

[原 著]

ヒト脂肪組織由来幹細胞の分離と脂肪・骨・軟骨への分化 —幹細胞の供給源としての脂肪組織—

覚道奈津子*, 鈴木 健司, 櫛田 哲史, 楠本 健司

形成外科学講座

Isolation and Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into Adipose, Bone, and Cartilage Cells

Natsuko KAKUDO, Kenji SUZUKI, Satoshi KUSHIDA, Kenji KUSUMOTO

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University

要 旨

近年、脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells; ASCs) が発見され、骨髄間葉系幹細胞と同様の多分化能をもつと報告されている。今回我々は、走査電子顕微鏡でのヒト正常脂肪組織の観察を行い、腹部皮下脂肪組織から分離した ASCs を用いた脂肪・骨・軟骨への分化誘導を行った。さらに、ハイドロキシアパタイト上に播種した ASCs に骨分化誘導を行い、3次元形状をもつ誘導骨の作成を試みた。ASCs は、脂肪・骨・軟骨すべての成熟細胞へ分化可能であることが各種特殊染色により証明され、脂肪組織は再生医療において用いられる間葉系幹細胞の供給源として有用であると考えられた。

Key words: 脂肪組織, 間葉系幹細胞, 再生医療

Abstract

Recently, human adipose-derived stem cells (ASCs) have been discovered and reported to show the same multilineage potential as bone marrow mesenchymal stem cells. In this study, we observed normal human adipose tissue using a scanning electron microscope, and induced the differentiation of ASCs isolated from abdominal subcutaneous tissue into adipose, bone, and cartilage cells. Subsequently, we induced the differentiation of ASCs seeded on hydroxyapatite into osteocytes in an attempt to promote the formation of bone with a three-dimensional morphology. We succeeded in preparing three-dimensionally cultured bone using human ASCs in the subcutaneous tissue of nude mice. It is revealed that collagen scaffolds are useful for human ASCs as a three-dimensional bone tissue engineering scaffold *in vitro* and *in vivo*. Various staining techniques demonstrated that ASCs were able to differentiate into mature adipose, bone, and cartilage cells, suggesting that adipose tissue is a useful source of mesenchymal stem cells in tissue engineering.

緒 言

脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells; ASCs) は骨髄間葉系幹細胞と同様の多分化能をもつため、脂肪組織は骨髄に代替した幹細胞の供給源であると報告されている^{1,2)}。脂肪組織は、形成

外科手術の際の余剰組織として採取することは容易であり、局所麻酔下で採取可能である。また骨髄幹細胞採取に比較して脂肪組織採取は侵襲も少なく、採取後の疼痛も極めて少なく、ドナーサイトの変形・欠損も非常に少なくなえる。このヒト ASCs の分離・分化誘導方法の確立ができ、脂肪組織が再生医療において幹細胞の普遍的供給源となれば、理想的であると考えられる。

* E-mail: kakudon@takii.kmu.ac.jp

Phone: 06-6992-1001 (内線 46224) Fax: 06-6997-0628

今回我々は、ヒト腹部皮下脂肪から分離した ASCs を用いた脂肪・骨・軟骨への分化誘導を行ったのち、ハイドロキシアパタイト上に播種した ASCs による骨分化誘導を行い、3 次元形状をもつ誘導骨の作成を試みた。ヒト ASCs の培養法における注意点と、分化誘導における興味ある知見、および幹細胞研究における ASCs の臨床的意義について文献的考察を含め報告する。

材料と方法

ヒト脂肪組織由来幹細胞の分離・培養

形成外科疾患により植皮術を施行する患者で、術前にインフォームド・コンセントが得られた 3 例 (BMI 29~35, 平均 32.3) を対象とした。ヒト脂肪組織を扱うに先だち、関西医科大学医学倫理委員会の承認を得て、遂行にはヘルシンキ宣言を遵守した。ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) に 10% 濃度の胎仔牛血清 (fetal bovine serum: FBS), 100 U/ml Penicillin G, 100 mg/ml Streptomycin を添加したものを基本培地とした。手術の余剰組織から無菌的に得られた 1 g 前後のヒト脂肪組織を採取後、PBS (phosphate buffered saline) で十分に洗浄し、血管、結合組織等を除去後、組織を細分化し、コラゲナーゼタイプ II (Sigma, ST Louis) にて 40 分 40°C にて震盪させ、組織を消化した。消化終了後、基礎培地を加えて 1,300 rpm 3 min にて遠心処理を行い、下部に沈殿した細胞ペレット (cell pellet) を新しい基礎培地の入った遠心管に移して攪拌し、洗浄した。この作業を 3 回繰り返し、十分にコラゲナーゼを洗浄する。最後に細胞成分を 100 mm のメッシュでろ過したのち、基礎培地にて 37°C, 5%CO₂ の条件下で培養を行い、3 継代したものを以下の分化誘導実験に用いた。脂肪・骨細胞への誘導は 24 well プレートに 1×10⁴ cell/well で播種した細胞を用い、軟骨細胞への誘導は遠沈管培養法¹⁰⁾ を利用した。

なお実験に用いた正常脂肪組織を 3 mm×3 mm に細切し、2.5% グルタルアルデヒド溶液にて前固定を行い、Kakudo らの方法³⁾ に従って走査電子顕微鏡標本を作成し、走査電子顕微鏡 (日立、4700-S) にて 30 倍、100 倍で観察を行った。

脂肪細胞への分化誘導

基礎培地 に 0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX), 1 mM dexamethasone, 10 mM insulin, 200 mM indomethacin を添加したものを脂肪分化誘導培地とした。コンフルエントになった ASCs を脂肪分化誘導培地にて 21 日間培養し、形態的变化を位相差顕微鏡にて毎日観察した。培地交換は 3 日ごとに行った。分化誘導 3 週間後に以下の Oil red O 染色, GPDH 活性の測定を行い、基礎培地で 21 日間培養したコントロール群と比較した。

Oil red O 染色

シャーレ内の培地を吸引し、PBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde にて 10 分間固定した。0.5% Oil red O イソプロパノール溶液と純水を 3:2 (v/v) で混合して 10 分間室温に放置し、ろ過ののち、染色液として使用した。蒸留水で洗浄後、上記染色液にて染色を室温にて 2 時間行い、顕鏡した。

GPDH 活性の測定

培養 21 日目の細胞の GPDH 活性をグリセロール 3-リン酸脱水酵素 (GPDH) 活性測定キット (TAKARA BIO INC, Japan) にて測定した。DNA 定量キット (Primary Cell Co., Ltd., Japan) を用いて同一サンプルの DNA を定量し、GPDH 活性を補正した。データは統計学的に Mann-Whitney の U 検定を行い、p<0.05 を有意差ありと判定した。

骨細胞への分化誘導

基礎培地 に 0.1 mM dexamethasone, 50 mg ascorbate-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate を添加したものを骨分化培地とした。コンフルエントになった ASCs を脂肪分化誘導培地にて 21 日間培養し、形態的变化を位相差顕微鏡にて毎日観察した。培地交換は 3 日ごとに行った。分化誘導 21 日後に Alkaline phosphatase 染色 (ALP 染色), Kossa 染色を行い、基礎培地で 21 日間培養したコントロール群と比較した。

ALP 染色

TRACP & ALP double-stain Kit (TAKARA BIO INC, Japan) を用いて ALP 染色を行った。

Kossa 染色

シャーレ内の培地を吸引し、PBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde にて 10 分間固定した。その後、5% Silver nitrate (Sigma, ST Louis) にて室温

の暗室で 10 分間染色した。蒸留水で洗浄後、UV ライトを 1 時間照射した。

3 次元培養骨の作製

コンフルエントになったヒト ASCs を 0.2% トリプシン (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) にてはがし、 1×10^6 cells/ml になるよう基礎培地にて細胞懸濁液を調製した。24 well プレート 1 well に 1 つずつ多孔体ハイドロキシアパタイト (CELLYARD HA scaffold, PENTAX, Tokyo, Japan) を入れ、細胞懸濁液を 1 ml 注ぎ、一晚 CO_2 インキュベーターにて浸漬した。細胞の接着したアパタイトを新しい 24 well プレートに 1 well につき 1 個ずつ移し、骨分化誘導培地もしくは基礎培地にて培養した。2 日に 1 回培地交換を行い、分化誘導 21 日目に ALP 染色を行った。

軟骨細胞への誘導

基礎培地に 6.25 mg/ml insulin, 10 ng/ml TGF- β 3, 50 nM ascorbate-2-phosphate を添加したものを軟骨誘導培地とした。軟骨への分化は、遠心管培養法⁴⁾にて行った。サブコンフルエントの細胞を 0.2% トリプシン (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) にてはがし、 1×10^6 cells/ml になるよう軟骨誘導培地にて細胞懸濁液を調製した。1.5 ml microfuge tube に 1 ml (1×10^6 cells/tube) ずつ分注し、1,000 rpm, 5 min 遠心を行ったのち、cell pellet を壊さないように、培養液の上澄み 500 μ l を静かに取り除いた。毎日培養液を交換し、その度ごとに 1,000 rpm, 5 min 遠心を行い、cell pellet を崩さないように注意した。キャップは気層が入るように緩めておいた。14 日間培養のちに、cell pellet を 4% paraformaldehyde にて 2 時間固定を行い 4 mm のパラフィン切片を作製し、Kakudo らの方法⁵⁾に従って Alcian Blue 染色, Collagen type II 免疫染色を行った。

結 果

走査電子顕微鏡での正常脂肪組織の観察

典型的な脂肪組織の肉眼的観察像および走査電子顕微鏡像を図 1 に示す。ヒト腹部脂肪組織は肉眼上黄色を呈しており、今回分離した ASCs は表皮より深さ 2 cm 前後の脂肪組織部 (図 1A, 矢印) より調製した。走査電子顕微鏡にて 30 倍で観察を行

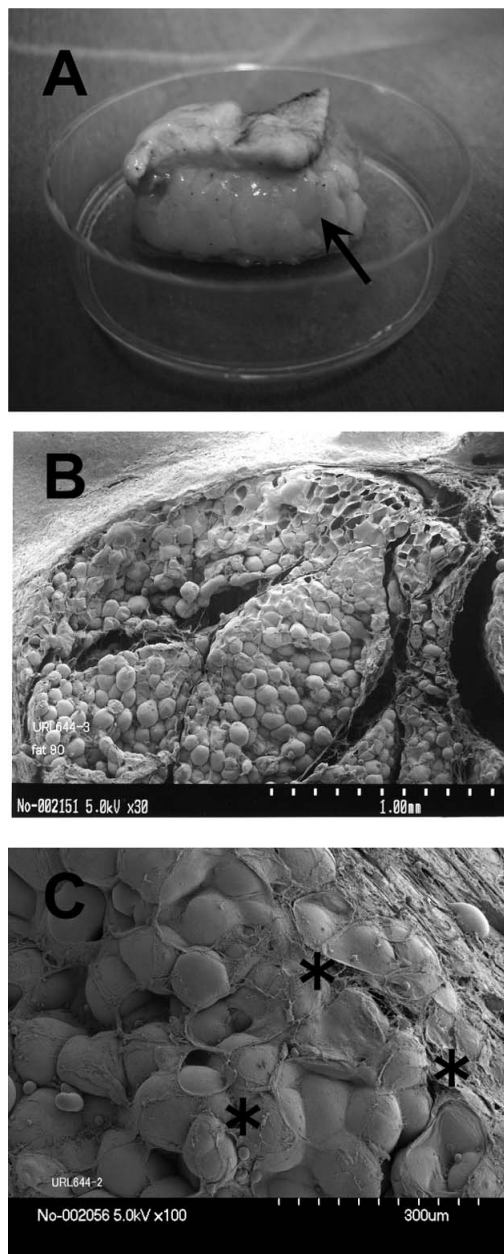


図 1 (A) ヒト腹部皮下脂肪組織 (矢印が ASCs 調製に使用した脂肪部分) (B) ヒト腹部皮下脂肪組織の走査電子顕微鏡像 ($\times 30$) (C) ヒト腹部皮下脂肪組織の走査電子顕微鏡像 ($\times 100$, *印が脂肪細胞間の未熟脂肪細胞と線維芽細胞様細胞)

う (図 1B) と、球形の成熟脂肪細胞が集まって集塊を作り、脂肪組織小葉を形成していた。小葉は血管に富む皮膜で包まれており、断面は蜂の巣状

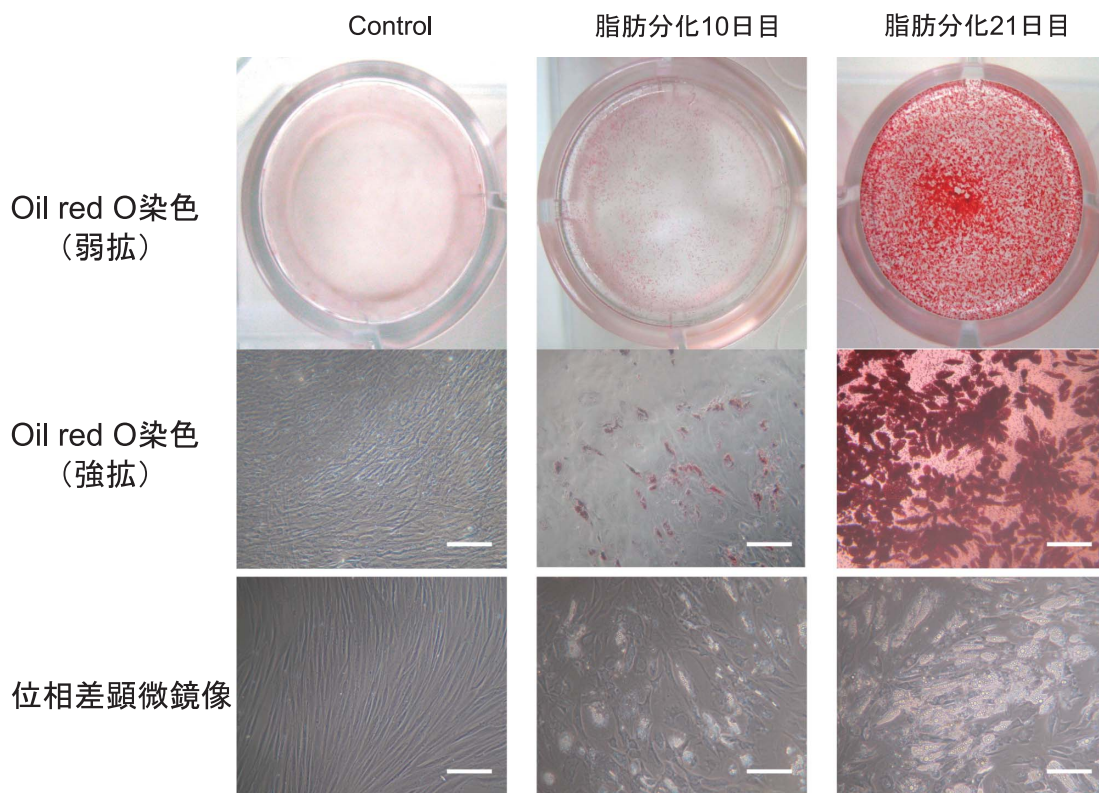


図 2 ヒト ASCs の脂肪細胞への分化 (Bar, 100 μ m)

の細胞膜の中に、脂肪滴が充満している様子も観察された。さらに拡大し 100 倍にて観察を行う (図 1C) と、成熟脂肪細胞はほぼ球形で大きさは直径約 80 μ m であり、脂肪細胞周囲は豊富な膠原線維と毛細血管で支持されており、脂肪細胞間には未熟脂肪細胞と線維芽細胞様細胞 (図 1C *印) が散見された。

脂肪細胞への分化誘導

脂肪分化誘導培地にて培養した細胞は、7 日目ごろから細胞質内に小型の脂肪滴が出現し多胞性の細胞へと変化した。この胞体は Oil red O 染色にて赤色に染色され、脂肪滴であることが確認された。培養期間が長くなるにつれて細胞質内の脂肪滴は大きくなる様子が観察された (図 2)。コントロール培地で培養したものは、線維芽細胞様の細長い形態のままであり、脂肪滴の出現は認められなかった。脂肪分化培地にて培養 21 日目の GPDH 活性は、コントロール培地の 25 倍の活性を有し

ており有意に促進していた (図 3)。3 検体から採取した ASCs のうち、3 検体とも脂肪分化誘導可能であった。

骨細胞への分化誘導

骨分化誘導培地にて培養した細胞は、7 日目ごろから線維芽細胞様の細長い形態から徐々に丸く敷石状の形態へと変化していった。14 日前後より細胞周囲に細胞外基質が分泌されはじめ、肉眼でも白色の石灰沈着を認めた。骨細胞への分化誘導を確認するため行った ALP 染色および von Kossa 染色では、培養 21 日目にて陽性の所見を呈していた。3 検体から採取した ASCs のうち、3 検体とも骨分化誘導可能であった。コントロール培地で同期間培養した細胞群では、陰性の所見であった (図 3)。

多孔体ハイドロキシアパタイトに播種した細胞群を上記と同様に ALP 染色を行うと、培養 21 日目にて陽性の所見が確認された。

GPDH活性

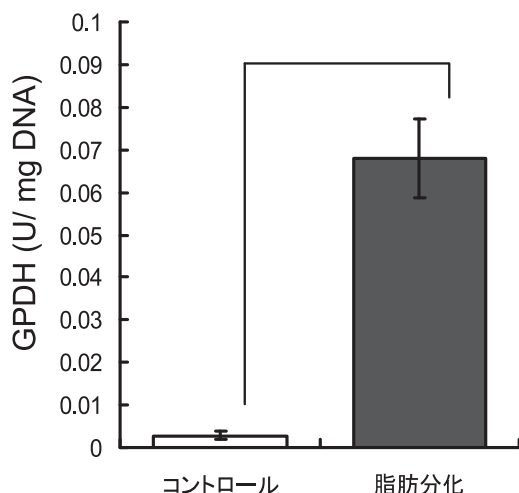


図3 ヒト ASCs の脂肪細胞への分化(21 日目)の GPDH 活性 (n=4, 3 検体 3ヶ所のサンプルに加え 1 検体は 2ヶ所よりサンプリングを行い計 4 サンプルとした.)

軟骨細胞の分化について

軟骨分化誘導培地で遠心管培養した細胞は、microfuge tube の底面で白色細胞塊を形成し、培養期間が長くなるに従い細胞塊の大きさが増大した。培養 14 日目にて軟骨細胞への分化を確認する Alcian Blue 染色, Collagen type II 免疫染色にて細胞塊は陽性所見を示した。2 検体から採取した ASCs のうち、2 検体とも軟骨分化誘導可能であった。

考 察

脂肪組織由来幹細胞 (ASCs) は、美容外科手術のひとつである脂肪吸引手術より得られた液状脂肪 (lipoaspirates) より 2001 年に初めて精製された¹⁾。今回我々は、液状脂肪ではなく、切除したブロック状の皮下脂肪組織より精製したが、既存の報告と同様に、それぞれの分化誘導培地で培養された ASCs は、脂肪・骨・軟骨すべての成熟細胞へ分化可能であることが各種特殊染色により証明された。

本実験に用いた脂肪組織は、すべて腹部の皮下脂肪を用いた。皮下組織は肉眼的には脂肪小葉と筋膜とで構成され、基本的には浅筋膜をはさん

で 2 層構造をしている。浅層は PAFS; Protective Adipofascial System (防御性脂肪筋膜系)、深層は LAFS; Lubricant Adipofascial System (潤滑性脂肪筋膜系) と呼ばれている⁶⁾。本実験に用いた脂肪は、形成外科の植皮術の際のドナーサイトから得た余剰組織で、浅筋膜より浅層の脂肪組織であるため、PAFS より精製された ASCs であると考えられる。

杉原ら⁷⁾ はヒト皮下脂肪組織 120 例を走査電顕により観察し、脂肪細胞の肥大と増殖について詳細に検討した。その結果、日本人成人普通体重者の成熟脂肪細胞は直径 70~90 ミクロンであるが、BMI 30 以上の肥満では、脂肪細胞は肥大し、脂肪細胞の間に増殖性の未熟脂肪細胞 (小型脂肪細胞と線維芽細胞様脂肪細胞) が見られたと報告した。本研究においては全ての症例で BMI 25 以上、平均 BMI が 32.3 と肥満の症例であり、脂肪細胞周囲は豊富な膠原線維と毛細血管で支持されており、脂肪細胞間には未熟脂肪細胞と線維芽細胞様細胞が散見され上記の報告に一致した。また、吉村ら⁸⁾ は同一患者の吸引脂肪と切除脂肪組織それぞれから ASCs を単離し比較をすると、吸引脂肪からは正常脂肪と比べて有意に少ない数 (平均 48 %) しか採取されないと報告した。すなわち、吸引脂肪組織は正常脂肪組織と比べると、幹細胞が相対的に欠乏している。走査電顕による脂肪組織の観察の結果、その原因として、吸引脂肪組織には、大血管が乏しいことに加え機械的な破碎や内因性の酵素反応などにより、吸引手術中や吸引瓶内での保存中に ASCs が廃液中に遊離されている可能性があるとして述べている。ASCs は脂肪組織中の血管・間質分画 (vascular stromal fraction) に含まれているとされており、脂肪組織の走査電顕像における毛細血管と膠原線維、未熟脂肪細胞と線維芽細胞様細胞の数や形態が、採取できる ASCs の数と関連がある可能性が示唆されており興味深い。

切除脂肪組織からの ASCs 採取の際のポイントとして、脂肪組織を眼科剪刀にて十分に細切すること、コラゲナーゼの消化時間を厳守すること、コラゲナーゼを十分に洗浄することが挙げられる。脂肪組織の細切が不十分であるとコラゲナーゼ消化に時間がかかるため、得られる ASCs の数が減少する。コラゲナーゼでの消化時間が長すぎ

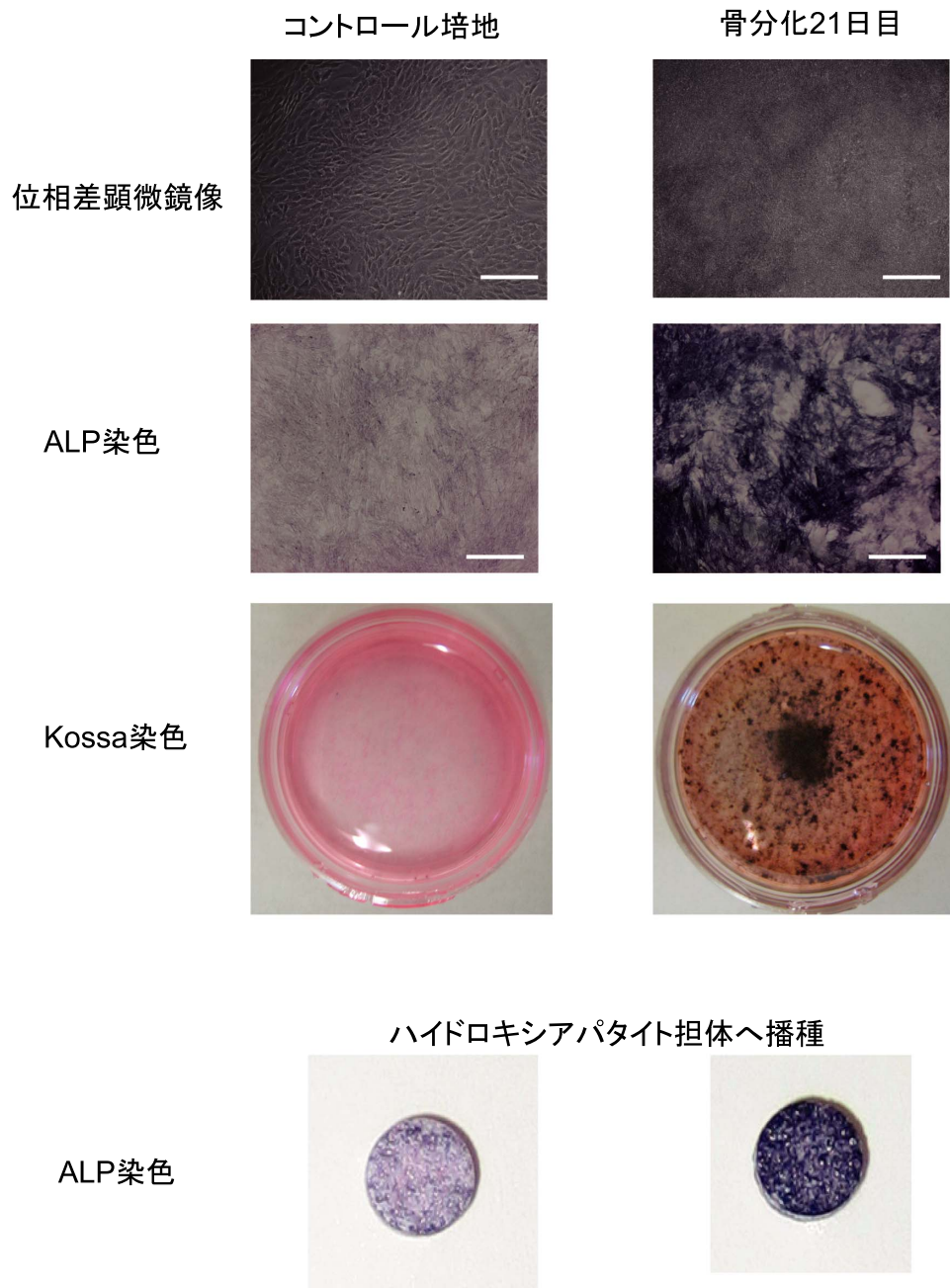


図4 ヒト ASCs の骨細胞への分化 (Bar, 100 mm), 3次元誘導骨の作製

る、またはその洗浄が不十分であると、得られる ASCs の viability が低下するので注意が必要である。また、ASCs の増殖率や分化率は、FBS のロットの影響が大きいので、必ずロットチェックを行い、細胞に適した FBS を使用する必要がある。

現在医療分野においては、外傷、疾病や老化によって失われたヒトの組織を再生させることに注目が集まっている。再生医療の成功には、特定の機能細胞への分化誘導系、医工学的な細胞増殖、分化の足場や成長因子などの徐放技術の開発など

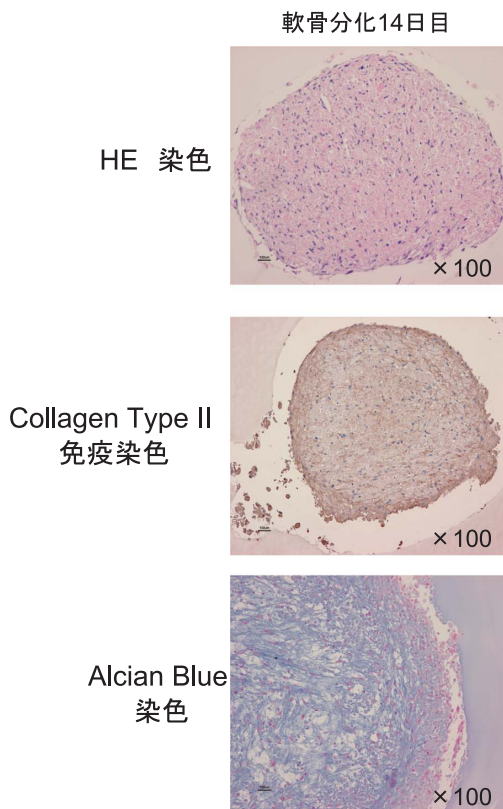


図5 ヒト ASCs の軟骨細胞への分化

が必要であるが、鍵となる必要技術の一つとして幹細胞の応用が挙げられる。幹細胞とは、自己増殖能と多分化能を兼ね備えた細胞であり、これまでは胚性幹細胞（ES 細胞）、体性幹細胞の利用が考えられていた。マウス ES 細胞株が 1981 年に樹立⁹⁾のち、ヒト ES 細胞が 1998 年に米国で初めて作成¹⁰⁾され、強力な増殖能と多分化能が明らかになりつつある。しかしながら臨床的な再生医療応用における問題点として、ヒト胚を医療に用いるという倫理的問題や、拒絶反応という障害が挙げられている。体性幹細胞は、そのような免疫拒絶がないうえに倫理的問題の少ない自己由来の細胞であり、そのなかでもこれまで基礎的・臨床的研究の先導的役割を果たしてきた細胞は、骨髓に存在する造血幹細胞、間葉系幹細胞であった。その中でも間葉系幹細胞は多系統の細胞に分化する^{11,12)}ことが示され、この骨髓由来間葉系幹細胞を用いた骨再生医療、軟骨再生医療、血管再生医療はすでに臨床研究が実地されている。しかしな

がらこの骨髓由来間葉系幹細胞は、獲得できる細胞数が非常に少なく、そのため体外培養を施さない限り一度に大量の骨髓採取を必要とする点である。したがって採取に当たっては全身麻酔を要するうえ、採取後の疼痛が避けられなく、ドナーの負担が大きい。

ところが近年、この骨髓由来間葉系幹細胞と同様の性質を有する細胞が、骨髓以外の組織にも存在する¹³⁻¹⁵⁾ことが示唆され、その中でも Zuk らは脂肪組織中に間葉系幹細胞に類似した多能性幹細胞を発見した¹⁾。脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として採取することは容易であり、局所麻酔下でも採取可能である。また骨髓幹細胞採取に比較して脂肪組織採取は侵襲も少なく、採取後の疼痛も非常に少なく、ドナーサイトの変形・欠損も非常に少なく行なえる。

本研究により我々は、ヒト腹部皮下脂肪から分離した ASCs を用いた脂肪・骨・軟骨への分化誘導法を確立したのち、ハイドロキシアパタイト上に播種した ASCs に骨分化誘導を行い、3 次元形状を有す誘導骨の作成に成功した。今後、臨床応用へむけて、*in vivo* における軟部組織・硬組織再建における条件検討を行い実用化を目指した研究を行うと同時に、遺伝子発現系、ベクター、移植デバイスの改良による安全・確実な手法への発展が期待される。

ま と め

我々はヒト腹部皮下脂肪から ASCs を分離し、分化誘導培地で培養することにより脂肪・骨・軟骨すべての成熟細胞へ分化可能であることを各種特殊染色により証明した。ハイドロキシアパタイト上に播種した ASCs に骨分化誘導を行い、3 次元形状を有する誘導骨の作成に成功した。脂肪組織は再生医療における間葉系幹細胞の供給源として有用であると考えられる。

文 献

- 1) Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. and Hedrick, M. H.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7: 211-228, 2001.
- 2) De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., Dragoo, J. L., Ashjian, P., Thomas,

- B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J. and Hedrick, M. H.: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174: 101–109, 2003.
- 3) Kakudo, N., Shimotsuma, A., Miyake, S., Kushida, S. and Kusumoto, K.: Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold: *J Biomed Mater Res A*, 84: 191–197, 2008.
- 4) Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T., Suzuki, F. and Takano, Y.: Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 9552–9556, 1988.
- 5) Kakudo, N., Wang, Y. B., Miyake, S., Kushida, S. and Kusumoto, K.: Analysis of osteochondro-induction using growth and differentiation factor-5 in rat muscle. *Life Sci*, 81: 137–143, 2007.
- 6) Nakajima, H., Imanishi, N., Minabe, T., Kishi, K. and Aiso, S.: Anatomical study of subcutaneous adipofascial tissue: a concept of the protective adipofascial system (PAFS) and lubricant adipofascial system (LAFS): *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 38: 261–266, 2004.
- 7) 杉原 甫:「脂肪細胞の増殖」第124回日本医学会シンポジウム記録集. 肥満の科学, 71–81, 2004.
- 8) 吉村浩太郎: ヒト脂肪組織由来幹細胞の基礎と臨床. 形成外科, 49: 1125–1133, 2006.
- 9) Evans, M. J. and Kaufman, M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154–156, 1981.
- 10) Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145–1147, 1998.
- 11) Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R.: Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143–147, 1999.
- 12) Umezawa, A., Maruyama, T., Segawa, K., Shadduck, R. K., Waheed, A. and Hata, J.: Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. *J Cell Physiol*, 151: 197–205, 1992.
- 13) Lee, J. Y., Qu-Petersen, Z., Cao, B., Kimura, S., Jankowski, R., Cummins, J., Usas, A., Gates, C., Robbins, P., Wernig, A. and Huard, J.: Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol*, 150: 1085–1100, 2000.
- 14) Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P. and Robey, P. G.: Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*, 153: 1133–1140, 2001.
- 15) Young, H. E., Steele, T. A., Bray, R. A., Hudson, J., Floyd, J. A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., Duenzl, M., Lucas, P. A. and Black, A. C. Jr.: Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*, 264: 51–62, 2001.

関西医科大学医学会賞

「関西医科大学医学会賞」は関西医科大学医師会の後援のもと、当該年本学で学位を授与された若手研究者を鼓舞し、更なる飛躍を期待するために設けられた賞である。

応募者は医学会賞選考委員会の厳正なる審査のもと、優秀賞と奨励賞が決定される。

平成18年は13名の応募者の内から1名に優秀賞と2名に奨励賞が交付された。

本号に掲載の受賞者研究内容を参照されたい。

医学会会長 山下 敏夫

関西医科大学医学会賞交付規程

第一章 総 則

(目的)

第1条 本規程は本学の学術研究振興を目的として、関西医科大学医学会（以下「医学会」という）が当該年度の優秀学位論文ならびに関連業績に対して褒賞するために定めた規程である。

(後援)

第2条 前条の褒賞にあたっては、関西医科大学医師会（以下「医師会」という）が後援する。

(財源)

第3条 本賞の財源としては医学会、医師会双方の予算をもってあてる。

(交付対象)

第4条 研究業績および将来性を含めて本学学術集談会での講演内容を審査して毎年若干名に交付する。

第二章 交 付 手 続

(交付申込)

第5条 本賞の応募者は医学会事務室に備え付けの所定の申込書に必要事項を記入し、関連論文3篇以内を添えて毎年1月15日迄に医学会に提出する。

第三章 選 考

(選考委員の構成)

第6条 選考委員会は、次の委員で組織する。

(1) 職務上委員となるもの

医学会会長

医学会委員長

(2) 選挙により委員となるもの

教授会 4名

助講会 5名

関西医科大学医師会 教授3名

第7条 委員の任期は2年間とし、再任を妨げない。ただし、2期を超えないものとする。

(選考委員会の開催)

第8条 毎年学術集談会開催日に選考委員会を催し講演内容と業績内容について選考を行う。

(審査会の成立)

第9条 選考委員会は選考委員の3分の2以上の出席をもって成立する。

(審査会の議長)

第10条 原則として医学会会長が議長となる。

(審査会の議決)

第11条 議決は出席選考委員の投票により決定する。

第四章 そ の 他

(本規程変更)

第12条 本規程の変更は医学会委員の3分の2以上の承認を得なければならない。

細則 1. 選考結果は毎年学術集談会終了時に発表し交付金を支給する。

なお、受賞者は関西医大誌誌上に講演内容を寄稿することとする。

付則 本規程は平成13年9月1日から施行する。

付則 本規程は平成15年10月10日から施行する。

[受賞]

膵癌の免疫機能評価

柳本 泰明

(外科学講座)

Immunological Evaluation of Circulating Dendritic Cells in Patients with Pancreatic Cancer

Hiroaki YANAGIMOTO

(Department of Surgery)

はじめに

我が国の膵癌による死亡者数は年々増加傾向にあり、癌死亡の6%を占め、年間20000人を超えた。年間罹患患者数と死亡者数がほぼ等しい最も予後の悪い固形腫瘍の代表的疾患である¹⁾。その主な原因は多くの症例が診断時既に高度の局所進展や肝転移などにより切除不能な進行例であることや、切除例であっても高率に早期再発をきたすためである。

膵癌患者の予後因子としては腫瘍因子、治療因子を中心に検討されてきたが、宿主因子としての免疫機能の評価はされていない。樹状細胞(dendritic cell: DC)はマクロファージなどとともに抗原提示細胞(antigen presenting cell: APC)として働いているが、professional APCとしてDCは癌免疫において特に重要な役割を果たしている。癌免疫の成立、すなわち腫瘍抗原を認識し抗原特異的に癌細胞を障害する細胞障害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte: CTL)の誘導には、DCが強く関わっており、最近ではDCによる抗原提示機構も明らかにされつつある。

今回我々は膵癌患者の免疫機能を評価し、進行度および予後との関連について検討した。

樹状細胞群の細胞とその特性

生体内に広く分布する樹状細胞は表現型や細胞機能において不均一な集団である。一般に、非リンパ系組織に分布するLangerhans細胞(Langerhans

cells)や間質細胞(interstitial cells)と呼ばれる樹状細胞は未熟で食作用活性を持ち、取り込んだ物質を消化分解することができる。このとき、侵入した異物やその産物あるいは炎症応答により産生されたサイトカインの作用を受けると、輸入リンパ管に入りベール細胞(veiled cells)と呼ばれる時期を経て所属リンパ器官へと移動する。そして相互連結性かん入細胞(interdigitating cells)としてT細胞領域において抗原提示を行い、特異的T細胞を活性化することにより免疫応答を誘導する。この過程において樹状細胞は細胞接着分子や共刺激分子の発現を増強するとともに、種々のサイトカインやケモカインの産生能を獲得して、より有効な抗原提示細胞となる²⁾。

樹状細胞群の細胞は大きくミエロイド系樹状細胞(DC1)とリンパ球系樹状細胞(DC2)の2群に分けられると考えられている。DC1はマクロファージや顆粒球と同一の前駆細胞に由来するのに対して、DC2は胸腺前駆細胞に由来し、リンパ球と同じ起源である。ヒトにおいては、CD11cの発現を指標に区別することができる。CD33+前駆細胞からGM-CSFの作用により誘導され、末梢非リンパ系組織に分布するCD11c+細胞がDC1、CD11c-の形質細胞様T細胞あるいは形質細胞様単球と称される細胞が未熟なDC2と考えられ、IL-3の作用により分化し、CD40Lの作用で成熟する³⁾。

対象・方法

対 象

関西医科大学附属病院外科に受診された膵癌患者を対象とし、説明文書によりインフォームドコンセントが得られた患者とした。また健康人ボランティアをコントロールとした。

方 法

担癌患者における免疫不全が DC 機能障害に起因していると仮定し、その機能障害を末梢血での量的・質的变化と規定し、健康人における DC 機能と比較検討する。採血は空腹時に患者（治療開始前）もしくは健康人の前腕皮静脈より静脈血約 30 ml をヘパリン加注射器に採取する。

リンパ球細胞数

採取した末梢血より Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) を用いた比重遠心法により分離した単核球 (peripheral blood monocyte cell, PBMC) を採取し細胞数を算定する。下記抗体 (PharMingen, San Diego, CA) を用いて各リンパ球分画を flow cytometry (FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA)) にて解析した。末梢血単核球の中で Lineage マーカー (CD3, CD14, CD15, CD16, CD19) が陰性で HLA-DR 陽性の細胞を DC とし、さらに CD11c 陽性細胞をミエロイド系 DC (DC1), CD11c 陰性細胞をリンパ系 DC (DC2) を同定した。

- ・ミエロイド系／リンパ系 DC cell (PE-Cy5-HLA-DR, FITC-*Lin, PE-CD11c)

* lineage-CD3, CD14, CD15, CD16, CD19

- ・NK cell (PE-CD14, FITC-CD56)
- ・CD 4/8 Tcell (PE-Cy5-CD3, FITC-CD4, PE-CD8)

DC の表面抗原の解析

DC の表面抗原は FITC-Lin, PE-HLA-DR, PE-Cy5-11c さらに ECD-CD40 もしくは ECD-CD86 抗体を用いて flow cytometry (EPICSRXL-MCL (Coulter, Hialeah)) にて解析を行った。結果は蛍光強度 mean fluorescence intensity (MFI) で表した。

末梢血からの DC の単離

私たちは Inaba ら⁴⁾の方法を用いて末梢血からほぼ 100%pure な DC を単離した。PBMC を anti-CD3 (HIT3a, T cell 表面認識マーカー) mAb, anti-CD14 (M5E2, Macrophage 表面認識マーカー) mAb (PharMingen, San Diego, CA) で培養した後 anti-mouse Ig coated magnetic beads (M-450; Dynal, Oslo, Norway) を用いて negative selection を行い、T 細胞やマクロファージを取り除きその細胞数を算定する。こうして得られた CD3-/CD14- 細胞をさらに anti-CD4-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) と培養し positive selection を行った結果 CD4+ 細胞が回収され、さらに PE-anti-CD11c mAb, a mixture of FITC-anti-CD3, -CD14, -CD15, -CD16, -CD19, and PE-Cy5-anti-HLA-DR mAb で培養後、EPICS ELITER flow cytometer (Coulter, Hialeah, FL) を用いて cell sorting を行い DC のみが単離される。

パルスする物質（免疫刺激物質）への反応性

A 群溶血性レンサ球菌由来 OK-432 は、頭頸部癌を含め多くの悪性腫瘍において、その有効性が確認され、広く臨床で用いられている抗腫瘍免疫療法剤であり、DC を OK-432 でパルスすると IL-12 を産生することが知られている⁵⁾。分泌された IL-12 は Th1 や細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導し⁶⁾、Th1 のインターフェロン γ (IFNγ) 分泌を

Table 1. Comparison of Lymphocyte Subsets and Dendritic Cells between Pancreatic Cancer Patients and Healthy Controls

	Control (n=20)	Patients (n=29)	P value
PBMC (cell/ml)	2.8±0.9×10 ⁶	2.7±0.8×10 ⁶	n.s
Total DC (cell/ml)	13078±7793	13347±7274	n.s
NK (%)	11.5±7.1	12.9±5.2	n.s
NK activity (%)	33.5±17.7	29±20.0	n.s
CD4 (%)	32.1±9.5	31.4±9.5	n.s
CD8 (%)	12.2±7.8	8.9±4.5	n.s
CD4/8ratio	3.5±2.2	4.8±3.1	n.s
PHA (c.p.m)	48943±26798	49091±10706	n.s

PBMC: peripheral blood mononuclear cells, NK: natural killer cells, PHA: proliferative response of T lymphocytes towards Mitogen.

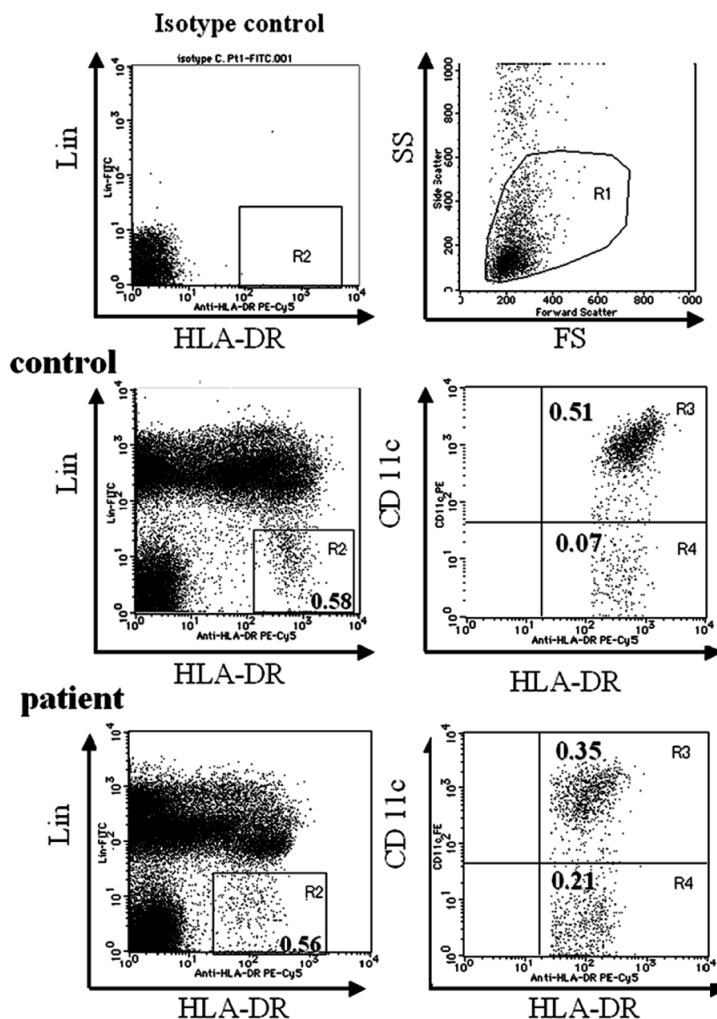


Fig. 1. Freshly isolated PBMCs were labeled with FITC-conjugated anti-CD3, CD14, CD15, CD16, and CD19 antibodies and PE-Cy5-conjugated anti-HLA-DR antibodies and PE-conjugated anti-11c antibodies. In each sample, a total of 300,000 cells were analyzed. Typical profiles of one control and one cancer patient are shown. Using light scatter properties, region R1 was defined to include lymphocytes and monocytes and exclude debris. DCs were detected as fractions of the lin-, HLA-DR+ cell population (designed R2). By gating on R2, region R3 (DC1s) describes HLA-DR+ and 11c+ cells. Region R4 (DC2s) describes HLA-DR+ and 11c- cells.

促進することが知られている⁷⁾。単離した DC1, DC2 をそれぞれ 0.01 KE/ml 濃度の OK432 と 25% monocyte conditioned medium で一昼夜パルスする。翌日培養上清中の IL-12 濃度を ELISA にて測定する。

異系リンパ球混合培養試験 (allo MLR)

Allo MLR にて T 細胞分裂刺激能を測定することにより DC の抗原提示能を評価した。単離した DC (1×10³/well) と健常者の CD14, 20 で nega-

tive selection して得られたリンパ球 (アロ T 細胞 2×10⁵/well) とを 96 穴プレートにて 4 日間混合培養後, [H+]-Thymidine (1 mCi/well: 日本原子力研究所, 茨城) を添加する。[H+]-Thymidine 添加 16 時間後に [H+]-Thymidine の取り込みを liquid scintillation counter にて計測し T 細胞の増殖反応を stimulatory index にて評価した。

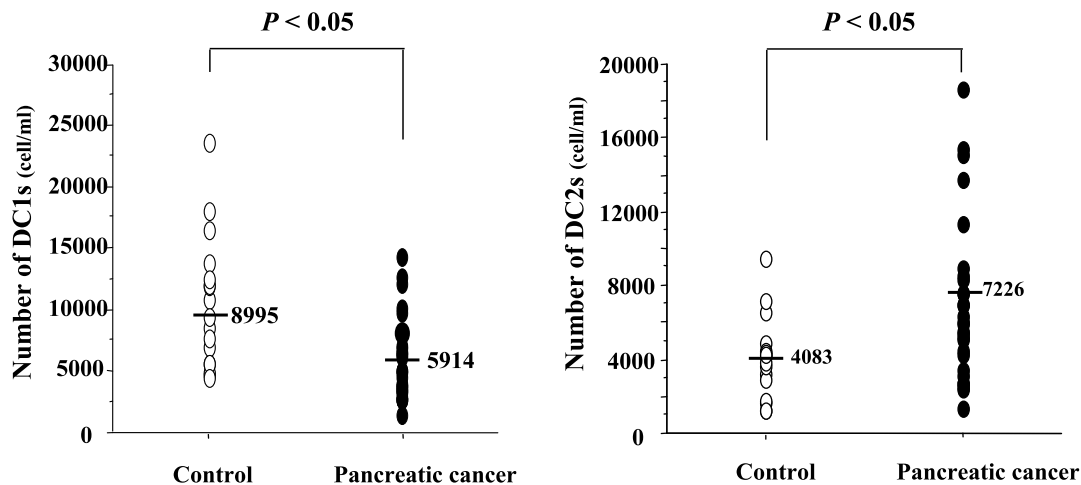


Fig. 2. Cancer patients had a significantly lower number of DC1s than did the controls ($p < 0.05$, Fig. 2A). In contrast, the numbers of DC2s were significantly higher in patients than in controls ($p < 0.05$, Fig. 2B). The mean values are expressed as bars. Statistical significance was determined by Mann-Whitney U test.

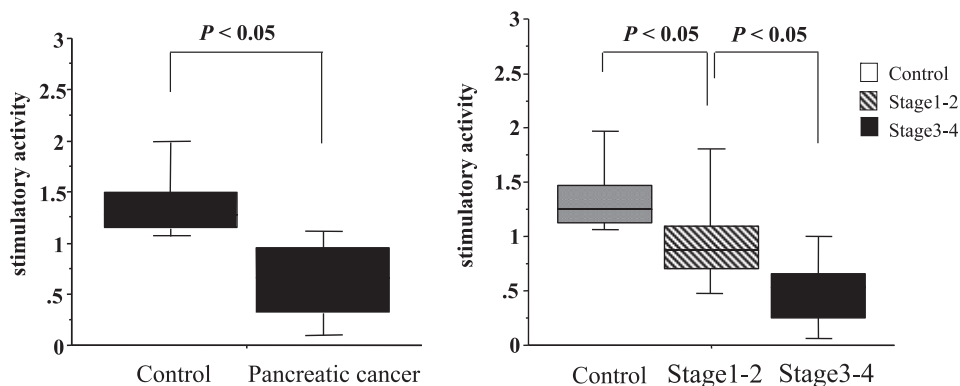


Fig. 3. A; DCs isolated from peripheral blood were tested for the ability to stimulate allogeneic T lymphocytes in a standard mixed leukocyte reaction. Patients' myeloid-lineage DCs (DC1s) demonstrated a significantly reduced ability to stimulate allogeneic control T cells as compared to those of gender and age-matched healthy controls ($P < 0.05$). The stimulatory activity was calculated by dividing the counts per minute (c.p.m) of patients or controls by the c.p.m of healthy third party volunteers. The data are expressed as a median (interquartile interval). Statistical significance was determined by Mann-Whitney U test. B; Myeloid-lineage DCs (DC1s) activity in patients with advanced disease (Stages 3–4) was significantly lower than that in patients with early stages of cancer (Stages 1–2) ($P < 0.05$).

結 果

膵癌患者と健常人との比較

末梢血 DC 細胞数

膵癌患者の末梢血中 DC 細胞数は健常者と比較して総 DC 数に有意差は認めなかった (Table 1). 典型的な DC 分画を示すフローサイトメトリーを Fig. 1 に示す. DC1 数は膵癌患者で有意に減少しており (patients: 5914 ± 3420 cell/ml, controls:

8995 ± 6617 cell/ml, $p < 0.05$, Fig. 2A), さらには DC2 数においては膵癌患者で有意に増加していた (patients: 7226 ± 4474 cell/ml, controls: 4083 ± 2189 cell/ml $p < 0.05$, Fig. 2B).

DC のアロ T 細胞に対する抗原提示能 (allo MLR)

単離した DC1 と健常者の T リンパ球を用いた培養リンパ球への活性化能を見るための allo MLR では膵癌患者では健常人と比較して有意に stim-

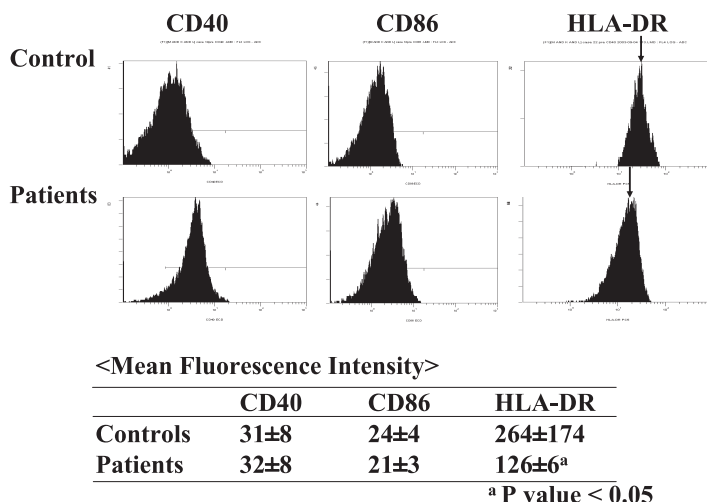


Fig. 4. Phenotypic analysis of Lin-DR+11c+ (DC1s) from cancer patients and controls was done. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

ulatory index が低下していた (patients: 0.70 ± 0.54 (1175.4 ± 814.2 c.p.m: 1×10^3 cell/DC1), controls: 1.40 ± 0.45 (2283.5 ± 1453.9 c.p.m), $p < 0.05$, Fig. 3A). さらには進行肺癌でより低下することが分かった (Stage 1-2: 1.03 ± 0.68 (1260.0 ± 468.2 c.p.m), Stage 3-4: 0.50 ± 0.34 (854.0 ± 547.4 c.p.m), $p < 0.05$, Fig. 3B).

DC1 細胞表面上の共刺激因子と HLA-DR の発現

DC の重要な働きとして細胞表面上の共刺激因子の発現増強にて抗原呈示を起こすことが知られているが、肺癌患者では健常人と比較して DC1 における HLA-DR の発現が有意に低下していることが分かった。しかし CD40/CD86 の発現においては両群間に有意な差は認められなかった (Fig. 4)。

サイトカイン (IL-12) 産生能

OK-432 によって成熟された DC は IL-12 を産生することが知られている⁵⁾。単離した DC1 を OK-432 で刺激し、その上清の IL-12 を測定した。肺癌患者では健常人と比較して DC1 からの IL-12 産生能は有意に低下していることが認められた (patients: 223 ± 178 pg/ml, control: 728 ± 422 pg/ml, $p < 0.05$, Fig. 5)。

他の免疫パラメーター

肺癌患者および健常人の両群間に末梢血単核球数 (PBMC), NK 細胞数, CD4 T リンパ球および CD8 T リンパ球数に有意差は認められなかった。

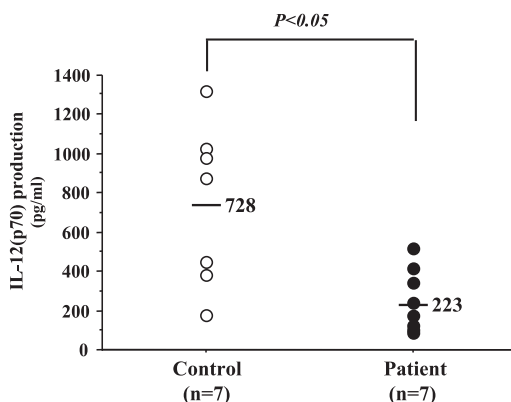


Fig. 5. Purification of DC1s and stimulating conditions were identical for pts and controls. The production of IL-12 (p70) by DC1s from patients with pancreatic cancer was significantly lower than those from healthy controls ($p < 0.05$). The mean values are expressed as bars. Statistical significance was determined by Mann-Whitney U test.

さらに NK 細胞活性、リンパ球幼若化試験においても両群間に差は認められなかった (Table 1)。

切除症例における術後再発の指標としての有用性

手術症例について検討したところ、術後 DC1, DC2 数に変化は認められなかったが DC1 機能が有意に改善することが認められた (Fig. 6A)。術後再発症例と術後無再発症例との比較において術後には両群間に差は認められなかったが、術後 1 年後の DC1 数において無再発群で有意に増加す

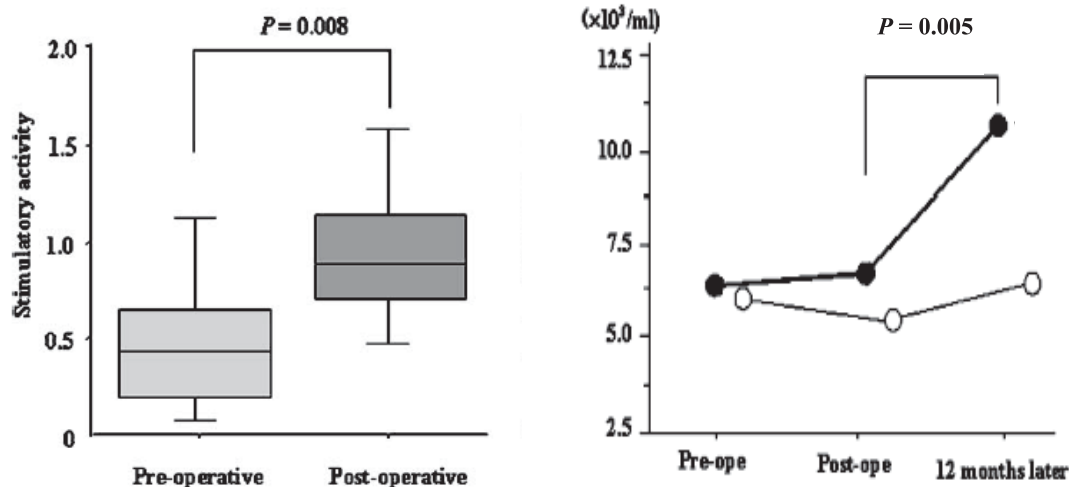


Fig. 6. A; Perioperative changes in the stimulatory capacity of cDC1. The stimulatory capacity of cDC1 significantly increased after pancreatectomy ($P=0.008$). B; Normalized cDC1 count at 12 months after pancreatectomy in disease-free patients. This figure is expressed as the change in parameters between the time of discharge and 12 months after pancreatectomy. The cDC1 count in patients who remained disease free after 12 months significantly increased at 12 months after pancreatectomy compared to that of the postoperative period ($P=0.001$), however, that in patients with recurrence or metastasis did not increase. The cDC1 count in disease-free patient at 12 months after pancreatectomy was significantly higher than that in relapsed patients. ($P=0.005$).

ることが認められた (Fig. 6B). このことから術後再発のモニタリングとしての有用性が示唆された。

考 察

我々は膵癌患者における免疫機能評価を DC に注目して行い、DC1 数の減少および DC1 機能が低下していることを示した。DC は免疫応答の中心的細胞であり、癌抗原を貪食し、効率的に抗原呈示を T 細胞に行い細胞障害性活性を獲た T 細胞が癌細胞を攻撃する。そのことから DC1 数の減少および DC1 機能の低下は癌における免疫応答全体の働きを低下させていると思われる。また担癌状態における免疫逃避機構を解明するために重要なことかもしれない。今回の検討では骨髓レベルでの DC の産生低下もしくは分化過程での障害が起こっているのか、腫瘍局所での消耗が起こっているのかについては検討していない。今後これらについての検討が必要と思われる。さらには免疫賦活するためのあらたな治療法の開発も急務であり、現在癌退縮抗原ペプチドを用いた癌免疫療法を臨床試験として施行中である⁸⁾。

文 献

- 1) 日本膵臓学会膵癌登録委員会：日本膵臓学会膵癌登録 20 年間の総括。膵臓, 18: 101-169, 2003.
- 2) Banchereau, J. and Steinman, R. M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245, 1998.
- 3) 稲葉カヨ, 稲葉宗夫：樹状細胞による抗原提示機構。医学のあゆみ, 192: 873, 2000.
- 4) Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. and Ikehara, S.: A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol*, 163: 1409, 1999.
- 5) Toyokawa, H., Inaba, M., Takai, S., Sato, S., Beuth, J., Ko, H. L., Matsui, Y., Kwon, A. H., Kamiyama, Y. and Ikehara, S.: Enhancement of circulating dendritic cell activity by immunomodulators (OK432 and KP-40). *Anticancer Res*, 22: 2137, 2002.
- 6) Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G.: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, 184: 747, 1996.
- 7) Mehrotra, P. T., Wu, D., Crim, J. A., Mostowski, H. S. and Siegel, J. P.: Effects of IL-12 on the generation of

- cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*, 151: 2444, 1993.
- 8) Yanagimoto, H., Mine, T., Yamamoto, K., Sato, S., Terakawa, N., Takahashi, K., Nakahara, K., Honma, S., Tanaka, M., Mizoguchi, J., Yamada, A., Oka, M., Kamiyama, Y., Itoh, K. and Takai, S.: Immunological evaluation of personalized peptide vaccination with gemcitabine for pancreatic cancer. *Cancer Sci*, 98: 605, 2007.
- 9) Yanagimoto, H., Takai, S., Sato, S., Toyokawa, H., Takahashi, K., Terakawa, N., Kwon, A. H. and Kamiyama, Y.: Impaired function of circulating dendritic cells in patients with pancreatic cancer. *Clin Immunol*, 114: 52, 2005.
- 10) Takahashi, K., Toyokawa, H., Takai, S., Sato, S., Yanagimoto, H., Terakawa, N., Araki, H., Kwon, A. H. and Kamiyama, Y.: Surgical influence of pancreatectomy on the function and count of circulating dendritic cells in patients with pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 55: 775, 2006.

[受賞]

哺乳類蝸牛の外有毛細胞における膜輸送

金子 敏彦

(耳鼻咽喉科学講座)

Membrane Traffic in Outer Hair Cells of the Adult Mammalian Cochlea

Toshihiko KANEKO

(Department of Otolaryngology)

はじめに

蝸牛の感覚細胞として2種類の有毛細胞、内有毛細胞と外有毛細胞が存在する。音信号は内有毛細胞より求心性繊維を通じて経路して伝えられる。外有毛細胞は能動的運動能を持ち音信号を増幅するとされている (Dallos & Harris, 1978)。外有毛細胞は少なくとも70 kHzまでの周波数に反応して機械的な力を発生する (Frank *et al.*, 1999)。その能動的運動は外有毛細胞側壁に高密度 (少なくとも $7,500/\mu\text{m}^2$, Huang & Santos-Sacchi, 1993) に存在するプレスチンによっておこる (Zheng *et al.*, 2000)。しかし、外有毛細胞のプレスチンの代謝はほとんど解明されていない。

近年、蛍光色素 FM1-43 を用いて endocytosis の機能を検討した論文が多く見られる。FM1-43 は可逆的に脂質二重層に結合し、細胞膜に結合している間に endocytosis によって取り込まれることにより、小胞の可視化を可能とする。内耳の有毛細胞頂部における endocytosis は非常に早く、rapid endocytosis と呼ばれ注目を集めている (Meyer *et al.*, 2001; Griesinger *et al.*, 2002, 2004)。Rapid endocytosis は内分泌細胞で有名な現象であり、細胞内 Ca^{2+} /Calmodulin によって制御されていると考えられている。今回の報告においては、rapid endocytosis によって取り込まれた細胞膜の運搬先、そして、細胞内 Ca^{2+} /Calmodulin の影響を検討した。

方 法

外有毛細胞の単離

200–400 g の有色モルモットから外有毛細胞を単離した。側頭骨を取り出し冷却したハンクス氏液 (4°C) に保存し、実験を行う直前に側頭骨より外有毛細胞を単離した。poly-L-lysine によってコーティングされた coverslip 上の 1.0 ml ハンクス氏液内に外有毛細胞を含むコルチ器を置き、100- μL のマイクロピペットを用いて機械的に単離、その後 coverslip に定着するように 10 分間放置した後、実験を行った。なお、外有毛細胞は健康な状態に見える細胞のみを使用した。また、すべての実験は $21.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の室温に調節された環境で行われた。

蛍光色素

endocytosis や transcytosis を調べるため、蛍光色素 FM1-43 (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) を用いた。dimethylsulphoxide を用いて作られた 20 mM のストック溶液を -20°C で保存した。実験直前にハンクス氏液にて 20 μM の最終濃度に調節した。FM1-43 は borosilicate glass capillary (GC150F-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) に満たし、pressure application にて細胞に局所投与した (Transjector 5246, Eppendorf)。キャピラリーの先端は 2.5 μm に調節し (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, Germany)、キャピラリー先端はマイクロマニピュレーターに

て細胞中央部から約 40 μm の位置に合わせた (Mini 25, Luigs and Neumann, Ratingen, Germany). この方法によって局所投与することにより FM1-43 は細胞全体を包み込む様に投与される. なお, 先端の位置 (頂部, 中央部, 底部) による細胞内蛍光信号への影響はなかった.

薬剤付加

rapid endocytosis は細胞内への Ca^{2+} 流入がトリガーと考えられている (Neher & Zucker, 1993; Artalejo *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2001; Griesinger *et al.*, 2002, 2004). 細胞内 Ca^{2+} 依存性を調べるため, 細胞内 Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM を用いた. BAPTA-AM (25 μM) を 30 分間付加し, ハンクス氏液にて wash out した後 FM1-43 を局所投与した. また Calmodulin の影響を調べるため, Calmodulin 依存性リン酸抑制剤である Trifluoperazine (TFP; 20 μM ; Levin & Weiss, 1978; Cook *et al.*, 1994; Vondonselaar *et al.*, 1994) を 15 分間付加し, wash-out せずに FM1-43 を投与した.

共焦点レーザスキャン顕微鏡

蛍光の観察には Zeiss 社の共焦点レーザスキャン顕微鏡 LSM510 を用いた (Oberkochen, Germany). 正立型顕微鏡 Axioskop 2 FS MOT に対物レンズには Zeiss 40 $\times$ (IR-achnoplan, water-immersion lens NA0.8, WD 3.61 mm) を用いた. FM1-43 の蛍光は 480 nm のアルゴンレーザーにて励起され, 505 nm 以上のロングパスフィルターを用いて観察をした. 観察した画像は 12 ビットで 256 $\times$ 512 ピクセルか 512 $\times$ 512 ピクセルの解像度で保存した. 蛍光信号の解析には Zeiss LSM510, フォトショップ 6.0 (Adobe), Origin 7 (Origin Lab) を用いた.

結 果

細胞内輸送

円筒形の外有毛細胞における細胞内輸送を詳細に検討した. 図 1A に示す細胞内各部位における FM1-43 の蛍光変化を観察した. 蛍光の経時変化を図 1B に示した. ピペットを用いて FM1-43 を 30 秒間, 300 秒毎に局所投与を 3 回試みた. stereocilia を含む細胞膜の部位では投与直後より蛍光強度は上昇し, FM1-43 投与中止後は速やかに exponentially に低下が見られ, ほぼ投与前の強

度になった. infracuticular zone (細胞頂部, 細胞内) においては FM1-43 投与中止後も蛍光強度の上昇が見られ 30 秒程で信号強度の exponentially な減少が始まった. しかし, 蛍光強度は次の色素付加までに initial level にまでは低下しなかった.

細胞底部 (細胞核近傍) における蛍光強度の変化は特徴的で, 蛍光強度は徐々に上昇し続けた. 細胞底部における蛍光は hot spot 等も見られず均一である (図 1D). FM1-43 投与後の急激な蛍光強度上昇も見られないことから, この部位での蛍光強度の上昇は外有毛細胞頂部で取り込まれた小胞が底部に transport されていると考えられる.

細胞内輸送速度

図 1A, C に示すように外有毛細胞長軸に沿って細胞内の何ヶ所か調べると, 頂部から底部にいくにつれ, 蛍光強度上昇の開始点の遅延が見られた. これにより細胞内輸送速度を $0.37 \pm 0.01 \mu\text{m/s}$ と計算することが可能であった. 15 の細胞からの平均では $0.36 \pm 0.03 \mu\text{m/s}$ であった.

細胞内 Ca^{2+} /Calmodulin 依存性 rapid endocytosis

我々は細胞内 Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM と calmodulin 阻害剤 TFP を用いた. 両者ともコントロールの実験に比較して, rapid endocytosis を著明に抑制した (図 2). この結果により, rapid endocytosis は細胞内 Ca^{2+} /Calmodulin により制御されていることが解った.

考 察

rapid endocytosis と細胞内輸送

我々は細胞頂部より取り込まれた小胞がヘンゼン体, 細胞側壁そして細胞核近傍の細胞底部に輸送されることを示した. Kachar (1997) は電子顕微鏡を用いてウシガエルの前庭有毛細胞の頂部を観察し, 2 種類の小胞; clathrin-coated pits と non-clathrin-coated pits を発見した. rapid endocytosis は clathrin を必要としない現象と考えられており (Artalejo *et al.*, 1995), 小胞形成必要な時間はわずか 1 秒以下と考えられている. 一方, clathrin-dependent endocytosis では小胞形成に数百秒の時間が必要である (Henkel & Almers *et al.*, 1996). Griesinger (2004) は外有毛細胞において, clathrin-dependent endocytosis と non-clathrin-dependent

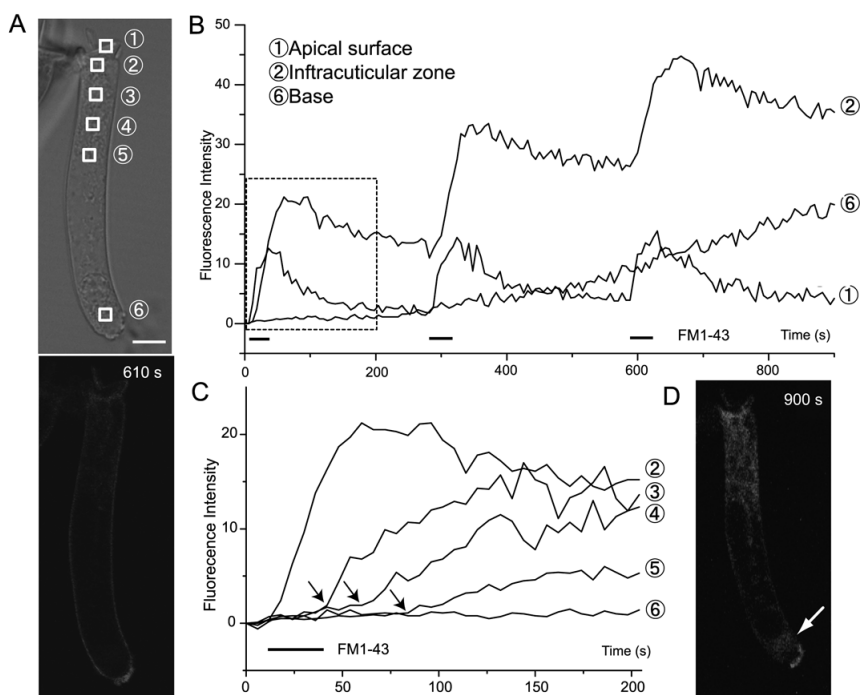


図1 FM1-43 付加による蛍光の経時変化。(A) 上図; 蛍光を付加した細胞。下図; 610 秒における蛍光変化。細胞全体と内部に蛍光が見られる。スケールバーは 10 μm 。(B) FM1-43 は 30 秒間、300 秒ごとに付加した。stereocilia を含む細胞膜の部位では投与直後より蛍光強度は上昇し、FM1-43 投与中止後は速やかに exponentially に低下が見られ、ほぼ投与前の強度になった (①)。infracuticular zone (細胞頂部、細胞内) においては FM1-43 投与中止後も蛍光強度の上昇が見られ 30 秒程で信号強度の exponentially な減少が始まった。しかし、蛍光強度は次の色素付加までに initial level にまでは低下しなかった (②)。細胞底部 (細胞核近傍) における蛍光強度の変化は特徴的で、蛍光強度は徐々に上昇し続けた (⑥)。(C) ヘンゼン体 (頂部) から細胞核 (底部) になるにつれて、蛍光上昇開始点の遅延が見られる (②~⑥)。細胞内の小胞の移動速度が計算可能となる ($0.37 \pm 0.01 \mu\text{m/s}$)。この図は (B) の点線の部分を拡大している。(D) 900 秒の時点の蛍光変化。細胞核近傍 (底部) に色素の集積が見られる (矢印)。

endocytosis の両方が存在する事を示した。我々は clathrin-dependent endocytosis については検討していないが、今回の実験では細胞内の蛍光観察に 1 秒以下の時間しか必要としておらず、我々が観察した endocytosis は clathrin-independent である rapid endocytosis と考えられる。

我々が今回観察した細胞内運搬速度 $0.36 \pm 0.03 \text{ mm/s}$ (n15) は微小管に沿った細胞内運搬の過去の報告に一致する (Nakata *et al.*, 1998; Toomre *et al.*, 1999; Kipp & Arias, 2002; Mundy *et al.*, 2002)。微小管は一般的に細胞内小胞の運搬に重要な役割を果たしていると考えられている (Kachar *et al.*, 1997)。外有毛細胞でも微小管は細胞全体に見られ特に細胞頂部、細胞底部により多く存在することが確認されている (Furness *et al.*, 1990)。以上

より我々の観察した細胞内小胞の移動は微小管に沿った現象と考えられる。

Ca^{2+} /Calmodulin の影響

カルシウムの細胞内流入は rapid endocytosis のトリガーと考えられている (Neher & Zucker, 1993; Artalejo *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2001; Griesinger *et al.*, 2002, 2004)。細胞内 Ca^{2+} キレーター BAPTA-AM を用いた実験では、細胞内 Ca^{2+} 濃度低下では rapid endocytosis の活動性が低下する事を確認した。rapid endocytosis では calmodulin は Ca^{2+} レセプターとして働く可能性の有ることが示唆されている (Artalejo *et al.*, 1996)。我々は今回 calmodulin inhibitor である TFP を用いて rapid endocytosis の抑制を確認した。

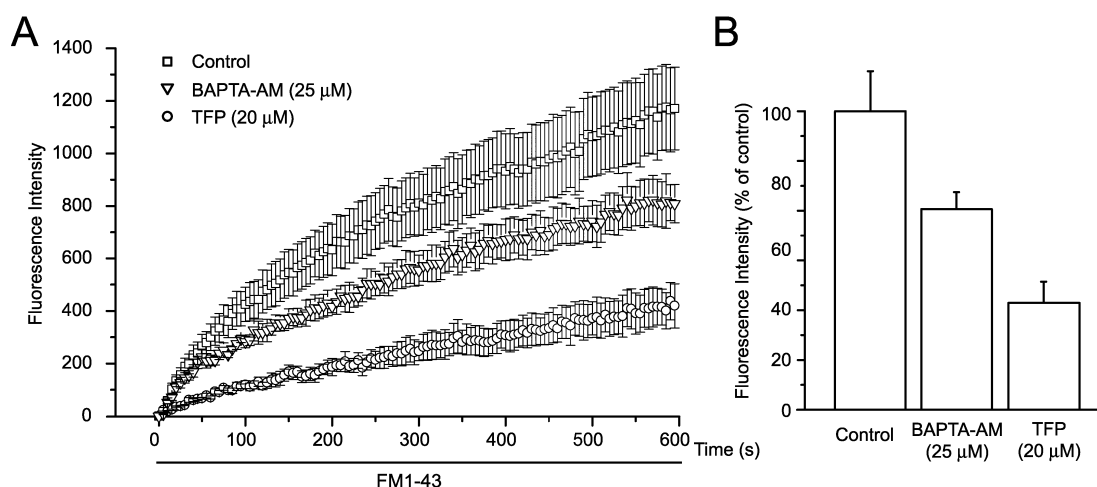


図2 細胞内 Ca^{2+} キレーターと Calmodulin 阻害剤による蛍光上昇の抑制. 細胞内 Ca^{2+} は BAPTA-AM (25 μM) によってキレートされた. Calmodulin は Trifluoperazine (TFP; 20 μM) によって阻害されている. 蛍光変化はヘンゼン体の領域で計測した. (A) 蛍光の経時変化 (Control n6; BAPTA-AM n4; TFP n4). (B) 600 秒の地点における蛍光変化. 両薬剤共に蛍光強度の抑制が見られる.

rapid endocytosis の役割

これまで transcytosis によって運搬される様々な物質が同定されている (Tuma & Hubbard, 2003). 細胞膜タンパク質は一定の寿命を持っており, それゆえ持続的に交換される必要がある. Endocytosis, exocytosis は細胞膜タンパク質代謝に関わるメカニズムであることが知られている. 過去の報告では細胞側壁に存在するプレスチンは非常に高密度であり (Huang & Santos-Sacchi, 1993), 活発なタンパク質代謝が必要と考えられている (Meyer *et al.*, 2001; Griesinger *et al.*, 2004). rapid endocytosis はこのプレスチンのリサイクリングに関わっているかもしれないと考察されている. 実際, 今回の報告において endocytosis によって取り込まれた細胞膜は, 細胞頂部からタンパク質代謝に関わる ER やゴルジ体の集合体であるヘンゼン体 (Saito, 1983) への運搬される事を確認している.

rapid endocytosis の役割として我々は神経伝達物質の運搬という可能性も考えている. 神経伝達物質のグルタミン酸塩とアスパラギン酸塩は有毛細胞に存在するだけでなく, 周辺の細胞にも存在する (Altschuler *et al.*, 1989; Usami & Ottersen, 1996). また有毛細胞の支持細胞であるダイテルス細胞には glutamate-aspartate transportor (GLAST)

の存在が確認されている (Furness *et al.*, 2002). また, グルタミン酸塩とアスパラギン酸塩の濃度は perilymph に比して endolymph に非常に高いことが示されている (Thalmann *et al.*, 1981). グルタミン酸塩やアスパラギン酸塩は神経伝達物質としてだけでなく, 細胞運動のエネルギー源としても重要と考えられている (Erecinska & Silver, 1990; Usami & Ottersen, 1996; Ottersen *et al.*, 1998). もしかするとグルタミン酸塩とアスパラギン酸塩は, 外有毛細胞においては高周波数に伴う運動エネルギー源として, 内毛細胞においては, その運動能にを反映した神経伝達物質として必要ではないかと考察する.

いずれにせよ, 今回報告した細胞内輸送によって運搬される物質を同定することが次の大きな目標である.

文 献

- 1) Altschuler, R. A., Sheridan, C. E., Horn, J. W. and Wenthold, R. J.: Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hear Res*, 42: 167–173, 1989.
- 2) Artalejo, C. R., Elhamdani, A. and Palfrey, H. C.: Calmodulin is the divalent cation receptor for rapid endocytosis, but not exocytosis, in adrenal chromaffin cells. *Neuron*, 16: 195–205, 1996.

- 3) Artalejo, C. R., Henley, J. R., McNiven, M. A. and Palfrey, H. C.: Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca^{2+} , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 8328–8332, 1995.
- 4) Cook, W. J., Walter, L. J. and Walter, M. R.: Drug binding by calmodulin: crystal structure of a calmodulin-trifluoperazine complex. *Biochemistry*, 33: 15259–15265, 1994.
- 5) Dallos, P. and Harris, D.: Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol*, 41: 365–383, 1978.
- 6) Erecinska, M. and Silver, I. A.: Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 35: 245–296, 1990.
- 7) Frank, G., Hemmert, W. and Gummer, A. W.: Limiting dynamics of high-frequency electromechanical transduction of outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 4420–4425, 1999.
- 8) Furness, D. N., Hackney, C. M. and Steyger, P. S.: Organization of microtubules in cochlear hair cells. *J Electron Microsc Techn*, 15: 261–279, 1990.
- 9) Furness, D. N., Hulme, J. A., Lawton, D. M. and Hackney, C. M.: Distribution of the glutamate/aspartate transporter GLAST in relation to the afferent synapses of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*, 3: 234–247, 2002.
- 10) Griesinger, C. B., Richards, C. D. and Ashmore, J. F.: FM1-43 reveals membrane recycling in adult inner hair cells of the mammalian cochlea. *J Neurosci*, 22: 3939–3952, 2002.
- 11) Griesinger, C. B., Richards, C. D. and Ashmore, J. F.: Apical endocytosis in outer hair cells of the mammalian cochlea. *Eur J Neurosci*, 20: 41–50, 2004.
- 12) Henkel, A. W. and Almers, W.: Fast steps in exocytosis and endocytosis studied by capacitance measurements in endocrine cells. *Curr Opin Neurobiol*, 6: 350–357, 1996.
- 13) Huang, G. and Santos-Sacchi, J.: Mapping the distribution of the outer hair cell motility voltage sensor by electrical amputation. *Biophys J*, 65: 2228–2236, 1993.
- 14) Kachar, B., Battaglia, A. and Fex, J.: Compartmentalized vesicular traffic around the hair cell cuticular plate. *Hear Res*, 107: 102–112, 1997.
- 15) Kipp, H. and Arias, I. M.: Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu Rev Physiol*, 64: 595–608, 2002.
- 16) Levin, R. M. and Weiss, B.: Specificity of the binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of phosphodiesterase and to a series of other calcium-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 540: 197–204, 1978.
- 17) Meyer, J., Mack, A. F. and Gummer, A. W.: Pronounced infracuticular endocytosis in mammalian outer hair cells. *Hear Res*, 161: 10–22, 2001.
- 18) Mundy, D. I., Machleidt, T., Ying, Y. S., Anderson, R. G. and Bloom, G. S.: Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 115: 4327–4339, 2002.
- 19) Nakata, T., Terada, S. and Hirokawa, N.: Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol*, 140: 659–674, 1998.
- 20) Neher, E. and Zucker, R. S.: Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, 10: 21–30, 1993.
- 21) Ottersen, O. P., Takumi, Y., Matsubara, A., Landsend, A. S., Laake, J. H. and Usami, S.: Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Prog Neurobiol*, 54: 127–148, 1998.
- 22) Saito, K.: Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: subsurface cisternae and lamellar bodies in the outer hair cells. *Cell Tissue Res*, 229: 467–481, 1983.
- 23) Thalmann, R., Comegys, T. H., DeMott, J. E. and Thalmann, I.: Steep gradients of amino acids between cochlear endolymph and perilymph. *Laryngoscope*, 91: 1785–1791, 1981.
- 24) Toomre, D., Keller, P., White, J., Olivo, J. C. and Simons, K.: Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci*, 112: 21–33, 1999.
- 25) Tuma, P. L. and Hubbard, A. L.: Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev*, 83: 871–932, 2003.
- 26) Usami, S. and Ottersen, O. P.: Aspartate is enriched in sensory cells and subpopulations of non-neuronal cells in the guinea pig inner ear: a quantitative immunoelectron microscopic analysis. *Brain Res*, 742: 43–49, 1996.
- 27) Vandonselaar, M., Hickie, R. A., Quail, J. W. and Delbaere, L. T.: Trifluoperazine-induced conformational change in Ca^{2+} -calmodulin. *Nat Struct Biol*, 1: 795–801, 1994.
- 28) Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D. and Dallos, P.: Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405: 149–155, 2000.

[受賞]

虚血肢における M-CSF の血流改善機序

中野 景司

(小児科学講座)

Mechanisms Underlying Acceleration of Blood Flow Recovery in Ischemic Limbs by Macrophage Colony-Stimulating Factor

Keiji NAKANO

(Department of Pediatrics)

要 約

近年, Minamino らはマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) が血管内皮前駆細胞 (EPC) を骨髄から末梢血に動員することにより虚血部位の血管数が増加し, 血流が改善することを報告した. 今回筆者らは M-CSF の EPC 動員のメカニズムについて研究をおこなった. M-CSF はその受容体を発現している骨髄細胞, 特に骨髄球系細胞に作用し, それらの細胞からの血管内皮成長因子 (VEGF) の産生を増加させた. In vivo で抗 VEGF 抗体を投与すると, M-CSF による血流改善効果と EPC 動員効果が阻害された. これらの結果から M-CSF は骨髄内の骨髄球系細胞から産生される VEGF を介して EPC を骨髄内から虚血部位に動員することにより, 血流を改善させるということがわかった.

はじめに

Asahara らは, 血管内皮に分化しうる EPC が骨髄中や末梢血中に存在することを報告した^{1,2)}. これらの発見をもとに, Tateishi や Yuyama らは閉塞性動脈硬化症やパーチャー病患者に骨髄単核球を用いることで虚血肢の血流を改善させるだけでなく, 潰瘍や疼痛も減少させることを報告した³⁾. その後, 骨髄細胞移植が虚血性心疾患にも有効であることも報告された⁴⁾.

現在 3 種のコロニー刺激因子 (G-CSF: 顆粒球コロニー刺激因子, M-CSF: マクロファージコロニー刺激因子, GM-CSF: 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) が知られている. G-CSF と GM-CSF については骨髄細胞を刺激して造血系前駆細胞や EPC を動員することが報告されている⁵⁻⁸⁾. G-CSF は虚血性心疾患に対し既に臨床応用されているが, その効果は賛否両論である⁹⁻¹²⁾.

近年, 本学病理学第一講座の Minamino と Adachi らが, G-CSF と同様に M-CSF にも骨髄から末梢血に EPC を動員する働きがあることを報告した¹³⁾. G-CSF による EPC の動員には CXCR4 と SDF-1 の

down regulation が関わっていると報告されているが¹⁴⁾, M-CSF の作用機序は解明されていない. 本研究では血管新生に重要な役割を担う VEGF に注目し, M-CSF の血流改善機序を解析した.

材料と方法

実験動物

清水実験材料より供給された C57BL/6 マウス (B6 マウス) 6~8 週齢の雄を使用した.

試薬

CD3, CD19, CD11b, CD11c, Ter119, CD45, Flk-1, NK1.1 に対する抗体は BD Bioscience 社の製品を使用した.

CD115 (M-CSF 受容体) に対する抗体は eBioscience 社の製品を使用した. 抗 VEGF 抗体は Lab Vision 社の製品を使用した.

Human G-CSF は中外製薬株式会社から, Human M-CSF は森永乳業株式会社から提供されたものを使用した.

下肢虚血モデルの作成

B6 マウスの右側鼠径部皮膚を切開し、鼠径動静脈を結紮・離断したのち皮膚を縫合する。その後、後述のレーザードップラーを用いて処置肢の血流途絶を確認する¹⁵⁾。

G-CSF, M-CSF, 抗 VEGF 抗体の投与

M-CSF および G-CSF をそれぞれ 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ずつ腹腔内投与する。抗 VEGF 抗体は 250 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を腹腔内投与する。

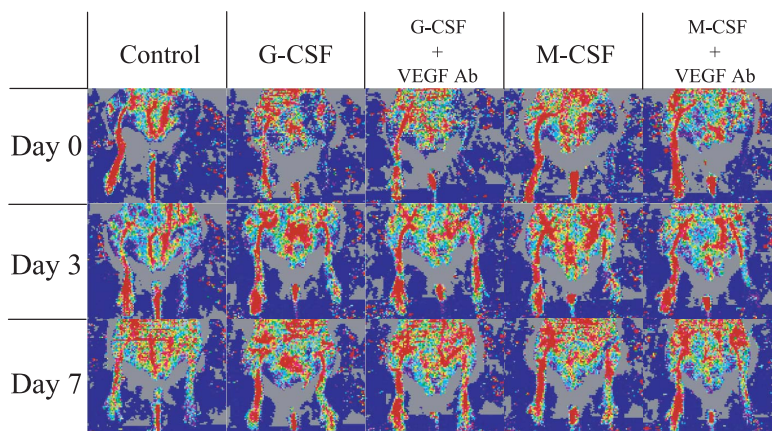
レーザードップラー法による血流測定

マウスの下肢を剃毛し pentobarbital で麻酔する。コルクボードに固定し、Laser Doppler Perfusion Image analyzer (Moor Instruments 社) を用いて血流を測定した¹⁵⁾。それにより得た血流分布画像を虚血肢/健常肢の血流比として数値化した。

細胞培養

培養液として RPMI1640 (10%FCS 含有) を使用し CO2 インキュベータ内で培養した。M-CSF 添

A



B

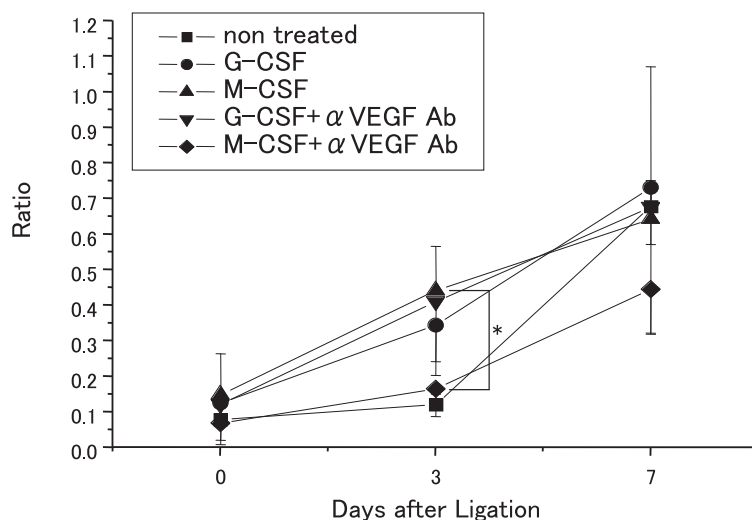


図 1

加群には培養液中に 10 ng/ml となるよう M-CSF を添加した。

また、骨髓中の各種細胞の分離には Ter119, Gr-1, Mac-1, CD19 の蛍光抗体で標識した骨髓細胞を EPICS ALTRA (Beckman Coulter 社) を用いて選別し、同条件で培養した。

ELISA による VEGF 濃度の測定

Quantikine Mouse VEGF immunoassay kit (R&D systems 社) を用いて血清および培養上清中の VEGF 濃度を測定した。

フローサイトメトリー

細胞表面抗原の解析には、FACScan (Becton and Dickinson 社) を使用した。また、本研究においては、EPC を Flk-1 陽性 /CD45 陰性 /Ter119 陰性の細胞と定義した¹⁷⁾。

結 果

実験1：抗 VEGF 抗体は G-CSF ではなく M-CSF の血流改善効果を阻害する

図 1 に示す 5 群を設定した。Day 0 に下肢虚血モデルマウスを作成し、抗 VEGF 抗体は Day 0 のみに、G-CSF および M-CSF は Day 0, 1, 2 に投与した。Day 0, 3, 7 に血流を測定した。図 1A にレーザードップラーで得た血流イメージを、図 1B に血流イメージから解析した虚血肢/健常肢比をグラフに示す。抗 VEGF 抗体を投与した群では M-CSF の血流改善効果が抑制されるが、G-CSF の効果は抑制されなかった。この結果から、M-CSF は VEGF を介して血流を改善させるということがわかった。また、G-CSF の血流改善効果に関しては CXCR4 と SDF-1 とを介するメカニズムが報告されているが、本結果とは矛盾しなかった。

実験2：骨髓細胞における M-CSF 受容体の発現

マウスの骨髓を採取し、M-CSF 受容体 (CD115)

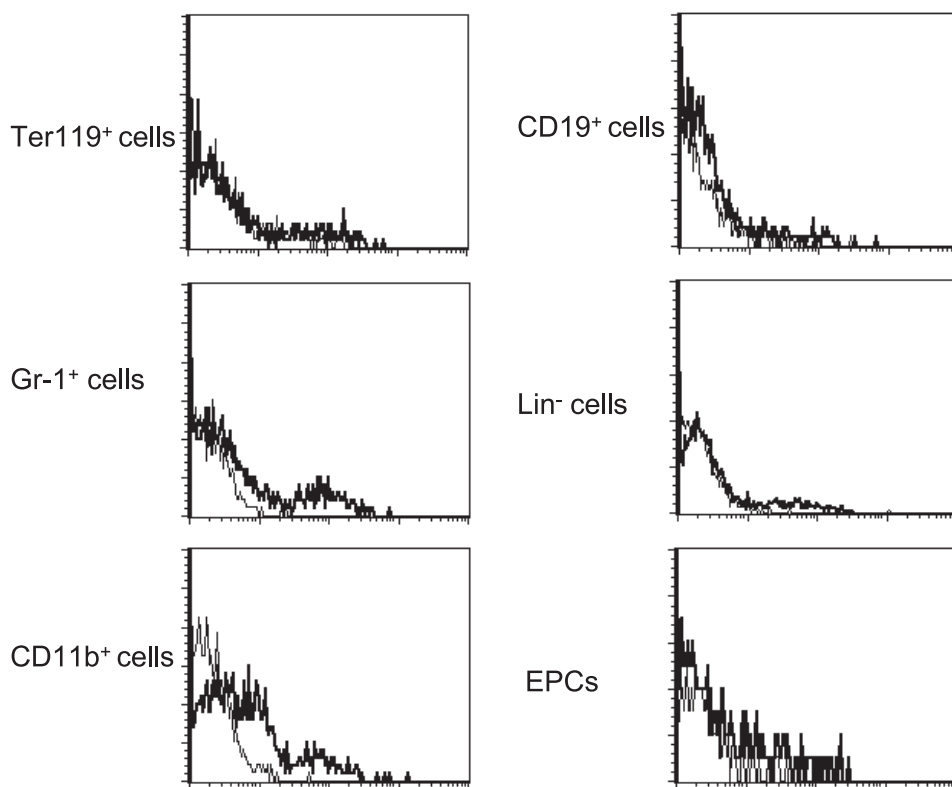


図 2

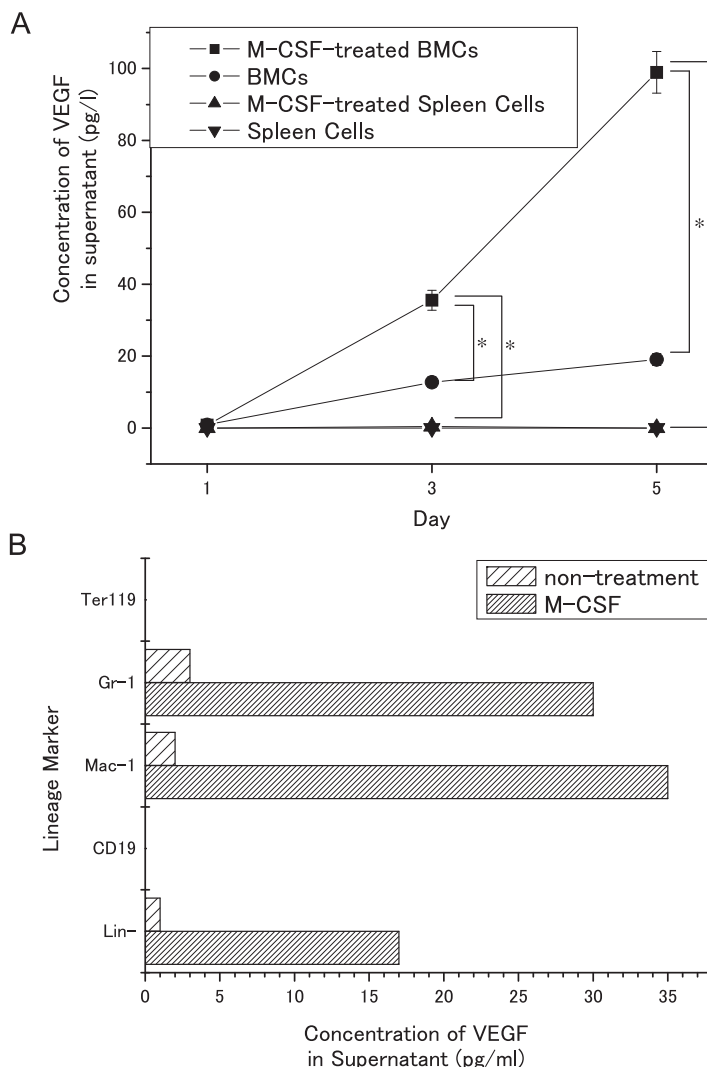


図 3

と種々の lineage marker で染色しフローサイトメーターで解析した。図2に示すように、主に Gr-1 陽性細胞と Mac-1 陽性細胞が CD115 を発現していた。

実験3 : M-CSF 刺激による骨髓細胞の VEGF 産生

ELISA 法を用いて血清中の VEGF 濃度を測定したが、無処置のマウスおよび M-CSF を投与したマウスのいずれの血清からも VEGF は検出できなかった (data not shown)。次に細胞が産生する VEGF を測定するために、骨髓細胞 (BMCs) と脾細胞とを $1 \times 10^6/\text{ml}$ ずつ培養液に浮遊させ、M-

CSF 添加群と無添加群を作成し、Day 1, 3, 5 の培養上清中の VEGF 濃度を測定した (図3A)。脾細胞の培養上清からは VEGF は検出されなかったが、骨髓細胞からは VEGF 産生がみられ、さらに M-CSF 添加群では VEGF 産生が亢進していた。

そこで、骨髓中のどの種の細胞が VEGF を産生しているかを検討するため、種々の lineage marker で標識した骨髓細胞をセルソーターを用いて分離・培養し、上清中の VEGF 濃度を測定した (図3B)。実験2で CD115 を発現していた Gr-1 陽性細胞と Mac-1 陽性細胞で、VEGF 産生と M-CSF 刺激による産生の亢進が認められた。

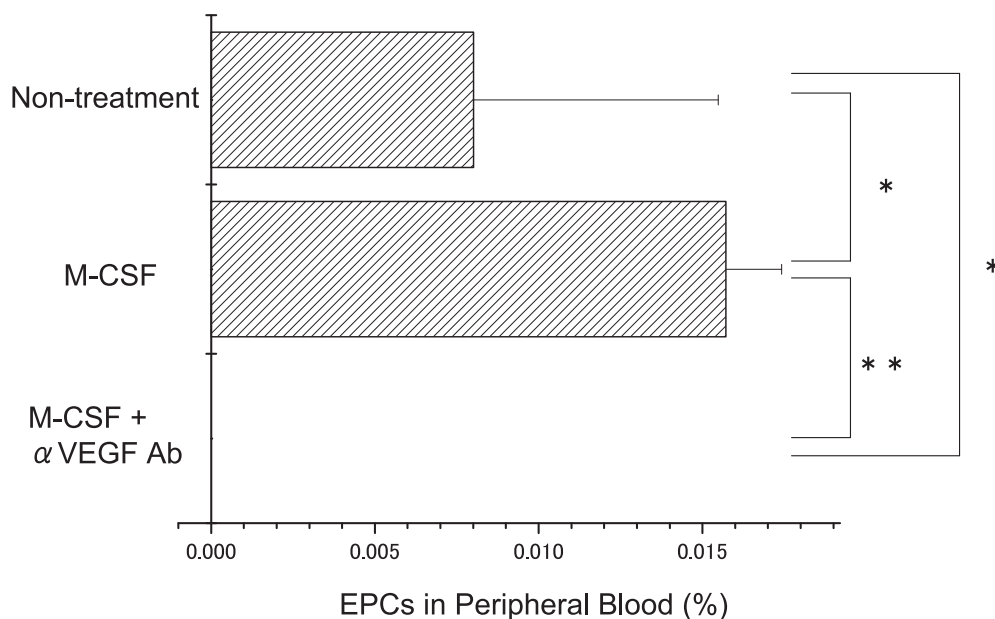


図 4

実験4 : M-CSF のEPC 動員効果を抗 VEGF 抗体が阻害する

実際に抗 VEGF 抗体が末梢への EPC の動員を阻害するかを検討した (図 4)。M-CSF 単独投与群, M-CSF・抗 VEGF 抗体併用群, コントロール群を作製し Day 0 に各試薬をマウスに投与する。Day 4 に末梢血を採取しフローサイトメーターで解析した。M-CSF を投与すると末梢血中の EPC が増加したが, 抗 VEGF 抗体を同時に投与すると末梢血での EPC 動員が抑制された。

考 察

従来, EPC を介した血管新生は胎生期におけると考えられていたが, Asahara らは成人の末梢血中にも EPC が存在し, 成人の血管新生にも働いていることを証明した。また彼らは EPC が骨髄細胞の一部として存在し, 骨髄から末梢血中に動員されるということも報告した。これらの知見をもとに, 骨髄細胞が閉塞性動脈硬化症やバージャー病の血流改善を目的に臨床応用されるようになった。

それと平行してサイトカインを用いた血管新生も盛んに研究されるようになり, G-CSF や GM-CSF による末梢血中の EPC 増加効果とその機序

が次第に明らかになってきた。

今回の研究では M-CSF の血流改善機序についての解析を行った。抗 VEGF 抗体が M-CSF の血流改善効果を阻害することから, そのメカニズムに VEGF が大きな役割を担っているということがわかった (実験 1)。

VEGF は血管新生における最も重要なサイトカインのひとつで, あらゆる臓器で発現がみられるが, 虚血状態や腫瘍の発育にも関与している²³⁻²⁹⁾。VEGF は G-CSF, GM-CSF, エストロゲンなどと同様に EPC を骨髄から末梢血中に動員する^{13,22,30,31)}。しかしながら, VEGF を全身性に投与すると浮腫の発生などの副作用が出現することがわかっていく³²⁾。

実験結果から, M-CSF を投与すると骨髄細胞 (主に骨髄球系細胞) から VEGF が産生されるが, 血清中の VEGF 濃度は上昇しないことがわかった。すなわち M-CSF の血流改善の機序において, VEGF は全身性ではなく骨髄内局所で作用していると考えられる。上述したように VEGF が骨髄内の EPC を末梢血中に動員する作用があることは報告されており, 本実験結果と併せると, M-CSF が骨髄中の顆粒球系細胞を刺激し VEGF 産生を亢進→末梢血中に EPC が増加→虚血部位に EPC が動

員され血管新生が促進される, という機序が考えられた。実験4の抗 VEGF 抗体を投与すると EPC の動員が阻害されるという結果もこれを支持している。

M-CSF は化学療法の補助療法としてすでに臨床使用されており, 重大な副作用は報告されておらず, 虚血性疾患に対する新たな治療戦略として有効であると考えられた。

謝 辞

本研究は本学病理学第一講座において, 池原進教授・足立靖助教の指導のもと行われた。また同教室のスタッフにも多くの支援を賜り, ここに感謝の意を表する。

文 献

- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275: 964-967, 1997.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. and Isner, J. M.: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85: 221-228, 1999.
- Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., et al.: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized control trial. *Lancet*, 360: 427-435, 2002.
- Kobayashi, T., Hamano, K., Li, T. S., et al.: Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res*, 89: 189-195, 2000.
- Andreeff, M. and Welte, K.: Hematopoietic colony-stimulating factors. *Seminars in Oncology*, 16: 211-229, 1989.
- Tsuchiya, M., Nomura, H., Asano, S., et al.: Characterization of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor produced in mouse cells. *EMBO J*, 6: 611-616, 1987.
- Teshima, T., Harada, M., Takamatsu, Y., Makino, K., Inaba, S., et al.: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-induced mobilization of circulating haematopoietic stem cells. *Br J Haematol*, 84: 570-573, 1993.
- Schwartzberg, L. S., Birch, R., Hazelton, B., Tauer, K. W., Lee, P. Jr, Altomose, R., George, C., Blanco, R., Wittlin, F., Cohen, J., et al.: Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Haemathoter*, 1: 317-327, 1992.
- Kang, H. J., Kim, H. S., Zhang, S. Y., Park, K. W., Cho, H. J., Koo, B. K., Kim, Y. J., Soo Lee, D., Sohn, D. W., Han, K. S., Oh, B. H., Lee, M. M. and Park, Y. B.: Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 363: 751-756, 2004.
- Ripa, R. S., Yongzhong, W., Jørgensen, E. and Kastrup, J.: Bone-Marrow stem cell mobilization induced by granulocyte-colony stimulating factor in patients with a PCI-treated acute ST-elevated myocardial infarction is safe: Results from a double-blind randomized study, the stem cells in myocardial infarction. (STEMMI) trial. *Circulation*, 110 sup III: 238, 2004.
- Pezsch, M., Ince, H., Kleine, H. D., Schmidt, H., Rehders, T., Körber, T., Freund, M. and Nienaber, C. A.: No restenosis after G-CSF in acute myocardial infarction: insights from FIRSTLINE-AMI (front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor). *Circulation*, 110 sup III: 238, 2004.
- Ince, H., Petzsch, M., Kleine, H. D., Schmidt, H., Rehders, T., Körber, T., Chatterjee, T., Freund, M. and Nienaber, C.: Prevention of LV remodeling with G-CSF in acute myocardial infarction: insights from FIRSTLINE-AMI (front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor). *Circulation*, 110 sup III: 352, 2004.
- Minamino, K., Adachi, Y., Okigaki, M., Ito, H., Togawa, Y., Fujita, K., Tomita, M., Suzuki, Y., Zhang, Y., Iwasaki, M., Nakano, K., Koike, Y., Matsubara, H., Iwasaka, T., Matsumura, M. and Ikehara, S.: Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) as Well as Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Accelerates Neovascularization. *Stem Cells*, 23: 347-354, 2005.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R. S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., Sandbank, J., Zipori, D. and Lapidot, T.: G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 3: 687-694, 2002.
- Amano, K., Okigaki, M., Adachi, Y., Fujiyama, S., Mori, Y., Kosaki, A., Iwasaka, T. and Matsubara, H.: Mechanism for IL-1 beta-mediated neovascularization unmasked by IL-1 beta knock-out mice. *J Mol Cell Cardiol*, 36(4): 469-480, 2004.
- Iwasaki, M., Adachi, Y., Minamino, K., Suzuki, Y., Zhang, Y., Okigaki, M., Nakano, K., Koike, Y., Wang, J., Mukaide, H., Taketani, S., Mori, Y., Takahashi, H.,

- Iwasaka, T. and Ikehara, S.: Mobilization of Bone Marrow Cells by G-CSF Rescues Mice from Cisplatin-Induced Renal Failure, and M-CSF Enhances the Effects of G-CSF. *J Am Soc Nephrol*, 16: 658–666, 2005.
- 17) Folkman, J. and Shing, Y.: Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267: 10931–10934, 1992.
- 18) Schaper, W., De Brabander, M. and Lewi, P.: DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ Res*, 28(6): 671–679, 1971.
- 19) Lindemann, A. and Rumberger, B.: Vascular complications in patients treated with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Eur J Cancer*, 29A: 2338–2339, 1993.
- 20) Adachi, K., Suzuki, M., Sugimoto, T., Yoroze, K., Takai, H., Uetsuka, K., Nakayama, H. and Doi, K.: Effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on bleomycin-induced lung injury of varying severity. *Toxicol Pathol*, 31: 665–673, 2003.
- 21) Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J. M. and Asahara, T.: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 5: 434–438, 1999.
- 22) Dvorak, H. F.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 20: 4368–4380, 2002.
- 23) Detmar, M., Yeo, K. T., Nagy, J. A., Van de Water, L., Brown, L. F., Berse, B., Elicker, B. M., Ledbetter, S. and Dvorak, H. F.: Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, 105: 44–50, 1995.
- 24) Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. and Leung, D. W.: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Rev*, 13: 18–32, 1992.
- 25) Ferrara, N. and Davis-Smyth, T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev*, 18: 4–25, 1997.
- 26) Thomas, K. A.: Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem*, 271: 603–606, 1996.
- 27) Barbera-Guillem, E., Nyhus, J. K., Wolford, C. C., Friece, C. R. and Sampsel, J. W.: Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res*, 62: 7042–7049, 2002.
- 28) Jablonska, E., Puzewska, W., Grabowska, Z., Jablonski, J. and Talarek, L.: VEGF, IL-18 and NO production by neutrophils and their serum levels in patients with oral cavity cancer. *Cytokine*, 30: 93–99, 2005.
- 29) Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M. and Isner, J. M.: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18: 3964–3972, 1999.
- 30) Strehlow, K., Werner, N., Berweiler, J., Link, A., Dirnagl, U., Priller, J., Laufs, K., Ghaeni, L., Milosevic, M., Bohm, M. and Nickenig, G.: Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*, 107: 3059–3065, 2003.
- 31) Vajanto, I., Rissanen, T. T., Rutanen, J., Hiltunen, M. O., Tuomisto, T. T., Arve, K., Narvanen, O., Manninen, H., Rasanen, H., Hippelainen, M., Alhava, E. and Yla-Herttuala, S.: Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ. *J Gene Med*, 4: 371–380, 2002.

第123回 関西医科大学学内学術集談会

日 時：平成19年3月16日（金） 午後1時00分～午後5時00分

会 場：関西医科大学附属滝井病院 南館 臨床講堂

特別講演

特異な形態をとる悪性リンパ腫症例から学んだこと

臨床検査医学講座 診療教授

植村 芳子

一般演題

1. nicotinamide prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis functionally and morphologically

眼科学講座

木内 克治

2. 心身症患者における Psychophysiological Stress Profile（精神生理学的ストレス反応のプロファイル）に関する研究

心療内科学講座

神原 憲治

3. Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain

心療内科学講座

阿部 哲也

4. 膵癌の免疫機能評価と免疫化学療法への取り組み

外科学講座

柳本 泰明

5. Effects of obstructive jaundice on neutrophil production and acquisition of chemotactic activity in the bone marrow

内科学第三講座

島谷 昌明

6. S100A12（EN-RAGE）タンパク質の発現調節に関する研究

内科学第二講座

長谷川隆正

7. Membrane traffic in outer hair cells of the adult mammalian cochlea（哺乳類蝸牛外有毛細胞における膜輸送）

耳鼻咽喉科学講座

金子 敏彦

8. Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis（筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの脊髄における小胞体ストレス蛋白 GRP78 の発現）

神経内科学講座

和手 麗香

9. 急性心筋梗塞患者における tissue plasminogen activator（t-PA）の静脈内前投与と血栓吸引療法の併用の効果

内科学第二講座

山本 哲史

10. 慢性維持透析患者の虚血性心疾患の診断：運動負荷後血圧反応と心エコー法による検出
内科学第二講座 福井 政慶
11. サルにおける頭頂葉後部の運動機能
生理学第二講座 中尾 和子
12. Quantification of mentolabial profile using lateral roentgen cephalography in healthy adults and patients with scar contracture following severe facial burns, and profile reconstruction by mandibular osteotomy
形成外科学講座 下間亜由子
13. M-CSF による血流改善機序の解明
小児科学講座 中野 景司

特別講演

特異な形態をとる悪性リンパ腫症例から学んだこと

臨床検査医学講座・枚方病院病理部

診療教授 植村 芳子

近年、悪性リンパ腫の病型分類は目覚ましい変遷をとげてきた。演者は、新 WHO 分類でびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の一亜型に設定された T-cell/histiocyte rich B-cell lymphoma (T/HRBCL) についての解析を試みたので紹介したい。T/HRBCL は L&H や RS 細胞類似の大型細胞が 10% 以下の割合で出現するとされ nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma との形態的な類似性があり、前者の進行した臨床病期や治療抵抗性など治療戦略上その鑑別は重要ながら、病理診断基準の不一致とも関連し、その詳細はいまだ明確なものではない。さらに加齢による EBV 関連リンパ増殖性疾患との異同も問題となり、演者はこれらの鑑別に CD20 の強発現と EBV 感染の有無が重要と考えている。さらに化学療法によって組織像の変化する症例もみられ、EBV 感染の有無とともに、その組織形態発現には生体側の免疫反応が深くかわっている可能性が考えられた。

病理診断部門では種々多数の症例から、主に免疫組織学的手法を用いて疾患の解析が可能であるが、今後はさらなる分子病理学的手法もとりいれた展開が必要となり、その現状と展望についても簡単に概説したい。

一般演題

1. nicotinamide prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis functionally and morphologically

眼科学講座 木内 克治

メチルニトロソ尿素 (MNU) は発癌性・催奇形性を有するアルキル化剤であるが、多種族の動物の網膜視細胞にアポトーシスを誘発し、ヒト網膜色素変性症の有用なモデルである。ニコチン酸アミド (NAM) は水溶性ビタミン B 複合体 (ビタミン B₃) であり、種々の薬剤で誘発される神経障害に対して神経保護効果があることが知られている。よって、NAM が MNU 誘発性視細胞アポトーシスに対し、制御可能か否かを形態的・機能的に検討した。

方法

1) 7 週齢の Sprague-Dawley (SD) ラット、6-8 週齢の C57BL マウスに対して、MNU (ラットでは 60 mg/kg, マウスでは 50 mg/kg) の単回腹腔内投与を行い、その後ただちに NAM (ラットでは 1000, 250, 50, 25, 10, 0 mg/kg, マウスでは 1000, 250, 100, 0 mg/kg) を単回皮下投与、あるいは、MNU 投与 0, 2, 4, 6, 12 時間後に 1000 mg/kg NAM を単回皮下投与し、7 日後に屠殺した。さらに MNU と 1000 mg/kg NAM を同時投与したラットに対し、長期間の経過観察を行い、各の摘出眼球標本を作製し、網膜厚の形態計測を行った。

2) 8 週齢の SD ラットに対し 60 mg/kg MNU および 0, 50, 1000 mg/kg NAM の投与 7 日後に網膜電図 (ERG) を記録し、その後眼球摘出を行い、

形態変化と比較した。

結果

1) ラット・マウスともに MNU 投与により、投与後 7 日目には視細胞層の消失をみた。しかし、ラットでは、25 mg/kg 以上の NAM の同時投与により視細胞の消失を完全に抑制し、10 mg/kg で部分抑制効果を示し、マウスでは、完全抑制には 1000 mg/kg、部分抑制には 250 mg/kg 以上の NAM の同時投与が必要であった。また、ラットにおいて、MNU 投与 4 時間後の 1000 mg/kg NAM 投与では視細胞の消失を完全抑制し、6 時間後の投与では部分抑制を示し、マウスでは MNU 投与 2～6 時間後の 1000 mg/kg NAM に対して部分抑制を示した。なお、ラットにおける 1000 mg/kg NAM の同時併用投与による (35 日間) の観察でも網膜に明らかな変化はみられなかった。

2) 視細胞の杆体機能を反映する scotopic ERG において MNU に 1000 mg/kg NAM を併用した群では、対照群と同等の波型を示していたが、MNU に 50 mg/kg NAM を併用した群ではわずかな低下がみられた。一方、MNU 単独投与群では、ERG は全ての刺激域において反応を示さなかった。視細胞の錐体機能を反映する photopic ERG では、MNU に 1000 mg/kg NAM を併用した群で、コントロール群と比較して最も弱い刺激域においてのみ有意な低下を認めたものの、他の刺激域では対照群と同等の波形を示し、MNU に 50 mg/kg NAM を併用した群では、有意な低下を示す刺激域がみられたものの良好な波形を示した。一方、MNU 単独投与群では、ERG は全ての刺激域において反応を示さなかった。なお、これら ERG 波形は網膜形態変化と相関をみた。よって 1000 mg/kg NAM は、MNU 誘発視細胞アポトーシスに対し、視細胞杆体・錐体細胞を機能的にも完全に保持することが示された。

結論 NAM は MNU 誘発性視細胞アポトーシスを形態的・機能的に抑制した。網膜変性症の予防法および治療法解明の糸口になりうる可能性がある。

2. 心身症患者における Psychophysiological Stress Profile (精神生理学的ストレス反応のプロファイル) に関する研究

心療内科学講座 神原 憲治

緒言 心身症や機能性疾患の病態は従来の医学的検査では捉えきれない面が多く、自律神経系を中心とした機能的な評価や心身相関の評価が重要である。そのような評価を行う方法の一つが Psychophysiological Stress Profile (PSP; 精神生理学的ストレス反応のプロファイル) である。

我々は、機能性身体疾患 (functional somatic syndrome; FSS)、及び心身症患者における精神生理学的ストレス反応 (Psychophysiological stress profiling; PSP) を健常人と比較して検討した。また、FSS 群の反応にはばらつきがあり、いくつかのサブグループの存在も示唆されたので、クラスター分析によって分類を検討した。

方法

(1) 当科を受診し、同意を得た FSS 患者、心身症患者、及び対照群として健常人を対象として PSP を行った。方法は、マルチバイオフィードバックシステムを用いて精神生理学的指標 (スキンコンダクタンスレベル、スキンコンダクタンス反応、皮膚温、容積脈波、前額筋電位、心拍数) を同時に測定し、mental work のストレス負荷として暗算を用い、各指標の変化を解析、評価した。平行して自覚的な緊張感を visual analogue scale を用いて評点し、精神生理学的評価との関係を検討した。

(2) 59 例の FSS 患者と 41 例の健常人を対象として、6 つの精神生理学的指標のストレスによる変動性スコア (autonomic lability score; ALS) を算出した。6 つの ALS を変数としてクラスター分析を行い、FSS 群は高変動群・低変動群の 2 群に分けられた。それに健常群を加えた 3 群について、変動性スコアの因子分析による因子得点、POMS (Profile of Mood States)、自覚的緊張スコア、症状の持続期間を比較検討した。

結果

(1) 全体として心身症患者や FSS 患者群におけるストレス反応は、健常群に比べて低い傾向がみられた。また、FSS 群において、自覚的緊張スコアと精神生理学的指標による客観的緊張スコアを

対比してストレス前後の変化をみると、客観的緊張スコアは健常群に比べて低反応であり、自覚的緊張スコアはストレス前後で健常群より高くストレスに対する反応は低かった。また、健常群では客観的・自覚的スコア間の有意な相関が認められなかったのに対し、患者群では客観的スコアが低反応であるほどストレス時の自覚的スコアが有意に高かった。

(2) 高変動群・低変動群間及び、低変動群・健常群間にストレス変動の因子得点に有意差が認められた。POMS 得点は高変動群が低変動群に比べて高く、症状の持続期間は高変動群の方が長かった。クラスター間で症状の種類や診断分類による偏りは認められず、それらとは独立した分類であることが示された。

考察

(1) 従来、各種病的状態における PSP は過剰反応、すなわちストレスによる機能的変動が大きくなることが病態の一部を構成するとするものが多かった。一方、心身症や FSS のような持続的なストレスに関連した病態における PSP の特徴についての報告はみられず、今回その特徴の一端を示すことができた。精神生理学的指標のストレス反応の低下は、ストレスに対する反応の柔軟性や対処能力の低下の一側面を表している可能性がある。

また、患者群の自覚的スコアがストレス前後に高いという特徴は、持続的な緊張感や不必要な緊張感、メリハリのない対処パターンなど、これらの疾患群における認知的特徴の一面を表していると考えられた。

(2) FSS 群の精神生理学的指標のストレスによる変動性について、高・低変動群の2種類のクラスターが存在し、症状や従来の臓器診断とは独立した診断軸の一つになる可能性が示唆された。また、文献的考察から、低変動群は alexithymia (失感情症) との関連も示唆された。

3. Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain

心療内科学講座 阿部 哲也

基礎研究では、疼痛反応が長期間持続する神経因性疼痛が慢性疼痛のモデルとされており、脊髄

後角シナプスにおけるNMDA受容体から一酸化窒素 (NO) へのシグナル伝達経路を介した痛みの中樞性感作が注目されている。NMDA 受容体を構成するサブユニットの1つであるNR2には、NR2AからNR2Dの4種類が存在し、その組み合わせによって受容体の機能や局在が異なっている。今回、疼痛への関与が注目されているNR2Bの関わる神経伝達経路について検討した。

マウスは野生型、およびNMDA受容体サブユニットのNR2AやNR2D、Srcファミリーに属するリン酸化酵素のチロシンキナーゼFynそれぞれのノックアウトマウスを用いて、選択的L5脊髄神経切断による神経因性疼痛モデルと、起炎物質CFAの皮下投与による炎症性疼痛モデルを作製した。足底への触覚刺激で誘発される痛みであるアロディニアに対するNR2BアンタゴニストCP-101,606の効果を、行動実験のvon Frey試験で評価した。腰部脊髄標本を作製し、NR2B, 1472番目のアミノ酸残基であるチロシン (Tyr1472) をリン酸化したNR2B (pTyr1472-NR2B)、神経型NO合成酵素 (nNOS) 抗体を用いた免疫組織染色や、nNOS活性化の指標となるNADPH ジアホラーゼ染色を行った。上記抗体を用いた実験結果は脊髄後角によるウエスタンブロット法で確認し、NADPH ジアホラーゼ染色は陽性ニューロン数と染色濃度を定量化して評価した。また、pTyr1472-NR2Bの局在を電子顕微鏡で確認した。

NR2A, NR2D各ノックアウトマウスでは、神経因性疼痛モデルでアロディニアが出現した。野生型マウスの神経因性疼痛モデルでは、CP-101,606が用量依存性にアロディニアを抑制した。脊髄後角の組織染色でNR2B, nNOSには変化がなかったが、pTyr1472-NR2BとNADPHジアホラーゼ反応は神経因性疼痛モデルで増強し、CP-101,606投与で減弱した。電子顕微鏡で解析した結果、pTyr1472-NR2Bはシナプス後肥厚部 (PSD) に局在していた。神経因性疼痛モデルの作製早期や炎症性疼痛モデルでは、脊髄の免疫染色でpTyr1472-NR2Bの発現をほとんどみとめなかった。Fynノックアウトマウスでは神経因性疼痛が出現せず、脊髄の免疫染色やウエスタンブロット法でもpTyr1472-NR2Bの発現をみとめなかった。

神経因性疼痛では、FynによるNR2BのTyr1472でのリン酸化がnNOS活性化を引き起こし、脊髄

での中枢性感作を形成していることを証明した。臨床場面では慢性疼痛には難治例が多いが、その形成には神経回路の再構築といった非可逆的な変化ではなく、NR2B のリン酸化という機能的かつ可逆的な変化が重要であることを示した。さらにこの変化は炎症による急性痛や早期の神経因性疼痛では発現していないことより、慢性疼痛にはこのような特異的な神経科学的病態が存在すると考える。また NR2B の C 末端部には、Tyr1472 を含んだ内在化モチーフ YEKL 配列と、nNOS 等の細胞内蛋白と結合する PDZ ドメインの結合モチーフ ESDV 配列が存在することより、NR2B の Tyr1472 におけるリン酸化には、NR2B の内在化を抑制することで PSD への局在を維持し、かつ下流へのシグナル伝達を有効に引き起こす働きがあると考えられる。最後に、海馬での長期増強の促進と脊髄での痛覚感作は、ともに Fyn による NR2B の Tyr1472 でのリン酸化を介しており、記憶・学習と慢性疼痛との間に共通のメカニズムの存在が考えられる。

4. 脾癌の免疫機能評価と免疫化学療法への取り組み

外科学講座 柳本 泰明

癌治療におけるさらなる治療成績の向上のためには免疫学的反応の維持・増強・抑制を評価し戦略的に使いわけることが重要である。これまで脾癌 104 例の末梢血中樹状細胞（以下 DC1）について評価してきた。免疫機能検査には樹状細胞（DC: DC1, DC2）、NK 細胞、CD4/8 リンパ球などを評価した。脾癌患者では健常者に比べ DC1 数の減少、DC1 機能の低下が認められた（〈DC1 数〉脾癌患者：0.27±0.18%，健常者：0.32±0.16%， $p<0.05$ 。〈DC1 機能：MLR〉脾癌患者：0.55±0.38%，健常者：1.05±0.70%， $p<0.05$ 。Yanagimoto et al., Clin Immunol. 2005）。切除症例（ $n=41$, 0.31±0.21%）の入院時 DC1 数は非切除症例（ $n=63$, 0.23±0.15%）に比べ有意に高値であった（ $p<0.05$ ）。切除症例に関して、stage 4a/4b 群の DC1 数（0.26±0.22%）は stage 1/3 群（0.38±0.19%）の DC1 数に比べ有意に低値であった（ $p<0.05$ ）。DC1 数高値群（DC1≥0.27%， $n=20$ ，1/3 年生存率 = 100%/64%）は DC1 数低値群（DC1<0.27%， $n=21$ ，1/3 年

生存率 = 68%/26%）に比べ有意に予後良好であった（ $p<0.05$ ，Yanagimoto et al., ASCO 2004, Sato et al., ASCO 2006）。脾切除例においては術後 1 ヶ月で DC1 機能は回復し、無再発症例では 1 年後の DC1 数が術前に比べ有意に増加することが認められた（Takahashi et al., Cancer Immunol Immunother. 2006）。癌ペプチドワクチンを用いた免疫化学療法施行例では特異的免疫反応増強効果が細胞性免疫・液性免疫共に認められ（Yanagimoto et al., Cancer Sci. in press），予後が延長する症例が得られ、さらには同療法での DC1 数増加群において有意に予後延長が認められた（ $p<0.05$ ）。

まとめ 脾癌症例において末梢血中の DC1 数は腫瘍の進行に関与し、新たな予後予測因子となり得る可能性が示唆された。患者個々の免疫状態に応じた癌ペプチドワクチンを行うことにより、脾癌治療の新たな展開が期待される。

5. Effects of obstructive jaundice on neutrophil production and acquisition of chemotactic activity in the bone marrow

内科学第三講座 島谷 昌明

目的 我々は、胆管閉塞が末梢白血球数を増加させ、末梢好中球走化能を亢進させることを報告してきた。しかしながら、これらの変化が骨髓レベルで生じているかどうかについては不明であった。そこで今回、ラット胆管閉塞—内瘻モデルを用いて、骨髓における好中球産生および好中球の走化能に及ぼす胆管閉塞の影響について検討した。

方法 200–240 g Wistar 系雄性ラットを用いた。胆管をポリエステルテープとステンレスコイルで圧迫、屈曲させた、胆管閉塞モデル（BDO 群）を作成した。また、一部のラットでは胆管閉塞 4 日後にポリエステルテープを抜去し、6 日間胆汁内瘻を施行した（胆管閉塞—内瘻モデル：BDOR 群）。BDO 群と BDOR 群各々に対する偽胆管閉塞群（Sham）も作成した。BDO 群では術後 Day 2, Day 4, Day 7, Day 10 に、BDOR 群においては Day 10 に末梢血および骨髓を採取し、血清 T-Bil, 末梢好中球数、骨髓細胞分画および末梢・骨髓好中球走化能を検討した。走化能は Modified Boyden 法を用いた。3 μ m 大の millipore filter で仕切った

Chamber の上層に 1×10^5 個の好中球を、下層に 50 ng/ml の Gro- β を静置した。37°C で 60 分間培養した後、filter の下面に遊走した好中球を光学顕微鏡 ($\times 400$) でカウントし、対照液 (培養液) に対する走化好中球数 (random migration) を差し引いた値 (actual chemotaxis) を好中球走化能の指標とした。

結果 sham 群における上記パラメーターは、今回の実験を通して正常ラットとの間に有意な差を認めなかった。

BDO 群：血清 T-Bil 値は、Day 2 以降で有意に上昇した (Normal 0.3 ± 0.2 mg/dl, Day-2 BDO 10.9 ± 3.9 mg/dl, Day-4 BDO 8.8 ± 1.3 mg/dl, Day-7 BDO 7.7 ± 1.5 mg/dl, Day-10 BDO 7.0 ± 0.6 mg/dl)。末梢好中球数は、Day 2 以降で有意に上昇した (Normal $1,158 \pm 238$ /ml, Day-2 BDO $3,246 \pm 432$ /ml, Day-4 BDO $3,098 \pm 1,250$ /ml, Day-7 BDO $4,811 \pm 945$ /ml, Day-10 BDO $6,887 \pm 1,130$ /ml)。骨髓の Myeloid:Erythroid (M:E) ratio は、Day 4 以降で有意な上昇を認めた (Normal 0.90 ± 0.29 , Day-4 BDO 1.60 ± 0.31 , Day-7 BDO 2.39 ± 1.09 , Day-10 BDO 2.32 ± 0.52)。骨髓細胞分画中の neutrophil proliferative pool (myeloblasts, promyelocytes, myelocytes) の占める割合は、Day 4 以降で有意に増加した (Normal $17.5 \pm 3.4\%$, Day-4 BDO $25.6 \pm 3.6\%$, Day-7 BDO $26.8 \pm 3.5\%$, Day-10 BDO $26.9 \pm 4.0\%$)。neutrophil storage pool (metamyelocytes, band cells, segmented neutrophils) の占める割合は、Day 7 以降で有意な増加を示した (Normal $13.2 \pm 3.3\%$, Day-7 BDO $23.3 \pm 4.1\%$, Day-10 BDO $22.9 \pm 2.3\%$)。

BDOR 群：胆汁内瘻により末梢好中球数は、BDO 群の Day 4, Day 10 に比して有意な低値を示し ($1,723 \pm 297$ /ml), sham と同レベルにまで低下した。M:E ratio も BDO 群の Day 4, Day 10 に比して有意に低値を示し (1.10 ± 0.40), sham との間に有意差は認められなかった。neutrophil proliferative pool の占める割合は、BDO 群の Day 4, Day 10 に比して有意に低値で ($17.3 \pm 3.3\%$), sham との間に有意差は認められなかった。neutrophil storage pool の占める割合は、BDO 群の Day 10 に比して有意に低値で sham と同レベルであった ($13.8 \pm 0.8\%$)。

好中球走化能：BDO 群の末梢および骨髓好中球

走化能は、Day 2 以降で有意に亢進した (末梢好中球走化能：Normal 9.6 ± 1.2 Cells/HPF, Day-2 23.9 ± 7.1 Cells/HPF, Day-4 26.2 ± 3.6 Cells/HPF, Day-7 25.8 ± 3.7 , Day-10 30.3 ± 2.0 Cells/HPF, 骨髓好中球走化能：Normal 11.5 ± 2.5 Cells/HPF, Day-2 26.3 ± 4.0 Cells/HPF, Day-4 26.1 ± 2.7 Cells/HPF, Day-7 26.4 ± 1.3 , Day-10 31.7 ± 2.6 Cells/HPF)。胆汁内瘻により末梢および骨髓の好中球走化能は BDO 群の Day 4, Day 10 に比して有意に低値を示し (末梢好中球走化能 12.1 ± 3.4 Cells/HPF, 骨髓好中球走化能 11.9 ± 3.1 Cells/HPF), sham との間に有意差は認められなかった。

結論と考察

1. 胆管閉塞により、骨髓における顆粒球系細胞の生成亢進が認められ、胆汁内瘻により正常化した。

2. 胆管閉塞により、骨髓好中球の走化能亢進が認められ、胆汁内瘻により正常化した。

3. 胆管閉塞時の末梢血における好中球数増加および好中球走化能亢進に対し、骨髓が重要な役割を担っていることが強く示唆された。

6. S100A12 (EN-RAGE) タンパク質の発現調節に関する研究

内科学第二講座 長谷川隆正

糖化蛋白 AGE (advanced glycation endproducts) はその受容体 RAGE (receptor for AGE) を活性化し血管内皮細胞において VCAM-1, ICAM-1 などの接着因子を誘導し、血管平滑筋細胞において増殖促進的に作用する。また AGE は糖尿病患者血中において増加することより糖尿病性細小血管障害および大血管障害の進展機序において最も重要な因子のひとつであると考えられている。

最近 RAGE へのリガンドとして S100 蛋白が報告された。S100 蛋白は 2 個の EF-hand をもつ分子量約 10 kDa のカルシウム結合蛋白として現在 16 種類以上のサブタイプが確認され、その機能は多岐にわたっている。これらのサブタイプの内 S100A12 (EN-RAGE) は AGE と同様に RAGE を介して血管平滑筋細胞の NF- κ B を活性化し増殖を促進し、また単球の遊走能を亢進させることが報告されその細小血管および大血管障害への関連が注目されている。

しかし、S100A12 (EN-RAGE) 遺伝子発現の調節因子についてはまだ不明な点が多い。そこでヒト THP-1 マクロファージ細胞においてノーザンブロット法および RT-PCR 法を用いて S100A12 (EN-RAGE) 遺伝子発現の調節因子について検討した。

ヒト THP-1 単球細胞を 160 nM PMA と 16 時間ふ置しマクロファージに分化後 total RNA を抽出し、ノーザンブロット法で S100A12 mRNA の存在を確認した。この THP-1 マクロファージを用いて動脈硬化を促進させる様々なサイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1) をふ置し S100A12 mRNA 量への効果を検討した。その結果、S100A12 mRNA は IL-6 のみで有意な増加を認めたがその他のサイトカインでは有意な変化を認めなかった。用量依存性を検討すると IL-6 (100 ng/ml) により S100A12 mRNA 量は 16 時間後で約 2 倍に増加し、16 時間ふ置による用量依存性を検討すると ED₅₀ は約 3 ng/ml であった。また、THP-1 マクロファージから実際に S100A12 タンパク質が分泌されているかを検討したところ THP-1 マクロファージ上清中に S100A12 タンパク質を ELISA により確認でき (約 0.67 ng/dl)、IL-6 添加後 20 時間すると約 20% の有意な増加を認めた。

THP-1 マクロファージにタンパク合成阻害薬である cycloheximide (2 μ g/dl) を 90 分間前ふ置し IL-6 をふ置すると IL-6 による S100A12 mRNA の増加は完全に抑制された。

次に、この S100A12 mRNA やタンパク質がこれまで明らかになっている IL-6 シグナル伝達系のうち JAK-STAT 系と SHP2-MAPK 系のどちらを介しているのかを検討した。THP-1 マクロファージを JAK inhibitor である AG490 と前ふ置すると IL-6 による S100A12 mRNA の増加は完全に阻害された。しかし MEK inhibitor である PD98509 では阻害されなかった。

最後に、動脈硬化促進に働く遺伝子発現を抑制するといわれている PPAR γ アゴニであるピオグリタゾンを用い S100A12 遺伝子に対する効果を検討した。ピオグリタゾン (50 μ M) 添加により THP-1 マクロファージの S100A12 mRNA は減少し、12 時間後に約 50% に、24 時間後には 30% 以下となった。ピオグリタゾン 24 時間ふ置による用量依存性を検討すると ED₅₀ は約 10 μ M であっ

た。またピオグリタゾン (25 μ M) と前ふ置後に IL-6 (100 ng/ml) を添加しても IL-6 による S100A12 mRNA の増加は認めらなかった。

THP-1 マクロファージにおいて、IL-6 は SHP2-MAPK 系を介さず JAK-STAT 系のみを介して S100A12 mRNA を増加させそのタンパク質合成を促進した。また、cycloheximide により IL-6 による S100A12 mRNA の増加を阻害したことから JAK-STAT 系を介した新規タンパク質が S100A12 mRNA 発現に関与していることが明らかとなった。一方、PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンは S100A12 mRNA を低下させ、また IL-6 による S100A12 mRNA の増加作用も阻害した。

このようにヒトマクロファージで S100A12 タンパク質が合成・分泌され、動脈硬化巣において増加していると言われている IL-6 により発現増強され糖尿病性合併症を含む各種血管障害への増悪因子となり、またチアゾリジン誘導体であるピオグリタゾンが PPAR γ を活性化することにより、これらの S100A12 たんぱく質増加の抑制を介して各種血管障害の進展を抑制する可能性を明らかにした。

次に、ヒト血中において S100A12 たんぱく質が存在するのか、存在するのであればどのような臨床病態学的意義があるのかを、合成ヒト S100A12 タンパク質に対するエピトープの異なる 2 種類のモノクローナル特異抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を作成し、2 型糖尿病患者 41 例 (DM 群)・非糖尿病患者 35 例 (Non-DM 群) における血漿 S100A12 タンパク質濃度の測定を試み検討した。この 2 群において血漿 S100A12 タンパク質濃度を比較すると、DM 群 19.6 ± 5.26 vs Non-DM 群 8.1 ± 0.81 ng/ml ($p < 0.001$) と DM 群において 2 倍以上の有意な高値を認めた。

また全患者での単相関を観ると、血漿 S100A12 濃度と HbA1c ($p < 0.001$, $R = 0.455$)、血糖値 ($p = 0.019$, $R = 0.281$)、高感度 CRP 値 ($p = 0.048$, $R = 0.223$) および白血球数値 ($p = 0.007$, $R = 0.325$) と有意の正相関を認めた。しかし上記の全てを独立変数としてステップワイズ重回帰分析を行なうと HbA1c 値 ($p = 0.0001$, $R = 0.467$) および白血球数 ($p = 0.0001$, $R = 0.316$) のみが血中 S100A12 濃度の有意な独立規定因子であった。

ヒトの血中における S100A12 タンパク質濃度の

高感度測定系を構築した。この測定系を用いて血漿中の S100A12 タンパク質濃度に血糖調節因子と炎症関連因子が関与する可能性を明らかにした。

以上の研究結果より S100A12 タンパク質が糖尿病における細小血管および大血管障害への促進因子である可能性が示唆された。

7. Membrane traffic in outer hair cells of the adult mammalian cochlea (哺乳類蝸牛外有毛細胞における膜輸送)

耳鼻咽喉科講座 金子 敏彦

はじめに 音波として人の内耳に伝わった情報は、蝸牛有毛細胞において電気信号に変換され聴神経に送られる。その意味において有毛細胞は重要な役割を担っている。有毛細胞頂部における細胞内取り込み機構 (Endocytosis) は非常に速く Rapid Endocytosis と呼ばれ、近年注目を集めている。蛍光色素 FM1-43 を用いるとこの膜輸送をリアルタイムに観察することが可能となる。この研究の目的は、FM1-43 を用いて Rapid Endocytosis により取り込まれた細胞膜の運搬先を調べることである。

研究方法 モルモット蝸牛外有毛細胞を単離。FM1-43 をピペットにて局所投与し、Endocytosis 及びそれに続く Transcytosis を調べた。FM1-43 の蛍光観察には共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いた。

FM1-43 の機械電気変換 (MET) チャネル、P2X レセプター経由での細胞内流入の可能性を否定するため各々のブロッカーである DHSM, PPADS を用いて検討した。

円筒形の外有毛細胞頂部より取り込まれた小胞のターゲットを調べるため、i) FM1-43 付加後の細胞内での頂部、中間部、底部における蛍光変化の観察、ii) 細胞側壁の Subsurface cisternae (SSC) を染色する DiOC₆ と FM1-43 の二重染色、および、iii) Micropipette Aspiration Technique を用いて細胞側壁を SSC と細胞膜に分離し FM1-43 の蛍光変化を観察した。

Rapid Endocytosis の Ca²⁺/calmodulin との関係性を調べるため、i) 細胞外 Ca²⁺ 濃度を変化させて ii) 細胞内 Ca²⁺ キレーター BAPTA-AM を用いて、iii) Calmodulin アンタゴニスト TFP を用いて実験

を行った。

Whole cell clamp にて -60 mV に電位固定。そこから 0 mV に脱分極させ、また -60 mV に戻し、細胞内電位変化による膜輸送への影響を調べた。この実験系では電位依存性 Ca²⁺ チャネルブロッカー、CdCl₂ を用い Ca²⁺ 依存性も調べた。

結果と考察 DHSM 及び PPADS を用いた実験では、コントロールに比べて細胞内に取り込まれる FM1-43 の蛍光変化に優位な差を認めなかった。よって細胞内で観察される FM1-43 の蛍光は、Endocytosis により取り込まれた細胞膜を示していることを確認した。

有毛細胞頂部で取り込まれた細胞膜は円筒型をした外有毛細胞の底部に運搬されており、また DiOC₆ との二重染色、および、Micropipette Aspiration Technique により細胞側壁の主に SSC にも運搬されている事が明らかになった。細胞内運搬速度は $0.37 \pm 0.01 \mu\text{m/s}$ であった。

FM1-43 を細胞へ付加しつつ、細胞外 Ca²⁺ 濃度を 25 μM から 2 mM に増加させると、細胞内 FM1-43 蛍光強度の上昇が見られた。BAPTA-AM, TFP を用いた実験では、コントロールに比して細胞内 FM1-43 蛍光強度の低下が見られた。以上より Rapid Endocytosis は Ca²⁺/calmodulin にて制御されていると考えられる。

FM1-43 を細胞に付加しつつ、Whole cell clamp にて脱分極させた結果、脱分極している間は蛍光強度の上昇率の減少が外有毛細胞頂部、底部ともに見られた。CdCl₂ を付加した実験では、頂部においては変化がなかったが、底部において脱分極中の蛍光強度上昇率の減少が抑制された。これらの結果により外有毛細胞の脱分極中における Transcytosis, Exocytosis の活発化、また底部における電位依存性 Ca²⁺ チャネルの Exocytosis への関与が考えられる。

以上、まとめとして、i) モルモット外有毛細胞頂部において Rapid Endocytosis により細胞内に取り込まれた細胞膜は細胞底部、及び、側壁—主に SSC—に運搬されている。ii) 細胞の膜輸送は Ca²⁺/calmodulin にて制御されている。今後、この現象により如何なる物質が運搬されているのか検討していく必要がある。

8. Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの脊髄における小胞体ストレス蛋白 GRP78 の発現)

神経内科学講座 和手 麗香

背景と目的 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において、運動ニューロンが選択的細胞死に陥る機序については多くの仮説が提唱されているが、詳細は現在も不明である。一方、近年、パーキンソン病において小胞体 (ER) ストレスが神経変性に関与するという報告がなされ注目されている。今回我々は、ER 膜局在蛋白 GRP78/BiP の発現を ALS モデルマウスにおいて検討し、ALS の神経変性においても ER ストレスの関与が示唆されるデータを得たので報告した。

対象と方法 発症前の 12 週齢から、末期の 20 週齢までの雌の G93A mutant superoxide dismutase 1 (mSOD1) transgenic (Tg) マウスを、各週齢 2 匹ずつ、合計 18 匹を用いた。腰髄横断切片を作成し、H&E 染色および抗 GRP78 抗体、抗 SOD1 抗体、抗 ubiquitin 抗体の免疫染色にて異常構造物を検討した。

結果 GRP78 免疫染色では、Tg マウスで観察される Lewy body-like hyaline inclusion (LBHI) は陽性であった。不整形で halo を伴わない大型の好酸性構造物 (不整形構造物) は、GRP78 免疫染色で弱くびまん性に陽性のものも見られたが、多くは陰性であった。Cord-like swollen neurite は点状に染色性を呈した。ubiquitin と SOD1 では、これらの異常構造物は全て陽性であった。Ubiquitin・SOD1 の LBHI における分布は GRP78 と類似していたが、不整形構造物と swollen neurite においては異なっていた。経時的な異常構造物数の検討では、LBHI は発症前の 14 週齢から、不整形構造物は 15 週齢から出現し、週齢を追うごとに増加した。抗 GRP78 抗体での陽性率は、LBHI は週齢に関わらずほぼ全て陽性であったのに対し、不整形構造物の各週齢における陽性率は 0～25% であった。

考察 本研究において我々は、GRP78 が G93A Tg マウスに見られる LBHI に発症前から蓄積してお

り、LBHI 内での分布が SOD1 の分布に類似していることを示した。近年、凝集した mSOD1 が GRP78 と共存していることが in vitro において示されているが、in vivo において示したものは本研究が初である。SOD1 は細胞質内で修飾を受けるとされ、成熟の過程に ER は関与しないとされているが、肝細胞における検討では、病的状態下では SOD1 が ER 内に観察されることが示されており、凝集した mSOD1 は ER の分布に一致した核周囲で観察されることも報告されている。従って本マウスにおいては、過剰発現した mSOD1 が ER 内に輸送され、GRP78 によって認識され、結合した可能性が考えられる。その結果、GRP78 は mSOD1 とともに凝集し、異常構造物を形成したと考えることが出来る。これにより GRP78 の機能が低下し、unfolded protein response が惹起され、細胞死へと導かれる可能性が示唆された。

本研究のデータは、ALS においても ER ストレスを介して神経細胞死を生じている可能性を示唆したものであり、「ER ストレスによる神経細胞死」が神経変性疾患において普遍的に認められる病的機序である可能性を示唆している。

9. 急性心筋梗塞患者における tissue plasminogen activator (t-PA) の静脈内前投与と血栓吸引療法の併用の効果

内科学第二講座 山本 哲史

はじめに 急性心筋梗塞 (AMI) の発症には、冠動脈内の不安定プラークの破綻と、それに伴う冠動脈の血栓性閉塞が大きく関与している。AMI 患者の再灌流療法において、これら血栓への対処の成否が心筋救済に大きく関わっている。経皮的冠動脈インターベンション (PCI) は、梗塞責任動脈 (IRA) の完全血行再建が可能な手技であるが、血栓性、動脈硬化性デブリスによる末梢塞栓の危険性を伴う。末梢塞栓は心筋微小循環を障害し、PCI 後の no reflow 現象、slow flow 現象を引き起こし、PCI のもたらすべき心筋救済を阻害する。いくつかの研究で PCI に先立って行われる血栓溶解療法、血栓吸引療法の有効性は各々において報告されており、no reflow、slow flow 現象の抑制、心筋微小循環の改善、左室機能の保持が証明されている。しかし、血栓溶解療法と血栓吸引療法の併用

の効果については、これまでに報告がない。本研究では、AMI患者におけるPCI前の血栓溶解療法と血栓吸引療法の併用について検討を行った。

研究方法 対象は本研究に対して書面によるインフォームド・コンセントが得られた初回ST上昇型AMI患者で、遺伝子組み換え型 tissue plasminogen activator (Mt-PA) の投与が禁忌でない連続44症例である。これら症例を封筒法によりMt-PA投与群(T群, n=23)と、非投与群(N群, n=21)に分けた。まず初期治療を行った上、冠動脈造影(CAG)を、T群ではMt-PAモンテプラゼを13,750 IU/kgを静脈内投与した後に、N群では直ちに行った。CAGにてPCIの適応があると判断された症例には、T群、N群を問わず全例に血栓吸引療法を行った。血栓吸引後は、通常の手法に従ってステント留置を含めたPCIを行った。評価項目として、CAG時のTIMI flow grade, PCI後のTIMI frame count (TFC), TIMI myocardial perfusion (TMP) gradeを用いた。さらに、AMI発症後3日以内に撮影した^{99m}Tc-quantitative electrocardiographically gated single-photon emission computed tomographic scintigraphy (QGS)による左室駆出率(QGS-EF), 6ヶ月後に左室造影で計測した左室駆出率(LVG-EF)の評価を行った。

結果 対象44症例すべてで、PCIに成功したが、T群で1例、N群で3例においてPCI後にTIMI flow grade 3が得られなかった。主要出血性合併症は両群ともで認めなかった。PCI前のCAGでのTIMI flow gradeは有意にT群でgrade 2が多く、N群でgrade 0が多く($p<0.01$)、PCI直後のTMP gradeは有意にT群でgrade 3が多く、N群でgrade 2が多かった($p<0.05$)。しかし、PCI直後のTFC, QGS-EFに有意差はなく、慢性期のLVG-EFの改善にも有意な差を認めなかった。観察期間中では主要心血管イベントの発生率にも有意差は認めなかった。

10. 慢性維持透析患者の虚血性心疾患の診断：運動負荷後血圧反応と心エコー法による検出

内科学第二講座 福井 政慶

はじめに 冠動脈疾患(CAD)を代表とする動脈硬化性心血管病変は、慢性維持透析患者において罹患率が高く、予後を左右する重要な要因となっ

ている。心血管病変は多因子が絡み合い生じているが、慢性の腎機能障害も心血管疾患の独立した危険因子の一つである。また、透析患者の心血管イベントによる死亡率は、非透析患者と比べ20から40倍と高く、慢性腎不全の存在そのものが、急性心筋梗塞の発症頻度をあげ、冠動脈形成術後の予後も悪化させると報告されている。さらに、無症候性心筋虚血の頻度が高いことも報告されている。これらのことより、透析患者の予後を向上させるためにはCADの早期診断と治療がきわめて重要であると考えられる。しかしながら、透析患者は運動耐容能の低下を認めること、左室肥大を高頻度に合併することから、運動負荷試験による心電図ST-T変化を用いた虚血評価には限界がある。それに変わる指標として、運動負荷試験における運動後の収縮期血圧(SBP)の回復遅延を評価することで、CADの診断が可能であるとする報告がある。加えて、超音波断層心エコー法の進歩はすばらしく、壁運動評価はCAD診断にとって必須となっている。

本研究は、透析患者のCADを診断する上でSBP反応を用いた運動負荷試験がCADの検出に有用であるか否かを検討した(第1編)。続いて、透析患者におけるCADのスクリーニング検査として、心臓超音波検査法の役割を検討した(第2編)。

研究方法 対象は本研究に対するinformed consentを書面にて得ることの出来た外来通院中の透析患者である。CADを疑われた44例(30 men, 14 women; age 41 to 81 years)に対し、症候限界性トレッドミル運動負荷試験と冠動脈造影検査を施行した。運動後SBPの回復遅延の指標(SBP ratio)は、運動後3分時のSBPを最大運動時のSBPで割ったものと定義した(第1編)。外来通院中の透析患者連続78例(男性60例、女性18例、平均年齢 64 ± 9 歳、平均透析歴 51 ± 55 ヶ月)に対し、安静時心電図、症候限界性トレッドミル運動負荷試験、心臓超音波検査、冠動脈造影検査を施行した。冠動脈支配領域に一致した高度な局所壁運動異常(高度壁運動低下領域、または無収縮領域)を認める場合、Advanced asynergyありと評価した(第2編)。

結果 冠動脈造影上有意狭窄を認めた症例は25例(CAD群)、認めない症例は19例であった(NO CAD群)。SBP ratioの至適cutoff pointを0.92

とすると、SBP ratio を用いた CAD 診断は、ST 変化を用いた場合より感度・特異度・精度とも上昇した (76% vs. 56%, 90% vs. 53%, 82% vs. 55%) (第 1 編)。Advanced asynergy を有する症例では CAD を高頻度に認めた ($p < 0.002$)。Advanced asynergy を用いた CAD の診断精度を検討すると、感度、特異度はそれぞれ 32.6%, 96.9% であった。安静時心電図変化、トレッドミル運動負荷試験の結果、運動負荷中の症状の有無、Wall motion score、Advanced asynergy を用いた多変量解析にて、Advanced asynergy が最も CAD の診断に有用であった ($p = 0.01$, odds ratio = 2.54, 95% confidence interval 2.09-298.1) (第 2 編)。

考察 本研究において、CAD の合併は約 60% の症例で認め、透析患者における CAD の罹患率は高いことが再確認された。貧血、心肥大、高血圧、溢水状態などの心血管異常に直接関わる、あるいは修飾する因子を多く有する透析症例では、CAD の有無を簡便に評価することは未だに困難である。現時点では透析患者に対して、有用性が証明された非侵襲的なスクリーニング法が確立されていないために、侵襲的検査である冠動脈造影検査を用いざるを得ないことがしばしばである。ベッドサイドで施行できる心臓超音波検査は、心室の局所壁運動異常の確認とそれによる罹患冠動脈枝の推定が可能である。Advanced asynergy を指標とした心臓超音波診断法は、CAD 診断に有用であった。つまり、心臓超音波検査で Advanced asynergy を認めた場合、CAD を合併している可能性が強く疑われ、積極的に冠動脈造影検査を進めることが出来る。ただし Advanced asynergy を認めないからといって CAD を否定することは出来ず、他の非侵襲的検査も考慮されるべきである。トレッドミル検査時、従来の ST-T 変化による虚血評価ではなく SBP 反応を評価することで、感度、特異度ともに高精度に CAD を診断し得ることが出来た。

結論 透析患者の CAD を診断する上で、SBP 反応を用いた運動負荷試験は CAD の検出に有用であり、さらに心臓超音波検査における Advanced asynergy の検出を組み合わせることにより、CAD に対するスクリーニング検査の精度はより一層大となる。

11. サルにおける頭頂葉後部の運動機能

生理学第二講座 中尾 和子

我々は先行研究においてサルに様々な体部位を用いた自発的な運動をさせると、運動前野、運動野および体性感覚野だけでなく頭頂葉後部 (posterior parietal cortex: PPC, 5 野と 7 野) の表面と 2.0-3.0 mm 深部に慢性的に埋め込んだ電極からも表面一陰性、深部一陽性の脳皮質電場電位が運動開始前に記録でき、この表面一陰性、深部一陽性の電場電位がヒトの運動準備電位に相当するように考えられることを報告した。他方、運動前野、運動野および体性感覚野から出現する運動前電場電位の振幅は運動実施に必要な筋力に応じて運動前に変化することがわかっている。しかし、PPC から出現する運動前電場電位の振幅と筋力の関係については不明であるので本研究において検討してみた。2 頭のサルに手を用いた自発的なレバー上げ運動を訓練し、その後多くの脳皮質領野の表面と 2.0-3.0 mm 深部に電極を慢性的に埋め込む手術をした。術後回復したサルに負荷有り (200, 400 g)、もしくは負荷無しのレバーを自発的に手で上げる運動を行わせ、運動施行中の脳皮質電場電位を埋め込んだ電極から記録し、解析した。負荷が大きくなって、レバーを上げるために必要となる筋力が増加するに伴い、運動前野、運動野および体性感覚野と同様に PPC から記録された運動前電場電位の振幅は大きくなった。

さらに、この運動前電場電位が真に運動を開始するための筋電活動を引き起こす準備電位であるかどうかを確かめるために、PPC を含む様々な脳皮質領野を電気刺激してどの体部位の筋肉がどの程度の刺激強度で活性化されるかについても検討した。上記の研究で用いたサルにもう 1 頭を加えた合計 3 頭のサルを使って、多くの脳皮質領野の埋め込み電極に単発のパルス電流を与え、両側の顔、胴、手首および足首の全 8 筋から筋電図を同時記録し、比較した。5 野および 7 野を電気刺激すると、運動野を刺激した時と同様に体部位局在性の筋電活動が生じた。筋電活動を誘発するのに必要な刺激強度は 5 野を刺激する場合は運動野の場合に比べてわずかに高い程度であったが、一方、7 野を刺激する場合は運動野の場合に比べ

でかなり高かった。

以上のことから、PPC は運動野と同様、筋力の予測制御に関わっていることがわかった。さらに、我々の先行研究において明らかなように、様々な体部位を用いた自発的な運動の開始前、PPC に出現する運動前電場電位が体部位局在性であり、本研究において、PPC の運動前電場電位の出現する部位を電気刺激すると、筋活動の誘発に必要な刺激強度は運動野より高かったが、運動野と同様の体部位局在性の筋活動が記録できた。これらは PPC が運動野と同様に純粋な運動機能に関わっていることを示している。

一方、最近の我々の研究から、サルの正中神経を電気刺激すると、刺激と対側の体性感覚野だけでなく PPC から極めて短潜時の体性感覚誘発電位が記録できた。これは受動的もしくは能動的な手の運動により生じる興奮性の体性感覚神経インパルスが体性感覚野と PPC を活性化するのに有用なことを示唆する。他方、サルの運動野の機能低下を体性感覚野が代償して運動機能のある程度回復させることは佐々木と玄番により報告されている。

以上、本研究で PPC が純粋な運動機能に関与することを明らかにしたことにより、例えば、運動野の障害による運動機能低下の場合、体性感覚野だけでなく PPC を積極的に活性化することが、運動機能の回復に有用であると期待される。そしてそれら頭頂葉を活性化するのに、皮膚のマッサージや運動トレーニングなど末梢の体性感覚神経を興奮させる治療法は有効なように考えられる。

12. Quantification of mentolabial profile using lateral roentgen cephalography in healthy adults and patients with scar contracture following severe facial burns, and profile reconstruction by mandibular osteotomy

形成外科学講座 下間亜由子

重度顔面熱傷症例では瘢痕拘縮を生じ、下口唇の外反やオトガイ唇溝の消失やオトガイ部の後退による下顎頸角の鈍角化など、きわめて特徴的な外見上の小顎症様顔貌をきたす。この重度顔面熱傷例の外見上の小顎症様顔貌については経験的に

は知られているものの、数量的に顔貌評価された報告はこれまで見当たらない。顔面の輪郭の基礎となるのは顔面骨および軟骨であるが実際に外観として把握する輪郭は軟組織最外層の輪郭である。軟部組織の contour を計測し、表示することが過去においてなされてこなかった理由の一つは基準点の設定が非常に難しいからである。軟部組織は表情、重力による下垂、炎症による一時的な腫張などにより容易に変化し、基準点の設定そのものが不可能に近い。必然的に安定している硬組織を基準とした軟組織の計測となる。そのため、硬組織を基準点とした軟部組織の計測を行った。良い再建治療を目指す第一歩はこの外見上の小顎症様顔貌の成因を客観的に評価することである。

今回、日本人一般成人の下顎軟組織の分析を行い標準値を求めると共に“重度顔面熱傷後顔貌”の顔面軟部組織の変形を Computed Radiography (以下 CR) による側方頭部 X 線規格写真撮影を用いて数値化し、一般成人の標準値を対照とし比較検討した。

また重度顔面熱傷後瘢痕拘縮症例の小顎症様顔貌改善の目的でオトガイ骨切りを行い数値の正常化に裏づけられた形態的改善を見た症例を提示する。

一般成人群では男性の方が女性より下顎の軟組織が各計測値において最大 1.7 倍分厚く、男性の方が軟組織の凹凸の変化が大きい形態をとることが証明された。

また男女とも、正常顔貌における陥凹部の厚みは他の部位より厚く、突出部の厚みは薄いことが示され、硬組織の輪郭と軟組織の輪郭が平行線を作っていないことが分かった。

ついでこれら一般成人の標準値を基にして重度顔面熱傷後瘢痕拘縮症例の外見上の小顎症様顔貌評価を行った。重度顔面熱傷後瘢痕拘縮症例では各計測値が一般成人群より最大 1.4 倍大きい結果を示した。これは我々が臨床現場で感じている熱傷後瘢痕拘縮症例の下顎は分厚いというイメージと一致する。また重度熱傷後瘢痕拘縮症例の外見上の小顎症様顔貌の原因はオトガイ唇溝の消失に因るものであり、赤唇の前突が小顎症様顔貌をより強調していることを客観的に評価した。

顔面側貌は視覚的かつ直感的に美醜の判断が付くものの、この明らかな基準を持つことが変形診

断や再建において極めて有用であろう。今後、重度顔面熱傷後癍痕拘縮症例の側貌改善に正常人側貌との数量的な比較検討した今回の計測結果が有用であり、外見上の最適の輪郭を設定するための重要な基盤になるものと考ええる。

しかしこのような小顎症様顔貌を改善するためにさまざまな軟組織へのアプローチによる再建方法を駆使しても満足のいく結果が得られず外見上の小顎症様顔貌を認めることをしばしば経験する。こういった症例に対し我々はオトガイ骨切り術という硬組織の再建によって軟組織の contour の再建を図るという方法を試みた。Contour をあくまで相対的なものと認識しオトガイ骨切り術によりオトガイ唇溝を形成することは極めて意義のあることである。オトガイ骨切りという単純な手術手技で確実な結果が得られるためこの方法は重度熱傷後癍痕拘縮症例の小顎症様顔貌の改善に非常に有用であると考ええる。

13. M-CSF による血流改善機序の解明

小児科学講座 中野 景司

はじめに 近年、心筋梗塞や閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対する治療として、細胞移植療法やサイトカイン療法などが開発され良好な成績をあげている。サイトカイン療法には、G-CSF や HGF、VEGF などが試みられているが、これらのサイトカインには炎症を増強したり、腫瘍を増大させたり、浮腫を助長するという副作用がある。

このような背景から我々は、血管新生の臨床では使用例が少ないサイトカイン M-CSF に着目し、

G-CSF と M-CSF を併用することにより、G-CSF 単独使用に比して、血管新生がより促進されることを見出した。(Minamino K, et al., Stem Cells. 2005; 23: 347-54.)

今回、我々は M-CSF の血管新生効果に VEGF が関与しているのではないかとという仮説のもとに以下の実験を行った。

方法 野生型マウスを用いて、M-CSF の血流改善効果（既報）が抗 VEGF 抗体を投与することにより阻害されるかを以下の方法で検証した。

- ・レーザー Doppler 血流計で虚血肢の血流変化を観察
- ・虚血肢の凍結切片を作成し、血管新生を組織学的に検討

また、M-CSF の作用点を明らかにするために、M-CSF 受容体に対するモノクローナル抗体で標識した末梢血細胞や骨髄細胞をフローサイトメーターおよびセルソーターを用いて解析した。

結果 M-CSF は骨髄内の VEGF 濃度を上昇させることにより血管内皮前駆細胞（EPC）を末梢血中に動員し、血管新生を促進している事がわかった。またこれにより血管新生がおこっている場でのみ作用すると考えられてきた VEGF が、EPC の貯蔵庫としての骨髄にも作用している事がわかった。

結語 VEGF は非常に強力な血管新生作用をもつが、全身に投与すると高度の浮腫などを引き起こすため、治療に応用することが困難であった。今回の実験結果から M-CSF などを用いることにより、間接的に骨髄内に VEGF を作用させる事で血管新生を誘導できる可能性を見出した。

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 の 結 果 の 要 旨

平成18年度

平成19年12月30日

関 西 医 科 大 学

は し が き

本集は学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 7 条による
公表を目的として平成 19 年 3 月 31 日までに本学で学位を授与した者
の論文内容の要旨および審査の結果の要旨を収録したものである。

目 次

◎ 医 学 博 士

掲載順	学位記番号	氏 名	論 文 題 目	頁
1405	甲第 763 号	高 橋 麻 由	Adenosine and a Nitric Oxide Donor Enhances Cardioprotection by Preconditioning with Isoflurane through Mitochondrial Adenosine Triphosphate-sensitive K ⁺ Channel-dependent and -independent Mechanisms.....	1
1406	甲第 764 号	山 田 麻 起 子	Propofol acts at the sigma-1 receptor and inhibits pentazocine-induced c-Fos expression in the mouse posterior cingulate and retrosplenial cortices	2
1407	甲第 765 号	中 野 景 司	Mechanisms Underlying Acceleration of Blood Flow Recovery in Ischemic Limbs by Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF)	3
1408	甲第 766 号	澤 井 宏 和	T Cell Costimulation by Fractalkine-Expressing Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis	4
1409	甲第 767 号	京 井 志 織	Dystrophin is a possible end-target of ischemic preconditioning against cardiomyocyte oncosis during the early phase of reperfusion	5
1410	甲第 768 号	矢 木 泰 弘	Involvement of Rho signaling in PAR2-mediated regulation of neutrophil adhesion to lung epithelial cells	6
1411	甲第 769 号	高 御 堂 祥 一 郎	INTRAPANCREATIC AXONAL HYPER-BRANCHING OF DORSAL ROOT GANGLIA NEURONS IN CHRONIC PANCREATITIS MODEL RATS, AND RELATION TO PANCREATIC PAIN.....	8
1412	甲第 770 号	李 强	Lin-CD34-bone marrow cells from adult mice can differentiate into neural-like cells	9
1413	甲第 771 号	三 谷 有 子	Evaluation of Psychophysiological Asymmetry in Patients with Fibromyalgia Syndrome	10
1414	甲第 772 号	内 田 洋 一 朗	Long-Term Outcome of Adult-to-Adult Living Donor Liver Transplantation for Post-Kasai Biliary Atresia	11
1415	甲第 773 号	张 建 华	Altered distributions of nucleocytoplasmic transport-related proteins in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	12
1416	甲第 774 号	和 手 麗 香	Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in	

				the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	13
1417	甲第 775 号	山 田 貴 佑 記		Regulation of cytokinesis by mgcRacGAP in B lymphocytes is independent of GAP activity	14
1418	甲第 776 号	小 池 保 志		Allogenic Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation plus Donor Lymphocyte Infusion Suppresses Growth of Colon Cancer Cells Implanted in Skin and Liver of Rats	15
1419	甲第 777 号	吉 賀 正 亨		Novel Digitalis-Like Factor, Marinobufotoxin, Isolated From Cultured Y-1 Cells, and Its Hypertensive Effect in Rats	16
1420	甲第 778 号	速 水 淳 史		Immunosuppressive effects of Photodynamic Therapy by topical aminolevulinic acid	17
1421	甲第 779 号	竹 田 浩 子		Hyposmotic stimulation-induced nitric oxide production in outer hair cells of the guinea pig cochlea.....	19
1422	甲第 780 号	沈	静	Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway and neuronal nitric oxide synthase in ATP-induced Ca^{2+} signalling in cochlear inner hair cells.....	20
1423	甲第 781 号	片 野 泰 代		Proteomic identification of a novel isoform of collapsin response mediator protein-2 in spinal nerves peripheral to dorsal root ganglia.....	22
1424	甲第 782 号	李	劲 松	An alpha-helical burst in the src SH3 folding pathway.....	23
1425	甲第 783 号	孫	瑛 洙	Prostaglandin E_2 is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells.....	24
1426	甲第 784 号	李	清	Analyses of Very Early Hemopoietic Regeneration After Bone Marrow Transplantation: Comparison Between Intravenous and Intra-Bone Marrow Routes.....	25
1427	甲第 785 号	石 川 有 加 里		Senescence in cultured trabecular meshwork cells	26
1428	甲第 786 号	阪 本 幸 世		The Differential Effects of Nitrous Oxide and Xenon on Extracellular Dopamine Levels in the Rat Nucleus Accumbens: A Microdialysis Study	27
1429	甲第 787 号	柴田 清児 ブルース		Administration of amitriptyline attenuates noise-induced hearing loss via glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induction	28
1430	乙第 644 号	生 田 明 子		Correlation p53 expression and human papilloma virus deoxyribonucleic acid with clinical outcome in early uterine cervical carcinoma.....	30
1431	乙第 645 号	四 宮 敏 章		Plasma acylated ghrelin levels correlate with subjective symptoms of functional dyspepsia in female patients	31

1432	乙第 646 号	長 谷 川	隆 正	The regulation of S100A12 (EN-RAGE) protein expression 31
1433	乙第 647 号	稲 田	武 文	A new method of measuring gastric emptying and gastrointestinal transit in mice and its application in the fields of anesthesiology 33
1434	乙第 648 号	中 尾	和 子	Motor functions of the posterior parietal cortex in monkeys..... 35
1435	乙第 649 号	山 田	光 一	Effect of beta-blockers on the mortality of Japanese patients with myocardial infarction 36
1436	乙第 650 号	森	伸 生	Development of a New Method for Diagnosis of Rubella Virus Infection by Reverse Transcription-Loop- Mediated Isothermal Amplification..... 37
1437	乙第 651 号	馬 殿	徹 也	Sequential endoscopic findings and histological changes of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats..... 38
1438	乙第 652 号	入 澤	聡	Increased omega complexity and decreased microstate duration in non-medicated schizophrenic patients 39
1439	乙第 653 号	狩 谷	秀 治	COMPARISON OF PRIMARY PATENCY IN CUTTING BALLOON ANGIOPLASTY AND CONVENTIONAL BALLOON ANGIOPLASTY FOR DIFFERENT TYPES OF HEMODIALYSIS ACCESS STENOSIS 40
1440	乙第 654 号	岡 田	智 行	Comparative immunobiology of thymic DC mRNA in autoimmune-prone mice 41
1441	乙第 655 号	张	玉 明	Simultaneous Injection of Bone Marrow Cells and Stromal Cells into Bone Marrow Accelerates Hematopoiesis In Vivo..... 43

【1405】

氏 名 (本 籍) ^{たか}高 ^{はし}橋 ^ま麻 ^ゆ由 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 763 号

学位授与の日付 平成 18 年 6 月 23 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Adenosine and a Nitric Oxide Donor Enhances
Cardioprotection by Preconditioning with
Isoflurane through Mitochondrial Adenosine
Triphosphate-sensitive K^+ Channel-dependent
and -independent Mechanisms

論文審査委員 主査 (教授) 稲垣千代子

(教授) 今村洋二 (教授) 新宮 興

論文内容の要旨

【はじめに】

先行する短時間の心筋虚血により、その後に生じる致死的な虚血性の心筋障害が抑制される現象は ischemic preconditioning (IPC) とよばれ、内因性心筋保護作用として重要な生理現象である。今日、IPC は心筋保護を必要とするさまざまな領域で臨床的にも応用されている。その発現機序は未だ不明であるが、G 蛋白質を介したアデノシン受容体や ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) チャンネルが強く関与することが示唆されている。我々が毎日の臨床で用いている吸入麻酔薬にも IPC 類似のプレコンディショニング効果があるといわれている。その機序も IPC と同様にアデノシンおよび K_{ATP} チャンネルが関与していると考えられているがなお明らかではない。

【研究目的】

我々はラット心筋において、吸入麻酔薬であるイソフルランのプレコンディショニング効果を、薬理的プレコンディショニングとして既に用いられているアデノシンおよび一酸化窒素ドナーの心筋保護効果と比較した。また、イソフルランによる心筋プレコンディショニングにおけるミトコンドリア K_{ATP} ($mitoK_{ATP}$) チャンネルの役割についても調べ検討した。

【研究方法】

ラット心臓を摘出し、ランゲンドルフ法を用い

て灌流した。 $mitoK_{ATP}$ チャンネル活性の指標としてフラボ蛋白の自家蛍光をモニターした。バルーンを左室に挿入し、左室等容性収縮力をモニターして心機能を評価するとともに、再灌流後 triphenyltetrazolium chloride 染色法を用いて心筋梗塞巣を測定した。また、選択的 $mitoK_{ATP}$ チャンネル阻害薬を投与し、イソフルランによる心筋プレコンディショニングにおける $mitoK_{ATP}$ チャンネルの役割について検討した。

【結果】

$mitoK_{ATP}$ チャンネル開口薬である diazoxide およびイソフルランは $mitoK_{ATP}$ チャンネルを活性化した。 $mitoK_{ATP}$ チャンネルの活性は 0.5 ~ 3.0% イソフルランでは濃度依存性に増加し、4.0% では減少した。Diazoxide による $mitoK_{ATP}$ チャンネルの活性化は diazoxide 存在下でのみ認められたが、イソフルランのそれはイソフルランを灌流液から除去しても持続した。このことからイソフルランの $mitoK_{ATP}$ チャンネルの活性化は IPC のそれと同様にいわゆる“メモリー”を有すると考えられた。

アデノシンや一酸化窒素ドナーである S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) 単独では $mitoK_{ATP}$ チャンネルの活性化はみられず、明らかな心機能の改善も認められなかった。しかし、イソフルランと共に三剤を同時投与すると、イソフルラン単独投与時以上に $mitoK_{ATP}$ チャンネル活性化は認められなかったが、心筋梗塞巣は有意に減少し、左心室機能も有意に改善した。

$mitoK_{ATP}$ チャンネル拮抗薬である 5-hydroxydecanoate を、イソフルランを含む三剤を投与前および三剤投与中も同時投与すると、 $mitoK_{ATP}$ チャンネルの活性は完全に抑制され、心筋梗塞巣の減少も完全に抑制された。しかし、イソフルランを含む三剤投与後 5-hydroxydecanoate を投与すると、 $mitoK_{ATP}$ チャンネルの活性は完全に抑制されたが、心筋梗塞巣の減少は完全には抑制されなかった。

【考察】

イソフルラン単独投与でも心筋梗塞巣は減少しプレコンディショニング効果はみられたが、更なる心筋梗塞巣の減少、および心機能の改善にはイソフルランと共にアデノシン、SNAP の三剤を同時投与する必要がある。

イソフルランによる $mitoK_{ATP}$ チャンネルの活性は、アデノシンおよび SNAP の同時投与によって

増強されなかったが、 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ チャンネルはその強力なプレコンディショニング作用の trigger として重要な役割を果たすことが示唆された。また $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ チャンネルの活性は、イソフルラン単独投与時の心筋保護効果において mediator としての役割も果たすが、三剤同時投与時の強力な心筋保護効果における mediator には、 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ チャンネルの活性に依存する機序と依存しない機序が存在することが示唆された。

審査の結果の要旨

従来からイソフルランに心筋プレコンディショニング作用があることが知られているが、本研究は従来の心筋梗塞巣の計測のみならず左心室機能の改善を指標とした。また、イソフルランにアデノシン、SNAP を併用することでプレコンディショニング作用が増強することを明らかとし、同作用におけるフラボ蛋白自家蛍光強度により計測したミトコンドリア K_{ATP} チャンネル開口の役割を明らかとした。本研究は医学博士論文に値すると判断する。

【1406】

氏 名 (本 籍) やま だ まき こ 山 田 麻 起 子 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 764 号

学位授与の日付 平成 18 年 6 月 23 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Propofol acts at the sigma-1 receptor and inhibits pentazocine-induced c-Fos expression in the mouse posterior cingulate and retrosplenial cortices

論文審査委員 主査 (教授) 稲垣千代子
(教授) 山田久夫 (教授) 新宮 興

論文内容の要旨

【目的】

シグマ 1 受容体は精神症状を引き起こす様々な薬剤と機能的に相互作用し、学習・記憶、神経保護、薬物耽溺などの多彩な生理作用に関連してい

るだけでなく、統合失調症との関連も指摘されている。脳後帯状・後板状皮質 (PC/RS) は統合失調症の責任部位の一つと考えられ、統合失調症の薬物モデルであるフェンサイクリジン (PCP) やケタミンなどの非競合性 NMDA 受容体拮抗薬は、げっ歯類に異常行動を引き起こすとともにこの部位の神経傷害を引き起こす。一方、PCP やケタミンによる PC/RS の神経細胞傷害にもシグマ受容体の関与があることが報告されている。多くの麻酔薬はシグマ 1 受容体を介する作用と類似の作用を有する。これまで一部の麻酔薬には非競合性 NMDA 受容体拮抗作用があることが明らかにされているが、麻酔薬のシグマ受容体に対する作用は全く不明である。本研究は、シグマ 1 受容体に対する静脈麻酔薬の作用を細胞および組織レベルで検討したものである。

【方法】

1. 結合実験：ラット脳小胞体膜を調整した後、固定濃度 (6.6 nM) の選択的シグマ 1 受容体作用薬である (+)[^3H]SKF-10,047 の特異的結合に対するプロポフォル (10⁻¹⁰–10⁻⁵ M)、デクスメトミジン (10⁻¹⁰–10⁻⁴ M)、ドロペリドール (10⁻¹⁰–10⁻⁵ M)、チオペンタール (10⁻¹⁰–10⁻² M) の効果を検討した。また、プロポフォルのシグマ 1 受容体に対する作用様式を確認するために、(+)[^3H]SKF-10,047 の濃度を変化させてプロポフォル 20 μM 存在下または非存在下における濃度結合曲線を作成した。

2. 細胞内カルシウム動態への作用実験：小胞体膜上に存在するシグマ 1 受容体・アンキリン B・IP3 受容体複合体のシグマ 1 受容体へのアゴニスト結合により、シグマ 1 受容体・アンキリン B 複合体が IP3 受容体から解離して IP3 受容体の活性化をおこす。これにより IP3 受容体を介する細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇が増加する。NG108 細胞を用いて、1 μM ブラジキニン (BDK) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加作用に対する、選択的シグマ 1 受容体作用薬である (+) ペンタゾシン (100 nM) およびプロポフォル (1, 10, 100 μM) の効果を調べた。

3. PC/RS への c-fos 発現への作用実験：ペンタゾシンは PC/RS にシグマ 1 受容体を介して c-fos を発現する。このペンタゾシンによる c-fos 発現作用に対し、プロポフォルがどのような影響を与

えるか、ICR マウスを用いて調べた。

【結果】

1. (+)[³H]SKF-10,047 (6.6 nM) の特異的結合に対する K_{i50} は、プロポフォル 10.2±0.6 μM (約 2.4 μg/ml) であり、臨床使用濃度内でシグマ 1 受容体に作用する可能性が示唆された。これに対して、ドロペリドール 0.17±0.03 μM、デクスメドミジン 5.73±1.2 μM であり、臨床使用濃度以上でしか作用しなかった。またチオペンタールは 10 mM 以下ではシグマ 1 受容体に全く作用しないことが認められた。プロポフォル非存在下では受容体最大結合量 (Bmax) は 59.4±4.2 fmol/mg protein, 解離定数 (Kd) は 11.4±1.1 nM であったのに対し、プロポフォル 20 μM 存在下では Bmax 33.3±2.1 fmol/mg protein, Kd 11.0±1.8 nM であり、プロポフォルがシグマ 1 受容体に対して非競合的に結合を抑制することが示された。

2. 1 μM BDK による [Ca²⁺]_i 増加作用を (+) ペンタゾシンは有意に増強したが、プロポフォルは増強しなかった。

3. プロポフォルは PC/RS でのペンタゾシン誘導性 c-fos 発現を有意に抑制した。

【考察】

静脈麻酔薬プロポフォルは臨床使用濃度でシグマ 1 受容体拮抗作用をもつことが示された。プロポフォルには精神作用、脳保護作用、制吐作用、耽溺作用など、シグマ 1 受容体を介する作用と同様の作用が多くある。シグマ 1 受容体がプロポフォルの作用に何らかの形で関与している可能性があり、本研究はプロポフォルの中樞神経系への作用機序解明に新しい視点を加えたものと考えられる。

審査の結果の要旨

本研究は静脈麻酔薬であるプロポフォルがシグマ受容体と結合し、シグマ受容体の活性化と考えられているペンタゾシンによる後帯状・後板状皮質の c-Fos 発現を抑制することから、シグマ受容体の拮抗薬作用を有する可能性を初めて示唆したものであり、今後プロポフォルの薬理作用を考える上で重要な結果を示した。したがって、博士号に値する研究であると審査の結果判断した。

【1407】

氏 名 (本 籍) ^{なか} 中 ^の 野 ^{けい} 景 ^し 司 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 765 号

学位授与の日付 平成 18 年 7 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Mechanisms Underlying Acceleration of Blood Flow Recovery in Ischemic Limbs by Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF)

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 金子一成

論文内容の要旨

はじめに

近年、心筋梗塞や閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対する治療として、細胞移植療法やサイトカイン療法などが開発され良好な成績をあげている。サイトカイン療法には、G-CSF や HGF、VEGF などが試みられているが、これらのサイトカインには炎症を増強したり、腫瘍を増大させたり、浮腫を助長するという副作用がある。

このような背景から我々は、臨床ではまだあまり使用されていないサイトカイン M-CSF に着目し、G-CSF と M-CSF を併用することにより、G-CSF 単独使用に比して、血管新生がより促進されることを見出した。(Minamino K, et al. *Stem Cells*. 2005; 23: 347-354.)

今回、我々は M-CSF の血管新生効果に VEGF が関与しているのではないかという仮説のもとに以下の実験を行った。

方法

① 6～8 週例の C57BL/6 マウス (B6 マウス) の大腿動静脈を結紮・離断し下肢の虚血モデルを作成し、直ちに抗 VEGF 抗体 (250 μg/body) あるいは生理食塩水を静脈内投与した。同日から 3 日間、M-CSF (250 μg/kg) または G-CSF (250 μg/kg) あるいは両者を腹腔内投与した。0・3・7 日目にレーザードップラーを用いて血流量を測定した。

② M-CSF が末梢血細胞と骨髄細胞のいずれに作

用し VEGF の産生を亢進させているかを検討するため、同マウスから脾臓細胞と骨髓細胞を同数採取し、M-CSF を添加し培養を行った。3 日目に培養上清を集め、ELISA 法を用いて VEGF 濃度を測定した。

- ③ 骨髓細胞の中でいかなる細胞が M-CSF 受容体を発現しているかを検討するため、血球系表面マーカー (Ter119, CD19, Gr-1, CD11b) で標識し、フローサイトメーターを用いて測定した。また、標識した細胞は M-CSF の刺激により VEGF の産生が亢進するかを検討するため、セルソーターを用いて各 Lineage に分け、サイトカイン添加培養を行い ELISA 法で検討した。
- ④ 抗 VEGF 抗体を投与することにより、M-CSF による末梢血への血管前駆細胞 (以下 EPC) 動員が阻害されるか、同マウスに抗 VEGF 抗体と M-CSF とを投与し 3 日目の末梢血をフローサイトメーターで解析した。

結果

- ① 抗 VEGF 抗体を投与することにより、M-CSF 群の血流改善効果が抑制されたが、G-CSF 群では抑制されなかった。
- ② 培養液中に M-CSF を添加することにより、骨髓細胞からの VEGF 産生が有意に亢進した。
- ③ M-CSF 受容体 (CD115) は、骨髓細胞中の Gr-1 陽性細胞 (顆粒球系)、CD11b 陽性細胞 (マクロファージ系)、Lineage Marker 陰性細胞に発現していた。それぞれをセルソーターで分離し、M-CSF を添加し培養すると、M-CSF 受容体を発現する細胞から VEGF 産生が認められた。
- ④ コントロール群に比し、M-CSF 群では末梢血中の EPC は増加するが、抗 VEGF 抗体を投与することにより EPC の動員が阻害された。

結語

以上の結果から、M-CSF による血管新生効果には骨髓内での VEGF 産生が関与しており、M-CSF は骨髓内での VEGF 産生を介して末梢血中に EPC を動員し、血流を改善させると考えられた。

審査の結果の要旨

近年、心筋梗塞や閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対する治療として、細胞移植療法やサイトカイン療法などが開発され良好な成績をあげて

いる。本研究は、M-CSF の血管新生効果に着目し、マウスの大腿動静脈結紮・離断による下肢虚血モデルを用いて、その血流改善効果について検討している。その結果、M-CSF が骨髓細胞からの VEGF 産生を介して、末梢血液中に血管内皮前駆細胞 (EPC) を動員し、この EPC が血管新生に関与することを明らかにしている。

以上のように、本研究によって、近い将来の M-CSF を用いる閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対する血管新生療法の可能性が示唆された点で、医学的に価値ある論文と認められる。

【1408】

氏 名 (本 籍) ^{さわ い ひろ かず} 澤 井 宏 和 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 766 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目

T Cell Costimulation by Fractalkine-Expressing
Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis

論 文 審 査 委 員 主査 (教授) 池原 進

(教授) 木梨達雄 (教授) 飯田寛和

論文内容の要旨

【研究目的】

関節リウマチは滑膜の過形成と慢性炎症が特徴である。それは滑膜中の繊維芽細胞と抹消より浸潤してきたリンパ球が原因の一つであると考えられる。すでに報告されている様に MHC class II 蛋白を発現している活性化された繊維芽細胞はスーパー抗原を介して T 細胞を活性化することが分かっている。

T 細胞は関節リウマチに特徴的な様々なケモカインにより遊走されるリンパ球の一つであり関節リウマチにおいて T 細胞の老齢化とそれに伴い Killer like immunoglobulin receptors (KIRs) や NKG2D などの新しい制御レセプターの存在も分かっている。

私が焦点を当てました FKN は上記のケモカインの一つでありその構造は他のケモカインにはな

い特徴がある。構造は 2 種類あり 1 つは膜結合型、他は浮遊型である。機能的にもリンパ球遊走機能、更に接着因子としての 2 つの機能を兼ね備えている。

滑膜中において FKN は Endothelial cells, DC, Macrophage に発現が認められている。一方で FKN のレセプターである CX3CR1 は唯一 FKN と結合出来るという特徴があり抹消血中には CD4⁺ Tcells, CD8⁺ Tcells, NKcells に発現が認められている。

この特徴的 FKN というケモカインとレセプターの結合によりどのように自己免疫疾患が形成されるか？という問題に焦点をあてました。

FKN をブロックする抗体治療によりマウスのコラーゲン誘発性関節リウマチが改善されたとの報告もありこのケモカインとレセプターとの結合は何らかの慢性炎症を引き起こす原因になると予測されました。

この研究では関節リウマチで発現が見られる FKN と CX3CR1 の結合によるシグナルが T 細胞にどのような影響を及ぼすのかを検証しました。

【研究方法】

FKN の発現に関してはリアルタイム PCR と免疫染色を施行した。

末梢血中の T 細胞上の CX3CR1 の発現はフローサイトメトリーを用いて検討した。T 細胞の活性機構に関しては増殖能、サイトカインの分泌、細胞内顆粒の放出実験を施行。繊維化細胞様滑膜細胞と T 細胞との接着実験は 5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を用いて施行した。

【結果】

FKN は培養したリウマチの繊維化細胞と滑膜組織中の肥厚した滑膜細胞中に発現が認められた。CD4⁺ T 細胞の中で唯一老齢化した CD28 陰性の T 細胞にレセプターである CX3CR1 の発現が認められた。

また、繊維芽細胞培養実験から TNF α , IFN- δ という preinflammatory サイトカインが FKN の発現をコントロールしていた。

これら CD4⁺ CD28⁻ CX3CR1⁺ T 細胞は非常に強く繊維化細胞と接着し FKN と CX3CR1 との結合を阻害する事により容易に接着性が失われた。

繊維化細胞上に発現した FKN は CX3CR1 を介

して T 細胞が活性化する為の補助刺激を送り T 細胞の増殖、各サイトカイン分泌、細胞内顆粒の放出を司っていた。

【考察】

滑膜中の繊維芽細胞は DC や Macrophage と同じように抗原提示細胞としての働きを持ち FKN というケモカインを通じて CD28⁻ T 細胞を活性化し慢性炎症を引き起こす原因となっていると考えられた。つまり FKN のレセプターである CX3CR1 もまた KIR や NKG2D と同じように Co-stimulator としての機能を持っていると考えられた。

審査の結果の要旨

本研究は関節リウマチの滑膜中に見られる繊維芽細胞に、リンパ球遊走機能と接着因子としての機能を持つフラクタカインが発現し、CD28-T 細胞を活性化してその増殖、各種サイトカイン分泌、細胞内顆粒の放出を司っていることを明らかにしたものである。関節リウマチの慢性炎症を生じるメカニズムに貴重な知見を加えたもので、学位に値するものと認められる。

【1409】

氏 名 (本 籍) 京 井 志 織 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 767 号

学位授与の日付 平成 18 年 10 月 31 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Dystrophin is a possible end-target of ischemic preconditioning against cardiomyocyte oncosis during the early phase of reperfusion

論文審査委員 主査 (教授) 岩坂壽二

(教授) 今村洋二 (教授) 松田博子

論文内容の要旨

【目的】

虚血や再灌流に伴う心筋細胞死の機序がその他の細胞死と異なる点は、心筋細胞は再灌流時に筋原繊維の収縮に伴って壊死に陥ることである。この再灌流時における心筋細胞膜の脆弱性の機序は

長く不明であった。Dystrophin は心筋細胞と骨格筋細胞に特異的に多く存在する膜タンパクであり、筋肉細胞の収縮に伴う shear stress から細胞膜を保護する役割を果たしている。したがって、もし虚血中に細胞膜 dystrophin の減少が惹起されれば、これが再灌流時における心筋細胞膜の脆弱性を引き起こす可能性がある。Ischemic preconditioning (IPC) はミトコンドリア機能を保護することで、虚血再灌流障害を予防することが知られている。そこで本研究では、IPC が再灌流後心筋収縮による心筋細胞壊死の予防効果の機序解明におけるミトコンドリア機能と細胞膜 dystrophin との関係を検討した。

【方法】

S-D 系雄性ラット 250–300 g の摘出心を Langendorff 法で灌流し、30 分間の虚血後 120 分間の再灌流を行なった。IPC の描出の為に、5 分間の虚血と 5 分間の再灌流を 3 回繰り返して行った。再灌流時の心筋細胞壊死における心筋収縮の役割を検討するために心筋収縮抑制薬である 2,3-butanedione monoxime (BDM) を投与した。また、ミトコンドリア機能と細胞膜 dystrophin の回復程度および心筋細胞壊死との関連を検討するためにミトコンドリア脱共役剤である 2,4-dinitrophenol (DNP) あるいはミトコンドリア F(1)F(0)-ATPase 阻害薬である oligomycin を投与した。ミトコンドリア膜電位は tetramethylrhodamine ethyl-ester (TMRE) の取り込みで評価した。心筋細胞壊死は Evans blue の取り込みと triphenyltetrazolium chloride 染色法による心筋梗塞巣の定量によって評価した。

【結果】

IPC は虚血中の心筋 ATP と細胞膜 dystrophin の減少を導かなかったが、再灌流時にはミトコンドリア膜電位と心筋 ATP を有意に増加させ、細胞膜 dystrophin の回復を促進した。これに伴って再灌流後の心筋細胞壊死は抑制され、その効果は再灌流後一過性に BDM を投与することによって著明に増強された。一方、DNP はミトコンドリア膜電位を低下させ、oligomycin はこれに影響を与えなかった。しかし、いずれの薬剤も IPC による再灌流後の心筋 ATP の増加を抑制し、細胞膜 dystrophin の回復を妨げた。単離ミトコンドリアと細胞膜を用いた in vitro の実験系でも、IPC 処置後に虚

血状態としたミトコンドリアは無処置の虚血性ミトコンドリアと比較して有意に ATP 産生が多く、細胞膜分画への dystrophin の移行は良好であった。

【結論】

細胞膜 dystrophin が虚血に伴う ATP 低下によって細胞膜から失われることが再灌流障害の成因として重要であることが示唆された。IPC は再灌流後のミトコンドリア機能を改善し、ATP 産生を増加させ、細胞膜 dystrophin の回復を促進することから、dystrophin は IPC による心筋保護効果の最終標的タンパクであると考えられた。また、IPC のごとくミトコンドリアの機能温存をもたらす心筋保護的処置と再灌流時に一過性収縮抑制を併用することによって再灌流障害が著明に軽減されることが示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は新規な内容を含んでおり、医学に資するところ大と考え、学位に値すると判断された。

【1410】

氏 名 (本 籍) ^や ^ぎ ^{やす} ^{ひろ} 矢 木 泰 弘 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 768 号

学位授与の日付 平成 18 年 10 月 31 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Involvement of Rho signaling in PAR2-mediated regulation of neutrophil adhesion to lung epithelial cells

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二
(教授) 稲垣千代子 (教授) 福原資郎

論文内容の要旨

【研究目的】

Protease-activated receptor (PAR) は細胞外特定領域を限定分解されることにより活性化される G 蛋白共役型受容体で、現在 PAR1 から PAR4 までがクローニングされている。呼吸器系において PAR2 は上皮細胞を含めたさまざまな細胞に発現しており、これらの受容体の活性化が炎症性疾患

に関与することが報告されている。また、肺上皮細胞への好中球接着は、肺線維症、acute respiratory distress syndrome といった炎症性疾患に認められ、その病態生理に関与することが報告されている。好中球接着にはさまざまな接着分子が関与し、これらの分子は focal adhesion kinase (FAK) などの細胞骨格関連蛋白と相互作用することが知られており、さらに細胞骨格の制御因子として Rho, Rac, Cdc42 などの低分子量 GTP 結合蛋白の役割が近年注目されている。我々は PAR2 を刺激した肺上皮細胞において好中球の接着が亢進することを見出し、その機序についてアクチンフィラメント再構築の観点から検討した。

【研究方法】

- (1) ヒト肺上皮癌由来細胞株 (A549 細胞) を 24 穴培養皿もしくはガラスカバースリップ上で培養し、薬物刺激 24 時間前に血清を含まない培養液に交換した。
- (2) A549 細胞をトリプシン 0.5 U/ml または PAR2 合成リガンド (SLIGKV-NH2) 100 μ M にて一時間刺激後洗浄し、健常者末梢血よりフィコールパーク法で調製した好中球を 10⁶ 個/well 加えた。
- (3) 好中球添加 30 分後上清を除去し、接着した好中球の peroxidase 活性を o-phenylenediamine 発色法により測定し、好中球 10⁶ 個の標準値から % 表示した。
- (4) PAR2 刺激後の上皮細胞を 3% パラホルムアルデヒドにより固定し、FITC 標識 phalloidin と反応後、共焦点レーザー顕微鏡で得られた蛍光染色像からアクチンの重合を観察した。
- (5) PAR2 刺激後の上皮細胞を radioimmunoprecipitation assay buffer にて溶解し、9000 g, 5 分間遠心分離後の上清を 7.5% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動展開した後、抗チロシンリン酸化または非リン酸化 FAK 抗体による Western blot 解析を行った。

【結果】

- (1) トリプシン (0.05–1 U, 30 分–3 時間) 及び SLIGKV-NH2 (0.1–100 μ M, 30 分–3 時間) 刺激により好中球接着は無刺激群と比べて濃度および時間依存性に亢進し、接着亢進は少なくとも 3 時間持続した。PAR1 刺激薬である thrombin 3 U/ml では好中球接着の亢進は認め

られなかった。

- (2) PAR2 刺激による好中球接着の亢進はアクチン重合阻害薬であるサイトカラシン D (1 μ M), Rho 不活化薬である mevastatin (50 μ M), および Rho キナーゼ (ROCK) 阻害薬である Y-27632 (10 μ M), または tyrosine kinase 阻害薬である genistein (10 μ M) 前処置により抑制された。
- (3) Phalloidin 染色により、PAR2 刺激 1 時間後の上皮細胞でアクチンフィラメントの重合が認められ、この反応は mevastatin または Y-27632 前処置により抑制された。
- (4) トリプシンおよび SLIGKV-NH2 によりチロシンリン酸化 FAK (pFAK Y397) の免疫反応性は無刺激群に比し 1.5–2.0 倍に増加し、この反応は mevastatin または Y-27632 前処置により抑制された。

【考察】

肺上皮細胞の PAR2 を刺激すると好中球接着亢進が認められた。この接着亢進はサイトカラシン D の前処置により抑制されたことからアクチンの重合の関与が考えられた。アクチン重合を調節しているシグナルに Rho/ROCK の関与が知られており、Rho 不活化薬および ROCK 阻害薬は肺上皮細胞の好中球接着の亢進とアクチン重合を抑制し、さらに PAR2 刺激による FAK チロシンリン酸化レベルの上昇が認められたことから、PAR2 刺激による肺上皮細胞への好中球接着の亢進には Rho/ROCK の活性化に続くアクチンフィラメントの再構成および FAK のチロシンリン酸化が関与する可能性が示された。

審査の結果の要旨

G 蛋白共役型受容体である PAR2 の炎症反応における役割が検討されている。すなわち、ヒト肺上皮細胞に発現する PAR2 を刺激すると好中球の接着が亢進し、その機序としてアクチンフィラメントの再構成および FAK のチロシンリン酸化の関与が示唆された。本研究は、炎症性肺疾患の基礎的データを提供したものであり、学位に値する。

【1411】

氏名(本籍) ^{たかみどう}高御堂 ^{しょういちろう}祥一郎(愛知県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲第769号

学位授与の日付 平成18年11月29日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

学位論文題目

INTRAPANCREATIC AXONAL HYPER-BRANCHING OF DORSAL ROOT GANGLIA NEURONS IN CHRONIC PANCREATITIS MODEL RATS, AND RELATION TO PANCREATIC PAIN

論文審査委員 主査(教授)伊藤誠二

(教授)山田久夫 (教授)岡崎和一

論文内容の要旨

慢性膵炎の本態は、膵実質の脱落とその部位の線維化の持続的進行であり、臨床的には頑固な上腹部痛を特徴とする。病理組織所見として膵内の線維化に伴い膵内神経線維の増生が観察され、また各種神経ペプチドや神経成長因子の受容体などがそれらの神経線維に過剰発現することが報告されており、本疾患の疼痛症状や炎症の増悪との関連が想像されるが、増生している神経の起源や機能・増生のメカニズムについては明らかでない。

今回、申請者は自然発症慢性膵炎モデルラットの WBN/Kob 系雄性ラットを用いて慢性膵炎時に膵内で増生する知覚神経の終末構造について神経トレース法と免疫組織化学的手法を組み合わせで検討した。さらに膵内神経増生と疼痛症状との関連について免疫組織化学法および行動生理学的手法を用いて検討した。

【研究方法】

WBN/Kob 系雄性ラット(慢性膵炎モデル群)は特殊繁殖用飼料 MB-3 にて飼育することで12週齢頃より組織学的に膵炎像が観察され、20週齢を過ぎると膵実質の脱落と線維化が著明となる。対照として標準飼料で飼育した同週齢の正常 Wistar ラット(コントロール群)を用いた。逆行性神経トレース実験として、24週齢ラットの膵実質内に逆行性軸索輸送物質(0.5% WGA-HRP+15% HRP:以下 HRP)を注入し、3日後に脊髄後根神

経節、副交感神経節(節状神経節)を摘出する。それぞれの神経節における HRP 陽性細胞数をカウントし、膵内神経支配について本モデルラットと正常 Wistar ラット間で比較検討した。次に順行性神経トレース実験として、膵支配レベルの脊髄後根神経節内に順行性軸索輸送物質(10% Biotinylated dextran amine:以下 BDA)を注入し、2週間後に膵臓を摘出、凍結連続切片を作成。膵内 BDA 陽性神経をカウントし顕微鏡下に追究した。さらに、シナプスタンパク質、末梢神経マーカー、神経突起発芽マーカー、膵内分泌細胞のマーカー、各種神経ペプチドとその受容体(Substance P, CGRP, NPY, VIP など)との蛍光二重染色をもおこなった。

またコレシストキニン(CCK)のアナログである caerulein を負荷し膵外分泌刺激を加えた際の、脊髄後角における神経興奮のマーカーである c-fos の発現量を免疫組織化学的手法にて評価し、さらに home cage activity を用いた行動生理学的手法を組み合わせて、疼痛症状について考察した。

【結果】

膵実質から各神経節への HRP 逆行性神経トレース実験では、慢性膵炎モデル群の脊髄後根神経節においてラベルされた HRP 陽性神経細胞の減少がみられた。節状神経節においては両群間に差はみられなかった。

脊髄後根神経節から膵内神経への BDA 順行性トレース実験では、慢性膵炎モデル群の膵内で synaptophysin 共陽性の BDA 陽性神経終末が増加していた。トレースされた神経の一部は膵内在性の神経細胞・神経節にその終末を伸ばしており、特に慢性膵炎モデル群では神経突起発芽部のタンパク質である GAP-43 が強く発現していた。さらに、この終末部は PGP9.5 陽性のサテライト細胞様小型細胞を取り囲むような構造をとっていた。c-fos を用いた免疫組織化学的検討では、慢性膵炎モデル群の膵支配レベルの脊髄後角において c-fos 陽性ニューロンの数が増加していた。さらに caerulein にて膵外分泌刺激を加えると、慢性膵炎モデル群では c-fos 陽性ニューロンの数が著明に増加した。行動実験においては、慢性膵炎モデル群で Grooming の減少がみられ、膵外分泌刺激を加えるとその変化はより明確となった。

【考察】

慢性膵炎時には組織荒廃に伴って末梢神経も変性し、膵臓を支配する後根神経節細胞の数は減少するが、慢性膵炎時に膵内で増生・伸長している神経線維の多くは後根神経節細胞から投射された軸索の分枝が増生したものであり、その神経終末と膵内在性の神経細胞との密接な関連が示唆された。膵内で後根神経節細胞の神経終末が増加していた脊髄レベルでc-fos陽性脊髄後角ニューロンの数が増加しており、このことは痛覚刺激の持続を裏付けている。また行動生理学の所見から、膵内神経支配様式の変化と疼痛症状との関連が示唆された。

審査の結果の要旨

慢性膵炎の疼痛症状に関する神経の機能・増生の機序は明らかでない。申請者らは自然発症慢性膵炎モデルラットを用い、慢性膵炎の膵内で増生・伸長している神経線維の多くは後根神経節細胞から投射された軸索分枝の増生であること、c-fos 陽性脊髄後角ニューロンの増加が痛覚刺激の持続に関与すること明らかにした。さらに行動生理学的手法を用いて膵内神経支配様式の変化と疼痛症状との関連を明らかにし、学位に値すると考えられた。

【1412】

氏 名 (本 籍) ^り李 ^{きょう}強 (中国)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 770 号
学位授与の日付 平成 18 年 11 月 29 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Lin-CD34-bone marrow cells from adult mice
can differentiate into neural-like cells

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 河本圭司

論文内容の要旨

神経疾患に対する幹細胞移植療法は、失われた神経細胞を補充し、神経変性を緩和し、神経回路

を再構築する可能性の高い療法として期待されている。臨床応用に伴う倫理問題、拒絶反応、単離技術などの面から考慮すると、自己移植を実現させる骨髄細胞 (BMCs)、特に幹細胞移植は最も魅力のある細胞ソースとして注目されている。

最近、骨髄由来の CD34+ 細胞から神経系細胞への分化誘導が可能であることが指摘されたが、CD34-BMCs についての報告はまだ少ない。このような背景から、我々は成体骨髄由来の Lin-CD34-BMCs から神経系細胞への分化誘導の研究を行った。

今回、我々は 16 週齢の eGFP+ or GFP-C57BL/6 (B6) マウスの BMCs を使用した。大腿骨や上腕骨から取り出した whole BMCs は ficoll で分離し、低比重分画を用いた。その後、anti-lineage markers (CD4, CD8a, CD11b, CD45R, Gr-1 and TER-119) 抗体と anti-CD34 抗体で染色し、細胞をフローサイトメーターで分析し、99.5%以上の純度の細胞を用いて、培養や移植を行った。

In vitro で Lin-CD34-BMCs の神経分化能を評価するため、神経誘導剤の retinoic acid (RA) と神経誘導因子の PDGF-BB, EGF, FGF-b を添加し培養した。添加なしの実験グループはコントロールとした。経時的に、免疫蛍光染色と RT-PCR の検討を行った。

In vivo で Lin-CD34-BMCs の神経分化能を観察するため、eGFP+ の細胞を生後 2-3 日目の B6 マウスの脳内 subventricular zone に注入し、経時的に免疫蛍光染色で検討した。

In vitro の誘導試薬添加したグループでは、有意に高い細胞増殖や生存率を認め、浮遊状態の細胞は 1 日目に培養プレートに付着し、2, 3 日目から bipolar, multipolar の細胞が現れ、また、一部の細胞には二つ以上の長い細胞突起が観察され、ニューロン様またはグリア様の形態を示した。コントロールのグループでは、細胞の増殖は認められず、8 日目以降に大部分の細胞は死滅し、形態学の変化も不明瞭であった。

蛍光免疫染色にて、誘導グループには経時的に、神経系細胞のマーカーが観察された。4 日目に $15.3 \pm 6.2\%$ の nestin と $1.6 \pm 0.8\%$ の TUJ1 を発現し、8 日目に $23.2 \pm 9.4\%$ の nestin や $13.9 \pm 6\%$ の TUJ1、16 日目に $12.7 \pm 6.1\%$ の nestin、 $17 \pm 7.6\%$ の TUJ1、 $7.9 \pm 3.6\%$ の MAP2、 $3.3 \pm 1.3\%$ の GFAP、

2.7±1.7%の CNPase が同定できた。但し、コントロールのグループでは、陽性結果は認めなかった。

RT-PCR にて誘導グループには経時的に、神経系細胞のマーカーである nestin, NF-H, GABA, GFAP, MBP が観察された。また、特異的な神経発生に関する転写因子の pax5, sox1, oxt2 も発現した。コントロールのグループでは、陽性結果は認められなかった。

脳移植の実験では、注入後 3 日目に、ドナー由来の細胞が注入点を中心に生着しており、一部の細胞が注入点からの遊走を観察した。3 週間後、ドナー由来の細胞は脳内の皮質、皮質下白質など、幾つかのエリアに見られ、形態学的にも不規則の形態を示し、短い突起を持つ細胞も見られた。蛍光免疫染色にて一部のドナー由来の生着細胞にはマクログリアのマーカーである MAC-1 (34.2±6.6%) が発現していた。また、一部の細胞にニューロン、グリアのマーカーである MAP2 (1.3±0.5%), GFAP (3.8±0.7%), CNPase (2.5±0.7%) もそれぞれ観察された。

審査の結果の要旨

本研究は、適当な微小環境があれば、少数ながら、成体由来の CD34-MBCs 中には神経系へ分化できる細胞が存在することが明らかになった。この事実がヒトの細胞でも発見されれば、CD34-BMCs は自己移植の細胞ソースとして、神経移植・再生療法の臨床応用に期待ができることから、学位に値するものと考えられた。

[1413]

氏 名 (本 籍) ^{み たに ゆう こ} 三 谷 有 子 (徳島県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 771 号

学位授与の日付 平成 18 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Evaluation of Psychophysiological Asymmetry
in Patients with Fibromyalgia Syndrome

論文審査委員 主査 (教授) 日下博文

(教授) 木下利彦 (教授) 中井吉英

論文内容の要旨

広範な部位の慢性・持続性の疼痛とこわばりを主訴とし、疲労感、しびれ、抑うつ症状などの多彩な症状を伴い原因不明の病態を有する線維筋痛症 (Fibromyalgia syndrome; FMS) がわが国でも最近注目されている。臨床的知見として FMS 患者では、Surface electromyography (SEMG) from trapezium muscle, Skin temperature (TEMP), Skin conductance level (SCL) の左右差が示唆される。

そこで FMS 群 31 名と健常群 47 名を対象に安静椅座により、SEMG を左右肩僧帽筋の皮膚表面に計 2 ヲ所、TEMP, SCL 測定センサーを左右手掌部に計 4 ヲ所装着し、安静 10 分の後、baseline period 5 分で測定した。解析は、baseline 測定開始 2 分後からの 4 分間の平均値を各被験者の代表値とした。その後、左右差 (利き手の平均値 - 非利き手の平均値) を被験者毎に算出し、平均値を各群の左右差とした。その結果、FMS 群では、TEMP, SCL, SEMG の左右差が大きく SEMG 左右差と TEMP, SCL 左右差間に有意な相関が認められた。

左右差の発現には様々な要因が考えられるが、FMS 患者は長期に渡る疼痛からの逃避姿勢と動作をとり、これらの継続が体幹部の筋緊張の左右差として身体のアアンバランスを一層強め、筋血流の低下、熱産生の低下から交感神経の過緊張が生じ、末梢血管収縮により TEMP, SCL の左右差として出現した可能性が示唆される。これらの仮説より FMS における疼痛は神経学的な機序だけでなく、患者自身の行動科学的観点 (疼痛行動) より理解する必要性がある。また、左右差を指標に、

FMS 患者への治療的アプローチを行なうことの有用性が示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は、TEMP, SCL, SEMG の左右差が FMS の治療における行動科学アプローチの一つの指標になる可能性が示唆された。本症患者の左右差の結果は新知見であり、厚生労働省研究班が組織された難治性疾患でもあり、今後さらに研究を深めることで、FMS 患者の病態と治療法の確立に貢献するものと考えられ、学位に値するものと認められた。

【1414】

氏 名 (本 籍) うち だ よういちろう 内 田 洋一朗 (埼玉県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 772 号

学位授与の日付 平成 18 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Long-Term Outcome of Adult-to-Adult Living

Donor Liver Transplantation for Post-Kasai

Biliary Atresia

論文審査委員 主査 (教授) 岡崎和一

(教授) 池原 進 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

【はじめに】

胆道閉鎖症 (BA) は、閉塞性黄疸を呈する代表的な先天性疾患であり、未治療であれば 2 年以内に肝不全に至る。1950 年代に導入された葛西手術 (肝門部小腸吻合術) により劇的な生存率の改善を認め、世界的に標準根治術式とされるに至った。しかし、20 年生存率は 23~29% と報告され、長期生存症例では胆管炎・門脈圧亢進症などに伴う合併症が多く、肝移植 (LT) を必要とする症例が少なくない。移植手術が導入され BA に対する LT 後の長期成績が明らかになりつつある現在、小児症例に対する LT の成績は良好であるが、成人症例における LT の成績は報告されていない。

【目的】

BA、特に成人 BA に対する生体肝移植後の周術期管理および長期成績について検討する。

【対象と方法】

1990 年 6 月から 2004 年 12 月までに京都大学病院で行った生体肝移植 (LDLT) は 1056 例あり、うち BA は 464 例であった。移植時年齢 16 歳未満の小児 BA 417 例と、16 歳以上の成人 BA 47 例を対象とし、術前、手術、そして移植後から現在に至るまでの術後経過を検討した。

【結果】

成人 BA の LDLT 後の 10 年生存率は 52.3% であり、小児 BA の 80.8% に比べ有意に不良であった ($P<0.005$)。手術因子において、手術時間 (868.0 min vs 647.5 min; $p<0.0001$) と冷阻血時間 (133 min vs 104 min; $p<0.05$) は成人 BA で有意に長く、GRWR (graft-to-recipient weight ratio, 1.05 vs 2.65; $p<0.0001$) は小児 BA で有意に高かった。移植後においては、消化管穿孔 (31.9% vs 8.4%; $P<0.0001$)、再開腹を要した腹腔内出血 (27.7% vs 9.6%; $P<0.001$)、胆管吻合部縫合不全 (23.4% vs 7.9%; $P<0.001$) の発症が成人 BA で有意に高かった。成人 BA において、ABO 血液型不適合移植、肺内シャント合併症例 (30% 以上) の予後は、各々血液型適合移植、肺内シャント非合併症例 (30% 未満) と比べ有意に不良であった ($P<0.05$)。成人 BA で LDLT 術後の予後規定因子は、多変量解析の結果、末期肝疾患の予後予測法である MELDscore の高値 (20 以上; $p=0.027$, $OR=6.94$, 95%CI=1.24-38.78) と移植後の再開腹 ($p=0.044$, $OR=11.87$, 95%CI=1.07-131.39) であった。

【考察】

本研究より、成人期での LT は小児期の LT と異なり、手術も煩雑となり、術後合併症も多く良好な予後は期待できない。成人になればより多くのグラフト重量が必要となり、生体ドナーにより負担がかかる場合もある。葛西手術は BA に対する根治手術ではなく、移植までの bridging surgery の役割を負っている。LT の技術が確立された現段階においては、LT が根治手術となりうる。LT を避けるために葛西手術、保存的治療、姑息手術を繰り返すことは避けるべきである。LT に踏み切るタイミングの決定は臨床的には非常に困難であるが、MELDscore を参考とし、繰り返す胆管炎

や進行性の門脈圧亢進症の出現時に加え、特に肺内シャント（30%以上）と門脈肺高血圧症が出現した場合には、できるだけ早期に移植を行うべきである。

審査の結果の要旨

我国で生体肝移植の導入による小児における先天性胆道閉鎖症の予後は良好となったが、成人症例での術後成績や予後規定因子はこれまで報告されていない。本臨床研究は成人症例での生体肝移植術後の 10 年生存率が 50%以上であること、予後規定因子は術前の MELD score 及び移植後の再開腹であることを示している。成人症例においても肝障害の増悪する以前に移植するべきであることを示す貴重な臨床研究である。博士号に値すると認められた。

【1415】

氏 名 (本 籍) 張 建 華 (中国)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 773 号
 学位授与の日付 平成 18 年 11 月 29 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目

Altered distributions of nucleocytoplasmic transport-related proteins in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

論文審査委員 主査 (教授) 杉本哲夫
 (教授) 伊藤誠二 (教授) 日下博文

論文内容の要旨

【研究目的】

近年、核一細胞質間輸送システムについての知見がめざましく蓄積してきており、このシステムが細胞生存と機能の維持に重要な役割を演じていることが明らかとなってきた。さらに、ある種の自己免疫疾患や腫瘍性疾患においては、このシステムの異常が特定の細胞障害につながっていることが示されている。

そこで我々は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態メカニズムにおける核一細胞質間輸送システ

ム異常の関与の有無を検討するため、変異 SOD1 (G93A) transgenic (Tg) マウスの腰髄において、このシステムに関与する蛋白の局在を免疫組織化学的に検討した。

【対象と方法】

雌の G93A Tg マウスを、臨床症状発症前と発症後早期・中期・末期に深麻酔下に灌流固定して脊髄を摘出し、腰髄の横断切片を作成して、免疫染色した。用いた一次抗体は、核一細胞質間輸送に関与する蛋白 (importin (Imp) β family, importin (Imp) α , histone H1, β -catenin) および caspase-3 に対する抗体である。週齢を合わせた雌の同胞 wild type (WT) マウスの腰髄を正常対照とした。

【結果】

WT マウスでは週齢による相違はなく、核一細胞質間輸送関連蛋白の免疫反応産物は脊髄前角細胞の核に強い反応が見られた。発症前の Tg マウスでは、これらの蛋白の分布は WT マウスと同様であった。一方、臨床症状発症後の Tg マウスでは、いずれの蛋白に対する抗体においても、その免疫反応性が核内で低下し、細胞質で増強している前角細胞が多く認められた。また、異常構造物であるレビー小体様封入体はいずれの抗体に対しても陽性反応を示した。

抗 Imp β 抗体により免疫染色した Tg マウス腰髄切片を、経時的定量解析したところ、核により強い染色性を呈する前角細胞の割合は臨床症状の進行に伴って統計学的に有意に減少した。一方、細胞質により強い染色性を呈する前角細胞の数は、病状進行とともに有意に増加することが示された。

抗 caspase-3 抗体を用いて免疫染色した切片を脱色し、Imp β で再染色する検討では、caspase-3 免疫反応性が認められない前角細胞においても Imp β が細胞質内に蓄積しているものが認められ、これらの蛋白の局在異常がアポトーシスに続発して生じている可能性は否定的と考えられた。

【考察】

我々は本研究において、ALS モデルマウスでは核一細胞質間輸送システムに異常が生じている可能性を初めて指摘した。

核一細胞質間輸送システムの主要な carrier 蛋白である Imp β family 分子は、病状の進行に伴って核内で減少し、細胞質に異常蓄積していることが

経時的定量解析によって示された。さらに, Imp β と複合体を形成して核—細胞質間輸送に寄与するアダプター蛋白 Imp α , および, これらの複合体によって核内に輸送される histone H1 も Imp β と同様の分布異常を呈することが示された。これらの事実は, Imp β の核内移行に障害が生じている可能性を示唆している。

この異常が Imp β の機能異常によるものか, 核膜孔複合体の異常によるものかを明らかにするため, Imp β/α 複合体に非依存性に核内に移行する β -catenin の分布を検討したところ, 発症後の Tg マウスでは β -catenin も核内で減少し細胞質に蓄積していた。従って, これらの蛋白の分布異常は核膜孔複合体自体の異常によると考えられた。これらの事実は, ALS モデルマウスにおいては核膜孔複合体の異常により細胞質から核への蛋白輸送が障害されていることを示唆している。

神経細胞は軸索切断などの障害を受けると修復のためのシグナルを発し, 核に伝えることにより種々の修復蛋白を発現して生存を維持していると考えられている。本研究の結果, ALS では核—細胞質間輸送システムの異常のためこれらの修復シグナルが核に到達せず, 有効な修復システムを発動できず, 神経細胞死が助長されている可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

最近注目されている核—細胞質間輸送システムの障害が, 筋萎縮性側索硬化症の病態に関与している可能性を示した初の研究である。時期を同じくしてアルツハイマー病においても同様の知見が報告され, これらに共通の病態が存在する可能性が出てきた。本研究は, 神経変性疾患の病態解明に新たな局面を開いたという意味において意義深く, 学位に値すると判断した。

【1416】

氏 名 (本 籍) ^わ ^て ^{れい} ^か 和 手 麗 香 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 774 号

学位授与の日付 平成 18 年 12 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

論文審査委員 主査 (教授) 杉本哲夫
(教授) 玄番央恵 (教授) 日下博文

論文内容の要旨

【背景と目的】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において, 運動ニューロンが選択的に細胞死に陥る機序については多くの仮説が提唱されているが, 詳細は現在も不明である。一方, 近年, パーキンソン病において, 小胞体 (ER) ストレスが神経変性に関与するという報告がなされ, 注目されている。今回我々は, ER 膜局在蛋白である glucose-regulated protein 78 (GRP78/BiP) の発現を, ALS モデルマウスにおいて免疫組織法によって検討し, ALS の神経変性においても ER ストレスの関与が示唆されるデータを得たので報告した。

【対象と方法】

発症前の 12 週齢から, 末期の 20 週齢までの雌の G93A mutant superoxide dismutase 1 (mSOD1) transgenic (Tg) マウスを, 各週齢 2 匹ずつ, 合計 18 匹を用いた。深麻酔下に灌流固定して脊髄を摘出し, 腰髄横断切片を作成した。H&E 染色にて異常構造物を写真撮影した後脱色し, 免疫染色を行った。免疫染色には, 抗 GRP78 抗体 (polyclonal, 1:50, Santa Cruz), 抗 SOD1 抗体 (monoclonal, 1:50, NeoMarkers), 抗 ubiquitin 抗体 (polyclonal, 1:100, Sigma) を用いた。対照には同胞の wild マウスを用いた。

【結果】

抗 GRP78 抗体による免疫染色で, Tg マウスで観察される Lewy body-like hyaline inclusion (LBHI)

は陽性であり、その core と halo の両方が陽性に染色されたが、halo のより外側の部分ではやや染色性が低く、また core の最中心部分では染色性は低かった。不整形で halo を伴わない大型の好酸性構造物（不整形構造物）においても抗 GRP78 抗体による免疫染色では一部陽性に観察されたが、陰性の構造物も多く、陽性のものでも一部が弱くびまん性に観察されるのみであった。cord-like swollen neurite においては点状に染色性を呈した。

一方、抗 ubiquitin 抗体と抗 SOD1 抗体では、これらの異常構造物はすべてびまん性に染色された。この染色結果は LBHI においては GRP78 と同様であったが、不整形構造物と cord-like swollen neurite では GRP78 とは異なっていた。

また、LBHI と不整形構造物について、異常構造物数の週齢ごとの経時的变化を検討した。LBHI は発症前の 14 週齢から、不整形構造物は 15 週齢から出現し、週齢を追うごとに増加した。抗 GRP78 抗体に対する陽性率は、LBHI では週齢に関わらずほぼすべてが陽性であったのに対し、不整形構造物の陽性率は 0～25% であった。

【考察】

本研究において、我々は GRP78 が ALS モデルマウスに出現するほぼ全ての LBHI に発症前から発現しており、その発現の形態は SOD1 の分布に類似していることを示した。近年の研究で、凝集した mSOD1 が GRP78 と共存していることが vitro において示されているが、vivo において示したものは本研究が初のものである。SOD1 は通常、細胞質に存在し、ER で折りたたまれるものではないとされる。しかし肝細胞における検討で、病理状態下では SOD1 が ER で観察されることが示されており、また凝集した mSOD1 は ER の分布に類似した核周囲で観察されることも報告されている。従って、本マウスの病理状態において、過剰発現した mSOD1 が ER 膜内に輸送され、GRP78 によって認識され、結合した可能性が考えられる。その結果、GRP78 は mSOD1 とともに凝集し、異常構造物を形成したと考えることが出来る。結果として、この分子シャペロンの機能が低下し、unfolded protein response が惹起されている可能性を示唆するものである。

本研究のデータは、ALS においても ER ストレ

スを介して神経細胞死を生じている可能性を示唆したものであり、「ER ストレスによる神経細胞死」が神経変性疾患において普遍的に認められる病的機序である可能性を示唆している。

審査の結果の要旨

本研究は、近年注目されている小胞体ストレスが、筋萎縮性側索硬化症の神経細胞死の病態機序に関与している可能性を vivo において示した初の研究である。最近、パーキンソン病において同様の病態が報告されており、「小胞体ストレスによる神経細胞死」が神経変性疾患において普遍的に認められる可能性を示した。本研究は、神経変性疾患の病態解明に新たな知見を得た点で意義深く、学位に値すると判断した。

【1417】

氏名(本籍) ^{やま} ^だ ^{たか} ^{ゆき} 山田 貴佑記 (静岡県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 775 号

学位授与の日付 平成 19 年 1 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Regulation of cytokinesis by mGcRacGAP in

B lymphocytes is independent of GAP activity

論文審査委員 主査(教授) 木梨達雄

(教授) 池原 進 (教授) 伊藤誠二

論文内容の要旨

【はじめに】

免疫系は生体防御を司る中心的システムであり、無数の外来性抗原を認識し反応する一方、自己抗原に対して不応答性を示す(寛容性)、極めてユニークなシステムを築き上げている。この機能を担っているのは B 細胞の場合 B 細胞レセプター(BCR)である。従って、BCR を介する抗原認識によって引き起こされるシグナル伝達機構の研究は B 細胞の分化・増殖・細胞死、ひいては多様性・寛容性獲得機構を解明するための必須の課題である。

低分子量 G タンパク質 (Small G) の Rho ファ

ミリーに属する Rac はさまざまな重要な生命現象に関与していることが知られている。

Rac は上流からのシグナルにより GDP/GTP 交換反応促進タンパク (GEF) により ON の状態となり、その後 GTP 加水分解促進タンパク (GAP) により OFF となる。mgcRacGAP は Rac に対し GAP 作用を持つ一つの分子である。

これまでの報告により mgcRacGAP は血液細胞における増殖や分化に関わっていること、細胞分裂時に mitotic spindle に局在が見られる、セリン残基のリン酸化により RhoA に対して GAP 活性を持つようになることなどが知られている。

しかしながら、mgcRacGAP の持つ生理的意義についてはまだまだ解決しなければいけない点が残されており、さらに B 細胞における機能に関しては未解決のままである。

【研究方法】

高率に染色体の相同組み換えがおこるニワトリ B 細胞株である DT40 を用いて mgcRacGAP の KO 細胞株を樹立した。この樹立した細胞株を用いて、細胞分裂、細胞死に焦点を置き解析を行った。また、mgcRacGAP のさまざまな変異体コンストラクトを作製して、KO 細胞株への戻し実験を行うことにより mgcRacGAP の機能発現についての解析を行った。

【結果】

mgcRacGAP を欠失した DT40 細胞は、これまでの報告どおり細胞質分裂の異常から多核化を示し、細胞死に陥ることが観察された。

驚くことに、GAP 活性を失うことで知られている 386 番目のアルギニンをアラニンへと置換した変異体 mgcRacGAP を導入した細胞では多核化及び、細胞死の回復が見られた。しかしながら、ドメイン欠損変異体 mgcRacGAP では、その機能回復が見られなかった。

【考察】

B 細胞の細胞分裂、生存において mgcRacGAP は必須であることが明らかとなった。

これまでの報告では mgcRacGAP の GAP 活性が mgcRacGAP の主な機能と考えられていたが、GAP の不活性化型変異体では KO 細胞株の機能回復がみられたことから、B 細胞の細胞分裂および生存には GAP 活性は必要でないことが明らかとなった。一方、N 末および C 末ドメインの欠失変

異体においてはその機能発現の回復がみられなかった。これは mgcRacGAP にアダプター的な役割が存在し、その機能が細胞分裂、生存に必須であるということを示唆する結果となった。

審査の結果の要旨

山田氏は B 細胞、血液細胞における mgcRacGAP の機能を遺伝子改変細胞、およびマウスを作成して、細胞質分裂に必須の役割をもつこと、その欠損によって G2・M 期の停止やアポトーシスが誘導され、血液幹細胞、B 細胞発生に必須であることを明らかにした。さらにこの機能には mgcRacGAP 活性が必要ではないことを始めて明らかにした。質疑応答にも明確な返答を行い、学位に十分値すると結論した。

【1418】

氏 名 (本 籍) 小 池 保 志 (兵庫県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 776 号

学位授与の日付 平成 19 年 1 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Allogenic Intra-Bone Marrow-Bone Marrow
Transplantation plus Donor Lymphocyte
Infusion Suppresses Growth of Colon Cancer
Cells Implanted in Skin and Liver of Rats

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 上山泰男

論文内容の要旨

はじめに

近年、白血病などの血液疾患に対してだけではなく、固形癌に対する骨髄移植とドナーリンパ球注入療法の抗腫瘍効果が注目されており、臨床応用も行われているが、様々な副反応、特に GvHD の発症が大きな問題となっている。このような背景から我々は最近、骨髄内骨髄移植とドナーリンパ球注入療法を併用することにより、マウスの肉腫モデルで抗腫瘍効果が得られることを見出した。

今回、我々はラットにおいて大腸癌細胞株の皮下接種モデルを作成、またこの細胞株を門脈内に投与し肝転移モデルを作成し、これらの担癌ラットに骨髄内骨髄移植とドナーリンパ球注入療法を併用し、その抗腫瘍効果を検討した。

方法

recipient に Fisher (F344), donor に Brown Norway (BN) を使用した。最初は大腸癌細胞株 ACL-15 の皮下腫瘍モデルで、抗腫瘍効果を観察した。作成した実験群は control 群 (腫瘍を接種し経過を観察した群), syngeneic IBM-BMT 群, syngeneic IBM-BMT+whole DLI (whole spleen cells を用いた DLI) 群, allogeneic IBM-BMT 群, allogeneic IBM-BMT+whole DLI 群, allogeneic IBM-BMT+CD4⁺ DLI (CD4 陽性細胞を除去した spleen cells を用いた DLI) 群, allogeneic IBM-BMT+CD8⁺ DLI (CD8 陽性細胞を除去した spleen cells を用いた DLI) 群の 7 群で行った。control 群と比較して、allogeneic IBM-BMT+CD4⁺ DLI 群で、GvHD を抑制しつつ、強い抗腫瘍効果が得られた。次に同じ細胞株を門脈より注入して大腸癌肝転移モデルとし、control 群と allogeneic IBM-BMT+whole DLI 群, allogeneic IBM-BMT+CD4⁺ DLI 群, allogeneic IBM-BMT+CD8⁺ DLI 群で検討を加えた。皮下腫瘍モデル同様に allogeneic IBM-BMT+CD4⁺ DLI 群では GvHD を抑制しつつ、強い抗腫瘍効果と有意な生存率の改善を認めた。肝転移モデルにおいては、allogeneic IBM-BMT+CD4⁺ DLI の後、さらに週に一回死亡するまで CD4⁺ DLI を追加した群も作成しその効果を検討したところ、コントロールや allogeneic IBM-BMT+CD4⁺ DLI 群と比較して、追加 CD4⁺ DLI を行った群では、有意に転移巣の腫瘍の発育抑制と寿命の延長が認められたが GvHD の増強は認められなかった。

結論

骨髄移植による抗腫瘍効果では、免疫抑制による腫瘍の増大や、GvHD を制御することの困難さが指摘されている。今回の実験で IBM-BMT と CD4⁺ DLI の併用により、原発巣のみならず転移巣に対しても抗腫瘍効果がみとめられ、また、追加 CD4⁺ DLI を行うことによって、抗腫瘍効果はさらに増強されたが、GvHD の発症は認められなかった。よって、IBM-BMT と CD4⁺ DLI の併用に

より GvHD を抑制しつつ GVT 効果が期待できる可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

固形癌に対する骨髄移植とドナーのリンパ球注入療法が臨床で行われ始めているが、生存率を高め GvHD 発症を予防する手段はまだ確立されていない。本研究は大腸癌モデルで骨髄内骨髄移植と CD4⁺ ドナー由来リンパ球の投与により、腫瘍の発育抑制のみならず、生存率の向上が得られること、しかし GvHD の増強は起こらなかったことを明らかにしている。より副作用の少ない固形癌の免疫治療の開発に重要な研究成果である。

博士号に値すると認められる。

【1419】

氏 名 (本 籍) 吉 賀 正 亨 (奈良県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 777 号

学位授与の日付 平成 19 年 2 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Novel Digitalis-Like Factor, Marinobufotoxin,
Isolated From Cultured Y-1 Cells, and Its
Hypertensive Effect in Rats

論文審査委員 主査 (教授) 稲垣千代子
(教授) 岩坂壽二 (教授) 高橋伯夫

論文内容の要旨

【はじめに】

内因性ジギタリス様物質 (DLF) は細胞膜の Na⁺, K⁺-ATPase に作用し Na ポンプ抑制活性を示し、心筋、血管平滑筋、交感神経活動などに作用して細胞内カルシウム濃度を増大させる。そのことにより心筋収縮力、末梢血管抵抗を増大させて血圧を高める。他方、腎では尿細管でのナトリウムの再吸収に抑制的に作用し、水・食塩代謝に関与することにより、電解質のバランス維持と高血圧発症に関与していると考えられている。ただし、血管内皮細胞にも作用して一酸化窒素の放出を促す作用も明らかにされている。近年、DLF の

中で marinobufagenin (MBG) を代表とする bufadienolide が ouabain をはじめとする cardenolide より強く水・食塩代謝に関わっていると報告されている。また、ヒキガエルでは MBG 関連物質としてスベロイルアルギニンがエステル結合した marinobufotoxin (MBT) が存在するが、哺乳類での MBT に関する報告はない。そこで、本研究者は EDLF の産生臓器と考えられている副腎由来細胞培養系において新規 DLF として MBT を発見し、ラットにおいて MBT の血圧に対する作用について研究した。

【研究方法】

研究室で作成した抗 MBG 抗体が MBT とも交叉活性をしめすことを利用して MBG 様免疫活性物質 (MBGi) を測定する enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用い副腎皮質由来細胞株である Y-1 細胞上清中の MBGi を測定した。さらに、MBGi の成分を同定するため Y-1 細胞上清を high performance liquid chromatography (HPLC) を用い、1 分毎の分画に分け、それぞれの分画を ELISA で測定するとともに liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) を用いて MBGi の成分の検索を定量と定性両面から実施した。また、ラットの腹腔内に浸透圧ミニポンプを留置することにより MBT を 1 週間連続投与し、血圧と尿中 MBGi 排泄量を測定した。

【結果】

Y-1 細胞上清の ELISA 測定の結果、経時的に MBGi の増加を認めた。また、HPLC の結果で標品の MBT の溶出位置と一致する 37 分の分画で最も高い MBGi のピークを認め、LC/MS で MBT の親イオンとそのフラグメントイオンを検出した。また、標品の MBG の溶出位置と一致する 46 分の分画にも低いピークを認め、LC/MS の結果 MBG の親イオンとそのフラグメントイオンと同定した。このことから Y-1 細胞上清の MBGi の増加は MT が中心であることを明らかにした。また MBT を連続投与したラットでコントロールラットと比べて有意な血圧の上昇 (135 ± 3.0 versus. 126 ± 2.0 mmHg $p < 0.05$) と尿中 MBGi 排泄量の増加 (1.41 ± 0.286 versus. 0.34 ± 0.064 ng/day $p < 0.01$) を認めた。

【考察】

従来から報告されている DLF はステロイドある

いはステロイド骨格に糖が結合した構造であるが、今回ステロイド骨格にアミノ酸が結合した新しい DLF である MBT を哺乳類の副腎皮質由来細胞が分泌していることを世界で初めて確認した。さらにその生体機能に対する影響を検索した結果、MBT に血圧上昇作用があることを明らかにした。本研究は、EDLF の主要成分と考えられる bufadienolide の哺乳類、特にヒトにおける産生・分泌機構の解明や高血圧の病態生理解明につながる重要な発見であると考ええる。

審査の結果の要旨

本論文で記載されている MBT については、血中濃度が測定法上の問題から不可能であるので明確ではないが、LC/MS による半定量でも Y-1 細胞培養上清中と同様に MBT が MBG より多量に存在することを示唆しており、過去 50 年間以上に亘って追求されている内因性ジギタリスとして、現在、発見されている物質の中では最も本質に近い物質を発見したもので、学位に値する研究として評価できる。

【1420】

氏 名 (本 籍) ^{はや}速 ^み水 ^{じゅん}淳 ^じ史 (大阪府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 778 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目

Immunosuppressive effects of Photodynamic
Therapy by topical aminolevulinic acid

論 文 審 査 委 員 主査 (教授) 藺田精昭
(教授) 池原 進 (教授) 堀尾 武

論文内容の要旨

【研究目的】

紫外線療法や光化学療法には免疫抑制作用があり、この作用が光線治療の治療効果や光発癌に深く関与することを明らかにしてきた。一方、可視光線を照射する Photodynamic Therapy (PDT) の免疫抑制作用については十分に解明されてい

ない。この奏効機序をより明らかにするために、PDT の免疫抑制作用を検討した。

【研究方法】

照射装置には Omnilux PDT (Waldmann Medical Division 社) の可視光源を用い、照射距離は 5 cm、強度は 90 mW/cm^2 にて実験を行った。20% 5-aminolevulinic acid (ALA) 親水軟膏を C57B/6 マウスに 10 mg/cm^2 塗布し、4 時間後に可視光線を照射した。

【結果】

1. Langerhans 細胞 (LC) への影響 : ALA-PDT 施行 5 日後に最も ADPase 陽性の LC 数の減少を 20 J/cm^2 照射で認め、その後徐々に回復し、14 日目でもとの値に戻った。この変化は dose-dependent であった。形態的にも ALA-PDT にて樹状のものが円形の LC へと変化した。可視光線のみ、および ALA 塗布のみでは LC 数は変化しなかった。

2. ALA-PDT による LC の表皮から真皮・リンパ節への遊走 : ALA-PDT 施行後、表皮内 LC 数の減少に伴ってリンパ節内の CD11c 陽性、I-Ab 陽性細胞数が増加した。

3. 局所性免疫抑制 : ALA-PDT (40 J/cm^2) 施行部皮膚に DNFB を塗布して接触アレルギー感作を誘導したマウスは、無処置で感作した陽性コントロールマウスと比較して耳介の惹起反応が抑制された。可視光線のみ、および ALA 塗布のみでは接触アレルギー感作は抑制されなかった。

4. 全身性免疫抑制 : ALA-PDT (80 J/cm^2) 施行部皮膚より離れた部位に DNFB を塗布して感作を誘導したマウスは、ALA-PDT を行わずに感作した陽性コントロールマウスと比較して耳介の惹起反応が抑制された。可視光線のみ、および ALA 塗布のみでは接触アレルギー感作は抑制されなかった。

5. 免疫学的寛容 (トレランス) : ALA-PDT 施行により DNFB に対する接触アレルギーを抑制したマウスに、惹起後期間において再度 DNFB で感作を試みたが、依然として惹起反応が抑制されておりトレランスの誘導が確認された。

6. 抗原特異的免疫抑制 : 一方、ALA-PDT 施行により DNFB に対する接触アレルギーを抑制したマウスに、惹起後期間において別の感作物質である oxazolone で接触皮膚炎を誘導したところ、ALA-PDT を行わずに感作した陽性コントロール

マウスと同等の耳介の腫脹が観察された。これにより ALA-PDT による接触アレルギーの抑制は抗原特異的であるといえる。

7. DNA 損傷 : 紫外線による免疫抑制には DNA 損傷が関与する。しかし、ALA-PDT 施行した皮膚では、紫外線 (UVB) 照射でみられるような cyclobutane pyrimidine dimer 型の DNA 損傷は形成されなかった。

【考察】

光力学療法でも紫外線照射と類似の免疫抑制が誘導されることを確認した。一旦成立した免疫抑制は、抗原特異的で他の免疫能には影響なく、しかもトレランスが誘導される。その機序としては、抗原提示細胞 (樹状細胞) である Langerhans 細胞に対する作用が重要な役割を演ずると思われる。

【結論】

光力学療法は、現在では主に悪性腫瘍の治療に用いられているが、本研究の結果から、アレルギー性疾患への適応拡大が期待される。

審査の結果の要旨

光感作物質投与と可視光線照射による光力学療法は、おもに悪性腫瘍の治療に行われてきた。最近では、尋常性乾癬、扁平苔癬、尋常性白斑などの治療にも試みられるようになったが、その奏効機序は明らかにされていない。速水らは、腫瘍以外の炎症性疾患に対する光力学療法の奏効機序として免疫抑制作用を想定して実験を行った。その結果、アミノレブリン酸塗布と可視光線照射により、表皮ランゲルハンス細胞が所属リンパ節へ遊走すること、接触アレルギー感作が抑制されること、抗原特異的トレランスが誘導されることを示した。この研究は、光力学療法の適用症拡大や副作用の防止など臨床的にも有意義であり、学位に値するものと評価された。

【1421】

氏 名 (本 籍) 竹 田 浩 子 (兵庫県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 甲 第 779 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Hyposmotic stimulation-induced nitric oxide
production in outer hair cells of the guinea
pig cochlea

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二

(教授) 稲垣千代子 (教授) 杉本哲夫

論文内容の要旨

【緒言】

遠心性の聴覚情報伝達機構において重要な役割を演じている内耳の蝸牛外有毛細胞には、求心性の聴覚情報伝達機構における内有毛細胞と違い、細胞自身が能動的に伸展および収縮することが知られている。さらに、この能動的運動には速い運動と遅い運動があることが報告されている。速い運動には、聴覚シグナルを増幅し、周波数弁別を鋭くして内有毛細胞に送る働きがあると言われていた。他方、遅い運動は、速い運動を修飾すると考えられ、これらの外有毛細胞の遅い動きは、音受容の調節において重要な役割を演じていると考えられている。今までの報告では、この遅い運動は、浸透圧やイオン環境の変化による運動と、ATP、ACh 等の神経伝達物質により、細胞内 Ca^{2+} の濃度変化を通してのアクチン、ミオシンを介する能動的運動が知られている。

近年、蝸牛外有毛細胞を含む内耳の様々な細胞において、細胞内 Ca^{2+} に依存する神経型及び内皮型一酸化窒素合成酵素 (NOS) の存在が組織的に同定され、他の組織と同様に一酸化窒素 (NO) が聴覚情報伝達機構においても重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。最近、モルモット渦巻外有毛細胞において、ATP 刺激による NO 産生及び、NO と細胞内 Ca^{2+} との相互作用についての報告がなされた。

今回申請者は、モルモット外有毛細胞において、低浸透圧刺激時の NO 産生と形態変化との同時測

定を行い、遅い運動における、NO と細胞内 Ca^{2+} の相互作用について検討を行った。さらに、浸透圧/機械的感受性チャンネルである TRPV4 の受容体の関与についても検討をおこなった。

【実験方法】

プライネル反射陽性の白色モルモット (体重 250–360 g) を用い、機械的処理のみで外有毛細胞の単離を行った。外有毛細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は Ca^{2+} 感受性蛍光色素である fura-2AM を用い、細胞内 NO 測定には NO 感受性色素である DAF-2DA を用いた。 Ca^{2+} 測定用画像解析蛍光顕微測光装置 (ARGUS100, Hamamatu, Japan) に 2 光路アダプターを設置し、赤色光及び fura-2AM や DAF-2DA に影響のない波長フィルターを用いて、1 つの光路で従来通り蛍光像の観察と蛍光強度の変化を記録し、もう 1 つの光路で形態の観察を行った。形態変化の解析には別の画像解析装置 (Lumina Vision, Mitani Corporation, Japan) を用いた。

【結果と考察】

DAF-2DA を用いた形態との同時測定実験において、低浸透圧刺激により外有毛細胞の腫脹に引き続く細胞内の NO 産生がみられた。細胞外に Ca^{2+} が含まれない場合、低浸透圧刺激による NO 産生はみられなかった。非特異的 NOS 合成阻害剤である L-NAME 及び stretch-activated channel blocker である gadolinium は、低浸透圧刺激による NO 産生を抑制したが、P2 receptor antagonist である suramin は抑制しなかった。このことから、低浸透圧刺激による外有毛細胞の腫脹によって惹起された細胞膜の伸展が、細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こし、結果 NO が産生されたと考えられた。

さらに、NO donor である SNAP は低浸透圧刺激による外有毛細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を抑制したが、L-NAME、Guanylate cyclase の inhibitor である ODQ 及び cGMP-dependent protein kinase の inhibitor である KT5823 は、これを増強した。これらのことから、浸透圧刺激により産生された NO は、NO-cGMP-PKG pathway を介して negative feedback に外有毛細胞の細胞内 Ca^{2+} の反応を抑制していると考えられた。

本研究において、申請者は、さらに分子生物学的および免疫組織化学的方法により、モルモット

外有毛細胞における TRPV4 受容体の存在を明らかにした。また TRPV4 受容体合成の activator である 4 α -PDD は NO 産生を引き起こした。これらの結果から、低浸透圧刺激により外有毛細胞において、TRPV4 受容体の活性化を介した細胞外から細胞内への Ca²⁺ 流入がおこり、結果細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加により外有毛細胞の NO 産生が引き起こされたと考えられた。

【結語】

内耳において、メニエール病や変動する感音性難聴における内耳液イオン環境とイオン透過性の変化は、局所の浸透圧変化を引き起こし、外有毛細胞の運動能に影響を与え、結果として聴覚機能に何らかの影響を与える可能性が考えられている。さらに、細胞外の浸透圧の変化による外有毛細胞の持続的な細胞の短縮と腫脹を引き起こすことが、聴力低下や耳鳴の原因となりうるとする報告がある。本研究から、低浸透圧刺激による外有毛細胞の形態変化（腫脹）に伴い、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇とそれに引き続き NO 産生が引き起こされることが、この一連の反応は TRPV4 の受容体の活性化を介していること、さらに産生された NO は細胞内 Ca²⁺ の反応を抑制していることが判明した。これらの結果は、内耳液の恒常性の破綻によって引き起こされるであろう局所の浸透圧変化による外有毛細胞の腫脹などの形態変化が、聴覚情報伝達機構に何らかの影響を与える可能性を示唆した。

審査の結果の要旨

遠心性の聴覚情報伝達機構の主役を演ずる蝸牛外有毛細胞には、細胞自身が能動的に伸縮することが知られている。この伸縮には早い運動と遅い運動があるが、後者を生ずる 1 つの誘因に浸透圧変化が考えられている。本研究は低浸透圧刺激による外有毛細胞の形態変化に伴う細胞内の Ca²⁺ や NO の変化を測定し、それらの解析から外有毛細胞の形態変化が聴覚情報伝達機構に何らかの影響を与える可能性に示唆し、十分学位に値すると評価された。

【1422】

氏名(本籍) 沈^{しん} 静^{せい} (中国)
学位の種類 博士(医学)
学位番号 甲 第 780 号
学位授与の日付 平成 19 年 3 月 30 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway and neuronal nitric oxide synthase in ATP-induced Ca²⁺ signalling in cochlear inner hair cells

論文審査委員 主査(教授) 稲垣千代子
(教授) 伊藤誠二 (教授) 山下敏夫

論文内容の要旨

【はじめに】

近年、求心性の聴覚路の一次ニューロンであるラセン神経節細胞および、感覚受容器である蝸牛内有毛細胞の細胞外 ATP 刺激による細胞内 Ca²⁺ の上昇が観察され、ATP が求心性の聴覚情報伝達機構における重要な神経伝達物質のひとつとして考えられている。一方、生体内で作られるラジカルである一酸化窒素(NO)が神経伝達物質や修飾物質として、さまざまな細胞において細胞内情報伝達機構において重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。内耳においても、蝸牛の内有毛細胞を含むさまざまな細胞において、Ca²⁺ 依存性の神経型及び内皮型 NO 合成酵素(NOS)の存在が証明されることから、NO が聴覚情報伝達機構においても何らかの役割を果たしている可能性が示唆されている。

本研究では、蝸牛内有毛細胞における ATP 刺激による細胞内 NO 産生および産生された NO と細胞内 Ca²⁺ の相互作用について検討をおこなった。更に、NO の作用におけるサイクリック GMP および神経型 NOS (nNOS) の関与についても検討した。

【研究方法】

実験は、モルモットの内耳蝸牛から急速単離した内有毛細胞を用いた。

細胞内 NO 測定は、NO 感受性の蛍光色素である DAF-2DA を用い、励起フィルター 485–495 nm、

干渉フィルター 510–540 nm を用い、蛍光強度の変化を ARGUS100 (浜松ホトニクス) 画像解析装置にて解析した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、Fura-2AM を用いて、340 nm/380 nm の双励起波長で蛍光像を観察した。画像の記録、解析は ARGUS/HiSCA システムを使用した。DAF-2DA と Fura-2AM を同一の内有毛細胞に負荷することにより、細胞内 NO と Ca^{2+} の同時測定を行った。Fura-2AM を用いる Mn^{2+} の quenching の実験は、 Ca^{2+} -free の細胞外溶液を用いて、励起波長 360 nm の条件で、ATP 刺激後に 50 μM のマンガン投与した。また蛍光免疫染色法により単離蝸牛内有毛細胞の nNOS の局在と、さらに二重蛍光免疫染色法を用いて、nNOS と P2X2 受容体の同一細胞における局在を観察した。

【結果】

① ATP 刺激による内有毛細胞の NO 産生：

細胞外 ATP 刺激によって、内有毛細胞において経時的な DAF-2 の蛍光強度の増加すなわち NO の産生が見られた。この NO 産生は非特異的 NOS 阻害剤である L-NAME 及び P2 レセプターの antagonist である suramin, calmodulin の antagonist である calmidazolium によって抑制された。細胞外に Ca^{2+} を含まない場合は、ATP 刺激による内有毛細胞の NO 産生が認められなかった。

② ATP 刺激による NO 産生における細胞内 Ca^{2+} の関与：

細胞外に Ca^{2+} を含む場合、ATP 刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と NO 産生が認められた。他方、細胞外に Ca^{2+} が含まない場合には、ATP 刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められたにもかかわらず、NO 産生が認められなかった。細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位より Ca^{2+} 放出を引き起こすと考えられている Thapsigargin 投与により Ca^{2+} 濃度が上昇したが、NO の産生が認められなかった。細胞内 Ca^{2+} と NO の同時測定により同一内有毛細胞において ATP 刺激による Ca^{2+} 濃度の上昇に引き続き、NO 産生がおこることが観察された。

③ ATP 刺激によって産生された NO の細胞内 Ca^{2+} 動態に対するフィードバック作用：

ATP 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は非特異的 NOS 阻害剤である L-NAME によって増強されたが、NO donor である SNAP によって抑制され

た。 Mn^{2+} quenching の実験で、L-NAME は ATP 刺激による Mn^{2+} の細胞外から細胞内への流入を促進したが、SNAP は抑制作用を示した。膜透過型 cGMP である 8-Br-cGMP は ATP による Ca^{2+} 反応を抑制したが、NO の標的酵素 soluble guanylyl cyclase (sGC) の抑制剤である ODQ 及び cGMP-依存性 protein kinase (PKG) の抑制剤である KT5823 は増強した。更に、SNAP の ATP による Ca^{2+} 反応への抑制作用は、ODQ 或は KT5823 によって消失した。

④ ATP 刺激による NO 産生に関する NOS の同定：

選択的 nNOS 阻害剤である 7-NI は、非特異的 NOS 阻害剤である L-NAME と同様に ATP による NO の産生を抑制した。さらに、7NI は、L-NAME と同様に ATP による Ca^{2+} 反応を増強した。両者の作用には有意差が認められなかった。免疫組織学的に、nNOS は P2 レセプターが局在すると考えられている細胞の頂部に強く発現していた。

【考察】

以上より内有毛細胞における ATP 刺激による NO の産生は、細胞頂部に存在する P2X レセプターの活性化により細胞外から細胞内への Ca^{2+} の流入がおこり、結果細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇して、同じ部位に局在すると考えられる nNOS が活性化され、NO 産生を引き起こすと考えられた。又、産生された NO が NO/cGMP/PKG 経路を介して、negative feedback に ATP による Ca^{2+} の流入を抑制すると考えられた。本研究より、NO が求心性の聴覚情報伝達機構において重要な役割を演じている可能性が考えられた。

審査の結果の要旨

聴覚情報伝達機構は近年かなり解明されてきたが、尚不明な点も多い。一方生体内で作られるラジカルである一酸化窒素 (NO) が神経伝達物質や修飾物質として、さまざまな細胞において情報伝達に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。本研究は細胞生物学的手技を用いて、NO が求心性の聴覚情報伝達機構においても重要な役割を演じている可能性を初めて示したものであり、十分学位に値すると認められた。

【1423】

氏名(本籍) ^{かたのたよ}片野泰代(大阪府)
学位の種類 博士(医学)
学位番号 甲第781号
学位授与の日付 平成19年3月30日
学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目

Proteomic identification of a novel isoform of
collapsin response mediator protein-2 in spinal
nerves peripheral to dorsal root ganglia

論文審査委員 主査(教授)杉本哲夫
(教授)日下博文 (教授)伊藤誠二

論文内容の要旨

【はじめに】

神経細胞は高度に分化した細胞であり、軸索と樹状突起という極性の異なる神経突起を有する。神経の伝達方向が一方であるのに対し、合成された物質はそれぞれの神経突起に分別輸送される。他方、慢性疼痛は末梢性および中枢性の2つの感作機構によって発症することが知られており、このような生理機能変化に伴い1次求心性線維による機能性分子の輸送は変化する。そのことから1次求心性線維の極性を明らかにする目的でその細胞体が存在する後根神経節(DRG)の中核側と末梢側の神経組織を用いたプロテオミクス解析をおこなった。

【研究方法】

5週齢のWistarラットからDRGの末梢側と中枢側の神経組織をそれぞれ回収し、ホモゲナイズ後、7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.5% Triton X-100 と 0.25% SDS を含むバッファーにて可溶化し試料を調製した。各 360 μ g の蛋白を高解像度(1次元目 24 cm, pH 5–6, 2次元目 22 $\times$ 70 cm ポリアクリルアミドゲル)の2次元電気泳動(2-DE)を行った。蛋白スポットは銀染色にて可視化し比較解析を行った。一方の画分に特異的、あるいは有意に発現量変化が認められ、再現性が確認されたスポットをMALDI-TOF MSを用いて測定、ペプチドマスフィンガープリント法にて同定した。同定分子の局在および発現量解析をウェスタンブロット法にて行った。翻訳後修飾および、蛋白を

構成するペプチド断片の特異性を明らかにするために、脱リン酸化酵素を用いた解析、MS および MS/MS 解析を行った。末梢神経損傷に伴う発現量変化を、2D-ディファレンシャルゲル電気泳動(2D-DIGE)法およびウェスタンブロット法にて解析した。

【結果】

2つの画分のゲルからそれぞれおよそ800個の蛋白スポットを検出し、各画分に特異的な分子の検出および同定を行った。DRGの末梢側の神経組織に特異的な蛋白スポットの一つをcollapsin response mediator protein-2(CRMP-2)と同定した。CRMP-2は特異的な抗体を用いた2-DEウェスタンブロットにて異なる分子量、等電点をもつ複数のスポットとして、脳、脊髄、DRGそして末梢神経組織に認められた。しかしながら、同定したCRMP-2スポット(M_r 60 kDa, pI 5.6)はDRGの末梢側の神経組織にのみ検出されたことからperiCRMP-2と名付けた。リン酸化修飾の有無を明らかにする目的で脱リン酸化酵素処理を行った結果、すでにリン酸化修飾が報告されている高分子量のCRMP-2スポットは塩基性側へ収束したが、periCRMP-2の等電点は変化しなかった。MSおよびMS/MSを用いた解析から糖鎖の修飾は認められず、既知のCRMP-2より電気泳動上、低分子量に検出されるperiCRMP-2はC末端のトランケーションフォームであることが示唆された。またperiCRMP-2は末梢神経結紮1, 3および7日後では発現量が減少することがわかった。

【考察】

CRMP-2は神経の発生および再生に関与する分子であり、神経系に広く存在することが知られており、セマフォリンシグナルの下流で作用し、成長円錐を退縮させる機能を有する。一方、海馬を用いた初期培養細胞で成長円錐に濃縮して存在し、軸索決定および伸展、神経の回路網形成に関与する極性決定分子としての機能も報告されている。CRMP-2の機能はRho-kinase, GSK3 β およびCdk5といった複数のリン酸化酵素によって調節されることが知られている。そして、神経変性疾患であるアルツハイマー患者脳でCRMP-2の糖鎖修飾は減少し、リン酸化が増加していることから糖鎖修飾によるリン酸化調節が示唆されている。これらの報告から、CRMP-2の機能調節における

翻訳後修飾の重要性がわかる。他方、本研究の成果と時期を同じくして、CRMP-2 が *in vitro* で虚血による神経細胞死に伴いプロテアーゼで切断されることが報告された。periCRMP-2 の切断が示唆された C 末端部位には、糖鎖修飾部位と機能が明らかされている Rho-kinase のリン酸化部位が含まれ、また periCRMP-2 と類似した分子量を示す C 末端 24 残基の欠損体を *in vitro* で過剰発現させると複数形成される軸索が単一となる。これらのことから、*in vivo* においても periCRMP-2 は他の CRMP-2 と異なる機能を有し、神経損傷後の末梢組織に特異的な機能性分子として神経再生に関与することが示唆された。

審査の結果の要旨

片野泰代氏は、医化学講座にてプロテオミクス解析系を立ち上げ、軸索伸長因子 collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) の新規 isoform (periCRMP-2) を同定した。本研究では、periCRMP-2 の組織特異性を明らかにし、蛋白質化学的性格付けを行った。periCRMP-2 が末梢神経再生に関与することを示唆した本研究は博士の学位に値する。

【1424】

氏 名 (本 籍) 李 勁 松 (中国)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 782 号
 学位授与の日付 平成 19 年 3 月 30 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目
 An alpha-helical burst in the src SH3 folding
 pathway
 論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二
 (教授) 藤井 茂 (教授) 木原 裕

論文内容の要旨

【はじめに】

蛋白質の機能は、その立体構造が担っている。したがって、蛋白質の立体構造がどのように決められているかを知ることが、構造生物学の中心課

題の一つである。我々のグループでは、ユビキチン、 β -ラクトグロブリンなどの主に β シートからなる蛋白質のフォールディング機構の解明を精力的に進めてきた。その結果は衝撃的で、今まで研究してきた蛋白質はすべてまず α ヘリックスからなる中間体を生じ、それを經由して主に β シートからなる蛋白質に理フォールドしていくことが分かった。我々はこれは一般的に成り立つかどうかを検討するために、生理的条件下では、全く α ヘリックスを含まない蛋白質の例として、src ホモロジドメイン 3 (SH3) を対象としてフォールディング実験を行った。

【研究方法】

実験に用いた SH3 は、大腸菌 BL21 DE3 pLysS (Novagene) に src SH3-pET 15b プラスミドをクローンし、発現させたものを用いた。

フォールディングは、変性剤である塩酸グアニジンを変性条件から生理的条件下に希釈して行った。希釈法としては、特別に製作したストップフロー法 (SF) を用いた。プローブとして α ヘリックスの量を測定する円偏光二色性 (CD)、蛍光および蛋白分子の大きさを表す X 線溶液散乱法を用いた。X 線溶液散乱法は高エネルギー加速器研究機構放射光研究施設で行った。

【結果】

SH3 は、塩酸グアニジン (変性剤) を添加していくと 3 M 以上では完全に変性 (アンフォールド) する。一方、1 M 以下では生理的条件下と変わらないコンパクトな構造を示す。

SF フロー法により、塩酸グアニジン濃度を 5 M から 0.7 M に急速に希釈したときの蛋白質の構造を上記の三つのプローブで観測した。どのプローブを用いた場合にも SF の測定限界時間 (6 ms) の間に大きなバースト (中間体) が観測された。特に CD では、全体の 26% に相当するアミノ酸を含む α ヘリックスが生じることが観測された。この中間体は、X 線散乱の観測の結果、すでにコンパクトな形をしていて、慣性半径もアンフォールドしているときの 27 Å から 18.5 Å に縮小しており、生理的条件下での 14.7 Å に近い値を示した。これらのデータを総合すると、フォールディングの初期に表れる中間体は主に α ヘリックスからなるコンパクトな形をしていることが証明できた。

【考察】

ここで得られた結果を一般的に考察するために、さらにリボヌクレアーゼ A、リゾチームなどいくつかの蛋白質についても測定し、2 次構造予測の多くのプログラムから得られた予測値と比較検討した。多くの 2 次構造予測のプログラムは、我々の結果と相関がなかったが、ただ一つボールドウィンらが開発したヘリックス 2 による結果だけは高い相関を示した ($r=0.86$)。ヘリックス 2 は、ポリペプチドがヘリックスとコイルからのみになっているとしてヘリックスコイル転移の理論を基に構築されたヘリックス含量予測プログラムである。このことから、フォールディングの初期には、まず不安定な α ヘリックスが生じ、それらの間で相互作用が起こり、準安定なコアができる。蛋白質の安定な構造は、 α ヘリックスからなる蛋白質の場合も、 β シートだけからなる蛋白質の場合も、この α ヘリックスからなる中間体（フォールディングコア）を経て形成されてゆくというスキームが我々によって初めて提唱されるに至った。

審査の結果の要旨

李氏は、従来の説と異なり、生理的条件で β -シートを多く含む構造を取る蛋白質の場合でさえも、最初に α -ヘリックスを多く含む中間体を形成し、その後それら蛋白質本来の構造を形成するという新しい説を src SH3 をはじめ数種の蛋白質で証明した。また、その意義についても充分納得できる明快な説明を加えた。李氏の研究は医学の基礎科学に大きな貢献をすることが期待され、学位に十分値すると考える。

【1425】

氏名(本籍) ^{そん}孫 ^{よん}瑛 ^す洙 (韓国)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 783 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Prostaglandin E₂ is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells

論文審査委員 主査(教授)池原 進

(教授)伊藤誠二 (教授)福原資郎

論文内容の要旨

【はじめに】

樹状細胞(dendritic cells: DCs)は生体に広く分布し、抗原特異的にナイーブ T 細胞を活性化、免疫応答を誘導する抗原提示細胞であり、獲得免疫応答の発動拠点としてその重要性が認識されている。また、獲得免疫のみならず、自ら産生するサイトカインなどにより自然免疫系への関与もみられる。

DCs はその起源および属性より myeloid DCs (MDCs) と plasmacytoid DCs (PDCs) に大別され、それぞれ異なる機能をもつことが知られている。

ProstaglandinE2 (PGE2) は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼの触媒を受けて生成される物質で生理化学物質の一つであり、炎症性刺激により産生が誘導される。PGE2 は炎症局所で産生され、免疫担当細胞へ作用し、自然免疫・獲得免疫の制御に関与することが知られている。

【研究目的】

PGE2 は全身に分布し生体内の機能を制御しているが、組織障害や抗原を介した免疫反応の際には、他の炎症性メディエーター(histamine, bradykinin など)と共に局所で、炎症反応に深く関与することが知られている。当然、炎症局所には抗原提示細胞として DCs が存在するため PGE2 は DCs に何らかの作用効果を持つと推測される。

これまでの報告では、PGE2 が抗原提示細胞に与える影響について、単球・マクロファージ・単球由来 DCs・骨髄由来 DCs について解析されて

いるものの PDCs に対する報告はない。

PDCs は、近年の研究により I 型インターフェロン産生細胞としてウィルス感染時の生体防御や自己免疫性疾患及びアレルギー性疾患での免疫応答の起点としての重要性が示唆されており、病態により PDCs が炎症局所に集積されることも知られる。

それ故、今回 PGE2 による PDCs への免疫学的影響を検討する事は、炎症環境下（感染症・アレルギー性疾患）で発生している免疫系の機構の解明に繋がり、炎症性疾患への治療戦略に寄与する可能性があると考えられる。

【研究方法】

インフォームドコンセントを得た健常者の末梢血を採取し、単核球層を比重遠沈法にて分離したあと、抗 CD3 抗体・抗 CD14 抗体を用いた immunoselection により T 細胞・単球を除去した。更に、磁気ビーズ標識抗 CD4 抗体を用い positive selection を行い、CD4+ CD3- CD14- の樹状細胞濃縮分画を調整し CD11c+, lineage-, DR+: MDCs と CD11c-, lineage-, DR+: PDCs をセルソーターにて単離した。MDCs, PDCs をそれぞれに感受性のある TLR ligand: Poly (I:C) (TLR-3 ligand), LPS (TLR-4 ligand), Sendai Virus (TLR-7 ligand), CpG-ODNs (TLR-9 ligand) で刺激し、PGE2 添加による生存率やサイトカイン産生を検討した。更に、allo naïve CD4+ T cell と共培養を行い、PGE2 処理 PDCs の T 細胞刺激活性化能も調べた。

【結果・考察】

PGE2 添加により MDCs の生存率は維持されるのに対し、PDCs の生存率は抑制された。また、PGE2 は MDCs が産生する IL-12 産生を抑制するだけでなく PDCs が産生する I 型インターフェロンの産生をも抑制した。I 型インターフェロンの産生抑制が生存率の低下によるものではないことを RT-PCR、細胞内サイトカイン産生をみることにより証明した。PGE2 処理後のそれぞれの DCs が、allo naïve CD4+ T cell からの Th1 サイトカインである IFN- γ 産生を制御する結果が得られた。すなわち、PGE2 が DCs 由来の IL-12 や I 型インターフェロンを抑制することによって、Th1 応答を抑制し、Th2 応答を誘導することが示唆された。

感染が起こった際、生体内では MDCs, PDCs が

それぞれ Th1 誘導型サイトカインが産生されるが、炎症環境下で PGE2 は、それぞれの DCs から産生されるこれら Th1 誘導型サイトカインを抑制させることによって病原性 Th1 応答を制御すると思われる。この事象は炎症環境下で発生する過剰な免疫応答を制御するネガティブフィードバック機構であると推測される。

審査の結果の要旨

本研究は、Prostaglandin E2 (PGE2) が plasmacytoid DC (PDC) によるインターフェロン α (IFN α) 産生を抑制し、炎症反応を負に制御することを明らかにした。すなわち、PGE2 は myeloid DC (MDC) による IL-12 の産生抑制と同様、PDC の特性を抑制することによって、過剰な免疫応答を制御している。巧妙な免疫反応の一端を明らかにしたものであり、学位に値する。

【1426】

氏 名 (本 籍) 李 清 (中国)
 学 位 の 種 類 博士 (医学)
 学 位 番 号 甲 第 784 号
 学位授与の日付 平成 19 年 3 月 30 日
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目
 Analyses of Very Early Hemopoietic Regeneration After Bone Marrow Transplantation: Comparison Between Intravenous and Intra-Bone Marrow Routes
 論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭
 (教授) 福原資郎 (教授) 池原 進

論文内容の要旨

ドナーの骨髄細胞を静脈から移入する方法が骨髄移植では一般的に行われているが、ドナー骨髄細胞が肺等で捕捉されるため、その生着率は非常に低い。最近、骨髄内移植法 (IBM-BMT) は静脈内法 (IV-BMT) と比べて移植効率が非常に高いことが、我々のみならず他の研究室においても報告されるようになった。そこで、IBM-BMT が有用である理由を解析するため、特に骨髄移植後早期

の造血系再構築機構を両移植法で比較検討した。

ドナー骨髄細胞を IBM-BMT したマウスの脛骨においては、骨髄移植後 2 から 6 日目までの間、ドナータイプの骨髄細胞数や造血前駆細胞数は、レシピエントの他の部位の骨に比べて有意に高く、IV-BMT 群の生理食塩水を注入した脛骨と比べても差は顕著であった。造血幹細胞数もドナー骨髄細胞移入脛骨において有意に高い値を示した。また、組織学的にも、IV-BMT 群の生理食塩水を注入した脛骨と比べて、著しく高い造血幹細胞とストローマ細胞の集積が骨髄移植 4 日目のドナー骨髄細胞移入脛骨において確認された。さらに、脛骨内の骨髄細胞の培養によって得られたストローマ細胞中のドナータイプ細胞数は、ドナー骨髄細胞移入脛骨において有意に高かった。放射線照射マウスの骨髄培養上清中に骨髄ストローマ細胞の走化誘導活性が検出されたが、血清中には認められないことから、IV-BMT によって血液循環系に入ったドナー骨髄ストローマ細胞がレシピエントの骨髄内へ homing できる可能性は低いと思われた。

以上の結果から、ドナー骨髄細胞移入脛骨においては、移植後早期に造血幹細胞とストローマ細胞の集積による造血微小環境の再構築が認められ、これが、IBM-BMT 法の有用性の一因であると結論できる。

審査の結果の要旨

本研究は、骨髄内移植法 (IBM-BMT) が従来の静脈内法 (IV-BMT) と比べて移植効率が非常に高い理由を解析するため、骨髄移植後早期の造血系再構築機構を両移植法で比較検討したものである。IBM-BMT 部位においては、造血幹細胞とストローマ細胞の集積による造血微小環境の早期再構築が認められ、これが IBM-BMT 法の有用性の一因であることが明らかになった。この知見は、IBM-BMT 法の臨床応用への基礎的実験として非常に重要であり、学位に値するものと認められた。

【1427】

氏名(本籍) ^{いし} ^{かわ} ^{ゆかり} 石川 有加里 (福岡県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 785 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

Senescence in cultured trabecular meshwork cells

論文審査委員 主査(教授) 螺良愛郎

(教授) 伊藤誠二 (教授) 松村美代

論文内容の要旨

【研究目的】

正常細胞は分裂回数に限界があり、最終的にはセネッセンスと呼ばれる分裂できない状態に陥る。セネッセンスはウェルナー症候群やアテローム血栓性疾患など加齢が関係する疾病と関連があると言われている。原発開放隅角緑内障は高眼圧が関与する視神経症で、高齢者に多く失明に至ることもあるため眼科領域では重要な疾患である。本疾患の患者や高齢者では眼内の房水流出路である隅角線維柱帯の細胞数が減少して細胞外基質に置き換わり、これが房水流出抵抗を増大させて眼圧上昇の原因となっていることが示唆されている。本研究では原発開放隅角緑内障の病態と加齢の関連を考察するため、分裂を繰り返した培養線維柱帯細胞がセネッセンスに陥るかどうかを検討した。

【研究方法】

組織および細胞培養

ブタ眼球から線維柱帯組織とテノン囊の結合組織を採取して初代培養とした。それぞれの組織から遊走、増殖した線維柱帯細胞と線維芽細胞を継代培養した。また角膜内皮細胞を採取して同様に継代培養した。コンフルエント状態になった初代培養の細胞を細胞分裂レベル 0 (PDL0) と定義し、トリプシンを用いて 1:4 の比率で継代培養した。このようにすれば細胞は各々の継代で 2 ずつ PDL が増加する。線維柱帯細胞を同定するため、線維柱帯細胞のマーカーである低比重リボ蛋白を蛍光標識したもの (DiI-Ac-LDL) で各々の細胞を

染色して蛍光顕微鏡で観察した。

β -ガラクトシダーゼ染色

細胞老化を意味するガラクトシダーゼ活性は pH 6 の環境下で、またライソゾームのガラクトシダーゼ活性は pH 4 の環境下で最大の酵素活性を示すため、各々の pH で PDL 2, 8, 16 の線維柱帯細胞にガラクトシダーゼにより青く発色する試薬 X-gal を反応させて染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

染色体末端の制限酵素断片（テロメア）長の測定

PDL 2, 8, 16 の線維柱帯細胞から染色体 DNA を抽出し、制限酵素 Rsa I と Hinf I で切断した。1 μ g の DNA サンプルを 0.7% のアガロースゲルで電気泳動した後、テロメアに特異的なオリゴヌクレオチド (TTAGGG)₃ に ³²P 標識したものをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

【結果】

DiI-Ac-LDL 染色では線維柱帯細胞は殆ど全てが陽性で、線維芽細胞と角膜内皮細胞は陰性であった。PDL 2 の線維柱帯細胞は pH 4 におけるライソゾームのガラクトシダーゼ染色だけが陽性で、細胞老化を示す pH 6 のガラクトシダーゼ染色は陰性であった。PDL 16 の線維柱帯細胞は pH 4 および pH 6 の両方のガラクトシダーゼ染色に陽性を示した。染色体 DNA のサザンプロット分析では継代数が増加した線維柱帯細胞でテロメア長が短くなるのが観察された。

【考察】

共同研究者の松永らは培養を繰り返した網膜色素上皮細胞がセネッセンスに陥ることを報告した。また線維芽細胞でセネッセンスに伴い細胞外基質成分の遺伝子発現が変化することや、網膜色素上皮細胞でセネッセンスに伴って網膜色素上皮細胞由来因子が減少することなどが報告されている。松永らが行った網膜色素上皮細胞の結果と比較すると、線維柱帯細胞は PDL 16 と少ない細胞分裂レベルでセネッセンスに陥った。この違いは線維柱帯細胞が初代培養で網膜色素上皮細胞が株化細胞であったこと、あるいは線維柱帯細胞がブタで網膜色素上皮細胞がヒトの細胞であり、種の違いのために見られたのではないかと推察される。もし加齢に伴い生体内で線維柱帯細胞のセネッセンスが起こるのであれば、線維柱帯細胞のセネッセンスは原発開放隅角緑内障の病態に重要な役割

を果たす可能性があると考えられた。

審査の結果の要旨

原発性解放隅角緑内障の原因を探るために、ブタ線維柱帯細胞の培養系を作製して老化の出現を検索した。その結果、線維柱帯細胞のマーカーである低比重リボ蛋白陽性細胞は、継代 16 代に至ると老化を示唆する β -ガラクトシダーゼ活性を発現し、かつテロメア長の短縮も認めたため、老化に陥ることが判明した。このことは、原発性開放性隅角緑内障の原因のひとつを同定し、併せて治療にも示唆を与える結果と考え、学位に値すると判断した。

【1428】

氏名(本籍) ^{さか} ^{もと} ^{さち} ^よ 阪本 幸世 (大阪府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 甲 第 786 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

学位論文題目

The Differential Effects of Nitrous Oxide and Xenon on Extracellular Dopamine Levels in the Rat Nucleus Accumbens: A Microdialysis Study

論文審査委員 主査(教授) 杉本哲夫
(教授) 稲垣千代子 (教授) 新宮 興

論文内容の要旨

【はじめに】

中脳辺縁系ドパミンシステムは中脳腹側被蓋野から側坐核にいたる神経回路網であり、妄想や幻覚といった薬物の精神異常誘発作用や薬物耽溺に深く関与する部位であると考えられている。フェンサイクリジン(PCP)やMK-801などNMDA受容体PCP結合部位に作用する拮抗薬は、側坐核ドパミン放出を増加させ妄想や幻覚を引き起こすことが報告されている。われわれは、NMDA受容体拮抗作用を有する静脈麻酔薬ケタミンが、側坐核のドパミン濃度を増加させ、この増加をバルビツレートが抑制することをすでに報告している。

ガス麻酔薬キセノンと亜酸化窒素はどちらも NMDA 受容体拮抗作用を有するが、その精神・神経に対する作用は大きく異なることが報告されている。例えば、亜酸化窒素は精神異常誘発作用を有するがキセノンにはほとんどない。また、ラット脳後帯状皮質・脳梁膨大後皮質 (PC/RS:NMDA 受容体拮抗薬による精神異常誘発作用のもう一つの責任部位と考えられ、ひいては統合失調症の責任部位とも考えられている) の神経細胞傷害や c-fos 発現 (げっ歯類異常運動の良い指標となる) を亜酸化窒素は引き起こすがキセノンは引き起こさない。さらに、ケタミンや MK-801 による同部位の細胞傷害や c-fos 発現を亜酸化窒素は増強しキセノンは抑制する。

そこで、亜酸化窒素とキセノンの側坐核ドパミン放出に対する作用に違いがあるかどうか、さらにケタミンによる同部位のドパミン放出増加作用に対する作用に違いがあるかどうかを調べた。

【研究方法】

オスのウィスターラットを用い、自由行動下のマイクロダイアリシス法により側坐核のドパミン濃度を測定した。実験 1: ラットを箱に入れて、40%酸素、60%亜酸化窒素 (0.27 MAC)、43%キセノン (0.27 MAC) をそれぞれ 1 時間投与した。実験 2: 各ガスを 10 分間投与した時点でケタミン 80 mg/kg を腹腔内投与し、その後各ガスを 1 時間投与した。サンプルは 20 分毎に採取しドパミン濃度は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。各時間のドパミン濃度は薬物投与前値を 100 とした相対値で示し、平均±標準誤差で表示した。統計処理は二元配置分散解析の後、Bonferroni 法を用いて各群間差を検定し、 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

側坐核のドパミン放出は、亜酸化窒素で有意に増加した (最大 144%) が、キセノンでは低下傾向を示した (82%)。また、ケタミン投与によるドパミン放出の増加 (243%) をキセノンは抑制した (143%) が、亜酸化窒素は抑制しなかった (232%)。

【考察】

側坐核のドパミン放出に対して、同様に非競合性 NMDA 受容体拮抗作用を有するガス麻酔薬、キセノンと亜酸化窒素では大きく作用が異なるこ

とが示された。このことが、亜酸化窒素とキセノンの精神・神経系に対する作用が異なる一因である可能性がある。興味深いことに、中脳辺縁系に対する亜酸化窒素とキセノンの違いは、PC/RS に対する両者の作用の違いと同様であった。中脳辺縁系ドパミンシステムと PC/RS の明らかな関連は認められていないが、最近の研究で、ケタミンはラットやヒトの PC/RS のドパミン放出を増加させるという報告もあり、さらに研究を進めていきたい。

審査の結果の要旨

ガス麻酔薬である亜酸化窒素とキセノンが共に NMDA 受容体拮抗薬でありながら、精神・神経作用に異なることがある。本研究は側坐核におけるドパミン放出作用に両薬が異なる作用を有することをラットにおいてマイクロダイアリシス法を用いて明らかとした。本研究は両薬の精神・神経系作用の違いが中脳辺縁系ドパミンシステムの違いに起因する可能性を示しており、博士号に値する研究であると判断した。

【1429】

氏 名 (本 籍) ^{しばた せいじ} 柴田清児ブルース (東京都)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 甲 第 787 号
学位授与の日付 平成 19 年 3 月 31 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目

Administration of amitriptyline attenuates
noise-induced hearing loss via glial cell line-
derived neurotrophic factor (GDNF) induction

論文審査委員 主査 (教授) 杉本哲夫
(教授) 稲垣千代子 (教授) 山下敏夫

論文内容の要旨

【はじめに】

近年、中枢や末梢神経において神経栄養因子 (NTF) の働きが研究され注目されている。内耳においてもこのような NTF が重要な役割を担っており、内耳初期発生、形態維持、細胞死などに関与

している。さらに Glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) や Brain derived neurotrophic factor (BDNF) 及び fibroblast growth factor (FGF) などの NTF は内耳有毛細胞やラセン神経節細胞の保護作用を有することが報告されている。

GDNF をはじめとする NTF は分子量が大きいため末梢より投与した場合、血液脳関門を通過することは困難である。過去の報告では、音響外傷や聴器毒性に対し GDNF をポンプやアデノウィルスベクターなどをを用い内耳に投与し、保護作用を認めている。しかし、いずれも手術を伴う投与方法で外科的侵襲による難聴を引き起こす可能性があるため臨床応用は容易ではない。最近の研究では三環系抗うつ薬のひとつである Amitriptyline (AT) を *in vitro* で投与することにより、rat C6 glioblastoma cell における GDNF mRNA の発現と GDNF の遊離作用が増強されることが報告されている。そこで本研究では AT 投与により誘導された内因性の GDNF が内耳における神経保護作用を示すことを推定し、モルモットを用いて音響外傷に対する AT の内耳保護作用を *in vivo* で検討した。

【方法】

250～300 g のモルモット (雌) を用いて、AT 投与前に ABR を測定し AT を 30 mg/kg で腹腔内投与した。また対照には同量の生食を腹腔内投与した。投与後、モルモットに 4 kHz のバンドノイズを 117 dB で 24 時間負荷した。その後、3 日目と 7 日目の ABR を測定し AT 投与群と生食投与群とを比較検討した。7 日目の ABR を測定後、両群のモルモットから蝸牛を取り出し Surface Preparation を行うことにより、損傷を受けた有毛細胞数を組織学的に比較した。蝸牛内の GDNF の産生を確認するため、AT および生食を投与したモルモットの蝸牛を摘出し、ホモゲナイズ後 SDS-PAGE 並びに Western Blot を行い、AT 投与群と生食投与群を 3, 12, 24 時間で GDNF の発現を経時的に調べた。また騒音環境下での AT 投与群と生食投与群を同様に調べ比較した。

【結果】

ABR において AT 投与群は生食投与群に比べ聴力の閾値上昇が 3, 7 日目ともに有意に低下していた。Surface Preparation では音響外傷後の有毛細胞の減少が AT 投与群は生食投与群に比べ少なく、外有毛細胞の減少に有意差を認めた。Western

Blot Analysis では AT 投与してから 3, 12 時間後に GDNF の発現を強く認め、24 時間後および生食群ではその発現は認められなかった。騒音環境下では 3, 12 時間後に GDNF の発現を強く認め、さらには 24 時間後と生食投与群でもその発現が認められた。

【考察】

本研究では AT 投与および騒音負荷による GDNF の発現の可能性が示唆された。その発現は AT 投与のみでは 24 時間後に消失したが、騒音を負荷した場合 24 時間後まで発現が維持されていた。また、生食投与群と AT 投与群の騒音負荷 24 時間後を比較した場合、AT 投与群の GDNF の発現が強く認められた。過去の報告では、騒音負荷 8 時間と 12 時間後に GDNF が誘導されることが知られており、内耳のストレスに対する防御反応機構の一つと考えられている。このことから我々は AT と騒音負荷の相加的効果により内因性の GDNF の産生が強まり、作用が延長し細胞死や損傷に対し保護的に働くと推察した。

GDNF は GDNF family レセプターとレセプター型チロシンキナーゼ遺伝子 (Ret) というレセプター複合体を介して情報伝達されることが知られており、内耳における GDNF の産生およびレセプターの局在は *in situ hybridization* および RT-PCR で確認されている。その細胞保護作用機序として free radical の発生抑制、カルシウム結合蛋白を介しての細胞内カルシウムの調節などが報告されている。本研究では音響外傷に対し AT 投与により機能および組織学的に内耳保護作用がある可能性が示唆されたが、AT 投与による GDNF の発現が内耳のどこで起こり保護作用がいかに機能するかは明らかではなく有毛細胞以外の蝸牛組織にも働いている可能性がある。AT による GDNF の誘導はセロトニンを介した MAPK カスケード、GDNF 以外の NTF との相互作用、サイトカインを介し起因する可能性があると考えられている。しかし、本研究ではその機序の解明には至っておらず、今後は AT 投与による GDNF の発現部位やその詳しい誘導、作用機序を検討することが必要であると考ええる。

審査の結果の要旨

三環系抗うつ薬のひとつである Amitriptyline

(AT) を *in vitro* で投与することにより神経栄養因子の 1 つである GDNF が発現することが知られている。本研究ではモルモットを用いて音響外傷に対する AT の内耳保護作用を *in vivo* で証明した。将来、臨床応用にもつながる研究で十分学位に値すると認められた。

【1430】

氏 名 (本 籍) ^{い く た あ き こ} 生 田 明 子 (広島県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 乙 第 644 号

学位授与の日付 平成 18 年 7 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

Correlation p53 expression and human papilloma virus deoxyribonucleic acid with clinical outcome in early uterine cervical carcinoma

論文審査委員 主査 (教授) 螺良愛郎
(教授) 池原 進 (教授) 神崎秀陽

論文内容の要旨

子宮頸癌は HPV16, 18, 33 型をはじめとする悪性型 HPV との因果関係が証明されている。また、癌抑制遺伝子である p53 遺伝子との関与が報告され、発癌との関連性や進行度・予後因子としての有用性も示唆されている。一方、子宮頸癌の予後因子としては、臨床進行期・リンパ節転移・子宮旁組織への浸潤が確立されている。今回、初期子宮頸癌において、p53 発現および HPV の typing が、年齢・月経の有無・進行期分類 (FIGO stage)・組織型・リンパ節転移・子宮旁組織への浸潤の有無・再発などと関係し、予後推定因子となり得るかを検討した。

1998 年から 2002 年に関西医科大学附属病院婦人科にて取り扱った子宮頸癌症例 Ia~IIb 期のうち、子宮摘出術を施行した 49 症例につき検討した。進行期は FIGO 分類に基づいて決定した。内訳は Ia 期 8 例 (16.3%)、Ib 期 29 例 (59.2%)、IIa 期 1 例 (2%)、IIb 期 11 例 (22.4%) であった。組織型は WHO の規約に基づき分類し、扁平上皮

癌 36 例 (73.5%)、腺癌 11 例 (22.4%)、腺扁平上皮癌 2 例 (4.1%) であった。全 49 症例で p53 モノクローナル抗体 (DO-7) を用い、SAB 法で p53 発現を確認し、光学顕微鏡 200 倍視野下で癌細胞核の 10% 以上が染色された場合を陽性と判定した。HPV DNA typing は 25 例において -80°C の凍結切片からスタンダード SDS プロテアーゼ K 法に従い DNA を抽出後、HPV typing を PCR-RFLP 法で行った。ウェスタンブロットは凍結切片から蛋白を抽出し、p53 モノクローナル抗体 (DO-7) を用い施行した。

免疫組織学的染色において、49 例中 25 例 (40.8%) に p53 発現を認めた。ウェスタンブロット法にても蛋白発現を認めた。p53 の発現は、年齢・月経の有無・FIGO stage・再発症例間で有意差を認めた。p53 発現症例では、生存率が低い傾向はあったが有意差はなかった。また扁平上皮癌で p53 発現が多い傾向にあったが有意差はなかった。リンパ節転移の有無との相関は見られなかった。子宮旁組織に浸潤したものでは p53 発現が多い傾向はあったが有意差はなかった。HPV DNA を検索し得た 25 例中、19 例 (76%) が HPV DNA 陽性、6 例 (24%) が陰性であった。HPV の陽性と年齢については、FIGO stage・組織型・リンパ節転移・子宮旁組織への浸潤の有無・再発・生存率との間にはいずれも有意差を認めなかった。p53 の発現と HPV DNA の陽性との間には有意差を認めなかった。また、p53 の発現と HPV の type にも相関はなかった。

臨床的予後因子のうち、子宮旁組織への浸潤例での再発は有意に高率であった。年齢および FIGO stage は再発に関連する傾向はあったが有意差はなかった。またリンパ節転移症例では再発が多い傾向にあったが有意差は認められなかった。49 例中 11 名に再発を認め (22.4%)、このうち 8 例 (72.7%) が p53 陽性であった。

これらの結果より、子宮頸癌においては p53 の発現は年齢・月経の有無・FIGO stage と相関し、かつ予後因子、特に再発を予測するマーカーになり得る可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は、子宮頸癌における p53 遺伝子発現が予後と関連しかつ再発リスクの予知にも有用であ

ることを始めて明らかにしたもので、実地臨床上也非常に有意義な研究であり、学位を授与するに値するものと認める。

【1431】

氏 名 (本 籍) ^{しの みや とし あき} 四 宮 敏 章 (香川県)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 乙 第 645 号
学位授与の日付 平成 18 年 7 月 28 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目

Plasma acylated ghrelin levels correlate with
subjective symptoms of functional dyspepsia in
female patients

論文審査委員 主査 (教授) 岡崎和一
(教授) 稲垣千代子 (教授) 中井吉英

論文内容の要旨

グレリンは主として胃内分泌細胞より分泌される脳-腸管ペプチドである。グレリンの生理作用には成長ホルモン分泌促進、摂食促進作用が知られているが、胃酸分泌促進、胃蠕動運動促進、胃食物通過時間の短縮などの弛緩作用も報告されている。

Functional dyspepsia (FD) は上部消化管の代表的な機能性胃腸障害の一つであり、胃痛、嘔気、膨満感などの症状を訴え医療機関を受診する患者の 60~70%と報告されている。また、消化管の motility や sensitivity が FD の病態に関与している可能性が示唆されている。グレリンが FD の病態に関与している可能性を検討するため、FD 患者の血清グレリンを測定し検討した。

18 名の女性 FD 患者と 18 名の女性健常者を対象に同意を得た上で採血した。アシル化グレリン濃度および脱アシル化グレリン濃度を、それぞれ市販されている「Active Ghrelin ELISAKit」、
「Desacyl-Ghrelin ELISA kit」を用いて測定した。その結果、両者に有意の差はみられなかったが、FD 患者群におけるアシル化グレリン濃度と各パラメーター (症状スコア、成長ホルモン、IGF-1、インスリン、血糖値、HOMA-IR、レプチン、遊離

脂肪酸) との相関を調べたところ、自覚的症状スコアと有意に相関した。しかし、脱アシル化グレリン濃度において相関は認められなかった。また、アシル化グレリン濃度はアシル化グレリンと脱アシル化グレリンの比 (A/D ratio) と強い相関が認められた。血漿アシル化グレリン濃度と A/D 比との相関は、アシル化に関わる酵素が高グレリン濃度の際に増加し、低グレリン濃度の際に減少している可能性を示唆している。また、血漿アシル化グレリン濃度が自覚症状スコアと相関する点は、アシル化グレリンが FD 患者の消化管の motility や sensitivity に影響している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

本研究により、FD 患者の機能異常が胃由来のグレリンの分泌あるいは生産に影響を与えているという知見と可能性が確認された点は、本症の病態の解明や治療薬の開発に大変有益であり、学位に値するものと認められた。

【1432】

氏 名 (本 籍) ^{は せ がわ たか まさ} 長谷川 隆 正 (大阪府)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 乙 第 646 号
学位授与の日付 平成 18 年 10 月 31 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目

The regulation of S100A12 (EN-RAGE) protein
expression

論文審査委員 主査 (教授) 伊藤誠二
(教授) 木梨達雄 (教授) 岩坂壽二

論文内容の要旨

【背景 1】

糖化蛋白 AGE (advanced glycation endproducts) の受容体である RAGE (receptor for AGE) へのリガンドとして最近 S100 蛋白が報告された。S100 蛋白は現在 16 種類以上のサブタイプが確認され、その機能は多岐にわたっている。これらのサブタイプの内 S100A12 (EN-RAGE) は AGE と同様に

RAGE を介して血管平滑筋細胞の NF- κ B を活性化し増殖を促進し、また単球の遊走能を亢進させることが報告されその細小血管および大血管障害への関連が注目されている。

しかし、S100A12 (EN-RAGE) 遺伝子発現の調節因子についてはまだ不明な点が多い。そこで、まず THP-1 マクロファージ細胞を用い S100A12 (EN-RAGE) 遺伝子発現の調節因子について検討した。(主論文-1)

【方法 1】

ノーザンブロット法および RT-PCR 法を用いて S100A12 mRNA を定量した ($n=5$)。また培養上清中の S100A12 タンパク質濃度をその特異抗体を用いた ELISA 法にて定量した。

【結果 1】

ヒト THP-1 単球細胞を 160 nM PMA と 16 時間布置しマクロファージに分化後 total RNA を抽出し、ノーザンブロット法で S100A12 mRNA の存在を確認した。この THP-1 マクロファージを用いて動脈硬化を促進させる様々なサイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1) を布置し S100A12 mRNA 量への効果を検討した。その結果、S100A12 mRNA は IL-6 のみで有意な増加を認めたがその他のサイトカインでは有意な変化を認めなかった。用量依存性を検討すると IL-6 (100 ng/ml) により S100A12 mRNA 量は 16 時間後で約 2 倍に増加し、16 時間布置による用量依存性を検討すると ED₅₀ は約 3 ng/ml であった。また、THP-1 マクロファージから実際に S100A12 タンパク質が分泌されているかを検討したところ THP-1 マクロファージ上清中に S100A12 タンパク質を ELISA により確認でき (約 0.67 ng/dl)、IL-6 添加後 20 時間すると約 20% の有意な増加を認めた。

THP-1 マクロファージにタンパク合成阻害薬である cycloheximide (2 μ g/dl) を 90 分間前布置し IL-6 を布置すると IL-6 による S100A12 mRNA の増加は完全に抑制された。

次に、この S100A12 mRNA やタンパク質がこれまで明らかになっている IL-6 シグナル伝達系のうち JAK-STAT 系と SHP2-MAPK 系のどちらを介しているのかを検討した。THP-1 マクロファージを JAK inhibitor である AG490 と前布置すると IL-6 による S100A12 mRNA の増加は完全に阻害された。しかし MEK inhibitor である PD98509 では阻害さ

れなかった。

最後に、動脈硬化促進に働く遺伝子発現を抑制するといわれている PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンを用い S100A12 遺伝子に対する効果を検討した。ピオグリタゾン (50 μ M) 添加により THP-1 マクロファージの S100A12 mRNA は減少し、12 時間後に約 50% に、24 時間後には 30% 以下となった。ピオグリタゾン 24 時間布置による用量依存性を検討すると ED₅₀ は約 10 μ M であった。またピオグリタゾン (25 μ M) と前布置に IL-6 (100 ng/ml) を添加しても S100A12 mRNA の増加は認められなかった。

【考察 1】

THP-1 マクロファージにおいて、IL-6 は SHP2-MAPK 系を介さず JAK-STAT 系のみを介して S100A12 mRNA を増加させそのタンパク質合成を促進した。また、cycloheximide により IL-6 による S100A12 mRNA の増加を阻害したことから JAK-STAT 系を介した新規タンパク質が S100A12 mRNA 発現に関与していることが明らかとなった。一方、PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンは S100A12 mRNA を低下させ、また IL-6 による S100A12 mRNA の増加作用も阻害した。

このようにヒトマクロファージで S100A12 タンパク質が合成・分泌され、動脈硬化薬において増加していると言われている IL-6 により発現増強され糖尿病性合併症を含む各種血管障害への増悪因子となり、またチアゾリジン誘導体であるピオグリタゾンが PPAR γ を活性化することにより、これらの S100A12 タンパク質増加の抑制を介して各種血管障害の進展を抑制する可能性を明らかにした。

【背景 2】

次に、ヒト血中において S100A12 タンパク質が存在するのか、存在するのであればどのような臨床病態学的意義があるのかを、糖尿病患者における血漿 S100A12 タンパク質濃度の測定を試み検討した。(主論文-2)

【方法 2】

合成ヒト S100A12 タンパク質に対するエピトープの異なる 2 種類のモノクローナル特異抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を作成し、2 型糖尿病患者血漿を用い血中 S100A12 蛋白質濃度を測定した。

【結果 2】

本研究で作成した血中 S100A12 濃度測定用 ELISA の測定限界は 0.2 ng/ml であった。この ELISA での intra-assay の CV 値は 4%未満で inter-assay の CV 値は 9%未満であった。そこで、この ELISA 法を用いて 2 型糖尿病 41 例 (DM 群)、非糖尿病 35 例 (Non-DM 群) において血漿 S100A12 タンパク質濃度を比較すると、DM 群 19.6 ± 5.26 vs Non-DM 群 8.1 ± 0.81 ng/ml ($p < 0.001$) と DM 群において 2 倍以上の有意な高値を認めた。また全患者での単相関を観ると、血漿 S100A12 濃度と HbA1c ($R = 0.455$, $p < 0.001$)、血糖値 ($R = 0.281$, $p = 0.019$)、高感度 CRP 値 ($R = 0.223$, $p = 0.048$) および白血球数値 ($R = 0.325$, $p = 0.007$) と有意の正相関を認めた。しかし上記の全てを独立変数としてステップワイズ回帰分析を行なうと HbA1c 値 ($R = 0.467$, $p = 0.0001$) および白血球数 ($R = 0.316$, $p = 0.0001$) のみが血中 S100A12 濃度の有意な独立規定因子であった。

【考察 2】

ヒトの血中における S100A12 タンパク質濃度の高感度測定系を構築した。この測定系を用いて血漿中の S100A12 タンパク質濃度に血糖調節因子と炎症関連因子が関与する可能性を明らかにした。

【まとめ】

主論文 1, 2 の研究結果より S100A12 タンパク質が糖尿病における細小血管および大血管障害への促進因子である可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は新規な内容を含んでおり、医学に資するところ大と考え、学位に値すると判断された。

【1433】

氏名(本籍) ^{いな} ^だ ^{たけ} ^{ふみ} 稲田 武文 (和歌山県)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 乙 第 647 号

学位授与の日付 平成 18 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

A new method of measuring gastric emptying and gastrointestinal transit in mice and its application in the fields of anesthesiology

論文審査委員 主査(教授)岡崎和一
(教授)稲垣千代子 (教授)新宮 興

論文内容の要旨

【目的】

集中治療室 (ICU) では、しばしば重症患者に対し栄養管理が行われる。経腸栄養はその有用性より近年広く用いられているが、その成否は腸管機能に依存している。一方 ICU の重症患者は、さまざまな疾患を有し、また治療のため多くの薬剤が投与されており、これらによる腸管運動抑制が大きな問題となっている。したがって ICU で頻見される疾患や頻用される薬剤の腸管運動に対する作用を知ることは、麻酔科医にとって興味ある事項である。

ラットやマウスを用いての胃・腸管運動の研究では、以前より放射性同位元素を用いた方法が Gold standard とされてきた。この方法は、放射性同位元素で標識された粒子を動物の胃内に投与し、標識物質の胃・腸管内での分布をみるものである。しかしながら、放射性物質の使用には、放射性崩壊や保管・廃棄に伴う物理的、法的な問題などさまざまな制約が多い。そのような不便さゆえ、従来放射性物質を用いてきた実験の多くが、今や非放射性標識物質を用いたものにとって代わられている。われわれは、胃・腸管運動測定分野において、蛍光標識粒子が放射性標識粒子にとって代われないものかと考えた。

本研究の第一の目的は、蛍光標識粒子とフローサイトメトリーを用いた新しい胃・腸管運動測定法をマウスを用いて開発することである。第二の目的は、この方法を用いて、ICU で広く用いられ

ている麻酔鎮静薬であるプロポフォルとミダゾラムの、胃・腸管運動に及ぼす影響を明らかにすることである。第三の目的は、ICU で最も頻度の高い疾患の一つである敗血症において、その原因物質であるエンドトキシンの胃・腸管運動に対する影響を調べることである。

【方法および結果】

1. マウスでの、蛍光標識粒子とフローサイトメトリーを用いた胃・腸管運動測定法の開発

【方法】Balb/c 雄マウス (6-7 週) を用いた。16-24 時間の絶食ののち、ポリスチレン微小蛍光ビーズを含む生食 200 μ l をハロタン浅麻酔下に胃内に投与した。30 分後胃・腸管を採取し、管内のビーズ数をフローサイトメーターを用い測定し、胃排泄率および小腸通過速度を計算した。また、モルヒネ (1, 10 mg/kg), デクスメデトミディン (0.003, 0.01 mg/kg) を腹腔内投与した 30 分後、胃排泄率および小腸通過速度を測定した。

【結果】薬剤非投与マウスにて 2 μ m の蛍光ビーズと 6 μ m の蛍光ビーズを投与し比較したところ前者では腸管からの有意な吸収が認められたのに対し、後者ではその様なビーズの体内への吸収は認められなかったため、蛍光ビーズの大きさは 6 μ m が妥当だと考えた。また、モルヒネ投与マウスで、6 μ m ビーズを用いたところモルヒネ投与により腸管からの有意なビーズの吸収が認められた。そのため、6 μ m の蛍光ビーズに加え過大量の 0.85 μ m 非蛍光ビーズを同時投与したところ腸管からの蛍光ビーズの吸収は有意に阻害された。従って以後の実験では 6 μ m の蛍光ビーズに加え 0.85 μ m の過大量の非蛍光ビーズを投与することとした。その結果、モルヒネは用量依存的に胃排泄および小腸通過を抑制したのに対し、デクスメデトミディンでは小腸通過は抑制したが、胃排泄は抑制しなかった。これらの結果は従来の放射性同位元素を用いての結果と同様であり当フローサイトメトリーを用いた方法の有用性が示されたことになる。

2. プロポフォルおよびミダゾラムの胃排泄および小腸通過に対する影響

【方法と結果】プロポフォル (50, 100 mg/kg) あるいはミダゾラム (25, 50 mg/kg) を腹腔内投与 10 分後、胃排泄および小腸通過を測定したところ、低用量では、何れの薬剤も胃排泄を同程度に軽度

抑制したが、小腸通過はミダゾラムで有意な抑制が認められた。高用量では何れの薬剤も同程度に胃・腸管運動を抑制した。

3. エンドトキシンの胃排泄および小腸通過に及ぼす影響

【方法と結果】リポ多糖体 (LPS) 投与後胃排泄および小腸通過を測定したところ、投与後 1.5 時間 (早期エンドトキシン血症) および 8 時間 (晚期エンドトキシン血症) において胃排泄および小腸通過の抑制が認められた。また、エンドトキシン血症時にみられる胃・腸管運動障害は、LPS により誘導される因子が関与すると考えられるので、その主な因子である一酸化窒素 (NO), 腫瘍壊死因子 (TNF)- α , インターロイキン (IL)-1 β および IL-6 の胃・腸管運動に対する影響を調べた。その結果 NO, TNF- α で胃排泄および小腸通過の抑制が認められることがわかった。従って LPS による胃・腸管運動抑制作用は NO や TNF- α の影響と類似することが示された。早期エンドトキシン血症では、選択的誘導型 NO 合成酵素阻害薬である 1400 W により、胃排泄および小腸通過抑制の改善がみられたが、抗 TNF- α 抗体投与では改善は認められなかった。一方晚期エンドトキシン血症では、1400 W および抗 TNF- α 抗体により胃排泄抑制は改善されたが、小腸通過抑制は抗 TNF- α 抗体によってのみ改善が認められた。したがって LPS による胃・腸管運動抑制の機序は、LPS 投与後の時期により異なることが示唆された。

【結語】

マウスでの、蛍光ビーズとフローサイトメトリーを用いた新しい胃・腸管運動測定法を開発した。本方法は、放射性同位元素を使用しないという利点があり、薬剤や疾患の胃・腸管運動に対する影響を調べるのに大変有用となりうる。

審査の結果の要旨

本研究は、胃・腸管運動研究に従来用いられてきた放射性同位元素の欠点を克服するために、蛍光標識粒子とフローサイトメトリーを用いた新たな方法を胃・腸管運動研究手法として開発し、麻酔科・集中治療領域研究への応用に有益であることを示した。さらに菌血症における胃排泄・小腸通過時間の遅延に一酸化窒素および TNF- α が関与していることを示した。審査の結果、医学博士

を授与するに値することを認めた。

【1434】

氏 名 (本 籍) ^{なか} 中 ^お 尾 ^{かず} 和 ^こ 子 (京都府)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 乙 第 648 号

学位授与の日付 平成 18 年 11 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

Motor functions of the posterior parietal cortex
in monkeys

論文審査委員 主査 (教授) 杉本哲夫

(教授) 日下博文 (教授) 玄番央恵

論文内容の要旨

【研究目的】

我々は先行研究においてサルに様々な体部位を用いた自発的な運動をさせると、運動前野、運動野、体性感覚野および補足運動野だけでなく頭頂葉後部 (posterior parietal cortex: PPC, 5 野と 7 野) の表面と 2.0–3.0 mm 深部に慢性的に埋め込んだ電極からも表面—陰性、深部—陽性の脳皮質電場電位が運動開始前に記録でき、この表面—陰性、深部—陽性の電場電位がヒトの運動準備電位に相当するように考えられることを報告した。他方、運動前野、運動野および体性感覚野から出現する運動前電場電位の振幅は運動実施に必要な筋力に応じて運動前に変化することがわかっている。しかし、PPC から出現する運動前電場電位の振幅と筋力の関係については不明であるので本研究において検討してみた。さらに、この運動前電場電位が真に運動を開始するための筋電活動を引き起こす準備電位であるかどうかを確かめるために、PPC を含む様々な脳皮質領野を電気刺激してどの体部位の筋肉がどのくらいの刺激強度で活性化されるかについても本研究で検討した。

【研究方法】

1. 2頭のサルに手を用いた自発的なレバー上げ運動を訓練し、その後多くの脳皮質領野の表面と 2.0–3.0 mm 深部に電極を慢性的に埋め込む手術をした。術後回復したサルに負荷 (200–

400 g) のかかった、もしくは負荷のかかっていないレバーを自発的に手で上げる運動を行わせ、運動施行中の脳皮質電場電位を埋め込んだ電極から記録し、解析した。

2. 上記の研究で用いたサルにもう 1 頭を加えた合計 3 頭のサルを使って、多くの脳皮質領野の埋め込み電極に単発のパルス電流 (強度; 0.050–4.000 mA; 刺激時間; 1 ms) を 6 秒間隔で 10 回与えて筋電図を記録した。筋電図は両側の顔、胴、手首および足首の全 8 筋から表面皿電極を用いて同時記録し、比較した。

【結果】

1. 負荷が大きくなって、レバーを上げるために必要となる筋力が増加するに伴い、運動前野、運動野および体性感覚野と同様に PPC から記録された運動前電場電位の振幅は大きくなった。

2. 5 野および 7 野を電気刺激すると、運動野を刺激した時と同様に体部位局在性の筋電活動が生じた。筋電活動を誘発するのに必要な刺激強度は 5 野を刺激する場合は運動野の場合に比べてわずかに高い程度であったが、一方、7 野を刺激する場合は運動野の場合に比べてかなり高かった。

【考察】

以上のことから、PPC は運動野と同様、筋力の予測制御に関わっていることがわかった。一方 PPC、特に 7 野は、純粋な感覚機能や運動機能というよりもむしろ、視覚刺激を用いた眼球運動や手を使った視覚的到達運動のような感覚運動統御機能に関連していると従来考えられてきたが、我々の先行研究において明らかのように、様々な体部位を用いた自発的な運動の開始前、PPC に出現する運動前電場電位が体部位局在性であり、さらに本研究において、PPC の運動前電場電位の出現する部位を電気刺激すると、筋活動の誘発に必要な刺激強度は運動野より高かったが、運動野と同様の体部位局在性の筋活動が記録できた。これらは PPC が運動野と同様に純粋な運動機能に関わっていることを示している。

一方、最近の我々の研究から、サルの正中神経を電気刺激すると、刺激と対側の脳半球において極めて短潜時の体性感覚誘発電位が体性感覚野だけでなく 5 野および 7 野からも記録できた。これは受動的もしくは能動的な手の運動により生じ

る興奮性の体性感覚神経インパルスが体性感覚野と PPC を活性化するのに有用なことを示唆する。他方、サル運動野の機能低下を体性感覚野が代償して運動機能のある程度回復させることは佐々木と玄番により報告されている。

以上、本研究で PPC が純粋な運動機能に関与することを明らかにしたことにより、例えば、運動野の障害による運動機能低下の場合、体性感覚野だけでなく PPC を積極的に活性化することが、運動機能の回復に有用であると期待される。そしてそれら頭頂葉を活性化するのに、皮膚のマッサージや運動トレーニングなど末梢の体性感覚神経を興奮させる治療法は有効なように考えられる。

審査の結果の要旨

独創的な手法を駆使してサルの頭頂葉後部が筋力の予測制御に関わることを明らかにし、さらにそれらの部位を電気刺激して体部位局在性の筋活動を誘発したことにより、頭頂葉後部が運動野と同様の純粋な運動機能に関わることを明らかにした本研究は学位に値すると判断される。本研究により、運動野障害により低下した運動機能の改善に、頭頂葉後部活性化の有用なことが示唆された。

【1435】

氏 名 (本 籍) ^{やま} ^だ ^{こう} ^{いち} 山 田 光 一 (兵庫県)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 乙 第 649 号
学位授与の日付 平成 18 年 10 月 29 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目

Effect of beta-blockers on the mortality of
Japanese patients with myocardial infarction

論文審査委員 主査 (教授) 岩坂壽二
(教授) 今村洋二 (教授) 稲垣千代子

論文内容の要旨

【研究目的】

急性心筋梗塞 (AMI) 後の死亡や再狭窄予防として β -ブロッカーはこれまで様々な臨床研究が

なされてきた。それは虚血抑止、降圧効果、抗不整脈、抗血栓効果と考えられているが、一方で日本人に多いとされている冠動脈攣縮には β -ブロッカーは悪化させるとの報告が多い。これまで日本人での AMI 後の β -ブロッカーの予後効果 (2 次予防) は明らかにされてはおらず、本研究は β -ブロッカーの AMI 後の臨床経過に与える影響を単一施設の症例をもとに明らかにすることを目的とした。

【研究方法】

1994 年 5 月から 2001 年 12 月まで関西医科大学附属病院 CCU に初回発症の AMI で入院した連続 646 例の中で、入院中の急性期死亡 57 例と冠動脈バイパス術を受けた 43 例を除く 546 例を対象とした。経口 β -ブロッカーは禁忌がない限り投与し、外来通院状況や電話などにより調査した。

患者背景の中から抽出した要因は加齢、性別、Q 波梗塞、急性期の再循環療法の有無、Killip 分類、入院時 CPK 値、危険因子としての喫煙、高血圧、糖尿病、高コレステロール血症、治療薬としてアンギオテンシン I 変換酵素阻害薬の投与、Ca 拮抗薬の投与、HMG-CoA 阻害剤の投与、そして、 β -ブロッカーの投与の有無を用いた。

【結果】

546 例を 2.0 ± 1.1 年間経過観察し 46 例 (8.4%) が死亡した。400 例 (73.3%) で退院時に β -ブロッカーの投与を受けた。146 例 (26.7%) が β -ブロッカーの投与を受けず、理由として 51 例 (34.9%) が心不全のない低血圧、44 例 (30.1%) が徐脈性不整脈、19 例 (13%) がうっ血性心不全、11 例 (7.5%) が慢性腎不全、11 例 (7.5%) が慢性閉塞性肺疾患、5 例 (3.4%) が末梢動脈疾患、4 例 (2.7%) が冠動脈攣縮、1 例 (0.7%) が β -ブロッカーによる肝障害であった。

525 例が冠動脈造影を受けており、梗塞に関係した冠動脈病変がなかったのは 27 例 (5.1%)、そのうち 23 例 (85.2%) で Ca 拮抗薬が投与されていた。 β -ブロッカーは有意狭窄がない例では 44% の症例でのみ投与され、有意狭窄を有する例の 75% に比して有意に投与例数は少なかった。かつ β -ブロッカー非投与例のすべてで Ca 拮抗薬が投与されていた。使用された β -ブロッカーの種類では metoprolol (80%)、次いで propranolol (11%)、atenolol (6%) という順であった。

次に退院後の生存に独立した因子として最も有意な因子は β -ブロッカーであった (hazard ratio=0.51, 95% confidence interval: 0.27 to 0.95, $p=0.0344$). 他の独立した因子には高齢, 男性, 血清クレアチニン値, Killip 2 以上が有意であった.

【考察】

冠動脈攣縮を有する虚血性心疾患に β -ブロッカーを使用することは冠動脈攣縮の頻度が高い日本人では特に懸念されている. その背景として, 血管拡張性 β -アドレナリン受容体を遮断することは, 交感神経の影響すなわち α -アドレナリン性血管収縮反応のため冠攣縮を悪化させる可能性が考えられるからである. 一方, 欧米での 2 次予防の第 1 選択薬は β -ブロッカーである. これらの背景が日本人に対する β -ブロッカー投与頻度を低くしている. その一方, α -ブロッカーには長期二重盲検無作為試験で冠攣縮を予防しないと報告されている. これまでの報告で少数の例では β -ブロッカーが冠動脈攣縮を悪化したとあるが, 確立したデータはない. Maseri たちは, 断片的な冠動脈攣縮は自律神経の異常でなくレセプターの刺激活動の反応による動脈壁の局所的な過度の反応であることを明らかにした. ゆえに本研究で示した日本人においても β -ブロッカー投与により高い生存率に寄与した結果は Maseri らの成績を支持するものであった.

代表的メタアナリシスでは 23%の死亡率低下であったが, 本研究では日本人が有する β -ブロッカーの冠動脈攣縮に対する悪影響を含めたとしても 49%も死亡率の低下を示した.

【結語】

日本人での虚血性心疾患に対する β -ブロッカー療法は冠動脈の攣縮を増やし生存率を悪化させると考えられていたが, 日本人でも心筋梗塞後の退院後の生存率を改善することが明らかになった.

審査の結果の要旨

本研究は新規な内容を含んでおり, 医学に資するところ大と考え, 学位に値すると判断された.

【1436】

氏 名 (本 籍) ^{もり} 森 ^{のぶ} 伸 ^お 生 (富山県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 乙 第 650 号

学位授与の日付 平成 18 年 12 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目

Development of a New Method for Diagnosis of Rubella Virus Infection by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification

論文審査委員 主査 (教授) 西山利正
(教授) 藤澤順一 (教授) 金子一成

論文内容の要旨

【研究目的】

風疹は小児の日常感染症の一つであり, 多くは後遺症を残さずに治癒する. 一方, 風疹ウイルスに対する免疫がない妊婦が, 妊娠初期に風疹に感染すると, 難聴, 白内障, 先天性心奇形などを合併した先天性風疹感染症・症候群 (以下, CRS) の児を出産する危険性がある. WHO は, 発展途上国を中心に毎年 100,000 例の CRS 症例が出生していると推測している. また, 43%の国で風疹ワクチンが定期接種に導入されておらず, 公衆衛生上の問題は大きい.

風疹と CRS は, 無症状感染例や典型的な症状を認めない例があり, 臨床症状だけでは診断が困難な時もある. 現在, 臨床現場で利用されている検査法には, ウイルス分離法, HI 法, EIA 法があるが, それぞれ問題がある. 検査法の向上は, 風疹と CRS の正確な診断に重要である. 我々は, 風疹ウイルス遺伝子を検出する遺伝子増幅検査法 (RT-LAMP 法) を開発し, RT-PCR 法とウイルス分離法と比較検討した.

【研究方法】

RT-LAMP 法の検出限界の感度について, 風疹ワクチン株 (高橋株) を用いて RT-PCR 法と比較した. 次に, 2004 年に風疹の流行があった栃木で得られた風疹罹患患者 9 人の検体を用いて, RT-LAMP 法, RT-PCR 法, ウイルス分離法を行い, 陽性率を比較した.

【結果】

風疹ワクチン（高橋株）ウイルスの培養液（感染価 $10^{-5.5}$ PFU/0.1 ml）200 μ l から抽出された RNA を 10 倍階段希釈し、その希釈溶液を用いて検出限界を測定した。RT-LAMP 法と RT-PCR 法ともに、 10^{-5} までは希釈された RNA 溶液での検出が可能であり、検出限界は 30 PFU/ml と推定された。

風疹と臨床診断された患者 9 人（0-8 歳、男 6 人女 3 人、風疹ワクチンは 8 人が未接種で、1 人は不明）から得られた検体で、RT-LAMP 法、RT-PCR 法、ウイルス分離法の検査を行った。風疹に対する IgM 抗体が 9 人中 4 人で測定され、4 人とも陽性であった。風疹ウイルスは 3 人（33.3%）で分離され、遺伝子は RT-PCR 法で 6 人（66.7%）、RT-LAMP 法で 7 人（77.8%）から検出された。風疹ウイルスが分離された 3 人からは、RT-PCR 法と RT-LAMP 法の両方で遺伝子が検出された。分離されなかった 6 人では、RT-PCR 法で 3 人、RT-LAMP 法で 4 人から検出された。2 人で 3 方法とも陰性であったが、そのうちの 1 人は風疹 IgM が陽性で、もう 1 人は検査診断された家族との接触があった。IgM 陽性であった 4 人中 3 人で RT-LAMP 法と RT-PCR 法で検出できた。そして、IgM の検査を受けていない 5 人中 4 人で検出された。

【考察】

ワクチン（高橋）株と近年に日本国内で分離された風疹ウイルスとともに、RT-LAMP 法で遺伝子の検出が可能であった。RT-LAMP 法では、30 PFU/ml の風疹ウイルスの遺伝子（RNA）の検出が可能で、RT-PCR 法と同等の感度であった。また、臨床診断された風疹患者 9 人から得られた検体で、ウイルス分離法と RT-PCR 法と比較し、同等以上の検出が可能であり、臨床現場での利用が期待される。RT-LAMP 法の手技は、ウイルス分離法や RT-PCR 法より、簡便で、かつ、迅速である。

RT-LAMP 法を用いた風疹の検査法の開発により、早期に正確な診断ができ、診断の誤分類（misclassification）の発生を抑制でき、検査診断の精度が向上される。集団発生の早期発見にも役立つため、CRS の排除に向けた風疹対策に貢献できる。

審査の結果の要旨

申請者は、風疹の流行や先天性風疹症候群撲滅を目的として、迅速かつ鋭敏な RT-LAMP 法（reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification）による風疹感染症診断法の確立を試み、従来法（RT-PCR、ウイルス分離）と比較検討の結果、臨床応用の期待できることを示した。

審査会では「RT-LAMP 法の理論」「検査の特異度」「早期診断の意義」や「ランニングコスト」などについて質問が出たが申請者は論理的に回答できていた。したがって十分、学位に値する研究と考えられた。

【1437】

氏 名（本 籍）^{ば でん てつ や}馬 殿 徹 也（兵庫県）

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 番 号 乙 第 651 号

学位授与の日付 平成 18 年 12 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

Sequential endoscopic findings and histological changes of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats

論文審査委員 主査（教授）岡崎和一
（教授）上山泰男 （教授）螺良愛郎

論文内容の要旨

食道癌の発生頻度や死亡率には地域差をみる。疫学的に地域差は遺伝的素因と言うよりも環境因子によると考えられており、なかでもニトロソ化合物は食道発癌の一つの重要な要因であることが実証されている。実験動物にも様々な種類のニトロソ化合物によって食道癌モデルは作製されているが、今回 N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA) によりラットに食道癌を誘発し、発癌過程を胆道ファイバーを用いて肉眼的に検索し、得られた内視鏡所見を病理組織像と対比した。方法としては F344/Jcl 雄ラットを用い、7 週齢より 15 週間にわたり DMSO に溶解した 0.5 mg/kg の NMBA を週 1 回、計 15 回皮下注射する群（24 匹）と、等量の DMSO を皮下注射した対照群（4 匹）を作製し

た。いずれの群も、7 週齢より隔週で食道内視鏡検査を行い、適宜生検および剖検を施行した。食道内視鏡所見は i) redness of mucosa, ii) loss of visible blood vessel network, iii) plaque, iv) smooth polyp, v) irregular polyp, vi) rough elevation の 6 つのカテゴリ分類を行い、病理組織像については i) blood vessel dilatation, ii) hyperkeratosis, iii) acanthosis, iv) papilloma, v) dysplastic papilloma, vi) carcinoma in situ, vii) invasive carcinoma の 7 つのカテゴリに分類し、経時的な進展を観察するとともに互いの所見の対応を行った。その結果、NMBA 処置ラットの食道内視鏡所見を経時的にみると、まず粘膜の充血を認め、その後充血が消失し、限局性もしくはびまん性に粘膜下の血管網が透見できなくなった。次いで plaque 様の限局した隆起を認め、隆起は高さを増し、楕円形で平滑なポリープや表面に不整を見るポリープとなり、やがて粗造な粘膜が確認された。食道の病理組織像を経時的にみると、まず粘膜下の血管拡張を認め、hyperkeratosis, acanthosis を経て異形成のない papilloma となる。さらに papilloma は異形成を獲得し、carcinoma in situ へと進み、粘膜の細胞は時間依存性に悪性化する事が認められた。さらに内視鏡所見を病理組織像を対応したところ、粘膜の発赤は粘膜下の血管拡張によるものであり、粘膜下の血管網の不透見性は hyperkeratosis によるものであり、plaque は上皮の肥厚に対応し、ポリープ形成は dysplastic papilloma, 粗造粘膜隆起は dysplastic polyp, carcinoma in situ や invasive carcinoma に対応していることが確認され、内視鏡所見と病理学的所見に相関をみた。よって、今回、小動物に対して経時的な内視鏡検査を可能とした。そして、内視鏡所見を 6 つのカテゴリに分類したところ、各々の内視鏡所見は組織像と対応をみた。従って、小動物に対しても低侵襲的に食道癌の進展過程が観察しうる。

審査の結果の要旨

化学発癌物質により誘発したラット食道癌モデルを作製して、食道扁平上皮癌の形成過程を経時的に内視鏡的に観察し、組織所見との対比を試みた実験的研究である。その結果、内視鏡的には経時的に粘膜の発赤、血管条の消失、ブランク形成、平滑なポリープ、不整を呈するポリープ、粗造な

隆起といった像が順次出現し、各の組織学的悪性進展経過と対応した。小動物を用いた食道癌形成過程の内視鏡的観察は今日までなされておらず、学位に値するものと評価された。

【1438】

氏名(本籍) 入澤 聡 (京都府)

学位の種類 博士(医学)

学位番号 乙 第 652 号

学位授与の日付 平成 19 年 1 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

Increased omega complexity and decreased microstate duration in non-medicated schizophrenic patients

論文審査委員 主査(教授) 玄番央恵
(教授) 日下博文 (教授) 木下利彦

論文内容の要旨

統合失調症は、思考障害、妄想、幻覚等の臨床症状を特徴とするが、これらは、統合失調症者に絶えず持続するのではなく、僅かな時間ごとに変化し、かつ、正常な思考と混在すると考えられている。このような臨床症状の不安定さは、統合失調症の診断や重症度の判定を困難にさせる一因となっている。思考障害のような、時々刻々と変化する障害を検証するには、高い時間解像能をもつ手段が有用である。脳波検査は、その意味において非常に優れた非侵襲的手法であり、その潜在能力は極めて高い。多誘導脳波記録は、様々な脳神経活動情報を含有することから、この電位情報の空間的特性を考慮した検証の有用性が提唱されている。多誘導脳波記録によって構成される脳電場の空間構造は、時々刻々と変化する脳機能状態を反映しており、その連続した電位図は、脳機能状態の空間的変動過程を描写している。Lehmann らは、このような多誘導から記録された電位情報の空間的および時間的特性を踏まえた評価の重要性を指摘している。本研究においては、未治療の統合失調症者の多誘導脳波記録を用いて、主に空間的特性を評価する global Omega complexity analysis

と時間的特性を重視する EEG microstate analysis の二手法を用いた。global Omega complexity analysis は、電位図を、電極数を次元とする状態空間における点の連続（軌道）として捉え直し、この軌道の形状を定量的に評価する指標である。これにより、脳機能状態の空間的変動過程は、軌道の複雑性を表す Omega Complexity (Ω)、電位情報を表わす Total Power (Σ)、周波数情報を表わす Generalized Frequency (Φ) により代表される。一方、頭皮上から記録される電位図は、一定の類似する電位構造が持続した後に急速な他の電位構造に変化する。このほぼ安定した電場構造が連続して出現する区間を、Lehmann らは脳の microstates と定義し、情報処理過程を担う電気的最小単位と考えた。EEG microstate analysis は、脳電位図の主成分およびクラスター解析により至適電位図とその数を決定し、各至適電位図の duration（持続時間）や occurrence（出現回数）を算出するものである。本研究の対象は、未治療の統合失調症者 24 名（男性 12 名、女性 12 名、平均年齢 25.3 ± 6.8 歳）と対照群 24 名（男性 12 名、女性 12 名、平均年齢 24.6 ± 5.6 歳）である。脳波記録は、頭皮上 19 部位（10/20 法）より導出し、視覚的にアーチファクトの混入しない安静覚醒閉眼時記録を 34.2 ± 8.6 秒選び、平均基準導出波形に変換した後、FFT-filter を通して解析に供した。global Omega complexity analysis の結果、統合失調症群の脳電位場において、 Ω は対照群に比して有意に高値を示した。また、 Φ は対照群に比して有意に低値、 Σ は有意に高値を示した。EEG microstate analysis では、統合失調症群で、左前—右後の方向性をもつ電位図の duration が有意に短縮していた。これらの結果は、統合失調症者の脳電位場の同期化の減少と神経活動の抑制、さらに、正常な情報処理の中断によって引き起こされる統合失調症者の逸脱した脳機能状態、すなわち、「脳神経活動の協調性や連結性の低下」、さらに「逸脱した情報処理過程」を示唆するものと考ええる。本研究は、包括的な空間的・時間的解析手法を組み合わせることにより、統合失調症者の脳機能に関する新たな知見を供したと考える。

審査の結果の要旨

本研究は、未治療統合失調症者の多誘導脳波記

録を、global Omega complexity analysis と EEG microstate analysis の二手法を用いて解析した。統合失調症者の脳電位場の同期化の減少と神経活動の抑制、さらに、正常な情報処理の中断によって引き起こされる統合失調症者の逸脱した脳機能状態を証明した点で、すぐれた研究であり、十分に学位に値するものと認められた。

【1439】

氏名（本籍）^{かり や しゅう じ}狩谷 秀 治（和歌山県）

学位の種類 博士（医学）

学位番号 乙 第 653 号

学位授与の日付 平成 19 年 1 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

COMPARISON OF PRIMARY PATENCY
IN CUTTING BALLOON ANGIOPLASTY
AND CONVENTIONAL BALLOON
ANGIOPLASTY FOR DIFFERENT TYPES
OF HEMODIALYSIS ACCESS STENOSIS

論文審査委員 主査（教授）岩坂壽二
（教授）今村洋二（教授）澤田 敏

論文内容の要旨

【研究目的】

慢性維持血液透析の長期化に伴ない透析アクセスの維持が困難になってきており経皮的血管形成術（PTA）によるアクセスの開存期間の延長は重要である。われわれは PTA にカッティングバルーンを使用することで PTA 後の開存率を改善できると考えた。この研究の目的はカッティングバルーン PTA と通常バルーン PTA を比較しカッティング PTA の開存率を評価することである。

【研究方法】

カッティングバルーン群は、2003 年 1 月から 9 月に PTA が適応となった全例にカッティングバルーンのみを使用して PTA を行い前向きに調査した（72 患者 87 狭窄、男性 32 人、女性 40 人、平均年齢 64.7 ± 9.9 歳）。通常バルーン群は、通常バルーンのみを使用した 2000 年 10 月から 2002 年 8 月に PTA が適応となった全症例（67 患者 98 狭

窄, 男性 32 人, 女性 35 人, 平均年齢 61.8 ± 10.6 歳) とした. すべての症例の観察期間は 450 日. 血管壁の構造の違いから自家静脈狭窄, 人工血管自家静脈吻合部狭窄, 人工血管内狭窄, ステンント内再狭窄の 4 タイプの狭窄に分類した. カプランマイヤー法による両群の一次開存率をログランクテストにて 4 タイプ別に比較した. また χ^2 テストまたはフィッシャーの直接法にて両群の開存率を 4 タイプ別に比較した.

【結果】

自家静脈狭窄ではカッティングバルーン群の 6ヶ月一次開存率はそれぞれ 84.6%であり, 通常バルーン群のそれは 55.0%であり, 両群に有意差はなかったが ($p=0.369$), 開存曲線上カッティングバルーン群の方が高く, さらに χ^2 テストでは 5, 6, 9ヶ月でカッティングバルーン群のほう有意に開存率は高かった ($p=0.016, 0.014, 0.003$). 人工血管自家静脈吻合部狭窄ではカッティングバルーン群の 6ヶ月一次開存率は 71.4%であり, 通常バルーン群の 6ヶ月一次開存率は 39.0%であり, カッティングバルーン群のほう有意に高かった. ($p=0.0394$). 人工血管内狭窄ではカッティングバルーン群の 6ヶ月一次開存率は 50.0%であり, 通常バルーン群の 6ヶ月一次開存率は 75.0%であり, 両群に有意差はなかった ($p=0.379$). ステンント内再狭窄ではカッティングバルーン群の 6ヶ月一次開存率は 30.0%であり, 通常バルーン群の 6ヶ月一次開存率は 57.1%であり, 両群に有意差はなかった ($p=0.923$).

【考察】

血管壁の脆弱な部分に過度な拡張力が加わり損傷を生じさせる通常バルーン PTA に比べ, カッティングバルーン PTA は, バルーンに装着したブレードが狭窄した血管壁に切痕を加え低圧で拡張するので血管壁の損傷が少なく慢性期での再狭窄が生じにくいとされる. われわれの結果でも人工血管自家静脈吻合部狭窄と自家静脈狭窄ではカッティングバルーン PTA のみで低圧にて拡張したほうが開存期間を長く保つ可能性を示した. しかし血管壁に人工物があるため脆弱な部分がないと考える人工血管内狭窄とステント内再狭窄では有意差はなかった. これらの狭窄では通常バルーン PTA にて高圧で拡張しても血管壁に人工物があるため脆弱な部分がなく損傷を免れ, むしろ狭窄の

原因である新生内膜を人工物構造とバルーンで高圧にて圧迫するほうが有利ではないかと考えた.

【結語】

人工血管自家静脈吻合部狭窄ではカッティングバルーン PTA のみを選択したほうが一次開存率は高かったが, 自家静脈狭窄, 人工血管内狭窄, ステンント内再狭窄では一次開存率に有意差は認めなかった.

審査の結果の要旨

本研究は人工透析時のシャント狭窄に対する治療方法をインターベンショナル ラジオロジーの観点から分析検討したもので, 結果的に人工血管自家静脈吻合部狭窄に対してはカッティングバルーンの有用性を示した. この研究結果は新しい知見を含んでいるのみならず, この分野の臨床研究を今後遂行する上での学問的一里塚としての価値が認められる. 学位に値する研究結果であると考えられた.

【1440】

氏 名 (本 籍) ^{おか} ^だ ^{とも} ^{ゆき} 岡 田 智 行 (広島県)
学 位 の 種 類 博士 (医学)
学 位 番 号 乙 第 654 号
学位授与の日付 平成 19 年 1 月 29 日
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目
Comparative immunobiology of thymic DC
mRNA in autoimmune-prone mice
論 文 審 査 委 員 主査 (教授) 福原資郎
(教授) 池原 進 (教授) 藺田精昭

論文内容の要旨

【はじめに】

New Zealand Black (NZB) マウスは, 自然発症自己免疫疾患モデルマウスとして知られている. NZB マウスにおける自己免疫疾患の発症機序は不明であるが, 胸腺上皮細胞の萎縮を含む胸腺の異常が加齢に伴い発生することが報告されている. 胸腺の樹状細胞 (Dendritic cell : DC) は, 自己反応性 T 細胞の除去, いわゆる “Negative Selection”

における自己抗原提示細胞として働いており、自己免疫疾患の発症に関与することが推測される。これまで我々は、自己免疫疾患マウスの胸腺 DC の異常を検出するために、NZB マウスの胸腺 DC についてチロシンキナーゼ（増殖や分化などの細胞機能に関与する）の遺伝子発現プロファイルを解析し、NZB マウスの胸腺 DC では、*c-met* チロシンキナーゼの遺伝子発現量が正常マウスに比べて亢進していることを見出した。（Okada T, et al. Dev Immunol, 9: 29-34, 2002）

今回、他の自己免疫疾患マウスでも、NZB マウスと同様に胸腺 DC の異常があるのではないかと考え、以下の実験を行った。

【研究方法】

- ① NZB マウスの胸腺 DC における *c-met* mRNA の発現量の亢進が胸腺組織に特異的であるかを検討するために、4 週齢の NZB と正常 BALB/c マウスの胸腺と脾臓の *c-met* の mRNA レベルをリアルタイム PCR で測定した。
- ② 他の自己免疫疾患マウスでも胸腺 DC における *c-met* mRNA の発現量の亢進が検出されるかを検討するために、4 週齢の MRL/*lpr*, NZB X NZW F1 (B/WF1), BXSb-*Yaa*, NOD マウスの胸腺 DC の *c-met* mRNA レベルをリアルタイム PCR で測定した。胸腺と脾臓 DC を対照として用いた。
- ③ 自己免疫疾患マウスの胸腺 DC における *c-met* mRNA の発現量の亢進が、*c-met* の下流にある E-cadherin（細胞間の接着に関与する）の発現に関与するかを明らかにするために、*E-cadherin* mRNA の発現量をリアルタイム PCR で測定した。
- ④ 自己免疫疾患マウスの胸腺 DC における *c-met* mRNA の発現量の亢進が、胸腺ストローマ細胞における肝細胞増殖因子（HGF : *c-met* のリガンド）の発現と関連するかを明らかにするために、胸腺ストローマ細胞の *HGF* mRNA レベルをリアルタイム PCR で測定した。胸腺ストローマ細胞は、胸腺細胞を 2 週間培養し、フラスコに付着した細胞を使用した。

【結果】

- ① 胸腺と脾臓における *c-met* mRNA レベルは BALB/c と NZB マウス間で差が認められなかった。

② 一方、自己免疫疾患マウスの胸腺 DC においては、*c-met* mRNA レベルの発現亢進が共通に認められた。一方、自己免疫疾患マウスの胸腺と脾臓 DC においては、正常マウスに比べて *c-met* mRNA レベルの差は認められず、*c-met* mRNA レベルの亢進は胸腺 DC に特異的な現象と考えられた。

③ 自己免疫疾患マウスの胸腺 DC において、*E-cadherin* mRNA レベルの低下が認められた。

④ 自己免疫疾患マウスの胸腺ストローマ細胞における *HGF* mRNA レベルは、正常マウスと差が認められなかった。

【考察】

注目すべき発見は胸腺 DC における *c-met* mRNA の発現量の亢進は自己免疫疾患を自然発症するマウスで共通に認められたことである。また、*c-met* の下流に位置する E-cadherin（細胞間の接着に関与する）の発現量低下も観察されたことから、自己免疫疾患マウスの胸腺 DC における *c-met* mRNA の発現量の亢進が、胸腺内における細胞教育の異常（胸腺 DC と T 細胞の相互作用の低下）に関与する可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は、自己免疫疾患自然発症モデルマウスの共通の異常として、胸腺樹状細胞（DC）の mRNA の発現量が亢進し、E-cadherin の発現量が低下していることを見出した。これは、胸腺内での DC と T 細胞の interaction が低下することにより、negative selection の異常が惹起される可能性があり、自己免疫疾患の病因を明らかにする上で、重要な研究として充分学位に値するものとして評価された。

【1441】

氏 名 (本 籍) 張 玉 明 (中国)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 番 号 乙 第 655 号

学位授与の日付 平成 19 年 1 月 29 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目

Simultaneous Injection of Bone Marrow Cells
and Stromal Cells into Bone Marrow

Accelerates Hematopoiesis In Vivo

論文審査委員 主査 (教授) 藺田精昭

(教授) 福原資郎 (教授) 池原 進

論文内容の要旨

【はじめに】

造血系細胞には、赤血球、白血球、血小板を作る巨核球などがあり、これらは造血幹細胞から分化・増殖するが、この分化・増殖に骨髓ストローマ細胞は不可欠の存在である。骨髓ストローマ細胞は、造血幹細胞と cell-to-cell contact を行い、造血幹細胞の維持、また成熟した造血系細胞を生涯にわたり安定して供給し続けるために働いている。我々は、以前骨髓ストローマ細胞と造血系細胞の MHC が一致した方が、一致しないより、造血が促進されることを報告した (Stem Cells 15; 461: 1997, Stem Cells 19; 46: 2001, Blood 89; 49: 1997)。また、最近、骨髓移植に際して、ドナーの骨髓細胞を骨髓内に投与 (Intra-bone marrow-bone marrow transplantation: IBM-BMT) した方が、静脈内に投与するより、ドナー由来の造血が促進されることを報告した (Blood 97; 3292: 2001)。今回の研究では、骨髓ストローマ細胞をドナー骨髓細胞と共に骨髓内に移植し、ドナーの造血細胞に対する作用を検討した。

【研究方法】ならびに【結果】

まず、C57BL/6 由来の骨髓ストローマ細胞である PA6 を用いて実験を行った。ドナーを C57BL/6(H-2^b) としレシピエントを C3H(H-2^k) とする同種移植において day 12 の CFU-S のコロニーの形成能の検討を行った。PA6 (1×10^5) と骨髓細胞 (1×10^5) を、致死量の放射線照射を行った C3H マウスに、それぞれ単独あるいは、混合して、静

脈内または骨髓内に投与した。ストローマ細胞 (PA6) と骨髓細胞を同じ骨の骨髓内に移植した場合 [IBM-(PA6+BMCs)] には、骨髓細胞のみを移植した場合 [IBM-BMCs] や PA6 と骨髓細胞を静脈内に投与した群 [IV-(PA6+BMCs)] と比較して、有意に多数のコロニーの形成が認められた。また、移植後 12 日の末梢血で比較しても、白血球数、赤血球数、血小板数いずれも、[IBM-(PA6+BMCs)] は [IBM-BMCs] や [IV-(PA6+BMCs)] と比較して増加していた。また、増加している白血球中でのドナー由来細胞の割合を検討すると、[IBM-(PA6+BMCs)] では [IBM-BMCs] や [IV-(PA6+BMCs)] と比較して増加が認められた。また、同様の移植を行い、生存率の検討を行ったところ、[IBM-BMCs] や [IV-(PA6+BMCs)] では 25 日以内に全例死亡したが、[IBM-(PA6+BMCs)] では 60% が 60 日以上生存した。この現象は、移植後、ドナー骨髓細胞が早期に造血を回復することによると考えられた。

以上の結果をふまえて、細胞株である PA6 に替えて培養により増殖させた骨髓ストローマ細胞と骨髓細胞を共に同種骨髓内骨髓移植を行った。C57BL/6 マウスの骨髓を in vitro で培養することにより骨髓ストローマ細胞を増殖させ、これを C57BL/6 マウスから得られた骨髓細胞と共に前日に致死量の放射線照射を行った C3H マウスに移植した。ストローマ細胞と骨髓細胞を同時に同じ骨の骨髓に移植した群では、骨髓細胞のみを移植した群やストローマ細胞と骨髓細胞を静脈内に投与した群と比較して、より多くの day 12 CFU-S の形成が認められた。よって、細胞株のみならず、培養によって増殖させたストローマ細胞も骨髓細胞との同時骨髓移植により、ドナーの造血を促進出来ることが明らかとなった。

【結語】

骨髓内骨髓移植は、ドナーの骨髓細胞をレシピエントの骨髓内に投与する骨髓移植法で、ドナー造血細胞の早期造血の回復が望め、GvHD の発症も抑制出来る方法であるが、さらに同じドナーから前もって、骨髓を得て培養によってストローマ細胞を増殖させ、同時に同じ骨髓内に移植することで、さらにドナーの造血を促進させうることが明らかとなった。

審査の結果の要旨

本研究は、骨髓内骨髓移植の際に、前もって培養により増殖させておいた、ドナーの骨髓ストローマ細胞を補充することによって、造血能の回復を促進し、生着率、生存率を高めることをマウスで証明したもので、将来、ヒトへの応用にも役立つ、大変重要な研究として充分学位に値するものとして評価された。

投 稿 規 定

1. 投稿者は原則として会員に限る。ただし原稿の採否および会員以外の投稿については編集委員に委任する。
2. 原稿の内容は総説・原著・臨床・症例・経験・速報・業績抄録・寄稿・その他とし特に紙数を制限しない。
3. 原稿は他の雑誌などに未掲載のものに限る。
4. 投稿論文の採否・掲載順位・印刷方法・体裁は編集委員会において決定する。
5. 原著・臨床・症例・経験については必ず欧文抄録を添付する。その他の原稿についても編集委員が必要と認めた場合は欧文抄録の提出を依頼することがある。
6. 原稿の執筆はつぎの要領に従う。
 - a. 原稿は青または黒で楷書、横書きとし、常用漢字、新かなづかいを用いる。欧語はすべて活字体とし、日本語で書く場合にはかたかなを用いる。
 - b. ワードプロセッサを使用する場合は、B5 または A4 の大きさの用紙に字間および行間をあけて 20 字 × 20 行で記すこと。
 - c. 論文の記載順序は①表題②著者名③所属④内容要旨 (600 字以内) ⑤ Key Words (5 語以内) ⑥ 本文 (原著の場合は原則として緒言・材料と方法・成績・考察・結論の順) ⑦文献⑧図表およびその説明⑨英文抄録とする。
 - d. 学術用語、諸単位は各学会所定のものに従い、数字は算用数字、数量の単位は下記による。
m, cm, mm, l, ml, kg, g, °C, % など。
 - e. 表・図・写真などは鮮明なものでなければならない。その種類別の一連番号を記入する。
表・図・写真は別紙に記入もしくは貼付し、説明をつけて本文原稿の最後にまとめる。アート紙希望のものはその旨記入する。本文の欄外にそれらの挿入箇所を指定する。
 - f. 引用文献は最後に一括し、下の順序に従って書く。
雑誌については、
著者名 (共著者の場合は全名を記載する) :

表題、雑誌名 (正規の略名) 巻数 : 初頁—終頁、西暦年次、とする。

例 藤田達士 : 細胞外液をめぐる諸問題。麻酔, 17 : 1108-1119, 1968.

例 Magoun, H. W.: The ascending reticular activating system. Res Ass Nerv ment Dis, 30: 480-492, 1951.

単行本については、

著者名 : 表題、書名 (編者名)、版数、巻数、発行社名、発行地名、初頁—終頁、西暦年次、とする。

例 木村 淳 : 神経刺激法と誘発電位。誘発電位と筋電図—理論と応用、医学書院、東京、pp 115-219, 1990.

例 Marty, A. and Neher, E.: Tight-seal whole—cell recording. Single—Channel Recording (Sakmann, B. and Neher, E. eds.), Plenum Press, New York, pp 107-122, 1983.

g. 英文抄録の記載順序は、表題、氏名、所属、内容要旨 (500 語以内) とする。英文は専門的知識のある人の校正を経たものでなければならない。

7. 原稿の提出は編集委員宛とし、受付順に掲載するのを原則とする。

8. 原稿は原著3部、その他の論文は2部を提出する。

9. 著者による校正は原則として2回とする。校正に際して組版面積に影響を与える改変や極端な組替えは許されない。

10. 原稿の届け先は下記とする。

〒 570-8506 大阪府守口市文園町 10 番 15 号

関西医科大学内

関西医科大学医学会編集委員会宛

電話 (06) 6992-1001 (大代表)

掲載料について

原著及び症例報告等の投稿については、投稿料が必要であるが、その他のものについては原則として無料とする。

1. 和文普通組、欧文、文献組、組表、トレース、凸版、写真版 (カラーを含む) 等はすべて時価 (実費負担) とする。

2. 別刷は 30 部まで贈呈、それ以上は実費負担。

3. 学内会員については、各頁につき、和文 500 円、欧文 800 円の割引を行う。

平成 19 年度予算

収入の部	
科 目	予 算 額
前年度繰越金	7,301,477 円
会 費	1,500,000 "
投 稿 料	120,000 "
広 告 料	396,000 "
預 金 利 息	769 "
大学補助金	950,000 "
寄 付 金	500,000 "
雑 収 入	0 "
収 入 合 計	10,768,246 円

支出の部	
科 目	予 算 額
印刷製本費	9,068,246 円
通信運搬費	400,000 "
消 耗 品 費	300,000 "
会 合 費	500,000 "
雑 費	500,000 "
支 出 合 計	10,768,246 円
収 支 差 引 残	0 円

平成 18 年度決算

収入の部		
科 目	予 算	決 算
前年度繰越金	12,077,100 円	12,077,100 円
会 費	1,650,000 "	1,734,000 "
投 稿 料	120,000 "	131,972 "
広 告 料	396,000 "	396,000 "
預 金 利 息	769 "	4,312 "
大学補助金	950,000 "	950,000 "
寄 付 金	500,000 "	500,000 "
雑 収 入	0 "	471 "
収 入 合 計	15,693,869 円	15,793,855 円

支出の部		
科 目	予 算	決 算
印刷製本費	13,993,869 円	2,241,750 円
通信運搬費	400,000 "	188,140 "
消 耗 品 費	300,000 "	312,488 "
会 合 費	500,000 "	0 "
雑 費	500,000 "	5,750,000 "
小 計	15,693,869 "	8,492,378 "
次年度繰越金		7,301,477 "
支 出 合 計	15,693,869 "	15,793,855 "
収 支 差 引 残	0 円	0 円

編 集 委 員 (ABC 順)

足立 靖, 藤澤 順一, 稲葉 宗夫, 稲垣 隆介,
木下 利彦, 中井 吉英, 緒方奈保子, 岡崎 和一,
高屋 淳二, 螺良 愛郎, 山田 久夫, 山内 康雄
会費 年間 3,000 円

関 西 医 科 大 学 雑 誌

第 59 卷 第 2, 3, 4 合併号

平成 20 年 1 月 28 日印刷

平成 20 年 1 月 31 日発行

編 集 発 行 所

〒570-8506 大阪府守口市文園町 10 番 15 号

関西医科大学医学会

TEL 06-6992-1001 内 2216

FAX 06-6992-1409

igakkai@takii.kmu.ac.jp

<http://www3.kmu.ac.jp/igakukai/>

印刷：中西印刷株式会社

〒602-8048 京都市上京区下立売通小川東入

TEL 075-441-3155 (代)

FAX 075-417-2050

<http://www.nacos.com/nakanishi>