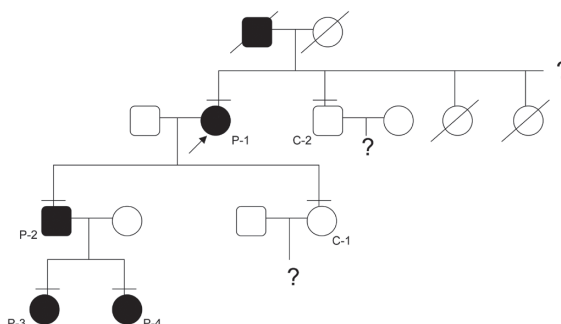


Fig. 2. The family tree of FCGN_2.

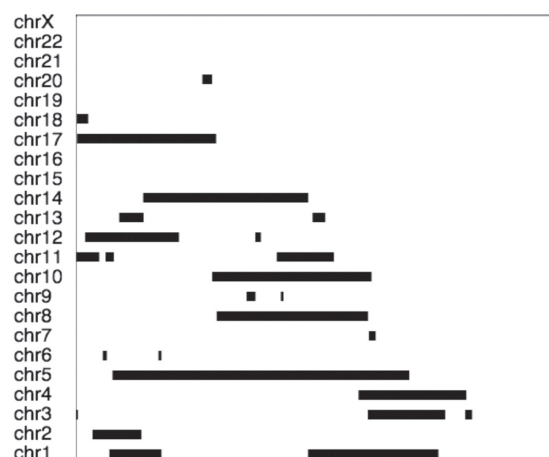


Fig. 3. Candidate regions for the disease gene for FCGN_2.

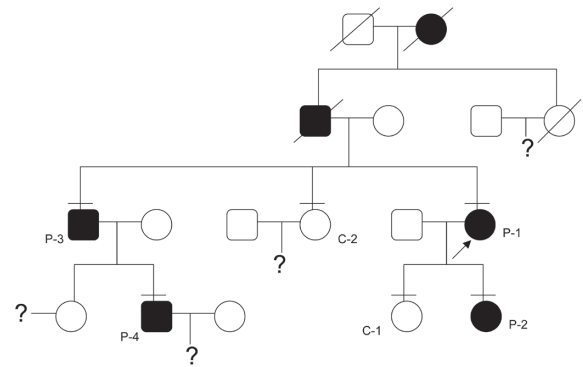


Fig. 4. Narrowed, candidate regions for the disease gene for FCGN_2.

Table. 1. Candidate genes for FCGN_2

Chromosome No.	Position	Gene ID	Symbol
8	Hs:8:89118580-89408892	ENSG00000156103	MMP16*
8	Hs:8:79807564-79880313	ENSG00000104432	IL7
12	Hs:12:9102453-9159825	ENSG00000175899	A2M*
12	Hs:12:6308185-6321522	ENSG00000067182	TNFRSF1A
12	Hs:12:6363595-6370994	ENSG00000111321	LTBR
17	Hs:17:45488431-45522843	ENSG00000005884	ITGA3*
17	Hs:17:40192094-40214740	ENSG00000073670	ADAM11*

現在までに*の遺伝子のエクソンシーケンスを終了したが、変異は検出されなかった。現在もエクソンシーケンスを継続中である。

**Fig. 5.** The family tree of FCGN_3.

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

新たな発がんメカニズム仮説の検証： RNA ゲノムと薬物代謝酵素の相互作用の解明

研究代表者 赤塚 俊隆（埼玉医科大学 微生物学）

研究分担者 菰田 二一¹⁾，小林 信春²⁾，Bruce D. Hammock³⁾

【緒 言】

C型肝炎ウイルス（HCV）感染者はわが国では約200万人，世界では実に1.7億人も存在するといわれ，その高齢化と共に肝硬変・肝癌で死亡する患者が急激に増加している．その治療としては，PEG-インターフェロンとリバビリン併用療法が一定の効果を示しているが，治癒率は約30%にとどまり，副作用も強い．また日本で最も多い1bタイプのウイルスは特に効果が低いことも知られている．この慢性感染者の救済が急務であり，我々はC型肝炎の発症・発がんのメカニズムを解明し，その知見に基づいた治療法を開発したいと願って本研究に取り組んだ．

今回の研究計画は，HCV感染が薬物代謝酵素の1つであるmicrosomal epoxide hydrolase (mEH)の存在形態に影響を及ぼすという，これまでのわれわれの研究成果に基づいて立てられた．研究代表者の赤塚は，C型肝炎患者の肝臓から精製されたAN6520抗原に対する抗体が，C型肝炎患者の血清中に高率に検出され，他のタイプの肝炎患者の血清中には検出されないことをかつて報告した¹⁻³⁾が，われわれは最近そのAN6520抗原のcDNAをクローニングし，本体がmEHであることを見出した．mEHを組換えバキュロウイルスで発現し，その精製タンパクを抗原として抗体測定を行うと，AN6520抗原で抗体を測定した結果とは違って，C型肝炎の他にA型肝炎患者の血清でも高率に抗体が検出され，一方B型肝炎，薬剤性肝障害等では全く出現しないことも分かった⁴⁾．抗体反応だけでなく，mEHそのものも，C型肝炎急性期において血中に出現し，感染チンパンジー肝臓の生検材料でmEHの局在変化が認められた．このことは肝細胞のmEHが特定のウイルス感染によって，その性質が変化し，

発現形態のみならず抗原性も変化を受けることを示している．ウイルス肝炎の中でもC型とA型肝炎でのみこの変化が見られ，B型肝炎や薬剤性肝障害では全く変化が認められないことは，これが非特異的な肝細胞障害やウイルス増殖一般に共通して起こる変化ではなく，もしかしたらRNAウイルスの増殖にのみ共通の出来事であることを示唆した．

そこで本研究では，我々の仮説どおりにRNAウイルス感染がmEHに変化を及ぼし，それに伴いmEHが関与する解毒機能にも影響が及ぶことを直接証明することを目的として行った．培養細胞でのウイルス感染が容易なA型肝炎ウイルス（HAV）を用いた実験からスタートし，その結果について他のRNAウイルスによる感染実験を用いて検証を進めることにした．またHAVを培養肝細胞株に感染させると，細胞内に局在しているmEHが細胞表面に出現することを予備実験で得ていたので，mEHの膜上でのトポロジー変化の解析手段として，mEHの異なる部分を認識する複数種のモノクローナル抗体を作成し，それを用いて詳細に検討した．

【材料と方法】

mEH断片の発現

図1に示す9種のmEH断片をGST融合タンパクとして大腸菌に発現させた．mEH cDNAの作成はすでに報告した⁴⁾．それをテンプレートとし，表1のプライマーを用いてPCRを行い，pGEX-2Tベクターに組み込んで大腸菌BL21で発現させた．タンパク発現の確認は菌体抽出液をSDS-PAGE後にCoomassie Blue stainingを行ってバンドのサイズを確認することと，western blotting後に抗GST抗体でGST融合タンパクを検出することにより行った．

抗mEHモノクローナル抗体の作成

免疫原としては，組換えバキュロウイルスを感染

1) 埼玉医科大学 生化学，2) 埼玉医科大学 微生物学

3) Entomology & Cancer Research Center, Univ. of California Davis

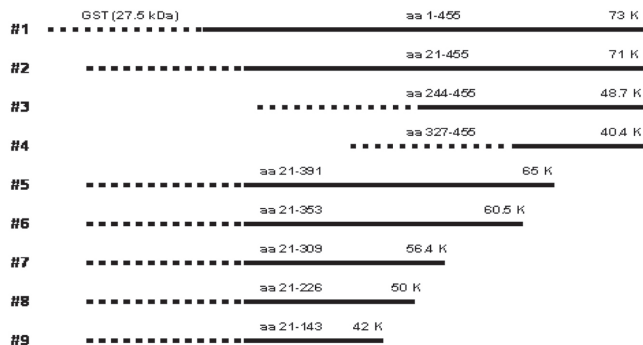


図 1. GST融合タンパクとして発現させた9種類のmEH断片（#1-#9）. 点線はGSTタンパク部分を示す.

させたSf9細胞の抽出液からイオン交換法で精製したmEH全長タンパク⁴⁾を用いた. BALB/cマウスに精製mEH 40 µgをフロイント完全アジュバントと共に皮下に免疫後, 同量のmEHを不完全アジュバントと共に皮下に(2回目), あるいはアジュバントなしに腹腔に注射した(3, 4回目). 脾細胞をNS-1と45% polyethylene glycol (ATCC)を用いて融合してハイブリドーマを作成した. 抗体の検出は精製mEHを固相化したELISAで行い, 3回以上のlimiting dilutionにより抗体産生ハイブリドーマを単クローン化した. 抗体のアイソタイプの決定はAmershamのisotyping kitを用いて行った.

mEH断片を用いたELISAとcompetitive antibody binding assay (CBA)

mEH断片は大腸菌菌体をSDS sample bufferで処理し可溶化後PBSで希釈し, ELISA plateにcoatingしてELISAに用いた. CBA⁵⁾には精製mEHタンパクをさらにpreparative SDS-PAGE (Prep Cell, Bio-Rad)で精製したものを固相化し, radioimmunoassayで行った. モノクローナル抗体を腹水からProtein G-agaroseで精製し¹²⁵IラベルしたIgGと, 非ラベルIgGとを固相化した抗原と反応させ, その競合率をγ-counterで測定した.

DMBA cytotoxicity assay

THLE-5b, Huh7, Huh7.5を96穴プレートで培養し, poly(I:C)処理またはウイルス感染後, M. Miyataらの方法⁶⁾でDMBAに対する感受性を測定した. 細胞数の測定はCell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いて行った.

【結 果】

抗mEHモノクローナル抗体の作成

mEHを発現するバキュロウイルスをSf9細胞に感染させ, 既に報告した方法⁴⁾, すなわち界面活性剤による溶解, 超遠心, Q-sepharoseを用いたイオン交換法によりmEHを精製した. これをBALB/cマウスにFCAと共に免疫した. 抗体のスクリーニングはこの

表 1. mEH断片（#1-#9）発現用プライマー

Name	Sequence
#1 forward	CGGGATCCATGTGGCTAGAAATCCTCCTCAC
#2 forward	CGGGATCCCGGGACAAAGAGGAACTTTGCC
#3 forward	CGGGATCCAAAGGCCTGCACTTGAACATGGC
#4 forward	CGGGATCCGAGAAGTTTTCCACCTGGACC
#1 reverse	CGGGATCCTTGCCGCTCCAGCACCGACAGG
#2-#4 reverse	TCCCCCGGGTTGCCGCTCCAGCACCGACAGG
#5 reverse	TCCCCCGGGCTTCATCCGCTCAGCCTTCTG
#6 reverse	TCCCCCGGGTGCCTCAGGGAGAACTTCC
#7 reverse	TCCCCCGGGGTGTCAGGCTTGTGCACTG
#8 reverse	TCCCCCGGGTCCCCTCCTTGAATGTAGAA
#9 reverse	TCCCCCGGGGGGCTTCGGGGTATGGCCTGC

mEHを固相化したELISAで行った. 抗体のエピトープ解析のため, mEHの異なる部分の断片をGST融合タンパクとして発現するプラスミドを構築した. 全長を発現する#1からN末を次第に短くした#2-#4と, C末から次第に短くした#5-#9の9種類を作成した(図1). これらのプラスミドで大腸菌をトランスフォームし, IPTGでタンパク発現を誘導し, 菌体をSDS処理して抗原を可溶化し, これを固相化したELISA法を作成した. #1-#4の抗原を用いたELISAで免疫マウス血清を測定してみると, 2回目の免疫までは#1と#2に対する抗体のみ出現したが, 免疫を3回繰り返すことにより#3と#4に対する抗体も出現した. このことからmEHのN末側の方がC末側より免疫原性が強いことが示唆された(data not shown).

次に得られた65種のハイブリドーマ上清についてこのELISAを行った. (代表的な7種の抗体の結果を図2a, bに示す). その反応パターンから1) N末(aa.21-143)を認識するもの(#1, #2, #5~#9と反応), 2) C末(aa.327-455)を認識するもの(#1~#4, #5, #6と反応), および3) 精製mEHとは反応するが, #1-#9のいずれとも反応しないものの3種に分けられた. ELISAの抗原として精製mEHをSDS処理したもの, しないものの2種類を用いて比較してみると, 1)と2)の抗体はSDS処理したmEHとも反応するのに対して, 3)の抗体はSDS処理したmEHとは全く反応しない(図2c)ことから, 1)と2)の抗体はmEHのlinear structureを認識し, 3)のグループはmEH分子が形成する高次構造を認識していると考えられた.

mEHのlinear structureを認識する1)と2)のグループの抗体はwestern blottingを行った抗原と反応するので, 以下の3種類のmEH発現細胞の抽出液を用いて行ってみた. 1) 組換えバキュロウイルスでmEHを発現しているSf9細胞の抽出液を抗原とした場合, 全長49KDaのmEHのバンド以外の小さなバンドの出現のパターンに3種類(A-C)あり, 1)のグループはAまたはCの2タイプ, 2)はBのタイプを示した(図3a).

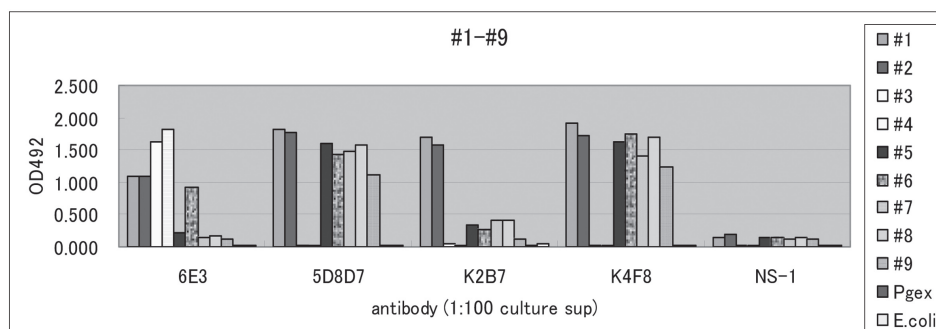
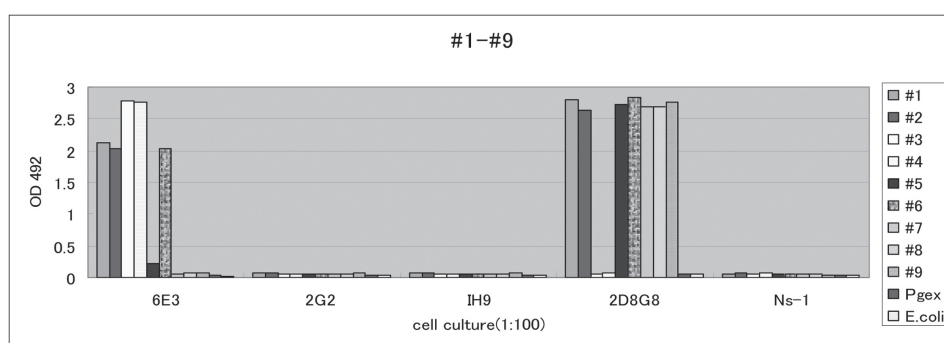
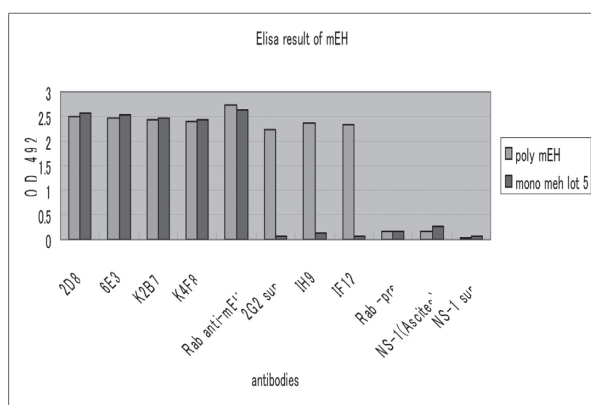


図 2. ELISAによるモノクローナル抗体のエピトープ解析.

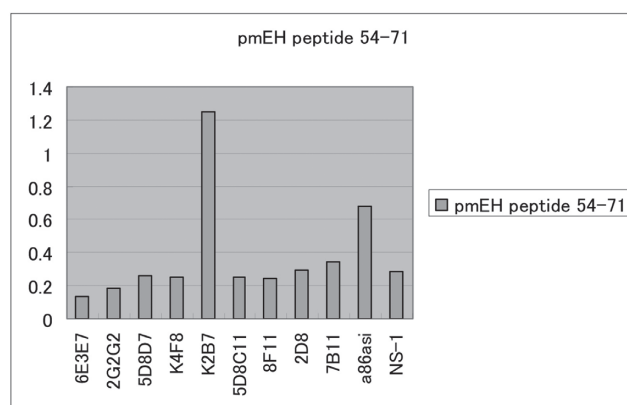
(a) 4種の抗体(6E3, 5D8, K2B7, K4F8)と陰性対象のNS-1培養上清の#1-#9との反応.



(b) 4種の抗体(6E3, 2G2, 1H9, 2D8)と陰性対象のNS-1培養上清の#1-#9との反応.



(c)精製mEH(poly mEH)とそれをpreparative SDS-PAGEで精製し, SDSにより高次構造を失ったmEH(mono mEH)に対する各種モノクローナル抗体の反応.



(d)Peptide aa54-71を固相化したELISA.

2) mEHを発現しているヒト肝細胞株 THLE-5b を用いたwestern blottingを行ったところ, 1) のタイプの抗体の一部で49KDaのmEH以外に52KDaのバンドとも反応するものが見つかった(図3b). 3) mEHを発現するヒト肝細胞癌由来株 Huh1を用いた結果も2)と同じであった(data not shown). 以上の結果と各グループの代表的な抗体の免疫グロブリンアイソタイプの結果をまとめると, 表2のように I から V までの5つのタイプに分類することが出来た.

この5種類の抗体のうち I ~ IV が認識する各々のエピトープのmEH分子上での位置関係を調べるために, 抗体同士のcompetitive binding assayを行った. 固相化した精製 mEH に対し, 各種抗体を精製後 125 I で標

識した抗体と非標識抗体とを混合して反応させ, 互いの競合度を測定した(表3). この測定にエピトープが分かっている抗ペプチド(aa54-71) mEHウサギ抗体も加えた. その結果, I と II の間では有意な競合が見られ, 互いのエピトープが近傍に存在することが示唆された. 同じようにN末部分を認識するIIIはI, IIとの競合が殆んどないが, 抗aa54-71ペプチドウサギ抗体と競合することが分かった. このタイプIIIの抗体の特異性を確認するためにaa54-71ペプチドを固相化したELISAを行ったところ, タイプIIIの抗体のみが反応した(図2d)ので, タイプIII抗体のエピトープはaa54-71の配列内に存在するものと思われた. タイプV抗体については高次構造を保持したmEH抗原を用い

てcompetitive binding assayを行ったところ、同じVに属する2種の抗体同士でのみ競合が見られた(表3)。以上の結果から、5つのタイプの抗体が認識するエピトープは表4に示したように結論することが出来た。

正常肝細胞表面のmEH発現

次に以上のタイプI～Vの抗体を用いて正常肝細胞表面のmEHの存在形態について調べた。mEHは主として小胞体膜上に存在するが、細胞膜表面にも発現していることが知られている⁷⁾。そのどちらの膜においても、mEHがどのようなトポロジーで存在するかはまだ定かでない。ラットのmEH遺伝子に

N glycosylation siteを導入し、細胞にトランスフェクションしてmEHの膜上のトポロジーを調べたD.Levyの実験に基づく説⁸⁾では、図4に示すように細胞表面膜上ではN末が細胞質側を向き、C末が細胞外に表出して(type II topology) Na⁺イオン依存性に胆汁酸をトランスポートしている。一方小胞体膜上では大半(約80%)のmEHがtype I topologyを示し、一部(約20%)のみがtype II topologyを示すという。そこでわれわれは手術と剖検で得られたヒトの肝臓を用い、collagenase 処理で細胞を分散後、5つのタイプのモノクローナル抗体と反応させてFCAS解析を行い、細胞表面におけるmEHのエピトープ発現を調べた。図5

表 2.

Clones	Isotype	L-chain	ELISA					Western blotting			Type
			#1	#2	#3	#4	polymer	Bac-Sf9	T5b	Huh1	
2D8	G2a	k	+	+	-	-	+	A	54K, 49K	54K, 49K	I
5D8	G1	k	+	+	-	-	+	A	54K, 49K	54K, 49K	I
K4F8	G1	k	+	+	-	-	+	A	49K	49K	III
K2B7	G1	k	+	+	-	-	+	C	49K	49K	II
6E3	G1	k	+	+	+	+	+	B	49K	49K	IV
2G2	G1	k	-	-	-	-	+	-	-	-	V

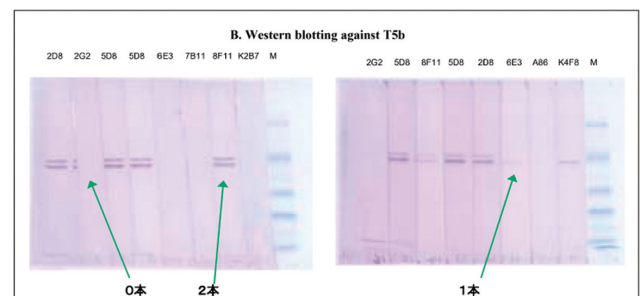
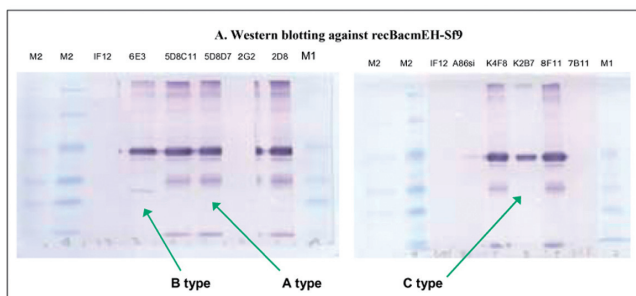


図 3. mEH発現細胞抽出液に対する各種モノクローナル抗体のimmunoblotting.

(a) 組換えバキュロウイルス感染でmEHを発現したSf9細胞.

(b) ヒト正常肝細胞由来細胞株THLE-5b.

表 3. Competitive binding assay

		Competitor Ab								
		Type I		Type III	Type II	Type IV	Type V		Rabbit	
		2D8	5D8	K4F8	K2B7	6E3	2G2	1H9	anti-aa54-71	
¹²⁵ I-Ab	Type I	5D8	96.1	100.0	62.6	30.9	38.0	1.4	1.4	4.2
	Type II	K4F8	93.9	94.7	100.0	16.9	10.5	15.5	15.5	25.9
	Type III	K2B7	28.4	54.2	72.0	100.0	39.7	0.0	0.0	99.3
	Type IV	6E3	30.0	26.2	43.4	44.0	100.0	43.0	43.0	51.6
	Type V	2G2	N.D.	17.9	N.D.	N.D.	9.1	100.0	100.0	N.D.
	Type V	1H9	N.D.	14.1	N.D.	N.D.	10.7	87.8	100.0	N.D.

表 4.

Type I: Anti-N-terminus (aa.21-143) linear epitope, Cross-reacts with 54-KDa protein
Type II: Anti-N-terminus (aa.21-143) linear epitope
Type III: Anti-N-terminus (aa.54-71) linear epitope
Type IV: Anti-C-terminus (aa.327-455) linear epitope
Type V: Anti-conformational epitope

に示すように, 3例の正常肝, 1例の脂肪肝のいずれにおいてもType I, II, III, Vのエピトープが細胞表面に発現していたが, Type IVだけは全く検出されなかった. これらの結果は肝細胞表面でのmEHはC末が表出せずにN末が出ているtype I topologyをとっていることを示唆し, かつその多くは分子内あるいは分子同士が特定の高次構造をとっていることを示唆している.

正常リンパ球でのmEH発現

次に別の種類の正常細胞でのmEHの発現を調べた. mEHは肝臓以外にも多くの組織で発現している⁹⁾. 我々はヒト肝細胞で得られたmEHのエピトープ解析の結果が, 他の細胞についても同じであることを確かめることにした. そこで正常人の抹消血リンパ球2例について同様にFCAS解析を行ったところ, 肝細胞と大きく異なり, 細胞表面ではいずれの抗体とも反応が全く見られなかった(図6a, c). 細胞内でのmEH発現を確認するために, 細胞をdetergentでpermealize処理し, 細胞内の抗原を調べたところ5つのタイプのうちtype Vを除く4種の抗体のいずれとも反応を示し, 細

胞内では肝細胞同様にmEHが発現していることが確認された(図6b, d). 以上よりリンパ球ではmEHは細胞内でのみ発現し, しかも肝細胞と大きく異なり, 細胞内外いずれにおいてもそれがtype V抗体が認識するような高次構造をとることなく, 殆どの分子はおそ

Bile Acid Transport by mEH (Daniel Levy)

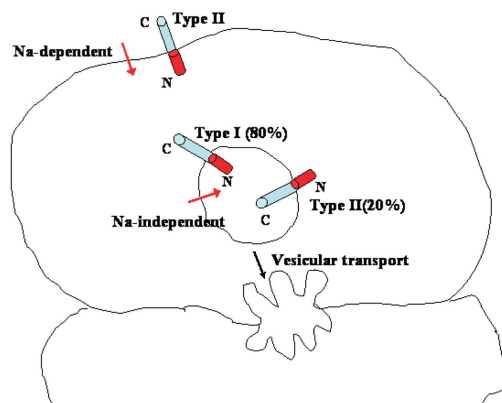


図 4. mEHのmembrane topologyに関するDaniel Levyらの説を模式図にしたもの.

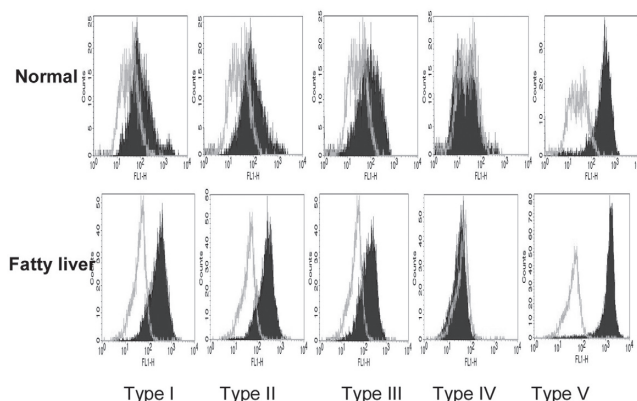
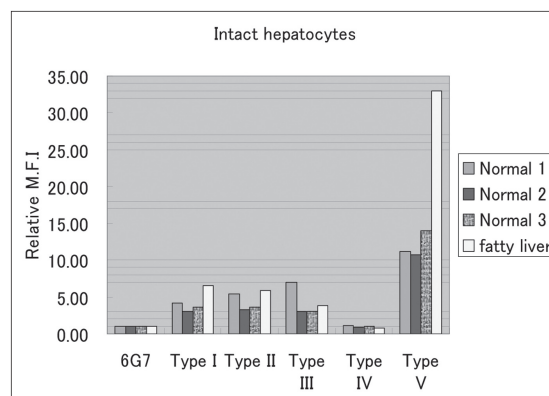


図 5. 正常人肝細胞表面のmEHエピトープ発現解析. 手術または剖検時に採取したヒト肝臓をコラゲナーゼ処理で処理後, 5種の抗体と反応させてflow cytometryを行った. (a)2つの代表例を示す.



(b) 調べた4例それぞれの結果をmean fluorescence intensityで示す.

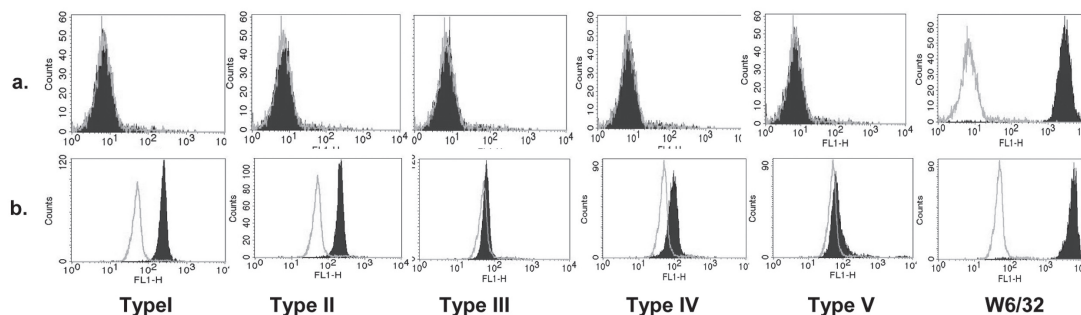
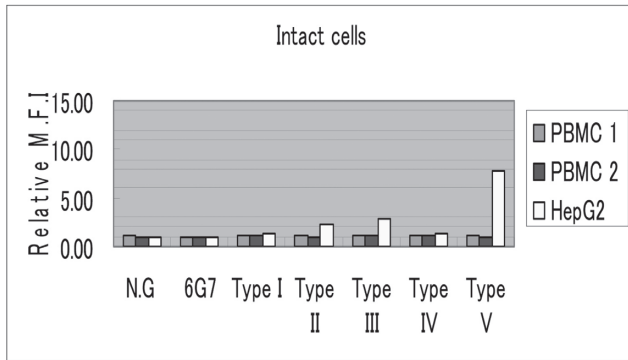


図 6. 正常人リンパ球でのmEH発現の解析.

(a) 正常人リンパ球を分離後5種の抗体と反応させてflow cytometryを行った. (b) 同じ細胞をBD Cytofix/Cytopermを用いてpermealizeし, 同じ抗体と反応させた.

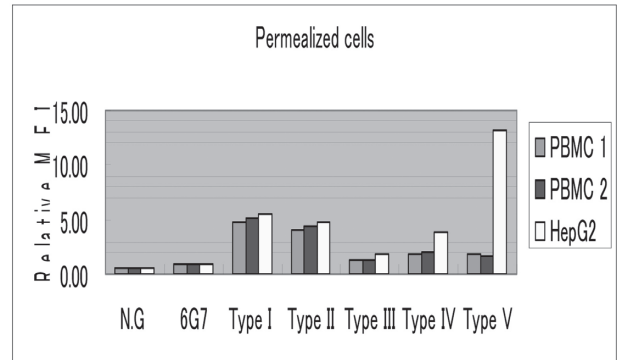


(c)4検体の結果を陰性コントロール抗体(6G7: 抗HCV core抗体)と比較したrelative mean fluorescence intensityで示した。W6/32: anti-MHC class I monoclonal antibody (陽性コントロール)。

らくモノマーの形で存在しているものと推測された。mEHの発現量が組織間で異なることは知られているが、このように存在形態が大きく異なることは知られていなかったの、とても価値のある知見であると思われる。

肝細胞株でのmEH発現

mEHはその遺伝子に多型性があり、特定の遺伝子型が種々の癌や慢性疾患の発生と相関があることが知られている¹⁰⁻¹³。またある種の癌細胞で過剰発現したり、ラットの化学発癌実験における肝細胞癌発生において癌発生に先立ってmEHが血中で検出され、preneoplastic antigenとも呼ばれた¹⁴。このようにmEHは肝細胞癌を含む多くの癌の発生に関連していることが知られている。そこでmEHの存在形態が発がんの過程で変化を受けていないかを知るために、正常肝細胞および肝細胞癌由来の細胞株3種について、今回得られたモノクローナル抗体を用いて調べてみた。1) 正常肝細胞をSV40 T抗原遺伝子の導入により不死化したTHLE-5b (T5b) 細胞では5種のエピトープのいずれも細胞表面では検出されなかった(図7a, c)。正常肝細胞は培養後短時間でmEHの細胞表面発現が失われることが知られており、THLE-5bのこの所見は培養状態にある正常肝細胞とよく似ていると思われた。2) 一方比較的分化した状態にあり、 α -fetoproteinの発現能も保持しているHuh-7ではtype Vの顕著な発現が認められ、type I, II, IIIもわずかであるが一部の細胞で認められた(図7a, c)。3) 未分化な肝細胞癌由来のHuh-1では全てのエピトープが細胞表面に発現しており、フレッシュな正常肝細胞やリンパ球では認められなかったtype IVのエピトープの発現も認められた(図7a, c)。いずれの細胞においても細胞内ではすべてのエピトープが発現していることは、細胞をpermealizeした後に抗体と反応させる実験で確認された(図7b, d)。今回の結果はtype IVのエ



(d)

ピトープの細胞表面発現が癌細胞特異的である可能性を示唆しており、非常に興味深い。

RNAウイルス感染が肝細胞株のmEH発現に及ぼす影響

肝炎患者血清中の抗mEH抗体出現がHCVとHAV感染でのみみられ、HBV感染や薬剤肝障害ではみられないことから、mEHの抗原変化がRNAウイルス感染に共通して起こることが1つの可能性として考えられた。そこで培養肝細胞にウイルスを感染させ、mEHの発現変化をタイプI-Vの抗体を用いて調べた。THLE-5bにRNAウイルスの1種であるSendai virusまたはDNAウイルスの1種であるワクシニアウイルスを感染させ、mEHの発現量をwestern blottingによる定量と、アセトン固定して蛍光抗体法を行って局在変化の検討を行ったが、全く差は認められなかった(data not shown)。そこで細胞をEDTA処理により単離し、細胞表面におけるmEH発現をflow cytometryで調べてみると、Sendai virus感染細胞でのみtype Vエピトープが細胞表面に出現することが認められた(図8)。肝炎ウイルスHCVとHAVのうちHAVは、それまでにmEHの発現を検討した細胞株中のHuh7に感染が可能であるので、その細胞についても検討を行った(図9)。その結果タイプVに加えタイプIIIのエピトープが細胞表面に出現すること、細胞内では全てのエピトープが検出され、ウイルス感染による変化はないことが分かった。

Poly(I:C)処理でRNAウイルス感染と同じ変化を引き起こすことができる

RNAウイルスが感染するとインターフェロン産生につながる非特異免疫系のシグナル伝達が誘導され、そのトリガーとしてPoly(I:C)がRNAゲノムの代用にしばしば用いられる。THLE-5bの培養液にこれを加えると、Sendai virusやLCMウイルス感染時と同様にtype Vエピトープの細胞表面発現が見られた(図10)。Poly(I:C)をトランスフェクションにより細胞内に導入

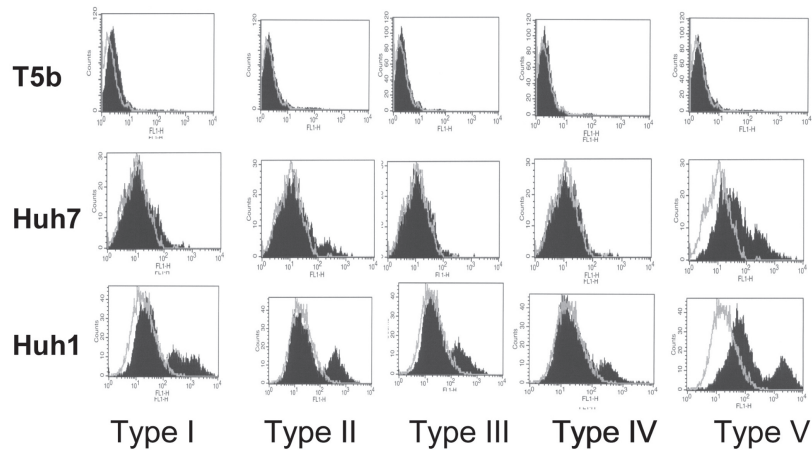
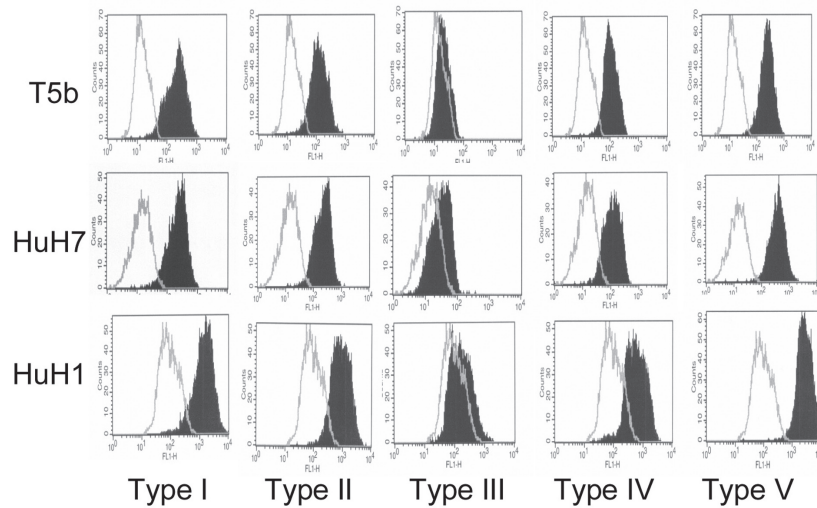
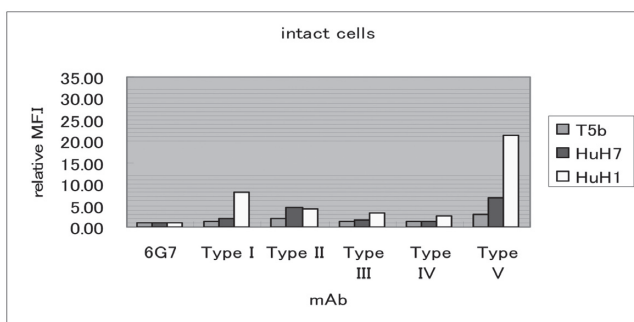


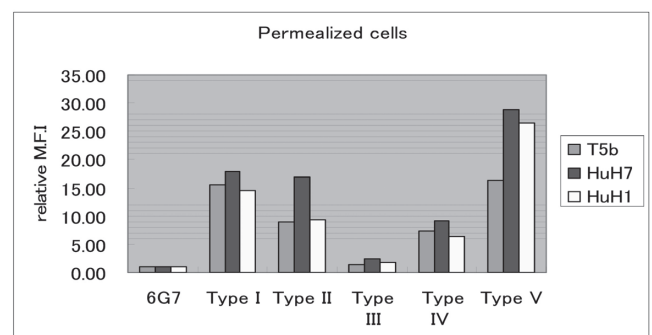
図 7. (a)3種の肝細胞株 (THLE-5b, Huh7, Huh1) の表面でのmEH発現解析.



(b)同じ3種の細胞の内側でのmEH発現解析.



(c) aの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの。



(d) bの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの。

しても同様な変化が認められた (data not shown).

RNAウイルス感染によりmEHが介在する代謝系に変化が起こる

Phase II 解毒酵素の1種であるmEHは, CYP450 等の phase I 解毒酵素との共同作業で生体異物の代謝

を行う. その機能を発揮するためには細胞の膜上で P450 などと正しい位置関係を取る必要がある¹⁵⁾. もしこれが RNAウイルス感染により変化を受けるとすると, mEH が関与する代謝機能にも障害がおきると予想された. 発がん有機物質である DMBA は CYP1A1 または CYP1B1 と mEH との共同作業で酸化と加水分解を受け, DNA と結合して変異原性を発揮する DMBA-

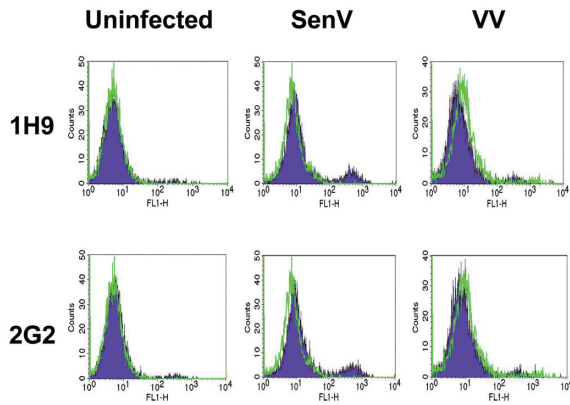
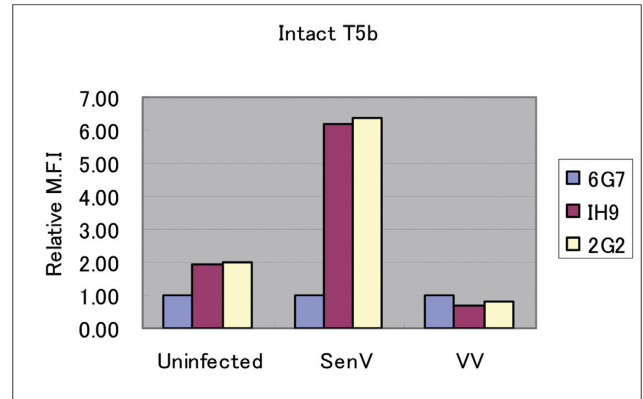


図 8. THLE-5b(T5b)細胞表面でのmEH type Vエピトープ発現.
(a)Uninfected: 未感染細胞, SenV: Sendai virus感染細胞, VV: ワクシニアウイルス感染細胞 それぞれのflow cytometry.



(b)aの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの。

a. Intact cells

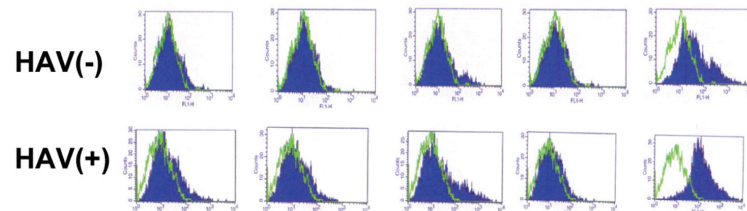
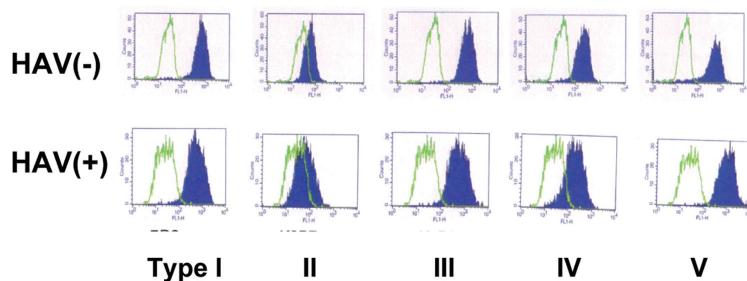


図 9. Huh7細胞表面でのmEH type Vエピトープ発現.

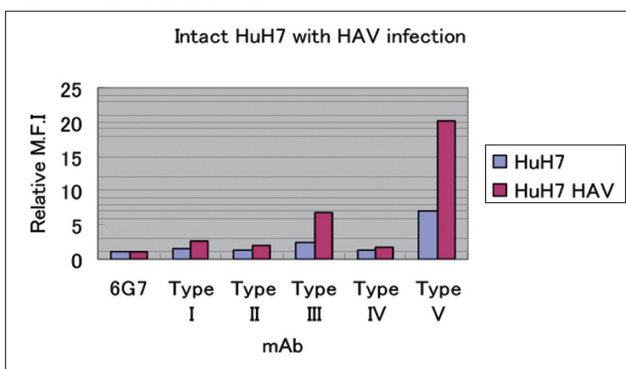
(a) HAV感染細胞 (HAV(+)) と未感染細胞 (HAV(-)) を生きたまま抗体と反応させたもの。

b. Permealized cells



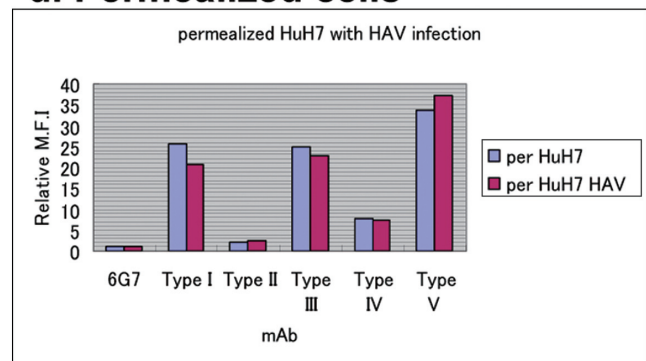
(b) HAV感染細胞 (HAV(+)) と未感染細胞 (HAV(-)) の細胞膜をpermealize後抗体と反応させたもの。

c. Intact cells



(c) aの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの。

d. Permealized cells



(d) bの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したものの。

3,4-diol-1,2-epoxideへと代謝される。これが細胞内に蓄積すると細胞傷害や発がんを引き起こされる⁹⁾。われわれはRNAウイルス感染によるmEHの発現変化がこの代謝過程にも影響を及ぼすと予想し、THLE-5bにPoly(I:C)を処理またはRNAウイルスを感染させ、DMBAによる細胞傷害性を測定して未処理細胞と比較した。結果は予想どおりで、図11に示すように、RNAウイルス感染 (SenV), あるいはpoly(I:C)を培養液に加えても (M-pIC), 細胞内にtransfectionで導入しても (T-pIC) いずれにおいても20倍以上の感受性の増加が認められ、代謝産物で変異原性・細胞毒性をもつDMBA-3,4-diol-1,2-epoxideが蓄積していると思われる。

RNAウイルスゲノムによるmEHへの影響にはRIG-Iを介したインターフェロン誘導経路が介在する

RNAウイルスが感染すると、細胞外にある2本鎖RNA分子はエンドソームに取り込まれ、そこで細胞のtoll-like receptorに結合し、IRF-3を介したシグ

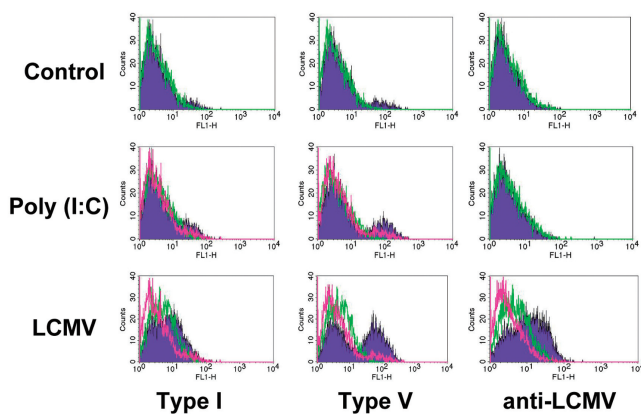
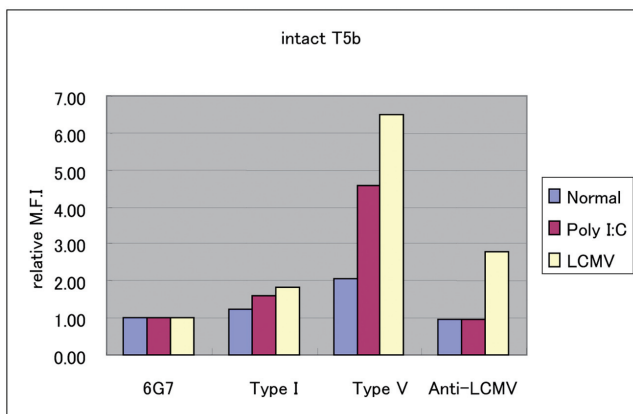


図 10. (a) 未処理 (Control), poly(I:C) 処理 (Poly(I:C)), LCMV 感染 (LCMV) THLE-5b(T5b) 細胞の膜表面でのmEH発現をtype I と type V 抗体エピトープについて調べたもの。



(b) aの結果をrelative mean fluorescence intensityで表したもの。

ナル伝達系によりインターフェロン α 遺伝子の発現にいたる。一方細胞内では2本鎖RNA分子はRIG-Iと結合した後、IPS-1を介した経路でシグナルが伝えられる¹⁶⁾。RNAウイルス感染がmEHに及ぼす変化もこの経路のいずれかが関与している可能性があると考えられた。Huh7細胞の変異株でRIG-Iに欠損を持つHuh7.5細胞とHuh7細胞にSendai virusを感染させ

a. T5b-M-pIC

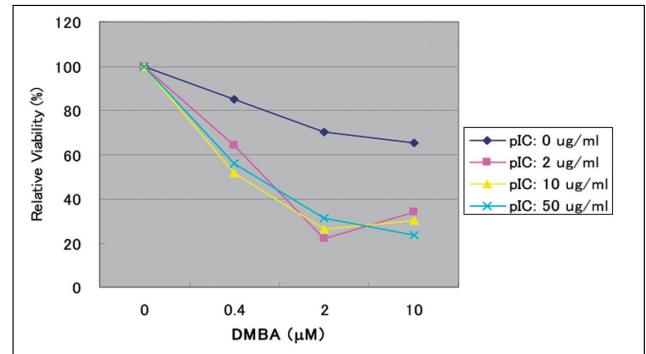
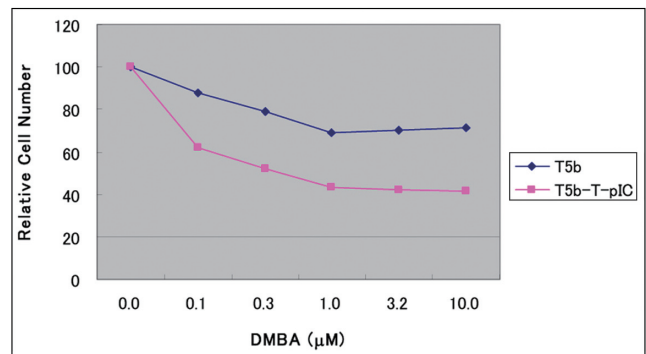


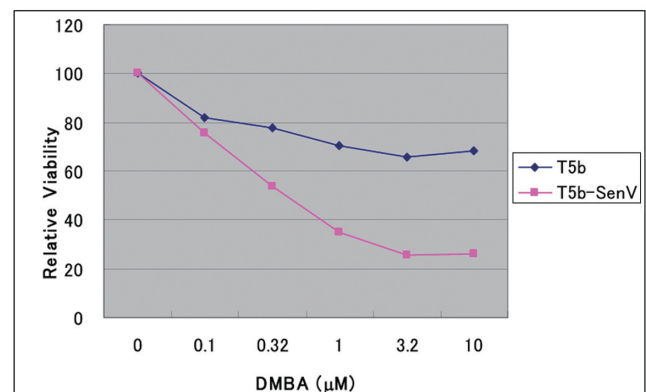
図 11. THLE-5b(T5b)細胞のDMBA細胞傷害試験。
(a) Poly(I:C)を種々の濃度で培地に加えたもの。

b. T5b-T-pIC



(b) Poly(I:C)をtransfectionして細胞内に導入したもの。

c. T5b-SenV



(c) Sendai virus感染細胞と未感染細胞の比較。

てDMBA感受性テストを行った。図12に示すようにRIG-Iに欠損のあるHuh7.5ではDMBAによる細胞傷害性が殆ど認められず、Sendai virus感染によるmEHへの影響にはRIG-Iが介在していることが示唆された。Huh7細胞はTLR3を発現していないので、poly(I:C)を培養液中に加えた実験では差が認められなかった。

マウスモデルでの実験

以上の実験は全てヒトのmEHに関するものであるが、RNAウイルス感染によるmEH機能の変化をin vivoで確認するためにマウスをモデルにした実験を行っている。上記のTHLE-5bを用いたDMBA cytotoxicity assayの結果から、RNAウイルスに持続感染したマウスでもmEHの局在変化と共に、それが関与する解毒機能にも変化が起こると予想される。そのようなマウスにDMBAを投与すれば、それに対する感受性が高まり、肝細胞障害や癌の発生頻度も上昇すると予想される。そこでLCMウイルスの変異株でマウスに持続感染を引き起こすclone-13をC56BL/6マウスに接種し、その3日後からDMBAを投与する実験を行った。その結果予想以上に激しい症状を引き起こし、低体温とショック症状で2週以内に半数近くが死亡した(data not shown)。

【考 察】

今回mEHの異なるエピトープに対する5種のモノクローナル抗体を得ることが出来、これを使用することにより、生理的・病的状態におけるmEHの存在形態を詳しく調べることが可能となった。肝細胞膜表面でC末のエピトープが表出していないことは新しい知見であるが、それが肝癌細胞で出現することも、mEHと発がんとの関連を推察するうえでとても興味深い。ラットの化学発癌実験の過程でmEHが血中に検出され、“preneoplastic antigen”と呼ばれ腫瘍特異抗原として注目されたこともあるが¹⁴⁾、今回得られた結果はやはりmEHが腫瘍細胞で特異な存在形態をとることを示している。

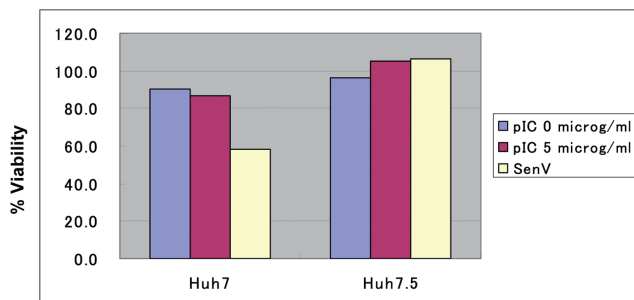


図 12. Huh7とHuh7.5のDMBA細胞傷害試験, Poly(I:C)を培地に加えるかSendai virusを感染させ、DMBAを3.2 μM加えた時の生存細胞数を示す。

mEHの存在形態が正常細胞でも、その種類によって大きく異なることも新しい発見である。mEHはepoxideを加水分解する触媒作用を行うだけでなく、肝細胞表面ではoligomeric structureをとってNa⁺-dependent bile acid transporterとして、そして小胞体膜上ではNa⁺-independent bile acid transporterとして働いていると考えられている¹⁷⁾。今回得られた抗体の内、Type Vはそのような数分子からなる高次構造を認識すると思われる。そのエピトープがリンパ球では細胞内外共に殆んど検出できなかったことから、2種の細胞の間でのmEHの発現の違いは単に量的な差ではなく、図13のように基本的な形態の違いが存在すると思われる。

Type V抗体が認識するmEHのoligomeric structureがウイルス感染により増加するという知見も今回得られたが、そのような細胞でもmEHの量自体に変化は認められなかったことから、ウイルス感染によりmEHによる触媒反応にはおそらく影響を受けることはないと思われる。それにもかかわらずDMBAにたいして感受性が10倍以上も高まったのは、変異原性をもつ代謝産物、DMBA-3,4-diol-1,2-epoxideの生成量が増えるためではなく、膜上のoligomeric structureがこの産物もトランスポートする機能も持っていて、その機能に差がでるためではないかと想像される。DMBAを処理したTHLE-5b細胞中のどこにDMBA-3,4-diol-1,2-epoxideがどれだけ存在するのか調べたかったが、それを測定する実験には、前駆体(DMBA-5-ブロム体)を還元してトリチウム化する必要がある、その前駆体がアメリカで製造中止となり手に入らないことが分かり、断念せざるを得なかった。このためDMBAに対する感受性更新のメカニズムは分からないが、マウスにおける実験でも予想通り、ウイルス感染によりDMBAに対する感受性が更新したことから、今後慢

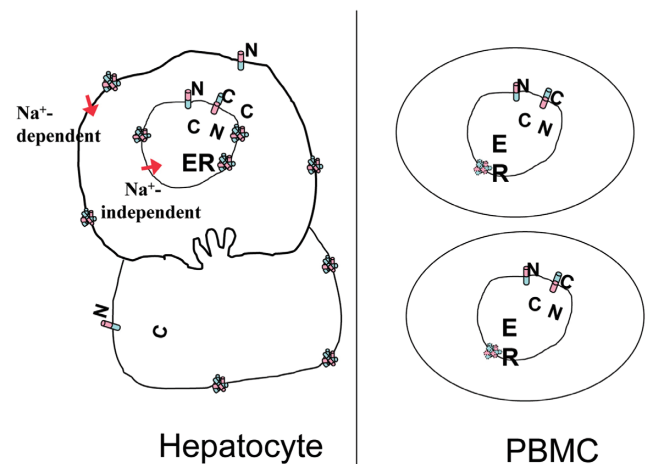


図 13. 正常ヒト肝細胞(Hepatocyte)とリンパ球(PBMC)におけるmEHの存在形態の違いに関する仮説。

性ウイルス感染症における肝細胞障害や肝癌発生に、mEHの受ける変化が深く関わっていることが示唆された。今回の実験結果は発がん仮説の検証には強すぎる効果であったので、現在投与量を変えたりして実験条件を検討している。最終報告までにmEHの機能異常に関するデータをそろえたい。

Reference List

- 1) Tohmatsu J, Morimoto T, Katsuhara N, Abe K, Shikata T. AN6520 Ag: An Antigen Purified From Liver With Non-A, Non-B Hepatitis. *J Med Virol* 1985;15:357-71.
- 2) Akatsuka T, Tohmatsu J, Abe K et al. Non-A, Non-B Hepatitis Related AN6520 Ag Is a Normal Cellular Protein Mainly Expressed in Liver. II. *J Med Virol* 1986;20:43-56.
- 3) Akatsuka T, Tohmatsu J, Yoshihara N et al. Detection of an Antigen (AN6520) Possibly Related to Non-A, Non-B Hepatitis, by Monoclonal Antibodies. I. *J Med Virol* 1986;20:33-42.
- 4) Akatsuka T, Kobayashi N, Ishikawa T et al. Autoantibody response to microsomal epoxide hydrolase in hepatitis C and A. *Journal of Autoimmunity* 2007;28(1):7-18.
- 5) Stone MR, Nowinski RC. Topological Mapping of Murine Leukemia Virus Proteins by Competition-Binding Assays with Monoclonal Antibodies. *Virology* 1980;100:370-81.
- 6) Miyata M, Kudo G, Lee YH et al. Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene. MICROSOMAL EPOXIDE HYDROLASE IS REQUIRED FOR THE CARCINOGENIC ACTIVITY OF 7,12-DIMETHYLBENZ[a]ANTHRACENE. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(34):23963-8.
- 7) Fretland AJ, Omiecinski CJ. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem Biol Inter* 2000;129:41-599.
- 8) Alves C, von Dippe P, Amoui M, Levy D. Bile Acid Transport into Hepatocyte Smooth Endoplasmic Reticulum Vesicles Is Mediated by Microsomal Epoxide Hydrolase, a Membrane Protein Exhibiting Two Distinct Topological Orientations. *J Biol Chem* 1993;268:20148-55.
- 9) Lu AYH, Miwa GT. Molecular Properties and Biological Functions of Microsomal Epoxide Hydrolase. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1980; 20:513-31.
- 10) Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Hirvonen A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res* 1998;58(23):5291-3.
- 11) Park JY, Chen L, Wadhwa N, Tockman MS. Polymorphisms for microsomal epoxide hydrolase and genetic susceptibility to COPD. *Int J Mol Med* 2005;15(3):443-8.
- 12) Tranah GJ, Giovannucci E, Ma J, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ. Epoxide hydrolase polymorphisms, cigarette smoking and risk of colorectal adenoma in the Nurses' Health Study and the Health Professionals Follow-up Study. *Carcinogenesis* 2004;Vol 25,Iss 7:1211-8.
- 13) Tiemersma EW, Omer E, Bunschoten A et al. Role of Genetic Polymorphism of Glutathione-S-Transferase T1 and Microsomal Epoxide Hydrolase in Aflatoxin-associated Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:785-91.
- 14) Levin W, Lu AYH, Thomas PE, Ryan D, Kizer DE, Griffin MJ. Identification of epoxide hydrolase as the preneoplastic antigen in rat liver hyperplastic nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(7):3240-3.
- 15) Ishii Y, Takeda S, Yamada H, Oguri K. Functional protein-protein interaction of drug metabolizing enzymes. *Front Biosci* 2005;10:887-95.
- 16) Sen GC, Sarkar SN. Hitching RIG to action. *Nat Immunol* 2005;6(11):1074-6.
- 17) von Dippe P, Amoui M, Alves C, Levy D. Na⁺-dependent bile acid transport by hepatocytes is mediated by a protein similar to microsomal epoxide hydrolase. *Am J Physiol* 1993;264:G528-34.

【研究成果リスト】

論文

Monoclonal antibodies reveal differential expression of human microsomal epoxide hydrolase in hepatocytes and lymphocytes. Hongying Duan, Kazunori Yoshimura, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Kazuo Sugiyama, Tugikazu Komoda, Isamu Koyama, Hidekazu Kayano, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka.
(in preparation)

学会発表

- 1) Akatsuka T, Ishikawa T, Kobayashi N, Duan H, Feinstein SM and Hammock BD. Autoantibody response to a drug-metabolizing enzyme, microsomal epoxide hydrolase in hepatitis C and A. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, Jul.1-5, 2006.
- 2) Akatsuka T, Kobayashi N, Sugiyama T, Duan H,

- Takagi A and Feinstone SM. Hepatitis C virus affects the location and function of a drug-metabolizing enzyme, microsomal epoxide hydrolase. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Cairns, Australia, Aug. 27-31, 2006.
- 3) 赤塚俊隆, 小林信春, 段洪英, 高木徹, 石川隆, 斎藤貴史, 進藤道子, 黒河内和貴, 杉山和夫. C型肝炎ウイルス複製に伴う薬物代謝酵素機能異常の解析. 第43回日本肝臓学会総会, 東京, May, 2007.
 - 4) 段洪英, 小林信春, 高木徹, 杉山和夫, 赤塚俊隆. 薬物代謝酵素 microsomal epoxide hydrolase (mEH) のエピトープ解析. 第43回日本肝臓学会総会, 東京, May, 2007.
 - 5) Analysis of the effect of HCV on the topology of the microsomal epoxide hydrolase with monoclonal antibodies with different epitope specificities. Hongying Duan, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Kazuo Sugiyama, Satoshi Ohno, Masanori Matsui, Masaru Nawa, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka, 14th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Glasgow, Scotland UK, Sep. 9-13, 2007.
 - 6) RNA virus infection affects the location and possibly the function of microsomal epoxide hydrolase. Hongying Duan, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka, Experimental Biology 2008, San Diego, CA, USA, Apr. 5-9, 2008.
 - 7) Analysis of the topology of microsomal epoxide hydrolase on the cell surface with monoclonal antibodies with different epitope specificities. Hongying Duan, Kazunori Yoshimura, Nobuharu Kobayashi, Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Kazuo Sugiyama, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka, Experimental Biology 2008, San Diego, CA, USA, Apr. 5-9, 2008.

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

糖尿病網膜症，加齢黄斑変性症の遺伝子解析：PEDF および
CFH 遺伝子を中心として

研究代表者 栗田 卓也（埼玉医科大学 内分泌・糖尿病内科）

研究分担者 森 圭介¹⁾，栗原 進²⁾，大崎 昌孝²⁾，樺沢 昌¹⁾

緒 言

疾患の発症に関与する遺伝子(疾患感受性遺伝子)を同定することは，疾患の発症機序を明らかにする上で有用であるのみならず，その予知，リスク評価，予防，オーダーメイド医療への展開においても重要である。成人の失明の二大原因である糖尿病網膜症と加齢黄斑変性症は有効な治療法が少なく，その疾患感受性遺伝子を明らかにすることは特に重要と考えられる。糖尿病網膜症は最近の糖尿病患者の急増により増加しており，視力に重要な黄斑部の障害を来す黄斑浮腫(黄斑症)あるいは異常血管新生を来す増殖網膜症が失明の原因となる。加齢黄斑変性症は高齢人口の増加に伴いわが国でも急増しており，黄斑部の病変(萎縮あるいは出血・滲出)のために高度な視力障害を来す。

糖尿病網膜症の疾患感受性遺伝子に関しては，これまでアルドース還元酵素(ALR2)，糖化最終産物受容体(RAGE)などの遺伝子多型との関連が報告されてきた。われわれは糖尿病網膜症の病態形成に強く関与する増殖因子として血管内皮増殖因子(VEGF)に注目し，研究を進めてきた。VEGFは，黄斑部の毛細血管の透過性亢進により生ずる黄斑症の病因としても注目されている。われわれは，VEGF 遺伝子のC-634G多型と網膜症および黄斑症との有意な関連を見出し^{1,2)}，内皮細胞機能に重要なeNOS 遺伝子の27 bp 繰り返し多型およびT-786C多型と黄斑症との有意な関連を見出した³⁾。さらに最近，網膜色素上皮細胞などから豊富に産生され，神経網膜の保護に重要であるとともに強力な血管新生抑制因子である色素上皮由来因子(PEDF)に着目した⁴⁾。PEDFは血管透過性亢進の抑制作用⁵⁾，VEGFの発現抑制および抗炎症作用⁶⁾もあり，VEGFと拮抗的に働く糖尿病網膜症・黄斑症の発症の重要な阻止因子と考えられる。

一方，加齢黄斑変性症の疾患感受性遺伝子についても種々の候補遺伝子との関連が検討されてきたが，最近大きな進展が認められた。補体活性化の代替経路の抑制因子である補体因子H(CFH)との関連がScience誌に相次いで報告され⁷⁻⁹⁾，その後の追試でも高度な関連が確認された。以前から加齢黄斑変性症の前駆病変として黄斑部に認められるドルーゼンには補体成分が検出されており，関連の機序として，加齢，喫煙，感染などの環境因子がtriggerとなり惹起された補体活性化による慢性炎症の遷延が推察される。さらに，セリンプロテアーゼHTRA1の遺伝子多型も疾患感受性遺伝子として最近同定された^{10,11)}。

対象と方法

2型糖尿病患者416例，加齢黄斑変性患者188例，コントロール139例を対象とし，書面による同意を得た上で，血液からDNAを抽出した。遺伝子多型の決定は，PCR-RFLP法あるいはTaqMan法により行った。各多型と，糖尿病網膜症・黄斑症，加齢黄斑変性症との関連の遺伝学的検討は，case-control 関連解析，および臨床指標を加味した多重ロジスティック回帰分析により行った。また，個々の多型に関してHardy-Weinberg平衡の検定を行うとともに，各遺伝子の多型間の連鎖不平衡検定，ハプロタイプ解析を行った。

結果と考察

1. 糖尿病網膜症とPEDF 遺伝子多型との関連¹²⁾

(1) PEDF多型のうち，プロモーター領域に存在するC-5740T(rs12150053)とA-5308G(rs12948385)が強い連鎖不平衡を形成し，網膜症および黄斑症と有意に関連していた。(2) ハプロタイプ解析では，-5740C/-5308A/-4879C/72Metが網膜症および黄斑症と有意に関連し，それ以外のハプロタイプは関連を認めなかった。(3) 臨床的指標を加味

1) 埼玉医科大学 眼科，2) 埼玉医科大学 内分泌・糖尿病内科

したロジスティック回帰分析でも、C-5740TとA-5308Gは網膜症および黄斑症の有意な危険因子であった（C-5740Tについて、それぞれ、オッズ比2.3, $p = 0.0002$ ；オッズ比2.2, $p = 0.006$, Table 1). (4) VEGF多型C-634G(rs2010963)も網膜症の有意な危険因子であったが（オッズ比1.6, $p = 0.005$), PEDF多型C-5740TとVEGF多型C-634Gは独立した危険因子であり、組み合わせるとオッズ比は7.06に増加した（Table 2). VEGFとPEDFが相加的に糖尿病網膜症・黄斑症に関連していた。その発症において、血管透過性、血管新生、炎症を促進するVEGFが増加し、VEGFと拮抗的に働くPEDFが減少することが、重要な病因と考えられつつある¹³⁾。われわれの成績はその仮説に合致するものである。

2. 加齢黄斑変成症とCFH遺伝子多型との関連¹⁴⁾

4つのCFH遺伝子多型（rs800292, rs1061170, rs2274700, rs1410996）の中で、エクソン2の非同義置換rs800292, エクソン10の同義置換rs2274700, およびイントロン14のrs1410996が加齢黄斑変成症と有意に関連していた（それぞれ, $p = 0.000009$, $p = 0.00004$, $p = 0.00002$). 一方、エクソン9の非同義置換rs1061170 (Y402H)は有意に関連していなかった。

Table. 1. Multivariate logistic regression analysis for the association with diabetic retinopathy

Variable	OR (95% CI)	p value
Female sex	0.82 (0.52-1.30)	NS
Age at onset	1.01 (0.99-1.03)	NS
Duration of disease	1.11 (1.07-1.15)	2.56×10^{-9}
Systolic blood pressure	1.01 (1.00-1.03)	0.0359
HbA _{1c}	1.01 (0.91-1.14)	NS
Cholesterol	1.00 (1.00-1.01)	NS
Insulin therapy	2.68 (1.60-4.48)	0.0002
PEDF C-5740T (rs12150053)*	2.40 (1.48-3.91)	0.0004

* Dominant model (TC or CC vs TT). OR, odds ratio; NS, not significant.

Table. 2. Interaction between VEGF C-634G (rs2010963) and PEDF C-5740T (rs12150053) in the association with diabetic retinopathy

SNP	DR (-) (n=229)	DR (+) (n=187)	OR (95% CI)*	p value
VEGF rs2010963 (CC vs CG or GG)	15.7% (36)	21.9% (41)	1.94 (1.09-3.46)	0.0239
PEDF rs12150053 (TC or CC vs TT)	27.1% (62)	39.6% (74)	2.40 (1.48-3.91)	0.0004
VEGF rs2010963 + PEDF rs12150053 (CC/TC or CC/CC vs others)**	3.9% (9)	13.9% (26)	7.06 (2.70-18.50)	6.95×10^{-5}

* Odds ratios were adjusted by multivariate logistic regression analysis including sex, age at onset, duration, systolic blood pressure, HbA_{1c}, cholesterol, and insulin therapy.

** Interaction between VEGF and PEDF SNPs is significant by multivariate logistic regression analysis ($p = 0.0158$).

日本人においてもCFH遺伝子多型が加齢黄斑変性症と明確に関連することを、初めて示すことができた。

3. 加齢黄斑変性症とHTRA1遺伝子多型との関連¹⁵⁾

HTRA1遺伝子プロモーター領域の多型rs11200638が加齢黄斑変性症と有意に関連していた（ $p = 0.000008$). さらに、病型別の解析では滲出型との関連が強く認められた。日本人においても、HTRA1遺伝子多型は加齢黄斑変性症感受性遺伝子であることを確認した。

文 献

- Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. 2002;Diabetes 51:1635-9.
- Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Inukai K, Inoue I, Kawasaki I, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. Biochem Biophys Res Commun 2005;333:679-85.
- Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Sawa T, Inukai K, Inoue I, Shibuya M, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. Diabetes Care 2004;27:2184-90.
- Tombran-Tink J. The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling. Front Biosci 2005;10:2131-49.
- Liu H, Ren JG, Cooper WL, Hawkins CE, Cowan MR, Tong PY. Identification of the antivasopermeability effect of pigment epithelium-derived factor and its active site. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:6605-10.

- 6) Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Shao C, Mott R, Ma JX. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *Faseb J* 2006;20:323-5.
- 7) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:385-9.
- 8) Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Nouredine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:419-21.
- 9) Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:421-4.
- 10) Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, Tam PO, Chan WM, Lam DS, Snyder M, Barnstable C, Pang CP, Hoh J. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 2006;314:989-92.
- 11) Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, Chen H, Zhao Y, Pearson E, Li X, Chien J, Dewan A, Harmon J, Bernstein PS, Shridhar V, Zabriskie NA, Hoh J, Howes K, Zhang K. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 2006;314:992-3.
- 12) Iizuka H, Awata T, Osaki M, Neda T, Kurihara S, Inoue K, Inukai K, Kabasawa S, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Promoter polymorphisms of the pigment epithelium-derived factor gene are associated with diabetic retinopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:421-6.
- 13) Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004;350:48-58.
- 14) Mori K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Kawasaki I, Oosaki M, Iizuka H, Katayama S, Awata T, Yoneya S. Coding and noncoding variants in the CFH gene and cigarette smoking influence the risk of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:5315-9.
- 15) Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, Kawasaki I, Gehlbach PL, Awata T, Yoneya S, Okazaki Y, Inoue S. Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population. *J Hum Genet* 2007;52:636-41.

研究成果リスト

- Iizuka H, Awata T, Osaki M, Neda T, Kurihara S, Inoue K, Inukai K, Kabasawa S, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Promoter polymorphisms of the pigment epithelium-derived factor gene are associated with diabetic retinopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(2):421-6.
- Mori K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Kawasaki I, Oosaki M, Iizuka H, Katayama S, Awata T, Yoneya S. Coding and noncoding variants in the CFH gene and cigarette smoking influence the risk of age-related macular degeneration in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:5315-9.
- Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, Kawasaki I, Gehlbach PL, Awata T, Yoneya S, Okazaki Y, Inoue S. Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population. *J Hum Genet* 2007;52:636-41.
- Miyazawa H, Kato M, Awata T, Kohda M, Iwasa H, Koyama N, Tanaka T, Huqun, Kyo S, Okazaki Y, Hagiwara K. Homozygosity haplotype allows a genomewide search for the autosomal segments shared among patients. *Am J Hum Genet* 2007;80(6):1090-102.

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

悪性高熱症素因者新規同定法の開発

研究代表者 水上 智 (埼玉医科大学 麻酔科学)

共同研究者 菊地 博達¹⁾, 岩瀬 良範¹⁾, 植村 靖史²⁾,
劉 天懿²⁾, 松下 祥²⁾

緒言

悪性高熱症 (malignant hyperthermia; MH) は、全身麻酔時に使用する揮発性の吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬の使用により発症する筋疾患である。臨床症状は高熱、筋強直、呼吸性・代謝性アシドーシス、頻脈、不整脈、高カリウム血症や高CK血症、ミオグロビン尿等を呈する^{1,2)}。この疾患は常染色体優性遺伝を示すが、日常生活上は全く問題がなく、全身麻酔を受けた場合にのみ発症するため、患者は悪性高熱症素因者 (malignant hyperthermia susceptible; MHS) と表現される。発症した場合には重篤で、適切な治療が行なわれなかった場合には死に至ることもある²⁾。疾患の本態は骨格筋細胞内のカルシウムイオン (calcium ion; Ca^{2+}) 動態異常に起因する代謝亢進であり、MHに特異的な臨床症状はなく、世界的に統一された臨床診断基準は今のところ存在しない。

現在のMHの確定診断は、局所麻酔下に筋生検を行い、骨格筋の Ca^{2+} 動態異常を直接観察することにより行われている。しかしこの方法にはいくつかの問題点がある。1. 素因者への侵襲性が高いこと、2. CICR(Ca^{2+} induced Ca^{2+} release)速度の測定を行っている施設が少ないこと、3. 筋肉採取後、48時間以内に検査を終了する必要があること、4. 測定に時間がかかり、同時に何例も検査をすることが不可能である等が挙げられる²⁾。原因遺伝子が1型リアノジン受容体 (Type 1 ryanodine receptor; RyR1) と判明していることから、遺伝子の変異点を検索する方法も試みられてきた。しかし、人種による変異点の差や、変異点の不明な症例も多いことが明らかとなっており、遺伝子変異の検索による診断は困難とされている³⁾。

遺伝要因を有するヒトが、MHを発症する可能性があるかどうかを、侵襲性の高い筋肉の生検に頼らず

に、簡便で、より精度が高い方法で予測することができれば、この疾患の解明、及び予防に貢献できる。採血による検査法は簡便で、患者への侵襲性が低い診断法といえる。

リンパ球は抗原や種々の液性因子により刺激されることで多様なサイトカイン産生性を示す。MHでみられる臨床症状は筋強直や代謝性アシドーシス、頻脈、体温上昇等多様であり、サイトカインによる作用等、免疫システムを巻き込んだ結果生じる可能性もある。近年、Bリンパ球には Ca^{2+} 放出チャネルとして機能するRyR1とイノシトール三リン酸受容体 (inositol triphosphate receptor; IP_3R) が存在し、これらを介して Ca^{2+} 応答が多様な免疫応答性に関与していることが示唆されている⁴⁾。

最近、 Ca^{2+} チャネルとして機能するRyR1が、マウスの樹状細胞 (dendritic cell; DC) に発現することが明らかにされた⁵⁾。DCは生体内の至る所に存在し、常に外界からの異物の侵入を監視し、生体内に侵入する異物特有の構造パターンを認識することで、未成熟な状態から免疫応答を惹起する成熟DCへと分化する。さらに、認識した異物の構造の違いにより、異なる分化を経ることで免疫応答性 (特にヘルパーT (Th) 応答性) を制御している⁶⁾。細菌由来のLPSを認識したDCは、主に細胞性免疫応答 (Th1) を誘導し、寄生虫などに由来する特殊な糖脂質の糖鎖構造を認識したDCは、主に体液性免疫応答 (Th2) を誘導する⁷⁻¹¹⁾。このように高度に発達分化した免疫担当細胞は、種々の刺激に対し多様な遺伝子を発現し、生体内の免疫恒常性を維持するために重要な役割を演じている。さらに、DCは種々の刺激により特殊な液性因子を産生するだけでなく、細胞遊走、形態学的変化等多様な細胞応答を示すことから、MHSと健常人との相違点を、これらをターゲットとして探索するのに有用である。

本研究では、ヒトDCを用いた悪性高熱症診断法の

1) 埼玉医科大学 麻酔科学、2) 埼玉医科大学 免疫学

開発を目的として, ヒトDCにおけるRyRサブタイプの発現とRyRのCa²⁺チャネルとしての機能をRyRアゴニストを用いて評価し, その有用性を明らかにした¹²⁾.

材料と方法

モノサイト由来DC (monocyte-derived dendritic cells; Mo-DCs) の誘導

インフォームドコンセントの得られた健康人ボランティアの末梢血からFicoll-Paqueを用いた密度勾配遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) を分離した. さらにこのPBMCより, CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてCD14陽性細胞を分離した. 分離したCD14陽性細胞を6穴プレートに 2×10^6 /mlになるように調整し, 50 ng/ml ヒトリコンビナント (rh) IL-4, および50 ng/ml rhGM-CSF (Primmune, Osaka, Japan) を加えた5%ヒト血清入りRPMI1640 (SIGMA, St Louis, MO) で6日間培養したものをモノサイト由来樹状細胞として用いた. DCに成熟刺激を加えないものを未熟DC (immature DC; iDC) とし, iDCに成熟誘導因子であるプロスタグランジンE₂ (PGE₂) (10 μ M) + TNF α (100 ng/ml), あるいはLPS (10 μ g/ml)を加え, 48時間培養して得られたものを成熟DCとして解析に用いた.

RT-PCRによるRyR発現の評価

モノサイト由来DC (iDC, PGE₂-DC, LPS-DC) よりtotal RNAを抽出し (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Maryland, USA), complementary DNA (以下cDNA) を合成した (Omniscript RT kit, QIAGEN, Maryland, USA). 内在性のコントロールとして β -actinを使用し, RyR1-3の陽性コントロールとしてヒト脳cDNA (Origene, Rockville, MD, USA) を使用した. 以下に示すプライマーを用いて各RyRサブタイプの遺伝子発現をReverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法により評価した.

RyR1; 5'-CAGATGAAGCATTTGGTCTCCAT-3',

5'-GACATGGAAGGCTCAGCTGCT-3',

RyR2; 5'-CAGATGAAGCATTTGGTCTCCAT-3',

5'-AAGGAGCTCCCCACGAGAAGT-3',

RyR3; 5'-CAGATGAAGCATTTGGTCTCCAT-3',

5'-AAGAGGAAGAAGCGATGGT-3',

β -actin; 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3',

5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3',

PCR反応は95°C 1分, 62°C 1分, 72°C 2分, 30サイクルで反応させた.

リアルタイムPCR

遺伝子発現量はTaqMan Gene Expression Assays (RyR1; Hs00166991_m1) を用いて定量した (ABI PRISM 7900 Sequence Detector; Applied Biosystems). GAPDHの発現量を一般化し, ddCT法によりRyR1遺

伝子発現量を定量した.

細胞内カルシウム動態の測定

calcium buffer (calcium buffer; 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine -N'-2-ethanesulfonic acid; pH 7.5)) およびCa²⁺指示薬Fura-2-AM (5 mM) (Biotium, Hayward, CA, USA) でDCを4°C, 30分インキュベートした. 1×10^6 /mlに調整したDCを, cell tak (BD Biosciences, CA, USA) を塗布したガラスベースディッシュ (Iwaki, Chiba, Japan) に固定し, 4°Cにて30分間静置した. この際にRyR1阻害薬として20 mM ダントロレン (Calbiochem, Darmstadt, Germany), IP₃R阻害薬として10 mM ゼストスポンギンC (Wako, Osaka, Japan), 細胞外Ca²⁺キレート剤として5 mM EGTA (WAKO, Osaka, Japan), 細胞内Ca²⁺キレート剤としてBAPTA-AM (nacalai tesque, Kyoto, Japan) 存在あるいは非存在下のものを用意した. これを37°Cに保ち, RyRアゴニストである細胞内Ca²⁺誘導性試薬 (4-クロロ-m-クレゾール; 4-chloro-m-cresol; 4CmC, ならびにATP) を直接添加した. 5秒毎の蛍光強度を蛍光顕微鏡を用いて2波長励起1波長蛍光計測 (340 nm, 380 nm) し, ニコンTE2000倒立顕微鏡 (Nikon ECLIPSE TE 2000) と, Aqua Cosmos画像解析装置 (浜松ホトニクス; Hamamatsu Photonics) を用いて測定解析した. 結果は340/380 nm蛍光強度比にて示した.

DCの表現型の解析

DCの表面分子の発現はフローサイトメトリーにより解析した. 解析の際には死細胞 (7-ADD陽性細胞) を除去した. DCのアポトーシスは, 死細胞の除去を行わずにAnnexin V陽性細胞をアポトーシス細胞として検出した.

混合リンパ球反応

PBMCよりCD4⁺CD45RO⁺ (ナイーブ) Th細胞を精製した (CD4⁺Tcell isolation kit II, CD45RO microbeads; Miltenyi Biotec). 放射線照射 (3000cGy) したDCとアロナイーブTh細胞を共培養した. 5日後, [³H]-thymidine (1 μ Ci/well) をパルスし, 16時間後の放射能の取り込みを定量することでT細胞増殖応答を評価した.

サイトカイン測定

DCより産生されるサイトカインはELISA法により定量した (R&D systems; Minneapolis MN).

結 果

1. ヒトDCはRyR1を発現する

主なヒト免疫担当細胞におけるRyRサブタイプの遺伝子発現を評価した. DCにおいてはiDC, PGE₂-DC, LPS-DCの3つのDCサブセットを解析に用いた. ヒト

脳細胞はすべてのRyRサブタイプ (RyR1, 2および3) を発現する為, これを陽性コントロールとした。また, β -actinは内在性コントロールとした。図1Aに示すように, RyR1は未熟および各成熟DCにおいて発現が認められた。特にiDCは, PGE₂-DC, LPS-DCなどの成熟DCに比較してRyR1遺伝子の高発現を認めた。RyR2, 3はDCには発現が認められなかった。

定量的PCR解析においてRyR1遺伝子は未熟DCにおいて最も多く発現していた(図1B)。

2. 4CmCはヒトDCにおける細胞内ストアからの細胞内Ca²⁺上昇を誘導する

次に我々は, RyRアゴニストである4CmCを用いてDCを刺激することによって, 細胞内Ca²⁺が上昇するかを検討した(図2)。

細胞内外のCa²⁺を除去せずに4CmC (500 mM) 刺激することによりヒトDCは, 細胞内Ca²⁺の持続性の上昇が認められた(図2A)。さらに, EGTAを用いて細胞外Ca²⁺を除去して4CmC刺激した場合においては, 細胞内Ca²⁺の一過性の上昇が認められた(図2B)。一方, BAPTA-AMを用いて細胞内Ca²⁺を除去して4CmC刺激した場合では細胞内Ca²⁺上昇は認められなかった(図2C)。以上より, ヒトiDCは4CmC刺激することにより細胞内Ca²⁺上昇を示すが, この細胞内Ca²⁺上昇は細胞内Ca²⁺ストアに由来することが明らかとなった。

細胞外のCa²⁺をキレートし, 各受容体の阻害薬のない状態で, DCを4CmC刺激した場合には細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図2D)。ダントロレン存在下, 4CmC刺激した場合では, DCにおける細胞内Ca²⁺上昇の抑制が認められた(図2E)。一方, ゼストスポンギンC存在下, DCを4CmC刺激した場合では, 細胞内Ca²⁺上昇の抑制は認められなかった(図2F)。以上より, 4CmC刺激により誘導される細胞内Ca²⁺上昇は, RyRを介したものであり, IP₃Rを介さない応答であることが示唆された。

図2G~2Iは未熟, 成熟の各DCを4CmC刺激し, 細胞内カルシウムの上昇を評価したものである。細胞外のCa²⁺をキレートし, 各受容体の阻害薬のない状態で, iDCを4CmC刺激した場合には細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図2G)。また, 細胞外のCa²⁺をキレートし, 各受容体の阻害薬のない状態で, PGE₂-DCを4CmC刺激した場合にも細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図2H)。細胞外のCa²⁺をキレートし, 各受容体の阻害薬のない状態で, LPS-DCを4CmC刺激した場合においても細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図2I)。それぞれのDCにおけるCa²⁺上昇パターンに相異は認められなかった。

3. RyR1刺激がヒトDCの成熟に及ぼす影響

LPS刺激の際に4CmCあるいは4CmCとダントロレンを加え, HLA-DRとCD86分子の発現を評価した。HLA-DRとCD86分子は, DCの成熟が促進した際に

発現が上昇する分子である¹³⁾。Annexin Vはアポトーシスをおこした細胞に陽性となる。LPS刺激の際に4CmCを添加したDCは, HLA-DRおよびCD86分子の上昇が促進された(図3-A)。また, この効果はダントロレンで抑制された。従って, RyR1を介したカルシ

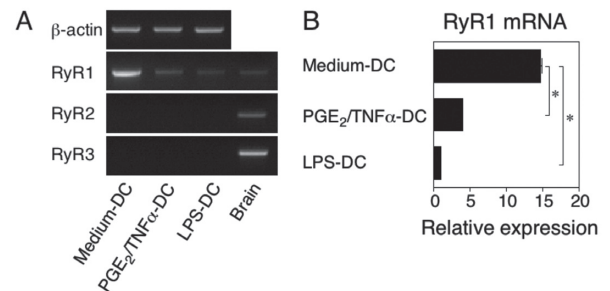


図1. ヒトDCにおけるRyR遺伝子発現。

A. iDC, PGE₂-DC, LPS-DCにおけるRyRサブタイプの発現をRT-PCR法で解析した。脳cDNAは各RyRサブタイプの陽性コントロールとして, β -actinは内在性コントロールとして使用した。

B. iDC, PGE₂-DC, LPS-DCにおけるRyR1の発現量をリアルタイムPCR法で解析した。

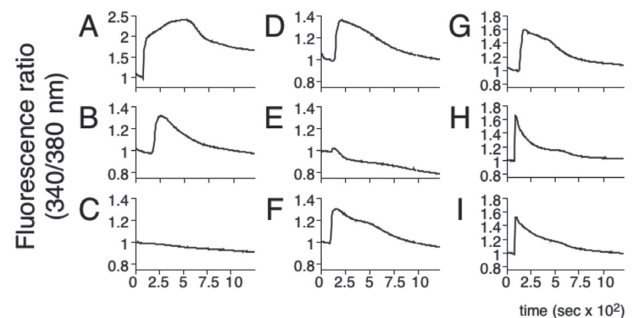


図2. ヒトDCにおけるRyR1はCa²⁺チャネルとして機能する。

A. EGTA (5 mM) 非存在下, BAPTA-AM (50 mM) 非存在下でヒトDCを4CmC (500 mM) 刺激した際のCa²⁺応答を示す。

B. EGTA存在下, 4CmC刺激したヒトDCにおけるCa²⁺応答を示す。

C. BAPTA-AM存在下で4CmC刺激したヒトDCにおけるCa²⁺応答を示す。

D. EGTA存在下, ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

E. EGTA存在下, ダントロレン存在下, ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

F. EGTA存在下ゼストスポンギンC存在下, ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

G. EGTA存在下, ヒトiDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

H. EGTA存在下, ヒトPGE₂-DCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

I. EGTA存在下, ヒトLPS-DCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

横軸は時間, 縦軸は2波長励起1波長蛍光計測によって得られた蛍光比, fluorescence ratio (340/380 nm) を示す。

ウムシグナルはDCの成熟を促進することが明らかとなった。

次に、これらDCにおけるアロMLR誘導活性を評価した。DCの成熟状態が強ければ、アロ抗原を認識するT細胞の増殖応答が促進されることが知られている。LPS刺激の際に4CmCを添加したDCは、T細胞の増殖応答を著しく促進した(図3B)。

以上より、4CmC刺激により樹状細胞の成熟が促進されることが明らかになった。

4. LPS刺激の際に4CmCを添加した際のサイトカイン産生性

LPS刺激の際に4CmCを添加したDCは、IL-12p40, TNF- α , IL-6などの炎症性のサイトカインの産生には影響しなかったが、免疫抑制性サイトカインであるIL-10の産生を抑制した(図4A)。また、この効果はダントロレン存在下では減少した(図4B)。

これに対し、LPS刺激の際にATPを添加したDCは、IL-12p40, TNF- α , IL-6の産生を低下させ、IL-10の産生を促進した(図4A)。

つまり、RyR1刺激によりIL-10産生が抑制され、DCを介して免疫応答を促進する方向に作用することが明らかとなった。

考 察

MHは、全身麻酔時に使用する揮発性の吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬の使用により発症するが、1, 臨床

症状が多様であること^{1,2)}, 2, EtCO₂の上昇, 体温上昇など不適切な麻酔によっても同様の症状が見られること, 3, 甲状腺疾患等, 合併症依存性を示すこと等の理由により, 疾患自体の鑑別が難しいとされている。近年, Bリンパ球およびEBウイルス形質転換B細胞を4CmC刺激することにより, RyR1を介して細胞内Ca²⁺が上昇することが報告された^{4,14)}。すでに4CmC刺激によりEBウイルス形質転換B細胞が産生するIL-1 β , あるいは筋細胞が産生するIL-6を指標にMHSを同定しようとする試みがある^{15,16)}。前者は, 4CmC刺激に対してEBウイルス形質転換B細胞が産生するIL-1 β は微量であるため, その検出が困難であることが問題点である。一方, 後者は生検時の生体への侵襲性が高いことが問題点である。従って, これらを応用してMHS判定のために日常検査に用いるのは困難である。また, これらの液性因子を短時間で大量に産生させるのに必要な4CmC濃度は極めて細胞毒性が高く, 生理的細胞応答とは大きく異なっている等の点から, 診断への有用性および普遍性に乏しい。一方, RyR1の遺伝子変異を解析することによりMHSを診断する方法が報告されているが¹⁷⁾, MHSにおけるRyR1遺伝子の変異が複数箇所にわたって存在すること, さらに, これらの変異部位が人種により異なる等の理由から正確な診断を行うことが困難とされている。

DCは生体内の至る所に存在し, 異なる分化を経ることで免疫応答性(特にヘルパーT(Th) 応答性)を

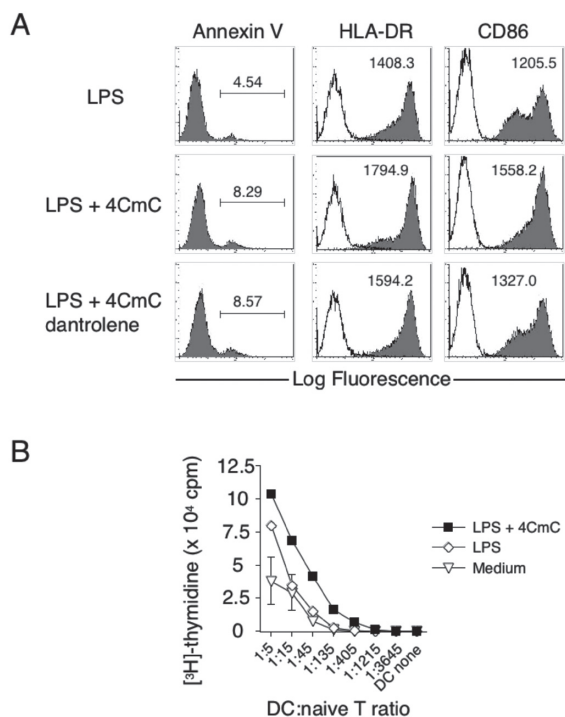


図 3. RyR1刺激によりDCの成熟が促進される。

A. DCの成熟状態

B. アロMLR誘導活性の評価

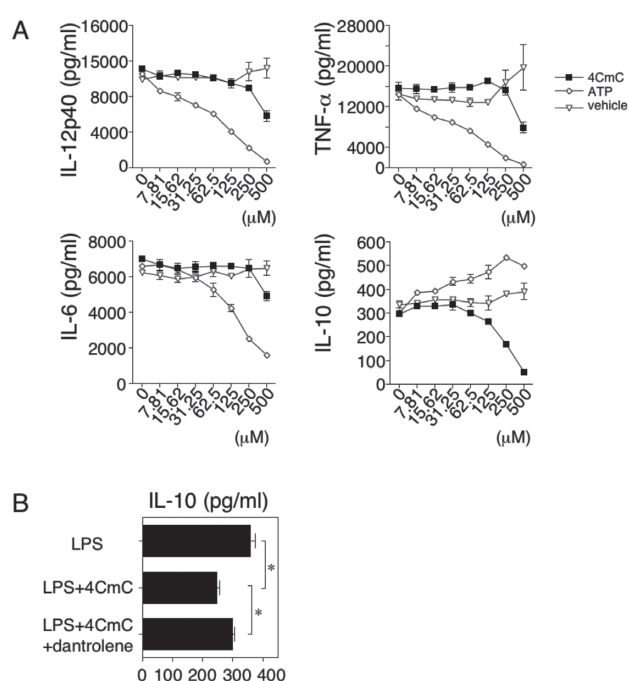


図 4. LPS刺激時にRyR1アゴニスト刺激するとIL-10産生が抑制される。

A. DCのサイトカイン産生

B. DCにおけるIL-10産生

制御する高度に発達分化した免疫担当細胞である。特に、DCから産生される種々の内因性発熱物質は、悪性高熱症で認められる多様な症状を構成する可能性があり、RyR1アゴニストに対するDC応答性を評価することで、MHの病態への関与も明らかとなるかもしれない。

マウスDCのRyR発現を確認した報告はすでに存在する⁵⁾。しかし、ヒトのDCのRyR発現を確認した報告は現在のところない。本研究で我々はヒトのDCにおけるRyRの発現をRT-PCR法を用いて検討した。RyR1は健常人のCD14モノサイト、iDC、PGE₂-DC、LPS-DCに発現していた。また、iDCはPGE₂-DC、LPS-DCなどの成熟DCに比較してRyR1遺伝子を高発現していることが明らかになった。しかし、LPS-DCやPGE₂-DCなどの成熟DCは、4CmC刺激に対してiDCと同様の細胞内Ca²⁺の上昇を示すため、蛋白レベルでは同等に発現しているかもしれない。また、この観察は、成熟DCにおいてRyR1の小胞体におけるターンオーバーが遅い可能性を示唆している。

iDCをRyRアゴニストにより刺激した場合に、Ca²⁺上昇が認められ、さらに細胞外のCa²⁺をキレートした場合でも一過性のCa²⁺上昇が見られた。これに対し、細胞内Ca²⁺をキレートすると、Ca²⁺上昇は認められなかった。従ってRyR刺激によるCa²⁺上昇は細胞内Ca²⁺ストアに由来することが明らかとなった。また、iDCをRyR刺激した際に認められるCa²⁺上昇は、RyR阻害薬であるダントロレンによって抑制されたことから、この反応はRyRを介したものと考えられる。ヒトDCはRyR1遺伝子のみを発現する為、4CmCによって誘導されるCa²⁺上昇はRyR1を介したものと考えられる。さらにIP₃Rの特異的阻害薬であるゼストスポンギンCは、4CmC刺激時のCa²⁺上昇を阻害しないことから4CmCにより誘導されるCa²⁺上昇はIP₃Rを介さない応答と考えられる。

我々は、4CmC存在下LPS刺激したDCは、HLA-DRとCD86分子の発現を上昇させ、アロMLR誘導活性が上昇することを示した。また、RyR1を介したCa²⁺シグナルはLPSによって誘導されるIL-10産生を抑制することを示した。これらの観察は、ヒトDCがRyR1を介したCa²⁺シグナルにより機能的修飾を受けることを示唆している。

従って、ヒトDCは、MHSと健常人との相違点をRyR1を介したCa²⁺応答性をターゲットとして探索するのに有用である。Ca²⁺測定は日常検査に用いるのは困難である。しかし、RyRアゴニスト刺激により特異的に産生されるDCの液性因子等を検出することができれば広く日常検査として応用が可能となる。またMHSと健常人のDC応答性の相違点とCICRの相関、遺伝子変異との関連を明らかにすることにより、より正確な診断法を確立できるものと考えられる。

結 論

我々は、ヒトDCにおいて3つのRyRサブタイプの中でRyR1のみが発現することを初めて明らかにした。さらに、RyR1にアゴニスト活性を示す4CmC刺激に対し細胞内Ca²⁺上昇を示すことを初めて示した。ヒトDCは、MH素因者と健常人との相違点を探索するのに有用な細胞である。

文 献

- 1) 弓削 孟文. 悪性高熱症 最新の知見. 麻酔 1994;43:86-92.
- 2) 向田圭子. 悪性高熱症 最新の知見と診断・治療. LiSA 1995;2:50-8.
- 3) Ibarra MC, Wu S, Murayama K, Minami N, Ichihara Y, Kikuchi H, et al. Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. *Anesthesiol* 2006;104:1146-54.
- 4) Sei Y, Gallagher KL, Basile AS. Skeletal muscle type ryanodine receptor is involved in calcium signaling in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1999;274:5995-6002.
- 5) O'Connell PJ, Klyachko VA, Ahern GP. Identification of functional type 1 ryanodine receptors in mouse dendritic cells. *FEBS Lett* 2002;512:67-70.
- 6) Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3:984-93.
- 7) Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 2000;164:6453-60.
- 8) Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA, Jr. Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol* 2001;167:442-50.
- 9) van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002;277:48122-9.
- 10) van der Kleij D, Yazdanbakhsh M. Control of inflammatory diseases by pathogens: lipids and the immune system. *Eur J Immunol* 2003;33:2953-63.
- 11) Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, et al. Cutting edge: different

- Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984-9.
- 12) Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Ohshima S, Mizukami S, et al. Identification of functional type 1 ryanodine receptors in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:510-5.
 - 13) Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG, Lewis GK. Calcium signaling through phospholipase C activates dendritic cells to mature and is necessary for the activation and maturation of dendritic cells induced by diverse agonists. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:77-82.
 - 14) Hosoi E, Nishizaki C, Gallagher KL, Wyre HW, Matsuo Y, Sei Y. Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells. *J Immunol* 2001;167:4887-94.
 - 15) Girard T, Cavagna D, Padovan E, Spagnoli G, Urwyler A, Zorzato F, et al. B-lymphocytes from malignant hyperthermia-susceptible patients have an increased sensitivity to skeletal muscle ryanodine receptor activators. *J Biol Chem* 2001;276:48077-82.
 - 16) Ducreux S, Zorzato F, Muller C, Sewry C, Muntoni F, Quinlivan R, et al. Effect of ryanodine receptor mutations on interleukin-6 release and intracellular calcium homeostasis in human myotubes from malignant hyperthermia-susceptible individuals and patients affected by central core disease. *J Biol Chem* 2004;279:43838-46.
 - 17) Kraev N, Loke JC, Kraev A, MacLennan DH. Protocol for the sequence analysis of ryanodine receptor subtype 1 gene transcripts from human leukocytes. *Anesthesiol* 2003;99:289-96.
- Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, and Matsushita S. 17β -Estradiol (E2) plus TNF α induces a distorted maturation of human monocyte-derived DCs and promotes their capacity to initiate Th2 responses. *Hum. Immunol* 2008; in press.
 - 鈴木元晴, 植村靖史, 劉天懿, 成田弥生, 石原理, 松下祥. 妊娠維持における脱落膜 non-invariant NKT 細胞の役割. *臨床免疫・アレルギー科* 2008, 印刷中.
 - 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 松下祥. NKT 細胞による樹状細胞を介した Th1/2 応答制御臨床免疫・アレルギー科 2008, 印刷中.
 - 菊地博達, 古家仁. 「麻酔満足度を考える」によせて *日本臨床麻酔学会誌* 2008;28:31.

《平成19年》

論文

《平成20年》

- Liu TY*, Uemura Y*, Suzuki M, Narita Y, Hirata S, Ohyama H, Ishihara O, Matsushita S. *equal contribution. Distinct subsets of human invariant NKT cells differentially regulate T helper responses via dendritic cells. *Eur. J. Immunol* 2008; in press.
- Uemura Y*, Suzuki M*, Liu TY*, Narita Y, Hirata S, Ohyama H, Ishihara O, and Matsushita S. *equal contribution. Role of human non-invariant NKT lymphocytes in the maintenance of type 2 T helper environment during pregnancy. *Int. Immunol* 2008; in press.
- Senju S, Suemori H, Zembutsu H, Uemura Y, Hirata S, Fukuma D, Matsuyoshi H, Shimomura M, Haruta M, Fukushima S, Matsunaga Y, Katagiri T, Nakamura Y, Furuya M, Nakatsuji N, Nishimura Y. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 2007;25:2720-9.
- Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Kurisaki A, Uemura Y, Nishimura Y, Senju S. Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J. Immunol* 2007;178:918-25.
- 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.
- Nakano K, Saito K, Mine S, Matsushita S, Tanaka Y. Engagement of CD44 up-regulates Fas ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis* 2007;12:45-54.
- 北村晶, 菊地博達. 診断・治療 頭痛とペインクリニック 総合臨床, 2007;56:713-7.
- 市原靖子, 菊地博達. 副作用各論 重大な副作用 全身性悪性高熱症 *日本臨床*, 2007;65:326-30.
- 大井良之, 小川龍, 加藤正人, 釘宮豊城, 武田純三, 一色淳, 細山田明義, 菊地博達, 巖康秀, 真下節, 高橋成輔, 十時忠秀. 酢酸リソゲル液を対照とした重炭酸リソゲル液の多施設共同無作為二重盲検比較試験 開腹手術予定患者を対象として *新薬と臨床*, 2007;56:2-10.

- ・岩瀬良範. ビデオ喉頭鏡からのメッセージ 電子機器としてのビデオ喉頭鏡 LiSA, 2007;14:810-5.
- ・岩瀬良範. ビデオ喉頭鏡からのメッセージ 臨床機器としてのビデオ喉頭鏡 LiSA, 2007;14:706-11.
- ・中野和久, 松下祥. 樹状細胞によるTh2細胞の誘導とドパミン 臨床免疫・アレルギー科, 2007;48:256-62.
- ・中野和久, 松下祥. ドパミンによる免疫調節作用 アレルギー, 2007;56:679-84.
- ・中野和久, 松下祥. 樹状細胞とT細胞の相互作用におけるドパミンの役割 呼吸, 2007;26:701-6.
- ・中野和久, 松下祥. 樹状細胞とT細胞の相互作用とTh1細胞/Th2細胞の分化 臨床免疫・アレルギー科, 2007;47:458-63.
- ・植村靖史, 鈴木元晴, 劉天懿, 成田弥生, 石原理, 松下祥. 妊娠の維持とNKT細胞 臨床免疫・アレルギー科, 2007;47:367-71.

＜平成18年＞

- ・Takahashi M. Takahashi H. Kikuchi H. Whartonia (Fascutonia) natsume (Acari: Trombiculidae): a new bat chigger collected from Plecotus auritus (Chiroptera: Vespertilionidae) in Japan, with host and distribution records of the genus Whartonia. J. Med. Entomol. 2006;43:128-37.
- ・Wu S. Ibarra MC. Malicdan MC. Murayama K. Ichihara Y. Kikuchi H. Nonaka I. Noguchi S. Hayashi YK. Nishino I. Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients Brain. 2006;129:1470-80.
- ・Ibarra M CA. Wu S. Murayama K. Minami N. Ichihara Y. Kikuchi H. Noguchi S. Hayashi YK. Ochiai R. Nishino I. Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. Anesthesiology. 2006;104:1146-54.
- ・Ohnishi Y. Tsutsumi A. Matsumoto I. Goto D. Ito S. Kuwana M. Uemura Y. Nishimura Y. Sumida T. Altered peptide ligands control type II collagen-reactive T cells from rheumatoid arthritis patients. Modern Rheumatology. 2006;16:226-8.
- ・高山尚美, 岩瀬良範, 松島久雄, 崎尾秀彰. ビデオ喉頭鏡とガムエラスティックブジー (gum-elastic bougie)を用いた気管挿管 日本臨床麻酔学会誌, 2006;26:77-81.
- ・植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 高木理恵, 大山秀樹, 涌井昌俊, 菊地博達, 石原理, 松下祥. 樹状細胞を用いたTヘルパー I 型, II 型免疫応答制御療法の為の基礎的研究 埼玉医科大学雑誌, 2006;33:67-72.
- ・新宮興, 増澤宗洋, 表圭一, 並木昭義, 菊地博達,

- 川真田美和子, 佐藤重仁, 木村智政, 畑埜義雄, 中塚秀輝, 森田潔, 原哲也, 上村裕一, 武田純三. Org 9426(臭化ロクロニウム)の筋弛緩作用 臭化ベクロニウムとの比較 麻酔 2006;55:1140-8.
- ・市原靖子, 菊地博達. 薬剤による横紋筋融解症の病態, 診断と治療 日本集中治療医学会雑誌 2006;13:206-9.
- ・菊地博達. 麻酔科関連の新しい薬物とその効果 緒言とまとめ. 麻酔 2006;55:814-6.
- ・菊地博達. 術中管理 悪性高熱症はどんな病気ですか? 予測方法と起こったときの治療法について教えてください ナーシングケアQ&A. 2006;(10):142-3.
- ・菊地博達. 術中管理 輸血後の合併症 GVHDとはどんな病気ですか? ナーシングケアQ&A. 2006;(10):128-9.
- ・岩瀬良範, 菊地博達. 手術に必要な処置 気管挿管・全身麻酔 消化器外科. 2006;29:887-92.
- ・市原靖子, Ibarra Moreno Carlos A., 菊地博達. 悪性高熱症とセントラルコア病 日本臨床麻酔学会誌 2006;26:215-24.
- ・菊地博達. 満足感を追求した麻酔 とくに術前のケア マインド手術室・麻酔教室 患者も医療に参加すべき 日本臨床麻酔学会誌 2006;26:35-9.
- ・涌井昌俊, 松下祥. 樹状細胞が発現するNotch リガンドアイソフォームとTh1/Th2分化 臨床免疫・アレルギー科 2006;46:129-35.
- ・松下祥. 生体ホルモン・環境ホルモンとTh2細胞 臨床免疫 2006;45:668-73.
- ・涌井昌俊, 松下祥. Innate immunityの基礎 樹状細胞による自然免疫と獲得免疫のクロストーク. 肝・胆・膵 2006;52:529-36.
- ・松下祥. 疫学・基礎研究 up-to-date アレルギー性鼻炎と遺伝 医学のあゆみ 2006;216:341-5.

著 書

＜平成18年＞

「悪性高熱症」菊地博達編. 克誠堂出版;2006.

学会発表

＜平成19年＞

- ・市原靖子, 菊地博達. 筋生検と遺伝子検索を行い RYR1 変異が認められたにもかかわらずCICR速度が亢進していなかった1症例 第27回悪性高熱研究会, 広島, 平成19年12月15日
- ・菊地博達, 市原靖子, 岩瀬良範, 成田弥生, 水上智, 中川秀之. 新しいCICR測定法 第27回悪性高熱研究会, 広島, 平成19年12月15日
- ・成田弥生, 水上智, 市原靖子, 菊地博達. ヒト樹状細胞を用いた悪性高熱症の新規診断法の開発 第27回悪性高熱研究会, 広島, 平成19年12月15日

- Nakano K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine synthesized and released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 平成19年11月20日～22日
 - Narita Y, Liu T-Y, Uemura Y, Kikuchi H, Matsushita S. Identification of functional type1 ryanodine receptors in human dendritic cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 平成19年11月20日～22日
 - Okada Y, Meguro M, Ohyama H, Yoshizawa S, Hatanaka K, Matsushita S, Takashiba S. Effects of HLA-II- induced CXC chemokines from human gingival fibroblasts on the proliferation of HUVEC cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 平成19年11月20日～22日
 - Meguro M, Yoshizawa S, Hatanaka K, Okada Y, Ohyama H, Matsushita S, Takashiba S. FAK mediates HLA class II-induced signaling in gingival fibroblasts. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 平成19年11月20日～22日
 - Matsushita S. T cell-dendritic cell interface and Th1/Th2/Th17 responses 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 神奈川, 平成19年11月1日～3日
 - 中野和久, 田中良哉, 松下祥. 樹状細胞はドパミン合成・放出によりTh2分化偏向を誘導する 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 神奈川, 平成19年11月1日～3日
 - 佐藤栄留, 岩瀬良範, 菊地博達. エアウェイスコープ(AWS)による意識下挿管の経験 第27回日本臨床麻酔学, 東京, 平成19年10月25日～27日
 - 岩瀬良範. Difficult Airway Management 医学生・研修医に対する気管挿管指導 第26回日本蘇生学会, 岡山, 平成19年10月5日～6日
 - 塚本真規, 星島宏, 竹内梨紗, 長坂浩, 佐藤栄留, 中村信一, 菊地博達. プロポフォールの呼吸制御に対する影響 ウサギの舌下神経と横隔神経活動を指標とした実験 第35回日本歯科麻酔学会, 福岡, 平成19年10月3日～5日
 - 竹内梨紗, 星島宏, 塚本真規, 岩瀬良範, 長坂浩, 中村信一, 菊地博達. 2種の喉頭鏡を用いても難渋しファイバースコープで気管内挿管に成功した症例 第35回日本歯科麻酔学会, 福岡, 平成19年10月3日～5日
 - 星島宏, 竹内梨紗, 塚本真規, 長坂浩, 中村信一, 岩瀬良範, 菊地博達. 高度上気道閉塞に対してエアウェイスコープを用いアウェイック挿管し得た一症例. 第35回日本歯科麻酔学会, 福岡, 平成19年10月3日～5日
 - 星島宏, 竹内梨紗, 塚本真規, 長坂浩, 中村信一, 岩瀬良範, 菊地博達. 頭頸部手術の気管挿管時のビデオ喉頭鏡所見について 第35回日本歯科麻酔学会, 福岡, 平成19年10月3日～5日
 - 千住覚, 末盛博文, 植村靖史, 平田真哉, 春田美和, 松吉秀武, 福岡大喜, 福島聡, 松永雄亮, 古谷正敬, 中辻憲夫, 西村泰治. 抗原提示機能を有するヒトES細胞由来の樹状細胞(ヒトES-DC)の樹立 第16回日本組織適合性学会, 京都, 平成19年9月9日～11日
 - 千住覚, 末盛博文, 前佛均, 植村靖史, 平田真哉, 春田美和, 松吉秀武, 下村真菜美, 福岡大喜, 福島聡, 松永雄亮, 片桐豊雅, 中村祐輔, 古谷正敬, 中辻憲夫, 西村泰治. 細胞ワクチンとしての実用化をめざしたヒトES細胞由来の樹状細胞の作成 第11回基盤的癌免疫研究会, 東京, 平成19年7月11日～12日
 - 松下祥. Th1/Th2分化の新知見とその治療応用 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 神奈川, 平成19年6月10日～12日
 - 高橋守, Kriangkrai Lerdtusnee, 三角仁子, Nittaya Khlaimeanee, Taweesak Monkanna, Chareonsongsermkit Weerayut, Leepitakrat Surachai, 菊地博達. リケッチア陽性および陰性フレッチェリーおよびチャングライツツガムシの生活史の比較 第59回日本衛生動物学会大会, 大阪, 平成19年4月2日～4日
 - 三角仁子, Kriangkrai Lerdtusnee, 高橋守, 菊地博達, 松本勲. インハルムツツガムシによる皮膚炎 第59回日本衛生動物学会大会, 大阪, 平成19年4月2日～4日
 - 大山秀樹, 小越菜保子, 西村英紀, 目黒道生, 吉澤さゆり, 中正恵二, 山根木康嗣, 山田直子, 西尾祥史, 植村靖史, 松下祥, 寺田信行. クラスII HLA分子を介した刺激を受けた歯肉線維芽細胞によるTh1/Th2応答性の制御 第96回日本病理学会, 大阪, 平成19年3月13日～15日
- 《平成18年》
- Suzuki M, Uemura Y, Liu T-Y, Narita Y, Ohyama H, Matsushita S. Role of non-invariant NKT cells in the maintenance of uterine Th2 environment during pregnancy. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 平成18年12月11日～13日
 - Liu T-Y, Uemura Y, Suzuki M, Narita Y, Ohyama H, Matsushita S. Dendritic cell-mediated Th deviation controlled by functionally distinct subsets of NKT cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 平成18年12月11日～13日
 - Nakano K, Uemura Y, Wakui M, Liu T-Y, Narita Y, Matsushita S. Dopamine as an immunotransmitter released by dendritic cells regulates Th1/Th2 polarization. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 平成18年12月11日～13日
 - Narita Y, Uemura Y, Liu T-Y, Suzuki M, Nakano K, Kikuchi H, Matsushita S. A new diagnostic method

to identify malignant hyperthermia susceptible individuals by using human dendritic cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 平成18年12月11日～13日

- ・松下祥. Th1/Th2パラダイムの再評価 マウスからヒトへ 免疫トランスミッター T細胞-樹状細胞インターフェイスにおけるドパミンの機能 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 平成18年11月2日～4日
- ・中野和久, 植村靖史, 劉天懿, 成田弥生, 涌井昌俊, 松下祥. 樹状細胞はドパミン放出によってTh1/Th2分化を調節する 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 平成18年11月2日～4日
- ・岩瀬良範, 上野和徳, 菊地博達. ビデオ喉頭鏡下のガムエラスティックブジー (GEB) 誘導の一工夫 経鼻エアウェイの応用 第26回日本臨床麻酔学会, 北海道, 平成18年10月26日～28日
- ・岩瀬良範. ビデオ喉頭鏡による気管挿管のコツ 第26回日本臨床麻酔学会, 北海道, 平成18年10月26日～28日
- ・松本延幸, 白石正治, 小泉實意子, 村上康郎, 中村信一, 水上智, 相川清, 相田純久, 松本勲, 菊地博達. 突発性難聴の聴力回復を予測する方法 星状神経節ブロックの有無で差が生じるか? 第40回日本ペインクリニック学会, 兵庫, 平成18年7月13日～15日
- ・木下勉, 金古逸美, 上田裕美, 菊地博達. 皮下埋込式硬膜外投与システム 埋込み手技の検討 第40回日本ペインクリニック学会, 兵庫, 平成18年7月13日～15日
- ・大山秀樹, 小越菜保子, 畑中加珠, 山田直子,

中正恵二, 植村靖史, 松下祥, 寺田信行. 早期発症型歯周炎患者におけるP.gingivalis由来53kDa外膜蛋白に対するT細胞応答性 第95回日本病理学会, 東京, 平成18年4月30日～5月2日

国際学会

- ・Ichihara Y, Kikuchi H, Ibarra M CA, Nishino I. CICR Differences in Skinned Fibers from MHS Patients and Normal Controls Depended by Fiber-Type Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists San Francisco, CA(USA), 13-17 October 2007.
- ・Ichihara Y, Kikuchi H, Ibarra M CA, Sasaki J, Ogawa S. The Presence of Mutation in the RYR1 Gene Is Not Associated with the Clinical Severity of MH Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists Chicago, IL(USA) 14-18 October 2006.
- ・Ohshima H, Kogoe N, Takeuchi K, Nishimura F, Uemura Y, Matsushita S, Ohara N, Okano S, Abiko Y, Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, Terada N. The effects of 5' flanking region gene polymorphism of IL12Rb2 on NK cell activity. 41th US-Japan Cooperative Medical Science Program. Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Kagoshima(Japan), 19 July 2006.
- ・Sone T, Oshiro S, Matsushita S and Hirayama K. Proteome analysis of Trypanosoma Cruzi CL Brener, a reference strain of genome project. In Proceedings of 11 th International congress of parasitology, Scotland, 6-11 August 2006.

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

ミトコンドリア呼吸鎖異常症の
迅速診断と疾病遺伝子異常の解明に関する研究

研究代表者 大竹 明 (埼玉医科大学 小児科)

研究分担者 岩佐 泰靖*

緒言

先天性高乳酸血症は小児科・新生児科領域における難病の一つで最も頻度の高い先天代謝異常症であるが、現在でもその約6割は病因診断がなされていない。正確な診断と、それに基づく的確なカウンセリングや治療法の開発が望まれる。診断が困難な最大の理由は先天性高乳酸血症の最大の原因と考えられるミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断が非常に困難なためである。Blue native ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE) 法は、膜に組み込まれて可溶化の非常に困難な大分子タンパク質の解析のために考案された方法である。私達はこの研究で *In vitro* 酵素活性測定と BN-PAGE 法によるタンパク質レベルの解析を組み合わせ、まずミトコンドリア呼吸鎖異常症を迅速で正確に診断するシステムを確立したい。

さらにミトコンドリア異常症の特性として、ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の二重支配を受けるために病因遺伝子の探索が極めて難しいことが挙げられる。本研究では BN-PAGE 法の特性を生かして異常症をまずタンパクレベルで効率的に分類し、その後ミトコンドリア及び核の既知遺伝子を解析する。次いで将来的には未知の核支配病因遺伝子についても発現マイクロアレイ、ホモ接合ハプロタイプ法で解析したいと考える。

材料と方法

材料：この研究は埼玉医科大学倫理審査委員会において審議され許可を受けて進められた。対象となった症例は Bernier らのミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断基準において“可能性例 (possible)”以上の基準を満たした症例を検索対象とした。臨床症状

は、新生児期致死性高乳酸血症から思春期の軽い筋緊張低下や食欲不振までに涉り非常に幅広い。大部分が原因不明の高乳酸血症症例であるが、一部は高乳酸血症を呈さずに多臓器にまたがる症状を呈したことからミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) を疑われた症例も含む。半数以上の症例が、新生児期から乳児期にかけて発病していた。約4分の3の症例が、先天性高乳酸血症や何かのミトコンドリア異常症と臨床診断されていた。男女比はほぼ同等であった。平成20年5月末現在日本全国の臨床医 (主に小児科医) のご協力で、合計120家系123症例から156検体 (皮膚線維芽細胞89検体、肝臓34検体、筋肉22検体、心臓9検体、腎臓・脾臓各1検体) のご提供を頂いた。現在までのところ、103家系106症例の解析が終了している。線維芽細胞は皮膚または骨髄から採取した。

方法：線維芽細胞の培養は既報に従った。ミトコンドリアは Argan らの方法に基づいて二段階遠心分離法で単離精製した。

1) ミトコンドリア呼吸鎖酵素活性の測定 (大竹)

個々の呼吸鎖酵素及び対照としてのクエン酸合成酵素 (citrate synthase; CS) 活性は、光度計を用いた既報に従った。即ち肝臓と心臓は粗ホモジェネートを直接に、線維芽細胞は単離したミトコンドリア画分を測定サンプルとした。呼吸鎖酵素活性は CS との相対比で表し、対照35人の平均に対するパーセントで示した。

2) Blue native 電気泳動 (BN-PAGE) 法を用いた解析 (大竹)

単離したミトコンドリア画分は使用まで -80°C 冷凍庫に保存した。線維芽細胞及び羊水細胞から単離したミトコンドリアは、界面活性剤であるドデシルマルトシドで可溶化し、BN-PAGE とそれに続くイムノブロット法を用いて呼吸鎖複合体の量と大きさを解析した。各複合体の解析に用いた抗体は以下のサブユニットに対するもので、いずれも Molecular Probe

* 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター トランスレーショナル
リサーチ部門・リサーチフェロー

社から購入した。呼吸鎖 I, 39 kDa サブユニット; 呼吸鎖 II, 70 kDa サブユニット; 呼吸鎖 III, コア I サブユニット; 呼吸鎖 IV, サブユニット 1. 核複合体の複合体 II に対する相対比は, Biorad GS-800 Calibrated Densitometer で定量し, 3 回の BN-PAGE & イムノブロット実験の平均値で表した。毎回の実験においては 1 枚のゲルに 2 つの対照を同時に流し, この 2 つの対照の相対比の平均を 100% として計算した。各呼吸鎖複合体のゲル内活性染色も既報に従った。

3) ミトコンドリアと核 DNA 量の比較定量 (mtDNA/nDNA) (大竹)

精製 DNA を用いて, ミトコンドリア (呼吸鎖 I-ND1 サブユニット) と核 (豚の胎性線維症遺伝子エクソン 24) の DNA を real time PCR (qPCR) で増幅しその量比を検討した。実験は 4 回繰り返して行い, その平均と標準偏差を測定した。

4) ミトコンドリア DNA 枯渇症候群の責任遺伝子解析 (岩佐)

すでに病因として報告のある 8 種類の遺伝子 (DGUOK, MPV17, PEO1, POLG, RRM2B, SUCLA2, SUCLG1, TK2) とその関連遺伝子 2 種 (POLG2, ANT1), 合計 10 種類の遺伝子を, 各エクソン毎に PCR 増幅しその塩基配列を直接決定した。

結果

1) ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) の診断

まず細胞・臓器別の解析結果を述べる。線維芽細胞では解析が終了した 67 症例中 23 例, 34% が MRCD と診断でき, 各種酵素異常症が幅広く存在していた。肝臓では解析した 31 家系中 34 症例中 21 家系 23 症例, 68% が MRCD と診断できたが, そのうち後に示すミトコンドリアと核 DNA 量の比較定量 (mtDNA/nDNA) 結果からミトコンドリア DNA 枯渇症候群と診断できた家系が 8 家系を占めることが特徴だった。筋肉では解析した 22 症例中 13 例, 59% が MRCD と診断でき, 呼吸鎖 I と IV の異常症がそれぞれ 4 例ずつであった。心臓では解析した 9 症例中 6 例, 67% が MRCD と診断でき, 呼吸鎖 I 異常症が過半数であった。

以上解析症例をまとめると解析した 103 家系 106 症例中, 51 家系 53 症例 (50%) を MRCD と診断した (図 1)。単独酵素欠損症としては呼吸鎖 I 欠損症が 20 例と最も多く, 他に呼吸鎖 III 異常症が 4 例, 呼吸鎖 IV 異常症を 5 例診断できた。さらに呼吸鎖 II の量と活性のみが残り, I, III, IV の量と活性の全てが低下した症例が 10 家系 12 症例存在し, ミトコンドリア DNA 枯渇症候群と考えられた。これらについては mtDNA/nDNA を検討した結果, 全てが mtDNA 枯渇症候群と診断できた。症例における mtDNA/nDNA の平均値は 0.6 ~ 23.7% と幅があったが, 重症例ほどその値が低い傾向があった。枯渇症候群症例の多くは新生児期から乳児早期に肝障害で発症する予後不良の症例で肝移植を受けている症例が半数以上であった。

2) 病因遺伝子の検討 (表 1)

遺伝子診断のできた 7 家系 8 症例の一覧を表 1 に示す。ミトコンドリア遺伝子異常が 4 家系, 核遺伝子異常 (いずれも新規変異) が 3 家系 4 症例である。ただし症例 5 についてはまだ DGUOK のヘテロ異常が一個見つかるだけで現在も解析を継続中である。症

Molecular Diagnoses

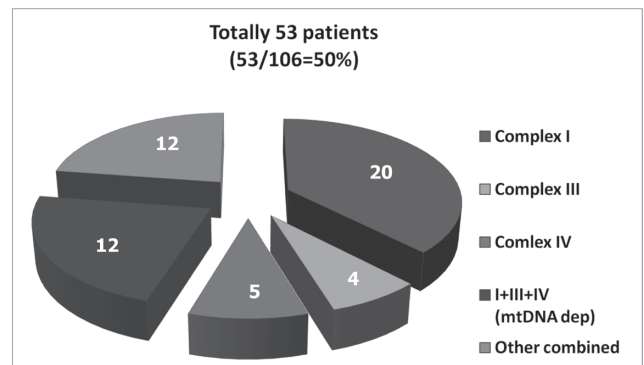


図 1. ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) の診断結果。解析した 103 家系 106 症例中, 51 家系 53 症例 (50%) を MRCD と診断した。単独酵素欠損症としては呼吸鎖 I 欠損症が 20 例と最も多く, 他に呼吸鎖 III 異常症を 4 例, 呼吸鎖 IV 異常症を 5 例, 呼吸鎖 II のみ活性の残ったミトコンドリア DNA 枯渇症候群を 12 例, 複数の酵素活性の低下した症例を 12 例診断した。

表 1. 遺伝子診断のついた症例の一覧

Pt	Sex	Initial symptom	Status	Complication	Blood lact/pyr (mM) (<1.8/<0.1)	qPCR (% mtDNA/nDNA)	Gene	mtDNA	Clinical diagnosis	Molecular Dx
1	M	Hypotonia (7y)	Alive (8y)	Hypertrophic cardiomyopathy	3.3/-11.1/			A3236G (tRNA ^{Leu} UUR)	Mitochondrial myopathy (RRF+)	Some MRCD (Other combined)
2	M	Convulsion (11y)	Alive (17y)	Retinal pigmentary degeneration	1.7/0.11			G3697A (ND1)	Epilepsy	Complex I deficiency
3	M	Hypotonia (10m)	Alive (3y)	Hypotonia, Myopathy, Periventricular leukomalacia	9.0/0.23			A3243G (tRNA ^{Leu} UUR)	Some mitochondrial disorder	Some MRCD (Other combined)
4	F	Convulsion (2m)	Alive (2y)	West synd	4.4/0.22			T10191C (ND3)	Leigh's disease	Complex I deficiency
5	F	Poor feeding (8d)	Alive (9m)	Liver failure⇒Liver Tx MR, Failure to thrive	2.9/0.14	2.3% (Liver)	DGUOK (L248P only)		mtDNA depletion synd	mtDNA depletion (Hepatic)
6	M	Failure to thrive Achoolic stool (3m)	Dead (2y)	Liver failure⇒Liver Tx	Unknown	7.8% (Liver)	MPV17 (487msC/S170F)		Hepatic failure	mtDNA depletion (Hepatic)
7	M	Failure to thrive vomiting (8m)	Alive (2y)	Liver failure⇒Liver Tx MR, GER, Respiratory distress	1.2/0.07	6.6% (Liver)	MPV17 (487msC/S170F)		Hepatic failure	mtDNA depletion (Hepatic)
8	F	Failure to thrive (4m)	Dead (7m)	Hypotonia, Nystagmus Her sister also died with liver failure.	1.76/0.1	2.7% (Liver)	POLG (I1185T/A957V), SUCLG1 (P173A only)		Hepatic failure	mtDNA depletion (Hepatic)

Pts 6 and 7 are brothers.
MR: Mental retardation
Tx: Transplantation
GER: Gastro-esophageal reflux
RRF: Ragged red fiber

例6は両親の各々が一つずつ遺伝子異常を持つことも確認しており、発端者に認められたMPV17遺伝子の複合ヘテロ変異が病因である可能性は高い。症例8では、POLGの複合ヘテロ変異に加えて、SUCLG1のヘテロ変異も発見されたが、未だ両親の解析もできておらずこれらの遺伝子異常と病気との因果関係は不明である。

考 察

BN-PAGE と in vitro 酵素活性測定を用いて、103家系106症例の候補症例から、51家系53症例(50%)のミトコンドリア呼吸鎖異常症例(MRCD)を診断した。MRCD中では呼吸鎖I異常症が最多であった。病因遺伝子としてミトコンドリア遺伝子異常を4例、核遺伝子異常を3家系4症例に発見した。今後発現マイクロアレー、ホモ接合ハプロタイプ法やBN-PAGEでのアセンブリングパターンによるグループ分けを用いて更なる新規責任遺伝子に迫りたい。mtDNA枯渇症候群は複数(特にI+III+IV)の呼吸鎖酵素活性が低下した症例における最大の病因である。侵される臓器・組織特異性を含めた臨床症状の差異と残されたmtDNAの質と量を解析しつつ、候補遺伝子を絞り込み分子学的解析を進める予定である。

ミトコンドリア遺伝子異常を認めた症例の方が年長発症の軽症例が多い。今回核遺伝子異常はミトコンドリアDNA枯渇症候群に絞って解析を進めたことも年齢差を説明する理由にはなるが、一般的に核遺伝子異常によるミトコンドリア病の方が重症で、小児科領域ではMRCDの大多数が核遺伝子異常に由来することは最近の多くの文献でも明らかになってきている。

臨床的に注目すべきは3症例において高乳酸血症が存在していないことである。また症例2の網膜色素変性と症例8の眼振は特徴的である。たとえ高乳酸血症がなくとも、単一臓器起源としては説明のつかない多臓器にまたがる症状の存在する時、特に眼科的異常の併存する時はMRCDの存在も念頭に置かねばならない。

BN-PAGEはMRCDの迅速で正確な診断にとって必須であるのみならず、診断後の分子学的解析にも有用な情報を与えてくれる極めて有力な解析手段であると考えられた。

謝 辞

多大なご協力と励ましをいただいた千葉県こども病院代謝科村山圭先生に深謝いたします。

研究成果リスト

原著論文と著書

- 1) Yamazaki T, Yamaguchi T, Inoue M, Ohtake A, Sasaki N, Inoue I, Sato K, Ouchi K and Kishimoto T:

The inhibitory effect of antihyperlipidemic drugs on the growth of *Chlamydia pneumoniae* in vitro. *J Chemother* 2006; 18(1): 107-9.

- 2) Nagasaka H, Hirano K, Ohtake A, Miida T, Takatani T, Murayama K, Yorifuji T, Kobayashi K, Kanazawa M, Ogawa A and Takayanagi M: Improvements of hypertriglyceridemia and hyperlacticemia in Japanese children with glycogen storage disease type Ia by medium-chain triglyceride milk. *Eur J Pediatr* 2007; 166(10): 1009-16. Epub.
- 3) Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR and Ryan MT: Analysis of the assembly profiles for mitochondrial and nuclear encoded subunits into Complex I. *Mol Cell Biol* 2007; 27(12): 4228-37.
- 4) 藤浪綾子, 高柳正樹, 山本重則, 小川恵美, 小川真司, 金澤正樹, 阿部博紀, 大竹明: 本邦における Carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) 欠損症の臨床像について. *小児科臨床* 2007; 60(11): 2115-20.
- 5) Yasuno T, Kaneoka H, Tokuyasu T, Aoki J, Yoshida S, Takayanagi M, Ohtake A, Kanazawa M, Ogawa A, Tojo K, Saito T: Mutations of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) in Japanese patients with CPT II deficiency. *Clin Genet* 2008; 73(5): 496-501.
- 6) Murayama K, Nagasaka H, Tsuruoka T, Omata Y, Horie H, Tregoning S, Thorburn DR, Takayanagi M, Ohtake A: Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur J Pediatr* 2008; 167: Epub ahead of print.
- 7) 内藤幸恵, 村山圭, 相澤まどか, 大竹明: ミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性により診断された新生児ミトコンドリア心筋症. *日本未熟児新生児学会雑誌* 2008; in press.
- 8) 大竹明: 新生児期に緊急処置を要する先天代謝異常. *小児の治療指針* (小児科診療69増刊, 衛藤義勝, 斉藤加代子, 斉藤博久, 長谷川行洋, 平岩幹男, 渡辺博 編集主幹). 東京: 診断と治療社; 2006.p.868-72.
- 9) 大竹明: 6. 先天代謝異常 カルニチン回路異常症. *今日の小児治療指針*, 第14版 (大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎 編). 東京: 医学書院; 2006.p.169-70.
- 10) 大竹明, 雨宮伸: X III 糖代謝 18. 低血糖症 4) 反応性低血糖症 a. ガラクトース血症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.3 内分泌症候群(第2版) — その他の内分泌疾患を含めて — III. 東京: 日本臨床社; 2006.p.215-9.
- 11) 大竹明: 第2部: 疾患 IV. 先天代謝異常 69. メチルマロン酸血症. *小児疾患の診断治療基準* 第3版 (小児内科38増刊, 小児内科編集委員会 責任編

集五十嵐隆 編). 東京:東京医学社; 2006.p.165-6.

- 12) 大竹明: IV. 脂質代謝異常の臨床 2. 低脂血症
4) 各病態における二次性低脂血症の発症機序とその治療 h. 乳児期の低脂血症. 脂質代謝異常—高脂血症・低脂血症—(日本臨床65巻 増刊号7). 東京:日本臨床社; 2007.p.658-62.
- 13) 大竹明, 高柳正樹:【疾患別アトラス編】代謝, 変性, 脱髄疾患 有機酸代謝異常症. 小児中枢神経疾患の画像診断2008(小児内科39増刊,『小児内科』『小児外科』編集委員会共編). 東京:東京医学社; 2007. p.526-7.
- 14) 大竹明: 8. トピックス 12. Fabry病(ライソゾーム病). 脳卒中診療:こんなときどうするQ&A(棚橋紀夫, 北川泰久 編). 東京:中外医学社; 2008.p.316-8.

学会発表

- 1) 大竹明: ミトコンドリア病: 臨床診断と病因診断の統合を目指して. 第289回日本小児科学会北陸地方会, 2007年3月11日, 石川県河北郡内灘町.
- 2) 大竹明: 臨床から見たスクリーニング—代謝異常症を中心に—第19回新生児マス・スクリーニングワークショップ, 2007年12月1日, 東京都品川区.
- 3) 大竹明: 新生児科医が知る必要のある先天代謝異常症—ハイリスク・スクリーニングと新しいマス・スクリーニング— 第63回多摩新生児懇話会, 2008年1月16日, 吉祥寺市.
- 4) Ohtake A, Honda M, Harashima H, Wu S, Kotake F, Murayama K, Ryan MT, Thorburn DR, Sasaki N: Blue native polyacrylamide gel electrophoresis is a powerful tool for screening of mitochondrial respiratory chain disorders. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening, 2006年9月16-19日, Awaji, Hyogo & Tokushima, Japan.
- 5) Ohtake A, Murayama K, Honda M, Ueda Y, Harashima H, Yamazaki T, Takayanagi M, Ryan MT, Thorburn DR, Sasaki N: Blue native polyacrylamide gel electrophoresis is a powerful tool for screening of mitochondrial respiratory chain disorders. SSIEM (Society for the Study Group of Inborn Errors of Metabolism) 2007 Annual Symposium, 2007年9月4-7日, Hamburg, Germany.
- 6) 大竹明, 本多正和, 原嶋宏子, 星野正也, 村山圭, 高柳正樹, 佐々木望, Mike T Ryan, David R Thorburn: ミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断におけるBlue Native 電気泳動法の有用性—複合体単独異常症と mtDNA 枯渇症候群—. 日本人類遺伝学会第52回大会, 2007年9月12日~15日, 東京都新宿区.
- 7) 大竹明, 山崎太郎, 赤塚淳弥, 本多正和, 原嶋宏子, 佐々木望, 村山圭, 高柳正樹, David R Thorburn: 日本人におけるミトコンドリア呼吸鎖異常症の酵素診断と分子病理. 第7回日本ミトコンドリア学会, 2007年12月20日~22日, 鹿児島市.
- 8) 本多正和, 大竹明, 原嶋宏子, 村山圭(千葉県こども病院), 小竹文秋, 宮路太, 佐々木望, :ミトコンドリア呼吸鎖異常症の病因診断: 高乳酸血症日本人20症例についての検討. 第109回日本小児科学会, 2006年4月21日~4月23日, 金沢市.
- 9) Honda M, Ohtake A, Harashima H, Wu S, Kotake F, Murayama K, Ryan MT, Thorburn DR, Sasaki N: Blue native polyacrylamide gel electrophoresis is a powerful tool for screening of mitochondrial respiratory chain disorders. Xth International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2006年9月12-16日, Chiba, Japan.
- 10) 本多正和, 大竹明, 原嶋宏子, 小竹文秋, 星野正也, 善利裕実, 村山圭, 佐々木望, Mike T Ryan, David R Thorburn: Blue Native 電気泳動法によるミトコンドリア呼吸鎖異常症の病因診断: 高乳酸血症日本人20症例についての検討. 日本人類遺伝学会第51回大会, 2006年10月17日~20日, 米子市.
- 11) 本多正和, 大竹明, 原嶋宏子, 小竹文秋, 星野正也, 村山圭, 佐々木望: ミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断に対するBlue Native 電気泳動法の有用性. 第110回日本小児科学会, 2007年4月20日~4月22日, 京都市.
- 12) 倉繁款子, 高杉尚志, 松下憲司, 細川卓利, 脇口宏, 村山圭, 大竹明: 肝型 mitochondrial DNA depletion 症候群の1例. 第49回日本先天代謝異常学会, 2007年11月15日~17日, 山形市.
- 13) 村山圭, 鶴岡智子, 馬場景子, 長坂博範, 高柳正樹, 山崎太郎, 大竹明: ミトコンドリア呼吸鎖障害と代謝性肝疾患. 第49回日本先天代謝異常学会, 2007年11月15日~17日, 山形市.
- 14) 山崎太郎, 村山圭, 赤塚淳弥, 本多正和, 原嶋宏子, 佐々木望, 高柳正樹, David R Thorburn, Mike T Ryan, 大竹明: ミトコンドリア呼吸鎖異常症の病因診断と分子病理の解明. 第49回日本先天代謝異常学会, 2007年11月15日~17日, 山形市.
- 15) 後藤珠子, 中村幸恵, 森雅人, 山形崇倫, 村山圭, 大竹明, 桃井真理子: 広範な白質壊死をきたし呼吸鎖複合体I 活性低下を認めたLeigh 症候群の1例. 第7回日本ミトコンドリア学会, 2007年12月20日~22日, 鹿児島市.
- 16) 村山圭, 鶴岡智子, 馬場景子, 長坂博範, 原嶋宏子, 山崎太郎, 山本重則, 高柳正樹, 大竹明: ミトコンドリア呼吸鎖異常と小児肝疾患. 第7回日本ミトコンドリア学会, 2007年12月20日~22日, 鹿児島市.

- 17) 鶴岡智子, 村山圭, 長坂博範, 馬場景子, 原嶋宏子, 山崎太郎, 山本重則, 大竹明, 高柳正樹: 新生児期から難治性分泌性下痢症を呈したミトコンドリア呼吸鎖 I 欠損症. 第7回日本ミトコンドリア学会, 2007年12月20日～22日, 鹿児島市.
- 特許出願
なし

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

ドパミンを介した免疫制御機構の解析

研究代表者 中野 和久

(前 埼玉医科大学 医学教育センター学生保健管理室

現 産業医科大学第一内科学 助教)

分担研究者 松下 祥¹⁾, 穂田 真澄²⁾

1. はじめに

1986年にT. R. Mosmannら¹⁾が初めてマウスのT細胞クローン間のサイトカインの分泌パターンの違いによってTh1細胞及びTh2細胞の二つのヘルパーT細胞の亜集団の概念を提起して以来、この二つの亜集団に関しては精力的な研究が行われてきた。IFN- γ を主に産生するTh1細胞は、細胞性免疫を媒介し、自己免疫疾患、遅延型アレルギーに、一方IL-4やIL-5、IL-13を産生するTh2細胞は液性免疫を媒介し、即時型アレルギーに関与すると考えられ、このTh1/Th2のバランスがお互いに拮抗しあって恒常性が保たれるという、いわゆるTh1/Th2パラダイムに支配されてきたが、多くの自己免疫疾患モデルマウスにおいて、IL-17を産生するTh17細胞が病態の発症に深く関与していることが解明され、このTh1/Th2パラダイムは崩壊しつつある。しかしながら、近年も増加の一途を辿るアレルギー疾患治療の新たなストラテジーを探るためには、とりわけTh2の分化を決定づける因子については追求する必要がある。

樹状細胞(Dendritic cell; DC)は最も強力な抗原提示細胞(antigen presenting cell; APC)であり、抗原特異的な免疫応答の誘導・制御の中心的な存在である。DCはリンパ器官だけでなく全身に分布しており、非リンパ系組織に存在する未成熟なDCは抗原捕捉能を有し、外界からの病原微生物の侵襲を監視する機能を持つと考えられる。抗原を取り込んだDCは、Toll-like receptor (TLR)をはじめとするパターン認識受容体(pattern recognition receptor; PRR)を介した刺激やケミカルメディエーター、サイトカイン、ケモカインなどの周囲の環境に応じて成熟し、所属リンパ器官へ

と移行する。そこでプロセッシングした抗原ペプチドをナイーブT細胞に提示し、DC-Tの相互作用により抗原特異的なヘルパーT細胞への分化を促し獲得免疫の成立に大きく寄与する。ヘルパーT細胞への分化にはT細胞受容体(TCR)とCD28を介したシグナルが必要であるが、DC-T細胞の相互作用時にDC側から産生される何らかの因子が、T細胞の分化方向をTh1もしくはTh2に偏向させると考えられている。

グラム陰性菌のリポ多糖、微生物DNA (CpG DNA)、リポタンパク質、ウィルス由来の二本鎖RNAなど多くの病原体の構成成分は、これらを特異的に認識するTLRを介しMyD88依存性シグナルによってDCの機能を偏向し、主にIL-12の産生を増強することにより、抗原非特異的にTh1反応を惹起、増強する^{2,3)}。つまり、DCが産生するIL-12はTh1偏向因子であることが、これまでのin vitro, in vivoの数多くの検討から明らかとなっている。

一方、thymic stromal lymphopoietin (TSLP)やprostaglandin E₂ (PGE₂)やヒスタミンなどはDCに作用してTh2反応を惹起することが知られる。これらによるDCの変化としてはCD86の発現の上昇^{4,5)}、IL-12の産生抑制^{6,7)}、NotchリガンドであるDelta 1の発現上昇⁸⁾などが報告されてきたが、このような変化がTh2分化偏向を誘導するという決定的な証拠に乏しく、その詳細なメカニズムは不明であった。つまり、Th2偏向因子は未発見であり、DC自体が積極的にTh2分化に寄与するかどうか不明であった。

今回我々は、これまで「神経伝達物質」として知られてきたドパミンがDCにおいても産生され、DCとナイーブT細胞の相互作用時にTh2分化偏向因子として機能することを発見し、マウスにおいて、ドパミンD1様受容体の阻害が多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症抑制・治療に有用であるこ

1) 埼玉医科大学 免疫学

2) 埼玉医科大学 中央研究施設 形態部門

とを実証した.

Th1/Th2アジュバントのスクリーニング

アジュバントの多くはDCに直接作用し, その性質を抗原非特異的に変化させることによってTh1/Th2分化に深く関与する. 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る. これまで我々はDCを介したTh1/Th2アジュバント探索のために, アジュバントで刺激したヒト単球由来DC (Mo-DC) とナイーブCD4T細胞 (CD45RA陽性CD4T細胞) の共培養によりアロMLRを誘導し, 活性化したT細胞が産生するTh1/Th2サイトカインのバランスをみる評価系⁹⁾ (図1A) の解析を行ってきた. 今回はこの系を用いて, すでに上市され一般に処方される無数の薬剤のTh1/Th2アジュバント活性の有無をスクリーニングした. 薬剤の作用機序をもとにして, Th1/Th2分化偏向のためのDC側の変化を集約することが主目的であった.

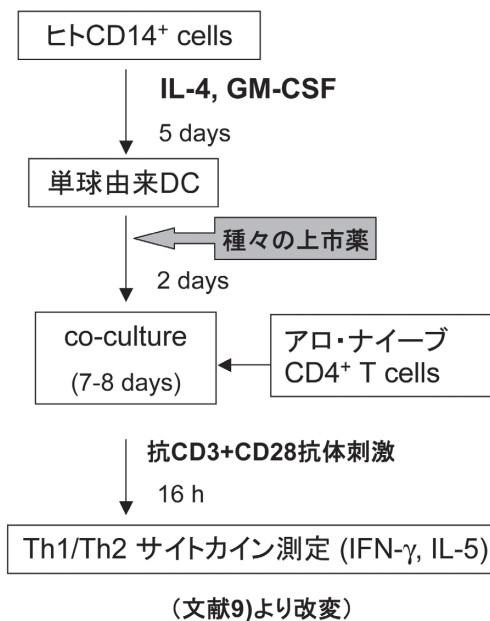
このスクリーニングにより, 抗精神病薬の中で, ドパミンD2様受容体阻害薬であるスルピリド, ネモナプリドなどがPGE₂と同程度に高いIL-5/IFN- γ 比を呈し, Th2アジュバント活性を有することが判明した (図1B). 逆にパーキンソン病薬として使用される非麦角系ドパミンD2様受容体作動薬であるレキップやビ・シフロールでMo-DCを処理した場合, LPSと同程度にIL-5/IFN- γ 比が低下した (図1C). これらの結果から, DCに発現するドパミン受容体からのシグナルがもたらすDCの性質の変化がTh1/Th2分化偏向に強く関与していることが示唆された.

DCにおけるドパミン受容体の発現とドパミン合成系の存在

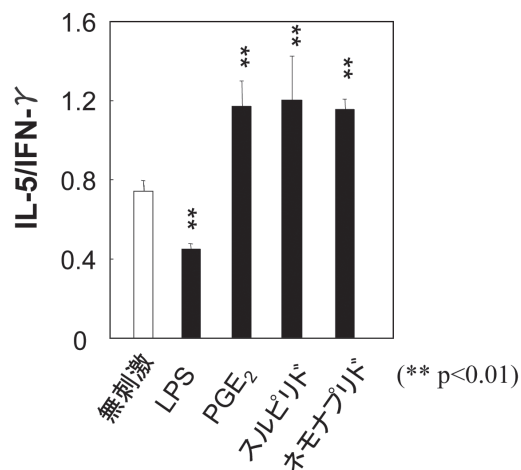
ドパミン受容体は少なくとも5つの遺伝子から作られるサブタイプ (D1 ~ D5) を持つ¹⁰⁾. それぞれのサブタイプはいずれも7回膜貫通型 (GTP結合蛋白連関型) であり, 薬理学的にD1様受容体 (D1, D5) とD2様受容体 (D2, D3, D4) とに大別される. これらの大きな違いはD1様受容体が細胞内アデニルシクラーゼ (Adenyl cyclase; AC) の活性化によりcAMPを上昇させる作用を持つG α sサブユニットと共役するのに対し, D2様受容体は細胞内AC活性の抑制によりcAMPを低下させる作用を持つG α iサブユニットと共役することにある¹⁰⁾.

単球由来DCのドパミン受容体発現パターンをフローサイトメーターで解析したところ, D1様受容体, D2様受容体ともに全てのサブタイプの発現が認められた⁹⁾ (表1). そこで単球由来DCをD2様受容体阻害剤 (L-750667), D1様受容体阻害剤 (SCH-23390) で処理すると, アロMLR実験系でそれぞれ強力なTh2アジュバント, Th1アジュバントとなることが判明した.

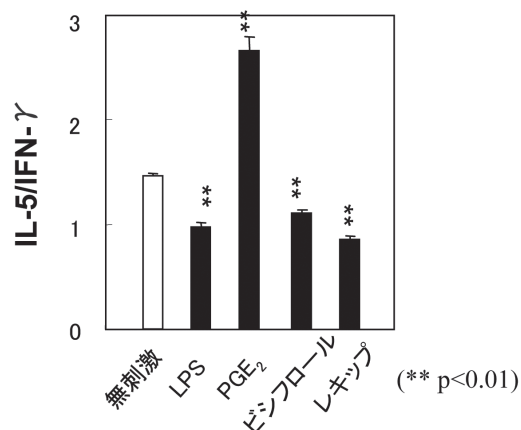
ドパミン産生細胞に発現するドパミン受容体はその細胞内のドパミン合成量を調整するために存在する



A. アロMLRによるTh1/Th2分化の評価系.



B. ドパミンD2様受容体阻害薬によるTh2シフト.



C. ドパミンD2様受容体作動薬によるTh1シフト.

図1.

ものと考えられる。ドーパミンは、チロシンからDOPAを経て合成され、小胞内に貯留され、脱顆粒刺激を受けた際に開口分泌によって細胞外に放出される。このドーパミン合成過程では、チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase; TH) が律速酵素となるが、このTH活性は細胞内cAMPの上昇によって亢進することが知られる¹¹⁾。発現するD2様受容体は自己受容体として機能しcAMP低下シグナルを転送することでドーパミン産生にネガティブフィードバックをかける¹²⁾。

これまでDCにおけるドーパミン合成・貯留については知られていなかったが、我々はDCもドーパミンを貯留すること、さらにDC内ドーパミンは小胞内に局在することを免疫電顕で明らかにした。さらに、このDC内のドーパミン量は、TH阻害薬である α -methyl-*p*-tyrosine (AMPT)で処理した際には減少し、DCにおいてもドーパミン合成系が存在することが明らかとなった。また、DCにドーパミンを添加するとDCの細胞内cAMP濃度は低下し、これはD2様受容体阻害剤であるL-750667による前処理で阻害された。この結果はDCに発現するD2様受容体が自己受容体として機能している可能性を示唆した。実際に、D2様受容体阻害剤であるスルピリドやL-750667で処理したDCではドーパミン貯留が増加した。D2様受容体阻害剤はドーパミン合成抑制シグナルを阻害することでDC内のドーパミン合成を増加させることが示唆された(図2)。なお、cAMP上昇薬剤であるフォスコリンやPGE₂などもDC内ドーパミン貯留を著明に増加させることが判明した。これらの現象はマウスの骨髄由来DCにおいても観察された。

ドーパミン刺激によるCD4陽性T細胞の反応

CD4陽性T細胞のドーパミン受容体の発現状態やドーパミンに対する反応も、ナイーブT細胞、メモリーT細胞それぞれで検討した。興味深いことにメモリーT細胞ではD1～D5まで全てのドーパミン受容体サブタイプの発現が認められたが、ナイーブT細胞ではD1様受容体は強く発現するものの、D2様受容体の発現はごく低レベルであった⁹⁾(表1)。ドーパミンの添加により、ナイーブT細胞では細胞内cAMP濃度が上昇したのに対し、メモリーT細胞ではcAMP濃度が低下した。この結果はナイーブT細胞ではD1様受容体を介して、メモリーT細胞ではD2様受容体を介してドーパミンが作用することを示唆した。

ナイーブT細胞に抗CD3+CD28抗体刺激を加える際にフォスコリンなどの細胞内cAMP上昇薬剤を同時添加するとIL-5などTh2サイトカインの産生が亢進することが知られるが¹³⁻¹⁵⁾、ドーパミンも同様に添加した場合は濃度依存性にIL-5産生を増強し、Th2反応を惹起することが示唆された。

DC-T細胞の相互作用におけるドーパミンの役割

ドーパミン神経シナプスにおいて、ドーパミンはシナ

プス前ニューロンで合成・貯留・放出の過程を経て、“神経伝達物質”としてシナプス後ニューロンに発現するドーパミン受容体を介して情報を伝達しシナプス後ニューロンに作用を及ぼす。DC-T細胞の相互作用も“免疫シナプス”として喩えられるが、我々はDC-ナイーブT細胞の相互作用の際には、DCがシナプス前ニューロン、ナイーブT細胞がシナプス後ニューロンに相当する形でシナプスを構成し、ドーパミンが“免疫伝達物質”として機能し、Th2偏向因子として作用しているのではないかと考えた。

実際に単球由来DCに抗原をパルスし、同一人由来T細胞クローンと反応させると、DCからT細胞に向けた脱顆粒が観察され、反応後のDC内のドーパミンは減少した。この結果は、抗原提示の際にT細胞からDCへの刺激によりドーパミンがT細胞に向けて放出されることを示唆した。さらに、AMPTでドーパミン合成を減らしたDC、コルヒチンで脱顆粒を阻害したDCなどを用いたアロMLR実験系では、おもにIL-5産生の低下によりTh1分化偏向を来したことから、DC-ナイーブT細胞の相互作用でDCから放出されるドーパミンはTh2偏向因子として作用することが実証された(図3)。

EAEモデルマウスにおけるドーパミン受容体阻害剤による免疫修飾

多発性硬化症 (Multiple sclerosis; MS) のモデルとして実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) が使われてきたが、これらを誘発するT細胞は、最近ではTh17やTh2に原因を求

表 1. 各細胞表面に発現するドーパミン受容体サブタイプ

		単球由来DC	ナイーブCD4 T細胞	メモリーCD4 T細胞
D1様受容体 (G α_s と共役)	D1	+	+	+
	D5	+	+	+
D2様受容体 (G α_i と共役)	D2	+	—	+
	D3	+	—	+
	D4	+	±	+

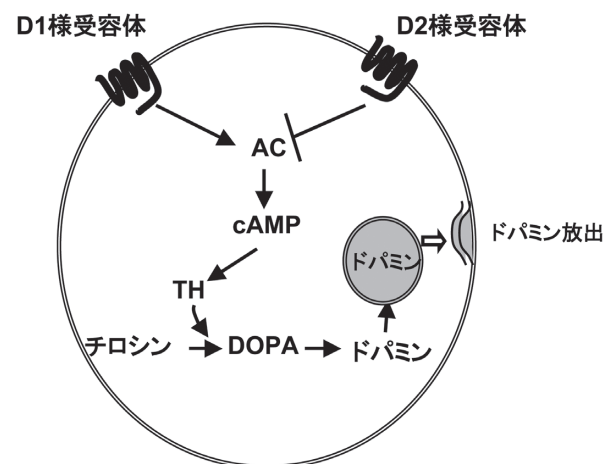


図 2. 樹状細胞におけるドーパミン合成・貯留。

める動きが出てきたものの¹⁶⁻¹⁸⁾, 古典的には自己抗原特異的なTh1細胞であると考えられ, Th2シフトによる病態改善の試みがこれまでも行われてきた。

我々はこの従来の見地から, Th2アジュバントであったL-750667 (D2様受容体阻害剤) などのEAEへの病態抑制効果を期待し, SJL/JマウスにPLP₁₃₉₋₁₅₁と完全フロイントアジュバントで免疫し, L-750667の内服投与を行った。しかし, 期待に反してL-750667投与群はすべて発症後致命的な経過をたどった(図4A)。脾細胞を分離し, PLP再刺激の上で行ったサイトカイン測定(IFN- γ , IL-4)では, L-750667投与群はin vitroと同様にTh2優位にシフトしており⁹⁾, L-750667投与によるTh2シフトがEAEの病態の悪化をもたらしていることが示唆された。骨髓細胞由来DCにL-750667処理を加え, PLP₁₃₉₋₁₅₁をパルス後にSJL/Jマウスに細胞を移入した場合も同様の結果を認め⁹⁾, L-750667は直接的にDCに作用してEAEの悪化をもたらすことが示唆された。

一方, D1様受容体阻害薬であるSCH-23390はin vitroではTh1アジュバントであったにもかかわらず, EAEの臨床症状に対して強い抑制効果を認めた(図4A)。同様に分離脾細胞のPLP再刺激後のサイトカイン測定では, in vitroと同様にTh1優位のシフトを認めた(図4B)⁹⁾。さらに, SCH-23390の効果は発症抑制にとどまらず, 一旦発症したEAEの臨床症状も劇的に改善した(図4C)⁹⁾。他のD1様受容体阻害薬(LE300等)を用いても同様の結果であった。一連のin vivo実験は, 最近の多くの報告と同様に, Th2シフトがEAEの病態の悪化につながることを示唆した。なお, 同時にIL-17も測定したが, 病態が悪化した群ではIL-17 > IFN- γ , 病態が改善した群ではIL-17 < IFN- γ という結果となり(図4D)⁹⁾, IL-17がEAE病態の悪化をもたらすとする最近の知見^{16, 17)}を支持する結果であった。また, 非麦角系ドパミンD2様受容体作動薬であるレキップやビ・シフロールなどのD2様受容体作動薬を用いて, 発症後のEAEマウスにおける臨床

効果を検証したところ, 一旦は臨床症状を改善させたものの, 発症後1ヶ月程度から効果は減弱した。このエスケープ現象はドパミンD2様受容体のhomologous down-regulationの誘導などが原因として考えられた。

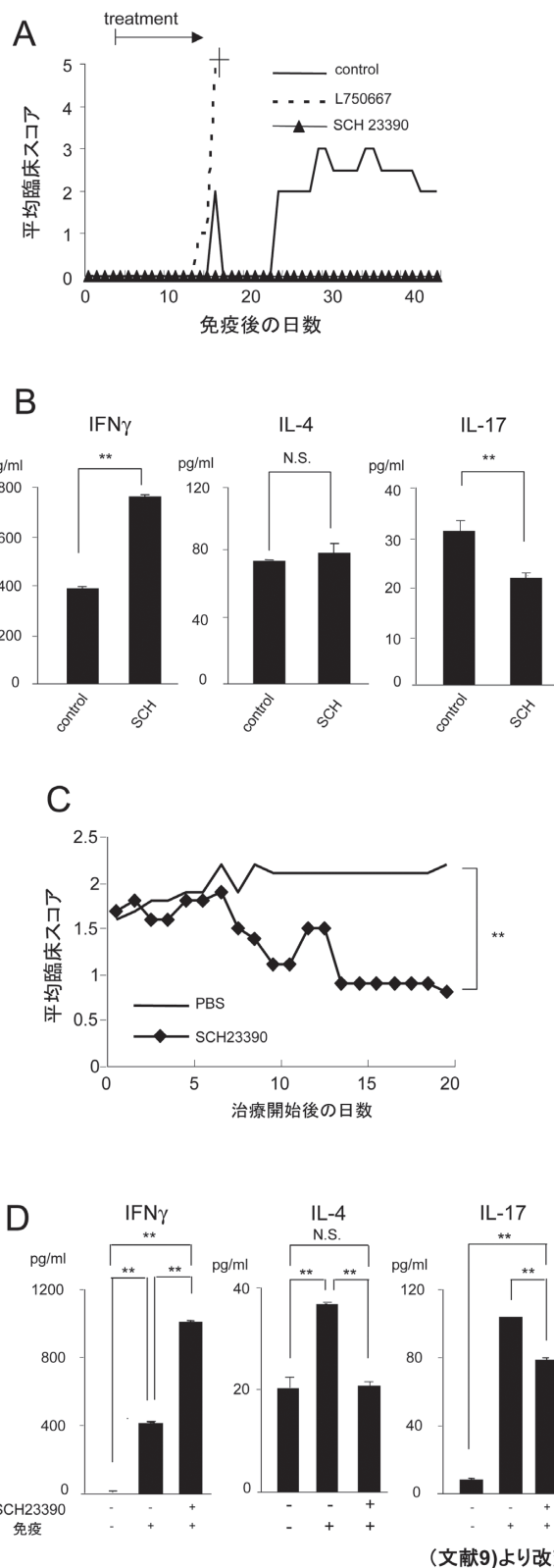


図3. DC-T細胞相互作用におけるドパミンのTh2偏向機序。

図4. EAEマウスにおけるドパミン受容体阻害薬の効果。

おわりに

情動やストレスが免疫系に強く影響すること、つまり免疫系は交感神経系の活動により大きく左右されることを我々は経験的に知っている。中枢性ドーパミン神経系の低もしくは過剰活動を伴うパーキンソン病や統合失調症などの重要な精神神経疾患が多くの場合免疫異常を伴うこと^{19, 20)}、ドーパミンD2様受容体の過剰活動が大きな原因とされる統合失調症患者では、一般人口と比べて様々な種類の癌の発生率が低いこと²¹⁾、等の報告もあり、これまでも各々の領域からのアプローチで「神経-免疫-内分泌」連関が検討されてきた。

近年、リンパ球の細胞表面にもドーパミンを含むカテコラミン、セロトニン、アセチルコリンなどの神経伝達物質の受容体が発現していることが明らかとなり、さらに、リンパ球は神経伝達物質を自ら合成・放出しうることが判明し、神経伝達物質はパラクライン、オートクラインにリンパ球に作用し、免疫修飾作用を有することが明らかとなってきた²²⁾。

しかしながら、これまでドーパミンと免疫系の関係の検討においては、ほとんどがリンパ節に分布した神経終末からドーパミンが分泌されるという前提に基づいていたため、多様な自己免疫疾患やアレルギー疾患とドーパミンの関連は想定不能であった。自然免疫の最前線に分布し獲得免疫との橋渡しをするDCがドーパミン分泌能を有し、ナイーブCD4 T細胞との相互作用時に放出されるドーパミン量がTh1/Th2分化方向を決定する重要な因子であることを明らかにした今回の検討は、従来Th1/Th2分化偏向に起因するとされていた各種の疾患の病態の見直しにつながるとともに、新たな治療法の開発につながるものと思われる。

また、EAEモデルマウスでの検討で高い臨床効果が明らかとなったドーパミン受容体阻害薬に関しては、他の自己免疫疾患や喘息・アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患のモデル動物における効果を検討中である。ヒトとマウスでの違いなど乗り越えるべき課題は存在するが、近い将来、このドーパミンによる免疫調節機構をもとにした創薬が、種々の疾患へ臨床応用されることを期待したい。

研究成果リスト

(論文)

1. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. Nakano K, Higashi T, Hashimoto K, Takagi R, Tanaka Y and Matsushita S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 373: 286-91.
2. 樹状細胞とT細胞の相互作用とTh1/Th2細胞の分

化. 中野和久, 松下祥: 臨床免疫・アレルギー科. 47 (4): 458-63. 2007

3. ドーパミンによる免疫調節作用. 中野和久, 松下祥: アレルギー 56: 679-84. 2007
4. 樹状細胞の機能をめぐって. 中野和久, 松下祥: 呼吸 26 (8): 701-6. 2007
5. Th2細胞分化におけるドーパミンの役割. 中野和久, 松下祥: 気道のアレルギー .5 (4): 9-14. 2007
6. 樹状細胞によるTh2細胞の誘導とドーパミン. 中野和久, 松下祥: 臨床免疫・アレルギー科, 48(3): 256-62. 2007

(学会発表)

1. 樹状細胞はドーパミン合成・放出によりTh2分化偏向を誘導する. 中野和久, 田中良哉, 松下祥. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2007年 11月
2. Dopamine synthesized and released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. Nakano K, Tanaka Y, Matsushita S. 第37回 日本免疫学会, 2007年 11月

文 献

- 1) T Mosmann, H Cherwinski, M Bond, M Giedlin, R Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
- 2) T Kaisho, S Akira. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1589: 1-13.
- 3) ML Kapsenberg. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 984-93.
- 4) VK Kuchroo, MP Das, JA Brown, AM Ranger, SS Zamvil, RA Sobel, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 1995; 80: 707-18.
- 5) GJ Freeman, VA Boussiotis, A Anumanthan, GM Bernstein, XY Ke, PD Rennert, et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*. 1995; 2: 523-32.
- 6) R Gutzmer, C Diestel, S Mommert, B Kother, H Stark, M Wittmann, et al. Histamine H4 Receptor Stimulation Suppresses IL-12p70 Production and Mediates Chemotaxis in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 2005; 174: 5224-32.
- 7) H Harizi, M Juzan, V Pitard, J.-F. Moreau, N Gualde. Cyclooxygenase-2-Issued Prostaglandin E2 Enhances the Production of Endogenous IL-10, Which Down-Regulates Dendritic Cell Functions.

- J Immunol 2002; 168: 2255-63.
- 8) M Wakui, K Nakano, S Matsushita. Notch ligand mRNA levels of human APCs predict Th1/Th2-promoting activities. *Biochem and Biophys Res. Commun.* 2007; 358: 596-601.
 - 9) K Nakano, T Higashi, K Hashimoto, R Takagi, Y Tanaka, S Matsushita. 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.
 - 10) C Missale, SR Nash, SW Robinson, M Jaber, MG Caron. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998; 78: 189-225.
 - 11) R Roskoski Jr, LM Roskoski. Activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells by the cyclic GMP and cyclic AMP second messenger systems. *J Neurochem.* 1987; 48: 236-42.
 - 12) RS Salah, DM Kuhn, MP Galloway. Dopamine autoreceptors modulate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase in rat striatal slices. *J Neurochem.* 1989; 52: 1517-22.
 - 13) A Suarez, L Mozo, C Gutierrez. Generation of CD4 + CD45RA + Effector T Cells by Stimulation in the Presence of Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate-Elevating Agents. *J Immunol* 2002; 169: 1159-67.
 - 14) S Klein-Hessling, MK Jha, B Santner-Nanan, F Berberich-Siebelt, T Baumruker, A Schimpl, et al. Protein Kinase A Regulates GATA-3-Dependent Activation of IL-5 Gene Expression in Th2 Cells. *J Immunol* 2003; 170: 2956-61.
 - 15) S Roy, J Wang, R Charboneau, HH Loh, RA Barke. Morphine Induces CD4 + T Cell IL-4 Expression through an Adenylyl Cyclase Mechanism Independent of the Protein Kinase A Pathway. *J Immunol* 2005; 175: 6361-67.
 - 16) CL Langrish, Y Chen, WM Blumenschein, J Mattson, B Basham, JD Sedgwick, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201: 233-40.
 - 17) Y Komiyama, S Nakae, T Matsuki, A Nambu, H Ishigame, S Kakuta, et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 177: 566-73.
 - 18) H Lassmann, RM Ransohoff. The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol.* 2004; 25: 132-7.
 - 19) S Basu, PS Dasgupta. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol.* 2000; 102: 113-24.
 - 20) EJ Meredith, A Chamba, MJ Holder, NM Barnes, J Gordon. Close encounters of the monoamine kind: immune cells betray their nervous disposition. *Immunology.* 2005; 115: 289-95.
 - 21) Y Barak, A Achiron, M Mandel, I Mirecki, D Aizenberg. Reduced cancer incidence among patients with schizophrenia. *Cancer.* 2005; 104: 2817-21.
 - 22) R Franco, R Pacheco, C Lluís, GP Ahern, J O'Connell P. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol.* 2007; 28: 400-7.

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

生活習慣病における血管内皮・単球・血小板の機能と
動脈硬化進展の機序の解明

研究代表者 倉林 均(埼玉医科大学 リハビリテーション医学)

1. 緒 言

運動療法は単に運動機能の回復だけではなく免疫機能、内分泌、自律神経機能などの回復にも有用であるという理念のもとに、私達は平成12,13年度に受けた文科省科学研究費補助金により、運動療法や物理療法が各種生体機能や生活習慣病に及ぼす影響を研究、報告してきた。動脈硬化の進展には内皮細胞への慢性炎症刺激や血小板活性化の他に単球やリンパ球の活性化が深く関与しており、運動療法が免疫機能の亢進、単球・リンパ球活性化の阻止、慢性炎症の抑制などを介して動脈硬化の進展を阻止し脳卒中を予防できる可能性もあると考えられる。さらに私達は平成16,17年度に受けた文科省科学研究費補助金により、運動療法が血小板活性化、血管内皮機能、免疫機能に与える影響を解析し運動療法の有用性を発表してきた。本研究では、平成18年度学内グラントの助成により、動脈硬化発生の大きな原因となっている血小板活性化、単球活性化、内皮機能障害と運動療法との関連を、日本人に多い脳卒中を中心に解析した。

2. 対象と方法

初回発症の脳卒中(脳梗塞,脳出血)で、リハビリテーション科に入院して理学療法および作業療法を施行した症例を対象とした。経過中に再発した症例、重度の意識障害(Japan Coma Scale 10以上)を起こした症例、重症合併症を起こした症例、心原性塞栓症例は本研究から除外した。リハビリテーション科転科時(発症から3-4週)と退院時(発症から8-10週)の2時点で、機能的自立度評価(Functional Independence Measure, FIM)を判定し、血小板活性化の指標(β -thromboglobulin, β TG, platelet factor 4, PF4)、血管内皮障害の指標(endothelin, EC, thrombomodulin, TM, von Willebrand Factor, vWF)、凝固線溶系の指標(D-dimer, DD, thrombin antithrombin complex, TAT, α 2 plasmin inhibitor plasmin complex, PIC, tissue

plasminogen activator, tPA, plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、接着分子(endothelial adhesion molecule, ELAM, vascular cell adhesion molecule, VCAM, intracellular adhesion molecule, ICAM, neural cell adhesion molecule, NCAM)、成長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF, macrophage colony stimulating factor, M-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、サイトカイン(tumor necrosis factor- α , TNF α , interleukin-1 β , IL-1 β , interleukin-6, IL-6)を測定した。

運動療法は、理学療法士および作業療法士により、病状に応じて1日20-60分間、週5回施行された。内容は、筋力、関節可動域、基本動作、日常生活動作、ストレングスエルゴ、屋外歩行、坂道歩行の練習である。さらに、日常生活動作練習は、看護師により病状に応じて1日20-40分間、週5回施行された。

機能的自立度評価FIMとは食事、移乗、整容、清潔、歩行、階段、トイレ動作などの日常生活動作の各項目を全介助～自立に応じてスコア化して合計した評価である。上記の運動項目(motor FIM, 満点は91点)の他に、社会的交流、問題解決、記憶などの認知項目(cognitive FIM, 満点は35点)も評価した。FIMは転科時から退院時まで、毎週1回評価した。FIMの改善度、すなわち転科時のFIMと退院時のFIMとの差をFIM利得(FIM gain, Δ FIM)で示した。

対照疾患として、脳血管疾患以外(頭部外傷、正常圧水頭症、脊柱管狭窄症)により麻痺をきたしリハビリテーションを施行した症例について、同様の評価と測定を行った。

- 1) 約1月間の運動療法により上記の指標の変化を解析した。
- 2) 各指標について、平均値より高い値の群(高値群)と低い値の群(低値群)とに層別化し、機能的自立度を比較した。

2群間の有意差検定はWilcoxon rank sum test または Student-*t* test を用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意

差ありと判定した。

本研究は埼玉医科大学病院 IRB (Institutional Review Board) により承認され、対象者全員から informed consent を得て施行した。

3. 結果

対象症例は17例(脳梗塞12例, 脳出血5例)。年齢は 62.7 ± 13.0 歳。対照症例は5例(頭部外傷2例, 正常圧水頭症2例, 脊柱管狭窄症1例; 年齢 52.2 ± 20.0 歳)。一部の検査項目(ELAM, VEGF, VCAM, NCAM, tPA, PAI-1, TNF α , VEGF, M-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6)については10例(脳梗塞7例, 脳出血3例, 年齢 67.5 ± 12.60 歳)のみ測定した。

約1月間の運動療法により, FIMは運動項目(mFIM), 認知項目(cFIM)とも増加したが, 脳卒中群と対照群とで差はなかった(図1)。脳卒中群と対照群においては運動療法の効果には差がみられなかった。

1) 運動療法による各指標の変動を解析した。運動療法により脳卒中群では β TG, PF4, TAT, PIC, DD, EC, ELAM, VEGFが有意に低下した(図2, 3)。TM, vWF, VCAM, NCAM, ELAM, tPA, PAI-1, TNF α , VEGF, M-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6 は有意な変化はみられなかった(データ表示なし)。脳卒中群では, TAT 3.16 ± 1.08 , vWF 181 ± 68 , β TG 104 ± 62 , PF4 42.5 ± 33.3 , TAT 9.71 ± 15.9 , PIC 1.78 ± 2.47 , DD 1.72 ± 3.68 であり, 対照群よりも高い値を示した。

2) 各指標を, 上記の平均値より高い値の群(高値群)と低い値の群(低値群)とに層別化して運動機能の予後と比較した。TAT, PIC, DD については高値群で運動項目FIMが入院時, 転科時ともに有意に高かった(図4)。機能的自立度の改善度(転科時と退院時との差, Δ FIM)は有意な変化はみられなかった(データ表示なし)。

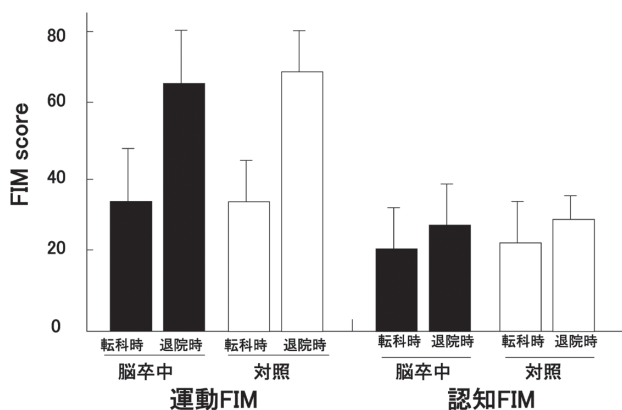


図1. 運動療法による脳卒中中の機能的自立度FIMの改善。

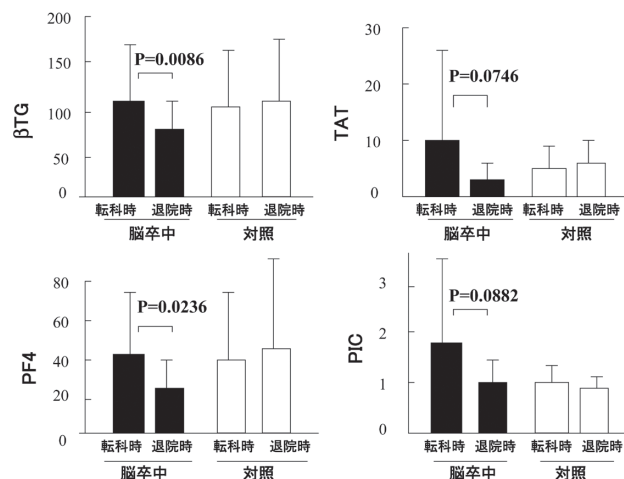


図2. 運動療法と血小板, 凝固線溶系の指標。

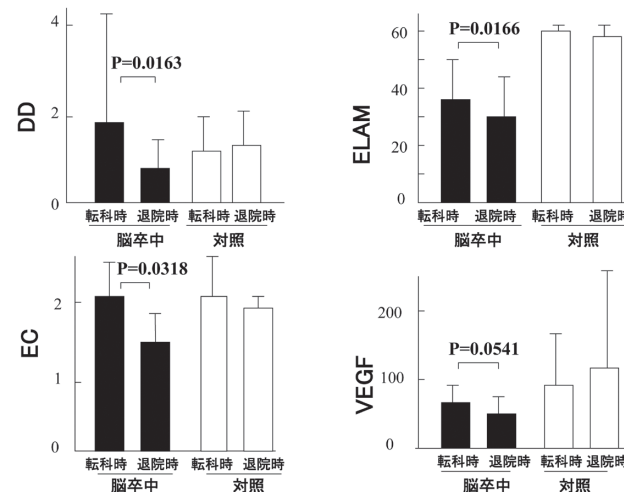


図3. 運動療法と線溶, 内皮, 接着分子の指標。

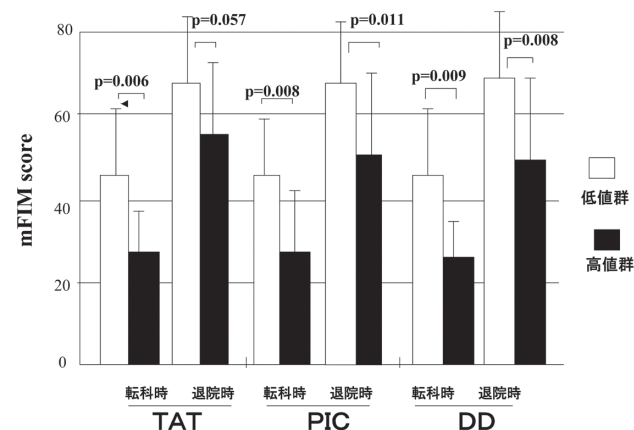


図4. 凝固線溶系の指標と機能予後。

4. 考 察

脳卒中は動脈硬化に起因する。動脈硬化は単球が泡沫細胞となり形成される。動脈硬化巣に血小板が粘着・凝集し、さらに凝固・線溶反応が加わり血栓症が発生する。単球、血小板の集積には接着分子が関与し、線溶物質産生には血管内皮細胞が関与する。従って脳卒中の機能的予後は、これらの単球、血小板、血管内皮、接着分子、凝固・線溶系の指標と関連している可能性がある。本研究では、運動療法によるこれら指標の変動を解析し、運動療法の有用性を評価した。さらに二次予防に有用な運動療法プログラムを開発したい。また、各指標により脳卒中の機能的予後の予測も試みた。

本研究は、運動療法により β TG, PF4, DD, ELAM が有意に低下し、TAT, PIC, VEGFが低下する傾向があることを示した。また、TAT, PIC, DDの低い症例では運動機能の予後が良いことが判明した。脳卒中において増加している血小板、血管内皮、接着分子、凝固・線溶系の指標は、運動療法により低下していく。運動療法の継続が脳卒中の二次予防に寄与する可能性が示唆された。動脈硬化の端緒である単球に関する指標は運動療法や機能的予後と関連がなかった。泡沫細胞発生から血小板凝集までの過程に関与する接着分子や血管内皮機能は運動療法や機能的予後と一定の関連がみられた。血栓症の最終的な引き金である血小板の指標は運動療法や機能的予後と深い関連をもっていた。単球遊走～動脈硬化～血栓症の過程で上流よりも下流に位置する指標が機能的予後と関連深い、つまり血管イベントの最終的原因が予後予測に有用であることが示唆された。

脳卒中におけるリハビリテーションの有用性が確立された現在、脳卒中で運動療法を施行しない対照群を設定することは倫理上不可能であるので、非動脈硬化性の中枢神経疾患を対照とした。このため脳卒中の急性期炎症反応が、単球、血小板、接着分子、血管内皮、凝固線溶の指標に及ぼす影響を排除して分析すること

は困難であった。

本研究をさらに発展させ、運動療法の時間、強度、モダリティーを変えていき、どのような運動療法のプログラムが脳卒中の二次予防に有用であるかを解析していきたい。本研究では、日本人に多い脳卒中を対照としたが、虚血性心疾患、糖尿病、高脂血症などの疾患についても研究していきたい。

謝 辞

本研究は平成18年度学内グラントにより行われた。

研究成果

学会報告

- 1) 倉林均, 間嶋満, 田村遵一, 久保田一雄: 脳梗塞発症前における血小板活性化の検討。
第48回日本老年医学会学術集会, 2006年6月, 金沢。
- 2) 倉林均, 菱沼亜紀子, 牧田茂, 間嶋満: 脳卒中のリハビリテーションにおける血管内皮機能と血小板活性化の解析。
第44回日本リハビリテーション医学会学術集会, 2007年6月, 神戸。
- 3) 倉林均, 間嶋満: 脳卒中高齢者のリハビリテーションによる機能的自立度FIMの改善。
第49回日本老年医学会学術集会, 2007年6月, 札幌。
- 4) 倉林均, 間嶋満: 加齢と血小板の超微細形態。
第49回日本老年医学会学術集会, 2007年6月, 札幌。
- 5) 倉林均: 運動療法が脳梗塞の血管内皮機能、接着分子、血小板活性化に及ぼす影響。
第30回日本血栓止血学会学術集会, 2007年11月, 志摩。
- 6) 倉林均, 菱沼亜紀子, 内田龍制, 牧田茂, 間嶋満: 血管内皮、血小板、凝固線溶系の指標による脳卒中の機能的予後の予測。
第105回日本内科学会講演会, 2008年4月, 東京。
- 7) 倉林均, 間嶋満: 単球, CRP, DD, ELAMと脳卒中の機能的予後との関連。
第50回日本老年医学会学術集会, 2008年6月, 千葉。

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

網羅的遺伝子多型解析とゲノム情報に基づく
加齢黄斑変性原因遺伝子の解明と機能解析

研究代表者 井上(堀江) 公仁子

(埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子情報制御部門 埼玉医科大学 眼科学)

共同研究者 森 圭介¹⁾, 神田 将和²⁾, 井上 聡³⁾

はじめに

加齢黄斑変性(AMD)は、欧米において失明原因の第一位である加齢に伴う眼科疾患であり、本邦においても罹患者数が急激に増加しており、高齢化社会における社会問題になりつつある。眼球をカメラに例えるならば、AMDとは高感度フィルムにあたる網膜中心部の黄斑部と暗箱にあたる脈絡膜の組織間において、老廃物の沈着(ドルーゼン形成)とその処理に伴い生じる免疫炎症反応により惹起するものと考えられる。さらに病状が進行すると、黄斑部に脈絡膜新生血管が発生し、網膜・脈絡膜間のバリア機構が破壊されることによって黄斑部機能は著しく低下し、急激な視力低下に至る。AMDの発症には、先進国における生活環境による影響も考えられるとともに、いくつかの遺伝的素因が複合的に関与していると考えられてきた。

疾患原因遺伝子の探求を行うにあたり、ヒトゲノム解読が終了した昨今において、ゲノム情報の蓄積に伴い、一塩基遺伝子多型(SNP)を用いたDNAアレイによるゲノムワイドな網羅的遺伝子多型解析が可能になってきた。また、人種別のSNP解析情報を元に進行しつつある国際的ハプロタイプヒトゲノムマップ計画(HapMapプロジェクト)により、特定のSNPおよび近傍のSNPにおける頻度の推定や、遺伝において同じ挙動を示すことが予想される遺伝子領域(ハプロタイプブロック)の情報取得が公開データベースにより可能となってきた。このような状況下において、2005年米国の複数の研究グループより、補体活性化第二経路の制御因子の1つである1番染色体上の補体H因子(CFH)について、アミノ酸置換を行うSNP(Y402H)と

白人におけるAMDの発症が強く相関することが発表された¹⁻⁴⁾。そのうちの1報¹⁾は、10万個サイズのDNAアレイ(100 Kアレイ)を用いた解析とHapMapデータの利用により、CFHの遺伝子多型との相関を特定したものである。CFHはAMDにおいてドルーゼン形成にかかわる蛋白であることも免疫組織化学的に明らかになったが、そのY402H多型はCFHがヘパリンやC反応性蛋白と結合する領域に存在することから、発症群において多いCアレルでは、補体系抑制機能が低下することが予想された。また、第二のAMD関連遺伝子座として、10番染色体長腕(10q26)領域が報告されてきたが^{5,6)}、最近その近傍に位置するセリンプロテアーゼ遺伝子の1つ(HTRA1)^{7,8)}もしくはミトコンドリアに発現する遺伝子ARMS2⁹⁾が原因遺伝子として注目されている。

白人におけるAMD関連遺伝子解析の結果に追従するように、黄色人種におけるAMD遺伝子解析においても、CFH多型や10q26領域の多型とAMDの相関性についても報告されているが、一方では日本人におけるAMDは白人のAMDとは異なる病型をとることが知られてきた。白人ではドルーゼン形成が主体で脈絡膜新生血管がないdry AMDと呼ばれる病型が主流であるのに対して、日本人では脈絡膜新生血管を伴う滲出性のwet AMDの病型と、特に男性に多く白人種には稀なポリープ状脈絡膜血管症(PCV)という病型の2つが主流である。従って、日本人においては、白人種と同じ遺伝子変異がAMDに発症に寄与している可能性がある一方で、白人とは異なる遺伝子の関与により異なる病態の修飾を生じ、表現型に大きな差が生じている可能性が考えられる。日本人に重要なAMD原因遺伝子を同定することにより、AMDの人種間差をもたらす因子とその病態への作用が明らかになり、さらに日本人に対して特に効果的であるAMDの分子標

1) 埼玉医科大学 眼科学

2) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター TR部門

3) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子情報制御部門

的治療が可能になると考えられる。

このような背景のもと、本研究は、埼玉医科大学病院眼科受診したAMD 罹患者および非罹患者における遺伝子多型解析を行い、ゲノムデータベース情報を活用して日本人のAMD 発症に関連する遺伝子の探索を行った。

研究方法

本研究は、埼玉医科大学倫理委員会の承認の下、文書によるインフォームドコンセントが得られた埼玉医科大学病院眼科受診者を対象として末梢血サンプルを提供いただき、ゲノムDNAを精製して解析に用いた。AMDの病態としては、滲出型AMD、ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)、萎縮型AMDの3型に分類した。コントロール群としたAMD非罹患者は、AMDの他、他の網膜・脈絡膜疾患を有さない、罹患者とマッチする年齢層の人を対象とした。個人を特定する情報は埼玉医科大学病院眼科において管理し、ゲノム医学研究センターにおいてはサンプルと個人情報を切り離して解析を行った。本研究開始時において、解析可能な対象数はAMD罹患者群189例、コントロール群135例であり、そのうちの男性比率は、罹患者群76.2%、コントロール群51.9%、年齢は、罹患者群71.2±8.5(平均値±SD)歳、コントロール群68.1±9.7歳であった。

SNP解析は、塩基の違いにより発色する蛍光色素が異なるようにデザインされたプローブによるPCR解析、TaqMan SNPジェノタイピングアッセイ(Applied Biosystems社)を用いて行った。

研究結果と考察

本研究において、10q26領域のHTRA1遺伝子プロモーター多型が日本人AMD罹患者性と特異的に関連することを明らかにした[研究成果参照]。この結果は、2006年末に米国より発表された白人種および米国在住中国人におけるHTRA1遺伝子プロモーター多型のAMD関連性を初めて日本人においても確認するものであり、本研究結果は、米国国立バイオテクノロジー情報センター提供のヒト遺伝病データベース(OMIN)にも収録され、インターネット上に公開された。転写因子の結合部位に関連するHTRA1遺伝子プロモーター多型については、HTRA1の発現量をコントロールする可能性が米国の研究グループにより報告されている⁷⁾。HTRA1の発現量と疾患の関連性については、変形性関節症の軟骨におけるmRNAの高発現が報告されており、HTRA1と炎症との関連性が考えられている¹⁰⁾。また、HTRA1はインスリン様成長因子¹¹⁾やTGF- β 系因子^{12,13)}へ直接作用することも推測されており、細胞増殖や腫瘍増殖をコントロールする可能性も考えられている。

他方、10q26領域においては、HTRA1遺伝子上流

にLOC387715/ARMS2遺伝子が存在すると考えられており、最近、この遺伝子がミトコンドリアに発現する可能性が報告された⁹⁾。LOC387715/ARMS2遺伝子のnonsynonymous SNPであるA69S多型は、10q26領域におけるAMD感受性のマーカーとして、早くから報告されてきたものである。ARMS2遺伝子のミトコンドリアにおける機能は明らかではないが、老廃物が細胞内で処理・消化されるにあたっては、ミトコンドリアのエネルギー代謝にも依存することから、この遺伝子の多型がAMDの発症で重要である可能性も考えられている。

さらに、候補遺伝子アプローチとして、補体系遺伝子のAMD罹患関連性について検討を行った。C型肝炎における肝線維化の関連遺伝子として報告があるC5について¹⁴⁾、肝線維化に重要と考えられる多型として、エクソン19のnonsynonymous SNPであるrs17611、イントロン27にあるSNP rs1035029、およびイントロン39にあるSNP rs2300929の解析を行ったところ、アレル頻度とAMD罹患との関連性は、カイ二乗検定においてそれぞれ $P=0.22$ 、 $P=0.26$ 、 $P=0.84$ であり、今回の集団においてはいずれも有意差は得られなかった。補体系とAMD罹患関連性については、1q32領域のCFH遺伝子とその周辺に位置するCFH関連遺伝子群^{15,16)}の他、CFHと同様に補体活性化第二経路における制御因子のB因子(BF)遺伝子および近接するC2遺伝子^{17,18)}、C3遺伝子^{19,20)}などについて報告がある。C5については、AMD患者に発生する網脈絡膜ドルーゼンの免疫染色において、C3とともに発現が認められており、また実験的に活性型C5であるC5aの受容体遺伝子をノックアウトしたマウス(C5aR^{-/-}マウス)の眼底にレーザー傷害を与えた場合、血管新生因子のVEGFの発現が低下し、脈絡膜新生血管の発症が抑えられることが示されている²¹⁾。現在までの検討では、C5遺伝子多型とAMD罹患の関連性については明らかではないが、さらに詳細なC5遺伝子周辺SNP多型の検討を行い、またC3遺伝子多型、C3aとC5aの受容体遺伝子多型の検討を行うことは、AMD発症における種々の補体系遺伝子の意義付けを明らかにできるものとして重要と考えられる。

おわりに

AMD疾患感受性遺伝子としては、現在のところCFHとHTRA1またはARMS2が重要であることが報告されてきたが、未だ日本人にwet AMDならびにPCVの病型が多い理由については明らかになっていない。AMDの治療法については、新生血管退縮を目的とした光線力学的療法、血管新生抑制のための抗VEGF抗体(アバスタチンなど)眼内注入、炎症抑制のためのステロイド剤(トリアムシノロンなど)の局所投与などの併用により、一時代昔に比較して格段に進歩したと

言えるが、費用の面で医療費負担は少なくない。また、病期進行後の治療では視力の回復が図れない場合もあり、高齢者のQOLを維持するためには、最も早期発見・早期治療が必要な疾患の一つと考えられる。本研究により、日本人におけるAMD易罹患性の遺伝子多型が明らかになれば、高齢者の健康維持を行える面においても、医療費増大を抑制できる面においても、重要な意義があると考えられる。本研究を進展させ、既知の疾患感受性遺伝子を含め複数の遺伝子多型を組み合わせることにより、AMD発症を性格に予測するシステムを構築し、さらに将来的には疾患感受性遺伝子をターゲットとした比較的安価で効果的な新しい治療・薬剤の開発への応用を目指したい。

謝 辞

本研究は、平成18年度埼玉医科大学学内グラントおよび平成17-19年度文部科学省学術フロンティア推進事業の支援により行われた。研究推進にあたり、埼玉医科大学医学部眼科・米谷新教授、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター・村松正實前所長ならびに岡崎康司所長に貴重な助言をいただいたことを深謝する。

研究成果リスト

論文

Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, Kawasaki I, Gehlbach PL, Awata T, Yoneya S, Okazaki Y, Inoue S. Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population. *J Hum Genet*. 2007;52(7):636-41.

学会発表

堀江公仁子, 森圭介, 神田将和, 樺沢昌, 川崎いずみ, 大崎昌孝, 飯塚浩幸, 栗田卓也, 岡崎康司, 井上聡, 米谷新

CFHおよびHTRA1プロモーター遺伝子多型による加齢黄斑変性症罹患リスクの検討

第61回臨床眼科学会. 2007.10 京都

特許出願

学内番号：埼玉特19-002

発明の名称：加齢黄斑変性症の発症リスクの予測方法
井上聡, 井上公仁子, 森圭介, 米谷新, 神田将和, 岡崎康司

出願日：2007.7.26

参考文献

- 1) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385-9.
- 2) Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor

- H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005 308(5720):421-4.
- 3) Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):419-21.
- 4) Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LJ, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(20):7227-32.
- 5) Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet*. 2005;14(21):3227-36.
- 6) Schmidt S, Hauser MA, Scott WK, Postel EA, Agarwal A, Gallins P, et al. Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*. 2006;78(5):852-64.
- 7) DeWan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science*. 2006;314(5801):989-92.
- 8) Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 2006;314(5801):992-3.
- 9) Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KE, Brooks M, Khanna R, et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(41):16227-32.
- 10) Hu SI, Carozza M, Klein M, Nantermet P, Luk D, Crowl RM. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem*. 1998;273(51):34406-12.
- 11) Zumbunn J, Trueb B. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett*. 1996;398(2-3):187-92.
- 12) Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshiba-Takeuchi K, Ina J, Yano M, et al. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development*. 2004;131(5):1041-53.
- 13) Hadfield KD, Rock CF, Inkson CA, Dallas SL, Sudre L, Wallis GA, et al. HtrA1 inhibits mineral

- deposition by osteoblasts: requirement for the protease and PDZ domains. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5928-38.
- 14) Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, et al. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet.* 2005;37(8):835-43.
- 15) Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(10):1173-7.
- 16) Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, et al. Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2008;17(7):971-7.
- 17) Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(4):458-62.
- 18) Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(9):1055-9.
- 19) Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, et al. Genetic Factors in AMD Study Group. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2007;357(6):553-61.
- 20) Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Scott WK, Gallins P, et al. C3 R102G Polymorphism Increases Risk of Age-related Macular Degeneration. *Hum Mol Genet.* 2008 Mar 6 [Epub ahead of print]
- 21) Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, et al. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2328-33.

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

吊り上げ・ミニラパ法による小児低侵襲手術法の開発

研究代表者 小高 明雄(埼玉医科大学 総合医療センター 肝胆膵外科・小児外科)

研究分担者 橋本 大定*

緒 言

1990年代から急速に普及してきた腹腔鏡下手術は、患者の負担軽減に大きく寄与する低侵襲手術として、現在さまざまな外科領域で利用されている。成人に比べ侵襲に弱い小児においては、低侵襲の腹腔鏡下手術の有用性は特に高いと思われる。しかし、小児の場合、腹腔鏡下手術で行われている炭酸ガスによる気腹は、呼吸や循環に悪影響を与えるのではないかという点が懸念される。また、小児外科領域では、成人の胆石症のように腹腔鏡下手術の適応となる日常疾患がないために、小児外科医が腹腔鏡下手術に習熟するのには長い年月を必要とするという欠点も指摘されている。

当科では、気腹をまったく必要としない真の低侵襲手術法として、腹壁の小切開創を水平方向、あるいは斜め方向に自在に牽引して手術を行う吊り上げミニラパ法(スライディング・ウィンドウ法)を、成人を対象として開発して、すでに臨床で実践してきた。この吊り上げ・ミニラパ法は、小切開手術でありながら、気腹を行わずに、開腹手術と同じ感覚で手術を施行でき、必要な場合には腹腔鏡も使用できるという利点を持っている。

本研究は、成人を対象として長期間取り組んできた吊り上げ・ミニラパ法の機械器具類を小型化して小児外科に適応し、成人以上にその必要性の認められる分野への応用を図るものである。

材料と方法

- 1) 腹壁の牽引器具・トロカール・鉗子類の開発：成人の吊り上げ・ミニラパ手術用に開発した腹壁の牽引器具、トロカール及び鉗子類を、小児の体型に合わせて、長さの短縮や細径化によって小型化する。
- 2) 臨床応用：当科における小児外科手術を吊り上げ・ミニラパ法によって行う。対象とする症例は、開腹手術が必要で、腹膜炎などの重篤な感染症を伴わない小

* 埼玉医科大学 総合医療センター 肝胆膵外科・小児外科

児外科疾患として、手術前に患者の両親から吊り上げ・ミニラパ法に関して同意の得られたものとする。

結 果

- 1) 腹壁の牽引器具・トロカール・鉗子類の開発：腹壁の牽引器具に関しては、成人の吊り上げ・ミニラパ手術用に開発したベープ吊り上げ鉤を小型化した(図1)。トロカールに関しては、小児の体型に合わせて、5 mm径の套管針2本と外套管5本を作成した(図2)。鉗子類に関しては、成人の腹腔鏡下手術で使用しているものを、小児の体型に合わせて小型化して、4種類計5本を作成した(図3)。
- 2) 臨床応用：小児外科疾患20例で吊り上げ・ミニラパ法を施行した。疾患と術式の内訳は、急性虫垂炎(虫垂切除術)8例、乳児肥厚性幽門狭窄症(粘膜外幽門筋層切開術)6例、新生児卵巣嚢腫(嚢腫切開吸引・生検)3例、卵巣奇形腫(腫瘍摘出術)1例、大網嚢腫(嚢腫摘出術)1例、胆石症+脾腫(胆嚢摘出術+脾臓摘出術)1例であった。皮膚切開は全例、臍部の小切開で施行した。胆石症+脾腫の1例で腹腔鏡の補助を必要とした以外は、全例直視下の操作で手術が可能であった。疾患別の手術時間は、それぞれ急性虫垂炎35～75分、乳児肥厚性幽門狭窄症50～95分、新生児卵巣嚢腫15～45分、卵巣奇形腫85分、大網嚢腫130分、胆石症+脾腫200分であった。術後合併症は、乳児肥厚性幽門狭窄症の1例で創感染を生じた以外には認められなかった。

考 察

これまでの経験によれば、小児の吊り上げ・ミニラパ法は、臍部の小切開のみで施行できることがわかった。これは、小児の腹壁は、成人に比べて柔軟性に富み、厚さも薄いことから、開腹創(ウインドウ)をスライドさせることが成人よりも容易にできるためと考えられる。また、大部分の小児外科疾患は、腹腔鏡の補助を必要とせず、直視下操作だけで手術がで

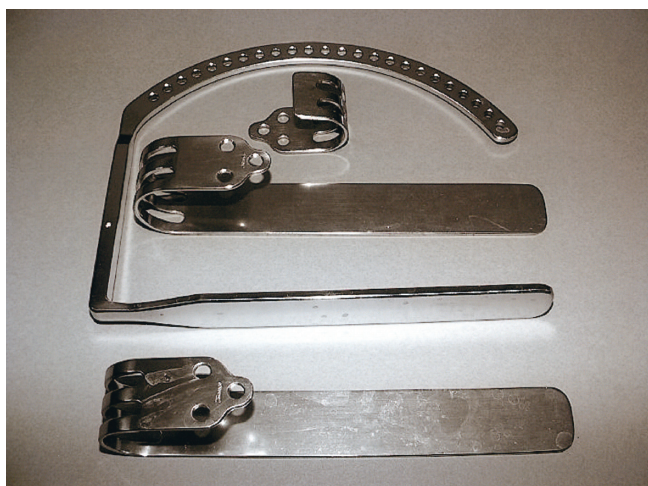


図 1. 小児用ベープ吊り上げ鉤：D型アーチ，短型弁，長型弁2.

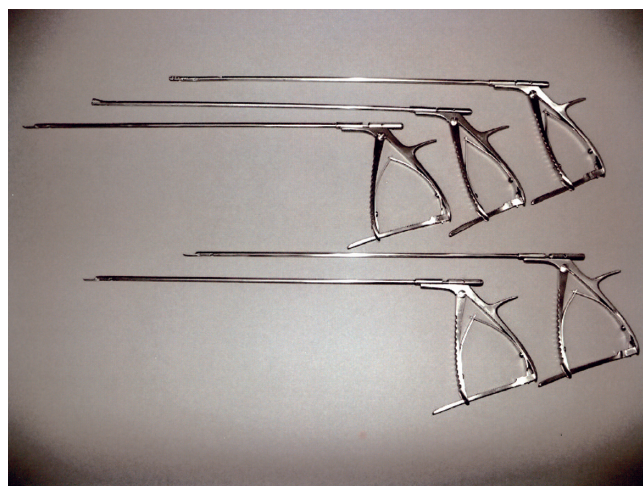


図 2. 小児用トラカール：套管針2本，外套管5本.



図 3. 小児用鉗子類（上：全体図，下：先端拡大図）：上から順に，三つ穴結紮鉗子，ツッペル鉗子，オジギ糸通し鉗子，オジギ鉗子2本.

研究成果リスト

きるため，従来の開腹手術と比べても手術時間は長くかからなかった．したがって，この手術方法は，炭酸ガスによる気腹を必要とせず，開腹創は小さくて済み，さらに手術時間も延長しないことから，真に低侵襲手術であり，成人よりも手術侵襲に弱い小児にとっては，大きな利益になることが期待できる．今後も，術前のインフォームドコンセント，十分な術野の確保，創部感染の予防に配慮しながら，さまざまな小児外科疾患に適応を拡大していく予定である．

学会発表

- 1) Odaka A, Hashimoto D, Komagome N, Shin N, Oda K, Ishida T, et al. Umbilical incision sliding-window method in pediatric surgery. The 6th GasLESS International, 2007年12月8日, Beijing (China)
- 2) 小高明雄, 橋本大定, 川嶋寛. 気腹を用いない小児の低侵襲手術(臍部小切開sliding-window法)の開発. 第45回日本小児外科学会総会, 2008年5月29日, つくば

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

進行性化骨性筋炎 (FOP) に関する国際的研究拠点の形成

研究代表者 片桐 岳信(埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター)

分担者 福田 亨¹⁾, 岡崎 康司¹⁾, 織田 弘美²⁾

1. はじめに

進行性化骨性筋炎(または進行性骨化性線維異形成症, Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP)は, 出生後から全身の筋組織内や周囲の膜, 腱や靭帯に異所性の骨化が進行する常染色体優性遺伝を示す疾患である¹⁾. 発症原因の詳細は不明で, 異所性骨化を抑制できるような治療法は確立されていない. 発症率は約200万人に1人とされ, 国内では約40名のFOP患者が確認されている.

我が国では, (1) 希少性(約5万人以下), (2) 原因不明, (3) 効果的な治療法未確認, (4) 生活面への長期にわたる支障, の4つの要件を満たす疾患を難治性疾患克服研究事業対象疾患(いわゆる難病)として認定し, 有効な治療法の確立に向けた研究が行われている. FOPの場合, この4要件をすべて満たしており, FOP患者会も難病認定を要望しているものの, 本研究を開始した平成18年時点では難病には認定されていなかった. 世界的には, アメリカを拠点としたInternational FOP Association (IFOPA)が設立されており, ペンシルバニア大学医学部整形外科のFrederick S. Kaplan教授を中心とした医療チームが長年にわたりFOP研究に取り組んできた. しかし, 多くの情報が英語で発信されているために, 国内のFOP患者が情報を得るには困難な場合が多く, 国内でFOPの発症原因や治療法を研究する新しい組織の設立が望まれていた.

FOPの発症原因として, 異所性骨化誘導で能を持つ生理活性物質として知られるbone morphogenetic protein (BMP)のシグナル異常が指摘されていた. BMPは骨組織に含まれるサイトカインで, それを筋組織に移植すると, そこに新しい骨組織の形成を誘導する²⁾. BMPは, *in vitro*でも筋組織の再生に重要な筋芽細胞の培養系に添加すると, 筋分化を完全に阻害し

て, 代わりに骨芽細胞への分化を誘導する. これらの活性は, 標的細胞膜上の2種類のBMP特異的受容体(I型とII型)に依って細胞内へ伝達される³⁾. どちらも膜貫通型セリン・スレオニンキナーゼで, II型受容体はI型受容体をリン酸化し, I型受容体は細胞室内の転写因子等を基質としてリン酸化する.

本研究では, 本邦初のFOP研究を専門に行う組織を本学に設立し, FOPの発症原因の解明と, FOPに有効な治療法の確立を目的とした.

2. 材料と方法

研究を開始するに当たり, 本学内にFOPを専門に研究する「埼玉医科大学FOP診療・研究プロジェクト」を組織した. 構成員は主に本学の臨床及び基礎研究者で, 若干名の学外研究者にも参加を要請した. また, 国内外のFOPやBMP研究に携わる研究者を国内外から本学に招き, セミナー等を開催してFOPに関する最新の情報を収集した. さらに, 2007年7月には, FOP研究者のみならず国内のFOP患者及びその家族を対象としたセミナー及び懇談会を企画した. 国内外のFOP研究者と患者及びその家族との交流の場を設け, 我が国におけるFOP研究の基盤整備に努めた.

FOPにおける遺伝子変異を解析するため, 埼玉医科大学倫理委員会で承認を受けた研究計画(472-II)に基づき, FOP患者会J-FOP〜光〜を通じて血液とFOPに関する情報の提供を依頼した. 血液サンプルの提供にあたっては, 各患者の主治医によるインフォームド Consent後, 書面での同意を得た上で採血を行った. 得られた血液サンプルより染色体DNAを抽出後, PCR法にてALK2遺伝子の各エクソン断片を増幅し, Direct Sequencing法により塩基配列を解読したものを, データベースと比較して変異の有無を解析した.

3. 結果

1) 埼玉医科大学FOP診療・研究プロジェクトの設立
FOP研究を効率的に推進するために, 本学に「埼玉

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 整形外科 脊椎外科

医科大学 FOP 診療・研究プロジェクト」(以下, FOP プロジェクト)を組織した。これは, FOP の診断や治療に関わる臨床研究と基礎研究の連携により FOP の克服を目指す, 本邦初の FOP 専門の研究組織である。本稿執筆時点で, FOP プロジェクトは 12 名の本学の臨床及び基礎研究者と, 4 名の学外研究者によって構成されている(表 1)。

FOP は, 極めて希で症例数の少ない疾患であることから, ごく一部の医療従事者だけが知る疾患であった。患者やその家族が FOP に関する情報を入手するためには, 少ない専門的な医学論文や患者個人のホームページなどに頼らざるを得ず, 正確で最新の情報を入手することが困難であった。そこで, 本学の全面的な協力の下, 2007 年 2 月に FOP プロジェクトによる一般向けホームページを開設し, これを頻繁に更新することで, 可能な限り正確で新しい FOP の医学的情報を提供する体制を整えた。

(http://www.saitama-med.ac.jp/medlinks/saitama_univ_fop/web-content/index.html)。

2) FOP に関する学術セミナー等の企画

FOP や BMP に関する最新の情報を収集するために, 海外を含む学外から関連の研究者を招きセミナー等を企画した(表 2)。本研究期間中に, 海外から 3 名, 国内から 5 名の講師を招いた。

また, 2007 年 7 月に開催された第 25 回日本骨代謝

学会学術集会ランチョンセミナー(大阪国際会議場)において, 片桐岳信が座長を務め Kaplan 教授が最新の FOP 研究に関する講演を行った。そこでこのランチョンセミナーに, 日本骨代謝学会の協力の下, 国内の FOP 患者と家族(合計 22 家族)を招待し, 最先端の FOP 研究に関する情報を得る機会を提供した。これは, 日本骨代謝学会でも初の試みであった。さらにこの講演会の後で, 国内の FOP 研究者や Kaplan 教授と共に, FOP 患者と家族の懇談会を開催した。これは, 国内初の全国規模の FOP 患者会となった。

3) 国内患者における FOP 遺伝子変異の解析

国内の FOP 患者 20 名とその血縁者から提供された血液を基に, FOP 責任遺伝子の解析を試みた。2006 年に, Kaplan らによって BMP 受容体の 1 つである ALK2 遺伝子の 617G > A 変異が同定されたことから, この変異の有無を解析したところ, 19 名の FOP 患者においてエクソン 4 中の 617G > A 変異を確認した。一方, 血縁者にこの変異は見出されなかった。また, 変異が確認されなかった 1 名は, 後日, 主治医による診断から FOP ではないことが判明した。よって, 国内の FOP 患者も ALK2 遺伝子の 617G > A 変異によって本疾患を発症しているものと予想された。

4. 考 察

本研究により, 我々は我が国初の FOP 研究専門組織

表 1. 埼玉医科大学 FOP 診療・研究プロジェクトのメンバー (50 音順)

亀田 真澄 (中央研究施設形態部門)
池淵 研二 (臨床検査部)
大竹 明 (小児科)
岡崎 康司 (ゲノム医学研究センター・トランスレーショナルリサーチ部門)
織田 弘美 (整形外科)
片桐 岳信 (ゲノム医学研究センター・病態生理部門)
小森 哲夫 (神経内科)
中山 耕之介 (内分泌・糖尿病内科)
難波 聡 (産婦人科)
福田 亨 (ゲノム医学研究センター・病態生理部門)
丸木 雄一 (精神神経センター)
依田 哲也 (口腔外科)
●学外協力メンバー
大湾 一郎 (琉球大学医学部)
自見 英治郎 (九州歯科大学)
供田 洋 (北里大学薬学部)
宮園 浩平 (東京大学医学部)

となる「埼玉医科大学FOP診療・研究プロジェクト」を組織し、国内におけるFOP研究を推進した。その後、2007年3月には、厚生労働省の平成18年度第4回特定疾患対策懇談会においてFOPを難病として認定することが決定した。これに基づき、2008年4月からは厚生労働省の難治性疾患克服研究事業「脊柱靱帯骨化症に関する調査研究」によってFOPに関する研究が開始され、片桐岳信も分担研究者として参加している。

今回の研究により、国内FOP患者においてもALK2遺伝子の617G>A変異が確認された。従来は、FOPを正確に診断する方法が確立されていなかったため、FOPと確定診断されるまでに平均4年を要していた。今後は、FOPに特徴的な所見である外反母趾を含む拇指の奇形の有無とALK2遺伝子の変異解析を行うことで、迅速な診断が可能になるものと思われる。すでに、本学のFOPプロジェクトでは外部医療機関からのFOP遺伝子解析を受け入れており、それによってFOPの診断が確定した事例がある。血液以外のサンプルを用いた非侵襲的な検査方法を検討すると共に、ALK2遺伝子の変異がBMP受容体のどのような機能的変化を引き起こすかという点について解析中である。これまでの予備的な結果によると、本受容体は構成的活性型変異体であり、常にBMPシグナルを細胞内に伝達している可能性が示された。

以上のように、本研究により本学にFOPの研究拠点を形成することに成功した。今後の継続的な研究により、FOPの発症原因が解明され、それに基づく新しい有効な治療法が開発されることが期待される。

文 献

- 1) Kaplan FS, Shen Q, Lounev V, Seemann P, Groppe J, Katagiri T, et al. (2008) Skeletal Metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J. Bone Miner. Metab.* 26, in press.
- 2) Katagiri T, Suda T, and Miyazono K. (2008) The bone morphogenetic proteins. *In The TGF- β Family*. Miyazono K and Derynck R, editors. Cold Spring Harbor Press, New York, p.121-49.

5. 謝 辞

本研究の少なくとも一部は、埼玉医科大学学内グラント(H18-1-2-10)、平成17年度私立大学学術研究高度化推進事業学術フロンティア、平成19年度厚生労働科学研究費難治性疾患克服研究事業、平成19年度三共生命科学振興財団研究助成、平成20年度川野正登記念川野小児医学奨学財団研究助成による助成を受けた。また、本研究の一部により、第5回森村豊明会奨励賞(片桐岳信)、ノボノルディスク成長・発達研究賞2008(片桐岳信)、第18回日本整形外科学

表 2. FOPプロジェクトが企画したセミナー等

年月日	講師(所属) および講演タイトル
2007年3月7日	Norihiro Kamiya (National Institute of Environmental Health Sciences) "In vivo functions of BMP signaling using bone-specific conditional mice"
2007年5月8日	宮園 浩平 (東京大学大学院医学系研究科病院・病理専攻分子病理学講座) 「TGF- β ファミリーシグナルの調節機構と疾患」
2007年7月17日	Frederick S Kaplan (Departments of Orthopaedic Surgery and Medicine, and The Center for Research in FOP and Related Disorders. The University of Pennsylvania School of Medicine) "Why do some people form two skeletons?"
2007年7月17日	John M. Wozney (Women's Health and Musculoskeletal Biology, Whyeth Reserch) "Biology and Clinical Development of BMPs"
2007年11月9日	清水 厚志 (慶應大学医学部分子生物学教室) 「進行性骨化性線維異形成症 (FOP) のモデルメダカの作成と発症機構の解明」
2008年1月21日	伊東 佑記 (九州歯科大学分子情報生化学分野) 「進行性骨化性線維異形成症 (FOP) で見出された変異 ALK2 受容体の解析」
2008年3月25日	Baohong Zhao (昭和大学歯学部口腔生化学教室) 「IRF-8 による破骨細胞分化の制御」
2008年3月28日	自見 英治郎 (九州歯科大学分子情報生化学分野) 「NF- κ B と Smad のクロストークによる骨芽細胞分化の制御」

会骨系統疾患研究会最優秀ポスター賞(片桐岳信), 29th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, Travel grant(福田亨), 29th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, Travel grant(野島淳也)を受賞した。

研究成果リスト

・論文

- 1) Fukuda T, Kanomata K, Nojima J, Urakawa I, Suzawa T, Imada M, et al. FGF23 induces expression of two isoforms of NAB2, which are corepressors of Egr-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 343: 147-51.
- 2) Tomoyasu A, Higashio K, Kanomata K, Goto M, Kodaira K, Serizawa H, et al. Platelet-rich plasma stimulates osteoblastic differentiation in the presence of BMPs. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 62-7.
- 3) Yamada A, Takami M, Kawawa T, Yasuhara R, Zhao B, Mochizuki A, et al. Interleukin-4 inhibition of osteoclast differentiation is stronger than that of interleukin-13 and they are equivalent for induction of osteoprotegerin production from osteoblasts. *Immunology* 2007; 120: 573-9.
- 4) Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 267-72.
- 5) Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, Katagiri T, Koike T and Takaoka K. Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway. *J Bone Miner Metab* 2008; in press.
- 6) Suzuki O, Imaizumi H, Kamakura S and Katagiri T. Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization. *Curr Med Chem* 2008; 15: 305-13.
- 7) Katagiri T, Suda T and Miyazono K. In: Miyazono K and Derynck R, editors. *In The TGF- β Family*. New York: Cold Spring Harbor Press; 2008.p.121-49.
- 8) Kaplan FS, Shen Q, Lounev V, Seemann P, Groppe J, Katagiri T, et al. Skeletal Metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Metab* 2008; 26, in press.
- 9) 片桐岳信, 大湾一郎 進行性化骨筋炎とは、どのような病気でしょうか. *健* 2007; 36: 10-2.
- 10) 片桐岳信, 福田亨, 鹿又一洋, 中村厚, 野島淳也 BMPシグナルと骨疾患: 進行性骨化性線維異形成症(FOP). *The Bone* 2007; 21: 711-5.
- 11) 片桐岳信, 高橋直之 BMPシグナルと骨疾患. 骨粗鬆症治療 2008, 印刷中.
- 12) 片桐岳信, 福田亨, 野島淳也, 鹿又一洋, 中村厚 骨形成におけるBMPシグナルとWntシグナルのクロストークの重要性. *クリニカルカルシウム* 2008; 18: 194-201.
- 13) 片桐岳信 進行性骨化性線維異形成症(FOP) 研究における最近の進歩. *難病と在宅ケア* 2008; 13: 55-8.
- 14) 片桐岳信: Fibrodysplasia ossificans progressiva FOPとBMP情報伝達異常のup to date. *リウマチ科*, 2008; 印刷中

・招待講演等

- 1) 片桐岳信: 骨形成の最前線. 第8回臨床骨代謝フォーラム, 2007年1月27日, 埼玉
- 2) 片桐岳信: 進行性化骨筋炎(FOP). 東北大学機能医科学講座運動学分野・セミナー, 宮城, 2007年2月15日
- 3) 片桐岳信: 骨形成研究の最前線. ペンタックス・セミナー, 東京, 2007年2月21日
- 4) 片桐岳信: 教科書にも載っていない将来の道. 獨協埼玉中学高等学校講演会, 埼玉, 2007年2月24日
- 5) 片桐岳信: FOPに関する最近の進歩. FOP講演会, 岐阜, 2007年3月27日
- 6) 片桐岳信: 難病への理解を深めるために 新たな難病指定を受けたFOPの現状と最近の動向から. 神戸市平成19年度第2回地域保険事業関連研修会, 2007年7月2日, 兵庫
- 7) 片桐岳信: 進行性骨化性線維異形成症(FOP)に関する基礎研究の進歩. 難治性疾患克服研究事業 脊柱靱帯骨化症に関する調査研究 進行性骨化性線維異形成症研究班 平成19年度第1回班会議, 東京, 2007年7月13日
- 8) 片桐岳信: 骨形成とBMPシグナル. 第25回日本骨代謝学会学術集会ミニシンポジウム, 大阪, 2007年7月21日
- 9) 片桐岳信: 埼玉医科大学が取り組む新規の難病・進行性骨化性線維異形成症(FOP). 第5回RCGMフロンティアシンポジウム, 2007年7月27日, 埼玉
- 10) 片桐岳信: 新規の難病・進行性骨化性線維異形成症(FOP). 九州歯科大学セミナー, 福岡, 2007年8月1日
- 11) 片桐岳信: 新規の難病・進行性骨化性線維異形成症(FOP). 佐賀県難病相談支援センター公開

・和文総説

- 1) 片桐岳信 BMPシグナルによる骨形成 ―生理的および病的骨形成への関与. *医学のあゆみ* 2007; 221: 57-61.
- 2) 片桐岳信, 福田亨, 野島淳也, 鹿又一洋 BMPの作用と骨疾患. *細胞* 2007; 39: 327-30.

- セミナー, 佐賀, 2007年8月2日
- 12) 片桐岳信: BMPシグナルによる骨形成の制御. 第16回ROD-21研究会, 神奈川, 2007年8月25日
 - 13) 片桐岳信: 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) における骨形成. 第49回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウムⅡ, 北海道, 2007年8月29日
 - 14) 片桐岳信: 埼玉医科大学が取り組む難病・進行性骨化性線維異形成症 (FOP). 第3回埼玉医大臨床遺伝カンファレンス, 埼玉, 2007年9月10日
 - 15) 片桐岳信: 新規の難病・進行性骨化性線維異形成症 (FOP). 昭和大学歯学部口腔生化学教室セミナー, 東京, 2007年9月1日
 - 16) 片桐岳信: 骨になる筋肉: 進行性骨化性線維異形成症 (FOP). 第62回日本体力医学会・教育講演, 秋田, 2007年9月13日
 - 17) 片桐岳信: 新規難病・進行性骨化性線維異形成症 (FOP) 治療薬の開発に向けて. 北里大学大学院薬学研究科講義, 東京, 2007年10月16日
 - 18) 片桐岳信: IFOPAシンポジウム報告 (基礎). 難治性疾患克服研究事業 脊柱靱帯骨化症に関する調査研究 進行性骨化性線維異形成症研究班 平成19年度第2回班会議, 東京, 2007年10月20日
 - 19) 福田亨: FOPの遺伝子解析. 難治性疾患克服研究事業 脊柱靱帯骨化症に関する調査研究 進行性骨化性線維異形成症研究班 平成19年度第2回班会議, 東京, 2007年10月20日
 - 20) 片桐岳信: 筋肉が骨になる難病 ～進行性骨化性線維異形成症 (FOP)～. ひたちなか薬剤師会学術集会・特別講演, 茨城, 2007年11月1日
 - 21) 片桐岳信: 難病指定されたFOPをもっと知ろう. 「FOPとは」. なら地域ケア研究会 地域ケアについて考えるフォーラム・基調講演, 2007年11月10日
 - 22) 片桐岳信: 筋肉が骨に変わる難病: 進行性骨化性線維異形成症 (FOP). 福岡歯科大学 学術フロンティアシンポジウム・特別講演, 福岡, 2007年12月5日
 - 23) Katagiri T.: Bone formation regulated by BMP signaling. Center for Research in FOP & Related Disorders Seminar. The University of Pennsylvania School of Medicine. 米国ペンシルバニア州, 2007年12月11日
 - 24) Katagiri T.: Bone formation regulated by BMP signaling. Department of Orthopaedic Surgery Reserch Laboratory Seminar. Jefferson Medical College of Thomas Jefferson University. 米国ペンシルバニア州, 2007年12月13日
 - 25) 福田亨: 筋組織内で異所性骨化が起こる Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) 発症メカニズムの解析. 第3回 Bone Forum in Hannno. 埼玉, 2008年1月10日
 - 26) 片桐岳信: 成長に伴い筋が骨化する難病・進行性骨化性線維異形成症. 第19回小児成長研究会 東京, 2008年2月9日
 - 27) 福田亨: 筋組織内で異所性骨化が起こる Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) 発症メカニズムの解析. 第2回 Bone Research Seminar. 東京, 2008年3月1日
 - 28) 片桐岳信: 骨誘導因子 (BMP) シグナルに基づく生理的及び病的骨形成の解明. 第179回北里研究会 北里研究所北里柴三郎記念賞, 森村豊明会奨励賞受賞者特別講演会, 東京, 2008年3月13日 【第5回森村豊明会奨励賞受賞】
- ・学会発表
- 1) 千代延友裕, 吉田路子, 藤木敦, 石井るみ子, 貫名貞之, 片桐岳信: 進行性化骨性筋炎 (FOP) の1例. 第41回日本小児神経学会近畿地方会, 大阪, 2007年3月24日
 - 2) 野島淳也, 福田亨, 鹿又一洋, 依田哲也, 片桐岳信: BMPによる筋分化の抑制はSmad4の核移行によって制御される. 第25回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2007年7月21日
 - 3) 福田亨, 鹿又一洋, 野島淳也, 神蘭淳司, 河原啓, 織田弘美, 中山耕之介, 宮園浩平, 自見英治郎, 大湾一郎, 片桐岳信: 筋組織内で異所性骨化が起こる Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) の発症メカニズムの解析. 第25回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2007年7月21日
 - 4) 野島淳也, 福田亨, 鹿又一洋, 依田哲也, 片桐岳信: BMPによる筋分化の抑制はSmad4の核移行で制御される. 第14回BMP研究会, 大阪, 2007年7月22日
 - 5) 福田亨, 神田将和, 鹿又一洋, 野島淳也, 新垣晴美, 神蘭淳司, 野口康男, 岩切清文, 近藤健男, 黒瀬純一, 遠藤健一, 中島康晴, 千代延友裕, 河原啓, 西田佳弘, 織田弘美, 大竹明, 中山耕之介, 小森哲夫, 丸木雄一, 宮園浩平, 自見英治郎, 大湾一郎, 岡崎康司, 片桐岳信: Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) で見られるBMP受容体Alk2の変異とその機能解析. 第14回BMP研究会, 大阪, 2007年7月22日
 - 6) 福田亨, 神田将和, 鹿又一洋, 野島淳也, 中村厚, 織田弘美, 池淵研二, 大竹明, 小森哲夫, 中山耕之介, 難波聡, 丸木雄一, 供田洋, 宮園浩平, 自見英治郎, 大湾一郎, 岡崎康司, 片桐岳信: 筋組織で異所骨形成を伴う Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) の発症メカニズムの解析. 第5回RCGMフロンティアシンポジウム, 埼玉, 2007年7月27日
 - 7) 野島淳也, 福田亨, 鹿又一洋, 中村厚, 依田哲也, 片桐岳信: BMPによる筋芽細胞から骨芽細胞への

- 分化誘導における Smad 依存的シグナルの役割. 第5回RCGMフロンティアシンポジウム, 埼玉, 2007年7月27日
- 8) 水野洋介, 八木研, 須田立雄, 片桐岳信, 福田亨, 岡崎康司: 骨芽細胞分化に關与するマイクロRNAの同定. 第5回RCGMフロンティアシンポジウム, 2007年7月27日
- 9) 野島淳也, 依田哲也, 片桐岳信: BMPによる筋芽細胞から骨芽細胞への分化誘導における Smad 依存的シグナルの役割. 第49回齒科基礎医学会学術大会, 北海道, 2007年8月30日【ポスターワークショップ】
- 10) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, Nojima J, Kamizono J, Oda H, Nakayama K, Ohtake A, Miyazono K, Jimi E, Owan I, Okazaki Y and Katagiri T: A constitutively activated BMP receptor, ALK2, induces heterotopic bone formation in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). 29th ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) annual meeting September 15-19, 2006, Honolulu, Hawaii, USA【Travel grant】
- 11) Nojima J, Fukuda T, Kanomata K, Yoda T and Katagiri T: Smad1 and Smad4 differentially regulate osteoblast differentiation and myogenesis in myoblasts. 29th ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) annual meeting, Honolulu, Hawaii, USA【Travel grant】 September 15-19, 2006.
- 12) 大竹明, 片桐岳信, 池淵研二, 織田弘美, 岡崎康司: 埼玉医科大学進行性骨化性線維異形成症 (FOP) 診療・研究プロジェクトの現状. 第25回小児代謝骨疾患研究会, 東京, 2007年12月1日
- 13) 水野洋介, 八木研, 須田立雄, 片桐岳信, 福田亨, 岡崎康司: 骨芽細胞分化に關与するマイクロRNAの探索. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 神奈川, 2007年12月11日
- 14) 福田亨, 神田将和, 鹿又一洋, 野島淳也, 中村厚, 神菌淳司, 中島康晴, 池淵研二, 小森哲夫, 中山耕之介, 難波聡, 丸木雄一, 供田洋, 大竹明, 織田弘美, 宮園浩平, 自見英治郎, 大灣一郎, 岡崎康司, 片桐岳信: 筋組織で異所性骨化を伴う Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) の発症メカニズムの解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会・講演, 神奈川, 2007年12月13日
- 15) 野島淳也, 福田亨, 中村厚, 鹿又一洋, 依田哲也, 片桐岳信: BMPによる細胞分化の制御における Smad の役割. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会・講演, 神奈川, 2007年12月14日
- 16) 大竹明, 織田弘美, 池淵研二, 片桐岳信, 岡崎康司: 進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: FOP) の5症例. 第2回埼玉北西部骨代謝研究会, 埼玉, 2008年2月15日
- 17) 大竹明, 織田弘美, 池淵研二, 片桐岳信, 岡崎康司: 進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: FOP) の5症例. 第38回埼玉小児發育障害研究会, 埼玉, 2008年2月16日
- ・特許出願等
なし

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

脳腫瘍摘出における術中蛍光診断の応用

研究代表者 三島 一彦(埼玉医科大学 脳神経外科)

分担研究者 西川 亮*

【緒言】

神経膠芽腫を代表とする悪性脳腫瘍の治療成績は、近年の診断・治療法の進歩にもかかわらずあまり改善が得られていない。予後改善につながる因子の1つとして手術摘出率があげられるが、悪性神経膠腫は浸潤性に発育するため造影MRIで腫瘍境界がはっきりしていても実際には不明瞭なことが多く、腫瘍摘出に際しては術者の主観と経験にもとづき摘出範囲の決定がなされてきた。最近腫瘍の位置を術中に確認する方法としてナビゲーションシステム、エコー等が使用され、さらに腫瘍組織を選択的かつ確実に摘出する方法の1つとして5-aminolevulinic acid (5-ALA)を用いた術中腫瘍蛍光診断が注目されている¹⁾。5-ALAを開頭腫瘍摘出に先立ち患者に経口投与すると体内に吸収された5-ALAが悪性神経膠腫に取り込まれ腫瘍細胞内でヘムの代謝系酵素により、protoporphyrin IX(PpIX)に変換される。術野に波長405 nmの半導体レーザー光を照射し420 nm以下をカットするフィルターを通して観察すると、腫瘍部ではPpIXによる赤色蛍光を発するため肉眼的に正常脳との境界が同定でき腫瘍摘出に有用とされている。我々は埼玉医科大学病院倫理委員会承認のもと、2002年6月より5-ALAを用いた術中蛍光診断を悪性神経膠腫はもとより他の脳腫瘍摘出の際にも試み、各種腫瘍摘出術への有用性を検討してきた。そのなかで、良性の髄膜腫の64%(11/17)、pilocytic astrocytomaの100%(4/4)の症例でも蛍光陽性を示し、これらの腫瘍の摘出率向上にも本法は貢献する可能性を報告した¹⁾。また悪性脳腫瘍のうち、悪性リンパ腫(75%:3/4)や胚細胞腫瘍(80%:12/15)も高い頻度で5-ALAによる蛍光が陽性となることが明らかとなっていった²⁾。近年、脳室内、松果体部、視床下部や神経下垂体部など脳の深部に発生する腫瘍に対して、治療方針を決定する目的で、定位的腫瘍生検術や神経内視鏡的腫瘍生検術により組織診断を行うように

なってきた。しかし摘出された組織が適切でないため確定診断に至らないことも報告され、摘出標本的確な病理組織診断率は必ずしも満足いくものではない。前述のように脳深部に発生する脳腫瘍の多くは5-ALAによる蛍光診断で陽性率が高く、低侵襲手術による腫瘍生検に蛍光診断を応用できる可能性がある。本研究では低侵襲手術による腫瘍生検術の際の摘出部位の決定や、摘出した組織が腫瘍であるための信頼性の向上を目指し、5-ALAを用いた術中蛍光診断が有効であるかを検討した。また、MRIで造影される神経膠腫ではほとんどの場合、腫瘍部分は強い蛍光陽性像として観察されるが、その周囲の腫瘍浸潤部や浮腫部も蛍光陽性を呈し、切除範囲の決定に苦慮する場合がある。そこで腫瘍周囲浮腫部の蛍光陽性所見につき蛍光顕微鏡による組織像と比較検討も行った。

【材料と方法】

1) 神経内視鏡生検術への5-ALA蛍光診断の応用

神経内視鏡的腫瘍摘出に先立ち、5-ALA 1 gを飲料水に溶解し、麻酔導入2時間前に経口投与した。神経内視鏡により脳室内を観察後、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励起光をファイバーで誘導しworking channelより挿入した。脳室壁、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。635 nmの波長ピーク(T)と505 nmの自家蛍光ピーク(N)との比(T/N)を算出することで腫瘍による蛍光を定量化し、波長比(T/N)が1.1以上の部分を陽性とし検体を採取、病理組織診断に提出した。

2) 定位的腫瘍生検術への5-ALA蛍光診断の応用

定位的腫瘍生検術の際はあらかじめ、MRI、CTで生検標的部位を決定し、その部位より採取した組織にviolet-blue励起光を照射し、分光解析装置を用いて、PpIX特異的波長ピーク(635 nm)を検出し定量化した。

*埼玉医科大学 脳神経外科

蛍光波長解析により T/N 比が 1.1 以上の部分の組織を病理組織診断に提出した。

3) 5-ALA 蛍光定量化診断を用いた神経腫瘍摘出術

開頭腫瘍摘出はニューロナビゲーション下に施行した。術中 405 nm の violet-blue 励起光で腫瘍部を照射し、分光解析装置を用い 635 nm の PpIX 特異的波長を検出し波長比 (T/N) が 1.1 以上のピーク陽性部位より腫瘍組織を摘出、また腫瘍周辺部で同様にピークを呈した部分より組織を摘出した。それぞれの部分の凍結標本とホルマリン固定標本より切片を作成し、蛍光顕微鏡下で組織を観察するとともに HE 染色、MIB-1 染色を行い、病理組織像を比較検討した。

【結 果】

内視鏡的腫瘍生検術は 10 例に施行した (表 1)。術中の蛍光波長解析では 10 例中 8 例で波長比 (T/N) 1.1 以上の部分が存在した。PpIX 特異的波長ピークがみられた部分より摘出した組織では全例腫瘍細胞が認められ、病理診断の確定が可能であった。病理診断の内訳はジャーミノーマ 6 例、退形成性星細胞腫 1 例、神経膠芽腫 1 例であった。一方、波長ピークを認めなかったのは、最終病理組織診断が放射線壊死であった 1 例と、肉芽腫性変化が強く c-Kit 免疫組織染色で陽性細胞がわずかに認められ診断に至ったジャーミノーマ 1 例であった。ジャーミノーマの 2 例では、術前 MRI で腫瘍病変が指摘できない部位に内視鏡下で蛍光波長ピークを認め、画像診断では把握できない病巣の広がりを検出できた。代表症例を呈示する。症例 3: 16 歳男性：上方注視麻痺、脳圧亢進症状を主訴とし、MRI では松果体部腫瘍、水頭症を認めた。内視鏡所見では松果体部で PpIX 特異的波長ピーク (635 nm) を認めるとともに、術前の MRI では検出できない側脳室前角、漏斗陥凹部にも PpIX 特異的波長ピークが検出され波長

比 (T/N) は 1.1 以上であった。漏斗陥凹部は侵襲を考え摘出を施行しなかったが、松果体部、前角部の波長ピーク陽性部より生検した組織の病理診断はジャーミノーマであった (図 1)。

症例 5: 25 歳男性：尿崩症で発症し、MRI で視床下部に腫瘍を認めた。内視鏡による観察では、視床下部の膨隆がみられるのみであった。この膨隆部で PpIX 特異的波長ピーク (635 nm) が検出でき、波長比 (T/N) 1.1 以上の部分より組織生検を行い、病理診断はジャーミノーマと確定できた (図 2)。

定位的腫瘍生検は 10 例で施行した。このうち 9 例では標的部より生検した組織で PpIX 特異的波長ピーク (635 nm) が検出でき波長比 (T/N) 1.1 以上の部分が存在した。これらの摘出組織標本より病理診断がすべての症例で確定できた (表 2)。

膠芽腫に対する開頭腫瘍摘出術 (図 3) において PpIX 特異的波長ピークを認めた腫瘍本体では、多数の腫瘍細胞の細胞質が蛍光顕微鏡による観察で蛍光陽性であった (図 4-A)。一方、PpIX 特異的波長ピークを認めた腫瘍周囲部では、細胞成分がない間質部で蛍光が陽性であり (図 4-B 上)、この部分の凍結切片の HE 染色所見では、浮腫を伴ったグリオーシス像を示した (図 4-B 下)。同部位の病理組織像をホルマリン固定標本でも確認した。凍結切片の結果と同様、腫瘍周囲部には MIB-1 染色を行っても陽性細胞は存在せず、反応性のアストロサイトを認めるものの明らかな腫瘍細胞は検出できなかった。

【考 察】

従来、5-ALA を用いた術中蛍光診断での蛍光陽性の判断は、肉眼的所見に頼っており定量性を欠いていた。特に神経内視鏡下での蛍光陽性、陰性の判断はこれまでの肉眼的検出法では不可能であった。この

表 1. Summary of cases treated by fluorescence-guided endoscopic tumor biopsy

Case	Age/ Gender	MRI findings		Endoscopic findings		Histological diagnosis
		Location	Dissemination or multiple	Fluorescence	Dissemination or multiple	
1	54/M	Thalamus	-	+	-	Anaplastic pilocytic astrocytoma
2	16/F	Suprasellar	+	+	+	Germinoma
3	16/M	Pineal	-	+	+	Germinoma
4	26/M	Suprasellar and Pineal	-	+	-	Germinoma
5	25/M	Hypothalamus	-	+	-	Germinoma
6	23/M	Subcallosal	-	+	-	Germinoma
7	69/M	Hypothalamus	+	+	+	Glioblastoma
8	16/M	Paraventricle	-	-	-	Radiation necrosis
9	17/M	Pineal	-	-	-	Germinoma
10	16/M	Pineal	-	+	+	Germinoma

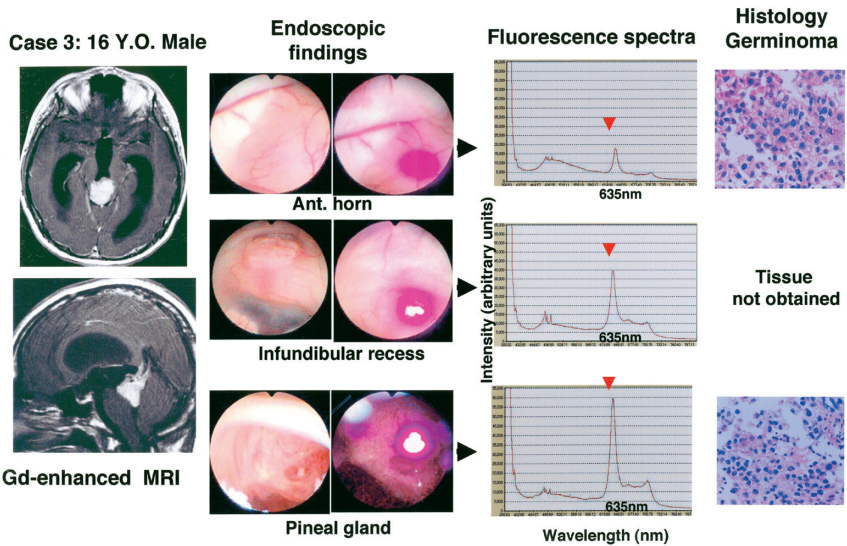


図 1. Endoscopic biopsy of pineal region tumor.

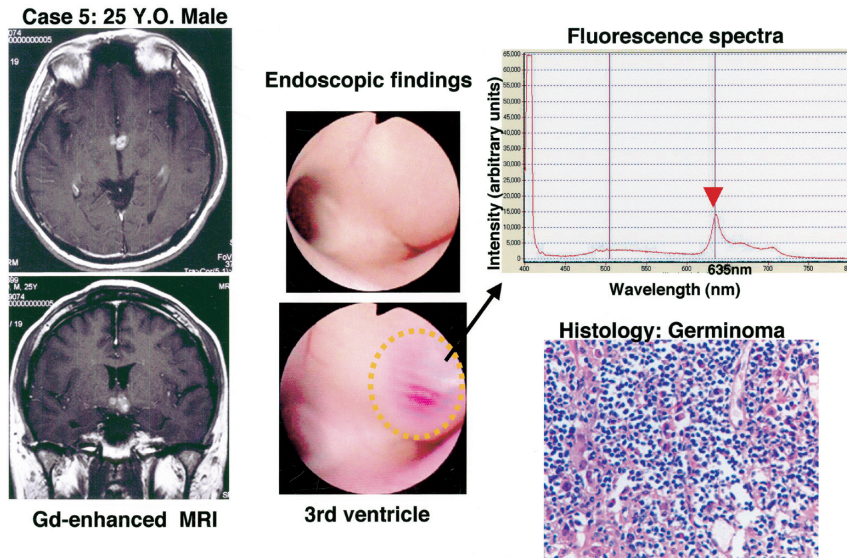


図 2. Endoscopic biopsy of hypothalamic region tumor.

表 2. Summary of cases treated by fluorescence-assisted stereotactic tumor biopsy

Case	Age/ Gender	Location	MRI Gd enhance	Biopsy sample Fluorescence	Histological diagnosis
1	15/M	Basal ganglia	+	+	Germinoma
2	15/F	Thalamus -midbrain	+	+	Glioblastoma
3	54/F	Lt. Frontal -Corpus callosum	+	+	Lymphoma
4	78/M	Basal ganglia	+	+	Glioblastoma
5	69/M	Hypothalamus	+	+	Glioblastoma
6	27/M	Thalamus	+	-	Anaplastic astrocytoma
7	85/M	Frontal lobe	+	+	Glioblastoma
8	76/F	Basal ganglia	+	+	Lymphoma
9	54/M	Corpus callosum	+	+	Lymphoma
10	64/F	Basal ganglia	+	+	Lymphoma

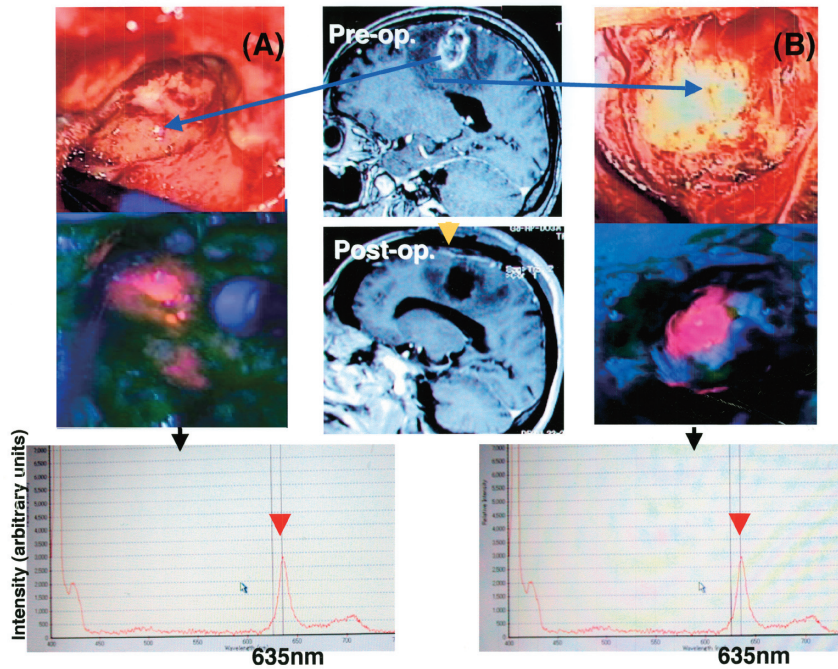


図 3.

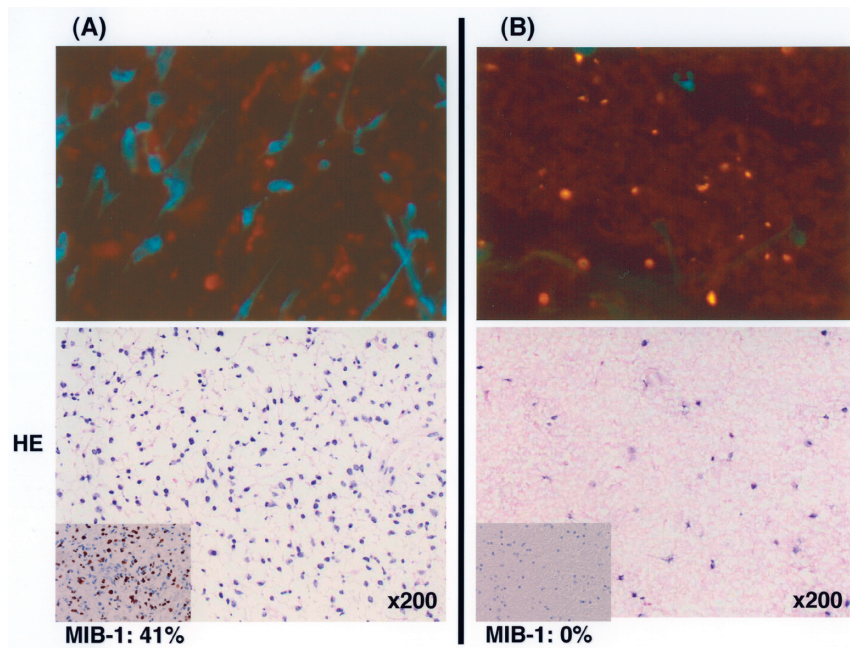


図 4.

欠点を補う方法として、腫瘍より発生した蛍光をファイバーにより分光器に誘導し、スペクトル解析装置を用いてPpIX 特異的 635 nm の波長ピークの定量化を試みた。このシステムを用いると肉眼的には腫瘍と判断が難しい部分においても蛍光ピークによる評価で腫瘍が存在するかを判定することが可能となり、内視鏡腫瘍摘出の際の摘出部位を決定するのに有効であった。また、この手法により蛍光ピーク陽性部より摘出した組織を用いて病理組織診断を確定することが可能で

あった。胚細胞腫瘍などでは内視鏡的に蛍光診断を応用することで、MRIなどの画像診断では検出できない微小な腫瘍の存在、腫瘍の広がりを検出できる可能性がある。また定位的腫瘍生検術の際も、635 nm 波長のピークを定量化することで、確実に腫瘍組織が摘出標本に含まれていることが確認でき、迅速診断のための追加切除操作に起因する脳内出血などの合併症を防ぐためにも有用な手法と考えられた。このように低侵襲で施行する腫瘍摘出術に5-ALAを用いた蛍光診断は

非常に有用であることが本研究により確認できた。

蛍光診断の問題点であるが、浮腫の強い神経膠腫などでは、腫瘍周囲の浮腫部でも蛍光陽性となることがあり、この部分の組織を解析すると腫瘍細胞ではなく浮腫部組織の間質が蛍光陽性を示していた。また間質の蛍光陽性は、分光解析を行っても腫瘍細胞による陽性との鑑別は困難であった³⁾。浮腫間質部ではどのような機序で蛍光物質が産生されるか、また腫瘍組織より蛍光物質が浸透移行する可能性があるかなど今後検討しなければいけない課題である。腫瘍周囲浮腫部の摘出にあたっては蛍光陽性部位であっても腫瘍細胞の有無を蛍光顕微鏡下にリアルタイムに観察し、摘出範囲を決定することが必要であると考えられた。

【研究成果リスト, 文献】

- 1) 三島一彦, 松谷雅生, 西川亮: 5aminolevulinic

acid(5-ALA)を用いた脳腫瘍の術中蛍光診断 脳神経外科速報2006;16:989-96.

- 2) Mishima K, Tachikawa T, Adachi J, Ishihara S, Nishikawa R, Matsutani M: Fluorescence detection of CNS germ cell tumors with 5-aminolevulinic acid. *Neurooncology* 2005;7:530.
- 3) 三島一彦, 石沢圭介, 上宮奈穂子, 鈴木智成, 廣瀬隆則, 西川亮: 腫瘍周囲浮腫部の蛍光陽性像についての検討 第4回日本脳神経外科光線力学研究会, 2008.3月(学会発表)

【謝 辞】

本研究は平成18年度埼玉医科大学 学内グラントにより行われた。病理診断をいただきました, 埼玉医科大学病理学教室: 石澤圭介先生, 廣瀬隆則先生に感謝いたします。

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

原因不明の脳炎・髄膜炎でのパレコウイルス検出と その臨床症状の解析

研究代表者 野村 恭一(埼玉医科大学 神経内科)

研究分担者 佐々木 望¹⁾, 富岳 亮²⁾, 名和 優³⁾, 高濱 美里²⁾,
町田 早苗⁴⁾, 清水 博之⁵⁾

緒 言

ヒトパレコウイルス(Human Parechovirus; HPeV)は、ヒトの脳炎・髄膜炎などの中枢神経感染性疾患の原因となる関連性が示唆されているが、その臨床症状は多彩で十分には解明されていない。

HPeV1型と2型は、かつてはEnterovirus属(エコーウイルス22型および23型)に分類されていたが、Stanwayらによりピコルナウイルス科の中の独立した属であるParechovirus属に再分類された¹⁾。HPeVは現在、1型～6型まで同定されている。最近の報告では、我が国でHPeV1型、3型、4型、6型が分離され²⁾、HPeV2型はかつては分離されていたが、1986年以降分離報告はない^{2,3)}。従来、HPeVは急性胃腸炎や呼吸器症状患者から比較的多く分離されているが、脳炎や髄膜炎患者からの分離も報告されている。HPeV6型は、我が国のReye症候群の小児患者の髄液から分離され、新規血清型の報告となった。我が国における各HPeV血清型の伝播状況および特定疾患と関連性については明らかにされておらず、臨床および基礎的な解析が必要となる。そこで第1に、感染源などを解析する上で血清疫学解析、脳炎や髄膜炎の髄液サンプルの収集を行い、HPeVの検出を行った。血清疫学解析では、中和抗体法で年齢別健康人血清を用いてHPeV1～3型の抗体保有状況を解析した。ELISA法を確立した段階でELISA法と中和抗体法での抗体検出率を解析する予定である。

材料と方法

1. HPeV1～3型中和抗体法

1歳から59歳までの健康人血清計235検体を

1) 埼玉医科大学 小児科, 2) 埼玉医科大学 神経内科
3) 埼玉医科大学 微生物, 4) 埼玉医科大学 医学研究センター
5) 埼玉医科大学 国立感染症研究所 ウイルス2部

用いた。被験血清検体を1:8から1:2048まで2倍階段希釈し、Vero細胞で発現するCPE抑制を指標とした血清中和抗体法で抗体価を測定した。血清抗体価8倍以上を陽性とした。中和抗体法に使用したウイルス株は、HPeV1型はHarris strain, HPeV2型はWilliamson strain, HPeV3型はA308/99 strainを用いた。

2. HPeV ELISA法の確立

HPeV1型:Harris strain, HPeV2型:Williamson strain, HPeV3型:A308/99 strain HPeV4型:サ2005-123FC strain, HPeV5型:tc HLF 07-18-95 strain (CDC), HPeV6型:NII561-2000 strainを用い、RT-PCR法にてELISA抗原となる各血清型のVP-1領域を増幅した。塩基配列を確認後、各VP-1遺伝子をpET-15b vectorに挿入した。Ni-NTA Fast kit (QIAGEN)を用いて発現蛋白を簡易精製した。発現蛋白の確認は、Western Blot(WB)法にて抗Hisモノクローナル抗体を用いて行った。

3. 髄液からのHPeV遺伝子の検出

髄液から、High Pure viral RNA kit (Roche)を用いてRNAを抽出した。RNAは、PrimeScript[®]1st strand cDNA Synthesis(TAKARA)のrandom 6mer primerを用いてcDNAを合成した。HPeV 5'UTR領域に設定したprimer pairにてPCRを施行し、約140 bpバンド検出した場合に陽性とした。陽性の場合には、更にVP-1領域のPCRを行い、塩基配列を確認した。

結 果

1. HPeV 血清診断

1) HPeV1～3型の血清疫学

年齢別健康人血清を用いて中和抗体法にてHPeV1～3型の抗体保有状況を解析した。HPeV1型の抗体保有率

を見ると3歳以下では54.5%, 4歳～5歳では78.8%, 6歳から10歳未満では94.5%, 20歳以上では95%以上であった(図1)。

HPeV2型は, 全体的に抗体保有率(平均21%)が低く, 特に5歳以下と16歳から50歳未満で平均10%と低かった。しかし, 6歳から15歳までの抗体保有率は36.5%であった(図2)。

HPeV3型抗体保有率は平均72%であり, 年代別に見ると3歳以下では45.5%, 4歳～5歳では78.8%となった。6歳から10歳未満では88.9%, 10歳から20歳未満では70.0%, 20歳から30歳未満では87.5%, 30歳～40歳未満では77.5%, 40歳～50歳未満55.0%そして50歳～60歳未満75.7%であった(図3)。

HPeV1型とHPeV3型の抗体保有を3歳以下の子供でみると両型の陰性者より片方のみの陰性が多かった(表1)。

2) 血清解析のためのELISA法の確立

HPeV1～3型は, 各VP-1遺伝子をpET-15b vectorに挿入し, その発現を確認した。HPeV1～3型の発現蛋白30.5 kDaをWB法で確認した。現在, HPeV4～6型標準株から, RT-PCRでVP-1遺伝子を増幅, その塩基配列を確認し, pET-15b vectorに導入し, 発現蛋白の解析中である。

2. 髄液からのウイルス遺伝子の検出およびウイルス分離

平成19年度は, 成人の脳炎や髄膜炎の患者が少なく, 小児脳炎2患者の髄液を用いてHPeVの遺伝子検出を行ったが, HPeVは検出されなかった。Vero細胞に髄液を接種し, その細胞上清液と細胞からのHPeVの遺伝子検出を行ったが, HPeVはいずれも陰性であった。

考 察

HPeV1～3型の血清解析から, HPeV1型は6歳以上における抗体保有率が90%以上で広く国内に蔓延していることが推測された。HPeV2型は全体的に抗体保有率(平均21%)が低く, 特に5歳以下と16歳から50歳未満で低かった。学童期に一旦保有率が高くなり, その後低くなるパターンとなり, 流行期・非流行期の存在が示唆された。病原体微生物検出情報によると, 1986年以来HPeV2型の分離報告はないが, HPeV2型の不顕性伝播の可能性が明らかになった。今後, ウイルス遺伝子検出等を用いた病原体検出によるHPeV-2伝播の確認が必要とされる。HPeV3型に対する抗体保有率は平均72%とHPeV1型より低く, 各年齢群で抗体保有率の多少のバラツキが認められた。HPeV1型とHPeV3型共に乳幼児期に不顕性感染することが示唆された。5歳以下のHPeV1～3型の抗体保有状況を見ると両方の血清型のHPeVに対する抗体を保有している児は4/20例と感染様態の違いが示唆された(表1)。今後, HPeV4～6型についても同様の血清疫学解析を行

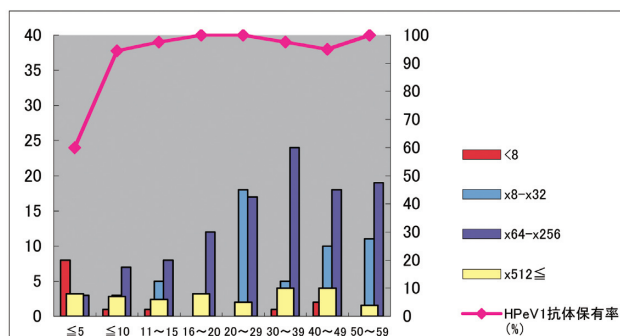


図1. HPeV1型の抗体保有率(%)と抗体価の分布。

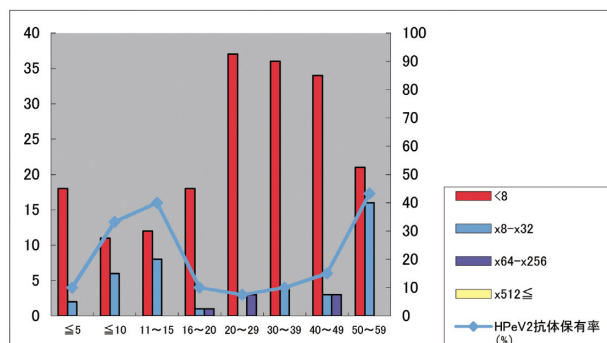


図2. HPeV2型の抗体保有率(%)と抗体価の分布。

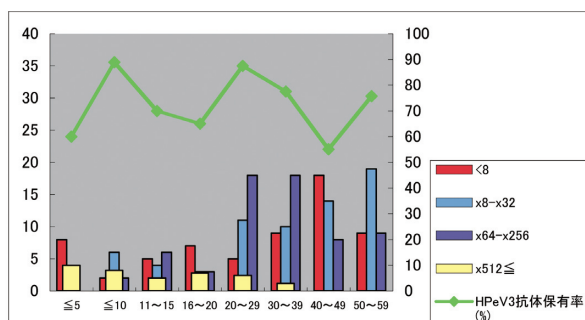


図3. HPeV3型の抗体保有率(%)と抗体価の分布。

表1. HPeV1,2,3型抗体保有状況

	年齢	HPeV1型	HPeV2型	HPeV3型
1	1歳	512	<8	8
2	1歳	512	8	<8
3	1歳	8	<8	<8
4	1歳	<8	<8	2048
5	2歳	2048	<8	2048
6	2歳	512	<8	<8
7	2歳	2048	<8	<8
8	2歳	<8	<8	<8
9	3歳	<8	<8	1024
10	3歳	<8	<8	2048
11	3歳	<8	<8	<8
12	4歳	<8	<8	<8
13	4歳	64	<8	1024
14	4歳	2048	8	512
15	4歳	1024	<8	8
16	4歳	<8	<8	1024
17	5歳	256	<8	1024
18	5歳	128	<8	<8
19	5歳	1024	<8	512
20	5歳	<8	<8	1024

うことにより、各血清型 HPeV の伝播状況についての解析を行う。ELISA での IgG 抗体検出法も確立できるので ELISA 法と今回検出した抗体価と比較検討する予定である。

脳炎・髄膜炎は、季節性や年によって発生にばらつきが認められる。その原因としてウイルス感染が考えられ、小児の解析ではエンテロウイルスの関与が示唆されている⁴⁾。かつてはエンテロウイルスに分類されていた HPeV を原因と考え、その解析をする意義は大きい。今回解析した 2 例では HPeV を検出できなかったが、継続してサンプルを収集しているのでその解析を進めていく。

引用論文

1. Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, Ghazi F, Khan M, Smyth M, et al. molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a

new picornavirus group. J Virol 1994;68:8232-8.

2. Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M.

Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples.

Emerging Infectious Diseases 2007;13:889-95.

3. 国立感染症研究所 病原微生物検出情報

4. 松永健司, 小児ウイルス性髄膜炎-エンテロウイルス性髄膜炎とムンプス髄膜炎との比較検討-小児感染免疫 2007;19:157-62.

研究成果リスト

学会発表

町田早苗, 西村順裕, 名和優, 伊藤雅, 清水博之. Human Parechovirus (HPeV) 抗体保有状況の解析, 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 平成 19 年 10 月 21 日～23 日, 札幌

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

大学病院における若手看護師対象の
看護実践能力育成のための現任教育プログラムの開発

研究代表者 渡辺 孝子(埼玉医科大学 保健医療学部 看護学科)

分担者 斉藤 啓子¹⁾, 及川 泰¹⁾, 藤村 朗子²⁾

I 緒言

2003年の第4次医療法改正以来病院の機能分化が進んでおり¹⁾, 医療制度改革²⁾の動きと相まって, 特に急性期医療を担っている医療職者に多くの課題が課せられている。

例をあげれば, 入院期間の短縮, 重症患者の増加と業務の煩雑化に伴うリスクマネジメントの強化, 患者の人権擁護への一層の取り組みなどであり, 特に高度先端医療を担っている大学病院の看護師には多忙を極める現場であっても, 安全性の高い熟練した看護実践能力がこれまでに増して求められるようになってきた³⁾。

このような現状の中で, 例年数多く採用される新人看護師の看護実践能力についての問題が深刻に考えられるようになった。卒直後の看護師の看護実践能力については, 基礎教育期間が3年ないし4年と限られていること, 免許取得前の技術教育には制限が多いことから, 卒業時点で習得する看護実践能力と医療現場が求めている看護実践能力の乖離が大きいことなどが以前より指摘されていたが, さらに最近では, 新人看護師が自分の看護の未熟さに衝撃を受け, 医療事故の予期的不安などから早期に退職することが問題となっている。2004年の日本看護協会の調査では, 採用後1年未満で退職する看護師が9.3%にもなり, その後も改善の兆しはない⁴⁾。また, 日本看護協会が設置主体別で看護師の離職率を調査した結果, 2004年, 2005年ともに学校法人立(大学病院)の離職率が高いことが報告されている⁵⁾。これら近年の情報から, 大学病院の看護現場は極めて厳しい状況であり, この状況を改善するには新人看護師が着実に看護実践能力を身につけ, 一人前の看護師⁶⁾として職場に定着していくことが何よりも重要である。そのためには, 大学病院で

展開されている医療に対応できる看護実践能力を育成する現任教育プログラムの開発が必要である。しかし, 現時点では, そのための基礎的調査も分析も十分に行われていない。本研究の最終目標は新人看護師が自立的に仕事が行えるまでを支援する独自性の高い現任教育プログラムを開発することであるが, 第一段階として看護実践能力を測定するツールの開発を目的とする。第二段階では, 開発したツールを用いて新人看護師の看護実践能力の実態を経時的に調査し分析することから最終目標である, 現任教育プログラム作成のための示唆を得ることを目的とする。

II 研究方法

1 看護実践能力を測定するツールの開発

1) 研究期間: 平成19年2月~平成19年3月

2) 対象: 平成17年4月にA大学病院が採用した看護師185名
平成18年4月にA大学病院が採用した看護師20名

3) 方法

(1) 基礎資料の収集と検討

A大学病院看護部では平成16年度に教育委員メンバーが中心となり, 既存の看護基準, 看護手順, 各部署で作成されている覚え書きなどを集め, 各部署に共通する認知レベルから行動レベルまでを含む看護を629項目抽出した。抽出された629項目はA大学病院の看護師が内容を理解し, 自立して行動できなければならない看護実践能力を示すものであると考えられた。A大学病院ではこの629項目を看護実践能力を測定するツールとして, 平成17年4月採用の看護師を対象に1年間に5回, 4段階(未経験, できない, 助言があればできる, ひとりではできる)で評価を行った。研究者らは新人看護師が評価した実態を評価表から分析した結果, 次のような問題点を明らかにした。

1) 埼玉医科大学病院, 2) 埼玉医科大学 保健医療学部 看護学科

①評価項目 629 項目は、項目数が多すぎ、評価者にかなりの負担を強いていると思われた。そのため、5回の評価時期を設定したにもかかわらず、5回をすべて評価した新人看護師は2割程度であり、自己の看護実践能力を高めるために活用しようとの考えよりも、義務的に評価している様子が記載内容からうかがえた。

②看護実践能力を測定するツールとして、内容の重複、重要項目の欠落などがあり、項目数の絞込みと内容妥当性の検討が必要であることが明らかになった。

③評価基準として用いられている4段階評価（未経験、できない、助言があればできる、ひとりで行える）が得点で置き換えられていることの妥当性について検討する必要があると考えられた。

④評価は新人看護師、プリセプター、看護師長の3者で同一の評価基準で行っているが、3者が同一の評価で行うべきなのか、それが現場教育にどのように活用されるのかが明らかにされておらず、評価者と評価基準を新人看護師の看護実践能力を高めるという視点で検討する必要があると考えられた。

(2) 625 評価項目及び評価基準の内容妥当性の検討

A 文献レビューと内容妥当性の検討

研究者らはA大学病院の看護部に類似点が多いと考えられたB大学看護学部が卒業生に調査した若手看護師の看護実践能力を問う質問項目を検討した文献⁷⁾、C大学病院の看護部が作成した看護技術項目についての文献⁸⁾及び平成16年度に厚生労働省が公表した「新人看護師の臨床実践能力向上に関する検討会」報告書⁹⁾をレビューし、625 評価項目の過不足と評価内容の妥当性について検討した。同時に評価基準についても検討し、A大学病院の看護師の看護実践能力測定のための評価項目、評価基準の試案を作成した。

B 新人看護師を部下に持つ看護師長と研究者らの検討

研究方法Aで作成した評価項目、評価基準の内容妥当性について、新人看護師を部下に持つ看護師長と研究者らで一致をみるまで検討を繰り返した。

C 看護実践能力の構成要素の抽出

研究方法Bで一致をみた評価項目の内容分析を行い、看護実践能力の構成要素を抽出した。

D プリテストと修正

研究方法(1)(2)を経て作成された看護実践能力測定ツールを、平成18年4月採用の看護師20名を対象にプリテストを行い、さらなる修正を加えた。

2 新人看護師の看護実践能力実態調査

1) 研究期間：平成19年4月～平成19年10月

2) 対象：平成19年4月A大学病院採用の看護師203名

3) 方法：研究方法1で開発した看護実践能力評価ツールを用いて、4月、6月、10月に調査を行った。

4) 分析：SPSSを用いて、記述的統計で算出した全対象者の平均得点を分析した。

III 倫理的配慮

本研究の趣旨、プライバシーは保護されること、研究結果は若手看護師の看護実践能力育成のための資料となること、研究への参加は個人の自由意志であることを説明し協力を得た。

IV 研究結果

1 新人看護師の看護実践能力を測定するツールの開発

1) 総数 629 評価項目個々の内容妥当性の検討を重ねて精練された評価項目数は143 項目となった(表1-1～表1-3)。

2) 143 評価項目の内容分析の結果、「看護師として必要な基本的姿勢・態度(20 項目)」「基本的看護技術(102 項目)」「看護実践に伴う判断力・行動力・調整力(21 項目)」の看護実践能力の構成要素が抽出された(表1-1～表1-3)。

3) 項目数の多い「基本的看護技術(102 項目)」の項目を類似項目別に分類し、①環境調整技術、②食事援助技術、③排泄援助技術、④活動援助技術、⑤清潔・衣生活援助技術、⑥創傷管理技術、⑦症状・生体機能管理技術、⑧呼吸循環を整える技術、⑨救命救急の技術、⑩死後の処置、⑪与薬の技術、⑫苦痛緩和の技術、⑬感染防止の技術、⑭安全確保の技術の14 技術内容に分けた(表1-2)。

4) 評価基準は「できない：得点1」「少しできる(援助があればできる)：得点2」「だいたいできる(少しの援助があればできる)：得点3」「できる：得点4」とし、4段階のリッカートスケールとした。

以上より3構成要素143 評価項目からなるリッカートスケールの看護実践能力測定ツールができあがった。

2 新人看護師の看護実践能力の実態

1) 評価項目別の平均得点

143 評価項目別に全対象の平均得点を算出した結果を、表1-1～表1-3に示した。

2) 看護実践能力のレベル

得点幅1～4の看護実践能力を構成要素別にレベルⅠ～レベルⅢに置き換え、その結果を表2-1に示した。さらに評価項目数の多い構成要素である看護技術については14 技術内容別にその結果を表2-2に示した。

なお、レベルⅠは得点1～1.9までとし、評価基準において「できない」～「少しできる」の途上にあるレベルとした。

レベルⅡは得点2～2.9までとし、評価基準において「少しできる」～「大体できる」の途上にあるレベルとした。

レベルⅢは得点3～4までとし、評価基準において「大体できる」から「できる」の途上にあるレベルとした。

3) 構成要素別看護実践能力の経時的変化

(1) 看護師として必要な基本的姿勢・態度

4月採用時点において、レベルⅠは20項目中1項目(5%)、レベルⅡは18項目(90%)、レベルⅢは1項目(5%)であった(表2-1)。

6月の調査では、レベルⅠの評価項目はなく、レベルⅡが20項目中15項目(75%)、レベルⅢは5項目(25%)であった。

10月の調査結果はレベルⅠが0、レベルⅡが20項目中5項目(25%)、レベルⅢが15項目(75%)であった。10月の時点でレベルⅡにとどまっている評価項目の大部分は自己の仕事への取り組みや学習姿勢の項目であった。

(2) 基本的看護技術

4月の採用時点において、レベルⅠは102項目中61項目(60%)、レベルⅡは40項目(39%)、レベルⅢは1項目(1%)であった。

6月の調査では、レベルⅠは102項目中29項目(28%)、レベルⅡは62項目(61%)、レベルⅢは11項目(11%)であった。

10月の調査では、レベルⅠが102項目中10項目(10%)、レベルⅡが54項目(53%)、レベルⅢが38項目(37%)であった。

さらに技術内容別にみると、4月採用時点においてレベルⅠの項目数を50%以上占める技術内容は「食事の援助」「排泄援助」「創傷管理技術」「症状・生体機能管理技術」「救命救急の技術」「安全確保の技術」「呼吸循環を整える技術」「死後の処置」「与薬の技術」の14技術内容中9技術内容であった。

6月の調査では、レベルⅠの項目数を50%以上占める技術内容は「救命救急の技術」「呼吸循環を整える技術」「死後の処置」の3技術内容であった。レベルⅢの項目数を50%以上占める技術内容は「環境調整技術」「清潔・衣生活援助技術」の2技術内容であり、その他多くはレベルⅡにとどまっていた。

10月の調査では、レベルⅠの項目数を50%以上占める技術内容はなく、レベルⅢの項目数を50%以上占める技術内容は6月調査の2技術内容に加えて「症状・生体機能管理技術」「感染防止の技術」「安全確保の技術」の5技術内容であり、その他の技術内容はレベルⅡにとどまっていた。

(3) 看護実践に伴う判断力・行動力・調整力

4月採用時点において、レベルⅠは21項目中5項目(24%)、レベルⅡは16項目(76%)、レベルⅢは0項目(表2-1)であった。なお、レベルⅠの評価項目は「施設における医療管理安全体制について理解している」「災害発生時の初期行動がとれる」「消火器の定位置と避難ルートの把握」「事故発生時の対処」「日常使用する医療器具の取り扱い」の5項目(24%)であった。

6月の調査では、レベルⅠの評価項目2項目(9%)、レベルⅡが18項目(86%)、レベルⅢは1項目(5%)であった。

10月の調査結果はレベルⅠが0項目、レベルⅡが16項目(52%)、レベルⅢが5項目(48%)であった。レベルⅡにとどまっている評価項目の多くは看護過程展開の知識とチーム医療に必要とされる判断力・調整力であった。

IV 考 察

卒直後の看護師の看護実践能力を4月、6月、10月の3回にわたり調査した結果から、現任教育プログラム作成に必要な要件を構成要素別に考察してみた。

1) 看護師として必要な基本的姿勢・態度

看護は健康の増進、疾病の予防及び回復、苦痛の軽減(安らかな死への援助)を目的として行われる活動であるが、それは同時に、対象者の尊厳と基本的人権をいかなる状況下でも保証しようとする活動でもある。対象者の基本的人権を保障する看護実践には、「看護師の基本的姿勢・態度」はきわめて重要でありすべての実践能力の基盤を形成するものと考えることができる。「看護師の基本的姿勢・態度」の評価項目である20項目の90%が卒業時点でレベルⅡまでに到達していたことは看護基礎教育においてこのことが看護の基本として価値づけられ、力点を置いて取り組んでいると推察できる。さらに、6ヵ月後の10月にはその75%がレベルⅢに向上していることから、病院という環境の中での看護経験が「基本的姿勢・態度」を育てていると考えることができる。看護実践能力の構成一要素である「看護師として必要な基本的姿勢・態度」は現任教育における集合教育としての必要性はなく、むしろ、平均レベルに達していない数少ない看護師に対する個別指導が適切であると考えられた。

2) 基本的看護技術

基本的看護技術の評価項目は102項目と他の構成要素に比べてきわめて多く、評価項目全体の70%以上を占めている。その評価を実践能力レベル別にみると技術内容によって差が大きいこと、評価の平均レベルが極めて低いこと、4月から10月と経験を積むごとにレベルの向上が認められるものの、6ヵ月を経過した時点でもレベルⅢに達していないものが60%以上あり、レベルⅠにとどまっている項目も10%存在しているなどきわめて低い水準にあると考えられた。新人看護師のストレスや不安による弊害⁴⁾が報じられているが、その原因の多くが看護技術の未熟さにあることがこの数値が示していると言ってよいであろう。

技術内容別に実践能力レベルをみると、「環境調整の技術」「清潔・衣生活援助技術」「症状・生体機能管理技術」「苦痛緩和の技術」「感染防止の技術」の5技術内容は患者への身体侵襲を伴わないという共通

表 1-1. 看護師として必要な基本姿勢・態度20評価項目と平均得点

NO	評価項目	平均得点 (ranre1~4)		
		4月 n=203	6月 n=172	10月 n=169
1	社会人として適切に対応できる	2.6	2.8	3.2
2	公私を区別した行動が取れる	2.7	3.0	3.3
3	病院の理念・目標を理解し、行動する習慣がついている	2.0	2.5	2.8
4	コスト意識を持って業務を行う習慣がついている	1.9	2.5	3.0
5	看護業務を責任感を持って実践する習慣がついている	2.3	2.7	3.1
6	看護は患者中心のサービスであることを認識し、行動できる	2.6	2.9	3.3
7	看護専門職として自己が患者に与える影響を自覚し、行動できる	2.4	2.7	3.1
8	患者と家族の話を傾聴できる	2.9	3.1	3.4
9	患者・家族を尊重し受容的・共感的態度で接することができる	2.8	3.1	3.4
10	守秘義務を厳守し、患者・家族のプライバシーに配慮できる	3.0	3.2	3.5
11	患者・家族に十分な説明を行い、承諾を得てケアを行う習慣がついている	2.3	2.7	3.1
12	患者の自己決定を尊重することができる	2.6	2.9	3.4
13	患者の擁護(代弁)者として行動できる	2.1	2.5	2.9
14	心身のストレスをセルフコントロールできる	2.5	2.7	3.0
15	自己の生活管理ができる	2.8	3.0	3.3
16	問題を感じた時、適切な人に相談できる	2.7	2.9	3.3
17	自分でできること、できないこと、わからないことを明確に意識できる	2.5	2.8	3.1
18	自己の課題に主体的に取り組むことができる(自己学習・他者に相談)	2.4	2.6	2.9
19	看護を実践するために必要な学習を自主的に行うことができる	2.4	2.6	2.8
20	看護の仕事に面白さを発見できる	2.4	2.5	2.8

表 1-2. 基本的看護技術102評価項目と平均得点

技術内容	NO	評価項目	平均得点 (ranre1~4)			技術内容	NO	評価項目	平均得点 (ranre1~4)		
			4月 n=206	6月 n=172	10月 n=169				4月 n=203	6月 n=172	10月 n=169
環境調整技術 (2項目)	21	病室環境の調整	2.7	3.0	3.4		72	人工呼吸器(呼吸異常の発見)	1.7	1.9	2.1
	22	ベッドメイキング	2.8	3.2	3.5		73	人工呼吸器(異常の判断・対応)	1.4	1.6	1.9
食事援助技術 (4項目)	23	食生活支援	1.7	1.8	2.2		74	人工呼吸器(管理)	1.4	1.5	1.8
	24	食事介助	2.4	2.5	2.9		75	意識レベルの確認	2.2	2.5	2.9
	25	胃管・腸管	1.7	2.1	2.7	救命救急の 技術 (13項目)	76	心音聴取	2.1	2.5	2.8
	26	経管栄養	1.7	2.1	2.7		77	急変時の脈拍測定	1.9	2.0	2.3
排泄援助技術 (7項目)	27	排尿困難	2.0	2.1	2.5		78	AEDの取り扱い	1.4	1.5	1.8
	28	排便困難	1.6	2.1	2.5		79	呼吸の判断	2.0	2.3	2.5
	29	浣腸	1.9	2.3	2.9		80	呼吸音の聴取	2.3	2.7	3.1
	30	摘便	1.6	1.8	2.4		81	気道確保の体位	2.0	1.9	2.2
	31	導尿	1.8	1.9	2.5		82	エアウェイの挿入	1.4	1.2	1.4
	32	膀胱内カテーテル挿入	1.5	1.7	2.4		83	アンビューバックを用いた用手的換気	1.5	1.5	1.8
	33	膀胱内カテーテル管理	2.0	2.4	3.0		84	閉鎖式心臓マッサージ	1.6	1.5	1.7
活動援助技術 (7項目)	34	歩行・移動・移送	2.5	2.9	3.4		85	気管内挿管の介助	1.4	1.5	1.8
	35	体位変換	2.4	2.8	3.3	その他 (1項目)	86	止血	1.5	1.7	2.0
	36	良肢位の保持	2.3	2.6	3.1		87	チームメンバーの応援要請	1.3	1.5	1.7
	37	関節可動域廃用症候群	2.5	2.6	2.9	与薬の技術 (20項目)	88	死後の処置	1.8	1.8	2.1
	38	可動域運動の実施	1.7	1.7	2.0		89	経口薬	2.1	2.4	2.9
	39	入眠・睡眠	2.2	2.3	2.7		90	外用薬	2.0	2.5	2.9
	40	不穏・鎮静中の援助	1.8	2.0	2.4		91	座薬	1.8	2.3	2.9
清潔・衣生活援助技術 (6項目)	41	全身清拭	2.9	3.2	3.5		92	皮内注射	1.5	1.7	1.9
	42	洗髪	2.8	3.1	3.4		93	皮下注射	1.7	2.2	2.7
	43	口腔内ケア	2.6	2.9	3.2		94	筋肉内注射	1.7	2.0	2.6
	44	入浴介助	2.4	2.5	2.9		95	静脈注射	1.6	2.2	2.6
	45	失禁ケア	2.3	2.6	3.1		96	中心静脈内注射の介助	1.4	1.7	2.3
	46	衣生活・整容	2.8	3.1	3.5		97	中心静脈注射の薬剤投与	1.5	2.0	2.5
創傷管理技術 (4項目)	47	創傷処置	1.7	2.1	2.5		98	中心静脈内注射の感染予防・ライン管理	1.6	2.1	2.5
	48	褥瘡予防の必要性・実施	2.3	2.7	3.0		99	輸液ポンプの取り扱い	1.6	2.7	3.4
	49	褥瘡予防治療計画に基づいたケア	1.5	2.1	2.6		100	輸液ポンプの安全管理	1.7	2.6	3.3
	50	包帯法	1.5	1.8	2.2		101	輸血時の管理	1.4	1.8	2.4
症状・生体機能管理技術 (12項目)	51	バイタルサイン測定	3.1	3.3	3.6		102	輸血後の副作用	1.5	1.6	2.0
	52	身体測定	2.6	3.0	3.4		103	抗菌薬の投与	1.5	2.2	2.8
	53	静脈血採血	1.9	2.5	3.1		104	インシュリンの投与	1.6	2.4	2.9
	54	静脈血(検体)の取り扱い	1.7	2.4	3.1		105	麻薬の取り扱い管理	1.5	2.0	2.5
	55	動脈血採取の介助	1.5	2.0	2.9		106	経口・経直腸・貼付用麻薬の投与	1.6	1.9	2.4
	56	動脈血(検体)の取り扱い	1.5	2.0	2.8		107	注射用麻薬投与管理	1.5	1.7	2.1
	57	採尿・尿検査	1.8	2.3	3.0		108	管理薬剤の管理	1.6	2.0	2.5
	58	血糖値	2.4	3.2	3.5	苦痛の緩和 の技術 (4項目)	109	安全な体位の保持	2.5	2.8	3.2
	59	12誘導心電図	1.7	2.2	2.7		110	電法等の安楽促進ケア	2.5	2.8	3.2
	60	心電図モニターの装着	1.7	2.4	3.0		111	リラクゼーション	2.0	2.2	2.6
	61	心電図の異常の判断	1.5	1.8	2.2		112	精神安寧のためのケア	2.8	2.9	3.3
呼吸循環を整える技術 (12項目)	62	パルスオキシメーターの測定	2.8	3.5	3.7	感染防止の 技術 (6項目)	113	スタンダードプリコーション	2.3	2.9	3.3
	63	酸素吸入	1.9	2.6	3.2		114	防護用具の選択	2.0	2.7	3.2
	64	口腔内・鼻腔内吸引	1.9	2.6	3.1		115	無菌操作の実施	2.0	2.5	3.0
	65	気管内吸引	1.7	2.2	2.9		116	医療廃棄物の取り扱い	2.2	3.0	3.4
	66	ネブライザー	2.0	2.7	3.1	安全確保の 技術 (4項目)	117	針刺し防止	2.1	2.9	3.3
	67	体温調整	2.3	2.9	3.3		118	洗浄・消毒方法	1.8	2.5	3.0
	68	体位ドレナージの必要性	1.7	2.5	2.8		119	薬剤の複数確認	2.3	3.3	3.7
	69	体位ドレナージの実施	1.7	1.8	2.1		120	転倒転落防止	2.0	2.7	3.1
	70	人工呼吸器(回路の組み立て)	1.2	1.4	1.8		121	薬剤曝露防止	1.5	1.7	2.0
	71	人工呼吸器(設定確認)	1.3	1.6	2.0		122	放射線曝露防止	1.9	2.4	2.9

表 1-3. 看護実践に伴う判断力・行動力・調整力21評価項目と平均得点

NO	評価項目	平均得点 (ranre1~4)		
		4月 n=203	6月 n=172	10月 n=169
123	看護実践に必要な患者の身体的側面をアセスメントできる	2.3	2.4	2.8
124	看護実践に必要な患者の心理・社会的側面をアセスメントできる	2.3	2.4	2.7
125	受持ち患者の看護問題を明確にできる(看護診断)	2.1	2.2	2.6
126	受持ち患者の看護計画が立案でき、計画に従って援助できる	2.2	2.2	2.7
127	受持ち患者の看護実践の結果を評価できる	2.1	2.4	2.8
128	看護記録の目的を理解し、適切かつ正確に記録できる	2.1	2.6	3.0
129	守秘義務に基づいて医療情報や記録物を取り扱うことができる	2.7	3.1	3.4
130	報告・連絡・相談の判断ができ、実施できる	2.5	2.8	3.3
131	看護実践の優先順位を考えて行動できる	2.2	2.4	2.8
132	自分のことだけではなく看護チームのメンバーの状況を考えて仕事ができる	2.1	2.4	2.8
133	医師や他医療職者に自分の考えを表現でき、チーム医療を意識した行動がとれる	2.1	2.2	2.6
134	決められた業務を時間内に実施できるように調整できる	2.0	2.2	2.7
135	看護に必要な院内の決まりごとや情報に関心を持ち、看護業務に活用できる	2.2	2.4	2.8
136	自己の限界を知り、必要な援助を求めることができる	2.3	2.6	3.1
137	看護基礎教育(看護学校など)で学んだ看護を現実の看護実践にうまく適応できる	2.1	2.4	2.8
138	施設における医療安全管理体制(診療基本マニュアル掲載)について理解している	1.7	2.1	2.4
139	院内の災害防止マニュアルに触れ、災害発生時の初期行動ができる	1.5	1.8	2.2
140	施設内の消火設備の定位置と避難ルートを把握し患者に説明できる	1.4	1.9	2.3
141	医療安全のための患者確認の方法を理解し、適切な確認ができる	2.0	2.6	3.2
142	医療事故(インシデント・アクシデント)発生時に速やかに対処できる	1.8	2.2	2.7
143	日常使用している医療器具・器械・衛生材料などの取り扱いを理解し、適切に使用することができる	1.8	2.4	2.8

表 2-1. 構成要素別看護実践能力レベル

看護実践能力構成要素	評価項目数	看護実践能力レベル	レベル別評価項目数(%)		
			4月	6月	10月
看護師として必要な基本的姿勢・態度	20	レベルⅠ	1(5)	0(0)	0(0)
		レベルⅡ	18(90)	15(75)	5(25)
		レベルⅢ	1(5)	5(25)	15(75)
看護技術	102	レベルⅠ	61(60)	29(28)	10(10)
		レベルⅡ	40(39)	62(61)	54(53)
		レベルⅢ	1(1)	11(11)	38(37)
看護実践に伴う判断力・行動力・調整力	21	レベルⅠ	5(24)	2(9)	0(0)
		レベルⅡ	16(76)	18(86)	16(52)
		レベルⅢ	0(0)	1(5)	5(48)
合計(総合実践能力)	143	レベルⅠ	67(47)	31(22)	10(7)
		レベルⅡ	74(52)	95(66)	75(52)
		レベルⅢ	2(1)	17(12)	58(41)

点を持ち、4月採用時の技術レベルも高く、6ヵ月後にはほぼ全項目がレベルⅢに達している。これらの技術内容は看護基礎教育における学習で基礎作りが可能であり、その後経験を積み重ねることで、熟練可能なものと考えられた。一方、採用後6ヵ月を経た10月の時点でレベルⅠにとどまっている項目をもつ「呼吸循環を整える技術」「救命救急の技術」は生命の危機に陥った患者に迅速且つ適確に実施しなければならない技術であり、未熟な技術が患者の生命に悪影響を及ぼす可能性があるという共通点を持っている。4月採用時点でのレベルも低く、基礎教育での学習が認知レベルにとどまり、行動レベルの学習に達していないことが推察でき、現任教育においては、基礎的知識から実践応用までの教育を系統的に行うことが重要であると考えられた。また、実践能力を高めるためには1度だけではなく繰り返し行うことが必要であると考えられた。

先に述べた身体浸襲を伴わない技術内容5項目とその対極にある生命に直結する2技術内容以外の中間的

な7技術内容にはどのような共通点があるのだろうか。たとえば「排泄の技術」の10月の技術項目の平均得点を見ると、病態や病因によって判断が伴う技術及びかなりの訓練を必要とする技術はレベルⅢに達していないことがわかる。「活動援助技術」「創傷管理技術」においても同様の共通点が見られた。

与薬の技術では、評価項目20項目のうち、機器の操作の訓練のみでレベルが向上する「輸液ポンプの取り扱いと管理」の2項目は6ヵ月後にはレベルⅢに達しているが、薬理学の知識が必要な技術である残り18項目はレベルⅡにとどまっている。臨床でよく使用される薬剤についての基礎的知識が必要であると考えられた。同様な理由で食事介助技術における食事療法を含む栄養学の必要性も考えられた。

生体機能管理技術の多くが6ヵ月後の10月にはレベルⅢに到達しているが、心電図の異常判断のみが低いレベルにとどまっている。心電図読解の教育は基礎教育では行われていない可能性も考えられ、机上でも教育訓練が可能であることから、現任教育において早い

表 2-2. 基本的看護技術内容別看護実践能力レベル

技術内容	評価項目数	実践能力 カレベル	レベル別評価項目数 (%)			技術内容	評価項目数	実践能力 レベル	レベル別評価項目数 (%)		
			4月	6月	10月				4月	6月	10月
環境調整 技術	2	レベルⅠ	0(0)	0(0)	0(0)	呼吸循環 を整える技 術	12	レベルⅠ	10(83)	6(50)	3(25)
		レベルⅡ	2(100)	0(0)	0(0)			レベルⅡ	2(17)	6(50)	5(42)
		レベルⅢ	0(0)	2(100)	2(100)			レベルⅢ	0(0)	0(0)	4(33)
食事援助 技術	4	レベルⅠ	3(75)	1(25)	0(0)	救命救急 の技術	13	レベルⅠ	8(62)	8(62)	6(46)
		レベルⅡ	1(25)	3(75)	4(100)			レベルⅡ	5(38)	5(38)	6(46)
		レベルⅢ	0(0)	0(0)	0(0)			レベルⅢ	0(0)	0(0)	1(8)
排泄援助 技術	7	レベルⅠ	5(71)	3(43)	0(0)	その他 (死後の処置)	1	レベルⅠ	1(100)	1(100)	0(0)
		レベルⅡ	2(28)	4(57)	6(86)			レベルⅡ	0(0)	0(0)	1(100)
		レベルⅢ	0(0)	0(0)	1(14)			レベルⅢ	0(0)	0(0)	0(0)
活動援助 技術	7	レベルⅠ	2(28)	1(14)	0(0)	与薬の 技術	20	レベルⅠ	18(90)	6(30)	1(0.5)
		レベルⅡ	5(72)	6(86)	4(57)			レベルⅡ	2(10)	14(70)	17(85)
		レベルⅢ	0(0)	0(0)	3(43)			レベルⅢ	0(0)	0(0)	2(10)
清潔・衣生活 援助技術	6	レベルⅠ	0(0)	0(0)	0(0)	苦痛緩和 の技術	4	レベルⅠ	0(0)	0(0)	0(0)
		レベルⅡ	6(100)	3(50)	1(17)			レベルⅡ	4(100)	4(100)	1(25)
		レベルⅢ	0(0)	3(50)	5(83)			レベルⅢ	0(0)	0(0)	3(75)
創傷管理 技術	4	レベルⅠ	3(75)	1(25)	0(0)	感染防止 の技術	6	レベルⅠ	1(17)	0(0)	0(0)
		レベルⅡ	1(25)	3(75)	3(75)			レベルⅡ	5(83)	5(83)	0(0)
		レベルⅢ	0(0)	0(0)	1(25)			レベルⅢ	0(0)	1(17)	6(100)
症状・生体機 能管理技術	12	レベルⅠ	8(67)	1(8)	0(0)	安全確保 の技術	4	レベルⅠ	2(50)	1(25)	0(0)
		レベルⅡ	3(25)	7(58)	4(33)			レベルⅡ	2(50)	2(50)	2(50)
		レベルⅢ	1(8)	4(34)	8(67)			レベルⅢ	0(0)	1(25)	2(50)
						合計 (基本的看護 技術)	102	レベルⅠ	61(60)	29(28)	10(10)
								レベルⅡ	40(39)	62(61)	54(53)
								レベルⅢ	1(1)	11(11)	38(37)

時期から取り組むことが適切と思われた。

以上より、現任教育における技術教育は身体浸襲の伴わない技術は、臨床現場におけるOJTで習得可能であり、集合教育の必要性はきわめて低いと考えられる一方、未熟な技術が患者の生命の安全を脅かす可能性のある技術内容である「呼吸・循環を整える技術」「救命救急の技術」の教育は適切な時期を選び知識と実践が統合できるまで訓練する必要がある、複数回の教育の必要性も示唆していた。これら以外の看護技術は日常繰り返し使われているものが多いが、しっかりとした基礎知識なしにはレベルが向上しない。薬理学、栄養学、病態の変化による症状管理の知識などを獲得することがレベル向上につながり、早い時期から取り組むことが必要であると考えられた。

3) 看護実践に伴う判断力・行動力・調整力

21項目の評価項目を4月、6月、10月の3時点でみると、4月採用時点において大部分の評価項目がすでにレベルⅡに達している。しかし、6月、10月と進むなかでレベルの向上が極めて小さいという特徴があり、この点が他の構成要素の評価と異なる点である。ここにおける実践能力は形になって現れないものも多いが、複雑な看護現象を理解した上でさまざまな選択肢のなかから判断し実施していくことが求められる看護の質を左右する重要な能力である。21項目を大きく

分けると、「看護過程展開の能力」、「チーム医療を円滑に進めるための能力」「医療の安全性確保のための能力」に分けられる。よく体験する事例や判断・行動・調整に複雑性がある出来事などを事例検討の方法で教育することが適していると思われた。

以上、3つの看護実践能力構成要素から現任教育の方法、内容、時期を考察してきたが、3つの構成要素は相互関係にあり、いずれかの実践能力の向上は他の実践能力をも向上させるという相乗効果を生むものと考えられた。また、現任教育は教育そのものが仕事の流れを乱したり、遅らせたりするものであっては継続できなくなるため、最も相乗効果が期待できる時期を慎重に検討することが必要であると考えられた。

V 結 論

看護師の看護実践能力を測定するツールの開発に取り組み、「看護師として必要な基本的姿勢・態度(評価項目20)」、「看護技術(評価項目102)」「看護実践に伴う判断力・行動力・調整力(評価項目21)」の3構成要素、総計143評価項目からなる看護実践能力測定ツールを作成した。

作成したツールを用いて、新採用看護師を対象に4月、6月、10月に実態調査を行いその変化を構成要素別に考察し、図1のような現任教育プログラムの試案を作成した。

4 月 (入職)	6 月	8 月	10 月
日常用いられる看護技術演習 (講義・演習)	呼吸循環管理の基礎 (講義・演習)	看護診断と看護過程 (講義・演習)	リスクマネジメント (講義)
1 静脈採血 2 筋肉注射 3 創傷処置 4 無菌操作	1 心電図解説 2 心音・呼吸音聴取 3 意識レベル	1 看護診断と看護問題解決 2 事例検討	1 医療事故防止の基礎知識 2 インシデントとアクシデント —その対処方法—
12 月	2 月	4 月 (2 年目)	6 月
安全な与薬のための基礎知識 (講義)	救命救急技術 1 (講義・演習)	救命救急技術 2 (講義・演習)	チーム医療と多職種連携 (講義・演習)
1 中心静脈栄養の基礎知識 2 劇薬・毒薬・麻薬の投与管理	1 気道確保 2 心肺蘇生 3 救急薬品と投与上の注意	1 人工呼吸器装着患者の管理 2 アンビューによる用手的換気 3 AED	1 医療専門職それぞれの 役割機能 2 事例検討

図 1. 若手看護師対象の現任教育プログラム試案.

文 献

- 1) 上田雅子, 狩谷由佳: 急性期病院の地域連携部署の実態と平均在院日数への影響, 日本看護管理学科誌 2005;8(2):30-6.
- 2) 奥村元子: 2006 年診療報酬改訂による看護管理への影響と課題, 看護管理 2006;16(6):439-56.
- 3) 小島恭子, 中村秀代, 黒田裕子: DPC 導入後の看護業務量の比較と関連要因, 日本看護管理学会誌 2006;9(2):14-21.
- 4) 日本看護協会中央ナースセンター: 2004 年新卒看護職員の早期離職等実態調査報告書, 2005
- 5) 鈴木理恵, 小谷幸: 2005 年病院における看護職員需給状況調査概要, 看護 2006;58(9).
- 6) Patricia Benner (井部俊子他訳): ベナー看護論—達人ナースの卓越性とパワー, 医学書院, 1992
- 7) 佐藤まゆみ, 大室律子, 根本敬子他: 看護系大学を卒業した新人看護師における看護実践能力の習得状況, 看護管理 16(8):676-81.
- 8) 日下和代, 小泉仁子, 千葉由美 他: 看護実践能力育成に向けた看護技術チェックリストの検討, 看護教育 2006;47(10):884-91.

- 9) 厚生労働省編: 新人看護職員の臨床実践能力の向上に関する検討会報告書—新人看護職員の研修の充実を目指して, 日本看護協会出版会, 2006

研究成果

<論文>

- 1) 藤村朗子, 渡辺孝子, 斉藤啓子, 及川泰 他: 入職時における新人看護師の看護技術習得状況実態調査, 第 38 回日本看護学会論文集—看護管理 P276-8, 2008 年 3 月

<学会発表>

- 1) 及川泰, 斉藤啓子, 藤村朗子, 渡辺孝子 他: 新人看護師の看護実践能力を測定する評価表の作成, 第 38 回日本看護学会—看護管理, 一般演題, 2007 年 10 月 25 日, 和歌山
- 2) 藤村朗子, 渡辺孝子, 斉藤啓子, 及川泰 他: 入職時における新人看護師の看護技術習得状況実態調査, 第 38 回日本看護学会—看護管理, 一般演題, 2007 年 10 月 25 日, 和歌山

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

高等学校における性教育の現状と課題 —大学1年次生の認識調査をもとにして—

研究代表者 岡部 恵子(埼玉医科大学 保健医療学部 看護学科)

分担者及び研究協力者 佐鹿 孝子*, 大森 智美*, 久保 恭子*, 安藤 晴美*,
坂口 由紀子*, 穴戸 路佳*

1. 研究の背景

1) 「健やか親子21」が示す思春期の課題

「健やか親子21」(2000)¹⁾は、21世紀の母子保健の主要な取組みの方向付けとして、①思春期の保健対策の強化と健康教育の推進、②妊娠・出産に関する安全性と快適さの確保と不妊への支援、③小児保健医療水準を維持・向上させるための環境整備、④子どもの心の安らかな発達の促進と育児不安の軽減といった4つの課題を設定した。そして、「思春期の保健対策の強化と健康教育の推進」に関する問題認識を、思春期の人工妊娠中絶や性感染症、薬物乱用等の増加等の問題や心身症、不登校、引きこもり等の深刻化とし、これらの問題解決は極めて困難であり、解決の方策は量的拡大とともに質的転換を図ることが不可欠とし、改善への努力の強化の必要性を強調し、10年後の目標を数値をもって示した。2006年の中間報告²⁾において、人工妊娠中絶は減少傾向にあるが性感染症は増加しているという結果を示し、思春期の性感染症については望まない妊娠の問題とあわせて適切な性教育の下で対応すべきとした。が、一方、性教育の適切な指導者が少ないこと、適切な教材についての共通の理解が得られていないことを問題としてあげている。

2) 埼玉県の思春期の保健対策

本学の理念に地域社会への貢献があげられている。埼玉県にある本学であるから、埼玉県下の思春期の問題の現状を把握し、解決のために活動することは看護学科に籍をおく者の重要な役割である。埼玉県は、「健やか親子21検討報告書」の基本的な考え方を踏まえ、平成14年に「彩の国健やか親子21～親と子の心の健康支援～」³⁾を示した。その基本方針は、「安心かつ

安全に子どもを産む育てることの出来る環境づくり」「子どもの心と体の健康に関する社会づくり」「児童虐待から子どもを守る社会づくり」であり、当面の5年間の最重点課題を①小児・思春期精神保健医療体制整備の促進、②児童虐待の予防・防止対策の推進の2つとしている。

埼玉県の2000年における10代の人工妊娠中絶は、全国では女子人口千に対して12.1であるのに対して9.1と低値である。が、山本は「埼玉県下における性感染症罹患の実態」⁴⁾の報告において、年齢階級別にみた性感染症の罹患頻度(女子)の最多は20～24歳で2,604.8人、次いで15歳～19歳が1,572.8人であり、性器クラミジア感染症、淋菌感染症が多く、同じ年の性感染症学会による全国的な性感染症サーベイランス報告と比較し埼玉県は20歳～24歳の発症数において約1.5倍の高値であり、15歳～19歳においても全国の値を凌駕しているとする。そして、「埼玉県における性感染症罹患数は全国と比較して、とくに10歳代、20歳代が突出して多いことから、この年代を中心に、性感染症予防に対する積極的なキャンペーンを行うことが急務である」と結論している。埼玉県においても、「思春期の健康と性の問題」について積極的に考えていかねばならないことが分かる。

3) 成長発達課題としての思春期における性感染症、人工妊娠中絶

性感染症、人工妊娠中絶ともに性的接触と関連するという特質を有する。であるから、人工妊娠中絶、性感染症を減少させていくには、思春期早期あるいは学童期から人間にとっての性行動の意味と性行動のもたらす結果について熟考できる教育が必要であり、思春期の性に関係する問題を、人間のライフサイクルの中の成長・発達の課題として捉えられるようにすること

* 埼玉医科大学 保健医療学部 看護学科

である。ルソーは⁵⁾、人間は二度この世に生まれるとし、一度は人類の一員として、二度目は性を持った人間とする。そして、石川⁶⁾は以下のように述べる。思春期は第二性徴期であり身体変化の大きく、この身体的変化が「性」を意識させる。からだは大人になるが心の発達にはこれに追いつかず、からだの心の極度のアンバランスを体験するのである。思春期の第二性徴は、種族保存本能ゆえの変化であり、種族保存のためのホルモンの変化が基本的欲求としての性衝動の起因となる。第二性徴は、おもに生殖腺から分泌される性ホルモンの作用によって生じ、生理的・心理的・社会的な変化があまりにも大きすぎるため、それをどのように統合したらよいのかの探索のなかにおかれる。とくに、性ホルモンの分泌による性欲の問題は、思春期・青年期の子どもの自己イメージに大きなゆらぎをもたらす、そのゆらぎのなかでの不安定さに対して、自分自身を過剰な自意識で覆い隠そうとするが、その抑圧は長くは続かず、成長とともに身体側からの反撃が起こる。その最もわかりやすいのが、より直感的に自分を感じられる性的な衝動の実現を表現していくことであり、それにより自分の全体性を回復しようとする機能をこの時期にはもつ。

急務とされる思春期の性教育は、思春期の若者自身が成長過程として出現する性ホルモンの変化による生殖本能としての性衝動、性行動を、どのように受け止め、どう行動するとよいかを考えられるようにすることが肝要になる。

4) 高校生の性と性教育に関する意識

平岡は⁷⁾1440名の高校性を対象に性と性教育に関する意識調査した結果、「男子高校生のセックス」について、肯定群が76.9%、否定群が13.5%、不明群(わからないあるいは無回答)9.5%、「女子高校生のセックス」については、肯定群は75.8%、否定群14.4%、不明群は9.8%である。また、「中学生の中絶」については、肯定群36.5%、否定群45.4%、不明群18.1%に対し、「高校生の中絶」には、肯定群38.1%、否定群44.2%、不明群17.6%であった。中学生の中絶に比して高校生の中絶の肯定がやや高くなっている。これらの結果は、性本能のもたらす性衝動とそれに伴う性行為は本能として、あるいは、思春期のゆらぎを癒すものとして認めざるを得ない状況におかれていることを意味する。中絶を肯定していることは、「産めない」「育てられない」ゆえの「やむを得ない」といった現実問題への対処としての肯定であって、人工妊娠中絶が胎児の生命の軽視の思考であるとは必ずしもいえない。性教育に関しては、「望まない妊娠を予防する教育」「STD・エイズ教育」の2項目についていつから行うとよいと考えているかの問いに⁷⁾対しては、「望まない妊娠予防」については、小学校低学年7.4%、小学校高学年27.6%、中学生が52.7%、高校生

が6.8%であり、必要ないが3.5%、「STD・エイズ教育」については、小学校低学年が11.2%、小学校高学年が34.4%、中学校が45.8%、高校が4.2%であり、必要ないが2.6%である。

この結果からも、人工妊娠中絶や性感染症の減少にむけて、現に実施されている高校生への性教育のあり方を再検討していく必要性が示唆される。

5) 性教育の歴史的変遷

では、性教育は何を目指し、どのようにすすめていくとよいのであろうか。いま、性教育の歴史を振り返り、時代の変化との関係をも合わせて性教育を評価してみる必要がある。そこで、田能村の「性教は転換期を迎えたかー性教育の立場から」⁸⁾をもとに、わが国の性教育を振り返ってみた。

戦後、昭和24年に「純潔教育基本要領」が、昭和30年には「純潔教育の進め方」が発表され、昭和33年には文部省より小・中学校の学習指導要領が告示された。が、少年非行の増加の中では性教育より非行防止のための純潔教育に関心が集中していた。昭和40年代に性解放の風潮がより高まるという状況の中で、各都道府県教育委員会が「性教育の手引」類を続々刊行した。その中で性教育の目標には、性の悩みや不安の解消、性被害・性病を防ぐといった表現が多くみられ、また、昭和50年前後には人間の性を科学的にとらえる、性を総合的にとらえて合理化、人格化、社会化をはかる、男女の特質の理解、協力関係を築くといったことが示された。昭和54年には日本性教育協会が「性教育指導要項、同解説書」において、性教育の目標、内容を発表した。昭和61年、文部省は生徒の性的成熟が早まり、かつ、生徒を取り巻く社会環境が大きく変化し、性に関する問題行動の増加や低年齢化が問題になっていることを指摘し、「生徒指導における性に関する指導ー中学校、高等学校編」を発行した。性教育に代わって「性」に関する指導が広がっているという状況であり、この頃より性教育は保健と理科の科目において教えられるようになった。平成11年、「学校における性教育の考え方、進め方」を発刊し、学校における性教育の基本的な考え方、発達段階に応じた性教育の指導内容、指導方法などを示した。ここにおいてやっと性教育の基本的考え方、発達段階に応じた性的成熟の正しい理解などがあげられたことになる。

わが国の性教育は様々に揺れ動きながら進められてきたことが伺われる。これらの歴史的視点をもとに、田能村は⁷⁾、性教育を人間の「性」およびそれにかかわる事柄についての教育であるとした上で、人間の「性」は昭和40年代よりセクシュアリティの教育とされながらも、それを構成する下位の概念を問わずにすすめてきたと指摘する。また武田は⁹⁾、今日的性教育の課題に対して、文科省の性教育指針による「児童・生徒らの人格完成と豊かな人間形成を究極の目的とし、

人間の性を人格の基本的な部分として生理的側面、心理的側面、社会的側面などから総合的に捉え、生徒が生命尊重、人権尊重、男女平等の精神に基づく正しい異性観をもつことによって、自ら考え判断し、意思決定の能力を身につけ、望ましい行動を取れるようにすること」が基本であること、そのために性教育は発達段階に即した内容、教材であること、自己実現と共生の教育であり、学校の全教育活動を通じて行われるものであること、人間教育の理念と教育内容を保護者の同意と理解を得てすすめていくこと、児童・生徒に対する指導上の留意することの必要性を述べる。

これらの提言より、性教育の現状をみつめ、性教育のあり方について議論し、性教育のモデル作成への努力をすることが急務であることが分かる。

6) 性教育はだれが行うのか

「健やか親子21」の中間報告は、適切な教材についての共通理解がされていないこと、適切な指導者が少ないことを性教育の課題としてあげた。では、性教育は、誰が、何を、どのように行うとよいのであろうか。

岡本¹⁰⁾、日頃から出産の場や人工妊娠中絶や若者の性感染症の治療場面に立ち会う機会の多い助産師が、思春期問題に悩む子どもたちの性にまつわる悩みの相談相手としての役割を担えるのではないかとし、その上で、養護教諭、保健担当教員、産婦人科の医師や看護師、保健師、助産師が、それぞれの職種の特性を踏まえた共同作業として行うことの必要性を述べる。看護職である安武¹¹⁾らも、「生と性の健康教育」は、学校保健と地域保健の連携した取り組みが必須とし、保護者、小学校教諭、養護教諭、保育士を対象に性教育に対する考え方、連携の実態、性教育の実施状況を調査した中で、保護者の多くは性教育を学校に任せきりにしている、わが子と性について語り合うことを敬遠していると回答していることを報告している。その上で、学校側も教育内容を保護者に伝えること、保護者の意見を把握することなどの必要性、すなわち、保護者も性教育に関わる必要があることを述べている。また、小学校教諭と養護教諭とでは性教育の理解状況や性について知りたい内容の認識に差があるとし、効果的な健康教育推進のためには、関係者の知識・技術の向上、教える側と教えられる側の相互交流や指導の評価システムが必要と結ぶ。

助産師である佐山¹²⁾、小・中・高校の教諭や地域保健師と連携をとり性教育にかかわる中での気づきとして、問題に遭遇した時、それを直視して「どうにかしなければ」という気持ちが重要とする。これらは、看護職が性教育にかかわる際の具体策をもみせている。

2. 研究目的

以上の性教育をめぐる背景を重要視し、本研究は高校における性教育の実情を知り、高校における性教育

の問題を明らかにし、看護職としての性教育のあり方を考察することを研究目的とする。思春期の人工妊娠中絶、性感染症にかかわる問題の解決にとっては、高校における性教育の改善が急務と考え、高校の性教育に焦点をあてた。

3. 調査方法と調査内容

調査対象は、高校卒業直後の者の多い大学1年次生とし、高校時代における性教育についての認識を調査する。調査は、自記式質問紙法によるアンケート調査である。質問内容は、①個人の属性(年齢、性別、卒業高校の課程)、②高等学校における性教育の実施状況(授業担当者、実施時間、学外の講師の授業、内容、教材)、③性教育の効果、④高校の性教育に対する要望(授業担当者、内容)、⑤性に関する話し相手について、である。

4. 倫理的配慮

調査協力依頼時に、各大学の担当者に対し文書にて以下のことを伝えた上で承諾を得た。

- ・本調査の目的と意義
- ・本調査は無記名回答であり、大学名や個人名は特定できないように配慮をすること。
- ・調査用紙は研究終了次第、廃棄し、データは研究以外の目的には使用しないこと。
- ・調査結果は、学会等に報告あるいは学会誌等に論文投稿をする予定であること。

調査対象の学生には、回答は自由意志であること、回答したくない項目には回答しなくてよいことを記した文書をアンケート用紙に同封した。

5. 結果

アンケート用紙は、調査協力の承諾を得た5大学に計1229部を配布し、699部回収、回収率56.9%、有効回答率99.7%であった。

1) 対象の背景

アンケート回答者は、男子学生277名(39.8%)、女子学生420名(60.2%)、年齢は18歳・19歳が87.0%、20歳以上が13.0%であった。本学が所在する県下の高校卒業生は30.6%、県外は69.4%であった。教育課程は、男女共学が76.3%、男子校10.7%、女子校11.8%、課程別では(普通科、専門科、総合学科)では普通科が94.7%であった。

2) 高校における性教育の実施状況

性教育は、「教科時間内」の実施が79.2%、教科外時間6.1%、ホームルーム4.2%であった。性教育は62.2%が「男女合同」で受けていた(図1)。「性教育の授業は誰が行っていたか」を5つの選択肢より選択法で回答を求めた(重複回答可)。保健体育の教師最多で85.4%、次いで養護教諭13.4%、家庭科の教師10.7%、

クラス担任3.4%の順であった。18年度学外講師による性教育は、「受けた」が26.2%、「受けたことはない」は59.6%であり、学外講師は性教育の専門家(性教育を職業としている者)が最も多く30.6%、次いで医師18.9%、保健師11.7%、助産師10.0%、看護師3.9%、看護職養成校の学生2.8%であった(図2)。

3) 性教育の受講内容と使用教材

性教育受講内容について12項目をあげ、選択法で回答を得た(重複回答可)。最も多かったのは「性感染症」であり、以下「男女の身体のしくみ」「避妊の方法」「妊娠」「避妊の意味」の順に多かった。受講経験が少なかったのは、「異性の人格尊重」「異性の心理や異性とのつき合い方」「性被害」であった(図3)。12項目について「最も印象に残っているもの」は、「性感染症」が41.7%と最も多く、次いで「人工妊娠中絶」「男女の身体のしくみ」「避妊法」の順であった。「人工妊娠中絶」と「妊娠」は女子学生に多く、男子学生では「男女の身体のしくみ」と「避妊の方法」が多かった(図4)。

4) 性教育の効果の認識

高校時代の性教育が「理解できたか」「役立ったか」を5段階法で質問した。その結果、「よく理解できた」と「まあまあ理解できた」を合わせ、「理解できた」は82.2%であった。「理解できた」は男子学生75.7%、女子学生87.0%であった(図5)。性教育が役立っているかには「どちらとも言えない」が最も多く45.8%であり、「とても役立っている」と「役立っている」を合わせ、「役立っている」は42.7%であった。「役立っている」は、男子学生40.3%、女子学生50.0%であった(図6)。

5) 大学生の考える適切な性教育授業担当者と教育内容の要望の意味

「高校時代の性教育の授業担当者は誰が適切か」には、養護教諭(56.5%)、性教育の専門家(55.2%)が多く、次いで、保健体育の教師39.5%、保健師・助産師・看護師37.9%、医師21.9%の順であった。養護教諭は女子学生に、医師は男子学生に、「保健師・助産師・看護師」は女子学生に多かった。高校時代に「もっと聞

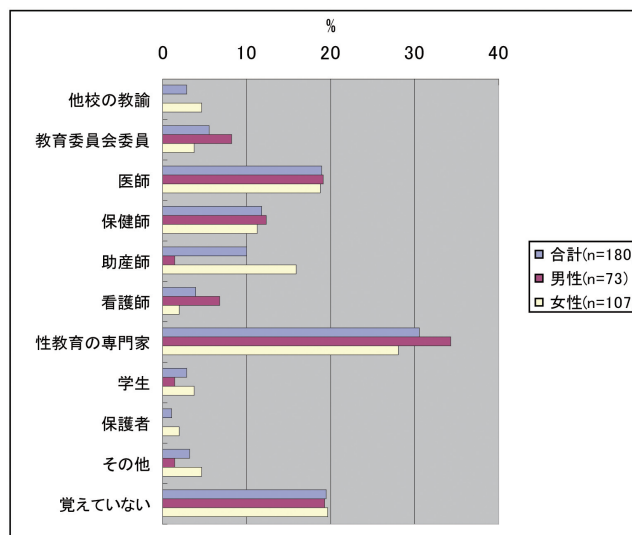


図2. 学外講師の職種.

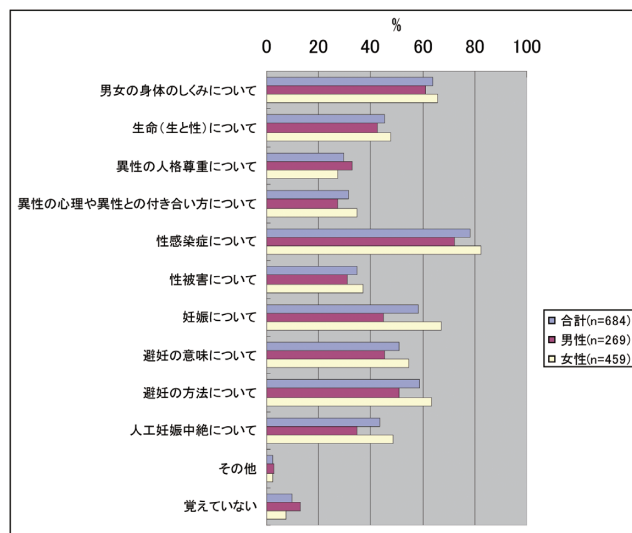


図3. 高校における性教育の受講内容.

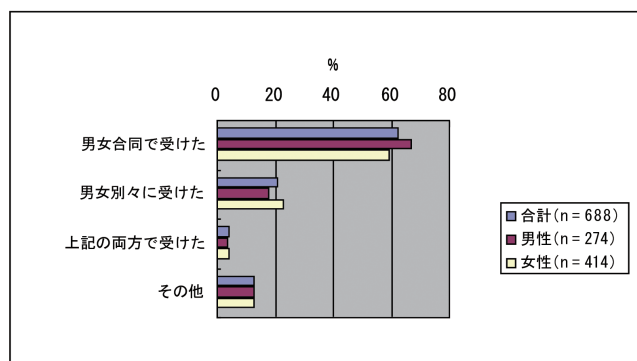


図1. 性教育の授業状況.

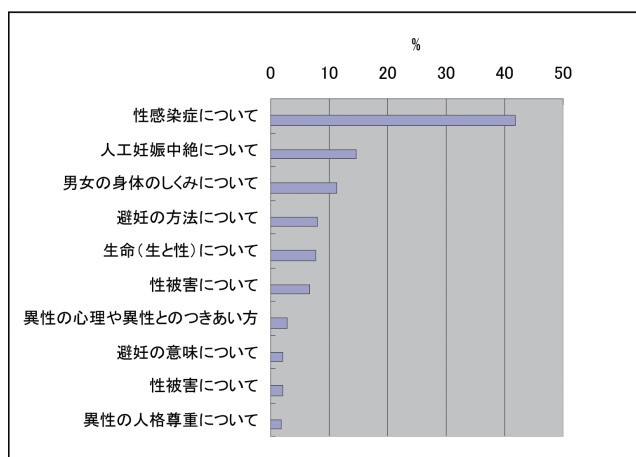


図4. 最も印象に残った性教育の内容.

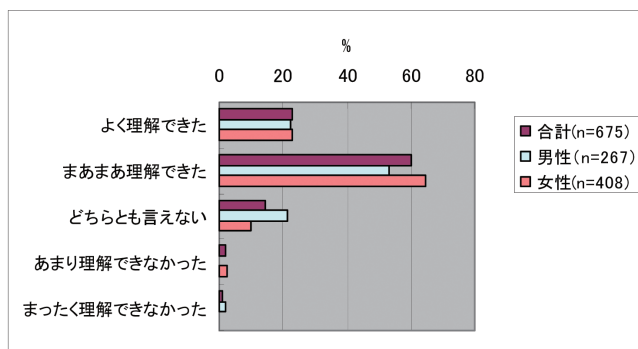


図 5. 性教育の理解度.

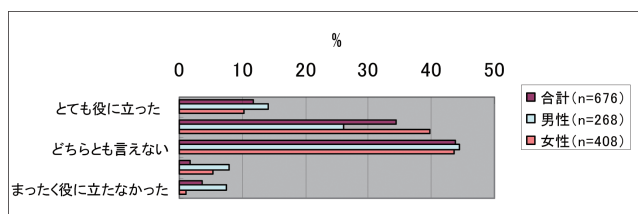


図 6. 性教育の役立ち度.

きたかった性教育の内容」は、「性感染症」が最も多く、次いで「妊娠」、「異性の心理や異性との付き合い方」、「人間としての生き方」、「避妊の方法」、「人工妊娠中絶」の順で多かった。「男女の身体的しくみ」は男子学生に、「妊娠」、「人工妊娠中絶」は女子学生に多かった。

6. 研究結果に基づく考察の概要

以上の結果より、本論文においては、①高校における性教育授業担当者の現状と課題、②高校における性教育の受講内容の再検討の必要性、③高校における性教育に対する看護職の果たすべき役割について考察した。(付：本研究は、現在、「母性衛生」(日本母性衛生学会に論文投稿し、査読結果をもとに加筆・修正中である。)

<引用文献>

- 1) 健やか親子21検討会：健やか親子21検討会報告書 厚生労働省発表 平成12年11月。
http://www1.mhlw.go.jp/topics/sukoyaka/tp1117-1_c_18.html
- 2) 「健やか親子21」推進検討会：「健やか親子21」中間評価報告書 厚生労働省発表 2006年3月。
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/03/s0316-4.html>
- 3) 埼玉県健康福祉部：彩の国 健やか親子21～親子の心の健康支援～ 2004
- 4) 山本勉：埼玉県における性感染症罹患率の実態 埼玉市民講座資料 2005：
<http://ssi.umin.jp/public/20050820-1/index.htm>。アクセス2006/10/02
- 5) J.J.ルソー『エミール』(1762) 世界の名著36 『ルソー』中央公論社 1978
- 6) 石川悦子：思春期に起こりやすいからだの危機 児童心理 1999; 53(3): 49-56.
- 7) 平岡友良：高校生の性および性教育に関する意識調査 思春期学 2003; 21(2): 192-9.
- 8) 田能村祐麒：性教育は転換期を迎えたか 性教育の立場から 思春期学2006; 24(1): 26-9.
- 9) 武田敏：性教育の現状論議と課題・展望 産婦人科治療 2005; 91(5): 482-3.
- 10) 岡本喜代子：助産師だから伝えられる生と性 SEXUALITY 2005; 023: 130-3.
- 11) 安武繁：学校保健と地域保健が連携した「生と性の健康教育」推進システムの構築に関する研究 人間と科学 県立広島大学保健福祉学部誌 2006; 6(1): 83-90.
- 12) 佐山静江：実りある性教育を実現するために 施設で働く助産師の役割と課題 助産雑誌 2004; 58(4): 9-14.

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

終末期医療における看護師の機能と役割

ー埼玉県内の大規模な病院と中小規模の病院を対象とした実態調査ー

研究代表者 松下 年子(埼玉医科大学 保健医療学部 看護学科)

分担研究者 大野 良三¹⁾, 齋藤 啓子²⁾, 及川 泰²⁾,小倉 邦子³⁾, 藤村 朗子³⁾

1. 緒言

これまで厚生労働省は終末期医療について、国民や医療従事者、介護・福祉職員等を対象に意識調査を経年的に実施してきた^{1,2)}。そして2007年度、尊厳死をめぐって国として初のガイドライン(厚生労働省指針「尊厳死に関するガイドライン」)³⁾がまとめられ、終末期医療のあり方が大きく変わろうとしている(①インフォームド・コンセントに基づく患者の意思決定, ②多職種による医療・ケアチームとしての遂行, ③緩和ケアの徹底, ④患者・家族の精神的社会的な援助を含めた総合的な医療・ケア, 以上の推奨)。その背景には、国民の「自宅で死にたい」というニーズ⁴⁾にもつながる「尊厳ある死」や、「尊厳ある生」への問い直し、患者の自己決定権の尊重等があると推察される。また、終末期の告知のあり方をはじめとする終末期医療に関する価値観が多様であるために、訴訟事件に発展するケースが生じるほどに、患者・家族側と、医師を中心とした医療従事者との間に摩擦が生じてきていることも、背景の1つとして否定できない^{5,6)}。さらに、医療費抑制等の経済的要因も間接的には影響していよう。地域性もあるが、(家族中心ではあっても)患者中心の終末期医療が必ずしも実施されていない現状が示唆されており、それに対して行政や法的な立場から、患者主体の終末期医療や尊厳死の枠組みを整えようとしているものと捉えられる。

このような中、先行研究では、終末期医療に関して、緩和ケア病棟や在宅の看護師が果たす役割や機能について言及したものは多いが、一般病院の看護師が終末期医療に特化したところで、いかなる役割

や機能を果たしているのかを明らかにしたものは少ない。池田ら⁷⁾は一般看護師の終末期医療に対する意識を調査し、終末期医療に関する関心度は年齢が高くなるほど、臨床経験が多くなるほど高いことを報告しているが、われわれとしては、終末期の個々の具体的な看護実践に対する意識や、終末期医療が大きく変わろうとしている現時点での、看護師の認識をさらに知りたいところである。ガイドライン作成に至ったここ数年間の医療界の動向の中で、看護師が望ましいと認識する終末期看護のあり方、またそれと実際の相違、従来の終末期看護の認識にいかなる変化が生じたのか、といった終末期看護の実態に関するデータ(実態調査によるデータ)が不足している。

2006年われわれは、本研究の予備調査として、臨床看護師を対象に一般病院におけるがん患者への終末期医療・看護、特に、本人ないし家族への病名告知や余命告知、延命処置実施の確認の有無、時期等についてインタビュー調査を実施した。そしてその結果に基づいて、終末期の入院から死亡までのフローチャートモデルを作成した(その簡略版の一部を、図1に示す)。病院での実態というよりはむしろ、実態を踏まえた上で「尊厳ある死」を目指すという前提にてイメージした終末期医療(看護)モデルといえる。本研究では、このがん患者を想定したモデルが、がんに限らず慢性的な経過を追って終末期に至る疾患を抱えた患者にも適応可と判断し、このモデルを提示した上で、一般病院の看護師における終末期医療・看護に関する実態および意識調査を行なった。その目的は、①看護師が、終末期医療においていかなる役割や機能を果たしており、②今回のガイドラインを受けて、終末期医療に対してどのような意識をもっているのか、③看護師からみて、病院で尊厳死を全うしたと評価できる患者がどの

1) 埼玉医科大学 保健医療学部, 2) 埼玉医科大学病院 看護部
3) 埼玉医科大学 保健医療学部 看護学科

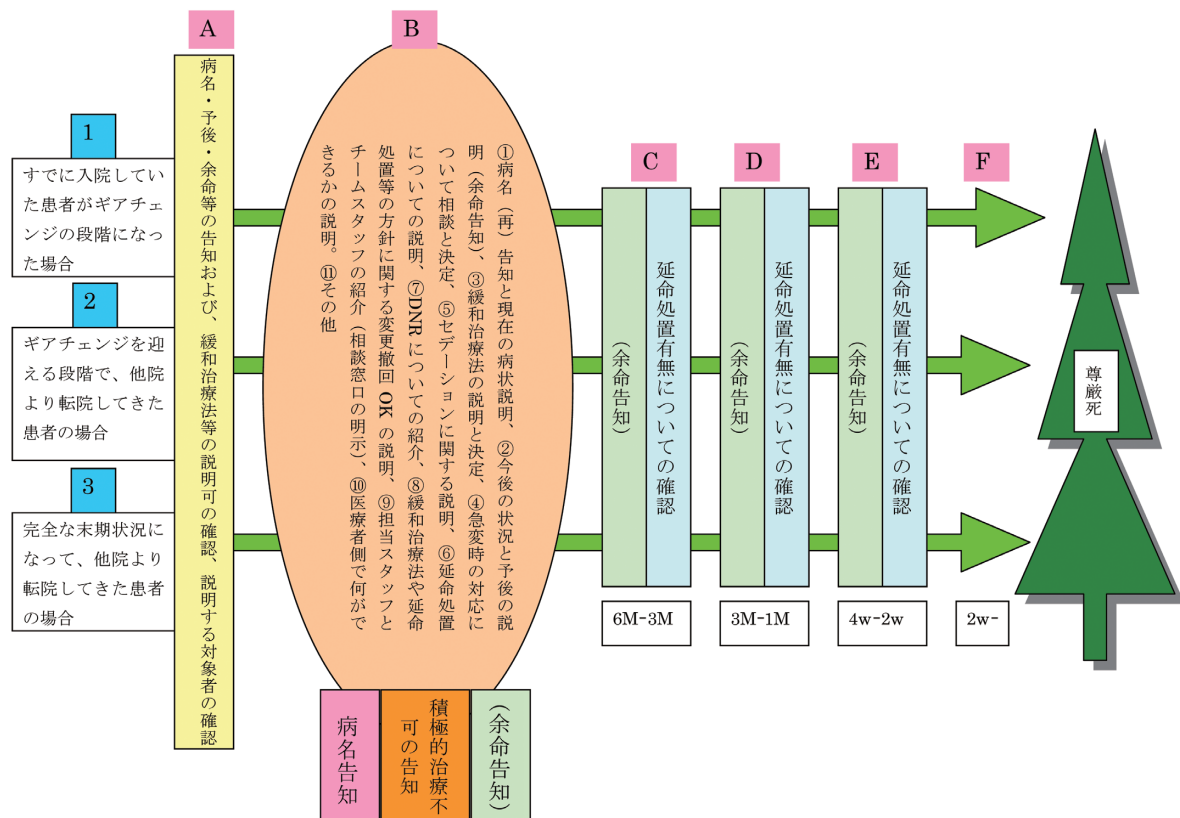


図1. 終末期医療のフローチャートモデル(一般病院の場合) [一部抜粋].

くらいいるのか、等を把握することである。

2. 研究方法

研究方法は郵送式の自記式質問紙調査である。埼玉県内の病院で緩和ケア病棟以外の、かつ終末期患者のいる病棟に就業している看護師のうち、調査協力の同意が得られた者を対象とした。

具体的には、県下の全病院（精神科病院、身体障害児者施設等も含む）の看護部門の長宛に、研究の主旨、方法、倫理的事項を記した調査依頼書を、質問紙のサンプルとともに郵送し、調査協力の可否を尋ねた。FAXないし封書の返信にて協力の同意が得られた病院および病棟に、対象者数分の調査説明書および、質問紙、返信用封筒等を郵送した。倫理的配慮としては、質問紙の記入は匿名にして個人が特定できないようにし、対象看護師には文書にて「調査協力は自由意志に基づくものであり、拒否することで不利益は生じないこと」、「守秘義務の遵守」等の倫理的要件を伝えた。質問紙の設問項目は、①対象属性と病棟の病床区分等、②終末期看護の実際、③終末期看護や尊厳死に関する考えや意識等の3群である。

3. 結果

1) 回収率と対象者の属性

埼玉県内の病院357施設に調査依頼書を郵送し、そ

の結果、返信のあった病院が90施設（回収率25.2%）、そのうち協力可能という返信は43施設（90施設の47.8%）であった（残り47施設は「協力できない」または「該当する病棟がない」であった）。次に、協力の同意が得られた43病院の対象看護師数は計1605名であったが、そのうち質問紙の返信があったのは1089名であった（回収率67.9%）。今回はそのうちの8病院、275名の看護師を対象とした分析結果を報告する。なお、対象看護師が就業している病棟は、一般病床が61.8%、療養病床が9.7%、精神病床が25.8%、その他が2.6%であった。看護師の平均年齢および平均臨床経験年数、現職場での平均勤務年数は、 32.6 ± 8.4 (21-60) 歳と 9.8 ± 7.4 (1-38) 年、 4.5 ± 3.4 (0-16) 年であった。

2) 終末期看護の実態

まず終末期看護の実態であるが、終末期患者に対する看護方式は「担当制をとっていない」が最も多く（37.5%）、次が「終末期に限らず担当看護師がつく」（24.3%）、「複数の看護師が担当として終末期患者につく」（19.9%）であった。多職種によるチームカンファレンスについては、「実施していない」が51.7%、1日のうち処置等以外で終末期患者（複数）のベッドサイドにいる時間は、「10分以内」が最も多く（44.1%）、次が「30分以内」（24.9%）、「ほとんどない」（11.1%）の順であった。「症状緩和のみの治療」等に関する説明や相談は、51.0%の者が「たまに」、21.3%が「しばしば」

実施しており、「全くしていない」は25.9%であった。「看取りと尊厳死に関する家族教育」の実施は、「行なったことはないが必要だと思う」が88.8%で最も多く、「行なったことがある」は6.5%であった。延命処置実施の確認は、大半の病棟で、「急変の可能性がある」と判断された時に(77.7%),「2-3回繰り返し」(60.5%)実施されており、81.6%の看護師がそれにかかわっていた。セデーションやDNR (do not resuscitate) に関してはそれぞれ61.6%と38.6%の看護師が、何かしらの形でそれらにかかわっていた。最後に、看護師対象の「終末期看護」教育(研修)は、「実施されていない」が55.8%と最も多く、「年に1回くらい」、「年に複数回」がそれぞれ16.1%、12.7%であった。

3) 終末期看護に関する看護師の意識

次に、看護師の意識であるが、多職種によるチームカンファレンスが有効か否かという問いに対して、「なんともいえない」が最も多く(51.5%)、次が「有効である」(27.5%)、「大変有効である」(8.4%)で、「あまり有効ではない」と「有効ではない」が合わせて12.6%を占めた。望ましいと思う「終末期患者のベッドサイドにいる時間」は、「1時間以内」が最も多く(33.7%)、次が「30分以内」(27.5%)で、「1時間以上」を望ましいとする者は14.5%であった。また、終末期患者の看護計画を立案する時、尊厳死を意識するか否かについては、「看護計画は立てているが特に意識していない」が46.9%と最も多く、次が「尊厳ある死を迎えられるようにということを看護目標にしている」(30.2%)、「看護計画を立てていない」(15.1%)であり、家族への援助で最も重視するのは「声かけ、話を聞く、助言する」(69.2%)で、次が「終末期の看取り教育」(25.0%)であった。なお、終末期看護を専門とする認定看護師やCNSの存在については、「是非来てほしい」と「できれば来てほしい」が合わせて69.1%であり、「何ともいえない」が19.6%、「自分たちでまかなえるので必要ない」は3.3%であった。WHOがん疼痛緩和法については、「名前だけ知っている」が46.5%、「ある程度は知っている」は33.1%であった。最後に、終末期患者のうつ状態をみかける頻度は「4-5人に1人」が最も多く(23.2%)、次に「2-3人に1人」(19.0%)、「10人に1人」(18.1%)が続き、「尊厳死を全うされた」と思う終末期患者の割合は、「ほとんどなし」と「1-2割」が最も多く(ともに24.7%)、「3-4割」と「半数」が13.5%と13.9%であった。

4. 考 察

1) 終末期医療・看護の体制と看護実践

終末期医療・看護の体制については、終末期患者に対する看護方式でどれだけ担当制が導入されているか、多職種によるチームカンファレンスがどれだけ実施されているか、1日のうち処置等以外で、看護師が

終末期患者のベッドサイドにいる時間がどれだけあるのか、また、看護師による「症状緩和のみの治療」等に関する説明や相談、「看取りと尊厳死に関する家族教育」の実施率などが、その充実度を示す一指標になり得ると考える。とすれば、4割近くの対象者(の回答)において担当制がとられておらず、半数以上でチームカンファレンスが実施されていなかったこと、また、8割以上において、1日のうち処置等以外で終末期患者のベッドサイドにいる時間がトータルで「30分以内」であったこと、看護師による「症状緩和のみの治療」等に関する説明や相談がルーチン化されているのが2割にすぎなかったこと、「看取りと尊厳死に関する家族教育」の実施が1割に満たなかったという本結果は、尊厳死をめぐる国として初のガイドラインである「尊厳死に関するガイドライン」が示す、患者中心の終末期医療・看護を実現するにふさわしい体制が、必ずしも十分でない可能性を示唆しているといえる。しかし一方で、延命処置実施の確認、セデーションやDNR (do not resuscitate) に関する場面では、看護師が一定以上かかわっていたことから(8割と6割と4割)、終末期医療体制の基本的な部分(枠組みの部分)では、看護師が重要な役割を果たしている可能性がうかがえた。また、WHOがん疼痛緩和法に関する知識や認識が十分とはいえなかった本結果(半数近くが名前のみを知っていた)は、看護師を対象とした「終末期看護」教育の必要性を示唆しているが、それが「実施されていない」と回答した者が半数以上だったことから、終末期看護の教育や周知に関する病院や管理者側の意識が、高くはない可能性が示された。石井ら⁸⁾による先行研究においても、一般病院における緩和ケアの研修率が3割前後であったと報告されていることから、本所見の信憑性は低くないと考える。

2) 終末期医療・看護に関する意識

次に、看護師の終末期医療・看護に関する意識であるが、多職種によるチームカンファレンスが有効と捉えている者が4割に満たなかったこと、ベッドサイドにいる時間も「1時間以上」を望ましいとする者が2割に満たなかったことから、終末期医療で強調されている「チーム医療」、「精神的社会的な援助を含めた総合的なケア」の観点を認識している者が多くはないことが示唆された。ただし、終末期患者の看護計画が8割以上の者で実施され、その立案時に「尊厳ある死を迎えられるようにということを看護目標にしている」という者が3割を占めたことから、おそらくは、基本的なところは抑えた終末期看護が提供されていること、尊厳死の観点も看護師によっては視野に入れていること、また、家族への援助で「声かけ、話を聞く、助言する」ことが重視されていたことから、家族までを射程に入れた終末期看護が志向されていることがうかがえた。なお、終末期看護を専門とする認定

看護師やCNSの存在を希望する者が7割を占めたことから、彼らが終末期看護における専門性を重視し、自らのその専門性向上を求めていることが示された。

3) 終末期患者の尊厳

最後に、終末期患者のうつ状態をみかける頻度は「4-5人に1人」以上と回答した者が4割以上いたことから、看護師がそのような状況にある患者を把握し得ていること、であればそこで、介入者としての役割を果たしている可能性、そうした機会を持っている可能性が示唆された。そして、終末期患者の抑うつにも連動するが、看護師の目から見て、終末期患者の中で「尊厳死を全うされた」と思う者の割合が、「ほとんどなし」ないし「1-2割」が半数を占めたことは、一般病院における終末期医療の不徹底ないし、限界を示唆するものであり、今後、看護師をはじめとする医療職者間に、終末期医療の基本的なコンセプトが十分浸透することと、そのコンセプトが実現され得る環境整備の充実が、切実に求められているといえよう。

<文 献>

- 1) 終末期医療に関する調査等検討会編. 今後の終末期医療の在り方. 東京: 中央法規出版; 2005.
- 2) 厚生省・日本医師会編. 末期医療のケアその検討と報告一. 東京: 中央法規出版; 1999.
- 3) 厚生労働省. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/05/dl/s0521-11a.pdf>
- 4) 池田千絵子. 【緩和医療の現状と展望】緩和医療の特徴と問題 平成14年度終末期医療に関する調査結

果概要について. 現代医療 2004;36:1239-44.

- 5) 松下年子, 野口海, 小林未果, 松田彩子, 松島英介. 【緩和医療におけるコミュニケーション】医師のがん告知におけるコミュニケーション. 緩和医療学 2007; 9: 47-53.
- 6) 松下年子, 野口海, 小林未果, 松田彩子, 松島英介. 中・小規模の一般病院におけるがん告知の実態調査. 総合病院精神医学 2007; 19: 61-71.
- 7) 池田正子, 千葉安代. 終末期医療に関する一考察 (2) 看護職員の終末期医療に対する意識と年齢および臨床経験との関係. 市立名寄短期大学紀要 2007; 40: 33-42.
- 8) 石井英子, 福田由紀子, 山田裕子, 城憲秀, 足立はるゑ. 終末期医療に対する看護師の認識調査ー緩和ケア経験の有無による違いー. 日本看護医療学会雑誌 2007; 9: 33-40.

<研究成果リスト>

学会発表

- 1) 松下年子, 小倉邦子, 藤村朗子, 及川泰, 齋藤啓子: 終末期医療における看護師の機能と役割ー埼玉県内の病院を対象とした実態調査ー. 第12回日本看護管理学会年次大会 (2008.8.22-23.) 一般演題発表予定
- 2) 小倉邦子, 松下年子, 藤村朗子, 齋藤啓子, 及川泰: 精神科看護師の終末期看護に関する意識調査. 第39回日本看護学会ー精神看護ー (2008.8.6-7.) 一般演題発表予定