

日本大学医学部 総合医学研究所紀要

Bulletin of The Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine

Vol.2 / December 2014

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

日本大学医学部総合医学研究所紀要の発行にあたって

今年度の「日本大学医学部総合医学研究所紀要」を発行する運びとなりました。この紀要は、医学に関する学理・技術の総合的研究の実践結果について、その諸報告及び成果等の外部情報発信を主たる目的とし、社会の要請に対応することに努めることを目指しています。本紀要に掲載されている内容は、日本大学医学部総合医学研究所のみならず、日本大学医学部又は日本大学全体で行われている各研究の一端でもあります。全ての研究を紹介するのは難しいことですが、この紀要を通じて日本大学医学部で推進されている研究を、一人でも多くの皆様に知っていただければ幸いです。

現在、この紀要は、ホームページ上で公開する形態をとっています。また、各原稿は、執筆者や著者の責任の下、基本的に査読を行わず、編集委員による体裁確認を経ることとしています。執筆いただいた関係者の皆様にお礼を申し上げます。

今後も、研究所として社会からの要請やニーズに応えられるよう努めてまいります。この紀要が日本大学医学部における研究内容の発信、また、更なる研究の発展に寄与することを期待しています。

日本大学医学部総合医学研究所長 照井 正

目 次

HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み機序の解明と肝癌発生に与える影響の解明	松岡俊一 他	1
低温大気圧プラズマ技術を用いた癌治療法の開発	相馬正義 他	9
関節リウマチおよび慢性蕁麻疹におけるマスト細胞を標的とした新規治療法の確立	岡山吉道 他	15
HIV 感染したベトナム小児患者血清における		
クラミジア・ニューモニエ抗体陽性率について	Trinh Duy Quang 他	28
低酸素下運動後の圧受容器反射機能の変化	柳田 亮 他	31
TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミドによる肝癌治療法の開発	高山忠利 他	33
「地震後めまい症候群」に関する研究	野村泰之 他	36
医療業務の効率性と医療情報の信頼性向上のためのシステム開発	和久井真司 他	39
有棘細胞癌の発生・進展におけるエストロゲン受容体 β の役割の解明	篠島由一 他	43
脱分化脂肪細胞の誘導及び維持における $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 の効果	槇島 誠 他	46
自己炎症性症候群マウスモデルにおけるマスト細胞活性化機構の解明	布村 聡 他	48
肺癌の個別化治療のための肺生検からの遺伝子学的多様性解析	辻野一郎 他	50
肝癌における B 型肝炎ウイルス遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式の解明	楡井和重 他	53
肝癌治療ガイドラインに向けた周術期管理基準の策定	山崎慎太郎	58
肝免疫系細胞における脂質代謝及び自然免疫調節機構に対する		
核内受容体 LXR の影響	梅田 (遠藤) 香織 他	61
二酸化炭素散布および純酸素投与による弁膜症手術における空気塞栓予防の検討	吉武 勇 他	63
高脂肪食がブタ心房筋の電気的、構造的リモデリングに及ぼす影響	奥村恭男 他	66
Holter 心電図を用いた心臓健常者における加算平均心電図の日内変動と自律神経活動との関連	橋本賢一 他	70
インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の機序と		
呼吸器疾患重症化の病態の解明	山本樹生 他	73
ゲノム化学に基づく先進医療開発研究		
抗腫瘍効果を持つピロール・イミダゾール・ポリアミドの開発	相馬正義 他	77
脳脊髄刺激療法を用いた運動麻痺の治療	山本隆充 他	81
プロテオミクス・ゲノミクス・臨床データベースを組み合わせた疾患マーカーの探索	中山智祥 他	87
ラジオアイソトープ・環境保全系による医学研究支援の現状	佐貫榮一 他	90
冠動脈起始異常を示すブタとの遭遇について	谷口由樹 他	92
脳卒中後疼痛に対する大脳皮質運動野の経頭蓋磁気刺激の効果		
ドラッグチャレンジテストとの比較から	山本隆充 他	98
医学部研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧		104

INDEX

Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC	Shunichi MATSUOKA et. al	1
Development of anti-cancer therapy using non-thermal atmospheric pressure plasma	Masayoshi SOMA et. al	9
Establishment of new therapy which targets mast cells		
in rheumatoid arthritis and chronic urticaria	Yoshimichi OKAYAMA et. al	15
Seroprevalence of <i>Chlamydophila pneumoniae</i> in HIV-infected children in Vietnam	Trinh Duy Quang et. al	28
Changes of cardiac baroreflex after normobaric hypoxic exercise	Ryo YANAGIDA et. al	31
Development of PI polyamide targeting TGF- β 1 for liver cancer treatment	Tadatoshi TAKAYAMA et. al	33
Study of Post Earthquake Dizziness Syndrome	Yasuyuki NOMURA et. al	36
The system development for improving reliability of medical data		
and efficiency of medical work	Shinji WAKUI et. al	39
Analysis of the role of estrogen receptor β in the development		
and progression of cutaneous squamous cell carcinoma	Yui SHINOJIMA et. al	43
Effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D ₃ on induction		
and maintenance of mouse dedifferentiated fat cells	Makoto MAKISHIMA et. al	46
Elucidation of the mechanism for mast cell activation in a mouse model of		
auto-inflammatory disease	Satoshi NUNOMURA et. al	48
Analysis of the genetic polymorphism from lung biopsy to decide personalized therapy	Ichiro TSUJINO et. al	50
Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC	Kazushige NIREI et. al	53
Management criteria for postoperative management of hepatocellular carcinoma	Shintaro YAMAZAKI	58
Effects of liver X receptor on regulation of lipid metabolism		
and innate immune responses in hepatic mononuclear cells	Kaori ENDO-UMEDA et. al	61
Prevention of air microemboli during heart valve surgery combination with CO ₂ insufflation		
and hyperbaric oxygen therapy	Isamu YOSHITAKE et. al	63
Impact of Hyperlipidemia on Atrial Electrical		
and Structural Remodeling of Atrial Fibrillation	Yasuo OKUMURA et. al	66
Circadian variation of late potentials and association with autonomic nerve system		
in normal heart subjects using Holter ambulatory electrocardiogram	Kenichi HASHIMOTO et. al	70
Study on the mechanism of exaggeration by both influenza virus and oral/respiratory tract bacteria		
and the pathogenesis of exaggeration for respiratory disease	Tatsuo YAMAMOTO et. al	73
Researches to develop advanced medicines based on the chemical genomics :		
Development of pyrrole imidazole polyamides with anti-tumor activity	Masayoshi SOMA et. al	77
Cerebrospinal stimulation therapy for motor weakness	Takamitsu YAMAMOTO et. al	81
Searching for the markers of diseases by the combination of proteomics,		
genomics and clinical database	Tomohiro NAKAYAMA et. al	87
Medical Research Activities Supported by the Section of Radioisotope		
and Environmental Conservation	Eiichi SANUKI et. al	90
Medical Research Activities Supported by the Section of Laboratory Animals For		
Anomalous coronary arteries pigs found during the experiment	Yoshiki TANIGUCHI et. al	92
rTMS of the motor cortex in post-stroke pain patients:		
comparison with results of the drug challenge test	Takamitsu YAMAMOTO et. al	98
Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center		104

HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み機序の解明と 肝癌発生に与える影響の解明

松岡俊一¹⁾, 森山光彦¹⁾, 浅井 聡²⁾, 黒田和道³⁾
吉宗一晃⁴⁾, 田村彰教¹⁾

Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC

Shunichi MATSUOKA¹⁾, Mitsuhiko MORIYAMA¹⁾, Satoshi ASAI²⁾, Kazumichi KURODA³⁾,
Hideki KOHNO⁴⁾, Akinori TAMAURA¹⁾

要旨

肝癌 (HCC) における HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式について検索した。本年度の研究には、Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH) 法を用いて、HBs 抗原陽性 (B 型) および HCV 抗体陽性 (C 型) および非 B 非 C 型 (NBNC 型) HCC 例の末梢血リンパ球より、HBV ゲノムのヒトゲノムへの組み込みの有無と、組み込み様式の特徴について検索した。対象は、2011 年より肝細胞癌の診断にて当院にて治療を行い検体使用の許諾を得た、B 型 4 例および C 型 18 例、NBNC 型 16 例の計 38 例である。これらの症例の末梢血リンパ球を用いて、前年度に作製した probe を用いて FISH 法を行い、この結果、子 B 型では 4 例全例に HBV ゲノムの組み込みを示す蛍光を認め、C 型では 18 例中 14 例に、NBNC 型では 16 例全例に蛍光を認めた。比較的 hot spot に近い部位を認めたが、ideogram の解析からは、HBV ゲノムの同一の組み込み部位は認められず、HBV ゲノムのヒト染色体上への組み込み部位はランダムであった。一方 C 型および NBNC 型においても、HBs 抗原陽性例と同様に、末梢血リンパ球からも多数の HBV genome のヒト染色体への組み込みが認められたが、同様に同一の特定部位への HBV ゲノムの組み込みは確定されなかった。以上より、FISH 法を用いて B 型 HCC 例の末梢血リンパ球より、HBV ゲノムのヒト染色体上への組み込みを検出した。一方 C 型および NBNC 型 HCC においても、HBV ゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認したことより、C 型慢性肝炎・肝硬変からの HCC 発生および原因不明の HCC 例には、HBV が関与していることも考慮すべきであることが示唆された。

1. はじめに

わが国における原発性肝細胞癌 (HCC) 死亡は年間 3 万人を超え、治療法の進歩により 5 年生存率は向上しているが、高い再発率を背景としてどのような治療法を選択しても疾患死亡率は 80% を超えている。したがって肝癌発生予知・抑止は重要な課題である。現在までのところ、肝癌発生に関与している遺伝子や SNPs は多数報告されているが、いずれも確定的とされる原因遺伝子や SNP は今のところ確認されていない。我々は、以前より HBV 感染が肝癌発生に重要な影響を与えていることを報告してきた¹⁾。肝癌における HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については、様々な検討が現在ま

でなされてきた。最近では Alu-PCR 法を用いた C 型 HCC 例における HBV ゲノムの組み込みの検出や、B 型 HCC 例の癌部および非癌部組織より、次世代高速シーケンサーを用いた全ヒトゲノム解析より HBV ゲノムの組み込み様式の報告が為されてきている^{2,5)}。しかしながら、今のところ特徴的な HBV ゲノムの組み込み様式は確定されていない。HBx 部位の組み込み頻度が高く、またヒトゲノムでは teromerase 領域への組み込み頻度が比較的高いことなどが報告されているにすぎない。

一般的には、現状では、HBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込み形式は、ランダムであり特定の部位への組み込みは乏しいとされている。

1) 内科学系消化器肝臓内科学分野

2) 生体機能医学系薬理学分野

3) 病態病理学系微生物学分野

4) 生産工学部応用分子化学科

松岡俊一: matsuoaka.shunichi@nihon-u.ac.jp

一方HCV関連肝癌においては、その血中よりHBV DNAが検出されるOccult HBV感染が危険因子であることが既に報告されている。我々は既に、このOccult HBV感染がHCV関連肝癌発生の原因のひとつであることを報告している⁶⁾。またmurakami²⁾らも、肝がん例の組織よりAlu-PCR法を用いて、HBVゲノムの組み込みが認められることを報告している。

本研究では、申請者がこれまで長年にわたり蓄積してきた肝癌発生に関する研究、HCVとHBVの感染研究の成果に立脚し、肝癌発生に関与しているHBVゲノムのヒトゲノムへの組み込み様式とその部位をFISH法を用いて検討し、新しい肝癌発生の予知・予防の方法論を確立して、臨床に応用可能な基盤的知見を得ることを本研究の目的とする。

本研究により、肝癌におけるHBV遺伝子の組み込み部位を確定し、簡便な検出法を開発することに成功すれば、肝癌発生にHBV感染が関与していることを証明することが可能である。現状では肝癌発生の原因は確定されておらず、HBV感染が背景因子にかかわらず肝癌発生の原因のひとつとして確認することができればユニバーサルワクチネーションをより強力に推進することが可能となり、今後の本邦における肝癌発生の予防・抑止に果たす効果は絶大なものがある。

2. 対象および方法

本研究は、平成24年度より25年度までの2ヵ年計画である。平成24年度には、(1) まず慢性肝炎および肝硬変例の血中より高頻度にHBV DNAを検出し得るprimer setsを用いたPCR法にてHBV DNAを検出して、Occult HBV症例の頻度を検索した。さらに、(2) この結果を基にして、Occult HBV関連肝癌症例の血中ないしは肝組織より同様にOccult HBV症例の頻度を検索した。(3) このうちHBV DNA検出例について、3.2kbの全塩基配列を増幅できるPCR法を開発してその全塩基配列を決定しえた。(4) 手術切除した肝細胞癌症例の肝組織より、HBV DNAとcccDNAをPCR法にて検出しHBVの関与を検索した。ここまでは平成24年度成果として、日本大学紀要に、「肝癌におけるB型肝炎ウイルス遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式の解明」として報告した。

本年度については、以下のごとく研究を中心におこなった。

- (1) HBV関連肝癌発生例のヒト遺伝子へのHBV遺伝子の組み込みの検出を、PCR産物をprobeとしたFISH法を用いて検討する。
- (2) この結果に立脚して次にC型HCCにおけるHBVゲノムのヒト遺伝子への組み込みの有無を、B型HCCと同様にFISH法にて検出する。
- (3) NBNC型HCCにおけるHBVゲノムのヒト遺伝子への組み込みの有無を、同様にFISH法にて検出する。
- (4) 次世代高速シーケンサーを用いたヒトゲノム解析

2症例について患者の同意を得て、末梢血リンパ球より次世代高速シーケンサーを用いて、ヒト全ゲノムの解析を行った。試薬類にかかるコストと委託費用などを勘案して、paired endで10 foldのシーケンスを施行した。次世代高速シーケンサー (Illumine Hisex2000) のランの委託は、実績のある北海道システム・サイエンス社に委託した。

研究対象と方法を以下に示す。

- 1) B型、C型およびNBNC型HCC例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出

B型、C型およびNBNC型HCC例のヒト染色体へのHBV遺伝子の組み込みの検出を、患者末梢血リンパ球を用いたFISH法にて検出した。

対象は、2011年1月より当院消化器外科および消化器内科にて血管造影を施行してHCCと診断された症例である。このうちFISH法施行の同意が得られたB型HCC4例、C型HCC18例、NBNC型HCC16例である。

これらの症例より末梢血10mlをヘパリン添加採血した。その後直ちにリンパ球を分離した。

- B型HCC4例については10mlをFISH法に使用した。

残りの血液5mlよりDNAを抽出して、HBV全長の3.2kbpを増幅させるPCR法を行った。この結果、3例に3.2kbpの増幅が得られた。この3例のPCR産物を精製してFISH法のprobeとして使

用した。さらに精製したprobeを用いて試験的にFISHを行い、最もバックグラウンドの少なかった38Tをprobeとして用いて以下のFISH実験に使用した。

尚、分子系統樹解析では、38T株はHBV genotype Cに分類された。

また検索した細胞数は各症例ともに20細胞である。

1. HBVの組み込みの検出

- 1) 採取したヘパリン加全血10mlを用いて行う。
- 2) 血球を分離してプレパラート上に薄層に添付する。
- 3) このプレパラートを用いて、Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH) 法により、染色体上へのHBVの組み込みの検出を行う。
- 4) B型肝炎患者さんの血清よりPCRにてHBV全長を増幅する。
- 5) このPCR産物よりprobeを作製する。DNA濃度を $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整して $20\mu\text{g}$ をprobeとして使用する。

2. 染色体解析用固定細胞作製

<試薬>

コルセミド溶液：ナカライ09356-74など、低張液：0.075M KClなど、固定液：メタノール：酢酸＝3：1、用時調製

<染色体標本作成>

- 1) 浮遊細胞の場合10ml程度の培地で、附着細胞の場合10cmのDishで継代後しばらく培養する。
- 2) 対数増殖期の細胞に $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにコルセミドを添加し、適当時間培養を継続する。
- 3) コルセミド処理をした細胞浮遊液を15mlチューブに回収し、1200rpmで5分間遠心して細胞をみつめ、上清を捨てる。コルセミド処理時間に影響するので迅速に行う。
- 4) 細胞にパスツールピペットで少量の低張液を加え静かにピペティングして細胞を分散させる。細胞が分散したらさらに1.5mlまで低張液を加え、ピペティングにより再度細胞を分散させる。室温に20分間放置して低張処理をおこなう。

5) 総量が10ml程度になるようにゆっくりと固定液を加える。

6) 静かに全体をパスツールピペットで攪拌し細胞を固定する。

7) 1200rpmで5分間遠心し上清をすて、新たな固定液を数滴加え、ピペティングにより細胞を分散させる。さらに10ml程度の固定液を加え全体を攪拌する。この作業をさらに2回行い完全に固定する。

8) 固定が完了したらチューブを固定液で満たし、 -20°C で保存。

3. 固定細胞FISHプロトコール

<試薬>

FISHプローブ、ホルムアミド、エタノール

<細胞の変性処理>

1. 細胞標本を 70°C ホットプレート上で2時間ハードニング
2. 70°C の70%ホルムアミド/2×SSC中2分間変性処理
3. 氷冷した70%エタノールに5分浸漬
4. 別の70%エタノールで洗った後100%エタノールに5分浸漬
5. 風乾もしくは 37°C インキュベーターで乾燥

<プローブの変性処理>

6. 1スライドあたり $10\mu\text{l}$ のプローブをチューブに入れ 75°C で10分変性
7. 5分以上氷冷

<ハイブリダイゼーション>

8. 細胞標本にプローブをアプライしカバーガラスをかける
9. 37°C で必要時間ハイブリダイズ

<洗浄・検出(ダイレクト蛍光標識プローブの場合)>

10. 2×SSC中5分浸漬しカバーガラスを静かにはずす
11. 37°C の50%ホルムアミド/2×SSC中20分浸漬
12. 1×SSCですすいだ後1×SSC中15分浸漬

<洗浄・検出(ハプテン標識プローブの場合)>

- i. 1% BSA / 4×SSC溶液で希釈した抗体を $100\mu\text{l}$ アプライしパラフィルムでカバーする
- ii. 37°C で1時間反応

iii.0.1% Nonidet P-40 (0.05% Tween20) / 4×
SSC で 10分 × 2回, 4×SSC で 10分 × 1回
洗浄

13. DAPI 染色後マウント
14. 蛍光観察

3. 結果

(1) probe に使用した 38T の全塩基配列を Fig.1 に提示する。

(2) HBs 抗原陽性肝細胞癌例のヒト染色体への HBV 遺伝子の組み込みの検出

1) Fig. 2 に case 1 の 1細胞あたりの Ideogram と 12細胞分の解析結果の Karyogram を提示する。染色体上に HBV ゲノムの組み込みを示す蛍光を提示する (矢印)。この結果, B 型肝細胞癌例 4例全例に, ヒトゲノムへの HBV ゲノムの組み込みを確認した。

Fig. 3 に 4 症例各々 12細胞分の karyogram のまとめを提示する。同一染色体上のほぼ同一部位に HBV ゲノムの組み込みを認めた。しかしながら大多数は 4 細胞以下であり, ヒト染色体上への特徴的な組み込み部位は認められず, ラ

ンダムに HBV ゲノムの組み込みがあることが確認された。

これらの検索結果をまとめると, HBV ゲノムはヒト染色体へ多数の組み込みが認められた。しかしながら, 特定の部位への組み込みの集積, いわゆる hot spot は認められず, HBV ゲノムの組み込みはランダムであった。現在さらに詳細なる検索・検討中である。現在までに得られた結果をまとめると, 1q32 (13), 2q36 (10), 3q24 (11), 6q22 (10), 9p21 (11), 14q31 (10), 15q21 (11) などに比較的多数の HBV ゲノムの組み込みが認められている。

(3) HCV 抗体陽性 HCC 例のリンパ球からのヒト染色体上の HBV ゲノムの組み込みの検出

Fig. 4 に case 5 の 1細胞あたりの Ideogram と 12細胞分の解析結果の Karyogram を提示する。染色体上に HBV ゲノムの組み込みを示す蛍光を提示する (矢印)。この結果, C 型肝細胞癌例 10例全例に, ヒトゲノムへの HBV ゲノムの組み込みを確認した。

38T-Full genome sequence

```
CTCCACCACGTTCCACCAAACTCTTCAAGATCCAGAGTCAGGGCTCTGTACCTTCTGCTGGTGGCTCCAGTTCGGAAACAGTAAGCCCTGCTCAGAATACTGT
CTCAGCCATATCGTCAATCTTATCGACGACTGGGGACCCCTCGCCGGAACATGGAGAACATCGCATCAGGACTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGCGGGGTT
TTTCTCGTTGACAAAACTCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAGTTTTCTAGGGGGAACACCCGTTGTCGTGGCCAAAAATTCGCA
GTCCAAAATCTCCAGTCACTCACCACCTGTTGTCTCCAAATTTGTCCTGGTATCGCTGGATGTGCTGCGGGCTTTTATCATCTTCTCCTGTCATCCTGCTGCT
ATGCCATCTTCTTGTGGTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCATCAACCACCGACGGGACCATGCAAGCCCTG
CACGACTCCTGCTCAAGGAACTCTTCCGCTCCATCATGTTGTTGTACAAAACCTAGGGACGGAACTGCACCTGTATCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTTGGC
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGTCCGTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTGAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGCTGGCTTTCAGT
TATATGGATGATGGTATTTGGGGCCAAAGTCTGTACAACACCTTGAGACCTTTATGCCGCTGTTACCCATTTTCTGTTGCTTTGGGTATACATTTAAACCC
CACAAAACGAAAAGATGGGATATTCCTTAACTTCAATGGGATATGTAATTGGGAGTTGGGGCACATGGCCACAGGAACATATTGCCAAAAAATCAAACTATGT
TTTAGAAAACCTCTGTAACAGGCCATTGATTGAAAGTATGTCAACGAATTTGGGCTTTTGGGGTTTGTGCCCTTTTACGCAATGTTGATATCCTGCT
TTAAAGCCATTATATGATGTATACAGGCAAAACAGGCTTTTACTTTTCCGCAACTTAAAGCCTTTCTACGTCACAGATATCTGAACCTTTACCCCGTTGCT
CGGCAACGGCTGGTCTGTGCAAGTGTGCTGACGCAACCCCACTGGTGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCCATGCGTGGAACTTTGTGCTCCTCTG
CCGATCCATCTCGGAACTCTAGCCGCTGTTTTGCTCGCAGCAGGCTGGAGCGAACTCATCGGACTGACAATTTGTCGTGCTCCTCCGCAAAATATACA
TGGTTCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCAATCGGATCCTGCGCGGACGCTCCTTTGTTTACGTCGCTGCGGCTGAATCCGCGGAGCAGCCCTCCCGGGG
CGTTTGGGCTCTACCGCCGCTTCTCCGCTGCGGATCCGACCGACCAGGGGCGCACCTCTCTTACGGGCTCCTCCCGCTGTCGCTTCTCATCTGCCGGG
CGTGTGCACCTTCGCTTCACTCTGCACGTTGCATGGAAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGAACCCCGTGA
TGCAACGACCGACTTGAAGCTACTTCAAGACTGTGTGTTACTGAGTGGGAGGAGCTGGGGAGGAGACGAGGTTAAAGGCTTTGACTAGGAGGCTGTA
GGCATAAATGGTCTGTTCAACGACCTTGAACCTTTTCACTCTGCATAGTCATCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCCTCAAGCTGTGCCTTGGGTG
GCTTTAGGACATGGACATGACCCCTATAAAGAAATTTGGAGCTTCTATAGAGTACTCTCTTTTTGCTACTGACTTCTATCCGTCGTTGCGAGACCTCTAGA
TACCGCCCTGCACTGTATCGGAACTTGAATCCAATGAACATTTGCTCACCTCACCTACAGCAATCAGGCAAGCTATTGTCGTGCTGGGGGAAAGTAATGAC
TCTAGCTTCTGGGGGGTGAATTTACAAGATCCAGCATCCAGGGATCTAGTAGTCGATATGTTAACACTAACATGGGCTTAAAGATCAGGCAATATTGTTG
GTTTCAATTTCTGCTTACTTTTGAAGAGAAGTTGTTCTTGAATTTTGGTGTCTTTGGAGTGTGGATTGCACTCCTCCTGCTACAGACCACCAATGCG
CCCTATCTTTCAACACTTCCGAACTACTGTTGTTAGACGACGAGGACGCTCCCTAGAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGAAGGTTCAATCACCAGG
TCGCAAGATCTCAATCTCGGGATCCCAATGTTAGTATCCCTGGACTCATAAGTGGGAACTTTACGGGCTCTATTCTCTACAGTACCTGTCTTCAATC
CTGAATGGCAAACTCCTCTTTTCCAGACATTTACTTGGAGGATATTTGTTGATAGATGTAAGCAATTTGGGACCACTTACAGTAAATGAACACAGGAGAC
TAAATTAATGCTGCTAGATTTATCCTAAGGTTACCAAAATTTACCCCTAGATAAAGGGATCAAACTTATTATCCAGACATGTAGTTAGTACTTACT
TCCAGACAAGACATTTATTTGCAATCTTTTGAAGCGGGGATCTTATATAAAGAGAGTCAACACAGAGCGGCTCACTTCCGGGTCACCATATTTCTGGGAAC
AAGATCTACAGCATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGAAAAGCATGGGACAAAATCTTCTGTCCCAATCCCAAGGATCTTCCCGATCATCAGTTGGAC
CCTGCCCTCAAAGCCAACTCAGAACTCCAGATTTGGGACCTCAACCCACACAAAGACAACCTGGCCGACGCGCCACAAGGTTGGGAGTGGGAGCATTTGGGCGAGGG
TTCACCCCTCCCATGGGGACTGTTGGGTTGGAGCCCTCAGACTCAGGGCATACTTACATCTGTGCCACAGCCCTCCTCCTGCTCCACCAATCGGCAGTCA
GGAAGGCAGCCAACTCCCTATCTCCACCTCTAAGGACACTCATCTCAGGCCATGCAGTGGAA
```

Fig. 1

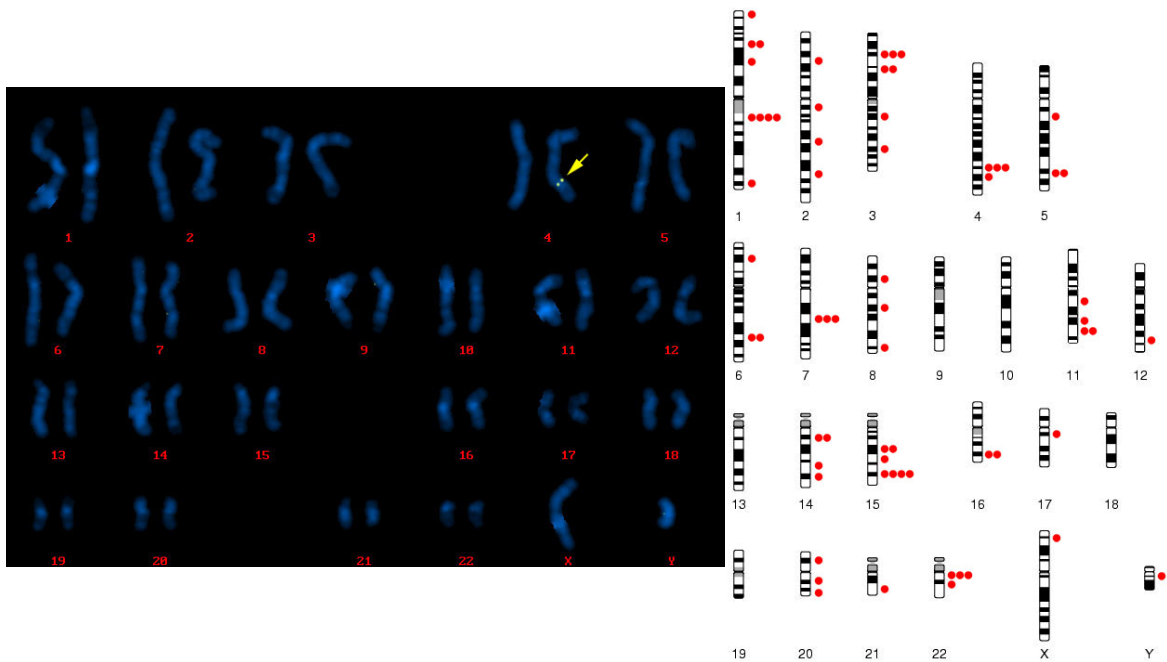


Fig. 2

ヒト染色体上への特徴的な組み込み部位は認められず、ランダムにHBVゲノムの組み込みがあることが確認された。

現在までに得られた結果をまとめると、HBc抗体陰性例では、1p35 (6), 1q22 (5), 1q41 (5), 1q42 (4), 2p22 (4), 2p22 (5), 2q24 (4), 2q32 (4), 2q36 (6), 3p21 (8), 3p14 (4), 3p12 (4), 3p24 (4), 4q28 (4), 5q13 (5), 5q23 (4), 5q31 (5), 5q35 (5), 6p21.3 (6), 7p15 (6), 7q22 (4), 7q31 (6), 8q24.2 (5), 9q22 (5), 9q31 (4), 10q22 (4), 10q25 (5), 11q13 (4), 13q14 (5), 13q21 (7), 14q21 (5), 14q24 (4), 14q31 (5), 15q21 (4), 15q22 (4), 15q24 (5), 15q25 (6), 16q21 (4), 17q21 (4), 18q21 (5), 19q13.2 (4), 21q21 (4), 22q12 (4), などに比較的多数のHBVゲノムの組み込みを認めた。

HBc抗体陽性例では、1p31 (4), 1q31 (5), 3p21 (4), 3q13.3 (4), 3q24 (5), 3q26.1 (4), 5q31 (4), 6p21.1 (4), 6q22 (6), 6q23 (4), 9q22 (4), 10q24 (4), 13q21 (4), 14q23 (4), 14q31 (4), 18q21 (7), などにHBVゲノムの組み込みを認めたが、その頻度はHBc抗体陰性例に比較して少ない傾向が認められた。

しかしながらHCV抗体陽性例でも同様に、大多数は4細胞以下であり、ヒト染色体上への特徴的な組み込み部位は認められず、ランダム

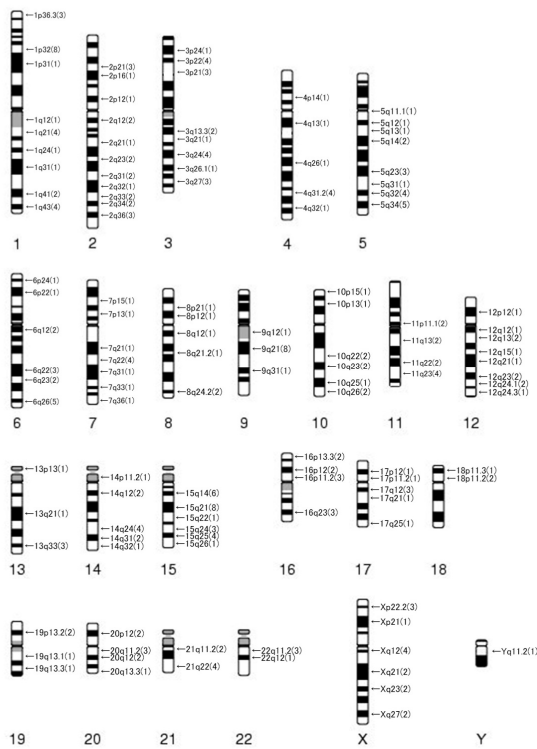


Fig. 3

Fig. 5に、HBc抗体陰性の10症例、各々12細胞分のkaryogramのまとめを同様に提示する。同一染色体上のほぼ同一部位にHBVゲノムの組み込みを認めた。しかしながらHCV抗体陽性例でも同様に、大多数は4細胞以下であり、

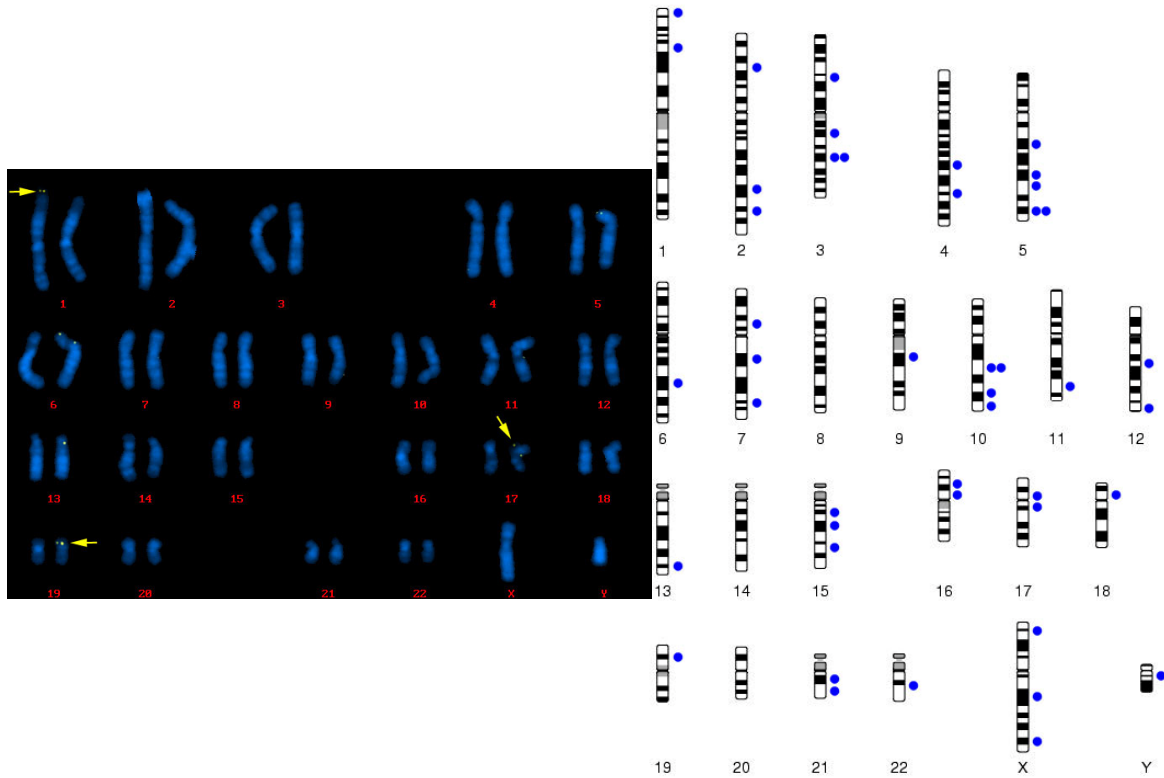


Fig. 4

(4) NBNC型HCC例のリンパ球からのヒト染色体上のHBVゲノムの組み込みの検出

Fig. 6にcase 5のcase 5の1細胞あたりのIdeogramと12細胞分の解析結果のKaryogramを提示する。染色体上にHBVゲノムの組み込みを示す蛍光を提示する(矢印)。

Fig. 7にHBc抗体陰性の10症例、各々12細胞分のkaryogramのまとめを同様に提示する。同一染色体上のほぼ同一部位に、HBVゲノムの組み込みを認めた。しかしながらHCV抗体陽性例でも同様に、大多数は4細胞以下であり、ヒト染色体上への特徴的な組み込み部位は認められず、ランダムにHBVゲノムの組み込みがあることが確認された。

現在までに得られた結果をまとめると、HBc抗体陰性例では、1p35 (6), 1q22 (4), 1q31 (4), 1q41 (11), 1q42 (6), 2q32 (5), 2q34 (5), 3p21 (8), 3q24 (6), 3q26.1 (4), 3q28 (6), 5q13 (7), 5q31 (5), 5q32 (4), 6q24 (5), 7p21 (5), 7q11.2 (4), 7q21 (4), 7q22 (5), 7q33 (4), 8p22 (5), 8q23 (4), 9q22 (4), 9q31 (4), 9q33 (5), 10p14 (4), 10q25 (8), 11p14 (4), 12q13

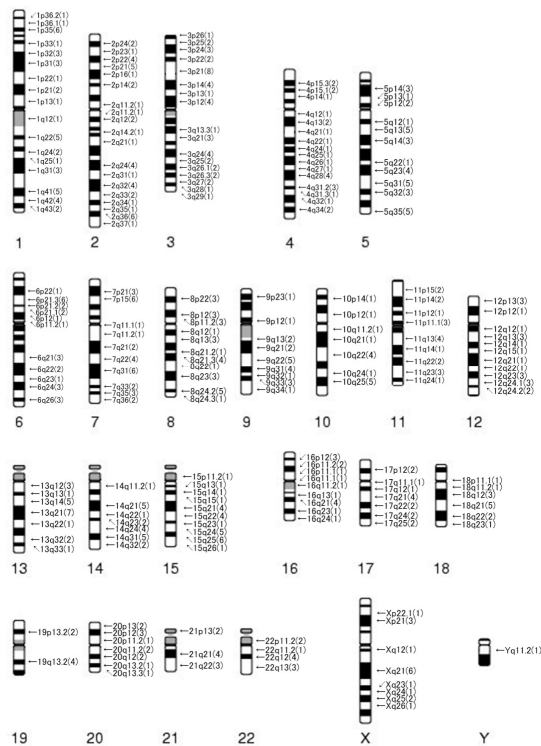


Fig. 5

にHBVゲノムの組み込みがあることが確認された。

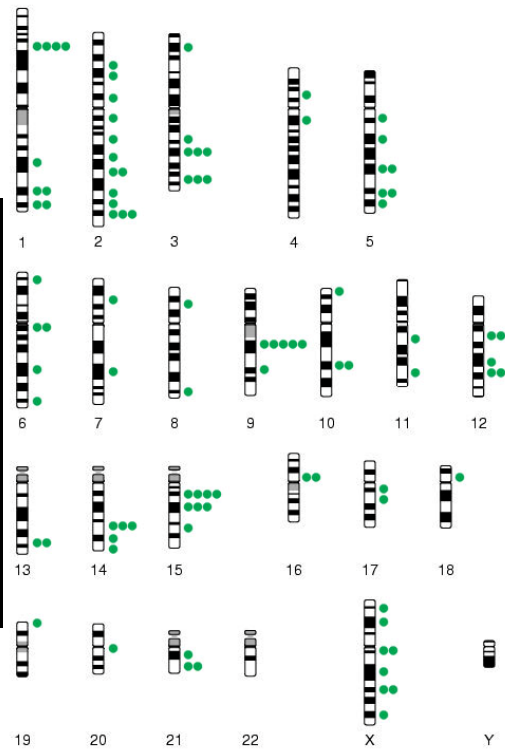
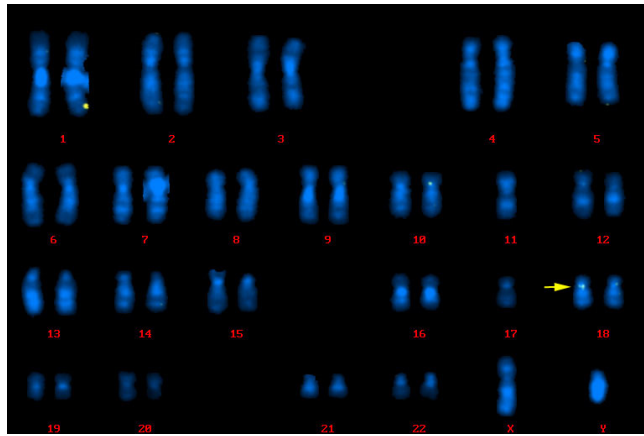


Fig. 6

(11), 20q11.2 (4), 20q13.2 (4), 21q21 (4), 22q12 (5), などにHBVゲノムの組み込みを認めた。

HBc抗体陽性例では、6q24 (4), 11q13 (4), などにHBVゲノムの組み込みを認めた。しかしながらC型と同様に、組み込み頻度はHBc抗体陰性例に比較して明らかに少なく認められた。

(5)次世代高速シーケンサーを用いたヒトゲノム解析

次世代高速シーケンサー (Illumine Hisex 2000) のランの委託は、実績のある北海道システム・サイエンス社に委託した。このdataを感染症ゲノム実験室に設置してある高性能ワークステーションと解析ソフトウェアを用いて、HBVゲノムの組み込み部位の同定を行った。しかしながら、現在までの検索では、HBVゲノムの組み込み部位は認められていない。考察すると、10 foldのrunでは欠失が多く、100 fold以上に読み込みを増加する必要があると思われる。可能であれば平成26年度に施行する予定である。

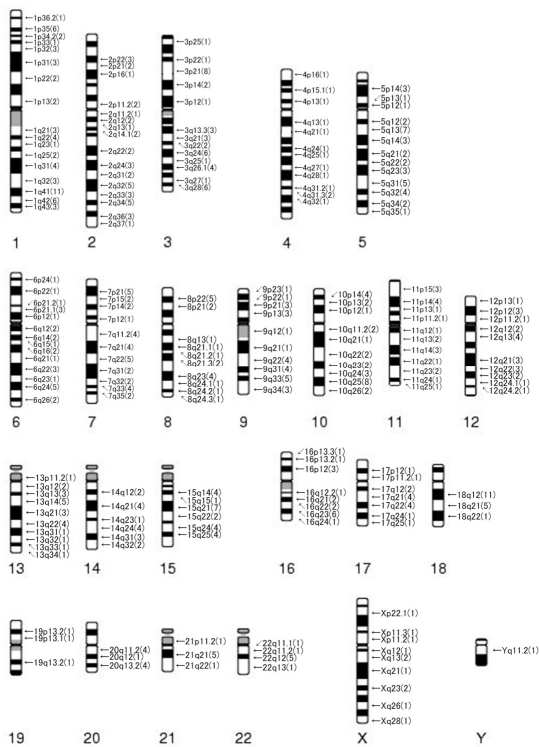


Fig. 7

(4), 13q14 (5), 13q22 (4), 14q21 (4), 14q24 (4), 15q14 (4), 15q21 (7), 15q24 (4), 15q25 (4), 16q23 (6), 17q21 (4), 17q22 (4), 18q12

4. 考 察

Fish法の結果では、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。しかしながら、ヒト染色体上への特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは今のところ認められていない。

HBs抗原陽性例におけるHBVゲノムのヒト染色体上への組み込み部位はランダムであった。

一方HBs抗原陰性かつHCV抗体陽性例およびNBNC型HCC例においても、HBs抗原陽性例と同様に、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。

今までのところ、HBs抗原陽性例と同一の特定部位へのHBVゲノムの組み込みは確定されていないが、HCV抗体陽性のいわゆるC型HCCにおいても、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認したことより、C型慢性肝炎・肝硬変からのHCC発生には、HBVが関与していることも考慮すべきであることが示唆された。同様にNBNC型HCCの発生においてもHBVゲノムのヒトゲノムへの組み込みがHCC発生に関与している可能性が推測された。

現在、組み込み部位と発癌に関与する遺伝子発現の有無など背景因子について、次世代高速シーケンサーを用いて検討中である。

謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金総合研究（総12-012）による助成を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Yamamoto T, Kajino K, Kudo M, et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1999; 29: 1446-1452.
- 2) Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanou T, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2005 Aug; 54 (8): 1162-8.
- 3) Wang J, Lin J, Chang Y, et al. MCM3AP, a novel HBV integration site in hepatocellular carcinoma and its implication in hepatocarcinogenesis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2010; 30: 425-429.
- 4) Ding D, Lou X, Hua D, Yu W, Li L, Wang J, Gao F, Zhao N, Ren G, Li L, Lin B. Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach. *PLoS Genet*. 2012; 8 (12): e1003065.
- 5) Toh ST, Jin Y, Liu L, Wang J, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Ronaghi M, Toh HC, Chow PK, Chung AY, Ooi LL, Lee CG. Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations. *Carcinogenesis*. 2013 Apr; 34 (4): 787-98.
- 6) Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, et al. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Intervirology* 2009; 51: 352-361.

低温大気圧プラズマ技術を用いた癌治療方法の開発

齋藤孝輔¹⁾, 浅井朋彦²⁾, 福田昇¹⁾³⁾, 鈴木良弘¹⁾, 照井正¹⁾, 上野高浩¹⁾,
篠島由一¹⁾, 小口治久⁴⁾, 五十嵐潤¹⁾, 藤原恭子¹⁾, 相馬正義¹⁾

Development of anti-cancer therapy using non-thermal atmospheric pressure plasma

Kohsuke SAITO¹⁾, Tomohiko ASAI²⁾, Noboru FUKUDA¹⁾³⁾, Yoshihiro SUZUKI¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾,
Takahiro UENO¹⁾, Yui SHINOJIMA¹⁾, Haruhisa KOGUCHI⁴⁾, Jun IGARASHI¹⁾,
Kyoko FUJIWARA¹⁾, Masayoshi SOMA¹⁾

要旨

低温大気圧プラズマは医療分野において非侵襲性の治療ツールとして非常に有望であるが、癌治療への応用に関しては知見が限られている。本研究では癌細胞を効果的に死滅させることが可能なプロトコルの開発を目指して、大気圧LFプラズマジェット装置を自作し、メラノーマ細胞株への効果を確認した。プラズマ照射した培地を用いて培養すると、メラノーマを含む複数の癌細胞株は正常細胞株と比較して強い生存率の低下を示し、その効果は培養開始後長期間観察された。一方、sphere 形成能は、プラズマ照射により影響をうけず、本研究での照射法ではプラズマは癌幹細胞に対する効果が弱いと考えられた。癌細胞が正常細胞と比較してプラズマに対し高い感受性を示す原因を解明することで、癌幹細胞に対しても殺傷効果を持つ、より効果的な照射プロトコルの確立が期待できると考える。

1. はじめに

プラズマは気体を構成する分子の一部または全体が陽イオンと電子に電離した状態を指し、個体・液体・気体に並ぶ、物質の第4の存在状態である。半導体加工や機能性薄膜堆積等においてプラズマ技術は不可欠であるが、近年医療分野においても応用が進められ、中でも、温度が室温に近い低温大気圧プラズマが生体に作用し、止血、血管新生、臓器癒着防止、細胞増殖促進などの多岐に渡る効果を示すことが報告されている。その作用機序は不明な点が多いが、プラズマにより生成するフリーラジカル、励起原子・分子、電子、紫外線が作用している可能性が考えられている。

癌治療の分野では肺癌、メラノーマおよび卵巣癌の細胞株に対し、低温大気圧プラズマが殺細胞効果を持つこと、その細胞死のメカニズムに活性酸素がかかわっている可能性があることが最近報告され

た¹⁾²⁾。有毒物質を用いず、また放射線のような取扱いの危険性の少ないプラズマは新規の癌治療ツールとして非常に期待が持てるが、まだ限られた細胞で行われた研究であり、その作用機序、最適条件などについては不明な点が多い。

近年、癌細胞集団は一部の自己複製能および多分化能をもつ癌幹細胞によって維持されていることが分かってきた。抗癌剤で癌細胞増殖を抑制しても、癌幹細胞の残存により再発する。そこで癌組織を根絶するためには癌幹細胞を確実に消滅させる必要がある。これまでに癌幹細胞特異的なマーカーの探索、およびそれをターゲットとした治療法の探索がなされてきた。現在までに、CD20, CD44, CD133, CD271, ABC transporter G2 (ABCG2), ABC transporter B5 (ABCB5), Aldehyde dehydrogenase (ALDH) などが癌幹細胞のマーカーとして報告さ

1) 日本大学医学部

2) 日本大学理工学部

3) 日本大学大学院総合科学研究科

4) 産業技術総合研究所

相馬正義: souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

れている。それらの一部は機能的に癌幹細胞の抗酸化機構を上昇させたり、薬剤耐性を強化するなど生存率を上げる方向に機能することが証明されている。例えばすい臓癌や大腸癌等多くの癌で癌幹細胞マーカーとして知られているCD44は pyruvate kiase M2と相互作用し³⁾、その結果細胞のエネルギー産生を解糖系依存に移行させる。ミトコンドリアにおける呼吸でエネルギー産生を行う場合と比較して、グルタチオンの消費や活性酸素の産生が低く抑えられ、結果的にCD44陽性細胞の抗酸化機構が維持され、細胞の生存率が上昇する。またCD44がアミノ酸シスチンの輸送体と相互作用し、シスチンの細胞内取り込み活性を上昇させ、その結果細胞のグルタチオン濃度を上昇させ、細胞の抗酸化機構を強化するとの報告もある⁴⁾。また同じく癌幹細胞マーカーの一つであるALDHのアイソザイムの一つALDH1A3をsiRNAでノックダウンすると、増殖抑制、アポトーシス誘導が起こることが観察されている⁵⁾。つまり、これらの分子はマーカーとしてのみならず治療標的としても有望であり、その発現低下や機能抑制を誘導して癌幹細胞を特異的に殺す試みが研究されている。

現時点において、プラズマの抗腫瘍効果に関する報告では、癌幹細胞のみでなく腫瘍細胞全体を標的

としているため、癌細胞集団の全滅は期待できず、また用いた細胞株の種類が少なく、治療法として確立するためには知見が限られている。そこで我々は腫瘍細胞を効果的に殺傷できるプラズマ治療法の確立を最終目的として、1) プラズマ照射装置の設計・作成、2) メラノーマ細胞株に対する効果的なプラズマ照射条件の検討、3) プラズマ照射の癌幹細胞に対する効果の確認を行った。

2. 対象および方法

1) プラズマ照射装置；

dielectric barrier discharge (DBD) 放電の一種である大気圧LFプラズマジェット装置（以下、LFジェット装置）を作成した。照射の際はPCに接続したマスフローコントローラー8500MC（寿産業）により照射量、電圧、時間等を制御し、条件設定をソフトを用いて簡単に変更できるシステムを作成し、以下の実験に使用した。照射部の形状はペンシル型とした（図1）。

2) 培養液中のフリーラジカルの測定（d-ROMsテスト）；

プラズマ照射後の培養液中のヒドロキシラジカルの生成量を活性酸素・フリーラジカル自動分析装置

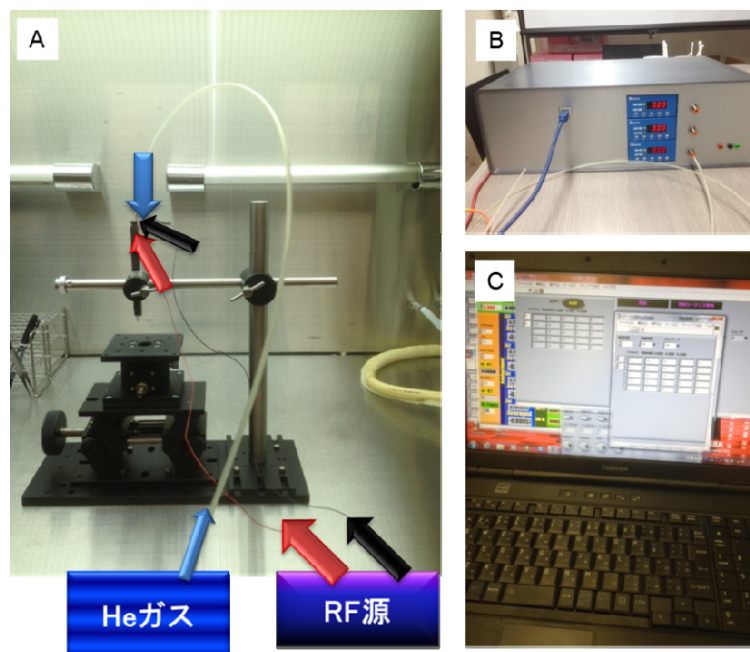


図1 プラズマ照射装置 (LFジェット装置)

A. 照射装置本体、B. 照射条件（ガス流量、電圧、照射時間）の制御装置、C. 照射条件制御装置をコントロールするPCソフト

(FRAS4) を用いて計測した。本測定法では培養液中の2価, 3価の鉄がイオン化され, これらの鉄イオンを触媒として培養液中のヒドロキシペルオキシド群が分解を受ける。この分解産物がクロモゲンを酸化して呈色するため, その変化を光度計で測定することでヒドロキシペルオキシドの量が定量できる。

3) 細胞株;

我々の研究室で所持するメラノーマ細胞株17種のうち, 文献的に, もしくは我々が以前に行ったマウス皮下腫瘍を作成する実験から癌幹細胞がある程度含まれている可能性の高いA375, A2058, HMY-1を用いて実験を用いた。また比較検討用に肺癌細胞株A549, 骨肉腫細胞株MG63, 繊維芽細胞HDFを用いた。

4) プラズマ照射培地の作成;

メラノーマ培養用の培地であるDMEM・10%FBSに対し印加電圧8kV, ヘリウムガス流量1.5ml/min, 時間60~300秒の照射を行った。コントロールとして, 電圧をかけずにヘリウムガスのみを同じ流量, 時間照射した培地も作成した。

5) 細胞生存率の定量;

細胞を 1×10^3 個/100 μ l, wellの密度で96well 培養プレートに播種し, 翌日プラズマ照射培地もしくはガスのみを照射した培地に置換し, 培養を続けた。培地置換後24時間目以降に, WST8 アッセイにより細胞の生存率を測定した。

5) Sphere 形成試験;

A375 もしくは A2058 細胞を 3×10^5 個/2ml, wellの密度で低接着性の6ウェルプレートに播種し, 翌日プラズマもしくはガス照射済みの培地に置換した。その後培養を続け, 72時間目に sphere 形成の状態を観察した。

6) PCRおよびFACS による癌幹細胞マーカー発現細胞の解析;

7~8割コンフルエントの培養細胞よりトータルRNAを抽出し, 逆転写によるcDNA作成後, PCRを行い幹細胞マーカーの発現状態を調べた。さらに,

6.5×10^5 個の細胞を2mlのPBS+3% FCSにサスペンドし, APCラベルされた抗CD133抗体およびFITCラベルされた抗CD44抗体と反応させ, FACSCalibur (BD Biosciences) により解析した。アイソタイプコントロールとしてはAPCラベルのマウスIgGおよびFITCラベルのマウスIgGを用いた。

3. 結果

1) プラズマ照射装置の設計と照射効果の確認;

マスフローコントローラーによるガス流量の制御が可能なLFジェット装置を作成し, 条件設定・変更をPC上のプログラムで容易にできるシステムを構築した(図1)。本装置を用いて, 培地にプラズマを照射し, 生成したヒドロキシペルオキシドを定量したところ, 印加電圧8kV, ヘリウムガス流量1.5ml/分, 300秒の照射条件でコントロールよりも高いヒドロキシペルオキシド群の生成が確認できた。未処理やガスのみ, 60秒の短い照射では生成が確認できなかったことから, これはプラズマ照射により生成したヒドロキシペルオキシドであると考えた(図2)。

2) メラノーマ細胞株を殺傷できる照射条件の検討;

作成したLFジェット装置を用い, 複数のメラノーマ細胞株へのプラズマ照射を行って効果的に細胞死を誘導できる条件について検討した。印加電圧8kV, ヘリウムガス流量1.5ml/分, 300秒という条件でプラズマ照射を行った培地, もしくはヘリウムガスのみを照射した培地に置換しメラノーマ細胞株HMY-1の培養を行ったところ, 照射24時間後の時

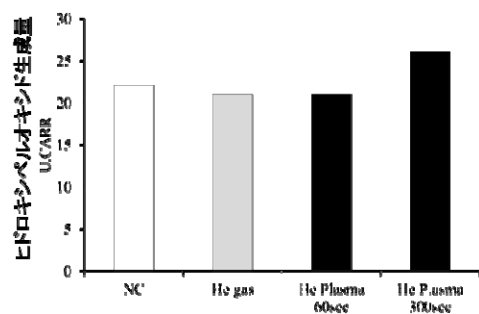


図2 d-ROMsテストによるヒドロキシペルオキシドの定量

5mlの培養液にプラズマもしくはヘリウムガスのみを照射し, 液中に生じたヒドロキシペルオキシドの量をFRAS4により測定した。

点で細胞増殖が完全に抑えられ、照射後120時間目までその効果が持続していることが判った (図3)。

3) プラズマ照射培養液による腫瘍選択的毒性の検討；

上記と同じ条件で、メラノーマを含む複数の細胞株を培養し、プラズマ照射もしくはガス照射培養液にて培養後72時間後に生存率を比較を行った。それぞれの細胞におけるヘリウムガス照射後の生存率を100%として表した場合、繊維芽細胞細胞株HDFは98.6%、正常メラノサイトは87.0%の生存率であった。一方、メラノーマ細胞株A375は31.2%、A2058は14.6%、また肺癌細胞株A549は61.5%、骨肉腫細胞株MG63は37.8%の生存率を示した (図4)。

4) Sphere 形成能に対するプラズマの効果；

癌幹細胞は sphere 形成能を持つことから、メラノーマ細胞株A375とA2058を低接着性の培養プレートに播種し、プラズマ照射の有無による sphere 形成能の変化を解析した。プラズマ照射培地で72時間培養した細胞の sphere 形成を観察したが、いずれの細胞もガスのみを照射した培地下で培養した細胞と比較して sphere の個数や大きさに差は見られなかった。

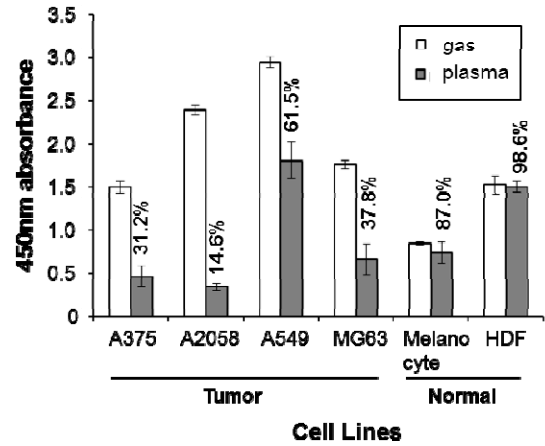


図4 各種細胞株に対するプラズマ照射効果の確認
メラノーマ細胞株A375, A2058, 肺癌細胞株A549、骨肉腫細胞株MG63、正常メラノサイト、繊維芽細胞HDFをそれぞれプラズマ照射培地もしくはガスのみを照射した培地を用いて培養し、72時間後の生存率をWST8 assayにより確認した。

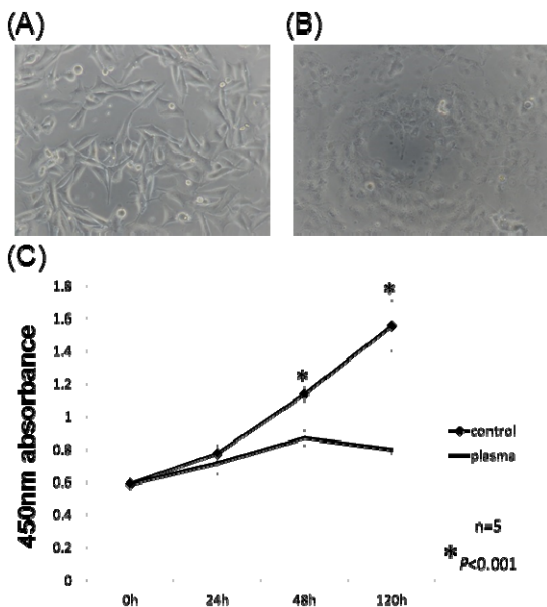


図3 メラノーマ細胞株HMY-1に対するプラズマ照射効果の確認

ガス照射 (A) もしくはプラズマ照射 (B) を行った培養液にて培養後、24時間目の画像
C. ガスまたはプラズマ照射培地にて120時間まで培養を行い、細胞の生存率をWST8 assayにより継続的に計測した。

胞と比較して sphere の個数や大きさに差は見られなかった。

5) 癌幹細胞マーカー発現細胞の検出；

癌幹細胞マーカーを標的とした薬剤とプラズマ照射との併用効果を確認するために、メラノーマ細胞株における幹細胞マーカーの発現状態を解析した。PCRによる解析ではCD133は全ての細胞において発現が見られ、CD20はG361とHMY-1において発現が確認され、CD44はA75において発現していることが判った (図5)。癌幹細胞はCD44およびCD133の両方が陽性であるとの報告があること、またCD44に対してはその機能や発現を抑制する薬剤が存在することから、この二つのマーカーの発現

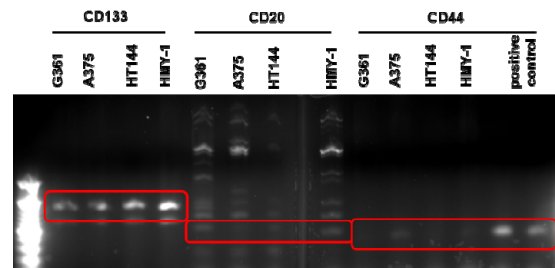


図5 メラノーマ細胞株における癌幹細胞マーカーの発現解析

メラノーマ細胞株G361, A375, HT144, HMY-1よりRNAを抽出し、癌幹細胞マーカーCD133, CD20, CD144の発現をPCRにより調べた。

している細胞の存在量をFACSを用いて解析した。その結果A375細胞においては、CD44とCD133をともに発現している細胞は全体の0.33%と極めて少ない事が判った(図6)。

4. 考察

本研究において、我々は照射条件をPCにて容易に設定・変更できるプラズマ装置を作成し、腫瘍細胞株に対するプラズマの殺細胞効果の検討を行った。我々の実験ではプラズマ照射を行った培地で培養したメラノーマ細胞株には120時間まで強い増殖抑制が観察された。また各種細胞間で比較すると、メラノーマ細胞株以外に骨肉腫細胞株や肺癌細胞株でもプラズマ照射培地で培養することで強い増殖抑制効果が見られたが、繊維芽細胞や正常メラノサイトにおいてはプラズマの効果は殆ど観察されなかった。

一方、本研究で用いたプラズマ照射条件では、メラノーマのsphere形成能に変化を引き起こさなかったことから、癌幹細胞の生存率に影響を与えていないと考えられた。メラノーマ細胞集団における癌幹細胞マーカー発現細胞の比率も極めて低く、従って癌幹細胞を標的とした薬剤とプラズマ照射の併用を行って効果的かつ完全に癌細胞集団を死滅させるという当初の計画を改変する必要があると考える。

本研究では、癌細胞が正常細胞と比較してプラズマ照射への高い感受性を持つ事が確認されたが、そ

のメカニズムは現時点では不明である。癌細胞と正常細胞のプラズマへの反応性の違いが何により起こっているのか、そのメカニズムを解明することで、より効果的な照射プロトコルの開発が可能になると考える。癌細胞は正常細胞と比べて活性酸素に対して高い感受性を持つことから、その性質を利用して副作用の少ない抗癌剤を開発する試みが数多くなされているが⁶⁾、プラズマによる細胞死においても、その作用機序に関わる因子の一つに活性酸素があるとされていることから、活性酸素への耐性を左右する薬剤と併用することで、より強力に癌幹細胞を含む癌細胞集団を死滅させる照射法の確立が可能となるかもしれない。今後は癌細胞と正常細胞において、プラズマ照射時にどのような反応が生じているか、その生化学的、分子生物学的違いについて、より詳細に解析していく計画である。

謝辞

本研究は平成25年度日本大学学術研究助成金(総合研究)の支援により実施されたものであり、ここに感謝の意を表します。

文献

- 1) Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, Fridman G, Shereshevsky A, Torabi B, Arjunan KP, Podolsky E, Fridman A, Friedman G, Azizkhan-Clifford J, Brooks AD. Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species. *Ann Biomed Eng* 39 (2): 674-687 (2011)
- 2) Iseki S, Ohta T, Aomatsu A, Ito M, Kano H, Higashijima Y, Hori M. Rapid inactivation of *Penicillium digitatum* spores using high-density nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *Applied Physics Lett* 100, 113702 (2012)
- 3) Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M, Saya H. Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 72 (6): 1438-1448 (2012)
- 4) Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Suematsu M, Baba H, Saya H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc⁻ and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19 (3): 387-400 (2011)
- 5) Luo Y1, Dallaglio K, Chen Y, Robinson WA, Robinson SE, McCarter MD, Wang J, Gonzalez R, Thompson DC, Norris DA, Roop DR, Vasiliou V, Fujita M. ALDH1A isozymes are markers of human melanoma

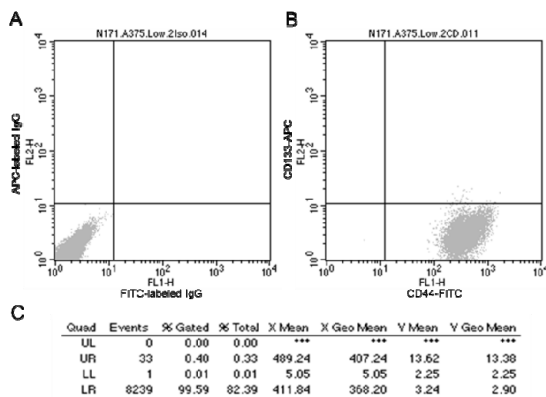


図6 FACSによる癌幹細胞マーカー発現細胞の検出メラノーマ細胞株G361集団中におけるCD44、CD133陽性細胞をFACSにより検出した。A. アイソタイプIgGによる検出。B. CD44 (FL1), CD133(FL2) 陽性細胞の検出。C. 測定結果(B)の集計。

- stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells* 30 (10): 2100-2113 (2012)
- 6) Suzuki-Karasaki Y, Suzuki-Karaski M, Uchida M, Ochiai T. Depolarization controls TRAIL-sensitization and tumor-selective killing of cancer cells: crosstalk with ROS. *Frontiers in oncology* 4 (128): 1-14 (2014)

関節リウマチおよび慢性蕁麻疹におけるマスト細胞を 標的とした新規治療法の確立

岡山吉道¹⁾, 藤澤大輔¹⁾, 山田賢鎬¹⁾, 権 寧博¹⁾, 橋本 修¹⁾,
浅野正岳²⁾, 斎藤 修¹⁾, 徳橋泰明¹⁾, 照井 正¹⁾

Establishment of new therapy which targets mast cells in rheumatoid arthritis and chronic urticaria

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾, Daisuke FUJISAWA¹⁾, Kenko YAMADA¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾,
Shu HASHIMOTO¹⁾, Masatake ASANO²⁾, Shu SAITO²⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

関節リウマチ (RA) と慢性蕁麻疹 (CU) の二疾患においてマスト細胞が重要な役割を果たしていることは示されているが、マスト細胞の活性化を惹起する機序および疾患の病態におけるマスト細胞の役割に関しては十分に解明されていない。我々はRAおよび変形性関節症 (OA) 病変滑膜組織よりマスト細胞を分離し、培養することに成功したので、RAとOAの病変部位のマスト細胞の活性化機序および疾患の病態におけるマスト細胞の役割を検討したところ、RAとOAの滑膜マスト細胞は、IgG受容体である、FcγRIとFcγRIIを恒常的に発現しており、RAでは免疫複合体の刺激により、多量のTNF-γを産生することが分かった。CU患者の膨疹病変部を生検し、健康人の皮膚のマスト細胞との比較を行ったところ、Gタンパク質共役型受容体の一つであるMas-related gene X2がCU患者の病変部マスト細胞において高く発現していた。この受容体を介して皮膚マスト細胞は神経ペプチドサブスタンスPによって活性化されるのみならず好酸球顆粒タンパクによっても活性化されることが分かった。以上より、マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在することが示唆された。

1. はじめに

マスト細胞は即時型のアレルギー反応を惹起するのみならず、マスト細胞の産生、放出するケモカインやサイトカイン、ロイコトリエンなどのメディエーターにより、遅発型のアレルギー反応および慢性炎症を惹起する¹⁾。また、マスト細胞の関節リウマチ (RA) における役割については近年注目されている。RAにおけるマスト細胞の関与に関しては、マウス関節炎モデルの実験に供するマスト細胞欠損マウスの種類によって結果が異なり未だ議論が多い²⁾⁻⁷⁾。しかしながら、ヒトのRA患者の滑膜組織病変部にはマスト細胞数が増加し、活動性と相関している⁸⁾⁻¹⁰⁾。また、トリプターゼやヒスタミンといったマスト細胞から遊離されるメディエーターの関節液中の濃度の増加が報告されている⁹⁾⁻¹²⁾。関節液中のサブスタンスP¹³⁾やinterleukin (IL) -33濃度の増

加¹⁴⁾も報告されており、これらは直接マスト細胞を活性化する。またマスト細胞はtumor necrosis factor (TNF)-αやIL-6の主要な産生細胞であり、RAの病態へのマスト細胞の関与が示唆されている。ヒトのマスト細胞には多様性があるが、単離した滑膜組織マスト細胞での研究は、未だなく、滑膜組織マスト細胞に発現している受容体の詳細は不明である。我々は、約2%のヒト末梢血由来培養マスト細胞が高親和性IgG受容体 (FcγRI) を発現しているが、ヒト末梢血由来培養マスト細胞および肺マスト細胞をIFN-γにて、24時間培養するとFcγRI mRNAと細胞表面の受容体の発現は有意に増強することを報告した¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。FcγRIの架橋によって、FcεRIの架橋と比較して同程度の脱顆粒、PGD2、LTC4の産生を認め、TNF-α、IL-1β、IL-6といったproinflammatory cytokineが産生された¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。そこで滑膜組織マスト細胞

1) 日本大学医学部

2) 日本大学歯学部

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

胞がIgG受容体を発現しており、免疫複合体で活性化され多量のTNF- α を産生するという仮説を立てて研究を行った。

慢性蕁麻疹 (CU) は、蕁麻疹が1ヶ月以上に亘り出現する疾患で原因が不明である¹⁸⁾。橋本病などの自己免疫疾患がと高頻度に合併すること、自己反応性IgGが検出されることから自己免疫疾患である可能性も示唆されている^{18), 19)}。マスト細胞の活性化がその原因であるが、マスト細胞の活性化機構は不明のままである。皮膚マスト細胞はサブスタンスPやコンパウンド48/80に反応し脱顆粒が惹起されるが肺マスト細胞はこれらに反応しない^{20), 21)}。最近、サブスタンスPやコンパウンド48/80の新規受容体としてMas-related gene X2 (MrgX2) が同定された²²⁾。MrgX2は神経節後根²²⁾ およびヒト臍帯血由来培養マスト細胞²³⁾ に発現している。我々はヒト皮膚マスト細胞にMrgX2が発現していることを報告している²⁴⁾。MrgX2のリガンドとしてはサブスタンスPやコンパウンド48/80のみならず、コルチスタチン、ソマトスタチン、オキシトシン、バソプレッシン、オピオイドペプチドのダイノルフェン、バソアクティブインテスチナルペプチド、抗菌ペプチドLL-37などの報告がある^{22), 23), 25), 26)}。CU患者にサブスタンスPやバソアクティブインテスチナルペプチドを皮内注射すると健康人よりも有意に大きい膨疹が惹起され長く持続するという^{27), 28)}。そこでCU患者の皮膚マスト細胞がMrgX2を健康人よりも高く発現しているという仮説を立てて検討した。

2. 対象及び方法

倫理的考慮：生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規定に定める学長の確認を受けて実施した。

細胞：ヒト末梢血および臍帯血培養マスト細胞はすでに報告した方法を用いて樹立した²⁹⁾。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球から lineage negative 細胞 (CD4⁻, CD8⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD16⁻, および CD19⁻ 細胞) を分離したのち、臍帯血では CD34⁺ 細胞を分離したのち、stem cell factor (SCF; 200 ng/

ml, PeproTech EC Ltd, London, UK) と IL-6 (50 ng/ml, PeproTech EC Ltd) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada と Iscove's modified Dulbecco's medium [IMDM]) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。ヒト滑膜マスト細胞³⁰⁾、肺マスト細胞と皮膚マスト細胞は、それぞれ滑膜組織、肺組織と皮膚組織から分離培養した。できるだけ新鮮な滑膜組織、肺組織と皮膚組織は採取後ただちに2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1 % fungizone を含んだ IMDM に入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenase と hyaluronidase を用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後 SCF (200 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose medium と IMDM) で培養した。42日目に PBS で Iscove methylcellulose medium を洗浄し、SCF (100 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) を含んだ IMDM で培養した。

RT-PCR：マスト細胞の総RNAはRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて抽出し、精製した。500 μ g/mL oligo (dT₁₂₋₁₈) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5 x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写を行った。MrgX2 および GAPDH の primer と probe は Assays-on-Demand™ service (Applied Biosystems, 東京) のものを使用した。

遺伝子発現抑制：レンチウイルスベクターを用いた shRNA 技術²⁴⁾ にてヒト皮膚組織由来培養マスト細胞の MrgX2 の発現抑制をおこなった。MrgX2 のコンストラクションに対する sense と antisense オリゴヌクレオタイド配列のレンチウイルス発現プラスミドは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。

フローサイトメトリー：マスト細胞のフローサイトメーターによる解析はすでに報告した方法を用いて行った³¹⁾。以下の抗体を用いて細胞を染色した。

PEあるいはビオチン標識抗FcεRIαモノクローナル抗体(クローンCRA1, eBioscience, San Diego, CA), PE標識抗CD64(クローン10.1)と抗CD32(clone KB61, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), ビオチン標識抗chymaseモノクローナル抗体(クローンB7), 抗tryptaseモノクローナル抗体(クローンG3, Chemicon International, CA), 抗CD16(クローンDJ130c, DakoCytomation, Carpinteria, CA), PE標識抗CD117(クローンYB5.B8, BD Biosciences, San Jose, CA), 抗MrgX2モノクローナル抗体(クローン477533, R&D Systems, Minneapolis, MI)。PE/Cy5-streptavidinはBiolegend(San Diego, CA)から購入した。

免疫化学組織染色と共焦点顕微鏡による解析: 共焦点顕微鏡による解析はすでに報告した方法を用いて行った³¹⁾。滑膜組織, 皮膚組織あるいは, 細胞を固定して, 膜の穴あけをした後, Alexa Flour 488標識抗tryptase抗体, ビオチン標識抗CD64(クローン10.1), Alexa Flour 555標識抗MrgX2抗体(Abca, Cambridge, UK), アイソタイプコントロールマウスIgG1およびウサギIgGとインキュベートした。ビオチン標識抗CD64陽性細胞は, streptavidin-Cy3(Biolegend)を用いて可視化した。FV1000型共焦点レーザー顕微鏡(Olympus, 東京)を用いた。

マスト細胞の活性化: IgE感作したマスト細胞を0.1, 1.0, 10μg/mlの抗FcεRIαモノクローナル抗体(クローンCRA1), サブスタンスP, major basic protein(MBP), eosinophil peroxidase(EPO), eosinophil derived neurotoxin(EDN)あるいはカルシウムイオノフォアA23187(10⁻⁶M)で30分間刺激した。FcγRIとFcγRIIの架橋は, マスト細胞を1, 10μg/mlの抗ヒトFcγRI抗体のF(ab)₂ fragments(F(ab)₂αFcγRI, clone 10.1)と抗ヒトFcγRII(F(ab)₂αFcγRII, clone 7.3)で30分間刺激した。コントロールとしてマウスIgG1のF(ab)₂ fragments(F(ab)₂mIgG1, Jackson Immune Laboratory, West Grove, PA)で30分間刺激した。細胞を1度洗浄後FcγRIとFcγRIIを架橋させるため抗マウスIgG F(ab)₂ fragmentsのヤギF(ab)₂ fragments(gF(ab)₂αmF(ab)₂, Jackson Immune Laboratory)を添加しさらに30分間刺激した。ヒスタミン遊離とPGD₂産生を測定するためそ

の細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。サイトカイン測定では6時間刺激後, 細胞上清を回収した。

脱顆粒, PGD₂産生, サイトカイン産生測定: ヒスタミン遊離とPGD₂産生は酵素免疫法, サイトカイン産生はELISA法を用いた。

統計解析: 臨床データの2群間の統計学的解析および*in vitro*の実験の3群間の統計学的解析はMann-Whitney U testを用いてP<0.05を有意とした。*in vitro*の実験の2群間の統計学的解析はunpaired Student t-testを用いてP<0.05を有意とした。

3. 結果

初代滑膜マスト細胞(関節滑膜から分離直後のマスト細胞)におけるFcεRI, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIおよびKit発現とFcεRIおよびFcγRI架橋刺激による初代滑膜マスト細胞の脱顆粒反応

滑膜組織から酵素で分散した滑膜細胞中のマスト細胞の純度は43±4%(n=9ドナー)であった。この細胞分画中のマスト細胞は, 構成的にFcγRIを発現しており, FcεRI, FcγRI, FcγRIIおよびKitの発現レベルはOAとRAで有意な差はなかった(図1A, B)。FcγRIIIはOAとRAのマスト細胞で発現していなかった。FcεRI, FcγRI架橋刺激による初代滑膜マスト細胞の脱顆粒反応に関してヒスタミン遊離率を指標に比較したがその遊離率に有意差はなかった(図1C, D)³⁰⁾。

培養滑膜マスト細胞におけるFcεRI, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIおよびKitの発現とフェノタイプ

分離した滑膜マスト細胞の培養に成功した。培養期間に応じて, マスト細胞の純度および細胞数の上昇を認めた。培養10週後にはマスト細胞の純度は98%に達し, 培養10週後の培養マスト細胞においてもKit, FcεRI, FcγRIおよびFcγRIIの発現を認めた(図2A)³⁰⁾。培養滑膜マスト細胞では, MC_{TC}(トリプターゼ, キマーゼの両方を発現しているマスト細胞)が85%, MC_T(トリプターゼのみを発現しているマスト細胞)が15%であった(図2B)³⁰⁾。

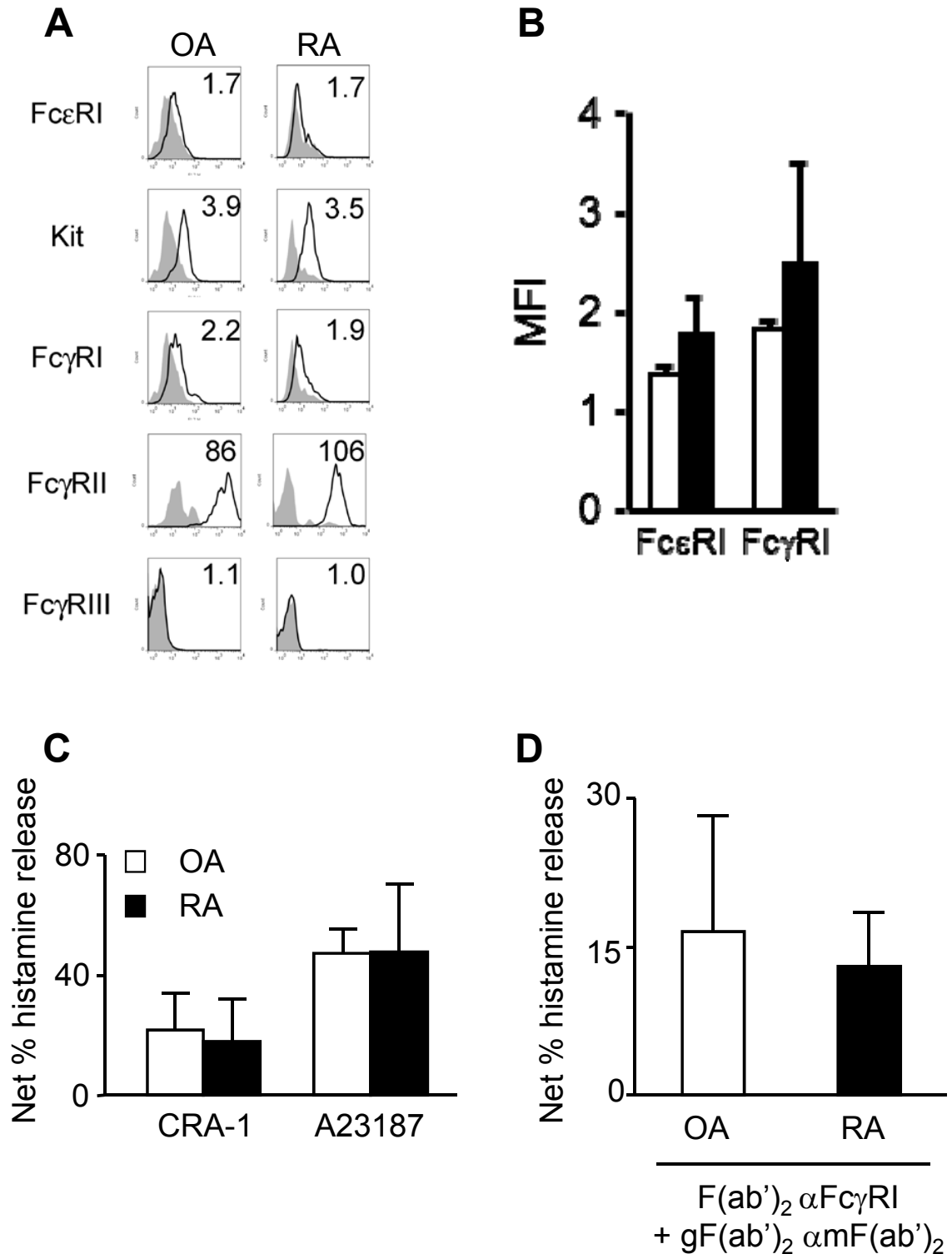


図1 初代滑膜マスト細胞におけるFcεRI, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIおよびKit発現とFcεRIおよびFcγRI架橋刺激による初代滑膜マスト細胞の脱顆粒反応

A) OAとRA患者の関節滑膜から分離直後のマスト細胞表面のFc受容体とKitの発現(フローサイトメトリー)。数値は各受容体発現量とアイソタイプ抗体との比(MFI)である。灰色のヒストグラムがアイソタイプコントロール, 黒線がFc受容体とKitの発現。B) AのFcεRIとFcγRIの発現の統計学的解析(n=3ドナー)。MFIで表示した。B~D) 白バーがOAマスト細胞, 黒バーがRAマスト細胞。C) FcεRIおよびD) FcγRI架橋刺激によるOAとRA患者の関節滑膜から分離直後のマスト細胞からのヒスタミン遊離率(文献30より改変引用)。

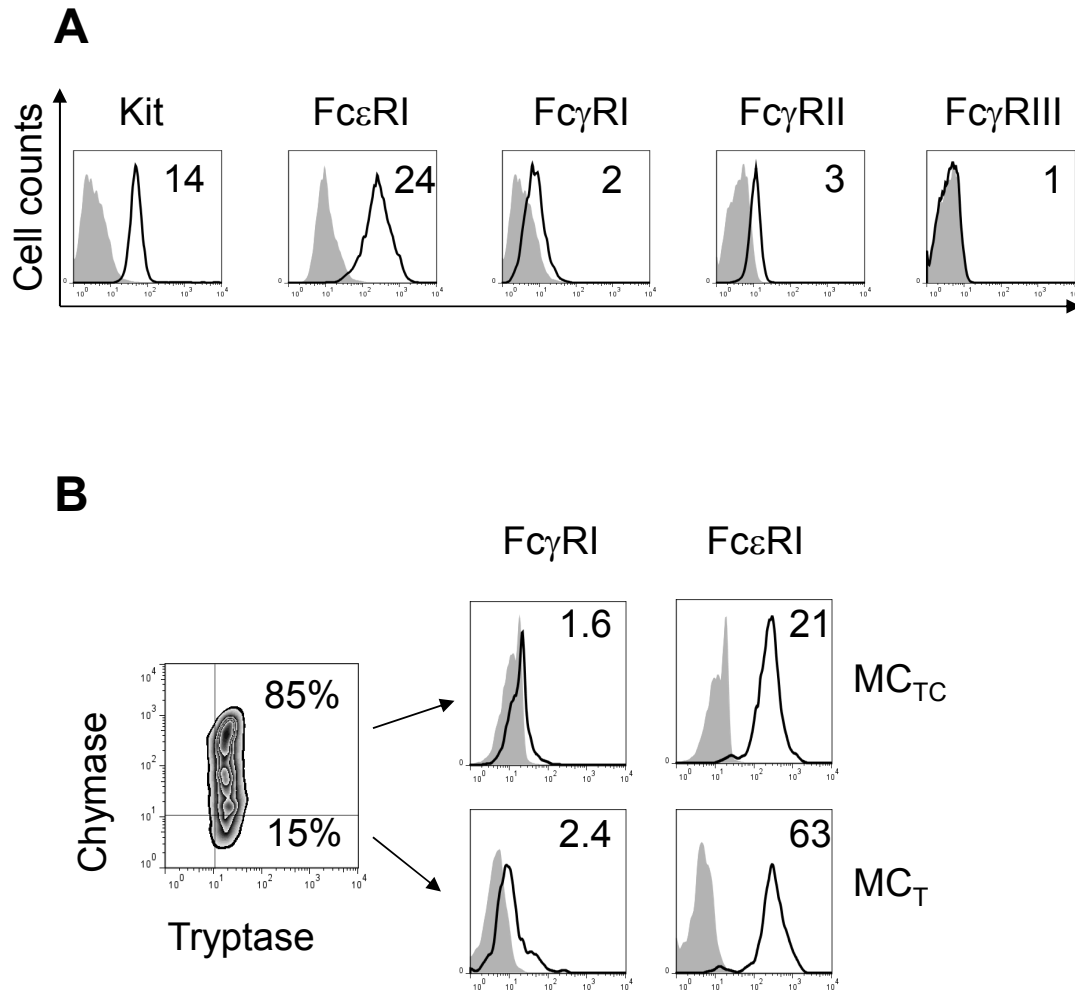


図2 培養滑膜マスト細胞におけるFcεRI, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIおよびKitの発現とフェノタイプ
 A) 培養滑膜マスト細胞表面のFc受容体とKitの発現(フローサイトメトリー)。灰色のヒストグラムがアイソタイプコントロール, 黒線がFc受容体とKitの発現。数値は各受容体発現量とアイソタイプ抗体との比である。B) MC_TとMC_{Tc}の2つのサブタイプの解析のため, 抗tryptase抗体と抗chymase抗体で染色し, フローサイトメーターによる解析を行った。MC_TとMC_{Tc}におけるFcεRIとFcγRIの発現レベル解析。灰色のヒストグラムがアイソタイプコントロール, 黒線がFc受容体の発現。ヒストグラムの数値は各受容体発現量とアイソタイプ抗体との比である(文献30より改変引用)。

FcεRIおよびFcγRIの架橋刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応, PGD₂, IL-8およびTNF-α産生
 培養滑膜マスト細胞において, FcεRI(図3)およびFcγRIの架橋刺激(図4)により脱顆粒反応, PGD₂, IL-8およびTNF-α産生を認めた³⁰⁾。

凝集IgG刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応およびTNF-α産生

凝集IgGの刺激によって培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応およびTNF-α産生を認めた(図5A, 5B)。一方, 単量体IgGは培養滑膜マスト細胞を活性化しなかった。抗FcγRI中和抗体および抗FcγRII

中和抗体を添加すると凝集IgGの刺激によるヒスタミンの遊離が有意に抑制された(図5C)³⁰⁾。

皮膚マスト細胞のMrgX2の発現

皮膚マスト細胞表面のMrgX2の発現をフローサイトメーターにて解析した。ヒト臍帯血由来培養マスト細胞, LAD2細胞および皮膚マスト細胞表面にはMrgX2が発現していたが, 肺マスト細胞には発現していなかった(図6A)³²⁾。次に健常人の皮膚マスト細胞にMrgX2が発現しているかどうかを皮膚生検組織の免疫組織化学染色によって検討したところ, 皮膚マスト細胞はMrgX2を発現していた(デー

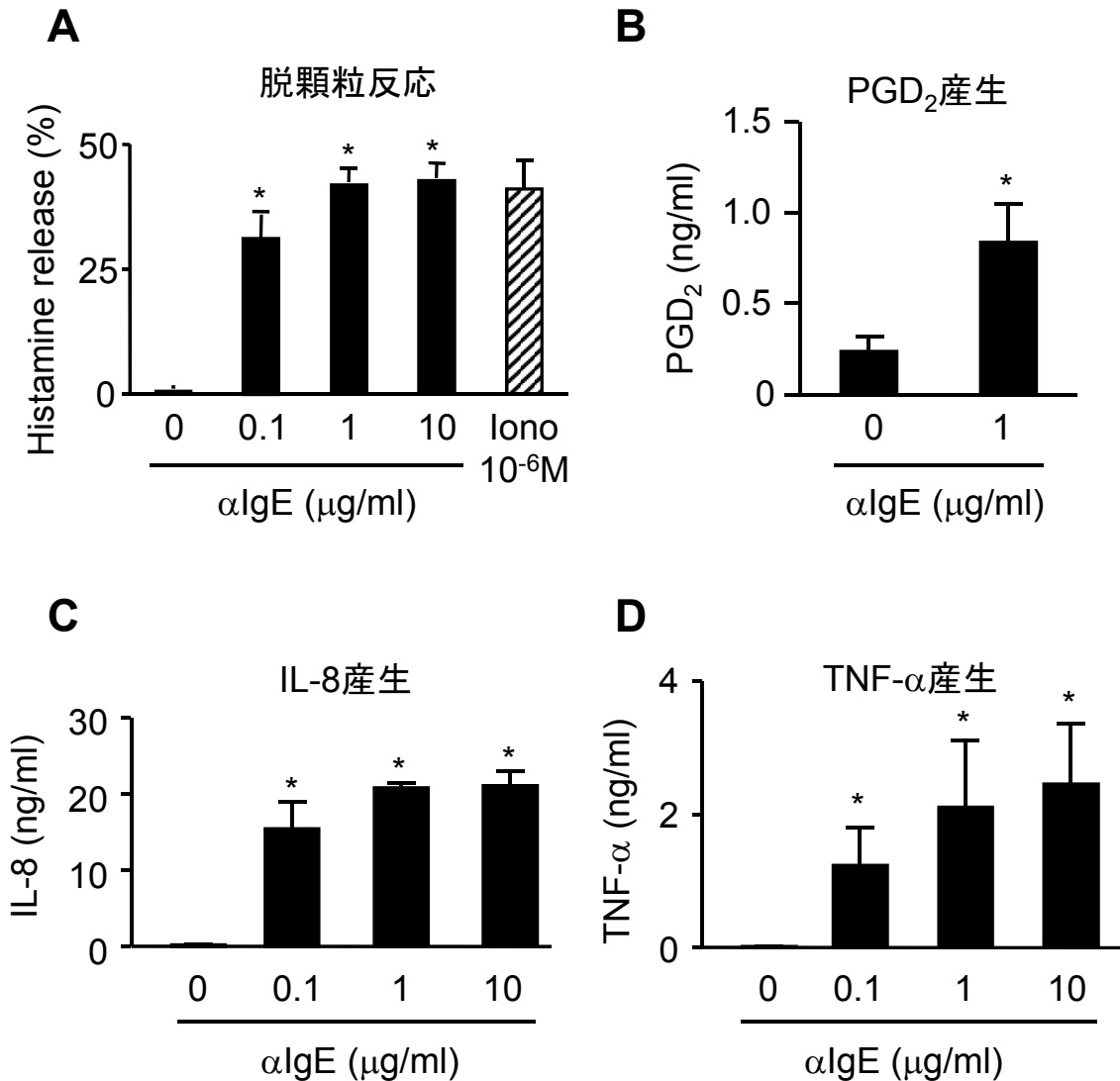


図3 FcεRIの架橋刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応, PGD₂, IL-8およびTNF-α産生
IgE感作したマスト細胞を抗FcεRI αモノクローナル抗体あるいはカルシウムイオノフォア A23187 (Iono, 10⁻⁶M) で刺激後のA) ヒスタミン遊離率 (n=3ドナー), B) PGD₂産生量 (1 x 10³個マスト細胞/100 μl, n=6ドナー), C) IL-8およびD) TNF-α産生量 (1 x 10⁵個マスト細胞/100 μl, n=4ドナー)を示す。* P<0.05 (文献30より改変引用)。

タは示さず)。また, CU患者の皮膚マスト細胞に MrgX2が発現していることを確認した(図6B)³²⁾。

CU患者と健常人(NC)の皮膚マスト細胞における MrgX2発現頻度の比較

10人の健常人と蕁麻疹活動性スコア7(UAS7)が30以上のCU患者9人の皮膚生検組織を免疫組織化学染色し, マスト細胞数, MrgX2陽性マスト細胞数およびマスト細胞のMrgX2陽性頻度を比較した。マスト細胞数には有意差はなかったが(図7A), MrgX2陽性マスト細胞数(図7B)およびマスト細胞のMrgX2陽性頻度(図7C)はCU患者において健常人と比較して統計学的有意な増加を認めた³²⁾。

サブスタンスP刺激による皮膚マスト細胞からのヒスタミン遊離とPGD₂産生はMrgX2を介する

MrgX2の役割を検討する目的にてレンチウイルスベクターを用いたshRNA技術にてヒト皮膚培養マスト細胞のMrgX2の発現抑制をおこなった。MrgX2の発現が抑制されたマスト細胞ではサブスタンスP刺激による脱顆粒とPGD₂産生は統計学的有意に抑制された(図8A, B)³²⁾。NK1-R拮抗薬CP-96345の添加ではサブスタンスP刺激による脱顆粒は抑制されなかった(データは示さず)。

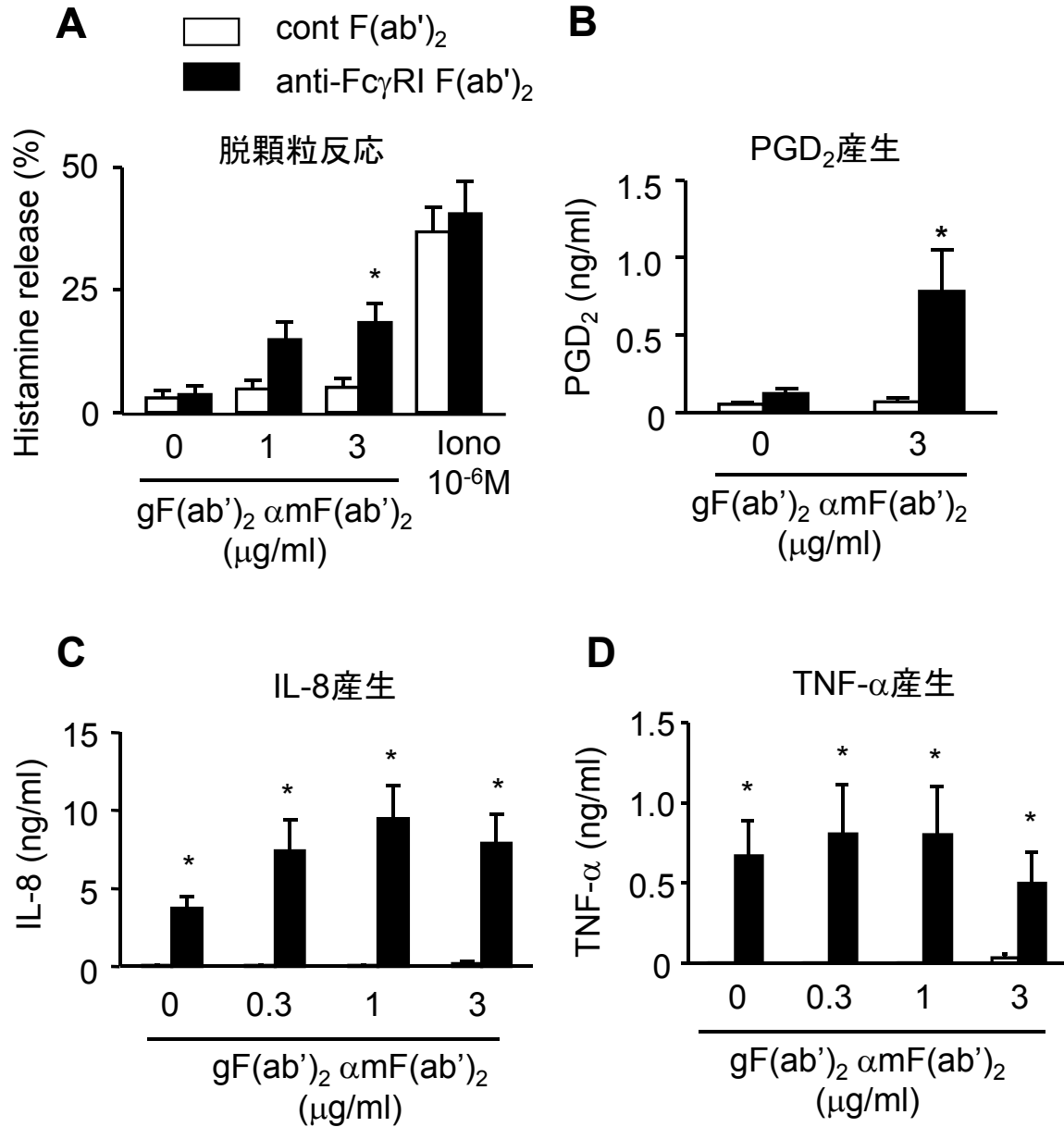


図4 FcγRIの架橋刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応、PGD₂、IL-8およびTNF-α産生。マスト細胞を抗FcγRI αモノクローナル抗体と抗マウスF(ab')₂IgG抗体(gF(ab')₂ αmF(ab')₂)あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (Iono, 10⁻⁶M)で刺激後のA) ヒスタミン遊離率 (n = 4ドナー), B) PGD₂産生量 (1 × 10⁵個マスト細胞/100 μl, n = 4ドナー), C) IL-8およびD) TNF-α産生量 (1 × 10⁵個マスト細胞/100 μl, n = 4ドナー)を示す。* P < 0.05 (文献30より改変引用)。

MBPとEPO刺激による皮膚マスト細胞からのヒスタミン遊離はMrgX2を介する

我々の検討ではUAS7が30以上のCU患者9人のうち7人の膨疹部位には好酸球の浸潤があった。好酸球顆粒タンパクがCUの膨疹部位に存在することから好酸球の関与が示唆されていた³³⁾⁻³⁵⁾。MrgX2のリガンドは強塩基性のペプチドであることから、我々はMBPとEPOがMrgX2のリガンドであるという仮説を立てた。CHO細胞にMrgX2全長を遺伝

子導入するとサブスタンスP刺激によって細胞内カルシウム濃度が増加した(図9A)³²⁾。この所見はMBPとEPOによっても観察されたがEDNでは見られなかった(図9B)。MrgX2の発現が抑制されたマスト細胞ではMBPとEPO刺激による脱顆粒は統計学的有意に抑制された(図9C)³²⁾。

4. 考察

RA患者およびOA患者の分離直後のマスト細胞

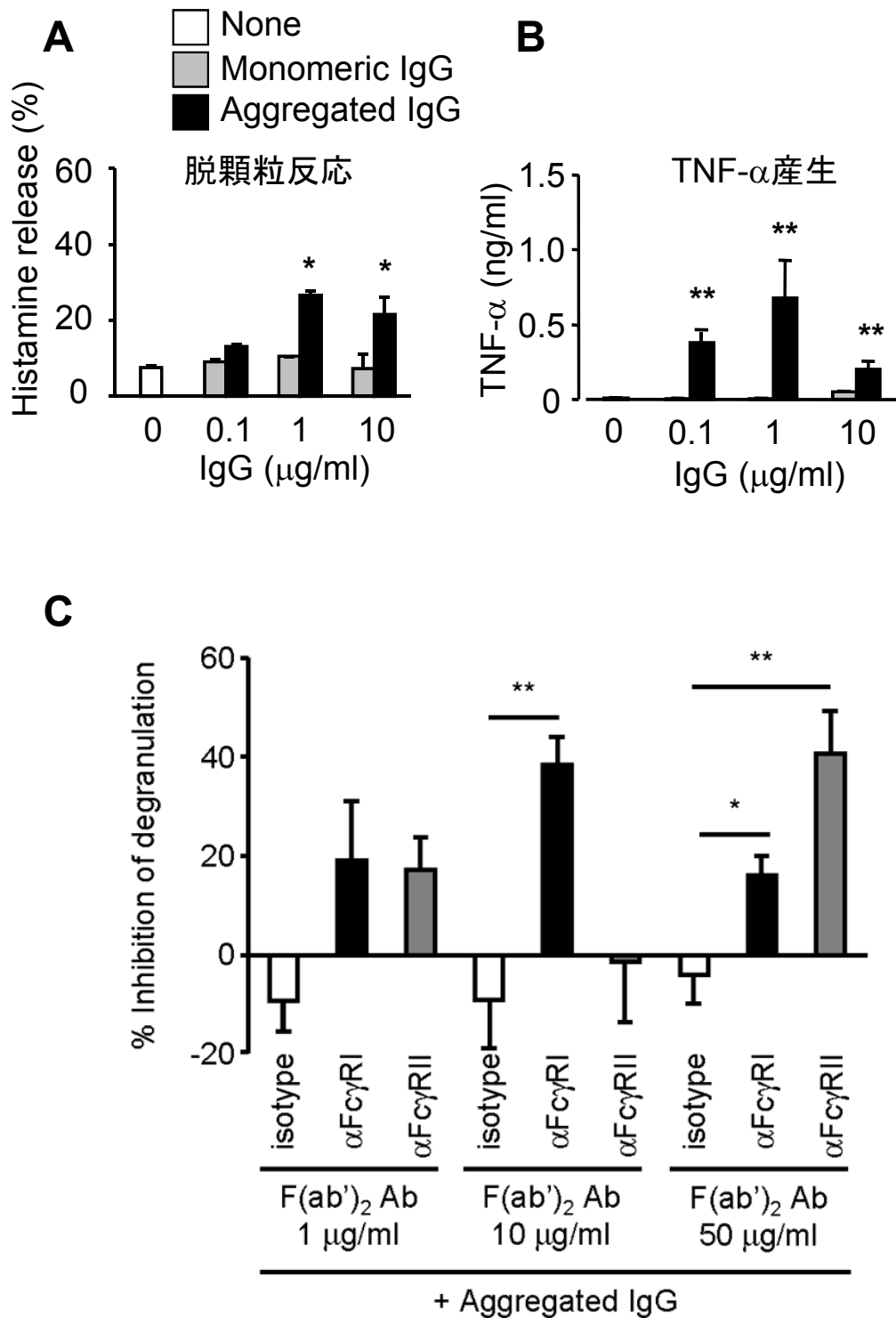


図5 凝集 IgG 刺激による培養滑膜マスト細胞の脱顆粒反応および TNF- α 産生

A) B) 凝集 IgG の刺激による培養滑膜マスト細胞からの脱顆粒反応および TNF- α 産生。n = 4 ドナー, 単量体 IgG 刺激に対し * P < 0.05, ** P < 0.01, データは mean \pm SEM で示した。C) 凝集 IgG の刺激によるヒスタミン遊離に対する抗 Fc γ RI 中和抗体および抗 Fc γ RII 中和抗体による抑制率 (%)。凝集 IgG の刺激によるヒスタミン遊離は 35 \pm 6%。n = 3-11 ドナー, * P < 0.05, ** P < 0.01, データは mean \pm SEM で示した (文献 30 より改変引用)。

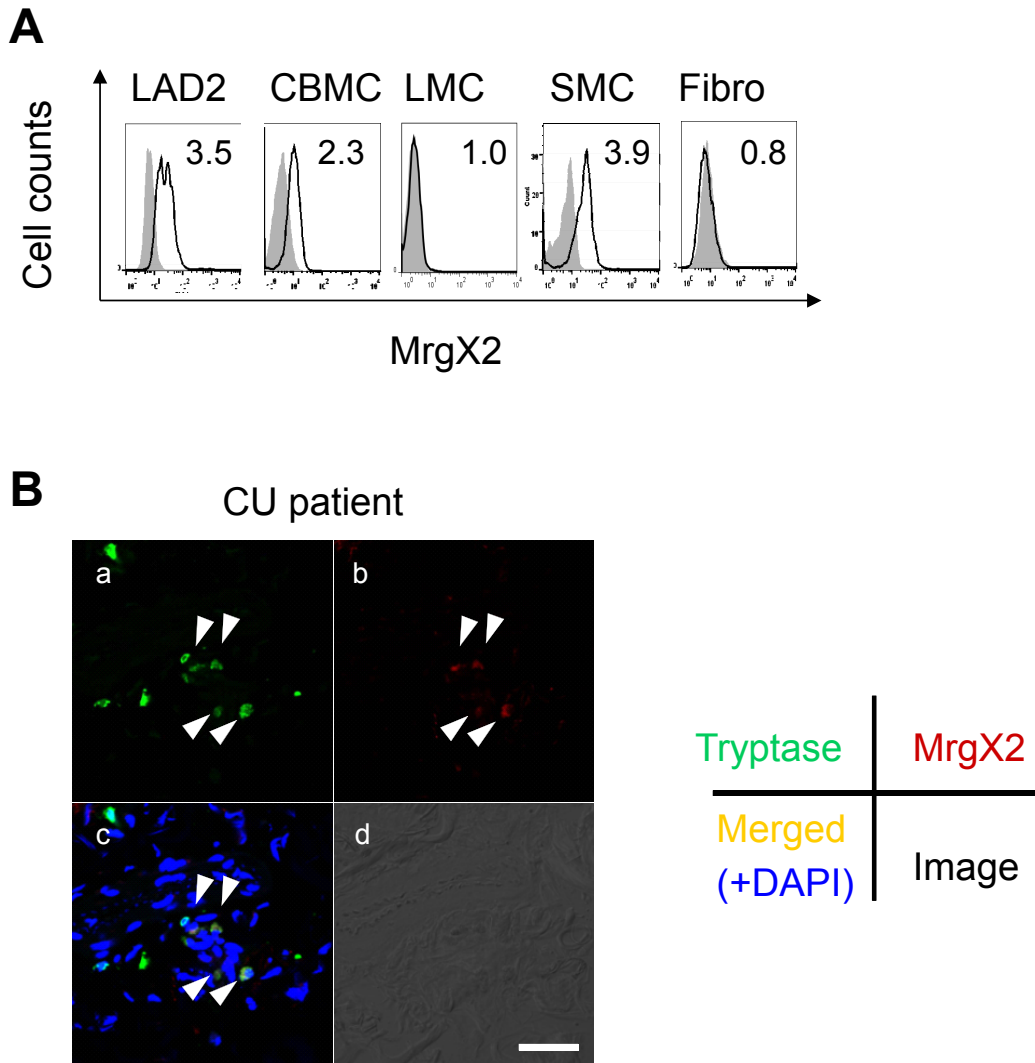


図6 皮膚マスト細胞のMrgX2の発現

A) 皮膚マスト細胞表面のMrgX2の発現。LAD2細胞，ヒト臍帯血由来培養マスト細胞（CBMC），肺マスト細胞（LMC），皮膚マスト細胞（SMC）および線維芽細胞（Fibro）表面のMrgX2発現をフローサイトメーターにて解析した。数値は各受容体発現量とアイソタイプ抗体との比である。灰色のヒストグラムがアイソタイプコントロール，黒線のヒストグラムがMrgX2の発現。B) CU患者および健常人より皮膚生検を試行し，その組織の免疫染色を行った。CU患者皮膚組織を抗MrgX2抗体（赤），抗tryptase抗体（緑）および核染色（青）したものであり，矢印はMrgX2陽性マスト細胞を示す。Bar = 50 μ m（文献32より改変引用）。

表面に発現しているFc ϵ RI，KitおよびFc γ RIには差が認められなかった。Fc ϵ RIおよびFc γ RIの架橋刺激による脱顆粒反応においても差は認められなかった。滑膜組織から培養滑膜マスト細胞の樹立に成功した。培養滑膜マスト細胞は，分離直後の滑膜マスト細胞と同様にFc γ RIを恒常的に発現し機能を持っていた。凝集IgGはFc γ RIおよびFc γ RIIを介してヒト滑膜マスト細胞を活性化させ多量のTNF- α を産生させたことから，免疫複合体はヒト滑膜マスト細胞を活性化させることが示唆された³⁰⁾。

皮膚マスト細胞は機能を持ったMrgX2を細胞表面に発現していた。重症のCU患者の膨疹部位のマスト細胞のMrgX2発現が健常人に比較して統計学的有意に増加していた。また，重症のCU患者の膨疹部位には好酸球が浸潤している症例があった。サブスタンスPのみならずMBPとEPO刺激による皮膚マスト細胞からのヒスタミン遊離はMrgX2を介していた。以上より，CU患者では神経ペプチド刺激や好酸球の活性化がマスト細胞を活性化させていることが示唆され，MrgX2がCU治療の新規分子標

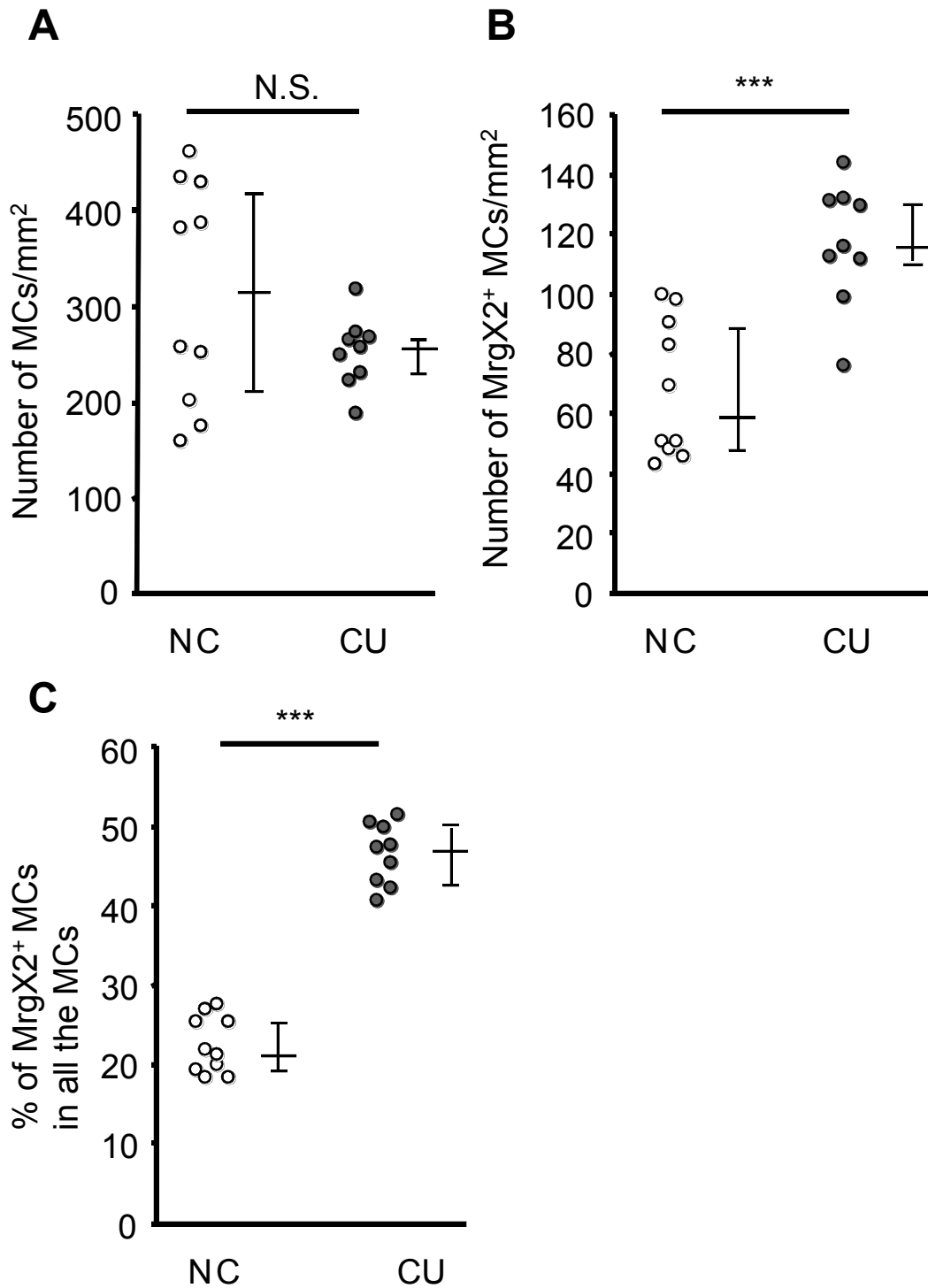


図7 CU患者と健常人 (NC) の皮膚マスト細胞における MrgX2 発現頻度の比較
 CU患者および健常人より皮膚生検を試行し、その組織の免疫染色を行った。A) マスト細胞数, B) MrgX2 陽性マスト細胞数およびC) マスト細胞の MrgX2 陽性頻度を比較した。N.S. 有意差なし。*** $P < 0.001$ データは中央値と四分範囲で示した (文献32より改変引用)。

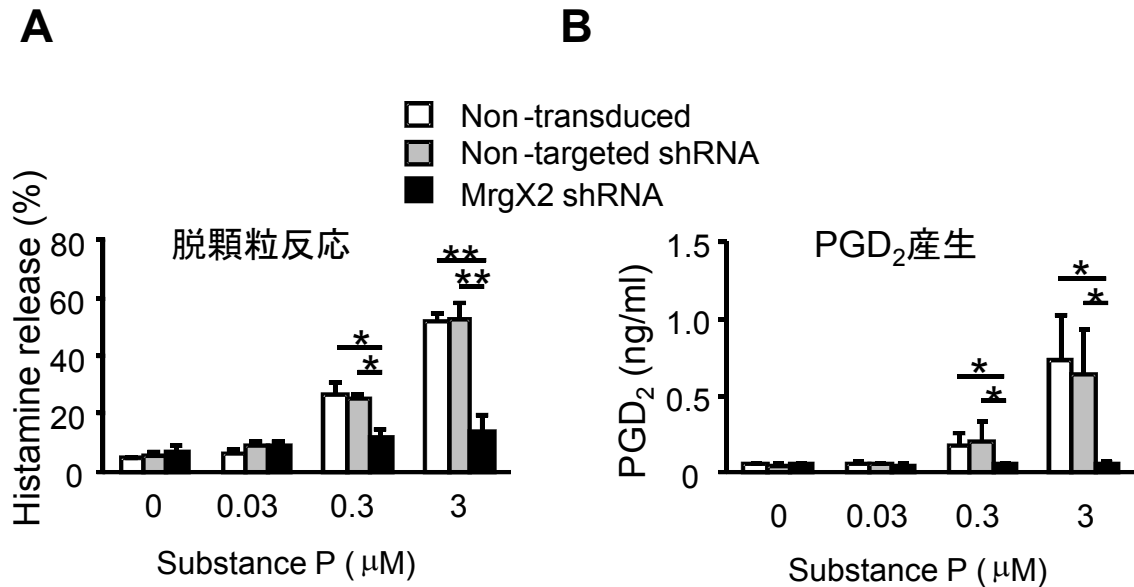


図8 サブスタンスP刺激による皮膚マスト細胞からのA) ヒスタミン遊離とB) PGD₂産生はMrgX2を介する。白バーが非処理マスト細胞, 灰色のバーがコントロールshRNAを導入したマスト細胞, 黒バーがMrgX2 shRNAを導入したマスト細胞である。n=3ドナー *P<0.05, **P<0.01 データはmean ± SEMで示した(文献32より改変引用)。

的となる可能性がある³²⁾。

5. 結 語

マスト細胞は疾患によってそのフェノタイプを変え、疾患特異的な活性化機構が存在することが示唆された。

謝辞

ここに記された研究は、平成25年度日本大学学術研究助成金〔総合研究〕による成果の一部であり、ここに深甚なる謝意を表します。

文 献

- Okayama Y, Kawakami T: Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* 2006; **34**: 97-115.
- Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB: Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002; **297**: 1689-1692.
- Corr M, Crain B: The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 2002; **169**: 6604-6609.
- Guma M, Kashiwakura J, Crain B, Kawakami Y, Beutler B, Firestein GS, et al.: JNK1 controls mast cell degranulation and IL-1β production in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 22122-22127.
- Zhou JS, Xing W, Friend DS, Austen KF, Katz HR: Mast cell deficiency in Kit(W-sh) mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J Exp Med* 2007; **204**: 2797-2802.
- Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Khun H, Van Rooijen N, Huerre M, et al.: Cutting Edge: The murine high-affinity IgG receptor FcγR4 is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2011; **186**: 1899-1903.
- Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, et al.: Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* 2011; **35**: 832-844.
- Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM: Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1984; **27**: 845-851.
- Malone DG, Irani AM, Schwartz LB, Barrett KE, Metcalfe DD: Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. *Arthritis Rheum* 1986; **29**: 956-963.
- Tetlow LC, Woolley DE: Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis* 1995; **54**: 896-903.
- Eklund KK: Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev* 2007; **217**: 38-52.
- Nigrovic PA, Lee DM: Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 2007; **217**: 19-37.
- Appelgren A, Appelgren B, Eriksson S, Kopp S, Lundberg T, Nylander M, et al.: Neuropeptides in temporomandibular joints with rheumatoid arthritis: a clinical study. *Scand J Dent Res* 1991; **99**: 519-521.
- Tang S, Huang H, Hu F, Zhou W, Guo J, Jiang H, et al.: Increased IL-33 in synovial fluid and paired serum is associated with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* 2013;

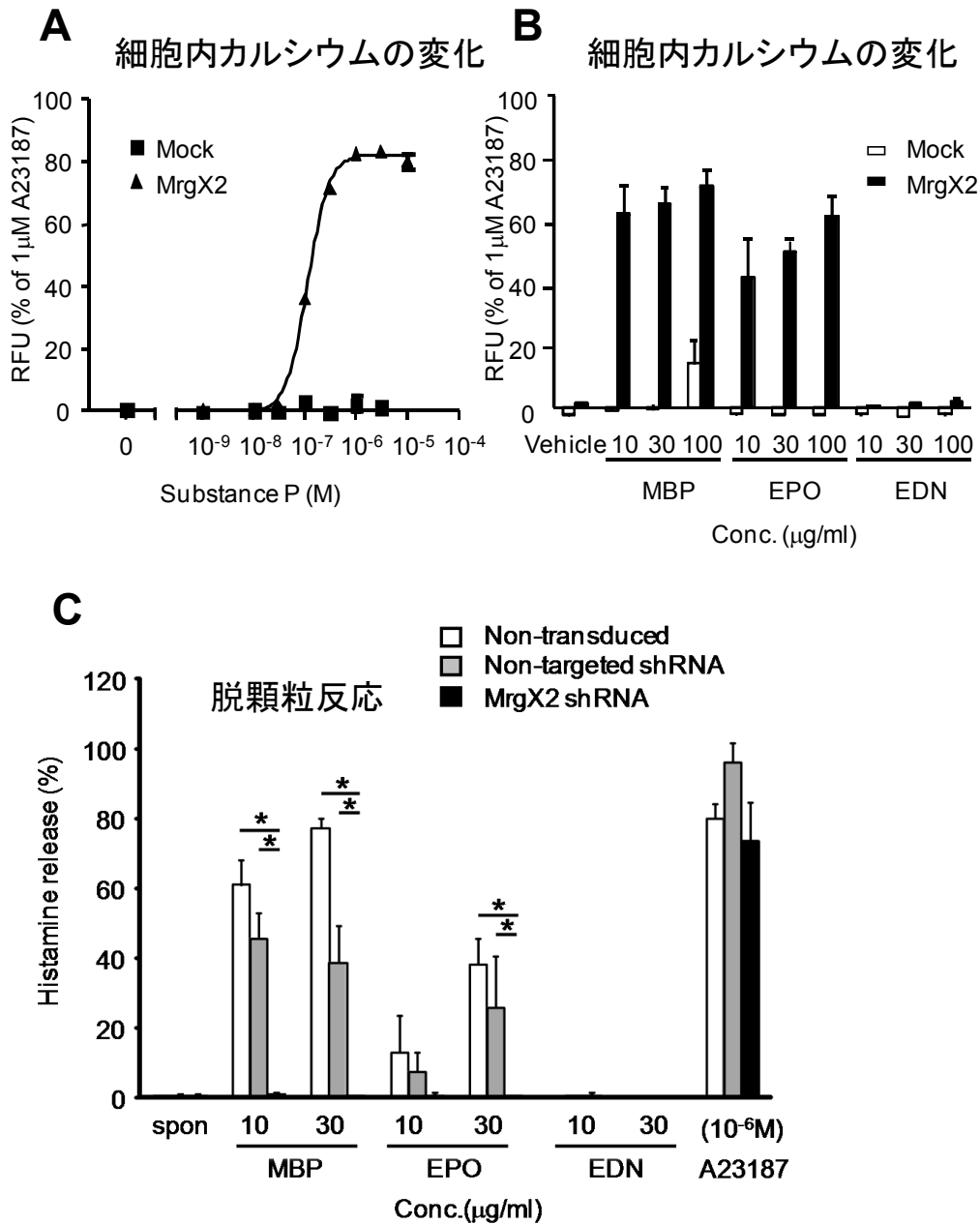


図9 MBPとEPO刺激による皮膚マスト細胞からのヒスタミン遊離はMrgX2を介する

A) B) MrgX2全長あるいはベクターのみ (Mock) を遺伝子導入したCHO細胞におけるサブスタンスP, MBP, EPOおよびEDN刺激による細胞内カルシウム濃度の変化。データは1 μM カルシウムイオノフォアA23187で刺激した際の細胞内カルシウム濃度を100とした時の%で示した。C) 白バーが非処理マスト細胞, 灰色のバーがコントロールshRNAを導入したマスト細胞, 黒バーがMrgX2 shRNAを導入したマスト細胞である。n = 3ドナー * P < 0.05 データはmean ± SEMで示した (文献32より改変引用)。

2013; 985301.

- 15) Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD: Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol* 2000; **164**: 4332-4339.
- 16) Okayama Y, Hagaman DD, Metcalfe DD: A comparison of mediators released or generated by IFN-gamma-treated human mast cells following aggregation of Fc gamma RI or Fc epsilon RI. *J Immunol* 2001; **166**: 4705-4712.
- 17) Woolhiser MR, Okayama Y, Gilfillan AM, Metcalfe DD: IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of Fc gamma RI by IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 3298-3307.
- 18) Kaplan AP, Greaves M: Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2009; **39**: 777-787.
- 19) Vonakis BM, Saini SS: New concepts in chronic urticaria. *Curr Opin Immunol* 2008; **20**: 709-716.

- 20) Lowman MA, Benyon RC, Church MK: Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. *Br J Pharmacol* 1988; **95**: 121-130.
- 21) Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK: Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol* 1988; **81**: 590-597.
- 22) Robas N, Mead E, Fidock M: MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem* 2003; **278**: 44400-44404.
- 23) Tatemoto K, Nozaki Y, Tsuda R, Konno S, Tomura K, Furuno M, et al.: Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **349**: 1322-1328.
- 24) Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, et al.: Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: 1137-1145.
- 25) Subramanian H, Kashem SW, Collington SJ, Qu H, Lambris JD, Ali H: PMX-53 as a dual CD88 antagonist and an agonist for Mas-related gene 2 (MrgX2) in human mast cells. *Mol Pharmacol* 2011; **79**: 1005-1013.
- 26) Kashem SW, Subramanian H, Collington SJ, Magotti P, Lambris JD, Ali H: G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2. *Eur J Pharmacol* 2011; **668**: 299-304.
- 27) Borici-Mazi R, Kouridakis S, Kontou-Fili K: Cutaneous responses to substance P and calcitonin gene-related peptide in chronic urticaria: the effect of cetirizine and dimethindene. *Allergy* 1999; **54**: 46-56.
- 28) Smith CH, Atkinson B, Morris RW, Hayes N, Foreman JC, Lee TH: Cutaneous responses to vasoactive intestinal polypeptide in chronic idiopathic urticaria. *Lancet* 1992; **339**: 91-93.
- 29) Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y: Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc* 2006; **1**: 2178-2183.
- 30) Lee H KJ, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y.: Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through Fc gamma RI and Fc gamma RII. *Arthritis Rheum* 2013; **65** (1): 109-119.
- 31) Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, et al.: Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and Fc epsilon RI. *Blood* 2003; **102**: 2547-2554.
- 32) Fujisawa D, Kashiwakura JI, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, et al.: Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2014; in press:
- 33) Peters MS, Schroeter AL, Kephart GM, Gleich GJ: Localization of eosinophil granule major basic protein in chronic urticaria. *J Invest Dermatol* 1983; **81**: 39-43.
- 34) Spry CJ, Tai PC, Barkans J: Tissue localization of human eosinophil cationic proteins in allergic diseases. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; **77**: 252-254.
- 35) Juhlin L, Venge P: Eosinophilic cationic protein (ECP) in skin disorders. *Acta Derm Venereol* 1991; **71**: 495-501.

HIV感染したベトナム小児患者血清におけるクラミジア・ ニューモニエ抗体陽性率について

Trinh Duy Quang¹⁾, Truong Huu Khanh²⁾, Le Quoc Thinh²⁾, Nguyen Thanh Hung²⁾,
Tang Chi Thuong²⁾, 泉 泰之¹⁾, 相澤(小峯) 志保子¹⁾, 牛島廣治¹⁾, 早川 智¹⁾

Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in HIV-infected children in Vietnam

Trinh Duy Quang¹⁾, Truong Huu Khanh²⁾, Le Quoc Thinh²⁾, Nguyen Thanh Hung²⁾,
Tang Chi Thuong²⁾, Yasuyuki IZUMI¹⁾, Shihoko AIZAWA (KOMINE)¹⁾,
Hiroshi USHIJIMA¹⁾, Satoshi HAYAKAWA¹⁾

要旨

HIV感染におけるクラミジア肺炎の合併は臨床的に重要な問題である。しかし、特に小児における罹患率は明らかでない。2004年10月から2005年9月までの1年間にホーチミン小児病院1に入院した南ベトナムのHIV感染乳児89人から採取した血液サンプルについて、クラミジア・ニューモニエに対するIgG, IgAおよびIgM抗体の血清学的スクリーニングを行った。同時にPCRによる遺伝子スクリーニングを行った。ELISAによって、血清サンプルのうち64%はクラミジア・ニューモニエに対するIgG抗体が陽性、31.5%はIgAが陽性、そして、3.4%はIgMが陽性であることが示された。1～2歳の年齢層において、IgGとIgA抗体共にもっとも高い陽性率が認められた(それぞれ75%および66.7%)。しかし、すべてのサンプルで、PCRによるクラミジア・ニューモニエ遺伝子は検出されなかった。本研究では、ベトナム小児HIV/エイズ患者におけるクラミジア・ニューモニエ罹患率が高いことが示唆された。

1. はじめに

クラミジア・ニューモニエは偏性細胞内細菌で、真核生物宿主細胞内で二相性のライフサイクルで複製する。クラミジア・ニューモニエは市中肺炎や、気管支炎、咽頭炎、副鼻腔炎などの上気道感染の約10%の原因となっている。一方、クラミジア・ニューモニエの感染の多くは無症候性であるともいわれている。感染者の多くは小児や若年層である。近年では、HIV/AIDS患者集団では、クラミジア肺炎が増加するのではないかと懸念がある。しかし、ベトナムでは、クラミジア・ニューモニエの感染は、一般集団においても、HIV感染患者においても、明らかでない。

本研究では、2004年10月から2005年9月までの1年間にChildren's Hospital 1, Ho Chi Minh City(小児病院1, ホーチミン)に入院した(ベトナム南部の)HIVに感染した小児における、クラミジア・ニュー

モニエの感染の有病率について検討した。

2. 対象及び方法

保護者の同意を得て89の血液サンプルをHIV感染患者から採取した。患者はベトナム南部の21の県の居住者である。非HIV感染対照群として、髄膜炎、ウイルス性脳炎、ギラン・バレー症候群、手足口病、おたふく風邪(ムンプス)と診断された91人の患者から血液サンプルを採取した。研究に先立ちベトナムの小児病院1と東京大学および日本大学の倫理委員会より承認を受けた。

血清学的検査として、クラミジア・ニューモニエに対する、IgG, IgA, IgM抗体価を、酵素免疫測定法で調べた(Ani LabSystems, Vantaa, Finland)。クラミジアを含む血液のDNAは、DNeasy Blood and Tissueキット(QIAGEN, 東京, 日本)を用いて抽出した。肺炎クラミジアの主要な外膜タンパク質を

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

2) 小児病院1, ホーチミン市ベトナム

Trinh Duy Quang : trnh.duyquang@nihon-u.ac.jp

コードする遺伝子を増幅するためnested PCRを行った。PCRは公開されたプライマーペアCP1とCP2（外部プライマー，CP1 (sense): 5'-TTA CAA GCC TTG CCT GTA GG-3', CP2 (anti-sense): 5'-GCG ATC CCA AAT GTT TAA GGC-3'），また，CPCとCPD（内部プライマー，CPC (sense): 5'-TTA TTA AT GAT GGT ACA ATA-3', CPD (anti-sense): 5'-ATC TAC GGC AGT AGT ATA GTT-3'）を使用して行った（Tong et al., 1993）。クラミジア・ニューモニエのKKpn-1株を陽性対照として使用した。

3. 結果及び考察

89人のHIV感染者の患者背景は以下の通りである。男児は45人，女児は44人で男女比は1対1であった。年齢は0.5ヶ月から65ヶ月で，51.7%が6ヶ月未満の乳児であった。入院の理由は，呼吸器症状が71.6%と最も多く，次いで下痢（8.1%），及び消耗症候群（6.8%）であった。CD4細胞数は89例中14人の患者で測定されており，40～2,403 cells/mm³，中央値が648であった。HIV-1サブタイプは，全例でCRF01-AEが検出された。

対照群では男児57人，女児34人で男女比は1.67対1であった。年齢は2ヶ月から12歳であった。72.5%が5歳以下の乳幼児，8.8%が生後6ヶ月未満であった。入院の理由として最も多いのが髄膜炎で66%を占め，次いで手足口病が25.3%であった。

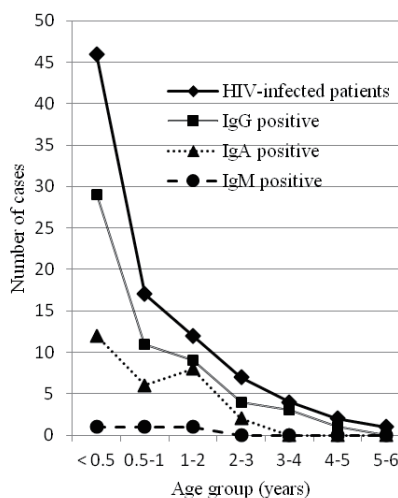
血清学的検査の結果は，HIV患者中57検体（64%）が抗クラミジア・ニューモニエIgG抗体陽性であっ

た。28検体（31.5%）がIgAが陽性であった，また，3つのサンプル（3.4%）は，IgM抗体陽性であった。これらの抗体陽性検体のうち，23サンプルは，IgGおよびIgAの両方に陽性であった。2サンプルはIgG抗体，IgA，およびIgM抗体の3種類すべて陽性であった。しかし，全てのサンプルにおいてクラミジア・ニューモニエはPCRで検出できなかった。調査対象集団と血清陽性被験者の年齢分布を図1Aに示す。

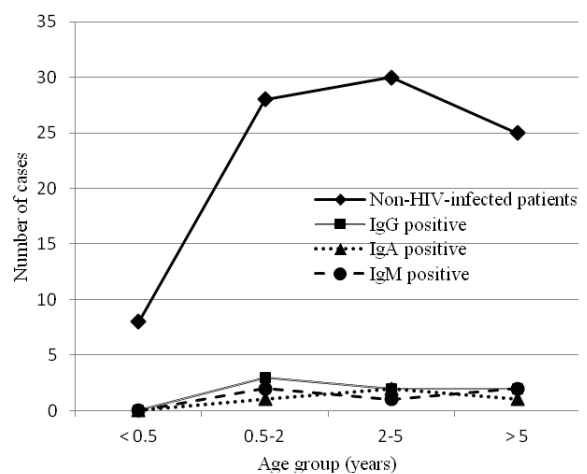
HIV感染群に比較して，対照群では抗クラミジア・ニューモニエIgG抗体，IgA抗体を持つ患者の割合はそれぞれ7.7%および4.4%と有意に少なかったが，IgM抗体については両群で差は認められなかった。この結果によりクラミジア・ニューモニエの既感染率は，HIVに感染した子供に高いことが示された。

HIVに感染した小児におけるクラミジア・ニューモニエに対するIgGおよびIgA抗体の年齢に関連した陽性率を，図2Aに示す。6ヶ月未満の乳児のIgG陽性率は63%であり，IgAの抗体陽性の割合は26.1%であった。

対照群では，クラミジア・ニューモニエに対する抗体は，6ヶ月未満の患者において検出されなかった。HIV感染者では，妊娠可能年齢の女性の多くがクラミジア・ニューモニエに感染しており，生涯の早い段階で（乳幼児期に）初感染が起きることが示唆された。さらに，IgGおよびIgA抗体の陽性率は1-2歳でもっとも高く，IgA抗体陽性率は2歳児以上



A. HIV-infected patients:



B. Non-HIV-infected patients:

図1 Age distributions of the study populations and *C. pneumoniae*-seropositive subjects.

では減少している。(図 2 A) 3歳児以上ではIgA, IgM抗体陽性者はともにみられない。(図 1A, 2A) この結果は、抗ウイルス療法が行われないままに成長した年長児では免疫機能の破壊がより深刻な可能性を示唆する。

結論として、ベトナムにおけるクラミジア・ニューモニエ感染症の疫学調査では、乳幼児やHIV / AIDSの小児におけるクラミジア・ニューモニエの抗体陽性率が高いことが明らかになった。日本ではHIV母子感染はほぼ完全にコントロールされているが、これがまだ達成されていない途上国では、不幸にも垂直感染をきたした児に対して、十分な医学的管理を行うことが必要である。特に呼吸器症状を示す小児にはHIV感染の有無にかかわらず、クラミ

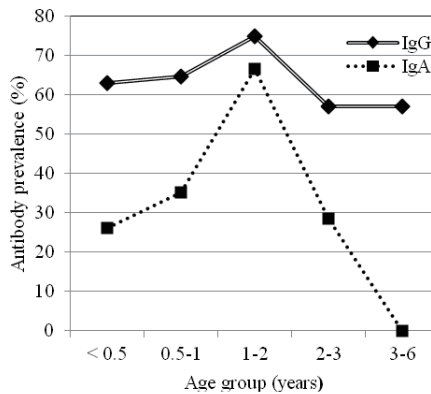
ジアニューモニエを鑑別にいれて診療を行う必要がある。

謝辞

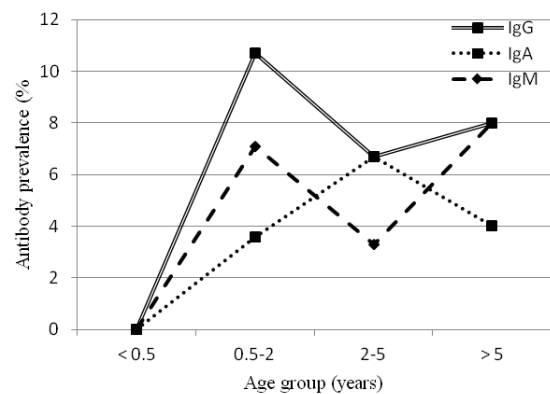
本研究は、2010-2012 JSPS特別研究員奨励費ならびに日本大学医学部50周年医学奨励研究費の助成を受けた。

参考文献

- 1) Trinh QD, Pham NT, Le Nguyen NT, Lam BQ, Le Phan KT, Truong KH, Le TQ, Nguyen HT, Tang TC, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Ushijima H, and Hayakawa S. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in HIV-infected children in Vietnam. *J Infect Chemother.* 2013; **19**: 538-541.
- 2) Tong CY, Sillis M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. *J Clin Pathol.* 1993; **46**: 313-317.



A. HIV-infected patients:



B. Non-HIV-infected patients:

図2 Prevalences of antibodies against *C. pneumoniae* by age group.

低酸素下運動後の圧受容器反射機能の変化

柳田 亮¹⁾, 小川洋二郎¹⁾, 加藤 実²⁾, 鈴木孝浩²⁾, 岩崎賢一¹⁾

Changes of cardiac baroreflex after normobaric hypoxic exercise

Ryo YANAGIDA¹⁾, Yojiro OGAWA¹⁾, Jitsu KATO²⁾, Takahiro SUZUKI²⁾, Ken-ichi IWASAKI¹⁾

要旨

健康被験者9名にて、常酸素下(酸素濃度21%)での運動と低酸素下(15%)での運動が圧受容器反射機能に及ぼす影響を評価した。圧受容器反射機能を周波数解析・伝達関数解析を用い運動前後で評価した結果、常酸素下運動と比較して低酸素下運動では、圧受容器反射機能がより低下したが、有意な差とはならなかった。

1. はじめに

我々の研究グループでは、低酸素環境が人体に及ぼす影響を、循環調節機能から評価しており、その調節機能が悪化する可能性を明らかにした¹⁾。本研究では、新たに低酸素下“運動”後の生理学的影響を血圧調節機能のひとつである圧受容器反射機能(動脈圧受容器心拍反射機能)の観点から評価することを目的とした。

2. 対象及び方法

実験説明書を用いて説明し、同意を得た健康被験者9名(年齢 22.8 ± 2.0 歳, 身長 168.8 ± 5.2 cm, 体重 62.7 ± 9.0 kg: 平均値 \pm 標準偏差)を対象とした。仰臥位安静状態で、心電計、非観血的連続血圧計を装着し、十分な安静(最低15分)を取った後に6分間のpre dataを測定した。その後、自転車エルゴメーターにて30分間の運動負荷(80watt, 60回転/分)を行った。運動負荷直後に仰臥位安静にし、運動後15-21分までのpost dataを同様に測定した。運動負荷中の酸素濃度を常酸素(21%)と低酸素(15%)に分けて、各被験者に対し1週間以上あけて無作為・

一重盲検・交互試験で行い、常酸素下と低酸素下の運動が圧受容器反射機能に及ぼす影響を評価した。圧受容器反射機能は、過去の研究と同様に心拍と血圧の自発変動を周波数解析・伝達関数解析を用いることで評価した^{1),2)}。

3. 結果

動脈圧受容器心臓反射機能の指標であるGainHFは常酸素下運動の前後(29.4 \rightarrow 26.7 ms/mmHg)、低酸素下運動の前後(26.4 \rightarrow 21.5 ms/mmHg)でも平均値は低下したが、統計的に有意な変化ではなかった。

4. 考察

過去の研究成果から、常酸素下運動と比較して低酸素下運動では、圧受容器反射機能がより低下すると予測した。本研究結果においては、常酸素下運動前後のGainHFの減少度(-2.7 ms/mmHg)と比較して、低酸素下運動前後のGainHFの減少度(-4.9 ms/mmHg)はやや大きいものの有意な差とはならなかった。この理由として、被験者の人数が少な

1) 日本大学医学部社会医学系衛生学分野
2) 日本大学医学部麻酔科学系麻酔科学分野
柳田 亮: yanagida.ryo@nihon-u.ac.jp

表1 心拍数・血圧および心拍・血圧変動の周波数解析・伝達関数解析

	常酸素下運動		低酸素下運動	
	pre	post	pre	post
HR (beats/min)	55.7±1.4	56.0±1.7	57.3±2.1	61.6±2.2*
SBP (mmHg)	114.5±2.9	114.3±4.6	116.6±3.1	114.4±3.8
LFsbp (mmHg ²)	5.2±1.4	5.1±1.1	5.5±1.2	8.5±2.8
HFsbp (mmHg ²)	0.6±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	1.1±0.3*
LFrr (ms ²)	1230.7±391.5	1165.6±347.7	1269.2±410.9	1102.0±379.1
HFrr (ms ²)	1192.3±348.9	926.4±175.0	858.1±215.7	875.8±199.9
LF/HF ratio	1.0±1.1	1.3±1.9	1.5±1.9	1.3±1.9
GainLF (ms/mmHg)	12.6±1.5	13.2±2.0	12.7±1.8	11.9±2.9
GainHF (ms/mmHg)	29.4±4.3	26.7±3.9	26.4±3.1	21.5±3.9
CoherenceLF (unit)	0.5±0.03	0.6±0.03	0.6±0.03	0.6±0.05
CoherenceHF (unit)	0.6±0.05	0.6±0.03	0.6±0.03	0.6±0.05

* p<0.05 vs Pre

HR, heart rate; SBP, systolic blood pressure; LFsbp and HFsbp, power in low- and high-frequency ranges of SBP variability respectively; LFrr and HFrr, power in low- and high-frequency ranges of R-R interval variability respectively; LF/HF ratio, the ratio of low- and high-frequency power of RR variability; GainLF, transfer function gain in low-frequency range; GainHF, transfer function gain in high-frequency range; CoherenceLF, coherence in low-frequency range; CoherenceHF, coherence in high-frequency range.

かった点と運動中の負荷量が80wattと一定であり、個人の体力の差を考慮に入れていなかった点が挙げられる。

5. 結 語

常酸素下運動と比較して低酸素下運動では、圧受容器反射機能がより低下したが、有意な差とはならなかった。

文 献

- 1) Iwasaki, K., Ogawa, Y., Aoki, K., Saitoh, T., Otsubo, A., Shibata, S.. Cardiovascular regulation response to hypoxia during stepwise decreases from 21% to 15% inhaled oxygen. *Aviat Space Environ Med* **77**: 1015-1019, 2006.
- 2) 柳田 亮, 小川 洋二郎, 水落 文夫, 鈴木 典, 高橋 正則, 岩崎 賢一: 高地トレーニング合宿におけるトレーニング効果と圧受容器反射機能の関係. *日本衛生学雑誌*, **67**, 417-422 2012

TGF- β 1抑制性PIポリアミドによる肝癌治療法の開発

高山忠利¹⁾, 高木恵子¹⁾, 森口正倫¹⁾, 藤原恭子²⁾

Development of PI polyamide targeting TGF- β 1 for liver cancer treatment

Tadatoshi TAKAYAMA¹⁾, Keiko TAKAGI¹⁾, Masamichi MORIGUCHI¹⁾,
Kyoko FUJIWARA²⁾

要旨

新規遺伝子制御薬ピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いてTGF- β 1の発現抑制を試み、ヒト肝癌細胞株(HepG2)に対する抗腫瘍効果を培養系で検討した。TGF- β 1抑制性PIP投与により、TGF- β 1の発現レベルが有意に抑制された($p < 0.05$)。また、ゲル内コロニー形成試験において肝癌細胞の足場非依存性の増殖が有意に抑制され($p < 0.05$)、Matrigel invasion アッセイでも細胞の浸潤を抑制する機能が示された。本研究結果より、TGF- β 1をターゲットとしたPIPは、肝癌治療薬候補として期待できると思われる。

1. はじめに

Transforming growth factor- β (TGF- β) は正常線維芽細胞が足場非依存性増殖能を獲得する際に必要な因子として発見され、肝癌を含む様々な癌において浸潤、転移、血管新生に際し促進的に働くことが知られている。従って、TGF- β の機能を阻害することにより、癌の進行を抑制することが期待できる。これまでに我々は配列特異的にDNAに結合するピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いた遺伝子発現制御薬の開発を行ってきた。カリフォルニア工科大学のダーバンらにより開発されたPIPは(Ref.1)、高い親和性と特異性で二重らせんDNA副溝に結合し、プロモーターの転写因子結合サイトを認識するように設計した場合は、下流の遺伝子の転写を阻害する事が可能である。特別なドラッグデリバリーシステムを要せず細胞内に取り込まれ、siRNAよりも安定であることから、新規の遺伝子発現制御薬として有望な分子である。PIPの哺乳動物細胞への作用を検証した研究として、代表者らは、MMP-9抑制性PIPの投与により、ヌードマウ

ス脾臓に移植したヒト大腸癌細胞株の肝転移が減少することを報告している(Ref.2)。また、酸化低密度リポ蛋白(LDL)受容体(LOX-1)に対するPIPがヒト血管内皮細胞の酸化LDLの取り込みを抑え、その結果アポトーシスを抑制するとの報告がある(Ref.3)。本研究においては、TGF- β 1抑制性PIPを設計し、ヒト肝癌細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。

2. 対象および方法

FSE2(脂肪特異性配列2)近傍にTGF- β 1抑制性PIPであるGB1101(図1)を作製し、ヒト肝癌細胞株(HepG2)に対する遺伝子発現量および機能を検討した。

1) 遺伝子発現量の検討

HepG2を10cmシャーレに 2×10^5 細胞/ml培養し、TGF- β 1抑制性PIPを $0.5 \mu\text{M} \sim 5 \mu\text{M}$ 濃度で投与し、24時間後RNAを採取し、real-time RT PCRによりTGF- β 1の発現量を調べた。

1) 日本大学医学部外科学系消化器外科学分野
2) 日本大学医学部内科学系総合内科学分野
高山忠利: takayama.tadatoshi@nihon-u.ac.jp

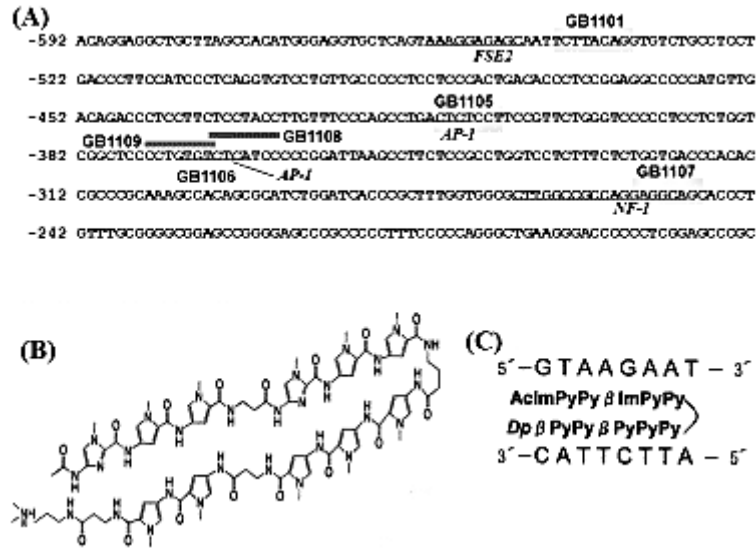


図1 TGF-β1抑制性PIPの設計

A) ヒトTGF-β1遺伝子プロモーターの配列と設計済みもしくは予定のPIPの配置。下線部は転写因子結合部位、転写因子はイタリックで示す。灰色のマーカーもしくは太い灰色線はPIPの認識部位。(B) GB1101の構造式。(C) GB1101によるDNA認識様式。

2) 培養系での機能検証

0.5μM ~ 3μMのTGF-β1抑制性PIP存在下および非存在下でHepG2の培養を行い、ゲル内コロニー形成試験により足場非依存性の増殖能、Matrigel invasion アッセイにより細胞浸潤能を評価した。

3. 結果

1) TGF-β1抑制性PIPを0.5μM ~ 5μM濃度で投与した結果、5μMの濃度でHepG2におけるTGF-β1の

発現レベルが有意に抑制された ($P < 0.05$) (図2A)。

2) ゲル内コロニー形成試験において、TGF-β1抑制性PIP投与後14日に100μm以上の大きさのコロニーを計測した結果、1μM以上の濃度がコロニー形成を有意に抑制した ($P < 0.05$) (図2B)。また、Matrigel invasion アッセイでは2μMのTGF-β1抑制性PIP投与によりコントロールと比べて細胞の浸潤を抑制した。

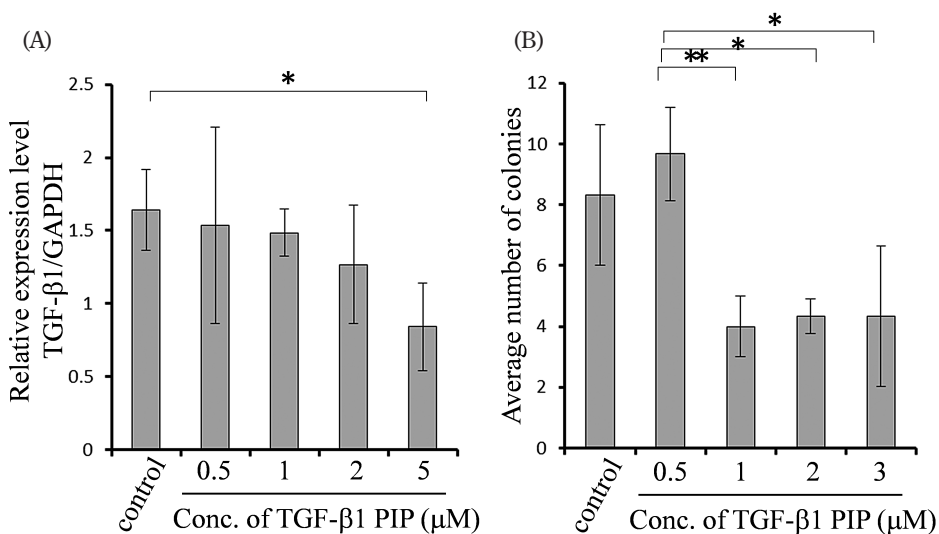


図2 肝癌細胞株HepG2に対するTGF-β1 PIPの効果
(A) Real time PCRによるTGF-β1 mRNA発現量の定量。(B) 足場非依存性コロニー形成能の定量。

4. 考 察

TGF- β 1プロモーターをターゲットとしたPIPは、TGF- β 1の発現を抑制し、肝癌細胞の足場非依存性の増殖と浸潤を抑制する機能を有すると考えられた。TGF- β が癌細胞の遊走・浸潤、血管新生に対し促進的に働くとする既存の研究から、TGF- β 1をターゲットとしたPIPは肝癌の治療薬候補として期待できると思われる。

文 献

- 1) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem* 2001; **9**: 2215-2235.
- 2) Wang X, Nagase H, Watanabe T, et al. Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer Sci.*2010; **101**: 759-766.
- 3) Ueno T, Fukuda N, Tsunemi A, et al. A novel gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function. *J Hypertens.* 2009; **27**: 508-516.

「地震後めまい症候群」に関する研究

野村泰之¹⁾, 戸井輝夫¹⁾, 池田真紀²⁾

Study of Post Earthquake Dizziness Syndrome

Yasuyuki NOMURA¹⁾, Teruo TOI¹⁾, Maki IKEDA²⁾

要旨

2011年3月11日の東日本大震災の直後から、実際には地震が起きていないにも関わらずあたかも揺れているかのようなめまいを自覚する人々が頻出し、俗に「地震酔い」と呼ばれるようになった。本研究では3000名以上への質問紙票調査を施行しその病態の解明をおこなった。その結果、有訴者の特徴として女性に多く、青壮年に多く、乗り物酔いの易感受性が関与し、めまいの既往には相関しないことなどが解明された、また症状としては室内座位などの静止時に1分程の揺れる感じが多く、一般的めまい疾患に伴う自律神経症状等の随伴症状は少なかった。

〈はじめに〉

2011年3月11日、日本は東北地方沖合に震源をもつマグニチュード9.0、最大震度7の巨大地震にみまわれた。そして地震後に、実際には地震が起きていないにも関わらずあたかも揺れているかのようなめまいを自覚する人々が頻出するようになった。自覚する人は震源地に近い東北から関東地方にかけて非常に多く存在することがニュース等でも知られるようになり、船酔いや車酔いといった動揺病^{1), 2)}に準じて俗に“地震酔い”ともよばれていた。これまで世界において大きな地震の後にめまいを生じた報告がいくつかあるが、今回日本で認められたような非常に多数の人々が症状を訴えるめまいの報告は渉猟されず、我々はこのめまいの病態と本質を探るために自己記入式質問紙法による疫学研究を実施し、これまで報告されたことのない数々の症候を明らかにして「地震後めまい症候群 (Post Earthquake Dizziness Syndrome: 以下 PEDS)」と呼称した³⁾。医学部創立50周年助成金研究ではその解析の一部を

担わせていただいた。

〈方法と対象〉

3月11日の東日本大地震のあと、東京および近郊の都市で、質問紙法による疫学調査をおこなった。質問紙法は、地震後のめまい症状に関する自己記入アンケート式の質問紙を作成し、地震後約2か月間以内に配布回収して約3000名から回答を得た。

配布した対象の内訳は、東京都にある日本大学附属板橋病院に勤務する一般成人および千葉県の学童、東京都と福島県にある3つの医療機関の患者である。本報告の結果では一般健常人の疫学をみるために、東京都の一般成人および3つの学校の協力のもとに施行した千葉県の学童の回収結果について報告する。統計処理は両群とも多変量解析、多重ロジスティック解析をおこなった。本研究は日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究倫理委員会の承認を得て施行した。

1) 日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野
2) 日本大学医学部公衆衛生学分野
野村泰之: nomusan@siren.ocn.ne.jp

〈結果〉

成人群は日本大学医学部附属板橋病院の成人職員1928名に質問紙を配布し1186名の回答を得て、回収率は61.5%であった。

学童群は、成人と同様の質問紙調査を千葉県の小、中、高校生に地震後約2か月間で実施した。各校の協力のもとに1926名に配布し1862名の回答を得て、回収率96.7%であった。内訳は小学生157名（質問紙の内容に回答出来る学年として5、6年生のみを対象とした。男子95名、女子62名。）、中学生721名（男子510名、女子211名）、高校生984名（男子692名、女子292名）であった。

数々の質問のうちからPEDSの特徴を示すとみなした結果項目を示す。

有訴者率：実際に地震が生じていない時でもあたかも地震が生じているかのごとき揺れを自覚した人の割合、すなわちPEDSの有訴者率は成人、学童ともに有意に女性に多かった。成人1186名ではPEDSを自覚した女性92.1%に対し男性は76.4%であり、学童1862名ではPEDSを自覚した女子73.2%に対し男子は53.1%でありいずれも有意差を認めた ($p<0.01$)。

年齢分布：PEDSを自覚した成人群の年齢を10歳ごとに区切った年齢分布でみると、20歳代の有訴率は90.8%、30歳代は88.9%、40歳代は89.5%、50歳代は77.5%、60歳以上は75.0%であった。50歳未満の者たちが50歳以上に対して有意に罹患していることがわかった ($p<0.01$)。

学童群は小学5年生から高校3年生までなので、その年齢は10歳から18歳であった。小学生の有訴率が73.9%であったのに対して中学生高校生ともに57.9%であり、小学生と中学生以上との間に有意差を認めた ($p<0.01$)。

動揺病の素因 (図1)：過去に乗り物酔いや船酔いをしやすかったかどうか、いわゆる動揺病にかかりやすいかどうかを尋ねた。成人群では、もともと乗り物酔いや船酔いをしやすい人の91.7%がPEDSにかかっていたものの、乗り物酔いや船酔いをしにくい人は84.0%しかPEDSにかかっておらず、もともと乗り物酔いや船酔いをしやすいの方が有意にPEDSに罹患していた ($p<0.01$)。学童群ではもともと乗り物酔いや船酔いをしやすい人の66.1%がPEDSにかかっており、やはり乗り物酔いや船酔い

動揺病の易罹患性の素因

成人、学童ともに、乗り物酔いや船酔いをしやすい人が有意に罹患していた。

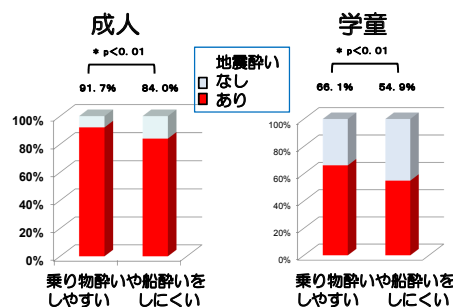
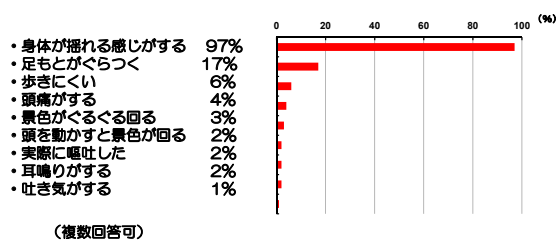


図1 動揺病の易感受性：成人、学童ともに乗り物酔いや船酔いをしやすい人が有意に罹患していた。

をしにくい人の54.9%との間に有意差を認めた ($p<0.01$)。

めまいの性状 (図2)：有訴者たちが自覚しためまいの性状については、景色がぐるぐる回るといった回転性のめまいや頭位性に生じるめまいではなく、身体が揺れる感じがするという訴えが多かった。成人群の97%に認められたが、学童群でも同様に最多であった。嘔気、嘔吐というような随伴症状、自律神経症状は有訴者全体としては極めて少なかったが、医療機関を受診した患者群ではそれらが認められる割合が高かった。めまいの持続時間としては1分以内が多く、めまいを自覚する場所はほとんど屋内であった。椅子などに座っている時の自覚が最も多く、次いで立位であった。歩いている時のような体動時にはめまいの自覚が少なかった。

めまいの性状について (成人)



(複数回答可)
有訴者全体では随伴症状、自律神経症状が極めて少ないが、医療機関受診者群では嘔気嘔吐などの自律神経症状の随伴が多くなる

図2 めまいの性状：身体が揺れる感じがほとんどであり、随伴症状は少ない。

〈考察〉

東日本大震災のあと、東日本では多くの人々がめまい、通称「地震酔い」を経験した。実際にはたしてどの程度の人々が経験していたかは不明であったが、本研究によって成人の8～9割、学童の5～7割が自覚していたことがわかった。性別ではいずれも女性が有意に多い。年齢的には成人では50歳以下の年齢層が多く、学童では中高生よりも小学生に多かった。一般的な動揺病の場合、たとえば乗り物酔いの罹患年齢は小学生高学年にピークを認めるが²⁾、動揺病の適応を獲得した成人では苦手の刺激を避けようという対処も加わって罹患率が下がる。今回の地震後には、子供たちに比して成人のほうが地震酔いを訴えていたような印象があったが、実際に成人の有訴率が高かった。また涉猟した大地震に関する世界のめまいの報告の多くが、心理的なストレスやPTSD（外傷後ストレス症候群）のような情動の関与がめまいを誘発、増悪させているのではないかと考察している⁴⁷⁾。

もともと乗り物酔いや船酔いにかかりやすかった人たち、すなわち動揺病に易感受性のあった人たちが有意に多くPEDSにかかっていた。ひとたび乗り物酔いを経験してしまうと、生理的な機能面だけでなく、自分は乗り物酔いしやすいという情動的な苦手意識を持つことになり、心理的な不安感の増強がより前庭平衡障害としてのめまい感と自律神経障害としての冷汗、嘔気、嘔吐などを惹起しやすいと考えられる²⁾。今回のPEDSでも、かつて経験したことの無い異常な受動刺激としての前庭システムへの揺れと、大地震という社会不安性の刺激の両面が、もともと動揺病への易感受性の高かった人に強く作用したと考えられる。逆に、普段から身体を動かすスポーツ習慣のある人々はPEDSの有訴率が低かった。

PEDSの有訴者たちが自覚しためまいはどういったものだったのであろうか。本研究結果によれば、室内でイスに座っている時に1分以内の身体の揺れを自覚する、という症状が最も典型的である。屋外に居たり、歩くなどの動作時には自覚が激減する。

一般のめまい患者にみられるような体動時のめまい症状の増悪や、耳鳴り・頭痛・嘔気嘔吐といった随伴症状も少なかった。

今回の研究結果をふまえて病態のさらなる解明をすすめていく予定である。

謝辞

本研究の実施に際して迅速なご高配を賜りました、当時の日本大学医学部附属板橋病院長・澤 充先生と臨床研究倫理委員会委員長・麦島秀雄先生に深謝申し上げます。研究遂行にご協力いただきました日本大学医学部附属板橋病院、日本大学第一小学校、中学校、高等学校の皆様、そして学童群調査にご尽力いただきました医学部教務課・藤井教智様に深謝申し上げます。

参考文献

- 1) J.T.REASON and J.J.BRAND: Motion Sickness. Academic Press, London. 1975
- 2) 高橋正紘：動揺病・ヒトはなぜ空間の奴隷になるのか。築地書館.1997.
- 3) Yasuyuki Nomura, Yoshitaka Kaneita, Teruo Toi, Takeshi Masuda, Masatoshi Miura, Atsuo Ikeda, Shuntaro Shigihara, Minoru Ikeda. POST EARTHQUAKE DIZZINESS SYNDROME IN JAPAN. The Journal of International Advanced Otology 7(3) supple2: 71, 2011.
- 4) Chen CC, Yeh TL, Yang YK, Chen SJ, Lee IH, Fu LS, Yeh CY, Hsu HC, Tsai WL, Cheng SH, Chen LY, Si YC.: Psychiatric morbidity and post-traumatic symptoms among survivors in the early stage following the 1999 earthquake in Taiwan. Psychiatry Res. 105: 13-22, 2001.
- 5) 竹尾重紀：芸予地震後に生じためまい、不安症状に著効した五苓散使用の2例。日本東洋心身医学研究 17: 33-37, 2002.
- 6) Tevzadze N, Shakarishvili R. VERTIGO SYNDROMES ASSOCIATED WITH EARTHQUAKE IN GEORGIA. Georgian Med News. 148-149: 36-39, 2007.
- 7) Chan CL, Wang CW, Qu Z, Lu BQ, Ran MS, Ho AH, Yuan Y, Zhang BQ, Wang X, Zhang X. Posttraumatic stress disorder symptoms among adults survivors of the 2008 Sichuan earthquake in China. J Trauma Stress 24(3) 295-302, 2011.

利益相反等

本研究に関する利益相反は無い。また本稿は原著「Post Earthquake Dizziness Syndrome: Nomura Y. et al. (on submission)」ならびにシンポジウム報告「地震後めまい症候群 (Equilibrium Research ; in printing)」からの抜粋に準じたものでデータ、付図、本文の内容等の本旨は上記論文に帰する。

医療業務の効率性と医療情報の信頼性向上のための システム開発

和久井真司¹⁾, 吉開範章²⁾, 秦 光賢¹⁾, 瀬在 明¹⁾, 秋山謙治¹⁾, 塩野元美¹⁾

The system development for improving reliability of medical data and efficiency of medical work

Shinji WAKUI¹⁾, Noriaki YOSHIKAI²⁾, Mitsumasa HATA¹⁾, Akira SEZAI¹⁾,
Kenji AKIYAMA¹⁾, Motomi SHIONO¹⁾

要旨

非常に過酷な労働環境と言える医療現場において、近年では電子カルテの導入が進んでいるが、電子化による恩恵もある反面、様々な原因により、現場のニーズに対応出来ていない側面が多数存在する。この研究は、未来永劫、様々に変化する医学界のニーズに対応し続けるための、患者と医師に優しくかつ効率的な医療情報システムの実現を目指して、医療業務と医療情報処理業務の信頼性と効率性の向上を目指すものである。

はじめに

現在の医療現場で働く者は、日々長時間労働に迫られ、超多忙な環境下に置かれている。しかし、その内容は、診察、手術、術後管理などの医療に直接関係する仕事以外に、本来の医療の仕事とは到底言い難い事務的な作業に非常に多くの時間を費やしているのが現状である。

I. 医療現場の問題点

1. 医療情報処理の現実

電子カルテが医療現場に導入され、すでに10年以上が経過している現在、医療情報処理作業がどれだけ効率化したかといえば、それほどでもないのが現実であり、デジタルデータとして保存されているはずの患者データであるが、実際には患者間データの扱いに関しては、電子カルテ単体では不可能であり、DWH (Data Warehouse) が必要である。しかし、このDWHのデータソースが電子カルテである以上、電子カルテ側になんらかの工夫がされていない限り、満足な臨床データは収集できない。すなわち、

患者のカルテを保存庫から持ってくる手間はなくなったが、DWHも含めた電子カルテシステムを利用しても、電子カルテを参照しながら、エクセルに手入力しなければならない部分が大部分を占める。

2. 医療情報処理の低信頼性

前項で述べたように、最終的には手作業により、データ収集されているため、手作業によるデータの移行ミスの可能性はゼロではない。

例えば、特定の疾患に対する手術症例数や成績などは、その病院の評価にもつながる重要なデータであるにもかかわらず、データの収集は最終的には手作業であり、故意にミスが生じている可能性が無いとは保証できない。

必ず集計者による手作業が存在する限り、信頼性のあるデータとは言い難い。

3. 各医学会主導の医療情報標準化の問題点

現場の医療従事者による患者データの統計作業に関しては、各分野の専門性が高いという医療情報の特性から、それぞれの分野でデータ整理の方法を標準化するということが必要になり、各医学会レベル

1) 日本大学医学部心臓血管・呼吸器・総合外科

2) 日本大学理工学部

和久井真司: wakui.shinji@googlemail.com

でのデータベースの規格設定が行われるべきである。既に、2000年ころから、日本胸部外科学会主導で、心臓外科領域に関しては、日本心臓血管外科手術データベースJapan Cardiovascular Surgery Database (JACVSD)¹⁾が稼働し、2011年からはNCD (National Clinical Database)²⁾としてさらに分野を広げている。

これらの学会主導のデータベースの規格により、多施設による統計が可能にはなるが、これらは、それぞれの電子カルテシステムとは無関係の独立したデータベースであるため、オンライン入力が可能だが、日常業務とは別にデータを手入力する必要を強いられることが、日常業務をさらに圧迫し、大きな負担になるとともに、手入力であるため、データの信頼性を保証できないという大きな二つの問題が残る。

4. 医療書類の非効率性

病院における業務のほぼ6割近くはなんらかの書類作成（電子カルテ入力）と言われている。一人の患者に対して多くの医療従事者が、分担して書類を記載していると捉えれば、聞こえがいいが、実際これらの書類には共通する項目が多数存在し、例えば一人の患者が心臓手術をする場合、外来医師、執刀医師、研修医、病棟看護師、手術室看護婦、麻酔科医、集中治療室看護師などが似たような情報収集をそれぞれが行い、同様な書類をそれぞれが作成しており、極めて効率の悪い作業が日々繰り返されている。

II. 問題を解決する電子カルテ介在型システム

前項では、様々な医療現場の問題点を指摘した。それらへの対策案を以下に示す。

1. システム構成

A) 試作システム

前述の問題点を克服するべく、2004年ごろよりFilemaker Pro^{®3)}をベースとして診療支援システムとして開発を開始し、現在では約50のデータテーブル、3000以上のプログラムスクリプトで構成され、Filemaker Pro Serverにて暗号化された院内ネットワーク上にディスクトップ端末以外にiPad, iPad mini, iPhone, iPod touchにてベットサイドや手術室での入力が可能となっている。2007年には本システムの一部が、知的財産所有権（プログラム登録 題号 医療書類作成支援システム 登録番号 P第

9126号-1）を所得している。

B) 変化への対応

医療や医療情報は今後も永久的に進化・変化するものであり、その変化に迅速に対応できるシステムであることが重要である。Filemaker Proは日本の医療界に深く浸透したプラットフォームであり、各医局、個人においてFilemaker Proによるプライベートデータベースは多数存在している。これら変化に敏感な個人的なデータベースと電子カルテの間に本システムが介在し、データが自動的に流れてくるシステムを確立することで、今後の変化にも迅速に対応可能と考えられる。

2. 電子カルテをデータマイニング可能にするには

A) 電子カルテとの接続

電子カルテと本システムを接続し、患者基本情報などを自動的に収集可能であれば、非常に効率的である。2014年7月現在、本システムと電子カルテの接続は目前となっているが、いまだ接続に至っていない。以下の様な接続方法を検討中である。

電子カルテは、もともと単体では全ての病院業務をこなせないため、様々な部門システム（放射線・薬剤・臨床検査など）と接続しデータの受け渡しが必要である。そのための通信としてソケットが標準装備されており、電文の仕様を照合してデータ連携を行っている。本システムでは、このソケットを利用した通信を行うことにより、従来に比べ低コストで電子カルテとの連携を実現する。

B) 重複入力を避ける項目の設定方法

データテーブルを患者毎ではなく、様々なイベント毎に作成し、イベントが起こるたびにレコードが追加されるデータ構造とする。イベントとは、入院、手術、処方、検査、オーダー、診察などであり、さらにこのイベント毎に用意されたテーブルを構成する項目（フィールド）はそのイベント一回の内で必ず一度しか発生しないものとし、また、様々な医療書類を構成する項目となることが可能なレベルに細かく設定する。（Fig.1参照）この重複入力を避け、細かく項目を設定し、それらを必要とする書類毎に、それら項目からのリンクを呼び出すことで電子カルテシステムの機能を補う。また、項目の設定は、各学会のデータベース規格に沿うものを含めることが望ましい。

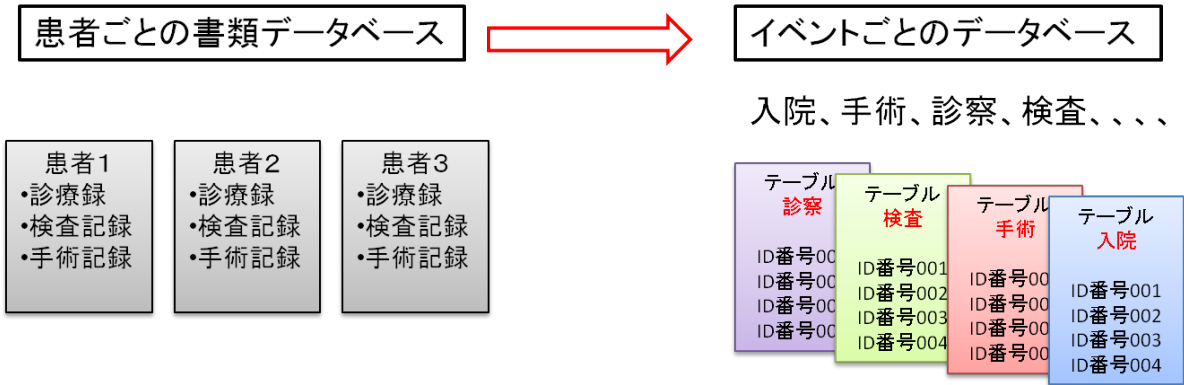


Fig. 1 イベント型データベース

3. 医療情報処理と電子カルテの一体化による利点

A) データ収集の効率性と信頼性の向上

電子カルテ上でデータマイニングが可能になると、前述のような医療情報処理を行う際の患者情報の収集にかかる手間が極めて著しく短縮される。また、電子カルテ端末上で全て行うようになれば、データの改ざんが不可能であることも利点である。統計結果を外部へ持ち出す場合は、個人情報が出ないように、匿名化されたもの以外はエクスポート不可能とすることで個人情報保護を担保する。

B) 書類作成の効率化

医療書類作成を効率化するための最大の鍵は、重複入力を避けるということである。

すべての入力の重複を避けることで、非常に効率的に作業を行うことが可能になる。様々な部署のクライアント端末から、様々な人間が重複なく情報を入力し、たとえば、紹介状のようなテキストベースで入力する書類は、現病歴、入院治療経過、手術日・術式、処方内容、などの情報の集合体であるため、各地で入力されたデータをクリックするだけで、約5秒で紹介状を作成可能である。(Fig2参照)

C) 学会データベース (NCD) の効率化

日常業務において、電子カルテから収集された情報や本システムへ入力されたデータを利用してNCD入力の約4から5割が自動的に収集され、NCDのWeb入力画面と同様な画面 (Fig 3) を本システムに作成し、医学的知識の全くない医局秘書にも入力

備考: 常々のご高配誠にありがとうございます。①

糖尿病、高血圧、高脂血症にて武蔵台病院にかかりつけの患者です。②

平成17年10月頃より胸部圧迫感出現。安静時にも出現していた。初めは、一週間に一回程度であったが、12月末から一日に1〜2分の胸部圧迫感が数回出現するようになり、精査目的でかかりつけ医でトリプルマスター施行したところV5でST低下、負荷後、陰性U波、II、III、aVFで異常Q波出現し、当院循環器科紹介受診。CAG施行したところ手術適応であるため入院となりました。

平成18年10月30日③、CABG(4) LITA-#8,Ao-#3-#4PD,Ao-#12④行し、

術後特に問題なく経過し、当日気管チューブ抜管、2日目で一般病棟へ入室し、その後も特に問題なく経過しています。⑤

経過良好につき、術後のリハビリテーションを宜しくお願いいたします。⑥

尚、処方は以下の通りです。

デジックス(20)1錠分1朝⑦

アルダクン(25)1錠分1朝

ルバスク(5)1錠分1朝

文脈構成ボタン

紹介状	サマリー
報告書	セット4
セット5	セット6

- ① 定型文挿入
- ② 現病歴挿入
- ③ 手術日挿入
- ④ 術式挿入
- ⑤ 術後経過挿入
- ⑥ 文末挿入
- ⑦ 処方挿入

Fig. 2 文章作成効率化



Fig. 3 医局秘書によるWeb入力

を可能としてNCD登録を効率化している。

Ⅲ. まとめ

少子高齢化社会における医療情報のICT化は必須な課題である。無駄な時間をできる限り削減し、患者のみならず、医療従事者のQOLを向上させさせることが、この研究の使命であるとする。

文献

- 1) Japan Cardiovascular Surgery Database (JCVSD)
: <http://www.kusatsu-gh.or.jp/newhp/JACVSDpanfu-reto.pdf>
- 2) NCD (National Clinical Database)
: <http://www.ncd.or.jp/>
- 3) Filemaker Pro
: <http://www.filemaker.co.jp/>

有棘細胞癌の発生・進展における エストロゲン受容体 β の役割の解明

篠島由一¹⁾, 相馬正義²⁾, 上野高浩³⁾, 照井 正¹⁾, 藤原恭子²⁾

Analysis of the role of estrogen receptor β in the development and progression of cutaneous squamous cell carcinoma

Yui SHINOJIMA¹⁾, Masayoshi SOMA²⁾, Takahiro UENO³⁾,
Tadashi TERUI¹⁾, Kyoko FUJIWARA²⁾

要旨

我々はこれまでにヒストン脱メチル化酵素GASC1をノックアウト(KO)したマウスにおいて、皮膚有棘細胞癌(SCC)の発生頻度が低いこと、これらのマウスではエストロゲン受容体 β (ER β)が低発現であること、ER β がGASC1による発現制御を受けている可能性が高いことを確認してきた。本研究では、SCCの増殖におけるER β の役割を解明することを目的として、解析を行い、SCC細胞株におけるER β の発現を抑制すると細胞増殖率が有意に低下することを確認した。一方、ヒトSCC検体においてはER β が正常部と比較して有意ではないものの高発現傾向にあり、今後検体数を増やした解析を行う予定である。

1. はじめに

腫瘍の発生にはゲノムの配列変異、増幅等のgeneticな変異のみならず、DNAのメチル化やヒストン修飾等epigeneticな変異が関与する事は知られている。ヒストン修飾酵素の一つJMJD2C(GASC1)はH3ヒストンのK9K36リジンの脱メチル化機能を持ち、この遺伝子が食道SCC、未分化ES細胞、乳癌において増幅していることが報告されている¹⁻³⁾。これまでに我々はSCCの発生・進展におけるGASC1の役割を解明するため、GASC1ノックアウトマウス(GASC1 KO)を作成し、皮膚化学発癌への感受性を解析した。DMBAとTPAを用いた2段階化学発癌プロトコルにて処理したところ、GASC1 KOにおける良性皮膚腫瘍、SCCの発生頻度は野生型と比べて有意に低かった。GASC1の下流で制御を受け発癌感受性に影響を与えている遺伝子をスクリーニングするため、ヘテロと野生型の正常皮膚の発現プロファイルを調べたところ、エストロゲン受容体(ER) β の発現がヘテロにて有意に低いことが

判った。GASC1 KOのER β のプロモーターのH3K9メチル化レベルが野生型と比較して更新していることをChIPアッセイにより確認した。

これらの結果から、GASC1によりER β の発現量が制御されていることが証明されたが、GASC1 KOにおけるER β の低発現がSCCの発生頻度の低下の原因となっているか否かは不明である。ER β は乳癌、大腸癌、メラノーマでは正常組織と比較して発現が上昇しているとの報告があり、一般的にはER β はむしろ癌抑制機能があると考えられている。一方、ヒト食道SCC組織におけるER β が高発現であるほど予後が悪いとの報告もあり、ER β と発癌の機能については不明な点が多い⁴⁾。そこで本研究では、ER β が皮膚SCCの発生・進展に関与している可能性について検討するため、SCC細胞株および皮膚腫瘍手術検体を用いて以下の研究を行った。

2. 方法, 対象

マウスSCC細胞株PVD57を培養し、siRNAによ

1) 日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野

2) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野

3) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

篠島由一: shinojima.yui@nihon-u.ac.jp

藤原恭子: fujiwara.kyoko@nihon-u.ac.jp

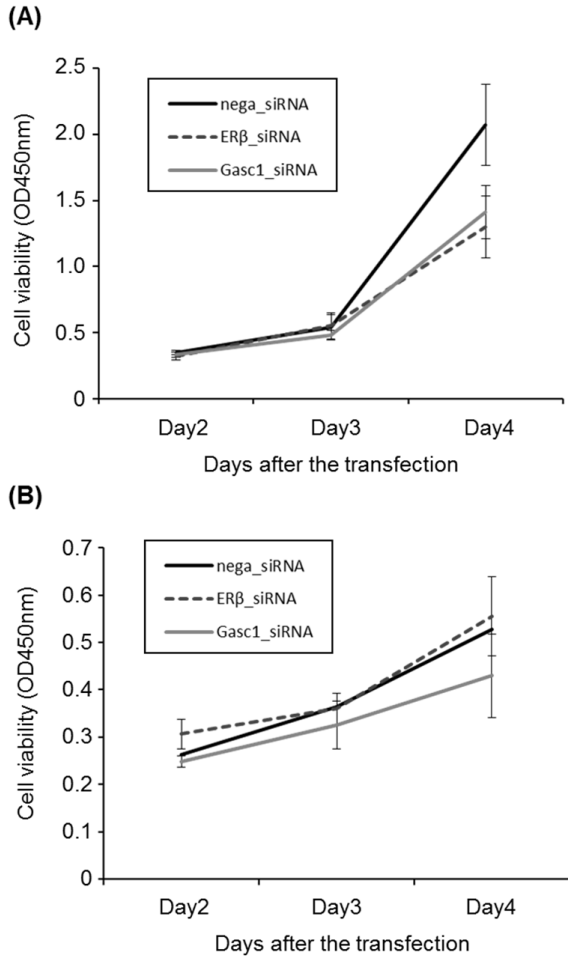


図1 ERβノックダウンによる細胞増殖能の変化
(A) SCC細胞株, (B) 繊維芽細胞株

りERβの発現をノックダウンし24時間から72時間後に細胞の生存率をWST8アッセイにより定量した。また対照として、繊維芽細胞細胞株NIH-3T3を用いても同様の実験を行った。ERβの発現抑制による細胞浸潤能の変化をMatrigel invasionアッセイにより調べ、Annexin VおよびPropidium Iodide染色によって、細胞死の様式についての判定を行った。

日大板橋病院にて採取された皮膚有棘細胞癌検体28例および皮膚正常部10例よりRNAを抽出し、real time PCRによりERβの発現を調べた。またパラフィンブロックより病理標本を作製し、免疫染色を行ってERβの発現レベルを解析した。

3. 結果

SCC細胞株PVD57におけるERβの発現をsiRNAにより抑制し、細胞増殖能への影響を調べたところ、

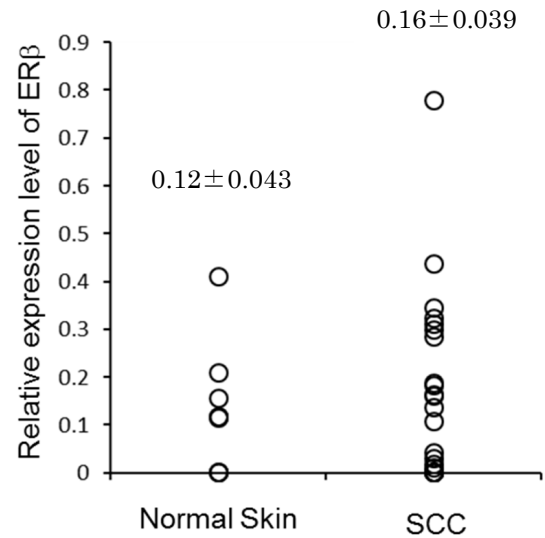


図2 SCC手術検体および正常皮膚におけるERβの発現量
両検体よりRNAを抽出し、real time PCRによりERβの発現量を定量した。値は平均値±標準誤差。

ろ、siRNA導入4日目においてNegativeコントロールと比較して、有意な増殖抑制効果を示した。Gasc1の発現抑制においても同様な低下が見られた。一方、マウス繊維芽細胞NIH-3T3においては、ERβの発現抑制による増殖抑制効果は殆ど見られなかった(図1A, B)。これらの細胞における浸潤能はERβの発現抑制の有無によって変化せず、またアポトーシスやネクロシスの頻度もERβの発現レベルとの有意な関連を認めなかった。

更に、ヒトSCC検体および正常皮膚におけるERβの発現レベルをreal time PCRにより検討したところ、腫瘍検体においてERβの発現が正常皮膚と比較して、有意差はないものの高発現を示す傾向にあった(図2)。組織検体の免疫染色においては、正常検体との顕著な差は確認できなかった。

4. 考察

本研究の結果から、ERβがSCC細胞の増殖に対して促進的に働くことが確認され、腫瘍の発生・進展に寄与する可能性が示唆された。一方、繊維芽細胞においてはERβの発現抑制による増殖率の変化が観察されなかった。今回データには示していない他の複数のSCC細胞株、繊維芽細胞株を用いた実験でも同様の結果を確認しており、ERβが腫瘍特異的

に増殖を促進している可能性が示唆された。現時点では作用機序が不明であるが、ER β が腫瘍抑制遺伝子として働くとの報告もあることから、細胞・組織ごとのER β 下流シグナル系の違いが、ER β による細胞の増殖抑制・促進を左右している可能性が考えられた。手術検体については、今回解析に用いた正常皮膚の検体数が少なく、またSCC組織提供者と異なる患者の皮膚検体であったことから、今後はSCCと正常皮膚を同一患者から採取し、改めて解析を行いたい。

文 献

- 1) Yang, Z. Q. et al. Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p, 23-24, frequently detected in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res.* 60: 4735-4739; 2000.
- 2) Liu G. et al. Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer. *Oncogene.* 28: 4491-4500; 2009.
- 3) Wang J. et al. The Histone Demethylase JMJD2C Is Stage-Specifically Expressed in Preimplantation Mouse Embryos and Is Required for Embryonic Development. *Biology of Reproduction.* 82: 105-111; 2010.
- 4) Zuguchi M. et al. Estrogen receptor α and β in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science.* 103: 1348-1355; 2012.

脱分化脂肪細胞の誘導及び維持における 1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の効果

水島優介^{1,2)}, 石澤通康¹⁾, 風間智彦³⁾, 松本太郎³⁾, 池田和正²⁾, 横島 誠¹⁾

Effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on induction and maintenance of mouse dedifferentiated fat cells

Yusuke MIZUSHIMA^{1,2)}, Michiyasu ISHIZAWA¹⁾, Tomohiko KAZAMA³⁾,
Taro MATSUMOTO³⁾, Kazumasa IKEDA²⁾, Makoto MAKISHIMA¹⁾

要旨

ビタミンDシグナルは、カルシウム代謝の他、細胞の増殖・分化、代謝、免疫など様々な生理機能に関与する。ビタミンD受容体(VDR)の欠損マウスやVDRリガンドを用いた研究によって、ビタミンDシグナルが脂肪細胞の分化に関与することが示されている。本研究において、脱分化脂肪細胞(DFAT)の誘導及び維持におけるビタミンDシグナルの影響を検討した。VDRリガンドとして機能する活性型ビタミンD₃(1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃)は、マウス皮下脂肪細胞のDFATへの誘導及びDFATの増殖を抑制し、未分化細胞マーカーであるNanog及び山中4因子の発現にも影響を与えた。本研究結果はDFATの脱分化メカニズムの解明に有用な情報であり、高効率なDFATへの脱分化手法の開発に役立てることができる。

1. 背景

核内受容体スーパーファミリーは、ステロイドホルモン、レチノイン酸、活性型ビタミンD₃などの受容体の一群であり、ヒトにおいて48種類存在し、種々の細胞機能調節に関わっている¹⁾。核内受容体とinduced pluripotent stem (iPS)細胞との関連性について、iPS細胞誘導において核内受容体LRH-1が山中4因子の一つOct4の代わりになること、LRH-1とレチノイン酸受容体RAR γ の導入はiPS細胞誘導の期間を短縮すること、核内受容体ERR β が山中4因子のうちOct4とSox2と相互作用することが報告されている²⁻⁴⁾。脂肪細胞の発生・分化に関して、レチノイン酸が抑制的に働き、活性型ビタミンD₃が促進的に働くことが報告されている^{5,6)}。

脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell; DFAT)は、脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞を天井培養によって脱分化させた多分化能細胞である⁷⁾。脂肪細胞への分化やiPSの誘導などに比較し、DFATの誘導及び維持メカニズムには不明な点が多い。本研究では、DFATの誘導及び脱分化後の維持に対する

ビタミンDシグナルの影響を検討した。

2. 結果

DFATへの脱分化は、10週齢から12週齢のオスC57BL/6Jマウスより皮下脂肪を採取、コラゲナーゼ処理によって成熟脂肪細胞(mature adipocyte; MA)を単離し、培養フラスコ内にて天井培養を行うことで誘導した⁷⁾。MAは播種から1週間後までに天井に接着し、分裂を始める。このとき、MAから非対称分裂によって増殖する線維芽細胞様の形態の細胞がDFATである。天井培養開始の際に100nM活性型ビタミンD₃(1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃; 1,25(OH)₂D₃)を添加したMAでは、総数に違いはみられなかったものの、DFATに脱分化する細胞数が少なかった(図1)。1週間後の細胞よりRNA抽出を行い、リアルタイムPCR法にて脂肪細胞のマーカー分子、山中因子、Nanogの発現変化を評価した。脂肪細胞のマーカー分子であるperoxisome proliferator activated receptor γ 2 (Ppar γ 2), CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α), C/EBP β のmRNAレベ

1) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野

2) 日本大学生物資源科学部応用生命科学科

3) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

横島 誠: makishima.makoto@nihon-u.ac.jp

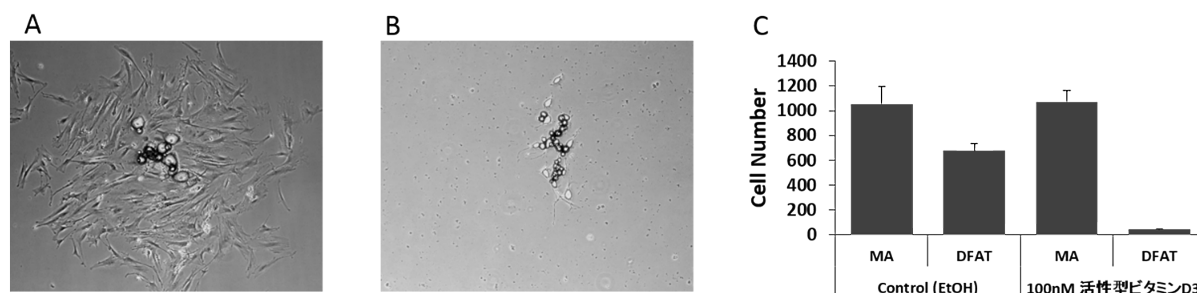


図1 天井培養から1週間後の天井培養細胞の形態及び細胞数
マウス皮下脂肪より成熟脂肪細胞 (MA) を単離し, (A) 溶媒コントロール添加培地又は (B) 100nM 活性型ビタミンD₃ 添加培地にて天井培養を行い, 1週間後の細胞形態を撮影し, (C) 細胞数を測定した。

ルは, MAで高発現しており, DFATへの脱分化過程で減少したが, 1,25(OH)₂D₃ 添加培地では発現減少が軽微であった。興味深いことに山中4因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) 及びNanogのmRNAレベルはいずれもDFATへの脱分化過程で発現が減少し, 活性型ビタミンD₃ 添加培地では減少が軽微, 又はMAよりも発現増加が認められた。

天井培養から2週間が過ぎると, DFATは通常培養が可能になる。DFATに対して100nM 1,25(OH)₂D₃ 処理を行い, 生細胞数をMTT assayにて評価した。溶媒コントロール, 薬剤処理いずれにおいても0日目に比べて生細胞数は増加するものの, 3日目までに活性型ビタミンD₃ 処理によって生細胞数の増加量の減少が認められ, 細胞増殖能が抑制されることが示唆された。活性型ビタミンD₃ 処理による脂肪分化マーカー分子, 山中因子, Nanogに対する影響を評価したところ, 1,25(OH)₂D₃ 処理24時間, 48時間ではPpar γ 2レベルに影響はなく, C/EBP α , C/EBP β はDFATへの脱分化過程と同様に発現増加が認められた。山中因子であるOct3/4, Sox2, c-Mycは薬剤処理24時間後でのみ発現増加が認められ, Klf4はむしろ発現が減少した。Nanogの発現には変化は認められなかった。

3. 考 察

本研究より, 1,25(OH)₂D₃は, DFATの誘導及び維持に, 抑制的に作用した。興味深いことに, 山中4因子及びNanogの発現レベルに対して影響を与えたが, 脱分化の形態変化と一致しない変化であり, その生物学的意義については今後の課題である。我々の研究室では, VDRアンタゴニストの開発を

行っているが⁸⁾, DFATの誘導や維持を促進させる効果が期待できる。VDR以外の核内受容体リガンドによるDFAT誘導・維持への影響も検討中である。

文 献

- 1) Makishima M (2005) Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J Pharmacol Sci* 97: 177-183.
- 2) Heng J-CD, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, et al. (2010) The Nuclear Receptor Nr5a2 Can Replace Oct4 in the Reprogramming of Murine Somatic Cells to Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* 6: 167-174.
- 3) Wang W, Yang J, Liu H, Lu D, Chen X, et al. (2011) Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18283-18288.
- 4) Festuccia N, Osorno R, Halbritter F, Karwacki-Neisius V, Navarro P, et al. (2012) Esrrb Is a Direct Nanog Target Gene that Can Substitute for Nanog Function in Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* 11: 477-490.
- 5) Berry DC, Noy N (2009) All-trans-Retinoic Acid Represses Obesity and Insulin Resistance by Activating both Peroxisome Proliferation-Activated Receptor {beta}/{delta} and Retinoic Acid Receptor. *Mol Cell Biol* 29: 3286-3296.
- 6) Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ (2012) 25-hydroxyvitamin D(3) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS ONE* 7: e52171.
- 7) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, et al. (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 215: 210-222.
- 8) Inaba Y, Yamamoto K, Yoshimoto N, Matsunawa M, Uno S, et al. (2007) Vitamin D₃ derivatives with adamantane or lactone ring side chains are cell type-selective vitamin D receptor modulators. *Mol Pharmacol* 71: 1298-1311.

自己炎症性症候群マウスモデルにおける マスト細胞活性化機構の解明

布村 聡¹⁾, 岡山吉道²⁾, 羅 智靖³⁾, 照井 正¹⁾

Elucidation of the mechanism for mast cell activation in a mouse model of auto-inflammatory disease

Satoshi NUNOMURA¹⁾, Yoshimichi OKAYAMA²⁾, Chisei RA³⁾, Tadashi TERUI¹⁾

要旨

近年同定された家族性寒冷蕁麻疹の原因遺伝子の一つである *plcg2* は、B細胞、ナチュラルキラー細胞、マスト細胞で発現するシグナル伝達分子のホスホリパーゼ (PL) $C\gamma_2$ をコードしており、家族性寒冷蕁麻疹では $PLC\gamma_2$ の恒常的活性化型の変異が認められている。本研究では、*plcg2* 遺伝子に機能亢進型の変異 (Tyr495→Cys) が挿入された結果、末梢四肢の紅班や浮腫を自然発症する Ali14 マウスにおけるマスト細胞に着目し、Ali14 変異マスト細胞の機能を *in vitro* および *in vivo* で明らかにすることを旨とした。

1. はじめに

Ali (Ali for Abnormal limb) 14 は、ドイツにおける大規模ミュータジェネシスプロジェクトにおいて、末梢四肢の紅班や浮腫を指標に単離された半優性突然変異マウス系統であり¹⁾, Everrtt²⁾ によって、Ali14 変異は *plcg2* の機能更新型変異であることが明らかにされている。Ali14 マウスの炎症反応がリンパ球の非存在下でも発症することから、皮膚組織に多数局在するマスト細胞が、Ali14 マウスで認められる自己炎症性皮膚疾患の病態形成における実効細胞である可能性が考えられた。そこで本研究では、Ali14 マウスの骨髄から調製したマスト細胞の機能解析を行なった。

2. 材料および方法

培養マウスマスト細胞は、Ali14 変異型 (Ali14/+), 野生型 (+/+) マウスの骨髄細胞 (東海大学医学部阿部幸一郎博士より供与頂いた) を IL-3 (5 ng/ml) 存在下で 6-8 週間培養することにより調製した。ラットマスト細胞株 RBL-2H3 への *plcg2*^{Ali14} および

plcg2^{WT} 遺伝子の導入はレトロウイルスを用いて行なった。ウイルス感染後、Puromycin 耐性クローンを選択し安定発現株を得た。調製した培養マスト細胞や RBL-2H3 Ali14 トランスフェクタントの活性化は、脱顆粒反応を指標にして評価した。マスト細胞の刺激は、寒冷蕁麻疹との関連から、寒冷刺激 (Icilin), 他の刺激として抗原 (anti-TNP IgE + TNP-BSA) 刺激を使用した。カルシウムイオノフォア A23187 (1 μ M) に対する脱顆粒および細胞内カルシウム応答を内部コントロールとし、抗原および寒冷刺激による脱顆粒応答とカルシウム応答は A23187 によって誘導された応答を 100% として表示した。

3. 結果

抗原刺激によるマスト細胞の活性化を脱顆粒を指標にして評価を行なった結果、Ali14 変異型マスト細胞で脱顆粒応答の亢進が認められた (図1)。

しかしながら、寒冷刺激 (Icilin) による脱顆粒応答は野生型、Ali14 変異型マスト細胞ともにほとん

1) 皮膚科学分野
2) 医学教育企画・推進室
3) 微生物学分野
布村 聡: nunomura.satoshi@nihon-u.ac.jp

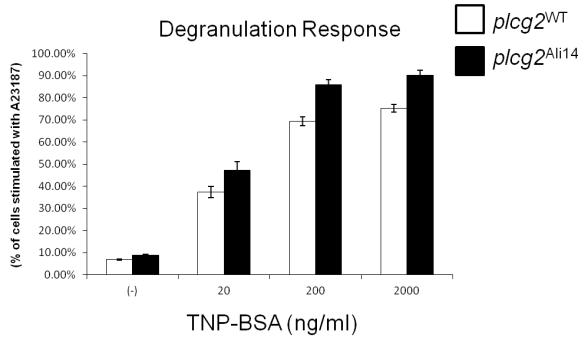


図 1 抗原刺激による脱顆粒

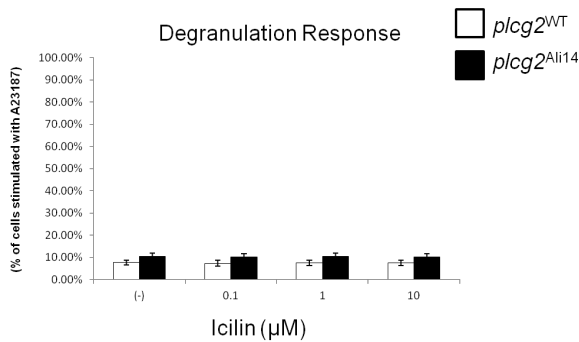


図 2 Icilin 刺激による脱顆粒反応

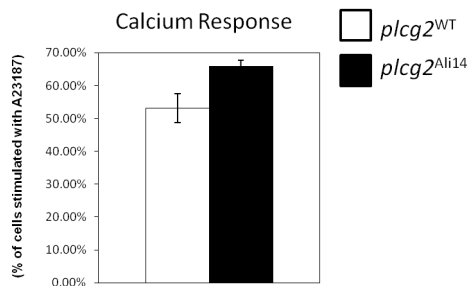


図 3 抗原刺激による細胞内カルシウム応答

ど誘導されず、また両群間で有意差も認められなかった (図2)。

抗原刺激による脱顆粒応答が増強されていたことから、細胞内カルシウムの動態をRBL-2H3トランスフェクタントを用いて解析を行なった。その結果、Ali14変異遺伝子を導入したRBL-2H3トランスフェクタントにおいて、抗原刺激 (TNP-BSA 2000ng/ml) による細胞内カルシウム応答が亢進していることが明らかとなった。

4. 考 察

今回の研究により、Ali14におけるplcg2の機能更新型変異は抗原刺激に対しては、マスト細胞の活性化を増大させるものであることが明らかになった。しかしながら、Icilinを用いた寒冷刺激に対してはほとんど影響を示さなかったことから、Ombrelloら³⁾によって報告された家族性のPLCγ2の恒常的活性化型変異が寒冷刺激によるマスト細胞の脱顆粒応答を亢進させるとする研究結果とは異なるものであり、Ali14マウスにおける末梢四肢の紅班や浮腫には温度環境によって発症が誘導されている可能性は低いことが示唆された。マスト細胞そのものの関与についても、現在マスト細胞欠損マウスとAli14マウスとの掛け合わせを進めている段階であり、*in vivo*での解析を行なっていく予定である。

謝 辞

本研究の成果は、平成25年度 日本大学医学部助成金 (50周年 (共同)) の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Hrabé de Angelis M H, Flaswinkel H, Fuchs H, et al. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet.* 2000; 25: 444-447.
- 2) Everett K L, Bunney T D, Yoon Y, et al. Characterization of phospholipase C gamma enzymes with gain-of-function mutations. *J Biol Chem.* 2009; 284: 23083-23093.
- 3) Ombrello M J, Remmers E F, Sun G, et al. Cold urticaria, immunodeficiency, and autoimmunity related to PLCG2 deletions. *N Engl J Med.* 2012; 366: 330-338.

肺癌の個別化治療のための肺生検からの遺伝子学的多様性解析

辻野一郎¹⁾, 高橋典明¹⁾, 中西陽子²⁾

Analysis of the genetic polymorphism from lung biopsy to decide personalized therapy

Ichiro TSUJINO¹⁾, Noriaki TAKAHASHI¹⁾, Yoko NAKANISHI²⁾

要旨

増殖シグナル伝達経路の様々な遺伝子変異は、ドライバー変異として非小細胞肺癌(NSCLC)の進展に深く関与していることから、治療標的分子として着目されているが、ドライバー変異不明で化学療法による治療群も多く存在する。そこで我々は、平成24年度はNSCLC進行例の経気管支鏡的肺生検を対象として腫瘍細胞の遺伝子変異解析を行い、増殖シグナル活性の指標となるリン酸化(p)ERKの発現強度と比較した。さらに平成25年度はプラチナ系抗癌剤感受性への関与が示唆されているDNA修復遺伝子に着目し、遺伝子変異解析を行った。これらの結果、pERKの核内発現強度は、ドライバー変異の種類によって異なることが明らかとなり、予後と相関、治療奏功性と逆相関の傾向を示した。またERCC1遺伝子に関してはドライバー変異群とは独立してC118T変異が予後因子となることが示された。以上よりEGFRシグナル伝達経路依存群ではpERKはNSCLCの予後ならびに治療抵抗性予測因子として有用であり、非依存群ではERCC1 C118T遺伝子変異が予後因子となり、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

1. はじめに

上皮成長因子受容体(EGFR)シグナル伝達は、上皮性腫瘍の増殖・進展において重要である。近年、癌のドライバー変異として、シグナル伝達経路上の遺伝子に活性型の変異が生じることにより、基質非依存性のシグナル伝達が誘導されることが明らかとなったことから、ドライバー変異はNSCLCの治療標的分子としても着目されている¹⁾。我々はこれまで、進行非扁平上皮型NSCLC症例を対象として、ドライバー変異とextracellular signal-regulated kinase(ERK)1/2のリン酸化について検討を行ってきた。Rat sarcoma viral oncogene homolog(RAS)-ERK経路において、EGFR変異症例よりも、KRAS変異症例でpERKが高発現であること、さらに、KRAS変異症例を含む、pERK高発現症例は治療抵抗性であるか、あるいは治療適応がなく予後不良であることが確認された。Mitogen activated protein

kinase(MEK)-ERK kinase(MEK)阻害剤によるpERK発現低下効果が示されており²⁾、pERK発現は現在有効な治療の乏しい予後不良例の選定に有用と考えられた。しかしながら、NSCLCにおいてドライバー変異が不明で化学療法が選択される症例も多い。そこで本年度は、プラチナ系抗癌剤感受性との関連が示唆されている³⁾が、遺伝子変異との関係は明らかとなっていないexcision repair cross-complementation group 1(ERCC1)遺伝子変異について検討を行った。

2. 対象及び方法

対象は2009年から2010年に呼吸器内科を受診し非扁平上皮NSCLCと診断し得た50例(年齢68.5歳、男女比35:15、喫煙42例、病期ⅢB-Ⅳ期42例)のパラフィン生検組織とした。ERCC1遺伝子変異解析は、ERCC1 C118T変異とC8092A変異について、生

1) 日本大学医学部内科学系 呼吸器内科学分野
2) 日本大学医学部病態病理学系 病理学分野
辻野一郎: tsujino.ichiro@nihon-u.ac.jp

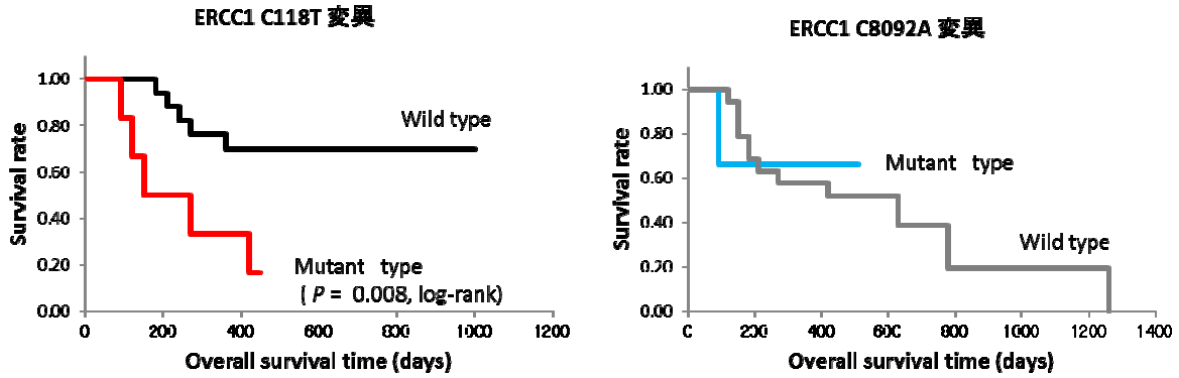


図 1 ERCC1 遺伝子変異と生存期間. ERCC1 C118T 変異症例は、全生存期間の中央値が8.3か月で、非変異症例の25.9か月に対して有意に予後不良であった ($P = 0.008$). 一方、ERCC1 C8092A 変異が検出された症例は少なく、変異の有無による予後の有意な差異は認められなかった。

表 1 Multivariate analysis using Cox model

factor	Median Survival	Hazard ratio	95% CI	P value
ERCC1 C118T mutated	8.3	2.45	1.10-5.46	0.02*
pERK high expression	11.6	0.89	0.72-1.09	0.26
KRAS mutated	12.8	0.76	0.09-6.24	0.80

検切片よりレーザーマイクロダイセクション法⁴⁾で回収した腫瘍細胞からDNAを抽出し、i-densy 5320を用いたQuenching Probe法⁵⁾で行い、SPSS version 20 (IBM)を用いて統計解析を行った。

3. 結果

遺伝子変異解析の結果、ERCC1 C118T 変異は9例、ERCC1 C8092A 変異は2例より検出された。ERCC1 変異陽性例は、平成25年度に解析したEGFR, KRAS, BRAF, ALKなどのdriver mutationは全て野生型であった。

ERCC1 C118T 変異例は有意に生存期間が短く、予後不良であった (図1)。

多変量解析の結果、ERCC1 C118T 変異群は、平成24年度に高悪性群であることが確認されたpERK 高発現群、KRAS 変異群と比較してもOSが有意に短く、独立予後因子と考えられた (表1)

4. 考察

平成24年度および25年度の検討結果から、非扁平上皮NSCLCにおいて、癌細胞の増殖がEGFRシグナル伝達経路の活性強度に依存する場合は、IHC

によるリン酸化ERKの評価が、治療耐性で且つMEK阻害剤の効果が期待される症例の選定に有用である可能性が示唆された。一方、EGFRシグナル伝達上の遺伝子異常と相互排他的に存在する傾向が示されたERCC1 遺伝子異常のうち、特に、C118T 変異が予後因子であることが示された。ERCC1 遺伝子異常のようにDNA修復機能が遺伝子変異などにより欠陥を生じると、PARPなどの別のDNA修復機構が誘導され、DNA損傷型の抗癌剤に耐性を示すことが知られている。このような遺伝子背景を有する症例群では、第二のDNA修復機構を阻害するPARP阻害剤などの補助療法の効果が期待される。

5. 結語

NSCLCにおいてpERK発現強度は癌のドライバー変異の種類で異なり、治療効果や予後と関係するため個別化治療の指標として有用である。また、EGFRシグナル伝達経路非依存的な群ではERCC1 遺伝子異常が治療耐性に関与する予後因子となり、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

文献

- 1) Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12: 175-180.
- 2) Hainsworth JD, Cebotaru CL, Kanarev V, Ciuleanu TE, Damyanov D, Stella P, Ganchev H, Pover G, Morris C and Tzekova V: A phase II, open-label, randomized study to assess the efficacy and safety of AZD6244 (ARRY-142886) versus pemetrexed in patients with non-small cell lung cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *J Thorac Oncol* 5: 2010; 5: 1630-1636.

- 3) Wang TB, Zhang NL, Wang SH, Li HY, Chen SW, Zheng YG. Expression of ERCC1 and BRCA1 predict the clinical outcome of non-small cell lung cancer in patients receiving platinum-based chemotherapy. *Genet Mol Res.* 2014; **13**: 3704-10.
- 4) Nakanishi Y, Shimizu T, Tsujino I, et al. Semi-nested real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the successful quantitation of cytokeratin mRNA expression levels for the subtyping of non-small-cell lung carcinoma using paraffin-embedded and microdissected lung biopsy specimens. *Acta Histochem Cytochem.* 2013; **46**: 85-96.
- 5) Ureshino N, Aragane N, Nakamura T, et al. A fully integrated and automated detection system for single nucleotide polymorphisms of UGT1A1 and CYP2C19. *Oncol Res.* 2011; **19**: 111-4.

肝癌におけるB型肝炎ウイルス遺伝子の ヒト遺伝子への組み込み様式の解明

楡井和重¹⁾, 森山光彦¹⁾, 黒田和道²⁾

Analysis of rearrangement of HBV integration in patients with HCC

Kazushige NIREI¹⁾, Mitsuhiro MORIYAMA¹⁾, Kazumichi KURODA²⁾

要旨

肝癌(HCC)におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込み様式について検索した。本年度の研究には、Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH)法を用いて、HBs抗原陽性およびHCV抗体陽性HCC例の末梢血リンパ球より、HBVゲノムのヒトゲノムへの組み込みの有無と組み込み様式の特徴について検索した。対象は、2011年より肝細胞癌の診断にて手術切除され、検体使用の許諾を得たHBs抗原陽性4例およびHCV抗体陽性4例の計8例である。これらの症例の末梢血リンパ球を用いて、前年度に作製したprobeを用いてFISH法を行い、この結果、HBs抗原陽性例では全例にHBVゲノムの組み込みを示す蛍光を認めた。またHCV抗体陽性例では4例中3例にHBVゲノムの組み込みを示す蛍光を認めた。比較的hot spotに近い部位へのHBVゲノムの集積を認めたが、全例に同一の組み込み部位は認められず、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込み部位はランダムであった。一方HBs抗原陰性かつHCV抗体陽性例においても、HBs抗原陽性例と同様に、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められたが、同様に同一の特定部位へのHBVゲノムの組み込みは確定されなかった。以上より、FISH法を用いてHBs抗原陽性HCC例の末梢血リンパ球より、HBVゲノムのヒト染色体上へのHBVゲノムの組み込みを検出した。一方HCV抗体陽性のいわゆるC型HCCにおいても、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認したことより、C型慢性肝炎・肝硬変からのHCC発生には、HBVが関与していることも考慮すべきであることが示唆された。

1. はじめに

肝癌(HCC)におけるHBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込みの有無については、様々な検討が現在までなされてきた。現状では、HBV遺伝子のヒト遺伝子への組み込み形式は、ランダムであり特定の部位への組み込みはないとされている。今回の研究の目的は、HCC症例でOccult HBV感染例の全塩基配列を増幅するPCR法を行い、そのPCR産物をProbeとして用いるFISH法にてHBV遺伝子のヒト染色体への組み込み部位の検索を行い、B型およびC型HCC例についてHBV遺伝子の組み込み部位を確認することである。

2. 対象および方法

対象は、当院消化器外科にて2011年より肝細胞癌の診断にて血管造影を施行され、検体使用の許諾を得たHBs抗原陽性4例、HCV抗体陽性4例である。

これらの症例より末梢血10mlをヘパリン添加採血した。この後直ちにリンパ球を分離し、培養後各々10細胞をカウントした。

1. HBVゲノムの組み込みの検出は以下の如く行った。

1) 末梢血10mlをヘパリン添加採血した。この後直ちに血球を分離して培養後、プレパラート上に薄層に添付する。

1) 内科学系消化器肝臓内科学分野

2) 病態病理学系微生物学分野

楡井和重: nirei.kazushige@nihon-u.ac.jp

2) Fluorescence labeled in situ hybridization (FISH)
法により、染色体上へのHBVゲノムの組み込み
の検出を行う。

2. 固定細胞FISH プロトコルを以下に提示する。

1) 細胞の変性処理を以下のごとく行う。

- ・細胞標本を70℃ホットプレート上で2時間ハー
ドニング後、70℃の70%ホルムアミド/2×
SSC中2分間変性処理した後、氷冷した70%エ
タノールに5分浸漬する。
- ・70%エタノールで洗った後100%エタノールに
5分浸漬後風乾もしくは37℃インキュベーター
で乾燥する。

2) プロープの変性処理を以下のごとく行う。

- ・1スライドあたり10 μ lのプロープをチューブ
に入れ75℃で10分変性して、5分以上氷冷する。

3) ハイブリダイゼーションを行う。

- ・細胞標本にプロープをアプライしカバーグラス
をかける。この後37℃で必要時間ハイブリダ
イズする。

4) 洗浄および検出を行う。

- ・2×SSC中5分浸漬しカバーグラスを静かには
ずして、37℃の50%ホルムアミド/2×SSC中
20分浸漬する。
- ・1×SSCですすいだ後1×SSC中15分浸漬した

後、DAPI染色後マウントし蛍光観察を行う。

3. 結果

1) HBs抗原陽性HCC例のリンパ球からのヒト染色
体上のHBVゲノムの組み込みの検出

ヒト染色体上にHBVゲノムの組み込みを示す蛍
光を認める。Fig.1に case 1 の1細胞の染色体上に
HBVゲノムの組み込みを示す蛍光を提示する(矢
印)。

Fig.2に4症例各々20細胞分のkaryogramのまと
めを提示する。同一染色体上のほぼ同一部位に
最大8細胞がHBVゲノムの組み込みを認めた。
しかしながら大多数は4細胞以下であり、ヒト染
色体上への特徴的な組み込み部位は認められず、
ランダムにHBVゲノムの組み込みがあることが
確認された。

2) HCV抗体陽性HCC例のリンパ球からのヒト染色
体上のHBVゲノムの組み込みの検出

Fig.3に case 5 の1細胞の染色体上にHBVゲノム
の組み込みを示す蛍光を提示する(矢印)。

Fig.4に4症例各々10細胞分のkaryogramのまと
めを同様に提示する。同一染色体上のほぼ同一
部位に、最大8細胞がHBVゲノムの組み込みを
認めた。しかしながらHCV抗体陽性例でも同様
に、大多数は4細胞以下であり、ヒト染色体上へ

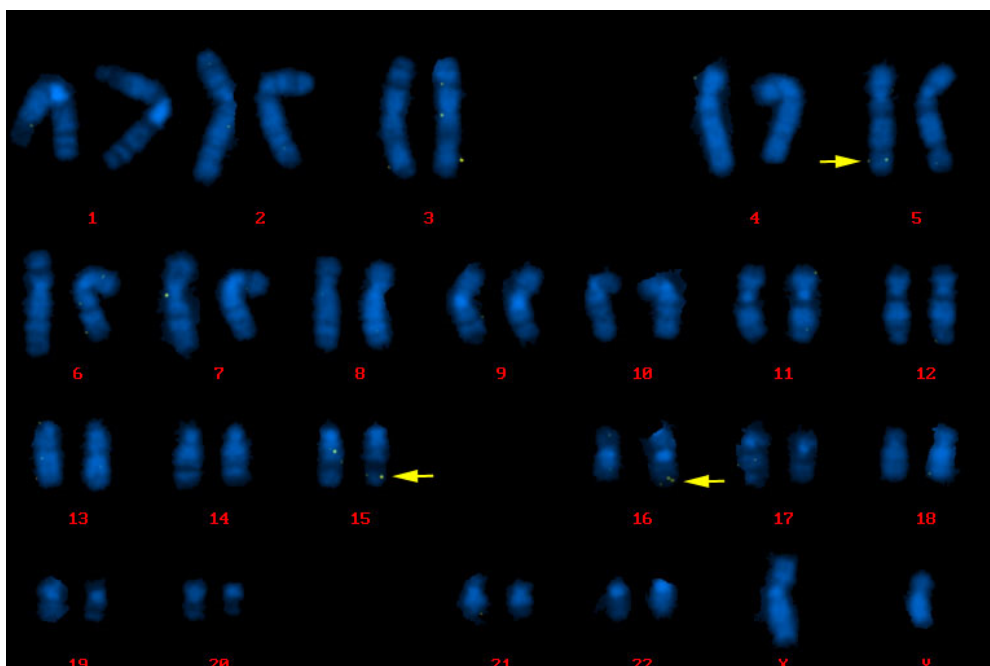


Fig. 1 HBs抗原陽性 Case 1 karyogram

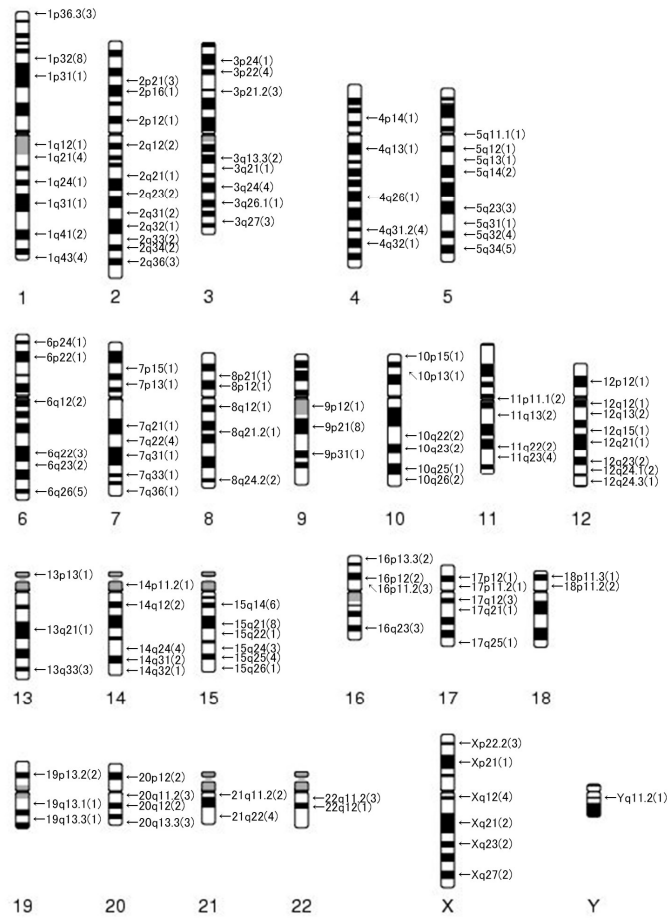


Fig. 2 HBV4症例の ideogram のまとめ

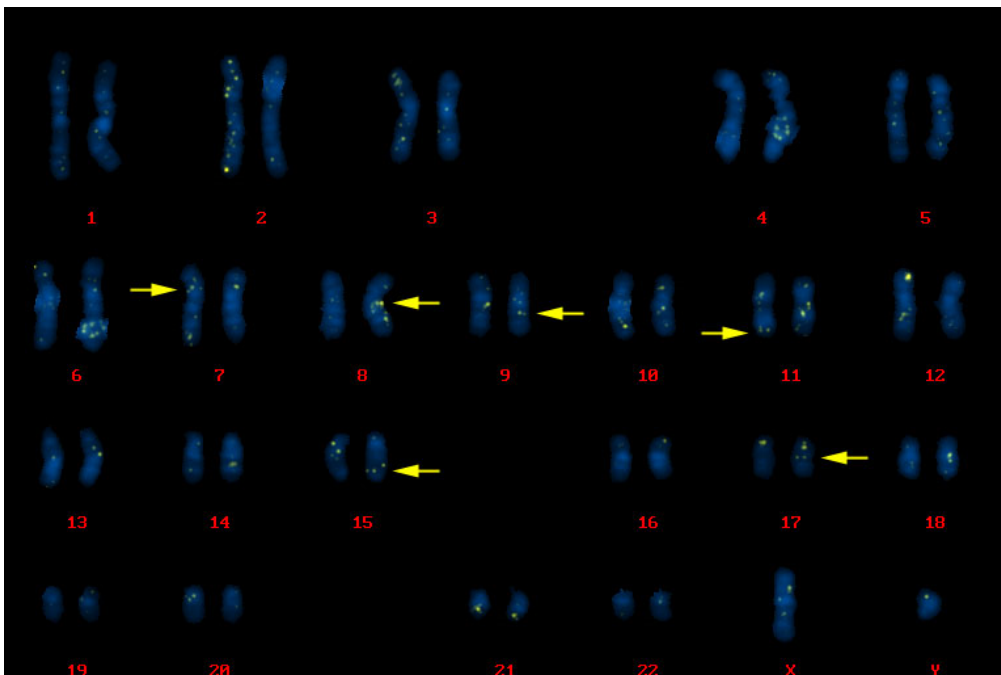


Fig. 3 HCV抗体陽性 Case 1 karyogram

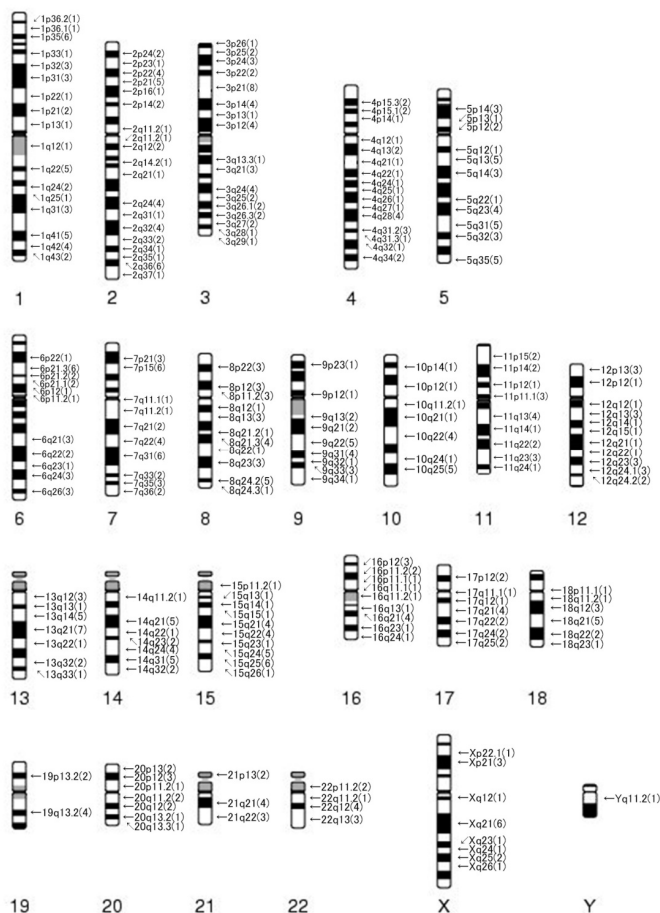


Fig. 4 HCV4症例のideogramのまとめ

の特徴的な組み込み部位は認められず、ランダムにHBVゲノムの組み込みがあることが確認された。

4. 考察

Fish法の結果では、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。しかしながら、ヒト染色体上への特定の部位への組み込みの集積、いわゆるhot spotは今のところ認められていない。

HBs抗原陽性例におけるHBVゲノムのヒト染色体上への組み込み部位はランダムであった。

一方HBs抗原陰性かつHCV抗体陽性例においても、HBs抗原陽性例と同様に、末梢血リンパ球からも多数のHBV genomeのヒト染色体への組み込みが認められた。今までのところ、HBs抗原陽性例と同一の特定部位へのHBVゲノムの組み込みは確定されていないが、HCV抗体陽性のいわゆるC型

HCCにおいても、HBVゲノムのヒト染色体上への組み込みを確認したことより、C型慢性肝炎・肝硬変からのHCC発生には、HBVが関与していることも考慮すべきであることが示唆された。

現在、組み込み部位と発癌に関与する遺伝子発現の有無など背景因子について、次世代高速シーケンサーを用いて検討中である。

文献

- 1) Yamamoto T, Kajino K, Kudo M, et al. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by cloning and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1999; 29: 1446-1452.
- 2) Matsuoka S, Nirei K, Tamura A, et al. Influence of Occult Hepatitis B Virus Coinfection on the Incidence of Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C. *Intervirology* 2009; 51: 352-361.
- 3) Wang J, Lin J, Chang Y, Li P, Yang Y. MCM3AP, a novel HBV integration site in hepatocellular carcinoma and its implication in hepatocarcinogenesis. *J*

Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2010; 30: 425-429.

- 4) Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, et al. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. Clin Cancer Res 2005; 11: 5821-5826.

肝癌治療ガイドラインに向けた周術期管理基準の策定

山崎慎太郎¹⁾

Management criteria for postoperative management of hepatocellular carcinoma

Shintaro YAMAZAKI¹⁾

要旨

肝切除は、1990年代に入り周術期死亡は劇的に低下した。当科でも周術期死亡は0.4%以下であり、近年合併症の発生率も低下している。今回、肝臓癌術前の予防的食道静脈瘤に対する治療の対策を検討した。今までに静脈瘤のグレード別にイベント発生率を前向きに検証した知見は存在しない。不要な治療による医療費と患者の苦痛を軽減するために、肝臓癌術前における食道静脈瘤の予防的治療のクライテリアを前向き試験により検証する。術前スクリーニングで食道静脈瘤の有無と程度を確認した。術前に静脈瘤グレードF3もしくはF2かつRC(+)の患者にのみ内視鏡的静脈瘤結紮術を施行した。術前観察において81/261例(31.0%)に静脈瘤を確認し内訳は(F0/F1/F2/F3:12/51/17/1)、RC(+)患者は全静脈瘤患者の12/81例(14.8%)であった。よって13/81例(16.0%)に術前内視鏡的結紮術を施行した。術後1週の観察では65例(24.9%)に食道静脈瘤を認め(F0/F1/F2/F3:17/39/7/2、RC(+)患者2例)4/65例(6.2%)に内視鏡的結紮術を施行した。術後内視鏡では術後1カ月59例(23.5%)、6カ月59例(23.1%)に静脈瘤を認めたが治療の対象となる患者はいなかった。

1. 肝硬変患者の術前管理基準の作成の必要性

肝機能因子は肝臓癌外科治療におけるKey因子である。肝硬変では高度の門脈圧亢進症が併存する。長期の門脈圧亢進症は食道静脈瘤の発達と密接な関係を持つ。末期肝臓癌の食道静脈瘤の破裂は致命率20%と非常に高い。

故に、肝臓癌の周術期リスク因子として食道静脈瘤の破裂が挙げられ致命率が高いといえる。現在行われている予防対策は、術前のスクリーニング、予防的食道静脈瘤治療と、βブロッカーの周術期使用である。これらは静脈瘤の破裂を未然に予防する方法であるが、静脈瘤には表1の如くグレードが存在する。今までにグレード別にイベント発生率を前向きに検証した知見は存在しない。不要な治療による医療費と患者の苦痛を軽減するために、肝臓癌術前における食道静脈瘤の予防的治療のクライテリアを前向き試験により検証する。

2. 方法

2008年から2010年の肝臓癌で手術を施行した371例中肝細胞癌症例の269例を対象とした。術前スクリーニングで食道静脈瘤の有無と程度を確認した。術前に静脈瘤グレードF3もしくはF2かつRC(+)の患者にのみ内視鏡的静脈瘤結紮術を施行した。肝切除後は全症例を対象に1週、1カ月、6カ月後に内視鏡による食道静脈瘤の観察・治療を施行。結紮術施行例は2週後に確認内視鏡施行後に肝切除術を行なった。(図1)

図1は、対象期間の371例の肝切除患者を対象とした。この中で肝細胞癌患者269例を対象をしぼり、スクリーニングを施行した。253例の患者の内、術前に食道静脈瘤の術前治療を必要とした患者は2例であった。残りの251例を術後のプロトコールに則ってフォローアップを行った。

1) 日本大学医学部
山崎 慎太郎 : yamazaki-nmed@umin.ac.jp

表 1 日本門脈亢進症学会による食道静脈瘤の表記方法

L : location
Ls superior 上部食道
Lm midium 中部食道
Li inferior 下部食道に限局
Lg gastric 胃静脈瘤
Lg-c 噴門輪に近接する静脈瘤
Lg-f 噴門輪に離れて孤立するもの
F : form
F0 静脈瘤として認められないもの
F1 直線的な細いもの
F2 連珠状、中等度
F3 結節状、腫瘤状
C : color
Cw (white)
Cb (blue)
血栓化静脈瘤は-Thを付記
RC : red color sign
RWM red wale marking(ミミズばれ)
CRS cherry red spot様所見
HCS hemato cystic spot 出血血豆様所見
発赤所見の程度
RC(-) 発赤所見を全く認めない
RC(+) 発赤所見を限局性に少数認める

3. 結果

肝切除周術期患者に術前にスクリーニング上部消化管内視鏡検査を行い静脈瘤の有無とそのグレードを観察した。

結果術前の81/253例(31.0%)に静脈瘤を確認した。その内訳は表1の表記に則り記載をすると、F0が12例、F1が51例、F2が17例、そしてF3は1例であった。Red Color sign (RC) 陽性の患者は全静脈瘤患者の12/81例(14.8%)であった。

このうち、静脈瘤の大きさがF3のもの、もしくは、F2かつRC陽性患者は予防的内視鏡下静脈瘤結紮術を施行した。よって13/81例(16.0%)に術前内視鏡的結紮術を施行した。さらに肝切除術後1週の観察では65例(24.9%)に食道静脈瘤を認めF0は17例、F1は39例、F2は7例、そしてF3は2例の静脈瘤患者を認めた。このなかで、F2かつRC(+)の患者2例が存在したため、合計4/65例(6.2%)に肝切除後1週目に内視鏡的結紮術を施行した。さらに術後フォローアップの上部内視鏡検査では術後1カ月59例(23.5%)、6カ月59例(23.1%)に静脈瘤を認めたがF3およびF2かつRC(+)となる治療の対象となる患者はいなかった。

Flow of patients

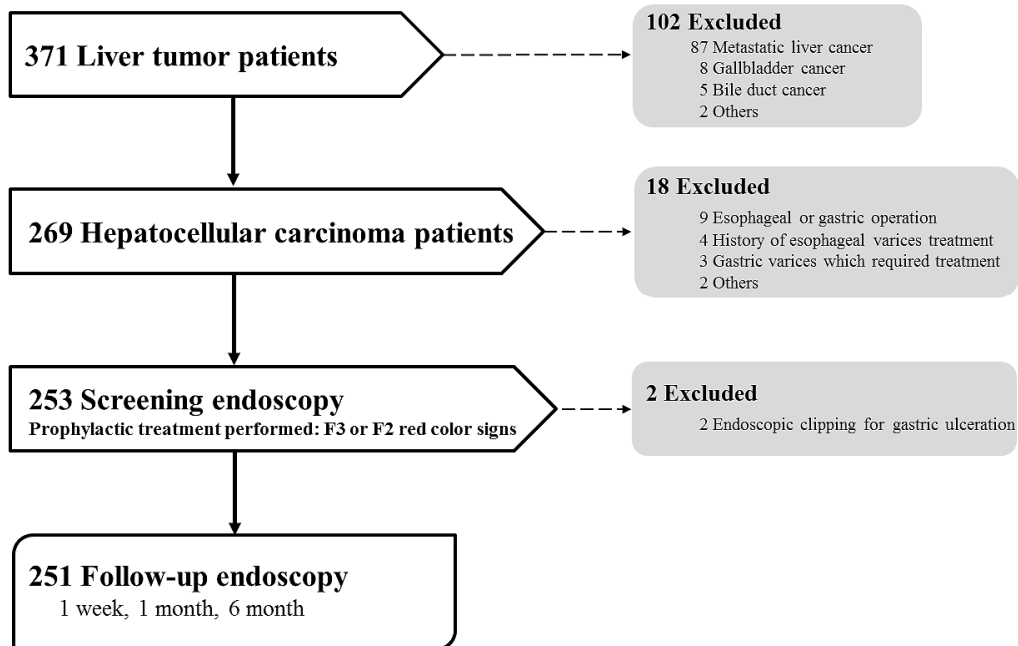


図 1 本研究の概要

Change and degree of varices at 1 week after operation

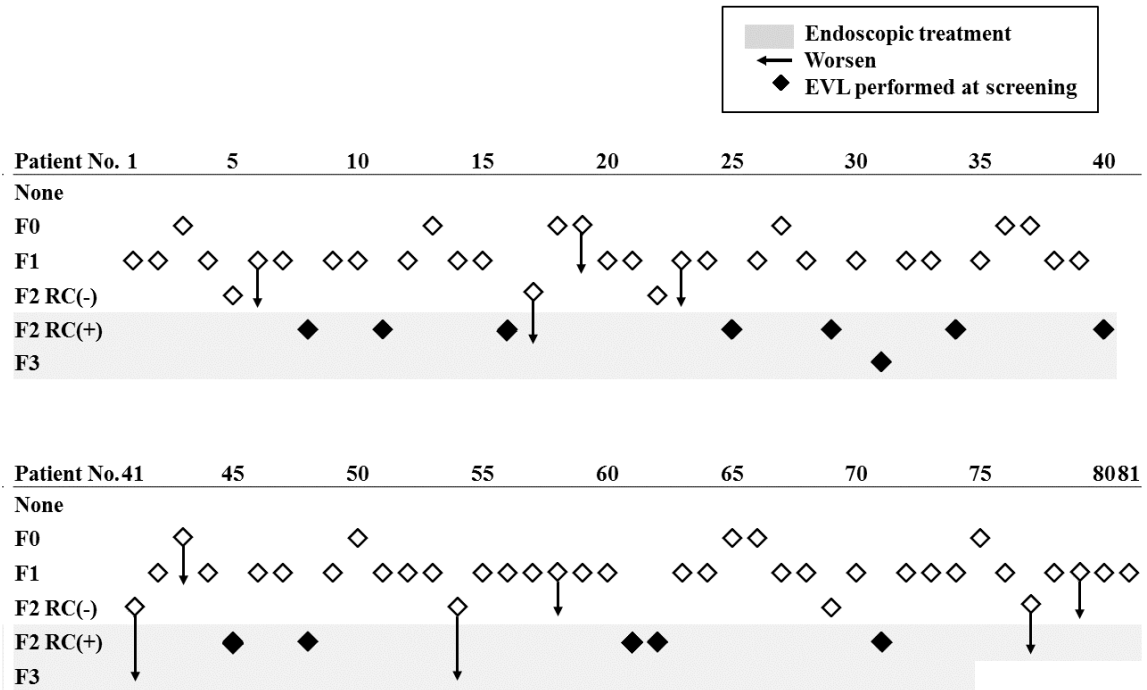


図2 本研究患者の静脈瘤の程度の推移

スクリーニングで食道静脈瘤の存在が確認された81例をフォローアップした。観察期間（6カ月）の間の静脈瘤の変化を図示した。

4. 結語

術前内視鏡的静脈瘤結紮術が必要な患者は静脈瘤グレードF3もしくはF2かつRC(+)の患者のみである。

5. おわりに

食道静脈瘤破裂は肝硬変患者にとって致命的イベントとして知られている。肝切除が安全に行われるようになったとはいえ、年間数%の食道静脈瘤の術後破裂患者が存在するといわれている。当科では術後在院死亡ゼロを達成すべく治療を行っている。

静脈瘤の術前治療は肝切除周術期における予防治療の軸の一つと考えられ、本試験による知見は術後死亡ゼロに貢献する戦略の一つと考えられる。

肝免疫系細胞における脂質代謝及び自然免疫調節機構に対する 核内受容体 LXR の影響

梅田 (遠藤) 香織¹⁾, 中島弘幸²⁾, 関 修司²⁾, 槇島 誠¹⁾

Effects of liver X receptor on regulation of lipid metabolism and innate immune responses in hepatic mononuclear cells

Kaori ENDO-UMEDA¹⁾, Hiroyuki NAKASHIMA²⁾, Shuhji SEKI²⁾, Makoto MAKISHIMA¹⁾

要旨

Liver X receptor (LXR) は生体内でコレステロール代謝調節センサーとして働く一方、マクロファージでは抗炎症分子として機能することが知られているが、体内に常在する免疫細胞における LXR の詳細な役割は明らかではない。そこで、本研究では LXR が主に発現、機能する肝臓での免疫細胞における LXR の機能について検討した。野生型と LXR 欠損マウスから肝免疫細胞を単離し、細胞組成およびエンドトキシンに対する応答性を比較したところ、欠損マウスでは炎症性マクロファージが増加し、それに相関して炎症性サイトカイン産生能も増加していることが明らかとなった。以上の結果から、LXR は動脈硬化等の代謝疾患のみならず、免疫疾患の治療薬の標的分子となりうる可能性が示唆された。

1. はじめに

核内受容体 LXR はリガンド依存性転写因子であり、LXR α と LXR β の 2 種類のアイソフォームが存在する。LXR α は主に肝臓、脂肪組織、腎臓、腸管、マクロファージに発現するのに対し、LXR β は全身に発現している。LXR はコレステロールの代謝産物であるオキシステロールをリガンドとして認識し、脂質代謝関連遺伝子群の発現を制御することで体内のコレステロール恒常性を維持している。また近年、マクロファージの LXR が NF- κ B の転写活性を直接抑制するメカニズムを介して炎症反応を抑制することが報告され¹⁾、LXR は脂質代謝のみならず自然免疫制御機構にも関与することが示された。しかし、体内に常在する免疫細胞における LXR の役割は未だ明らかではない。

本研究では、免疫細胞が豊富に存在し、かつ LXR が高発現する肝臓に着目し、野生型および LXR α / β 欠損マウスを用い、肝臓免疫細胞における LXR の機能を比較検討した。

2. 対象ならびに方法

野生型または LXR α / β 欠損マウスの肝臓から、非実質細胞をコラゲナーゼ消化及びパーコール密度勾配分離法を用いて単離した。単離した細胞は FITC 標識抗マウス F4/80 抗体、PE-Cy5 標識抗マウス CD11b 抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞分布を分析した。次に、野生型または LXR α / β 欠損マウスから単離した肝免疫細胞を培養し、リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) で 3 時間刺激後 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて炎症性サイトカイン発現を評価した。

3. 結果と考察

野生型と比較した結果、LXR α / β 欠損マウスにおいて総免疫細胞数が約 2 倍増加していた (図 A)。また、各免疫細胞の組成を分析したところ、炎症応答時に多くのサイトカインを産生する F4/80 陽性 CD11b 陽性 Kupffer 細胞の割合が増加していた (図 B)。次に、単離した肝免疫細胞を LPS で刺激したところ、

1) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野
2) 防衛医科大学校免疫・微生物学
梅田 (遠藤) 香織: umeda.kaori@nihon-u.ac.jp

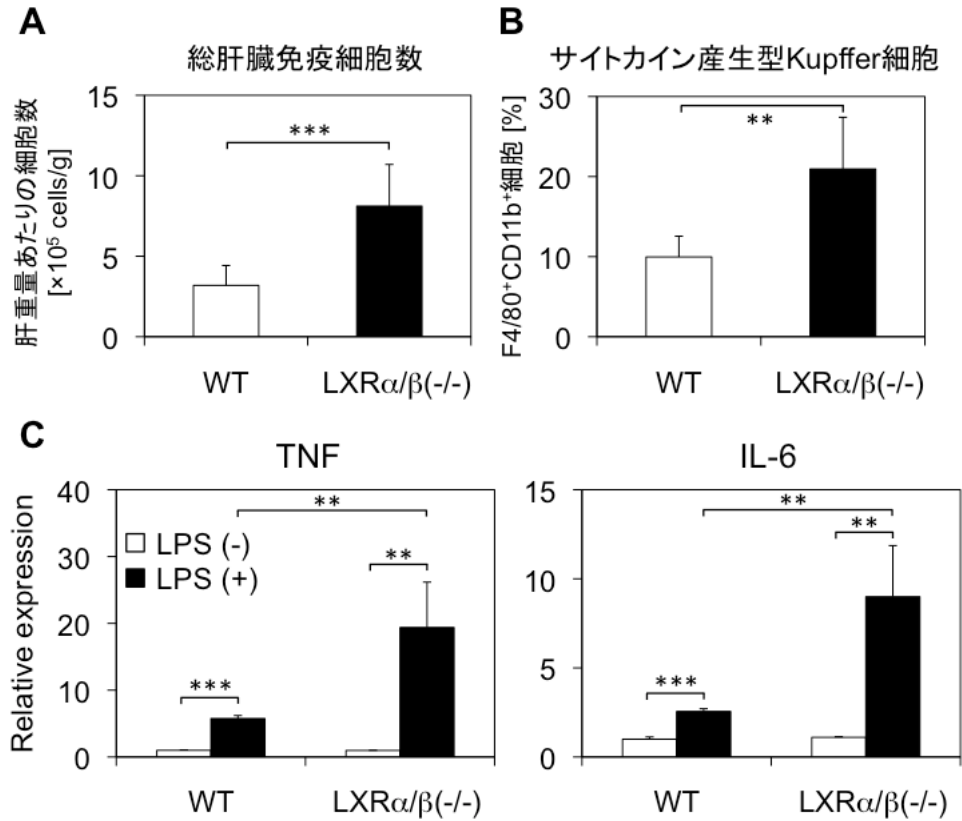


図 野生型 (WT) および LXR α/β 欠損 (LXR α/β (-/-)) マウス由来肝臓免疫細胞の比較. A, 肝重量あたりの総肝臓免疫細胞数. B, F4/80陽性 CD11b陽性細胞数. C, LPS刺激による炎症性サイトカイン (TNF, IL-6) 産生能の評価. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

野生型と比較してLXR α/β 欠損においてTNF, IL-6の炎症性サイトカイン発現量が顕著に増加した(図C)。

以上のことから, LXRは, 肝臓免疫細胞において細胞分布および炎症応答反応に影響を及ぼすことが示唆された。近年, 著者らは抗炎症作用特異的LXRリガンドを開発した²⁾。今後はこのリガンドを用いて肝障害における薬理効果を検討し, LXRが免疫疾患の治療標的となりうる可能性を模索していく予定である。

引用文献

- 1) Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, and Tontonoz P. (2003) Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* 9, 213-219.
- 2) Aoyama A, Endo-Umeda K, Kishida K, Ohgane K, Noguchi-Yachide T, Aoyama H, Ishikawa M, Miyachi H, Makishima M, and Hashimoto Y. (2012) Design, synthesis, and biological evaluation of novel transrepression-selective liver X receptor (LXR) ligands with 5,11-dihydro-5-methyl-11-methylene-6H-dibenz[b,e]azepin-6-one skeleton. *J. Med. Chem.* 55, 7360-7377.

二酸化炭素散布および純酸素投与による弁膜症手術における 空気塞栓予防の検討

吉武 勇¹⁾, 畑 博明¹⁾, 秦 光賢¹⁾, 瀬在 明¹⁾,
 額原 徹²⁾, 飯田良司²⁾, 塩野元美¹⁾

Prevention of air microemboli during heart valve surgery combination with CO₂ insufflation and hyperbarix oxygen therapy

Isamu YOSHITAKE¹⁾, Hiroaki HATA¹⁾, Mitsumasa HATA¹⁾, Akira SEZAI¹⁾,
 Toru EHARA²⁾, Ryouji IIDA²⁾, Motomi SHIONO¹⁾

要旨

弁膜症手術における空気塞栓に関しては二酸化炭素散布による予防効果が証明されてきており一部施設では用いられているが、一般に広く普及しているとは言い難い。そこで、当院において二酸化炭素の術野散布を導入するにあたり、従来法、CO₂散布法、コンビネーション法（CO₂散布+高濃度酸素投与）を行い、その効果を臨床試験によって再評価することを本研究の目的とした。Primary endpointは経食道心臓超音波検査による左房・左室内の気泡数の変化を比較評価し、Secondary endpointとして空気塞栓症の有無につき臨床症状および生化学データにて比較検討する方針とし、プレスタディーとしてCO₂散布法を行った2症例について検証した。CO₂散布により気泡数は減少し、容易に人工心肺より離脱し得たが、臨床症状および生化学データ値において従来法との明らかな相違は認めず、プレスタディーのみで本研究を終了した。今後本研究を継続するにあたり、客観的かつ早期に検出可能な新たな評価項目を見出す必要があると考える。

1. はじめに

弁膜症手術における空気塞栓に関しては二酸化炭素散布による予防効果が証明されてきており一部施設では用いられているが、一般に広く普及しているとは言い難い。当院でも従来のように大動脈基部ないし心尖部より空気抜きを行い空気塞栓予防に努めているが、空気塞栓合併による急性循環不全や臓器障害さらには術後脳虚血による後遺症を来す症例も経験し、さらなる検討の必要性を痛感している。本研究の目的は、当院において二酸化炭素の術野散布を導入するにあたり、その効果を臨床試験によって再評価することと、さらなる予防効果を発揮するように、人工心肺離脱前より手術終了まで純酸素を投与することによる相乗効果の有無を検証することであり、本研究をRCTにて行うに先立ち、当科にてCO₂散布法を用いて弁膜症手術を行った症例について検証した。

2. 対象および方法

当院で行った弁膜症手術2例（同一術者執刀による連続した症例）を対象とし、経食道超音波検査ならびに術前後の臨床症状の変化につき比較評価した。

3. 症例1：73歳、男性

診断：大動脈弁狭窄兼閉鎖不全症、僧帽弁閉鎖不全症、冠動脈形成術後、虚血性心疾患。

術式：二弁置換術（大動脈弁および僧帽弁置換術）、冠動脈バイパス術（1枝）

全身麻酔、胸骨正中切開にてアプローチ。上行大動脈送血、上・下大静脈脱血にて人工心肺を確立。この時点より術野へのCO₂散布（1L/min）を開始。通常通り大動脈弁および僧帽弁を切除し、生体弁を用いて二弁置換術を施行。大動脈遮断解除後より経食道超音波検査にて左心房および左室内の空気像を経時的に観察したところ、遮断直後より心腔内の

1) 日本大学医学部 外科学系 心臓血管・呼吸器・総合外科学分野
 2) 日本大学医学部 麻酔科学系 麻酔科学分野

吉武 勇：yoshitake.isamu@nihon-u.ac.jp

空気像は少なく（左房>左室）、ほぼすべての気泡が消失するのに約5分の再還流を要した。体外循環からは中等量のカテコラミンを使用にて容易に離脱し、空気塞栓を疑われる合併症（急性心不全、不整脈等）の出現は認めなかった。術後四肢麻痺なく完全覚醒し、脳神経系合併症の出現は認めなかった。手術時間：367min, 人工心肺時間：268min, 大動脈遮断時間：215min。術後peak CK-MB 106 IU/L, 術後人工呼吸器装着時間：89h, 術後ICU滞在期間：233h。

4. 症例2：68歳，女性

診断：大動脈弁狭窄兼閉鎖不全症

術式：大動脈弁置換術

全身麻酔，胸骨正中切開にてアプローチ。上行大動脈送血，右房脱血にて人工心肺を確立。この時点より術野へのCO₂散布（1L/min）を開始。通常通り大動脈弁を切除し，機械弁を用いて大動脈弁置換術を施行。大動脈遮断解除後より経食道超音波検査にて左心房および左心室内の空気像を経時的に観察したところ，遮断直後より心腔内の空気像はほとんどなくなり（左房=左室），気泡が消失するのに約2分の再還流を要した。体外循環からは少量のカテコラミン使用にて容易に離脱し，空気塞栓を疑われる合併症（急性心不全，不整脈等）の出現は認めなかった。術後四肢麻痺なく完全覚醒し，脳神経系合併症の出現は認めなかった。手術時間：214min, 体外循環時間：112min, 大動脈遮断時間：78min, 術後peak CK-MB 20 IU/L, 術後人工呼吸器装着時間：6h 18min, 術後ICU滞在期間：68h。

5. 考 察

開心術を行う際に発生しうる空気塞栓は，急性心不全（とくに右冠動脈への空気流入による右心不全），不整脈（除脈，心室細動等の重篤な不整脈）および脳血管障害（一過性脳虚血発作を含む）等の重篤な合併症の原因となるだけでなく，体位変換等により突然発症することが多く，術後容態急変の引き金となり得るため，可能な限り予防する必要がある。これまで，手術中に空気抜きのためのベントチューブを左室や大動脈に留置したり，体位変換や心臓に振動を加えたり等，様々な工夫を行って来ているが，完全に予防するには至っていない。現在は

空気抜きのための予防措置として術野へのCO₂散布が有効であるといった報告もなされており¹⁻⁶⁾，施設間においてばらつきはあるものの，導入が簡便であることから徐々に広まりつつある。今回の検討においても，術野へのCO₂散布により手術手技の妨げになるものではなく，空気抜きにかかる時間は従来に比べ短時間である印象もあることから，積極的に導入すべきと考えられた。ただし，経食道超音波検査での比較検討のみでは，明確な違いを見出すのは困難であり（心腔内に存在する空気像の評価，空気抜きに要した時間など，いずれも検者の主観が介入するため），従来法との比較検討における有意差を見出すには客観的指標が必要と考えられた。今回の検討では行わなかったが，近年になり，多くの高齢者において手術や麻酔後に起こる術後認知機能障害（Postoperative Cognitive Dysfunction: POCD）が注目されるようになっており，心臓手術数週間後には30～80%，3～6カ月後には10～60%にPOCDが発生すると報告されており，そのリスクファクターとしては年齢や麻酔時間，呼吸器合併症，感染症の合併，2回目の手術，教育レベル，うつ状態，アルコール摂取が抽出されている⁷⁻⁹⁾。しかし，空気塞栓の際に起こりうる低酸素や低血圧の発生との因果関係は証明されておらず，MMSE等の質問紙表を用いた高次脳機能・認知障害を評価することによって，これらの因果関係が証明される可能性はあり，興味深い研究になり得ると考える。

6. 結 語

当院において二酸化炭素の術野散布を導入するにあたり，プレスタディーとしてCO₂散布法を行った2症例について検証した。CO₂散布により気泡数は減少し，容易に人工心肺より離脱し得たが，臨床症状および生化学データ値において従来法との明らかな相違は認めず，プレスタディーのみで本研究を終了した。今後本研究を継続するにあたり，客観的かつ早期に検出可能な新たな評価項目を見出す必要性があると考えられる。

謝辞

本研究は平成25年度日本大学医学部学術研究助成金「土岐研究」の支援によりなされたものであり，ここに深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) Svenarud S, persson M, Van der Linden J. Efficiency of a gas diffuser and influence of suction in carbon dioxide deairing of a cardiothoracoc wound cavity model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125: 1043-9.
- 2) Al-Rashidi F, Landenhed M, Blomquist S, et al. Comparison of the effectiveness and safety of a new de-airing technique with a standardized carbon dioxide insufflation technique in open left heart surgery: a randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 141: 1128-33.
- 3) Svenarud P, Persson M, van der Linden J. Effect of CO₂ insufflation on the number and behavior of air microemboli in open - heart surgery: a randomized clinical trial. *Circulation.* 2004; 109: 1127-32.
- 4) Al-Rashidi F, Blomquist S, Höglund P, et al. A new de-airing technique that reduces systemic microemboli during open surgery: a prospective controlled study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 ;138 :157-62.
- 5) Chaudhuri K, Storey E, Lee GA, et al. Carbon dioxide insufflation in open -chamber cardiac surgery: a double-blind, randomized clinical trial of neurocognitive effects. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 ;144 :646-653.
- 6) Sun Y, Ji B, Zhu X, Zheng Z. Efficacy of carbon dioxide insufflation for cerebral and cardiac protection during open heart surgery: a systematic review and meta-analysis. *Artif Organs.* 2013 ;37 :439-46.
- 7) Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, et al. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. *Lancet.* 1998 ;351 :857-61.
- 8) Ancelin ML, de Roquefeuil G, Ledésert, et al. Exposure to anaesthetic agents, cognitive functioning and depressive symptomatology in the elderly. *Br J Psychiatry.* 2001 ;178 :360-6.
- 9) Johnson T, Monk T, Rasmussen LS, et al. Postoperative cognitive dysfunction in middle-aged patients. *Anesthesiology.* 2002 ;96 :1351-7.

高脂肪食がブタ心房筋の電氣的、構造的リモデリングに及ぼす影響

奥村恭男¹⁾, 渡邊一郎¹⁾, 永嶋孝一¹⁾, 真野博明¹⁾, 園田和正¹⁾, 古川力丈¹⁾,
佐々木直子¹⁾, 高橋啓子¹⁾, 磯 一貴¹⁾, 大久保公恵¹⁾, 中井俊子¹⁾, 平山篤志¹⁾

Impact of Hyperlipidemia on Atrial Electrical and Structural Remodeling of Atrial Fibrillation

Yasuo OKUMURA¹⁾, Ichiro WATANABE¹⁾, Koichi NAGASHIMA¹⁾, Hiroaki MANO¹⁾,
Kazumasa SONODA¹⁾, Rikitake KOGAWA¹⁾, Naoko SASAKI¹⁾, Keiko TAKAHASHI¹⁾,
Kazuki ISO¹⁾, Kimie OHKUBO¹⁾, Toshiko NAKAI¹⁾, Atsushi HIRAYAMA¹⁾

要旨

心房細動患者は、メタボリック症候群と関連があると報告されているが、いかに心房筋に影響を与えているか不明である。そこで、高脂肪食を給与したブタを用い、電位生理学的、組織学的検討を行った。ブタ10頭を、生後8週後から高脂肪食を与える5頭と通常食を与える対照群5頭に分け12週間餌付けし、電気生理学的検査を施行した。各肺静脈での不応期は、脂肪食群は対照群より有意に短縮していた。左心耳からの5秒間の高頻度刺激にてAF持続時間は対照群より脂肪食群で長かった。組織学的検討では、両群間での相違も認めなかった。

以上より、この変化はメタボリック症候群でのAF発症における初期の電気生理学的変化を示している可能性が示唆された。

1. はじめに

近年、メタボリック症候群が心房細動 (AF) 発症の危険因子であることが知られている^{1,2)}。しかしながら、その正確な機序については明らかではない。そのため本研究は、メタボリック症候群がAF発症に関与する正確な機序を解明するための足掛かりとして、育成期に高脂肪食を給与したブタを用い、AFの誘発性や持続時間を含めた電位生理学的検討、また心臓超音波や心房・肺静脈の解剖学および組織学的検討を行った。

2. 対象及び方法

動物実験：ブタ10頭を実験に使用した。生後8週齢から高脂肪食を給与した高脂肪食群5頭と、正常食を給与した対照群5頭とし、12週間飼育した後、電気生理学的検査を施行した。その後心臓を摘出し、心房および肺静脈の組織学的検査を施行した。

準備

ミタゾラム0.1mg/kg筋肉注射後5%イソフルランにて全身麻酔とし、耳静脈にルートを取り気管挿管後、1回換気量10ml/kg,20回/分で呼吸としイソフルラン3%にて維持麻酔とした。右外頸静脈より7Fr sheathを挿入し、冠静脈用8極の電極カテーテルを挿入した。右鼠径静脈より、8.5Fr long sheath (Agilis, St. Jude Medical Inc., Minneapolis, MN) を挿入し、左鼠径静脈より8Frの心腔内エコー用の専用sheathを挿入した。左鼠径動脈を確保し、動脈圧をモニタリングした。心腔内エコーにより、左房径、左室駆出率、左室壁厚を測定後、心腔内エコーガイド下に、brockenbrough法により左房ヘカテーテルを配置した。

電気生理学的検査

Ensite NavXマッピングシステム (ESI 3000, version 8, St. Jude Medical Inc.) を使用し、多極電極カテーテルを用いて右房、左房の三次元 geometry を

1) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野
奥村恭男: yasuwo128@hotmail.co.jp

作成した。洞調律中の activation map を作成し、同時に右房、左房の各部位（右心耳、上大静脈—右房接合部、右房側壁、右房中隔、左房中隔、前壁、僧帽弁輪部、左心耳、左房天蓋部、右左上肺静脈、下肺静脈共通幹）における電位波高を記録した。また、基本刺激周期 400～500ms から 10ms ごとに早期刺激を漸減し、各心房部位における心房不応期を測定した。続けて左心耳より 5 秒間の高頻度心房ペーシングを行い、AF の誘発性および持続時間を評価した。AF が持続した場合、AF 中の右房、左房の各部位における CFAE（分裂電位：AF 中に 5 秒間で記録した平均周期が 120ms 以下で興奮する電位部位）の分布を分析した。

組織学的検討

3%イソフルランによる深麻酔下に、KCL40mEq/20ml を静注し安楽死後、心臓を摘出 10%緩衝ホルマリンで固定後、パラフィンブロックを作製し 4μm で薄切。hematoxylin and eosin 染色（H.E.）を用い右房、左房、肺静脈における線維化や肥大の分布を高脂肪食群、対照群で比較した。

3. 結果

血液生化学的検査では、総コレステロール値（81 [67-88] mg/dl vs. 347 [191-434] mg/dl, $P=0.0088$ ）、LDLコレステロール値（43 [34-48] mg/dl vs. 276 [115-340] mg/dl, $P=0.0163$ ）、HDLコレステロール値（30 [29-41] mg/dl vs. 58 [41-74] mg/dl, $P=0.0278$ ）は、いずれも対照群と比較し、高脂肪食群では有意に増加し、明らかな高脂血症を呈した。中性脂肪値（22 [16-30] mg/dl vs. 17 [14-27] mg/dl, $P=0.4620$ ）は両群間で差がなかった。対照群、脂肪食群における各種指標の比較を表 1 に示す。体重、血圧、心拍数、平均左房圧、左心房径、左室収縮率を含めた心エコー指標に差を認めなかった。電気生理学的指標においては、両群間で右房、左房、全心房内伝導時間および電位波高に差を認めなかった。左心耳、右心耳における有効不応期は、脂肪食群は対照群に比較し短縮している傾向を認め、特に上大静脈接合部、各肺静脈での不応期は、脂肪食群は対照群より有意に短縮していた。

左心耳からの 5 秒間の高頻度刺激にて AF が全例誘発されたが、持続時間は対照群より脂肪食群で

長かった（22 [3～30] sec vs. 80 [45～1350] sec, $P=0.0212$ ）。三次元マップ上の洞調律時の電位波高は、右房、左房の各部位、肺静脈では両群に差はなかった。AF が持続しないため対照群では 5 例中 2 例のみしか CFAE マップは作成できなかったが、脂肪食群は全例 AF が長期に持続したため、CFAE マップを作成可能であった。AF 中の CFAE 局在は両群間で相違なく、肺静脈よりむしろ右房本体、左房本体、右心耳、左心耳に集中して分布していた。組織学的検討では、右房本体、左房本体、右心耳、左心耳、肺静脈開口部において、心房筋の線維化、肥大、神経節の増加など有意な所見を認めず、両群間での相違も認めなかった。

4. 考察

本研究では、高脂肪食群は対照群に比較し、肺静脈および上大静脈の不応期が短縮しており、高頻度刺激による AF 誘発後の AF 持続時間が有意に延長していることが明らかとなった。

AF を引き起こす心房の電気生理学的特性の変化は、心房不応期の短縮、心房不応期の刺激頻度依存性の低下、伝導速度の低下で説明され、いずれも心房内の興奮波長（興奮伝導速度×有効不応期）を短縮することで、AF を維持するためのリエントリー形成を助長する。本研究の高脂肪食群での AF 持続時間の延長は、両群で心房内の伝導時間に差がなかったことから、主に肺静脈における不応期の短縮が関与している可能性が考えられる。このような AF を発生・維持させる初期の電気生理学的変化を電氣的リモデリングと呼ぶが、本結果より、肺静脈の電氣的リモデリングは心房のそれより先に進行することが示唆された。この肺静脈の不応期の短縮には、いくつかの機序が考えられる。一つは、心房、肺静脈のストレッチである。高脂肪食群では、有意ではないが体重、血圧、平均左房圧などが高値を呈しており、心房、肺静脈のストレッチを受けやすい背景がある。細胞外ストレッチによって伸展活性化チャンネルが開口することで細胞内 Ca^{2+} 過負荷が起こる。この細胞内 Ca^{2+} 過負荷は、撃発活動や異常自動能を誘発して AF のトリガーを形成するとともに、 Ca^{2+} チャンネルの不活化をきたし、有効不応期を短縮させてリエントリーを引き起こす³⁾。もう一つは炎症の関与である。肥満患者では高感度 CRP を

表1 対照群, 脂肪食群における比較

	対照群 (n=5)	脂肪食群 (n=5)	P value
体重 (kg)	70 [67-93]	89 [78-101]	0.3472
収縮期血圧 (mmHg)	120 [94-140]	130 [114-150]	0.3472
拡張期血圧 (mmHg)	70 [58-82]	81 [62-95]	0.3472
心拍数 (回/分)	114 [98-154]	128 [115-147]	0.6015
平均左房圧 (mmHg)	24.5 [21.3-27.8]	34.0 [23.0-41.0]	0.1573
超音波指標			
左房径 (mm)	32 [28-34]	31 [23-34]	0.6631
左室中隔壁厚 (mm)	8.5 [6.5-10.5]	9.5 [6.8-14]	0.5590
左室後壁厚 (mm)	10.0 [8.3-11.8]	11.5 [9.3-13.8]	0.3094
左室駆出率 (%)	66.5 [65.0-66.0]	70.0 [65.3-82.3]	0.2248
左房径 (mm)	32 [28-34]	31 [23-34]	0.6631
左室中隔壁厚 (mm)	8.5 [6.5-10.5]	9.5 [6.8-14]	0.5590
電気生理学的指標			
右房内伝導時間 (ms)	69 [67-73]	62 [51-72]	0.1425
左房内伝導時間 (ms)	57 [45-73]	49 [45-53]	0.2073
全心房内伝導時間 (ms)	84 [76-100]	77 [67-87]	0.1745
有効不応期 (ms)			
上大静脈接合部	180 [170-195]	150 [140-160]	0.0082
右心耳	180 [160-180]	140 [125-160]	0.0517
左心耳	130 [110-135]	140 [130-155]	0.0827
右上肺静脈開口部	160 [150-175]	130 [110-140]	0.0144
左上肺静脈開口部	160 [145-195]	120 [105-135]	0.0119
下肺静脈共通幹	150 [140-175]	130 [115-140]	0.0232
電位波高 (mV)			
上大静脈	0.71 [0.45-2.24]	2.31 [0.96-3.26]	0.3472
上大静脈接合部	2.59 [1.50-2.96]	1.96 [1.30-3.63]	0.6752
右心耳	5.85 [4.56-6.88]	4.94 [2.95-10.08]	0.9168
右房側壁	3.08 [1.86-5.59]	3.36 [2.69-5.67]	0.7540
右房中隔	3.08 [2.07-4.24]	3.45 [1.90-6.76]	0.6015
左房中隔	3.52 [1.95-3.79]	4.44 [3.58-5.55]	0.0758
左心耳	9.79 [6.25-12.04]	10.62 [7.88-16.99]	0.3472
左房後壁	4.06 [2.79-5.29]	4.31 [1.79-5.89]	0.7540
左房天蓋	4.17 [2.54-5.29]	4.42 [3.58-4.87]	0.8345
僧帽弁輪側壁	5.93 [5.12-11.5]	10.1 [8.42-10.64]	0.1172
左上肺静脈開口部	1.66 [1.01-2.70]	2.24 [1.55-4.63]	0.2506
右上肺静脈開口部	2.71 [1.90-3.64]	4.23 [2.61-5.11]	0.1745
下肺静脈共通幹	1.54 [1.08-4.12]	3.67 [1.00-5.32]	0.8340

はじめとした炎症性サイトカインが高値を呈しており、さらに炎症はAF発症に関与していることは広く知られている。従って、高脂肪食ブタでは炎症が亢進していると考えられる。このストレッチや炎症はATIIを上昇させAT1受容体に結合し、Gタンパクを介して細胞内Ca²⁺過負荷を引き起こすと同時に、ATIIはIKsを増加させ、有効不応期を短縮させるとも報告されている⁴⁾。しかしながら、ブタにおいて血清炎症マーカーは不安定であるため、測定することができなかった。

AFが数週間維持すると電気的リモデリングに引き続いて、心房筋の肥大や線維化、細胞死、心房の拡大といった構造的リモデリングが生じる。この構造的変化は不可逆的に心房内の伝導障害を引き起こし、AFの持続に重要な役割を果たしている。しかしながら本研究では高脂肪食群において、電気生理学的（心房内伝導時間の延長）にも組織学的（心房線維化）にも、構造的リモデリングを認めなかった。また、AF持続時間も比較的短時間であった。したがって、高脂肪食群で見られた電気生理学的変化

は, 心房における電氣的リモデリングの初期段階を反映しているのかもしれない。構造的リモデリングを認めるには, さらに長期にわたる高脂肪食の給与モデルを作成する必要がある可能性がある。

5. 結 語

本研究では, 高脂肪食群は対照群に比較し, 肺静脈の不応期は短縮し, またAF誘発後のAF持続期間が有意に延長しており, 心房の電氣的リモデリングを示唆する所見を認めた。しかしながら, 心房の線維化, 肥大などの組織学的リモデリングを示唆する所見は認めなかった。以上より, この変化はメタボリック症候群でのAF発症における初期の電気生理学的変化を示している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Wanahita N, Messerli FH, Bangalore S, Gami AS, Somers VK, Steinberg JS. Atrial fibrillation and obesity - results of a meta-analysis. *Am Heart J.* 2008; 155: 310-315.
- 2) Watanabe H, Tanabe N, Watanabe T, Darbar D, Roden DM, Sasaki S, Aizawa Y. Metabolic syndrome and risk of development of atrial fibrillation: The nigata preventive medicine study. *Circulation.* 2008; 117: 1255-1260.
- 3) Tavi P, Han C, Weckstrom M. Mechanisms of stretch-induced changes in $[Ca^{2+}]_i$ in rat atrial myocytes: Role of increased troponin c affinity and stretch-activated ion channels. *Circ Res.* 1998; 83: 1165-1177.
- 4) Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Isono T, Toyoda F, Ding WG, Matsuura H, Horie M. Angiotensin ii potentiates the slow component of delayed rectifier K^+ current via the $at1$ receptor in guinea pig atrial myocytes. *Circulation.* 2006; 113: 1278-1286.

Holter心電図を用いた心臓健常者における加算平均心電図の 日内変動と自律神経活動との関連

橋本賢一¹⁾, 笠巻祐二¹⁾, 奥村恭男²⁾, 中井俊子²⁾,
國本 聡²⁾, 渡辺一郎²⁾, 平山篤志²⁾, 相馬正義¹⁾

Circadian variation of late potentials and association with autonomic nerve system in normal heart subjects using Holter ambulatory electrocardiogram

Kenichi HASHIMOTO¹⁾, Yuji KASAMAKI¹⁾, Yasuo OKUMURA²⁾, Toshiko NAKAI²⁾,
Satoshi KUNIMOTO²⁾, Ichiro WATANABE²⁾, Atsushi HIRAYAMA²⁾, Masayoshi SOMA¹⁾

要旨

【背景】 心疾患患者において、心室遅延電位 (LP) の検出は心室性不整脈の予測に有用であることが報告されている。近年24時間のLP検出により詳細なリスク層別化の研究が可能となったが、心臓健常者のLPや自律神経との関連に関する報告はない。

【方法】 24時間デジタル心電計を用いて、48人の健常者 (男性24, 平均年齢45±7歳) のLPを日中1点, 夜間1点 (計2点) で計測した。

LP各パラメータ (fQRS, RMS40, LAS40) の計測を行い、同時に心拍変動解析を行った。LP各パラメータを日中と夜間で比較し、それらとLF/HF, HFとの相関についても検討した。

【結果】 男性のfQRSとLAS40は日中と比較して夜間に有意に延長していた ($P < 0.05$, $P < 0.01$), RMS40は日中と比較して夜間に有意に小さかった ($P < 0.01$)。

男性のFQRS, LAS40はLF/HFとの間に緩い負の相関関係を認めた ($R = 0.458$, $P = 0.002$) と $R = 0.35$, $P = 0.012$) RMS40はLnHFとの間に緩い正の相関関係を認めた ($R = 0.35$, $P = 0.0023$)。

【結語】 男性健常者においてLPは日内変動を有し、自律神経の影響を受けていることが示唆された。

1. 背景

心室遅延電位 (late potential; LP) の検出は心疾患患者において心室性不整脈の予知に有用である¹⁻³⁾。近年デジタルホルター心電計を用いて24時間のLP検出することが可能となり、詳細な致死性不整脈のリスク層別化研究が可能となったが⁴⁻⁶⁾、健常者の24時間のLPに関する報告はない。また、LPの日内変動と自律神経活動に関する報告は少ない。

2. 目的

本研究の目的は、1) LPの日内変動定量的な変化を調査すること、2) LPと心拍変動解析による自律神経活動との関連について検討することである。

3. 対象及び方法

ホルター心電計 (Spide View: Ela Medical社) を用い、48人の心臓健常者 (男性24, 平均年齢45±7歳) のLPを日中1点, 夜間1点 (計2点) で計測した。

心臓健常者の定義は胸部症状を訴え来院したが12誘導心電図, 胸部X-P, Holter心電図検査にて明らかな異常所見がなかった患者とした。

1) 加算平均心電図

加算平均心電図計測の条件は、誘導フランク誘導 (X, Y, Z), 40-250Hz バンドパスフィルターを使用し、サンプリングレート 1000Hzにて行った。

2) HRV (Heart rate variability) 周波数領域解析

RR間隔の変動より自律神経活動の測定を行った。

1) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野
2) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野
橋本賢一: hashimoto.kenichi@nihon-u.ac.jp

具体的な方法は、心電図のR波トリガー信号から得られたRR間隔を時系列データとしてメモリーし、修正型最大エントロピー法 (Maximum Entropy Calculation, MemCalc) を用いて行った。パラメータとして total power (0.01 ~ 1.00 Hz), lowfrequency spectra (LF, 0.04 ~ 0.15 Hz), high frequency spectra (HF, 0.15 ~ 0.40 Hz), およびLF/HFを求めた。

(* HFは歪曲が大きいため自然対数(log) = LnHFをとった。)

4. 結果

1) LPの日内変動 (表1)

LP日内変動の実測平均値を表1に示す。

男性健常者において (fQRS, LAS) は夜間有意に延長した。

(fQRS; 97.6 ± 12.0 ms vs. 102.1 ± 13.1 ms, $P=0.02$. LAS 40; 30.1 ± 13.9 ms vs. 37.8 ± 14.4 ms, $P = 0.007$.)

一方, RMS 40 は夜間有意に短縮した。

(33.8 ± 22.8 ms vs. 27.6 ± 19.6 ms, $P = 0.023$)

女性健常者においてはfQRS, RMS40夜間有意に延長傾向を示したが, (fQRS; 87.9 ± 8.3 ms vs. 89.7 ± 9.3 ms. $P = 0.172$, LAS 40; 29.1 ± 6.2 ms vs. 30.5 ± 8.4 ms, $P=0.3$). 有意ではなかった。RMS 40は日中と夜間で差がみられなかった ($44.6 \pm 22.3\mu V$ vs. $41.8 \pm 27.7\mu V$, $P=0.073$).

2) LPと日内変動の相関 (図1- (a), (b), (c))

男性健常者において, FQRS, RMS 40 と LF/HF 間で負の相関を認めた ($p=0.002$, $R=0.458$; fQRS, $p=0.023$, $R=0.35$; RMS40)

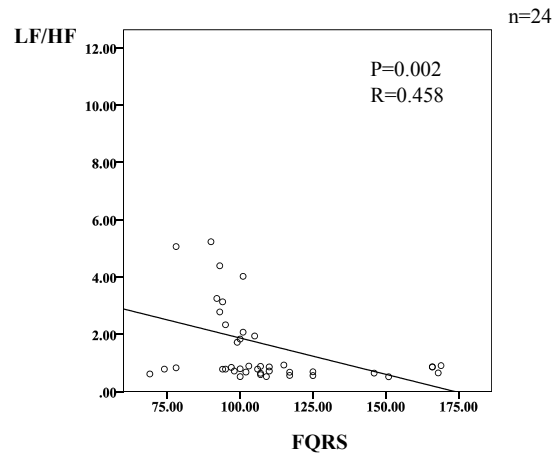


図1- (a) LPと日内変動の相関

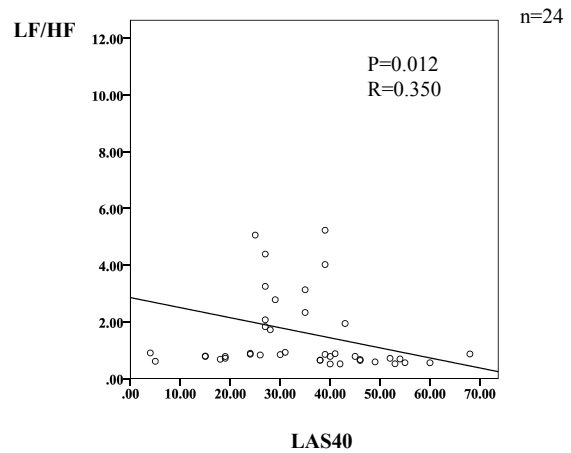


図1- (b) LPと日内変動の相関

表1 LPの日内変動

	日中	夜間	P value
FQRS (Men) ms	97.6 ± 12.0 #	102.1 ± 13.1 ##	0.02
FQRS (Women) ms	87.9 ± 8.3	89.7 ± 9.3	0.172
LAS (Men)ms	30.1 ± 13.9 †	37.8 ± 14.4 ††	0.007
LAS(Women)ms	29.1 ± 6.2	30.5 ± 8.4	0.3
RMS 40(Men) μV	33.8 ± 22.8 #	27.6 ± 19.6 ##	0.035
RMS 40(Women) μV	44.6 ± 22.3	41.8 ± 27.7	0.276

データはすべて平均値±標準偏差
 $P < .005$, # vs ##, $P < .001$, † vs ††

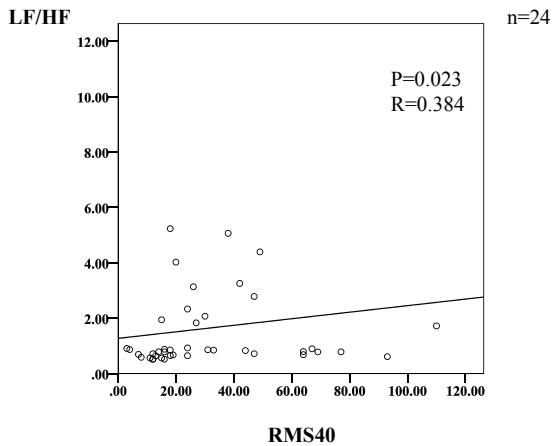


図 1 - (c) LP と日内変動の相関

LAS40 と LF/HF 間で正の相関を認めた ($p=0.012, R=0.358$).

5. 結 論

男性の心臓健常者において、LPの各パラメータは日内変動を有し、交感神経活動と関連がみられた。

夜間におけるLPの判定を行う際は考慮に入れる必要がある。

6. 考 察

本研究では、1) 男性における心臓健常者ではLPパラメータ (fQRS, RMS40, LAS40) は日内変動があり、夜間に増悪するが、女性は有意差がなかった。2) 夜間のLP増悪は副交感神経活動によって修飾されている。ことが明らかとなった。

LPは電気的な心室性不整脈の器質 (素地) を表している。

これまでは実時間 (リアルタイム) での検討であり、記録時間は15-20分と短時間であった。近年ホルター心電図のデータ記録がデジタル化されたことに伴い、LPの記録も24時間計測することが可能となった^{5,6)}。

Brugada症候群は器質的な心臓異常みられず、Naチャンネル (Ito) の異常により致死性心室性不整脈を呈する疾患群で、高率にLPが陽性となることが知られている⁴⁾。

Brugada症候群では夜間の心臓突然死が多いことが報告されており、自律神経活動との関連が示

唆されている。阿部ら⁶⁾はBrugada症候群と、不整脈源右室心筋症 (Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: ARVC) 症例との比較でBrugada症候群はLPの日内変動を認め、夜間の心室性不整脈の発症率との関連が示唆された。

現時点ではBrugada症候群, ARVC以外の心疾患患者では24時間のLPの変動はまだ十分検討されていない。現在、ハイリスクの各心疾患における心臓突然死を回避する最も有効な方法は植え込み型除細動器 (ICD) 植え込みみである。

LPは特異度が非常に高い検査法でlow riskの患者を見極めて、不必要な植え込ICDの手術をすることを回避することに寄与できる検査となり得ると考えられる。今後、24時間のLPの健常値、また心疾患ごとの突然死や、致死性心室性不整脈のcut off値の検討が望まれる。

文 献

- 1) Simson, M. B. Use of signals in the terminal QRS complex to identify patients with ventricular tachycardia after myocardial infarction. *Circulation*; 1981; 64(2): 235-242.
- 2) Breithardt, G., J. Schwarzmaier, et al. Prognostic significance of late ventricular potentials after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*; 1983; 4(7): 487-495.
- 3) Breithardt, G., M. E. Cain, et al. Standards for analysis of ventricular late potentials using high-resolution or signal-averaged electrocardiography. A statement by a Task Force Committee of the European Society of Cardiology, the American Heart Association, and the American College of Cardiology. *Circulation*, 1991; 83(4): 1481-1488.
- 4) Ikeda, T., H. Sakurada, et al. Assessment of noninvasive markers in identifying patients at risk in the Brugada syndrome: insight into risk stratification. *J Am Coll Cardiol*, 2001; 37(6): 1628-1634.
- 5) Abe, A., T. Ikeda, et al. "Circadian variation of late potentials in idiopathic ventricular fibrillation associated with J waves: insights into alternative pathophysiology and risk stratification. *Heart Rhythm*, 2010; 7(5): 675-682.
- 6) Mizumaki, K., K. Nishida, et al. "Vagal activity modulates spontaneous augmentation of J-wave elevation in patients with idiopathic ventricular fibrillation. *Heart Rhythm*, 2012; 9(2): 249-255.

インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との 相互作用の機序と呼吸器疾患重症化の病態の解明

山本樹生¹⁾, 黒田和道¹⁾

Study on the mechanism of exaggeration by both influenza virus and oral/respiratory tract bacteria and the pathogenesis of exaggeration for respiratory disease

Tatsuo YAMAMOTO¹⁾, Kazumichi KURODA¹⁾

要旨

2010年より開始された本プロジェクトも5年目の最後の年を迎えた。インフルエンザの脅威は、2009年のブタ由来新型インフルエンザによるパンデミック以降も、収まっていない。昨年に中国から報告されたH7N9鳥インフルエンザウイルスの人への感染は、一時収まるかと思われたが、再度患者の発生が見られた。今後の動向が気に掛かる。2003年からのH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの人への感染もいまだに収束していない。多くの研究者の努力にもかかわらず、次のパンデミックがどのインフルエンザウイルスにより引き起こされるかは、だれも予想できないままである。ただ、明らかながある。インフルエンザにより命を奪われる大半は高齢者であるということである。どのウイルスによる流行であろうとこのことは変わらない。このような状況下での本プロジェクト研究の重要性は明確であり、着実な成果を上げつつある。ここにこれまで得られた成果の概要をまとめた。

1. 研究プロジェクトの概要

インフルエンザは、高齢罹患患者において重症化率・致死率が著しく高まることが知られている。また、他の呼吸器疾患においても高齢は大きな危険因子である。高齢化社会を迎えている日本では、インフルエンザなどの呼吸器疾患に対する有効な対策の確立は喫緊の課題と考えられる。そこで、インフルエンザを中心に呼吸器疾患の病態悪化の機構を解明し、有効な対策を提案することが本プロジェクトの目的である。平成22年のプロジェクト開始から、既に4年が経過し、着実な成果が得られてきている。これまでの中心課題であった、インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌および体液中ウイルス感染阻害因子との相互作用の解明に加え、インフルエンザの危険因子としての妊娠の問題を解明するために、マウスをモデルとした研究が進められている。インフルエンザの流行を考えると、日本国内のみの流行動態だけでなく海外の状況にも注目する必要がある。

そのためには、海外とのネットワークの構築が必要であるが、海外で収集した臨床材料を用いた解析が進行中である。また、インフルエンザウイルスの感染機構をより詳細に理解するために、宿主因子とインフルエンザウイルス遺伝子産物との相互作用に注目した研究が成果を結びつつある。以下に、本プロジェクトにおいて現在進行中の研究の概要を報告する。

2. 研究プロジェクト遂行の概要・進捗状況

(a) インフルエンザと口腔細菌

本プロジェクト前半期における最重要課題は口腔・気道の細菌や体液中阻害因子がインフルエンザウイルス感染にどのような影響を与えるかを明らかにすることであった。既にその成果の一端は、まとめられ報告された(Nishikawa T, et al. (2012). Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor. PLoS

1) 日本大学医学部
山本樹生: yamamoto.tatsuo@nihon-u.ac.jp

One. 7 (9), e45371.)。この報告では、口腔細菌の産生するシアリダーゼが抗インフルエンザ薬（抗NA薬）の働きを阻害する可能性を示した。この成果を基に、細菌シアリダーゼがインフルエンザウイルス増殖に与える影響を検討した。種々の口腔細菌培養上清中のシアリダーゼ活性を測定したところ、歯垢中に検出される細菌である *Streptococcus ovaris* と *Streptococcus mitis* とに高い活性を示す株を見出した。これらの菌株培養上清をインフルエンザウイルス感染細胞に添加したところ、感染細胞上清中のウイルス量が増大することを見出した。さらに、インフルエンザウイルス感染巣の拡大が観察された。細菌が産生するシアリダーゼがインフルエンザウイルス感染を促進することが示された。この結果は、口腔ケアを行うことで、口腔内のシアリダーゼ産生細菌を減少させ、インフルエンザ発症を予防できる可能性を示している。口腔ケアが高齢者の肺炎の発生を抑制することが知られており、インフルエンザにおいても同様な効果が期待される。インフルエンザ重症化予防対策を考える上で示唆に富む結果である。

(b) 妊娠とインフルエンザ

2009年の新型H1N1インフルエンザウイルスによるパンデミックにおいて、妊娠がインフルエンザ重症化の危険因子として注目された。妊娠が危険因子となり得ることは、2009年パンデミック以前から指摘されてきたことであるが、このパンデミックの初期における米国での死亡例において、妊婦が多く含まれたことから特に注目された。実際、2009年パンデミックにおいて、インフルエンザによる妊婦の死亡率の上昇、未熟児や出生時低体重の発生率の上昇など、インフルエンザが妊婦に与える悪影響が報告されている (Memoli et al. (2013) *Influenza in pregnancy. Influenza and Other Respiratory Viruses* 7 (6), 1033-1039.)。少子化に直面する日本においては、妊婦の危険因子を減少させることは必須の課題であり、インフルエンザが妊婦に与える影響の詳細な解析が望まれる。妊娠がインフルエンザ重症化の危険因子であるとの報告はあるものの、それをもたらす機構の詳細については不明な点が多い。そこで本プロジェクトでは、妊娠マウスを用いたインフルエンザウイルス感染モデル系を確立し、インフルエ

ンザの妊娠への影響を解析することとした。インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおいて、ウイルス接種量は重要な因子である。大量に接種すれば、全てのマウスが死亡し、少なすぎれば感染そのものが成立しなくなる。検討の結果、 5×10^4 pfuをマウスに接種することで、死に至らずに、マウスの体重減少（インフルエンザウイルス感染進行の指標として用いられる）が観察された。そこで、この量を妊娠マウスに接種し、胎児への影響を検討した。非接種妊娠マウスと比較し、胎児の死亡、早期産の上昇などの異常は観察されなかった。しかしながら、胎児重量に関しては、非接種群に比べ50%程度の減少が観察された。ヒトにおいても、妊婦のインフルエンザウイルス感染が出生時の体重減少をもたらすとの報告があることから、興味深い結果である。今後、妊娠マウスのインフルエンザウイルス感染における体内サイトカインの変化等、さらなる詳細な解析を進める予定である。

(c) ベトナムにおけるインフルエンザ流行状況

インフルエンザは、パンデミック時だけでなく毎年の流行においても、世界中で患者の発生が見られる。特に、H3N2亜型の流行に関しては東南アジアでの抗原性変異株の発生とその世界への伝播が提唱されている。したがって、インフルエンザの流行動態を理解するためには、単に日本国内のみを対象とした解析では不十分であると考えられる。新型あるいは抗原変異株の発生を素早く捉え、効果的なワクチンを準備することが、インフルエンザ対策として最も重要なことの一つであり、これまで十分な解析が行われてこなかった東南アジアでのインフルエンザ流行動態調査は、喫緊の課題の一つと考えられる。本プロジェクトでは、ベトナムにおけるインフルエンザ流行の分子疫学的解析を行うこととした。2010-2011年にかけてベトナムで採集された吸器感染症患者の試料（鼻咽頭スワブ、1082例）について、種々のウイルス特異的PCRを行い、35例のインフルエンザウイルス感染試料を同定した。その内、14例がH1N1pdm09亜型、21例がH3N2亜型であった。これらの試料に関し、HAおよびNA遺伝子の塩基配列を決定し、これまで報告されたウイルスと比較し進化系統樹解析を行ったところ、ベトナム由来のウイルスが独自に位置にあることが示された。今後も

このような解析を行うことで、日本における流行とベトナムを含む東南アジアでの流行の間に何らかの相関、例えば、日本での流行の前駆となる流行が見出される可能性が期待される。今後の解析結果が待たれる。

(d) インフルエンザウイルスタンパク質と宿主タンパク質との相互作用

新規抗インフルエンザウイルス薬の開発など、新たなインフルエンザ対策を樹立するためには、ウイルス感染過程の詳細な理解が必須である。ウイルス感染細胞内においては、ウイルスタンパク質の産生とそれに対する宿主細胞側の応答が起こる。つまり、ウイルス因子と宿主因子が常に相互作用を行い感染過程が進行する。ウイルスタンパク質の機能を理解するためには、そのタンパク質が相互作用する宿主因子を同定し、その相互作用の帰結を解明する必要がある。本プロジェクトでは、インフルエンザウイルス M1 タンパク質に注目した解析を行ってきた。M1 タンパク質が感染後期において核内構造体 ND10 (PML ボディ) に集積することは既に報告した (Shibata T et al. (2009) Immunofluorescence imaging of the influenza virus M1 protein is dependent on the fixation method. J Virol Methods. 156 (1-2), 162-165.)。この集積の意義を明らかにするために、M1 タンパク質上で ND10 への集積に必要な部位を、種々の欠失変異体を作成することで明らかにすることを試みた。M1 は、大きく N 末端側と C 末端側の 2 つの領域に分けられる。この 2 つの領域のそれぞれを単独で発現させると、N 末領域のみが ND10 への集積を示した。この N 末領域に関しては立体構造が明らかになっている。図 1 に示すように、9 本の α ヘリックスが短いループで繋がれており、 α ヘリックス同士は互いに相互作用をしている構造である。 α ヘリックスを 1 本でも欠失させると全体の構造が大きく変化することが予想された。実際、そのような変異体では、発現量が大きく低下することが観察され、欠失変異体の不安定さが示唆された。そこで、ループ領域に注目した。ループの欠失も大きな構造変化をもたらすことが予想されたので、各ループのアミノ酸を Ala に置換した変異体を作成し、それらの ND10 への集積の有無を検討した (図 2)。これらの変異 M1 の中で、ループ 5 の Ala 置換体のみが

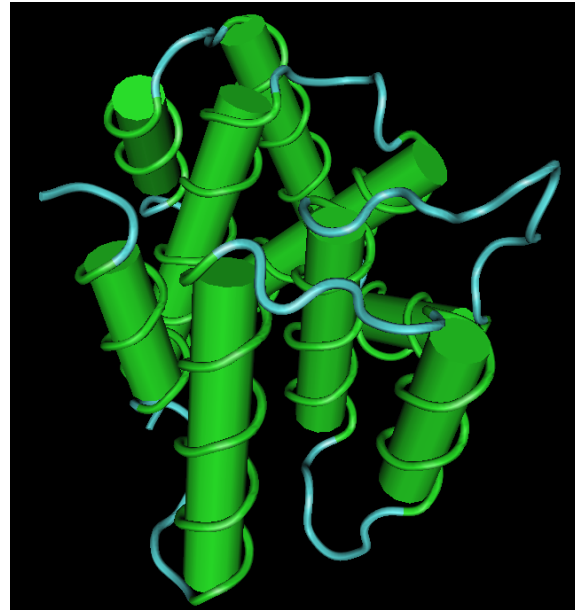


図 1 インフルエンザウイルス M1 タンパク質の立体構造

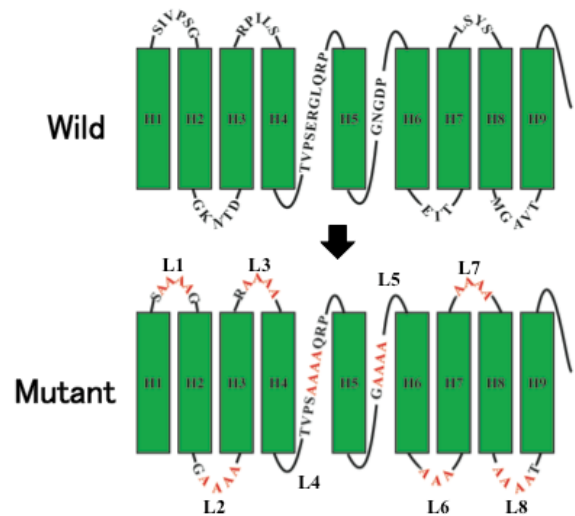


図 2 M1 タンパク質のループ領域に導入した Ala 置換変位

ND10 への集積能を欠失した。今後、ループ 5 の各アミノ酸を個々に Ala に置換した変異体についても解析する予定である。極僅かな点変異により、M1 タンパク質が ND10 への集積能を欠失することが明らかとなった。そこで、この変異を導入したインフルエンザウイルスの作出を現在試みている。そのようなウイルスが得られれば、M1 タンパク質の ND10 への集積のウイルス感染過程における意義について

有益な情報を得ることが期待できる。今後の結果に期待したい。

(e) その他の関連研究

これまでの研究により、唾液中にインフルエンザウイルスのレセプターへの吸着を阻害する物質が存在することが明らかとなった。この阻害物質の実体を明らかにするために、ウイルス粒子に結合する唾液中のタンパク質を同定する研究が現在進行中である。複数の候補タンパク質が質量分析解析により見出されており、さらなる解析を行っているところである。

核内受容体リガンドを細胞に添加することにより、特定の遺伝子の発現を誘導することができる。このことを利用し、インフルエンザウイルス感染過程に関与する宿主遺伝子の発現を誘導することで、感染過程の進行を制御する可能性を現在検討中である。

以上述べたように多くの成果が既に得られ、さらに新たな進展に繋がる研究も現在進行中である。

3. 今後の展望

本プロジェクトにおける研究の中から、ウイルス、細菌、宿主細胞の3者がお互いに影響を与えな

がら、インフルエンザの病態が決定されている様が見えてきた。本年は、本プロジェクトの最終年であり、現在進行中の研究を完成させ、感染症重症化の原因解明とその制御を目指したプロジェクトの目標を達成することを期したい。

4. これまでの研究発表

(論文)

Sawai-Kuroda R, Kikuchi S, Shimizu YK, Sasaki Y, Kuroda K, Tanaka T, Yamamoto T, Sakurai K, and Shimizu K: A polyphenol-rich extract from *Chaenomeles sinensis* (Chinese quince) inhibits influenza A virus infection by preventing primary transcription in vitro. *J. Ethnopharmacology* 146(3), 866-872, 2013.

全83件

(学会発表)

神尾 宜昌, 今井 健一, 田村 宗明, Marni Cueno, 清水 一史, 落合 邦康: 口腔細菌のインフルエンザウイルス感染促進と重症化に及ぼす影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸国際会議場, 神戸, 2013年11月10-12日

他 全168件

ゲノム化学に基づく先進医療開発研究 —抗腫瘍効果を持つピロール・イミダゾール・ポリアミドの開発

藤原恭子^{1,2)}, 福田 昇^{1,3,4)}, 齋藤孝輔^{1,2)}, 上野高浩^{1,3)}, 相馬正義^{1,2)}

Researches to develop advanced medicines based on the chemical genomics : Development of pyrrole imidazole polyamides with anti-tumor activity

Kyoko FUJIWARA^{1,2)}, Noboru FUKUDA^{1,3,4)}, Kosuke SAITO^{1,2)},
Takahiro UENO^{1,3)}, Masayoshi SOMA^{1,2)}

要旨

ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは配列特異的にDNAに結合する性質を持つ低分子化合物である。高い親和性と特異性で二重らせんDNA副溝に結合し、転写因子結合サイトに対して設計した場合は、競合阻害により転写を抑制する。これまでに我々は腫瘍特異的に発現している遺伝子を標的としてPIポリアミドを作成し、抗腫瘍効果を検討してきた。これらのPIポリアミドのうち、E-box配列を認識し癌遺伝子MYCの下流遺伝子の発現を抑制する分子、インプリンティング疾患Beckwith-Wiedemann症候群において過剰発現している*LIT1*の発現を抑制する分子、前立腺癌において観察される融合遺伝子の生成・発現を抑制する分子が有意な抗腫瘍効果を示している。

1. はじめに

分子標的治療は疾病に関連した分子の発現や機能を抑制する治療法であるが、近年、癌や高血圧など難治性疾患の発症メカニズムが分子レベルで解明されるようになり、多くの薬剤の開発が進んでいる。ヒトゲノムの解読が完了したこと、次世代シーケンサーが開発されたことにより、疾病関連遺伝子変異の探索が容易になったことも分子標的治療薬の開発に拍車をかけている。

日本大学医学部戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」プロジェクトでは、配列特異的なDNA結合能を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIポリアミド)を用いて、疾患特異的に発現異常を起こしている遺伝子の転写調節を試みてきた。

PIポリアミドは1996年にカリフォルニア工科大学のDervanらが発見した低分子有機化合物であ

り、その構造やDNAへの結合様式についての解析が現在までに数多くなされている¹⁾。芳香族アミノ酸 *N*-methylpyrrole (Py) および *N*-methylimidazole (Im) で構成され、DNAに配列特異的に結合する性質を持つ。ImとPyの組み合わせ次第で多様な配列のDNAに結合させることが可能であり、遺伝子プロモーター領域の転写因子結合部位を認識するPIポリアミドは、転写因子の結合を競合阻害し、目的遺伝子の転写阻害を行うことが期待できる。特別なDrug Delivery Systemを必要とせず、生体内でも安定であることから、PIポリアミドは新規の転写阻害剤として期待される分子である。

これまでに我々の研究室では、MMP-9抑制PIポリアミドの投与により、ヌードマウス脾臓に移植したヒト大腸癌細胞株の肝転移が減少すること²⁾、酸化低密度リポ蛋白(LDL)受容体(LOX-1)に対するPIポリアミドがヒト血管内皮細胞の酸化LDLの取

1) 難治疾患治療開発プロジェクト

2) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野

3) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

4) 日本大学大学院総合科学研究科

相馬正義 : souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

り込みを抑え、その結果アポトーシスを抑制すること³⁾などについて報告を行ってきた。またTGFβ抑制性PIポリアミドが皮膚の肥厚性瘢痕⁴⁾、高塩食による腎炎⁵⁾、アルカリ性角膜外傷⁶⁾など、多くのTGFβ関連疾患の症状を改善することを確認し、現在、ヒトとゲノム構造の近いマーマセットを用いて、TGFβ抑制性PIポリアミドの前臨床試験を行っている。本紀要では抗腫瘍効果を持つPIポリアミドの開発状況について報告する。

2. 抗腫瘍効果を持つPIポリアミドの開発

1) E-box 認識PIポリアミドの開発

前癌遺伝子MYCは多くのヒト悪性腫瘍においてゲノムレベルでの増幅や発現レベルの上昇を示すことが報告されている。MYCは basic-helix-loop-helix leucine zipper 型転写因子であり、MAX 蛋白質と二量体を形成し、DNAのE-box配列に結合する。MYCにより発現が制御されている遺伝子は4千以上ののぼり、それらの多くは細胞の成長、増殖、代謝、アポトーシス、分化に関与し、細胞の形質変化を促進している。腫瘍の増殖抑制を目的として、MYCもしくはMYC下流遺伝子の機能や発現量を効果的に制御するために様々なアプローチが試みられてきたが、手技の煩雑さ、生体内への輸送の難しさなどの問題があり実用化には至っていない。

我々は、E-box配列CACGTGを完全にまたは部分的に認識するPIポリアミドを複数作成し(図1A)、そのうちMyc-6がヒト骨肉腫細胞株、慢性骨髄性白血病細胞株に対し増殖抑制効果を示す事を確認した。骨肉腫細胞株MG63においては、1μMより増殖能、コロニー形成能を有意に抑制し(図1B)、5μM以上で細胞移動能を低下させた。マウス皮下にMG63を移植して作成したXenograftの成長もMyc-6の尾静脈投与により有意に抑制された(図1C)。Myc-6による細胞死の様式について検討したところ、Myc-6投与により、初期アポトーシスのマーカーであるphosphatidyl serineの細胞膜外側への露出と、後期アポトーシスのマーカーである切断型Caspase3の出現が観察された。細胞周期の解析においてはMyc-6投与群の細胞ではS期、M期の細胞数の割合が減少し、逆にG0/G1期にある細胞の割合が非投与群と比べて有意に上昇していた。

Myc-6の詳細な作用機序を解明するためにMyc-6

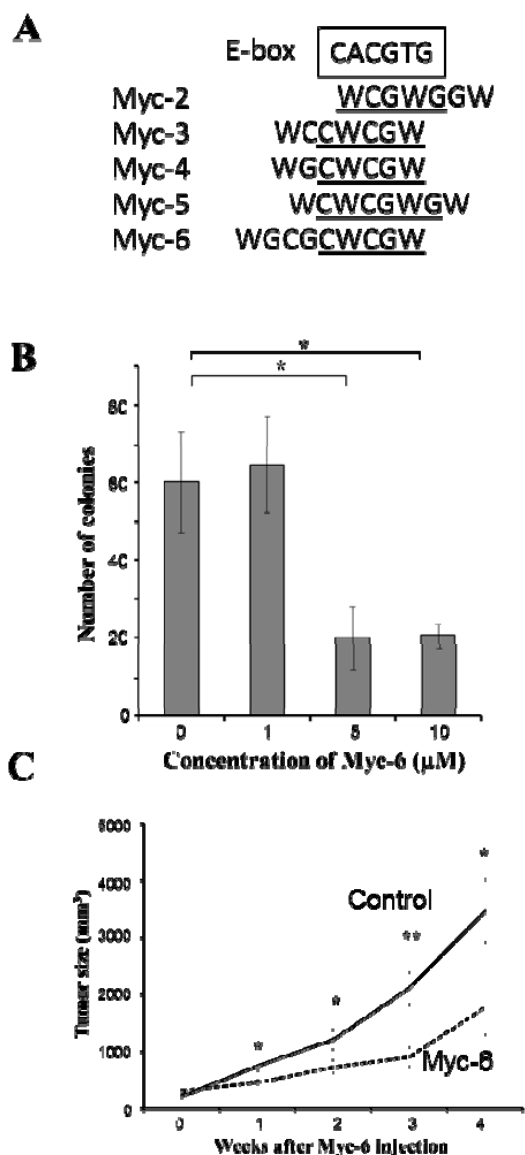


図1 E-box 認識PIポリアミドのデザインと抗腫瘍効果 (A) 各ポリアミドが認識するDNA配列。WはAもしくはT。 (B) ゲル内コロニー形成試験 (C) マウス皮下に移植したヒト骨肉腫細胞の増殖曲線

ポリアミドにより発現が変化する遺伝子についてAffymetrix GeneChip U133 Plusを用いて調べたところ、10μMのMyc-6投与後有意な発現低下を示した14の遺伝子のうち、長鎖non-coding RNAの一つであるMALAT1遺伝子の上流1000bp以内に、E-box類似配列があることが判った。Myc-6がこの配列に特異的に結合することがゲルシフトアッセイにより確認され、またsiRNAによりMG63におけるMALAT1の発現をノックダウンした結果、有意な増殖抑制効果が観察された。この結果よりMALAT1

がMyc-6の直接の標的の一つであり、Myc-6による細胞増殖抑制に関与している可能性が強まった⁷⁾。

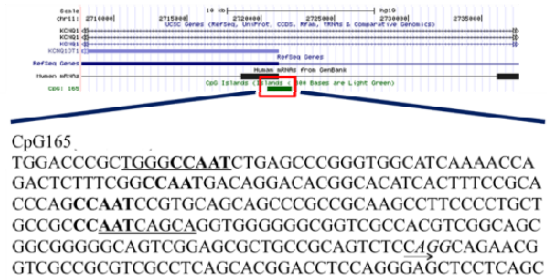
現在、Myc-6と他の抗がん剤との併用プロトコルの確立、MALAT1の発現をより効果的に抑制するポリアミドの開発を目指して引き続き研究を行っている。

2) LIT1抑制PIポリアミドによる腎芽腫細胞株の増殖抑制

Beckwith-Wiedemann症候群(以下、BWS)は臍帯脱出、巨舌、巨体を三主徴とする先天性過形成症候群で5~10%に胎児性腫瘍(腎芽腫、肝芽腫、膵芽腫)を合併する。染色体11p15.5のインプリンティング調整領域(KvDMR, H19DMR)のメチル化異常や欠失、父型対立遺伝子の獲得などの結果、母型片親発現調整遺伝子群の絶対的もしくは相対的な発現低下が起こることにより発生するインプリンティング疾患である⁸⁾。通常状態では抑制されているKvDMR領域の母方対立アリルがBWSでは脱メチル化してLIT1遺伝子が過剰発現し、腫瘍抑制遺伝子p57^{KIP2}を含む周辺遺伝子を抑制しているとされる。そこで我々は、LIT1遺伝子を標的としたPIPを用いてヒトBWS線維芽細胞株におけるLIT1遺伝子の発現を抑制し、p57^{KIP2}遺伝子の再発現効果を検討した。

LIT1遺伝子プロモーター領域に存在するCCAAT boxを認識するPIポリアミド(h-CCAAT1, h-CCAAT3, 以下PI1, 3)を設計・合成し(図2A)、ヒトBWS線維芽細胞株(BWS6, BWS9)および腎芽腫細胞株G401に投与したところ、いずれにおいてもLIT1の発現低下を認めた。G401細胞株を用いた詳細な検討では、PI1とPI3の同時投与により、通常LIT1によりサイレンシングされているp57^{KIP2}の発現上昇が観察され、細胞増殖率の低下も認めた。さらにFACS解析から、PI1, PI3の投与によりアポトーシスが起きていることが確認できた(図1B)。現在免疫不全マウスにG401を皮下注射し作成したXenograftに対するPI1とPI3の効果を解析中である。また、p57^{KIP2}以外のLIT1周辺遺伝子の中にも腫瘍関連遺伝子があることから、それらについても現在検討を行っている。

A



B

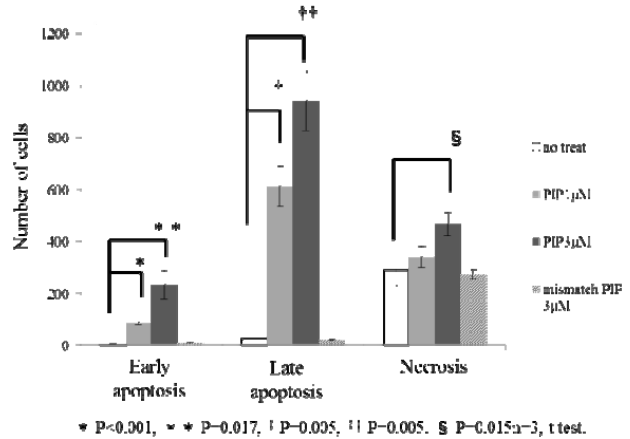


図2 LIT1抑制PIポリアミドのデザインと抗腫瘍効果 (A) LIT1プロモーター上のポリアミド認識部位。太字; CCAAT配列, 下線; ポリアミドの標的配列, 斜字+矢印; 転写開始点 (B) LIT1抑制PIポリアミドによるアポトーシスの誘導効果

3) 前立腺がん特異的融合遺伝子の生成を抑制するPIポリアミドの開発

前立腺において染色体再配列によりアンドロゲン応答遺伝子TMPRSS2と癌原遺伝子ERGが融合し、生じた融合遺伝子は、細胞の癌化・悪性化、およびアンドロゲン感受性の変化に関与することが報告され、注目されている。この融合はアンドロゲンレセプター(AR)がゲノム上のAR結合配列に結合して両遺伝子共通の特定配列を切断し、染色体再配列を起こすことで生じることが判っている⁹⁾。

そこで、切断される特定配列に結合し、TMPRSS2-ERG融合遺伝子の発生を抑制するPIポリアミドを設計し、細胞増殖/遊走能に与える影響を、前立腺癌細胞(LNCaP細胞)を用いて検討した。LNCaP細胞のゲノム上には通常の状態では融合遺伝子が存在しないが、アンドロゲン刺激により組み換えが起こり、融合遺伝子が生じる。

まず最初にLNCaP細胞に対し、切断配列に特異的に結合するPIポリアミド (Fusionポリアミド) を1ないし5 μ M加え、アンドロゲン刺激を行ったところ、TMPRSS2-ERG遺伝子の発現低下、ERG蛋白量の低下を確認した。また、Fusionポリアミド添加による細胞増殖能、および遊走能の低下がMTS assay, Cell migration assayにて確認された。さらにヌードマウスにLNCaP細胞を皮下注射して腫瘍を形成し、Fusionポリアミドを尾静脈より投与したところ、非投与群と比較して有意な腫瘍体積減少を確認した。以上の結果より、切断配列に結合するFusionポリアミドは融合遺伝子およびERGの発現を抑制し、さらに細胞増殖能、遊走能を抑え、*in vivo*においても抗腫瘍効果を持つ事が確認できた。また生体投与によりマウスに明確な健康上の変化が観察されなかったことから、Fusionポリアミドの安全性が高い事が証明された。

3. 今後の展望

これまでに、上記で紹介したPIポリアミドが有意な抗腫瘍効果を持つ事が確認できたため、現在、その作用機序や副作用について主に*in vivo*での解析を行い、実用化に向けたデータを集めている。また、これらの研究と並行して、より高い殺細胞効果と腫瘍特異性を兼ね備えたPIポリアミドの開発を目指して、腫瘍特異的な配列変異やゲノム増幅を認識するPIポリアミドにアルキル化剤などをコンジュゲートした分子を作成し、機能解析を行っている。

参考文献

- 1) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem.* 2001 Sep; 9(9): 2215-35.
- 2) Wang X, Nagase H, Watanabe T, et al. Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer Sci.* 2010 Mar; 101(3): 759-66.
- 3) Ueno T, Fukuda N, Tsunemi A, et al. A novel gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function. *J Hypertens.* 2009 Mar; 27(3): 508-16.
- 4) Washio H1, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeting the TGF- β 1 promoter. *J Invest Dermatol.* 2011 Oct; 131(10): 1987-95.
- 5) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor- β 1 promoter. *Kidney Int.* 2011 Jan; 79(1): 46-56.
- 6) Chen M1, Matsuda H, Wang L, et al. Pretranscriptional regulation of Tgf-beta1 by PI polyamide prevents scarring and accelerates wound healing of the cornea after exposure to alkali. *Mol Ther.* 2010 Mar; 18(3): 519-27.
- 7) Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, et al. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif. *FEBS Open Bio.* 2014 Mar 13; 4: 328-34.
- 8) Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet.* 2001 Dec 15; 10(26): 2989-3000.
- 9) Lin C, Yang L, Tanasa B, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell.* 2009 Dec 11; 139(6): 1069-83.

脳脊髄刺激療法を用いた運動麻痺の治療

山本隆充¹⁾, セデキジャン・ウフル¹⁾, 深谷 親¹⁾, 渡辺 充²⁾, 角光一郎²⁾,
四條克典²⁾, 大淵敏樹²⁾, 加納利和²⁾, 小林一太²⁾, 大島秀規²⁾, 吉野篤緒²⁾, 関口真一³⁾

Cerebrospinal stimulation therapy for motor weakness

Takamitsu YAMAMOTO¹⁾, Sidikejiang WUPUER¹⁾, Chikashi FUKAYA¹⁾,
Mitsuru WATANABE²⁾, Kohichiro SUMI²⁾, Katsunori SHIJO²⁾,
Toshiki OBUCHI²⁾, Toshikazu KANO²⁾, Kazutaka KOBAYASHI²⁾,
Hideki OSHIMA²⁾, Atsuo YOSHINO²⁾, Shinichi SEKIGUCHI³⁾

要旨

私立大学戦略的基盤形成支援事業の研究拠点を形成する研究（ニューロモデュレーションセンターの構築と医療連携）において、脳神経外科学系で行なっている運動麻痺に対する脳・脊髄刺激療法について報告する。

これまでに運動機能回復を目的とした大脳皮質運動野刺激の効果が報告されているが、これらの報告は3週あるいは6週間のリハビリテーションと同時に大脳皮質運動野刺激を行い、その後に刺激装置を抜去するもので、長期間の慢性刺激についての検討はされていない。今回の研究では、6ヶ月以上継続する運動野の慢性刺激によって、運動機能が改善するが、長時間の刺激を行うと逆に運動機能を悪化させることが明らかとなった。また、患者選択には経頭蓋磁気刺激を用いた大脳皮質運動野刺激によって、どのように誘発筋電図であるF波が変化するか検討する必要がある。さらに、運動機能の回復を目的とした慢性の大脳皮質運動野刺激では、1日の刺激を3時間程度に制限する必要があると結論された。

一方、5Hzの脊髄刺激を用いると容易に四肢の muscle twitch を誘発することが可能で、脳卒中後疼痛の症例において、疼痛治療のみならず運動機能回復をも期待できる。さらに、遷延性意識障害を認める症例では、muscle twitch を誘発することによって、関節拘縮や筋萎縮の予防効果も認めることから、muscle twitch を誘発する脊髄刺激は、新たなニューロモデュレーション技術として期待される。

1. はじめに

私立大学戦略的基盤形成支援事業の研究拠点を形成する研究（ニューロモデュレーションセンターの構築と医療連携）では、慢性植込み型脳脊髄刺激装置、植込み型髄腔内薬液注入ポンプ、高頻度経頭蓋磁気刺激装置などを用いたニューロモデュレーション技術を用いて、難治性疼痛、不随意運動、運動麻痺、意識障害、痙縮、癲癇などの治療に臨床応用している。さらに、ニューロモデュレーションセンターを構築し、新たな脳脊髄機能制御・再建のための研究拠点を形成することを目的としている。この

ため、脳神経外科学系応用システム神経科学分野、神経外科学分野、神経内科学分野、ペインクリニック分野、リハビリテーション医学分野、精神医学分野、泌尿器科学分野などの研究者が連携して研究をおこなっている。本稿では、脳神経外科学系で行なっている脳脊髄刺激療法を用いた運動麻痺の治療について報告する。

大脳皮質運動野刺激は、脳卒中後疼痛の治療を目的として坪川ら¹⁾によって開発された方法で、1990年の報告以来、多くの研究者によってその効果が確認され、各種の神経障害性疼痛の治療に広く用いら

1) 日本大学医学部脳神経外科学系、応用システム神経科学分野

2) 神経外科学分野

3) 医学研究支援部門医用電子系医用電子室

山本隆充：yamamoto.takamitsu@nihon-u.ac.jp

れるようになった²⁻⁴⁾。私どもが、これまでに視床痛やワレンベルグ症候群などの脳卒中後疼痛の治療を目的として大脳皮質運動野刺激をおこなった症例の中に、四肢ならびに顔面の運動麻痺や発声が改善する症例を数多く経験し、この事実を報告してきた⁵⁾。本稿では、脳卒中後疼痛の治療を目的とした大脳皮質運動野刺激を行い、同時に運動麻痺の改善について検討した。また症例選択の方法ならびに運動機能改善を目的とした刺激条件設定についても検討した。さらに、muscle twitchを誘発することが可能な5Hzの脊髄刺激を用いた新たな運動機能回復の方法について報告する。

2. 方法

1) 運動麻痺の改善についての検討症例

大脳皮質運動野の慢性刺激は、脳卒中発症後すでに1年以上経過している6例で、全例で四肢の疼痛と運動麻痺を認めた。経頭蓋磁気刺激による大脳皮質運動野刺激は、脳卒中発症後2年以上経過している運動麻痺症例12例に施行し、コントロール14例ではF波の記録のみ行った。脊髄刺激は、いわゆるminimally conscious stateと評価される遷延性意識障害10例、脳卒中後疼痛に運動麻痺を合併した5例を対象とした。本研究については、日本大学板橋病院臨床研究審査委員会の承認を得て行なった。

2) 慢性大脳皮質運動野刺激の刺激部位決定

大脳皮質運動野刺激には、MR imagingを用いた画像誘導装置とcortico-spinal motor evoked potential (cortico-spinal MEP)を用いて、電極の留置部位を決定した。刺激電極にはメドトロニック社製のRESUME電極を大脳皮質運動野硬膜外に2個植込み、慢性刺激を行った。MRIを用いた画像誘導装置で硬膜上から中心溝を同定し、cortico-spinal MEPのD波をモニターしながら電極の留置方法を検討したところ、足の領域では電極を上矢状静脈洞のすぐ外側で、上矢状静脈洞に平行に電極を留置し、手の領域では中心溝に平行に中心前回後半部に留置することにより、双極刺激で最も高振幅のD波を記録することが出来た^{6,7)}(図1)。

刺激条件は、刺激強度3～6V(運動誘発閾値の80%の強度)、刺激頻度25Hz、刺激幅0.210msに統一した。また、術前と刺激開始後1, 2, 3, 6ヶ月の各時点で、運動機能(Fugl-Meyer検査、運動速度など)の変化について検討し、その期間の実際の刺激時間数との比較を行った。実際の刺激時間数については、患者さんの記録を参考にしながら、外来受診時にimplantable pulse generatorに記録された刺激時間数を確認して、一日の刺激時間数を算出した。

3) 経頭蓋磁気刺激による運動野刺激

脳卒中後の症例ではMRIを撮影し、フレームレ

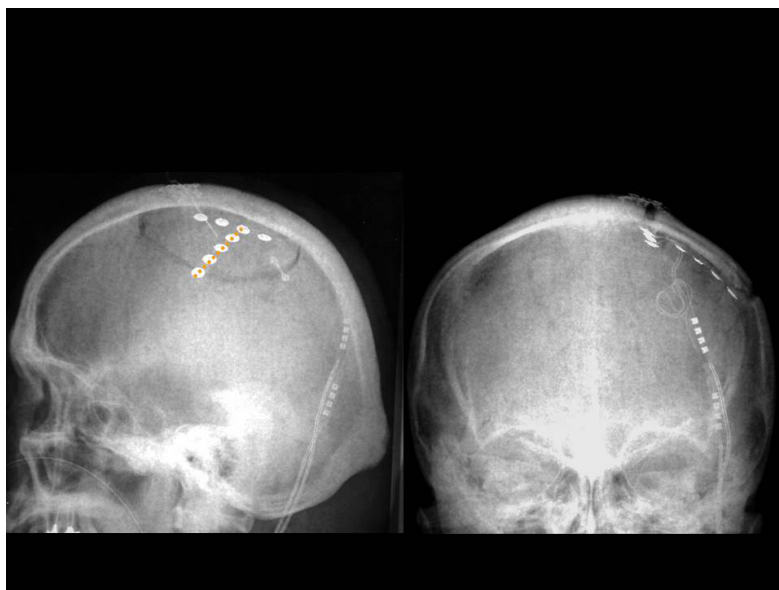


図1 慢性植込み電極による大脳皮質運動野刺激

ス定位ナビゲーションシステム (Brainsight TMS, Rogue Research Inc. Canada) を用いて、中心前回の precenral knob (手の領域) を同定し、直径 70 mm の 8 の字コイルを磁気刺激装置 (Magstim Super Rapid, The Magstim Company Limited, Whitland, UK) につないで刺激を行なった^{8,9)}。脳卒中後の症例に対する高頻度経頭蓋磁気刺激の刺激強度決定には、健側の刺激によって運動を誘発する運動誘発閾値をそれぞれの症例ごとに決定し、この運動誘発閾値の 110% の強度で患側の大脳皮質運動野 (手の領域) を刺激した。刺激は磁気刺激の安全ガイドライン (日本臨床神経生理学会) にしたがって、10Hz で 1000 発の刺激を行なった。

F 波の記録には、表面電極を用いて刺激幅 0.2 ms、刺激強度 20 ~ 50 mA で、手首の部位で尺骨神経を刺激した。刺激強度は最大の複合筋電位 (CMAPs) が記録される 120% の強度を用いて、50 回の記録を行なった。記録は、第 1 背側骨間筋 (FDI) の筋腹に関電極、第 2 中手骨頭に不関電極を置き、刺激電極と記録電極の間に接地し、band pass 20 Hz ~ 5 KHz で、MEB-2208 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を用いて記録した。健常人では右側から F 波の記録のみを行い、脳卒中後の症例では rTMS 前と rTMS 直後に麻痺側から F 波を記録した。末梢誘発筋電図である F 波の変化については、1) F 波の出現率、2) F 波の振幅、3) M 波と F 波との振幅比 (F/M 比) について検討した

4) 5Hz 脊髄刺激による muscle twitch の誘発

私どもは、遷延性の意識障害で minimally conscious state (MCS) の患者に対しては関節拘縮や筋の廃用性萎縮を防ぐ目的で、5Hz 程度の低頻度刺激を用いている。5Hz 程度の低頻度刺激であれば muscle twitch を誘発することができるが、15Hz では muscle contraction を誘発してしまうためである。また、脊髄刺激では脳深部刺激療法のような激しい覚醒反応を誘発することはできないが、MCS 症例での検討では、刺激中に脳血流は 20% 程度増加することを報告した¹¹⁾。

一方、難治性疼痛に対する脊髄刺激では、15 ~ 25Hz で経度の paresthesia を誘発する程度の刺激強度を用いる。この刺激に加えて、5Hz で muscle twitch を誘発する刺激を 1 回に 5 分程度とし、この

刺激を 1 日に 5 回追加した。また、1 か月後に手の開閉のスピードならびに握力の変化について比較した。

3. 結果

1) 慢性植込み電極による大脳皮質運動野刺激

6 ヶ月間の大脳皮質運動野の慢性刺激では、6 例中 4 例で上肢の Fugl-Meyer scale が 4 から 8 点増加し、運動機能の改善を認めた¹⁰⁾。また、この 4 例では一日の刺激時間は 2 時間から 3 時間半であった (図 2)。一方、一日の刺激時間が 9 時間と 8 時間に及んだ 2 例では逆に Fugl-Meyer scale が著しく減少し、運動障害が増悪したが、Fugl-Meyer scale 減少後の早い時期に刺激時間を強制的に制限することで、術前に近いレベルまで回復した¹⁰⁾。この一日の刺激が長時間に及んだ 2 例では、刺激による除痛が得られたものの、あまり after effect が得られないため、長時間の刺激を避けられなかった症例であった。そこで、刺激装置を continuous mode から cycle mode に変更し、長時間の刺激を行わないようにしたところ、運動機能の回復を認めた (図 3)。

2) 経頭蓋磁気刺激による大脳皮質運動野刺激

F 波の平均振幅は、脳卒中後症例において高頻度経頭蓋磁気刺激前が $223.44 \pm 107.27 \mu\text{V}$ 、健常例で $151.97 \pm 60.98 \mu\text{V}$ であり、脳卒中後症例では高頻度経頭蓋磁気刺激前に比較して刺激後で F 波の振幅低

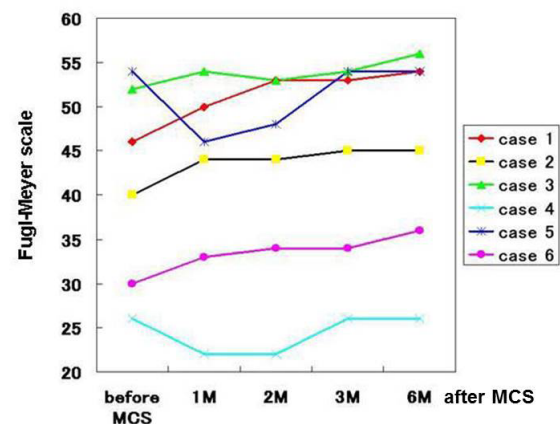


図 2 大脳皮質運動野の慢性刺激による Fugl-Meyer Scale の変化。一日の刺激時間が 3 時間以下の 4 例では点数が改善したが 8 時間以上の刺激を行った 2 例では逆に増悪した。

下を認めたが、個々の症例間の振幅にかなりの相違を認めたため、統計学的な有意差は認められなかった⁸⁾。

一方、F波の出現率は、健常例では54.29 ±

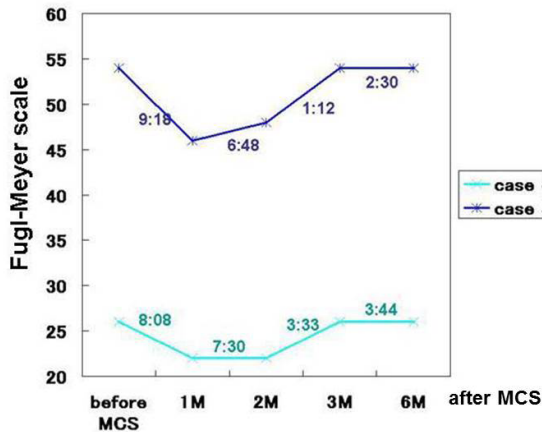


図3 一日に8時間以上の刺激を行いFugl-Meyer Scaleの点数が増悪した2例においても、刺激時間を3時間以下に制限することによって、点数が改善した。

22.67%, 脳卒中後症例では86.5 ± 14.35で、健常例に比較して脳卒中後の症例で有意にF波の出現率が高かった (p<0.01, Student's t-test)。また、脳卒中後の症例では高頻度経頭蓋磁気刺激後にF波の出現率が76.17 ± 19.62と有意に低下した⁸⁾ (p<0.01, Paired t-test)。

F/M比は、健常例で0.84 ± 0.45、脳卒中後の症例においては高頻度経頭蓋磁気刺激前が2.44 ± 1.69であり、健常例に比較して脳卒中後症例において有意にF/M比が高値であった (p<0.01, Paired t-test)。また、脳卒中後症例では高頻度経頭蓋磁気刺激後にF/M比が減少した⁸⁾ (p<0.05, Paired t-test) (図4)。

3) 5Hz 脊髄刺激の効果

MCSの症例に対して5Hz 脊髄刺激を頸髄レベルで施行した10例中7例がMCSから回復した。7例中1例は独歩可能となったが、6例は刺激開始後12ヶ月の時点でも車椅子生活で、歩行のためのリハビリテーションを継続中であった¹¹⁾。しかし、6例ともに上肢の運動機能回復は著しく、下肢の運動機能回

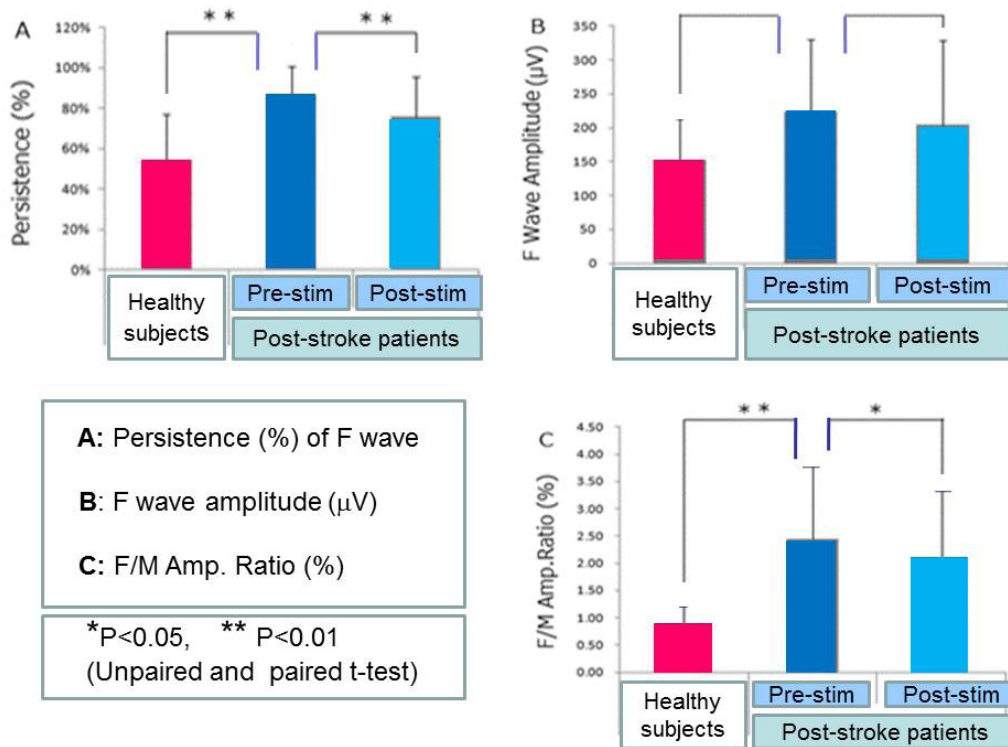


図4 F波を用いた経頭蓋磁気刺激による大脳皮質運動野刺激の効果。健常人に比較して脳卒中後の症例では、F波の出現率とF/M比の増加を認める (p<0.01, Student's t-test)。また、脳卒中後の症例に対する磁気刺激によってF波の出現率が減少 (p<0.01, Paired t-test) し、F/M比も減少 (p<0.05, Paired t-test) した。

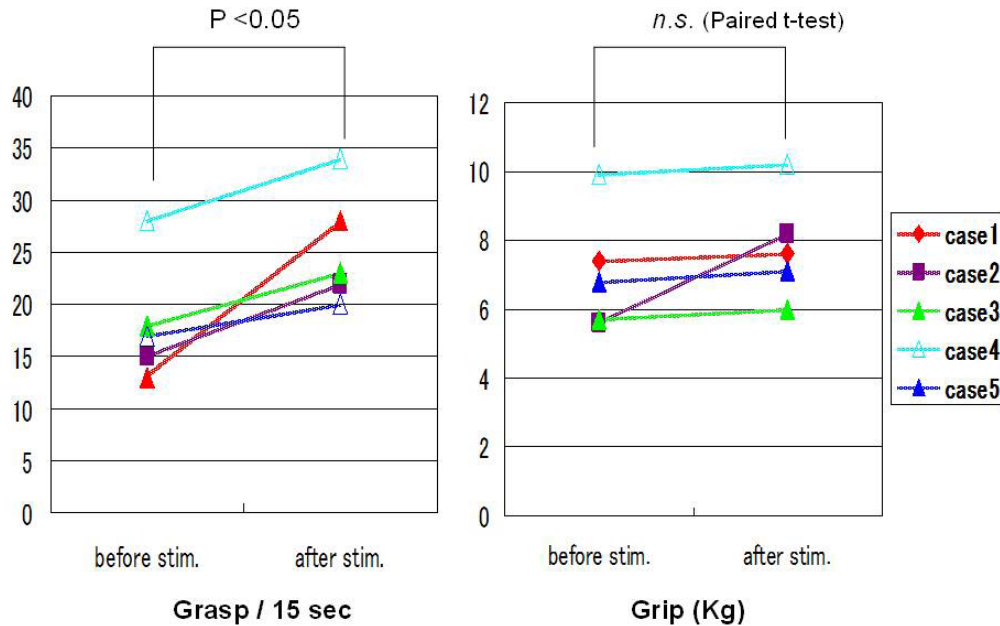


図5 頸髄レベルで5Hz脊髄刺激を用いて上肢のmuscle twitchを誘発（1回に5分間，一日に5回，1か月継続）後の，最大速度で15秒間に施行できる手の開閉運動の回数と握力の比較．手の開閉運動の回数は増加した ($p < 0.05$, Paired t-test) が，握力には有意の変化を認めなかった。

復とは明らかな差を認めた。これは，5Hzの上位脊髄刺激によって上肢のmuscle twitchを連日誘発したことによって，運動機能を回復させたものと考えられた。また，脳卒中後疼痛に運動麻痺を合併した症例に対する頸髄レベルでの5Hz脊髄刺激では，15秒間に可能な手の開閉回数が 18.2 ± 5.8 から 25.4 ± 5.6 まで増加した ($p < 0.05$, Paired t-test) (図5)。

4. 考 察

大脳皮質運動野刺激の電極留置部位の決定には，cortico-spinal MEPを記録するのが有用である^{6,7)}。脊髄硬膜外に記録電極をあらかじめ留置する必要があるが，全身麻酔下でも安定した記録が可能で，最適の刺激部位を決定するための電極位置の微調整も可能である。誘発筋電図を用いる方法では，記録方法は容易であるが，train刺激を用いるために痙攣の誘発に注意する必要がある。また，麻酔の問題もあり，施設によって得意な方法を用いるのが良いと考える。さらに，現在使用することが可能な慢性植込み型の刺激装置も電極の留置方法で重要なポイントとなる。現在市販されている慢性の脳刺激装置は，脳深部刺激療法を目的としているため，単極刺激ではcathode刺激に限られ，anode刺激ができない。大脳皮質刺激では脳表から垂直方向に通電が可能な

anode刺激が有効であるため，双極刺激を選択することになり，電極の留置部位の決定には運動誘発電位のモニタリングが特に有用である⁷⁾。

運動機能回復を目的とした大脳皮質運動野刺激が報告されているが，これらの報告は3週あるいは6週間のリハビリテーションと同時に大脳皮質運動野刺激を行い，その後に刺激装置を抜去するもので，長期間の慢性刺激についての検討はされていない¹²⁻¹⁴⁾。今回の研究では，6ヶ月以上の運動野の慢性刺激で運動機能が改善することが明らかとなった。しかし，刺激条件の設定が重要であり，持続的に長時間の刺激を行うと逆に運動機能を悪化させることが明らかとなった。これらの事実から，1日の刺激を3時間程度に制限する必要があることが明らかとなった。

痙攣が認められる脳卒中後の症例では，健常例に比較してF波の出現率とF/M比が有意に増加していた事実は，上位ニューロン障害によってF波の出現率やF/M比が増加するとのこれまでの報告と一致する¹⁵⁾。また，脳卒中後の症例に対する高頻度経頭蓋磁気刺激によってF波の出現率とF/M比が減少することが明らかとなった。運動機能回復を目的とした大脳皮質運動野刺激では，有効例と無効例が混在していることが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。運動機

能回復を目的とした慢性の大脳皮質運動野刺激の適応を決定するにあたっては、経頭蓋磁気刺激によってF波の出現率とF/M比が十分に減少する症例を選択して慢性の大脳皮質運動野刺激を行うことにより、手術成績を向上させることができるものと考えられる。

脊髄刺激は、局麻下に脊髄硬膜外針を用いて経皮的に脊髄硬膜外腔に刺激電極を挿入することが可能であるので、脳深部に刺激電極を挿入する脳深部刺激療法 (DBS) や開頭によって大脳皮質運動野上の硬膜外に刺激電極を留置する大脳皮質運動野刺激 (MCS) と比較して、容易に試験刺激を行うことができる利点があり、脳脊髄刺激療法では第一に選択されることが多い¹⁶⁻¹⁸⁾。脊髄刺激で muscle twitch を誘発する機序としては、脊髄刺激電極は脊髄の後索上に留置してあることから、脊髄後根への電流の spread や脊髄後角から脊髄後索へのファイバーの逆行性刺激によって muscle twitch が誘発されるものと考えられる。脳卒中後疼痛に対する脊髄刺激では、疼痛部位に刺激の paresthesia を誘発する必要がある。また、疼痛部位に一致した部位の運動機能が障害されるのが特徴であり、刺激条件を変更することによって、疼痛と運動麻痺の治療が可能である。5Hz の脊髄刺激によって muscle twitch を誘発する脊髄刺激療法は、新たなニューロモデュレーション技術として今後の発展が期待される。

文 献

- 1) Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, et al.: Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. *J Neurosurg* 1993; 78: 393-401.
- 2) Yamamoto T, Katayama Y, Hirayama T, et al.: Pharmacological classification of central post-stroke pain: comparison with the results of chronic motor cortex stimulation therapy. *Pain*, 1997; 72: 5-12.
- 3) Nguyen JP, Keravel Y, Feve A, et al.: Treatment of deafferentation pain by chronic stimulation of the motor cortex: Report of a series of 20 cases. *Acta Neurochir (wien)* 1997; 68: 54-60.
- 4) Saitoh Y, Shibaya M, Hirano S, et al.: Motor cortex stimulation for central and peripheral deafferentation pain: Report of eight cases. *J Neurosurg* 2000; 92: 150-155.
- 5) Katayama Y, Fukaya C, Yamamoto T, et al.: Post-stroke pain control by chronic motor cortex stimulation: neurological characteristics predicting a favorable response. *J Neurosurg* 1998; 89: 585-591.
- 6) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al.: Recording of corticospinal evoked potential for optimum placement of motor cortex stimulation electrodes in the treatment of post-stroke pain—two case reports—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2007; 47: 409-414.
- 7) Yamamoto T, Katayama Y, Nagaoka T, et al.: Intraoperative monitoring of the corticospinal motor evoked potential (D-wave): Clinical index for postoperative motor function and functional recovery. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2004; 44: 170-182.
- 8) Wupuer S, Yamamoto T, Katayama Y, et al.: F-wave suppression induced by suprathreshold high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in post-stroke patients with increased spasticity. *Neuromodulation* 2013; 16: 206-211.
- 9) Matsumura Y, Hirayama T, Yamamoto T: Comparison between pharmacological evaluation and rTMS-induced analgesia in post-stroke pain patients. *Neuromodulation* 2013; 16: 349-354.
- 10) Yamamoto T, Katayama Y, Watanabe M, et al.: Changes in motor function induced by chronic motor cortex stimulation in post-stroke pain patients. *Stereotact Funct Neurosurg* 2011; 89: 381-389.
- 11) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al.: Spinal cord stimulation for treatment of patients in the minimally conscious state. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1012; 52: 475-81.
- 12) Harvey RL, Winstein CJ: Design for the everest randomized trial of cortical stimulation and rehabilitation for arm function following stroke. *Neurorehabil Neural Repair* 2009; 23: 32-44.
- 13) Levy R, Ruland S, Weinand M, et al.: Cortical stimulation for the rehabilitation of patients with hemiparetic stroke: a multicenter feasibility study of safety and efficacy. *J Neurosurg*. 2008; 108:707-14.
- 14) Brown JA, Lutsep HL, Weinand M, et al.: Motor cortex stimulation for the enhancement of recovery from stroke: a prospective, multicenter safety study. *Neurosurgery* 2006; 58:464-73.
- 15) Drory VE, Neufeld MY, Korczyn AD, et al.: F-wave characteristics following acute and chronic upper motor neuron lesions. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 1993; 33: 441-446
- 16) Kumar K, Toth C, Nath RK, et al.: Epidural spinal cord stimulation for treatment of chronic pain—some predictors of success: a 15-year experience. *Surg Neurol* 1998; 50:110-120.
- 17) 山本隆充：神経障害性疼痛に対する外科的神経破壊術と脳脊髄刺激療法, 医学のあゆみ 247 (4) : 333-338, 2013
- 18) 山本隆充, 大淵敏樹, 加納利和, 他：神経障害性疼痛に対する Dual-lead を用いた脊髄刺激療法と low-dose ketamine 点滴療法の併用効果, *Pain Research* 2009; 24: 9-15.

プロテオミクス・ゲノミクス・臨床データベースを 組み合わせた疾患マーカーの探索

中山智祥¹⁾, 石井敬基²⁾, 高橋泰夫³⁾, 石原寿光⁴⁾, 亀井 聡⁵⁾, 高橋 栄⁶⁾,
山本樹生⁷⁾, 千島史尚⁷⁾, 湯澤美都子⁸⁾, 森隆三郎⁸⁾, 吉野篤緒⁹⁾, 鈴木久仁博¹⁰⁾

Searching for the markers of diseases by the combination of proteomics, genomics and clinical database

Tomohiro NAKAYAMA¹⁾, Yukimoto ISHII¹⁾, Yasuo TAKAHASHI¹⁾, Hisamitsu ISHIHARA¹⁾,
Satoshi KAMEI¹⁾, Sakae TAKAHASHI¹⁾, Tatsuo YAMAMOTO⁷⁾, Fumihisa CHISHIMA⁷⁾,
Mitsuko YUZAWA⁸⁾, Ryuzaburo MORI⁸⁾, Atsuo YOSHINO⁹⁾, Kunihiro SUZUKI¹⁰⁾

要旨

平成25年度の日本大学医学部高度化推進事業に採択された研究テーマ「プロテオミクス・ゲノミクス・臨床データベースを組み合わせた疾患マーカーの探索」について報告する。本研究は日本大学医学部の9学系分野と日本大学松戸歯学部1講座、計12名の研究者を中心としてスタートした。本研究プロジェクトではプロテオミクス、ゲノミクス、臨床データベースの3方向から解析する手法をとり入れ、各スペシャリストを配置し、連携解析方式を採用するというユニークなシステムを採った。予算を有効に活かして次世代シーケンサーを購入し、既存の設備とともに研究体制を構築した。

1. 研究目的

ポストゲノム時代に入りプロテオーム解析が注目され、様々な疾患における新規疾患マーカー探索が盛んに行われている。これは最近の液体クロマトグラフィー質量分析計 (liquid chromatography mass spectrometer: LC-MS) などの性能向上に依るところが大きい。ゲノム解析においても次世代シーケンサーの台頭とともに一人の全塩基配列読み取りが可能になるなど研究ツールの大幅な進展があった。しかしこうした技術革新とは裏腹に疾患マーカーの探索においては研究・臨床応用ともに今一歩進展がはかどっていない。タンパク質つまりプロテオミクスを主とする研究者、遺伝子・ゲノムを取り扱うゲノミクス研究者、臨床データを用いる研究者間の共同

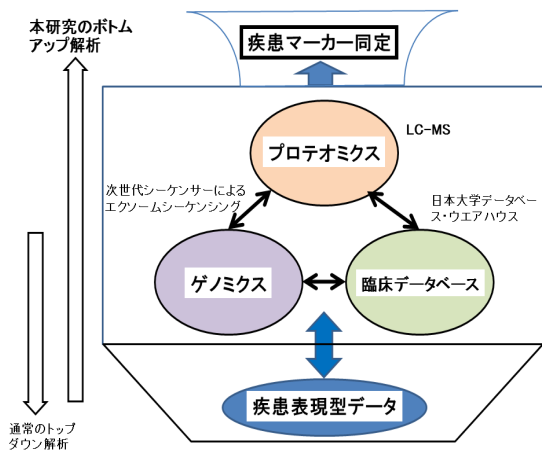
研究体制が乏しい事に一因があると思われる。本研究プロジェクトの目的はプロテオミクス・ゲノミクス・臨床データベースを有機的に組み合わせ診断と治療に役立つ疾患マーカーの探索を目指すことである。この取り組みは動物や細胞レベルの基礎的研究ではなく直接人間の疾患病態解明や治療方法開発に結び付く研究であり、意義の深いものと考えられる。

2. 研究体制

本研究プロジェクトではプロテオミクス、ゲノミクス、臨床データベースの3方向から解析する手法をとり入れ、各スペシャリストを配置し、連携解析方式を採用する。それに各臨床医師が臨床研究の中で構築した疾患表現系データを絡めることによって

1) 日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野
2) 日本大学医学部医学研究企画・推進室
3) 日本大学医学部臨床試験研究センター探索医療・ゲノム疫学分野
4) 日本大学医学部内科学系糖尿病代謝学分野
5) 日本大学医学部内科学系神経内科学分野
6) 日本大学医学部精神医学系精神医学分野
7) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野
8) 日本大学医学部視覚科学系眼科学分野
9) 日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野
10) 日本大学医学部松戸歯学部生物学
中山智祥: nakayama.tomohiro@nihon-u.ac.jp

上記3方向からのどこからでもアプローチできる研究体制を作る。スペシャリストや設備が存在して可能になることであって、必要な機器備品を購入することで研究拠点を形成に値するものとなる。それぞれが独立しているわけではなく、ダイレクトにデータを結びつけることによって、各方向からの研究結果検証段階での確実性を増す。こうした研究プロジェクト体制は、各研究テーマごとにばらばらに研究を遂行するという体制にはない非常にユニークなものであり、本学部が実施する高度化推進事業として理想的なものとする。研究プロジェクトの中に研究テーマをいくつかに分けていくことは、研究組織としてのまとまりを欠く可能性があり採用しない。本研究体制が確立される次年度以降は本研究システムに沿った新たな研究者の参入も視野に入れ研究を拡大していく予定である。

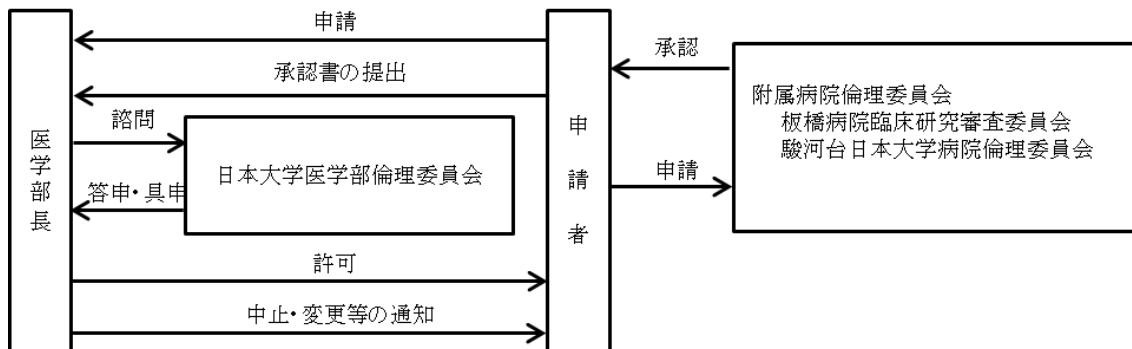


3. 研究方法

まず研究全体の計画を日本大学医学部倫理委員会と附属病院の臨床研究審査委員会に申請する。そして研究のスタート体制を整えるために、新規機器の購入、既存機器のメンテナンスを進める。具体的には新規機器としてゲノミクスに用いる次世代シーケンサーMiSeqシステム (illumina社) を購入した。プロテオミクスに用いるLC-MSのQuattro Premier XE (MS TECHNOLOGIES社) とゲノミクスの遺伝子型決定 (ゲノタイピング) に用いるシーケンスデテクションシステム SDS7700 (ライフテクノロジー社) は設置済みで使用している。臨床検査を主とする日本大学データベース・ウェアハウスはすでに構築・稼働している。サンプルと疾患表現型データを収集するのは糖尿病、神経疾患、精神疾患、黄斑変性疾患、妊娠高血圧症候群、脳腫瘍などである。各疾患の目標収集サンプル数は1000人とする。血液はEDTA塩入り試験管とプレーン試験管とにより前者はDNA抽出と血漿用、後者は血清用とする。収集と同時にDNAを抽出する。疾患表現型データは日本大学データベース・ウェアハウスでフォローしきれないデータであるバイタルサイン、家系図情報、既往歴、生活歴、投薬情報、治療前後や回復前後でのデータ変動などターゲットを絞り込んでいくのに有用なものをリストアップしデータベース化している段階である。

4. 研究により期待される効果

まず研究体制で研究テーマごとに細分化するのではなく、各研究者が密に連携できる体制を作ったこ



【生命倫理申請に係る組織図】

とによって効果的に研究結果が出る効果が期待できる。また本研究プロジェクトの3つの柱となるプロテオミクス、ゲノミクス、臨床データベースの解析ではそれぞれにスペシャリストを配置することで、研究者は自分の研究に専念でき、かつ高い研究レベルに到達することができることが期待できる。

研究結果は疾患の診断と治療に直接むすびつくような疾患マーカーの発見、開発のため新規臨床検査診断法、新規創薬の特許取得や開発に至る可能性が高い。ひいては人類の健康増進、疾患発症予防に役立つものにしたい。

採択後の本テーマ関連論文

- 1) 中山智祥：ハプロタイプを用いた関連解析の効用。(総説)日本臨床検査自動化学会会誌. 39 (2) : 157-165, 2014. 4
- 2) 中山智祥：遺伝子・DNA利用の製品研究開発における規制・倫理対応と解析, 操作技術のトラブル対策7章 各疾患における遺伝子治療, 遺伝子診断の現状と今後有望な開発ターゲットの考察, 第1節 遺伝カウンセリング, 遺伝学的検査現状と今後の課題. 遺伝子治療診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発. 技術情報協会 pp.291-299. 2014. 5. 30
- 3) 中山智祥：遺伝子医療の現状とゲノム医療の近未来, 遺伝子医療・ゲノム医療を支える社会基盤, 人材養成4: ジェネティックエキスパート. 週刊医学のあゆみ 第1土曜特集号, 医歯薬出版 2014印刷中
- 4) 中山智祥：コンパニオン診断の進展 — 個別化医療を進めるために — 認定制度ジェネティックエキスパートの立ち上げ. 臨床病理レビュー特集号. 2014印刷中
- 5) 中山智祥：ますます臨床利用がすすむ遺伝子検査—その現状と今後の展望そして課題—第1章. 実用化へ向かう次世代シーケンサーとその周辺6. 遺伝子関連検査におけるネットの活用とその人材育成. 遺伝子医学MOOK メディカル ドゥ. 2014印刷中

ラジオアイソトープ・環境保全系による医学研究支援の現状

佐貫榮一^{1,2)}, 宮本政憲¹⁾, 会田良行¹⁾Medical Research Activities Supported by the Section
of Radioisotope and Environmental ConservationEiichi SANUKI^{1,2)}, Masanori MIYAMOTO¹⁾, Yoshiyuki AIDA¹⁾

はじめに

当系は, RIを「安全・安心」して使えるように, またRI以外の作業環境保全に欠かせない有害化学物質などの測定を実施してきた。この現状を報告する。

ラジオアイソトープ (RI : RadioIsotope) 測定

RIの利用状況は表1に示した。(表1)

RIを「安全」に使えるように放射線障害防止法などにに基づき以下の事項を実施している。

1) RI実験室・機器の管理・保守点検, 放射性物質(薬品等)の受入れから廃棄(排水・廃棄を含む)までの管理。

2) RIを取扱者の「安全」はRI室の入退室・個人被曝線量・電離放射線健康診断・個人票などの管理。

3) 同時にこれらを記載記録し永久保存としている。

4) また地震や火災など緊急時・原子力規制への対応も実施してきている。

5) 放射線研究者が「安心」して実験できるように, 教育・訓練・大学院生の実習(表2)も行っている。

上記の各種検査・測定の結果は,

- 1) 実験室の汚染を認めなかった。
- 2) 個人被曝も認めなかった。
- 3) 電離放射線健康診断で異常は認めなかった。

4) 放射線管理区域外漏洩は認めなかった。

5) 濃度限度を越える測定値を認めなかった。

(表4, 表5)

表1 RI実験室利用状況

年 度	平成23	平成24	平成25
発注量	単位 MBq	単位 MBq	単位 MBq
³ H	0.185	0	0
¹²⁵ I	0.555	1.221	0.333
³² P	37	37	74
³⁵ S	185	37	74
発注件数			
³ H	1	0	0
¹²⁵ I	5	11	3
³² P	1	1	2
³⁵ S	5	1	2
計	12	13	7
実習生	8名	9名	6名

表2 教育

1) 同位元素取扱者のための教育訓練講習会を主催している。今年は平成26年7月10日に企画した。

2) また日本大学院医学研究科履修の一端は放射線基礎科学(大学院履修要項)の講義および実習を平成26年6月3日および10日に実施した。

謝辞: 教育を担当頂いている阿部修教授, 原留弘樹准教授および坂口雅州先生に深謝いたします。

1) 日本大学医学部 総合医学研究所 医学研究支援部門 ラジオアイソトープ・環境保全系
2) 日本大学医学部 放射線医学系
佐貫榮一: sanuki.eiichi@nihon-u.ac.jp

作業環境測定

「特定化学物質障害予防規則（特化則）」等の改正により平成20年3月1日よりホルムアルデヒドが特定第2類物質に指定された。

これにともない、勤労者の暴露を防止するため、医学部、板橋病院、駿河台病院のホルムアルデヒドを取り扱う作業全般に関する作業環境測定が必要になった。そこで、当系が測定に当たることになり、平成21年11月から測定を実施してきている。

(写真1, 表3)

また平成24年4月10日、母性保護のために、生殖機能などに有害な化学物質が発散する場所での女性労働者の就業を禁止する「女性労働基準規則（女性則）」の一部を改正する省令を公布しました。

改正女性則は平成24年10月1日に施行、このためキシレンの作業環境測定も平成26年度から実施を予定している。(表3)



写真1 ホルムアルデヒドの作業環境測定

付記

関係する各省庁などへの報告書は、膨大にて省略する。

深謝

これらの測定・報告書作成における林敬真技術長、宮本政憲主任および会田良行様に深謝いたします。

表3 作業環境測定の実施作業場所数

ホルムアルデヒド	
学部	単位作業場所3ヶ所
板橋病院	単位作業場所5ヶ所
駿河台病院	単位作業場所4ヶ所
エチレンオキシド	
学部	単位作業場所1ヶ所
板橋病院	単位作業場所1ヶ所
キシレン(平成26年度より測定を予定)	
学部	単位作業場所2ヶ所
板橋病院	単位作業場所2ヶ所
駿河台病院	単位作業場所1ヶ所

表4 空中放射線量測定

福島原発事故後2週目でバックグラウンドにもどった(総合医学研究所紀要Vol.1 / December 2013)。

この後3年まで測定したが、検出限度濃度以下であった。

表5 プール水における放射性濃度測定

福島原発事故後から2週間で検出濃度限度以下となり、現在まで濃度限度を越える値は認めていない。

なおラドセーフテクニカルサービスにて詳細な測定を行った。

¹³¹I, ¹³⁴Cs, ¹³⁷Csのいずれも検出濃度限度以下であった。

まとめ

当系は何もない事がなによりである。日ごろの管理・予防が実った結果と自負したい。

同時に関係各位に再深謝いたします。

冠動脈起始異常を示すブタとの遭遇について

谷口由樹¹⁾, 藤田順一¹⁾, 黒田和道¹⁾, 石井敬基²⁾Medical Research Activities Supported by the Section of Laboratory
Animals For Anomalous coronary arteries pigs found
during the experimentYoshiki TANIGUCHI¹⁾, Junichi FUJITA¹⁾, Kazumichi KURODA¹⁾, Yukimoto ISHII²⁾

1. 諸言

動物福祉の問題への関心の高まりなどもあり、産業動物であるブタの使用が注目されている。ブタは、生理学的、薬理的、解剖学的に多くの点でヒトと類似していることから、近年、広い研究分野で動物実験に用いられており、特に循環器系の研究分野での使用が多く報告されている^{1), 2)}。さらにGuiney³⁾は心臓手術の研究分野における実験動物としてブタを高く評価している。日大医学部では以前より循環器および心臓外科領域の研究でブタを使用しており、毎年50～100頭を実験に使用し様々な成果を挙げている。今回、心臓外科の実験において、偶然、冠動脈起始異常を呈するブタを発見した。このブタについて得られた若干の結果を、文献的考察とともに報告する。

2. 症例

ブタを用いた心臓外科領域の実験において、胸骨正中切開による開胸を行ったところ、左冠動脈前下行枝 (Left anterior descending coronary artery; 以下LAD) の走行が、通常とは異なり、右冠動脈から分岐、走行していることを発見した。このような冠動脈起始異常を呈するブタの発見は初めてのことであり、実験を一時中断し、より詳しく冠動脈の走行を確認するために、冠動脈造影 (Coronary Angiography; 以下CAG) (図1) 及び直視下での写真撮影

を行った (図2)。対象のブタは雄性家畜ブタ (系統LWD: ランドレース種 (L), 大ヨークシャー種 (W), デュロック種 (D)) であり、正確な出生日は不明であるが生後約2～3ヶ月と考えられた。実験開始日より10日前に当施設へ搬入され、搬入時の検査では外見上の異常は見られなかった。また、実験までの馴化飼育期間中は食欲も旺盛で、特異的な行動等も観察されなかった。

実験時体重は36.8Kgであり、血液・生化学検査の結果は以下のとおりであった。

血算; RBC $6.15 \times 10^6 / \mu\text{L}$, WBC $1.49 \times 10^4 / \mu\text{L}$,
Hb 11.2 g/dl, Hct 37.9%
電解質; Na 142 mEq/L, K 5.4 mEq/L,
Cl 107mEq/L
生化学検査; CPK 2825IU/L/37°C, AST 57IU/L,
ALT 32IU/L

またLADの流量を超音波トランジェットタイム血流計 (T206 トランソニックジャパン社製) にて計測したところ、seg7における流量は20 ml/minであった。

これらの値を、これまでの実験で得られた正常ブタのデータと比較したところ (表1), CPKについては若干高値であった (正常ブタ $1736 \pm 1182.5 \text{ IU/L/37}^\circ\text{C}$)。また、冠動脈起始異常ブタのLADの流量

1) 日本大学医学部医学研究支援部門ラボラトリーアニマル系
2) 日本大学医学部医学研究支援部門
谷口由樹: taniguchi.yoshiki@nihon-u.ac.jp

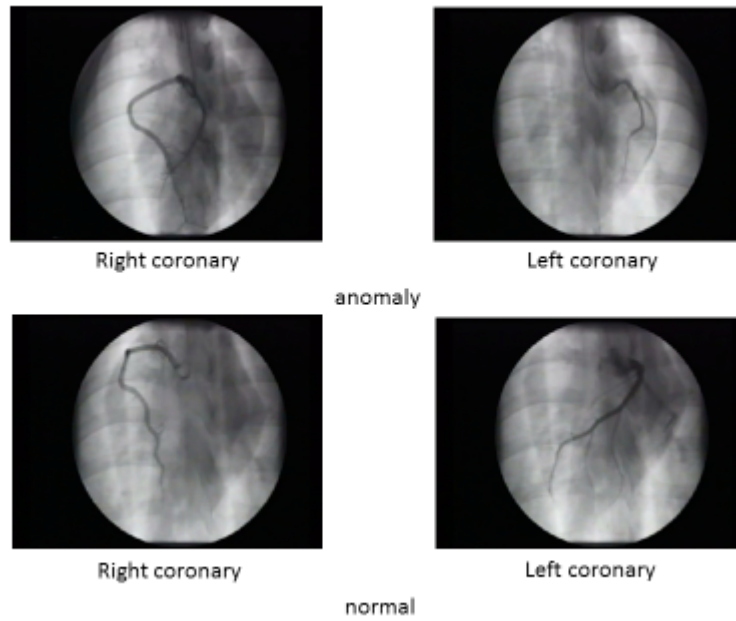


図 1 Coronary angiography

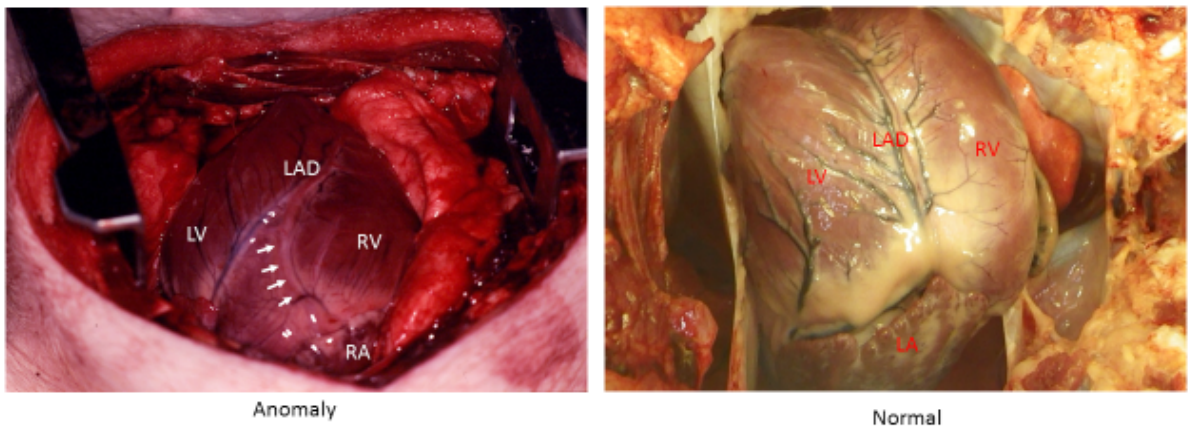


図 2 開胸時心臓

RA：右心房 RV：右心室 LA：左心房 LV：左心室 LAD：左冠動脈前下行枝
右冠動脈から分岐した血管が左前下行枝へ走行している

は、正常ブタの70%程度の流量であった（正常ブタ $31.4 \pm 5.6 \text{ ml/min}$ ）。なお、心臓の大きさは、他の同体重のブタと比べ小さめであった。

CAGを行ったところ、今回のブタは、左前下行枝が右冠動脈から分岐している、冠動脈起始異常であることが確認できた。

3. 考 察

近年ブタを用いた動物実験が頻繁に行われるようになってきた。日大医学部においても毎年50～100頭を動物実験に供してきた。ブタは比較的先天異常

が多いと言われているが、今回の起始異常のブタに遭遇するまで、当施設において先天異常が認められた例はなかった。実験に使用するという性質上、動物を搬入する際にチェックが行われ飼育中も観察を行うが、今回の起始異常ブタは外見上目立った異常を示さなかった。

画像診断技術の向上や選択的冠動脈造影により、ヒトの冠動脈起始異常は生前に診断することが可能となった。冠動脈の先天性異常には、冠動脈の肺動脈基部からの起始異常、冠動脈の大動脈または他の冠動脈からの起始異常、冠動脈シャント、冠動脈

表1 ブタの血液データおよび冠動脈 (seg7) 流量

	頭数	Normal	Anomaly
RBC	87	5.74±0.98	6.15x10 ⁶ /μl
WBC	85	1.8331±0.603	1.49x10 ⁴ /μl
Hb	85	9.81±1.55	11.2g/dl
Hct	80	35.4±5.74	37.9%
Na	81	142±3	142mEQ/L
K	82	3.7±0.4	5.4mEQ/L
Cl	82	102±3.5	107mEQ/L
CPK	83	1763±1182.5	2825IU/L/37°C
AST	81	40±17	57IU/L
ALT	82	37±8.2	32IU/L
Flow	7	31.4±5.6	20ml/min

瘤等がある⁴⁾。その中でも大動脈または冠動脈からの冠動脈起始異常は、心筋血流に異常を示すことが少なく、多くは冠動脈造影時に初めて発見され、その頻度は成人例の1～0.5%といわれている⁴⁾。今回のブタでの異常においても、ヒトの多くのケースと同じく、外見上異常が見られず、開胸し心臓を露出して初めて発見に至った。冠動脈起始異常は、冠循環に影響をおよぼすことなく臨床症状を全く呈しないものもあるが、生命をおびやかすに至るものや他の疾病と鑑別が困難な症状を呈するものなど、奇形の発症部位と種類により、その症状は多様である⁵⁾。Edwards⁶⁾やHudson⁷⁾は、冠動脈の異常をminor anomaliesとmajor anomaliesに大別している。minor anomaliesは、生理学的な異常をきたさない冠動脈の数、走行、分布の異常を指し、major anomaliesは、生理学的な異常をもたらすものとしている。今回ブタにおいて見出した左前下行枝右冠動脈起始(肺動脈前型)(図3)⁸⁾は比較的予後の良いminor anomalyとされている。

今回ブタで発見した冠動脈起始異常は左前下行枝が右冠動脈より分岐しており、分岐角や長い異常走行のために心筋虚血を引き起こす可能性もあった。

実際、LAD seg.7の血流量は若干低流量を示し、摘出した心筋重量においても、ほぼ同体重のブタと比べやや小さかった。恐らく、低流量のため出生後の心臓の成長が若干悪かったと考えられる。しかしながら、心筋虚血により死亡することなく、外見上正常ブタと見分けがつかないまま成長し、当実験施設に搬入されたものと考えられる。

起始異常ブタの発見に至った当初の実験計画は、冠動脈結紮による急性心筋梗塞モデルに対する左心補助循環装置Abiomed BVS5000の補助効果の検討という内容であった。今回の異常があっても、急性心筋梗塞モデルの作製、左心補助循環装置の装着が可能のため、そのままこのブタを用い実験を継続した。実験を継続したところ、通常と同じようにデータを得ることができた。

ブタは他の家畜より先天異常の発生頻度は高いとされている。ブタの先天異常の発生率は0.03～2.9%と報告⁹⁾されているが、養豚場では母ブタによる子ブタへの圧死や下痢など様々な原因により子豚の死亡が発生し、その頻度も低くなく、個々の死亡原因が追究されることは稀である。したがって、死に繋がるような先天異常が存在したとしても、そ

冠動脈起始異常を示すブタとの遭遇について

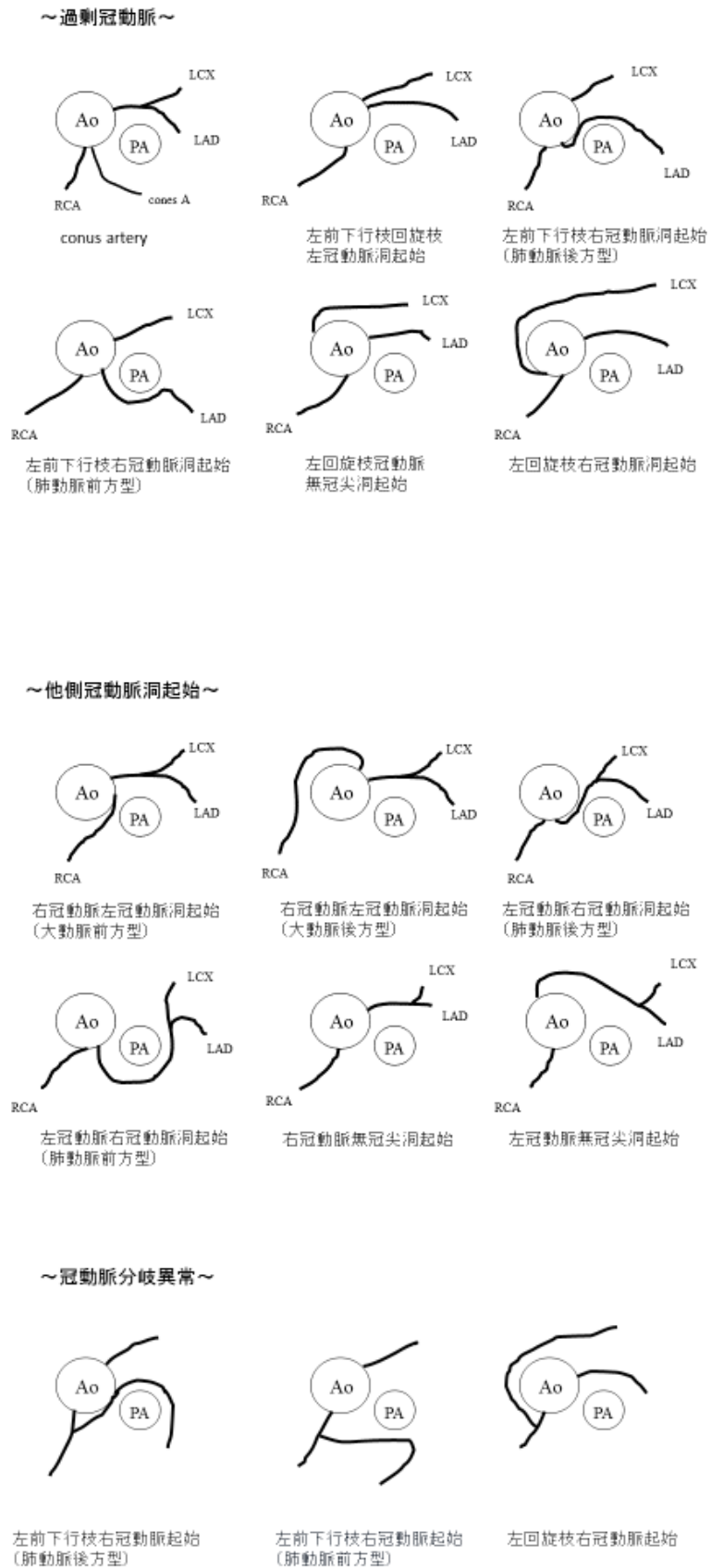


図3 冠動脈起始異常の分類
肺動脈起始, high take off単冠動脈は除く

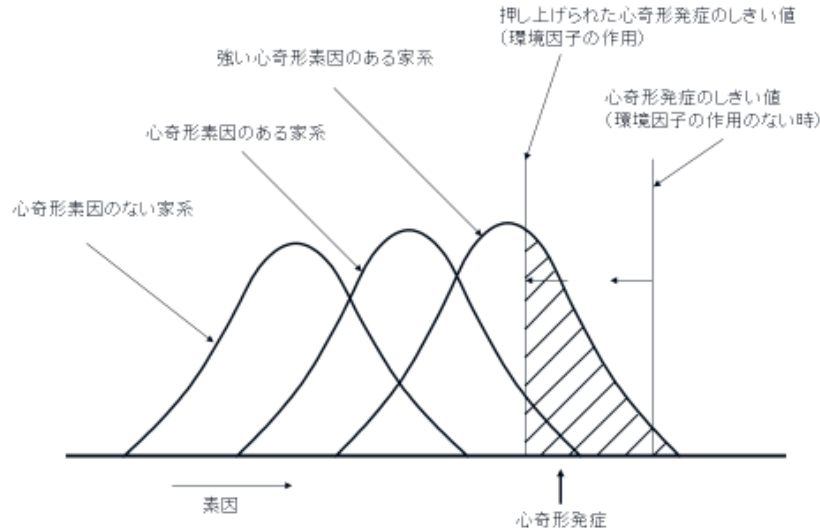


図4 心奇形における多因子性遺伝のしきい説

れが発見されることは期待し難い。今回先天異常が認められたブタも養豚場で飼育されていたが、その養豚場責任者にインタビューしたところ、やはり子豚の死亡例は圧死が多いとの回答を得た。

実験動物に奇形が発生した場合、その動物は実験に使用することができない事態となる可能性は高く、奇形の発生を予防することが必要と考えられる。家畜では近親交配のウシ、系統繁殖のブタ、イヌ、ネコ、ニワトリなどで奇形発生に関し遺伝の関与が示唆されているが、成因に関する確定的な見解は示されていない。今回のブタは、動物実験において多数使用されているラットやマウスのように実験用に供された動物ではなく、養豚場にて生産された家畜ブタであった。したがって、遺伝的統御が厳しく管理されている実験動物としてのラットやマウスのように管理が行われていない。そのため今回のような事態が起こったと考えられる。今後の異常発生の予防法として考えられるのは、他の遺伝病と同様に捉え、雌雄とも保因ブタを交配に使用しないことである。これにより、突然変異を除いて、遺伝病の発生はほぼ完全に防ぐことができる¹⁰⁾。また遺伝的な素因を濃くしないために近親相姦をさけることも重要となる。環境要因が奇形発生に繋がる可能性(しきい説; 図4)¹¹⁾もあるが、現在心奇形を引き起こす環境要因は不明なため、現時点では発症を防ぐには、保因ブタの排除、近親相姦を避ける、この2点が重要となる。しかしながら、保因ブタが、いわ

ゆる「種親」として優秀な場合があり、なかなか排除が難しく、また、近親交配についても、家畜の改良にとってメリットが大きいため、これを避けることは難しい。そのため、動物実験用として管理されたブタを実験に使用する必要があると考えられる。

4. 結語

今回実験中に冠動脈奇形のブタを発見した。実験動物としてのブタは有望で、現在積極的に行われている循環器領域以外にも使用するメリットのある動物である。その他、医療技術トレーニングにもブタは使われており、今後ブタの利用数が拡大するものと思われる。現在実験に使用されるブタは、家畜からの転用が多いが、最近では実験用として生産、供給されるブタも増えてきている。今後実験用ブタの必要性が高まれば、家畜からの流用でなく、きちんと管理された実験用ブタが主流となると思われる。今回のような奇形に遭遇する事態の発生は、ほぼなくなるのではないかと考えられる。しかしながら、現在でも家畜ブタの流用が主となっており、今回のような奇形等との遭遇は当面続くと考えられる。そのような事態が発生した時には、生産者に連絡を取り、再発防止にできる限り協力することが重要である。

参考文献

- 1) Detweiler, D. K. in Swine in biomedical research; proceedings of a symposium at the Pacific Northwest

- Laboratory, Richland, Washington, July 19 - 22, 1965 (eds Leo K. Bustad, R. O. McClellan, U.S. Atomic Energy Commission., & Pacific Northwest Laboratory.) 301 - 306 (Battelle Memorial Institute, Pacific Northwest Laboratory, 1966).
- 2) Engelhardt, W. in Swine in biomedical research; proceedings of a symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington, July 19 - 22, 1965 (eds Leo K. Bustad, R. O. McClellan, U.S. Atomic Energy Commission., & Pacific Northwest Laboratory.) 307 - 329 (Battelle Memorial Institute, Pacific Northwest Laboratory, 1966)
 - 3) Guiney, E, J : The pig as an experimental animal with particular reerence to cardiovascular surgery. Ir. J. Med. Sci. No.474 (1965)
 - 4) 増田善昭：冠動脈起始異常. 心臓 Vol.30 No.7 450-452, 1998
 - 5) 阿部博幸, 林田憲明, 加納達二, 桜井秀彦, 脇屋義彦, 長坂英雄, 矢部喜正, 相沢忠範, 中島大和, 三山博司, 北村和夫, 阿部正視, 天野純, 渡辺幹夫, 田中淳：冠動脈奇形の診断とその臨床的意義. 臨放 23 : 1431-1443, 1978
 - 6) Edwards, J.E. : Editorial : Anomalous coronary arteries with special reference to arteriovenous - like communications. Circulation 17 : 1001-1006, 1958
 - 7) Hudson, R.E.B. : Cardiovascular Pathology volume 3, 1st ed, p. 33, The Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1970
 - 8) 小林亨：冠動脈起始異常. 日本臨床, 別冊循環器症候群 I, 803-806, 1996
 - 9) 三上仁志：ブタの先天異常の遺伝. 日豚会誌 26巻 3号 : 175-187, 1989
 - 10) 漆山芳郎：わかっているようでわからない遺伝病・心奇形. 臨床獣医 Vol.12, No.9, 28-35, 1994
 - 11) 高尾篤良総編：臨床発達心臓病学, 中外医学社, 東京, 1989

脳卒中後疼痛に対する大脳皮質運動野の経頭蓋磁気刺激の効果 — ドラッグチャレンジテストとの比較から —

山本隆充¹⁾, 深谷 親¹⁾, セデキジャン・ウフル¹⁾,
松村祐平¹⁾, 関口真一¹⁾, 石井敬基¹⁾

rTMS of the motor cortex in post-stroke pain patients: comparison with results of the drug challenge test

Takamitsu YAMAMOTO¹⁾, Chikashi FUKAYA¹⁾, Sidikejiang WUPUER¹⁾,
Yuhei MATSUMURA¹⁾, Shinichi SEKIGUCHI¹⁾, Yukimoto ISHII¹⁾

要旨

大脳皮質運動野刺激が脳卒中後疼痛の治療に有効であることが多くの研究者によって報告されている。日本大学医学部医学研究支援部門医用電子系医用電子室で臨床研究に使用することができる高頻度経頭蓋磁気刺激装置を用いて、脳卒中後疼痛に対する大脳皮質運動野刺激の効果を検討した。また、モルヒネ、ケタミン、チオペンタールを用いたドラッグチャレンジテストの効果との比較を行った。Visual Analogue Scale (VAS) の減少率は、平均値ではSham刺激3.1%、本刺激17.4%であった。また、最大のVAS減少率はSham刺激19.4%、本刺激35.8%であり、本刺激はsham刺激と比較して有意にVASの減少がみられた (P<0.05, Paired t-test)。さらに本刺激とSham刺激との比較では、刺激の5時間後まで有意にVASの減少を認めた (P<0.05, Bonferroni's multiple comparisons)。ドラッグチャレンジテストとの比較では、ケタミンが最も有効で、脳卒中後疼痛の治療に経頭蓋磁気刺激を用いる場合には低用量ケタミン点滴療法の併用が有効であると考えられる。

1. はじめに

大脳皮質運動野刺激は、脳卒中後疼痛の治療を目的として、1993年に坪川らによって開発された方法である¹⁾。その後、多くの研究者によって、その有用性が確認されている²⁻⁵⁾。しかし、慢性植込み電極を用いた大脳皮質運動野刺激では、開頭して大脳皮質運動野上の硬膜外に刺激電極を留置する必要がある、簡単に刺激の効果を確認することは困難であった。

一方、経頭蓋磁気刺激では、電磁誘導の原理を用いて、頭皮上に置いた刺激コイルに高電流を瞬間的に流すことにより、皮膚や頭蓋骨などの影響を受けない誘導磁場を発生させることができる。また、この誘導磁場によって、刺激コイルと逆向きの誘導電流を大脳皮質内に発生させ、大脳皮質を刺激することができる。初期の経頭蓋磁気刺激装置では、1Hz以下の低頻度刺激のみ可能であったが、最近では50Hzの刺激が可能な装置も一般的に使用されるようになった。また、磁気刺激装置に連動するナビ

ゲーションシステムも広く用いられており、あらかじめMRIの撮影を行なっておくと、患者MRIの脳表面画像上でリアルタイムにコイルの位置と方向が示され、刺激部位を正確に決定することができる^{6,7)}。

本研究では、非侵襲的に大脳皮質運動野を刺激することのできる経頭蓋磁気刺激装置を用いて、脳卒中後疼痛に対する除痛効果について検討した。また、モルヒネ、ケタミン、チオペンタールを用いたドラッグチャレンジテストの結果と比較して、脳卒中後疼痛に対する経頭蓋磁気刺激の効果発現における、薬理学的背景について検討し、経頭蓋磁気刺激の効果を増強する方法についても検討を加えた。

2. 対象及び方法

対象は20例の脳卒中後疼痛患者で、男性12例、女性8例。年齢の平均は63.5±8.1歳 (54歳から85歳)。原因は、視床出血7例、被殻出血5例、脳幹出血1例、視床梗塞4例、脳幹梗塞3例で、てんかんや頭蓋内金属の存在など経頭蓋磁気刺激の適応外と

1) 日本大学医学部医学研究支援部門 医用電子系医用電子室
山本隆充: Yamamoto.takamitsu@nihon-u.ac.jp

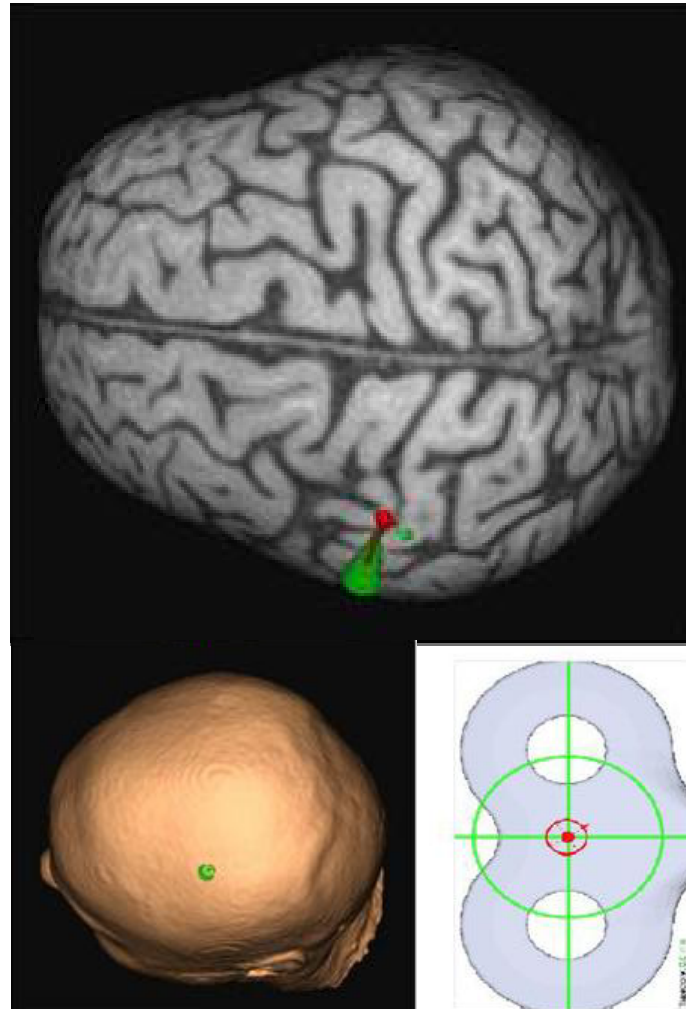


図1 フレームレス定位ナビゲーションシステム。
左上：頭皮上に磁気刺激の刺激点を投影したもの。
左下：8の字コイルの刺激点。
右：運動野（中心前回）の手の領域に磁気刺激の刺激点を合わせたところ。

なる症例は含まれていない。また、脳卒中発症から平均 38.2 ± 40 ヶ月（6ヶ月から180ヶ月）経過している。

MRIを撮影し、フレームレス定位ナビゲーションシステム (Brainsight TMS, Rogue Research Inc. Canada) を用いて、中心前回のprecentral knob（手の領域）を同定し、直径70 mmの8の字コイルを磁気刺激装置 (Magstim Super Rapid, The Magstim Company Limited, Whitland, UK) につないで刺激を行なった (図1)。高頻度経頭蓋磁気刺激の刺激強度決定には、健側の刺激によって運動を誘発する運動誘発閾値をそれぞれの症例ごとに決定し、この運動誘発閾値の100%の強度で患側の大脳皮質運動野（手の領域）を刺激した。刺激は磁気刺激の安全ガイドライン（日本臨

床神経生理学会）にしたがって、5Hzで500発の刺激を行なった。刺激前のVisual Analogue Scale (VAS) と刺激後のVASを比較した。また、刺激後のVASの値は、刺激直後、60分、120分、180分、240分、300分、24時間後に測定し、これらの平均値ならびに刺激直後に認められる最大のVASの減少率について比較した。本研究は、日本大学板橋病院臨床研究審査委員会の承認を得て行なった。

ドラッグチャレンジテストの方法²⁾としては、ケタラルテストは、5分間隔で生食を2回投与後、5分間隔で5mgのketamine hydrochlorideを合計25mgまで静脈内投与する。モルヒネテストは、同様に5分間隔で3mgのmorphine hydrochlorideを合計18mgまで静脈内投与する。また、チオペンター

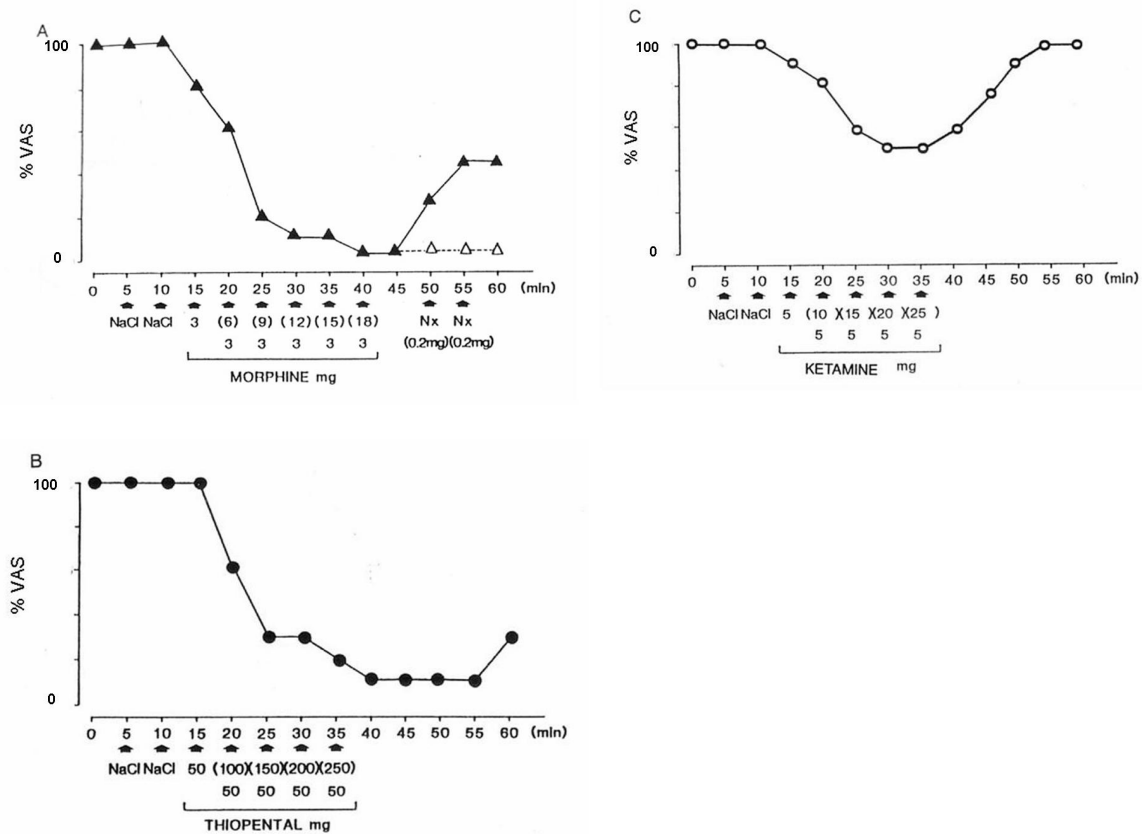


図2 ドラッグチャレンジテスト

A: モルヒネテスト, B: チアミラールテスト, C: ケタミンテスト

ルテストは、同様に50mgのthiopental sodiumを、5分間隔で合計250mgまで静脈内投与し、途中で入眠した場合は、その時点で中止する。Visual Analogue Scale (VAS) を連続的に測定し、(薬物投与後VAS ÷ 薬物投与前のVAS) × 100% = % VASとして、% VASが60%以下となったもの、すなわち薬物投与前と比較して、VASが40%以上減少したものを有効例、40%以下のものを無効例とした(図2)。

3. 結果

経頭蓋磁気刺激によるVASの減少率は、平均値ではSham刺激3.1%、本刺激17.4%であった。また、最大のVAS減少率はSham刺激19.4%、本刺激35.8%であり、本刺激はsham刺激と比較して有意にVASの減少がみられた($P < 0.05$, Paired t-test)。また、本刺激とSham刺激との比較では、刺激の5時間後まで有意にVASの減少を認めた($P < 0.05$, Bonferroni's multiple comparisons)(図3)。

ドラッグチャレンジテストでは、ケタミンテスト

で10/20 (50%)、モルヒネテストで3/20 (15%)、チアミラールテストで7/20 (35%) が有効で、磁気刺激によるVASの減少率とドラッグチャレンジテストによるVASの減少率を比較すると、ケタミンテスト($r=0.503$, $p=0.012$)、チアミラールテスト($r=0.609$, $p=0.002$)、モルヒネテスト($r=0.527$, $p=0.009$)の、いずれも有意の相関関係を認めた(Pearson's correlation coefficient)(図4)。

4. 考察

これまで慢性植込み電極を用いた大脳皮質運動野刺激の効果については、脳卒中後疼痛では長期的に有効な症例は、約50%であると報告されている¹⁻⁵⁾。今回の結果から、経頭蓋磁気刺激は脳卒中後疼痛の治療に有用であることが確認された。また、大脳皮質大脳皮質運動野の硬膜上に刺激電極を留置して、慢性的な刺激を行なう適応を決定するには、あらかじめ経頭蓋磁気刺激で大脳皮質運動野刺激の効果を確認しておくのが有用であると考えられた。

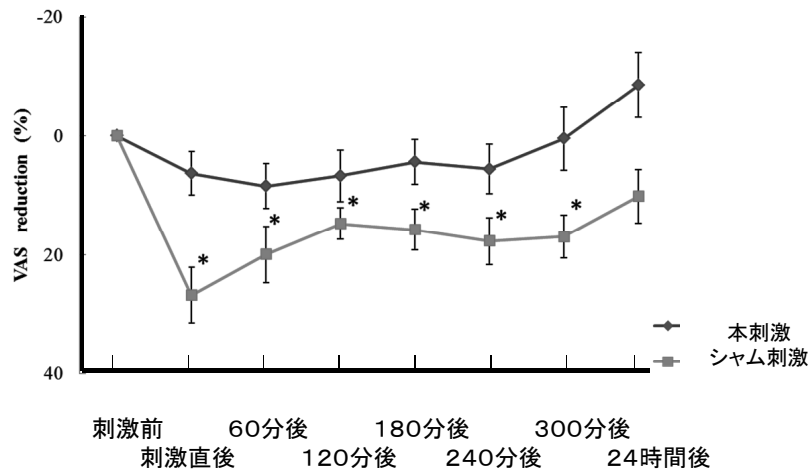


図3 経頭蓋磁気刺激によるVASの変化。sham刺激とreal刺激の比較。

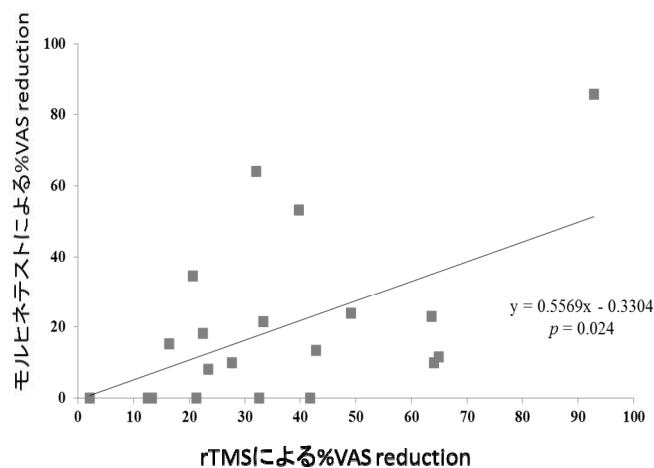


図4 経頭蓋磁気刺激とドラッグチャレンジテストの回帰分析。
A: モルヒネテスト, B: チアミラルテスト, C: ケタミンテスト

経頭蓋磁気刺激による除痛効果は一時的で、刺激後の除痛効果の持続期間は5時間程度であった。Khedrら⁸⁾は連続5日間の刺激を行うことで、2週間持続する除痛効果が得られたと報告しており、持続的な効果を得るためには、連日の刺激が必要であると考えられる。このような理由で、磁気刺激の治療を家庭で継続することのできる小型で簡易型の磁気刺激装置の開発が望まれているが、いまだ実用化はされていない。

低用量のケタミン点滴による除痛効果の持続時間には個人差があり、僅か数時間のものから数日間持続するものまで存在する。効果の持続時間が短い症

例でも一度疼痛を軽減することが疼痛の管理には重要であり、これによって精神的な安定を得られるという症例が多い。また、中枢性感作の解除にも有効であると考えられている⁹⁾。ケタールの持つ解離性麻酔薬としての性質から情動面の変化を呈する症例も存在したが、適切な投与量と投与時間を選択することによって、有効な治療効果を得ることができる。プレガバリンには神経終末からの興奮性アミノ酸の遊離を抑制する作用が報告されており、NMDAレセプターのブロッカーであるケタミンとの相乗効果も期待される。

これまでにケタミンが麻酔薬として使用される場

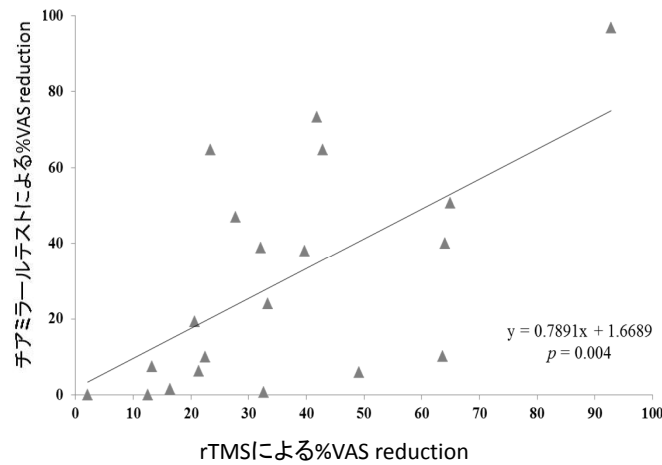


図4 経頭蓋磁気刺激とドラッグチャレンジテストの回帰分析。
A：モルヒネテスト，B：チアミラルテスト，C：ケタミンテスト

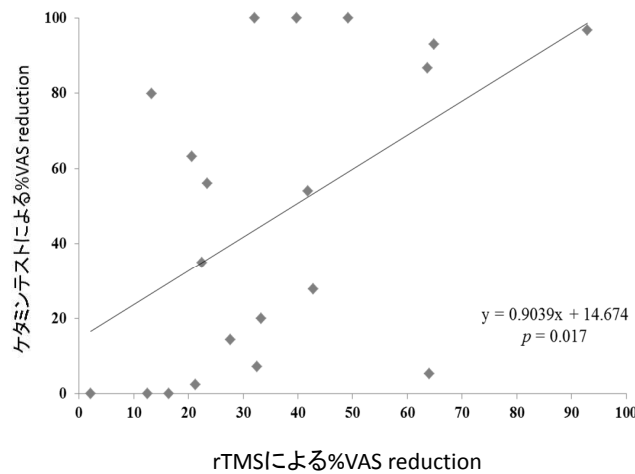


図4 経頭蓋磁気刺激とドラッグチャレンジテストの回帰分析。
A：モルヒネテスト，B：チアミラルテスト，C：ケタミンテスト

合は、ケタミン1～2 mg / kg を1分以上かけて静注、あるいは5～10 mg / kg を筋注する方法が用法、用量として推奨されている。一方、ケタミン点滴療法は、ケタミン0.3 mg / kg を100 mlの生食に加え、1時間かけて点滴投与する方法で、全く別の使用方法である。ケタミンの点滴中でも覚醒状態で患者さんの状態を確認し、精神状態ならびに疼痛の変化を確認することができる。また、求心路遮断痛では、この程度の投与量で十分な除痛効果を得ることができる⁹⁾。低用量ケタミン点滴療法の明らかな除痛効果は数時間のことが多いが、疼痛が持続して難治性となっている症例においては、一時的であっても疼痛から開

放される時間を提供することによって、増大した痛みをリセットすることができ、日常の生活も改善されるので、経頭蓋磁気刺激療法との併用は特に有用な併用療法と考えられる。

5. 結 語

日本大学医学部医学研究支援部門医用電子系医用電子室で臨床研究に使用することができる高頻度経頭蓋磁気刺激装置を用いて、大脳皮質運動野刺激による脳卒中後疼痛の除痛効果について検討した。経頭蓋磁気刺激の効果とケタミンによる除痛効果には相関関係を認め、有効例もモルヒネやチオペンター

ルに比較して高率であった。本研究の結果から、脳卒中後疼痛の治療として、経頭蓋磁気刺激に低用量ケタミン点滴療法を組み合わせた新たな治療法を提唱したい。

文 献

- 1) Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, et al.: Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. *J Neurosurg* 1993; 78: 393-401.
- 2) Yamamoto T, Katayama Y, Hirayama T, et al.: Pharmacological classification of central post-stroke pain: comparison with the results of chronic motor cortex stimulation therapy. *Pain* 1997; 72: 5-12.
- 3) Nguyen JP, Lefaucheur JP, Decq P, et al.: Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical, electrophysiological and anatomic data. *Pain* 1999; 82: 245-251.
- 4) Garcia-Larrea L, Peyron R, et al.: Electrical stimulation of motor cortex for pain control: a combined PET-scan and electrophysiological study. *Pain* 1999; 83: 259-273.
- 5) Saitoh Y, Shibata M, Hirano S, et al.: Motor cortex stimulation for central and peripheral deafferentation pain. Report of 8 cases. *J Neurosurg* 2000; 92: 150-155.
- 6) Wupuer S, Yamamoto T, Katayama Y, et al.: F-wave suppression induced by suprathreshold high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in poststroke patients with increased spasticity. *Neuromodulation*, 16: 206-211, 2014
- 7) Matsumura Y, Hirayama T, Yamamoto T: Comparison between pharmacologic evaluation and repetitive transcranial magnetic stimulation-induced analgesia in poststroke pain patients. *Neuromodulation* 16: 349-354, 2013
- 8) Khedr EM, Kotb H, Kamel NF, et al.: Longlasting antalgic effects of daily sessions of repetitive transcranial magnetic stimulation in central and peripheral neuropathic pain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 833-838.
- 9) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al.: Drug-challenge test and drip infusion of ketamine for post-stroke pain. *Pain Research* 2009; 24: 191-199.

医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧

Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center

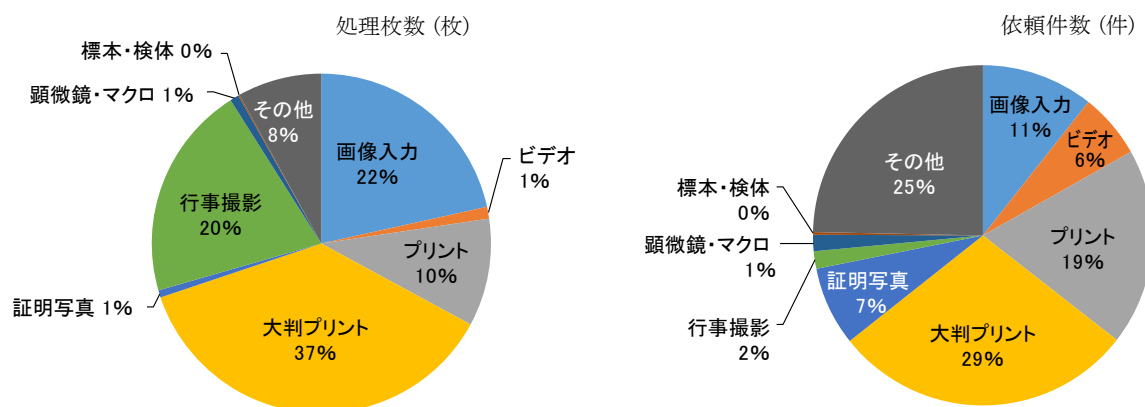
形態系

【中央写真室】

平成25年度 年間処理枚数/依頼件数

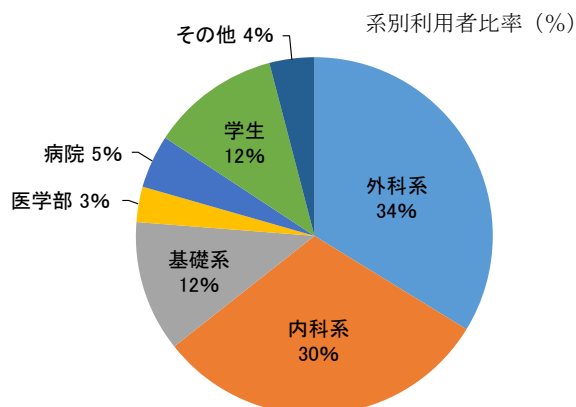
	画像入力	ビデオ	プリント	大判プリント	証明写真	行事撮影	顕微鏡・マクロ	標本・検体	その他	年間合計
処理枚数(枚)	4110	215	1957	7050	129	3906	168	14	1537	19086
依頼件数(件)	159	92	279	429	112	25	23	4	368	1491

※1「ビデオ」は処理時間30分を1枚として換算 215枚=107.5時間
※2「大判プリント」は料金単位 10cmを1枚として換算 7050枚=705m



平成25年度 年間利用者数(人)

外科系	内科系	基礎系	医学部	病院	学生	その他	合計
307	278	108	29	44	106	37	909



【電子顕微鏡室】

論文

病態病理学系人体病理学分野

逸見明博：急速凍結技法の病理診断への応用と生きた臓器・組織の観察. 日大医学雑誌, 72 (1):39-42, 2013.

学会発表

病態病理学系人体病理学分野

逸見明博：生体内凍結技法を用いたラット腎近位尿管の観察. 第133回電子顕微鏡技術研究会, 教育講演, 東京大学医科学研究所, 2013. 9. 7.

Hemmi A : Introduction of pathological diagnostic system in Nihon University Itabashi Hospital, Mongolian-Japanese Joint Project on Education for Medicine and Biology. *The 1st Workshop on Microscopy Technology for Medicine and Biology. Workshop*, National Cancer Center of Mongolia, 2013. 10. 14.

逸見明博：急速凍結法を用いた臨床電顕応用への試み. 医学生物学電顕技術学会第30回学術講演会および総会, 大阪, 2014. 5. 23-25.

逸見聖一朗, 地家豊治, 松本なつき, 尾花ゆかり, 中西陽子, 逸見明博：生体内凍結技法を用いたラットうっ血腎の観察. 医学生物学電顕技術学会第30回学術講演会および総会, 大阪, 2014. 5. 23-25.

逸見聖一朗, 地家豊治, 松本なつき, 尾花ゆかり, 逸見明博：生体内凍結技法を用いたラットうっ血腎集合管の観察. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第29回学術講演会および総会, 神奈川, 2013. 6. 8.

大矢俊之, 地家豊治, 渡辺一郎, 逸見明博, 石井敬基, 村井一郎, 平山篤志：心筋細胞陥入膜の電気生理学的形態学的解析への試み. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第29回学術講演会および総会, 神奈川, 2013. 6. 8.

逸見聖一朗, 地家豊治, 松本なつき, 尾花ゆかり, 中西陽子, 逸見明博：生体内凍結技法を用いたラットうっ血腎近位尿管の観察. 第54回日本組織細

胞化学会総会・学術集会, 東京・新橋, 2013. 9. 27.

内科学系循環器内科学分野

大矢俊之, 山田勉, 高山忠輝, 加藤真帆人, 渡辺一郎, 杉谷雅彦, 平山篤史：心不全における心筋細胞間隙の臨床的意義に関する研究. 第34回心筋生検研究会, 2012. 11.

遠山一人, 大矢俊之, 加藤真帆人, 奥村泰男, 山田勉, 渡辺一郎, 廣高史, 平山篤史：心筋生検のみから診断し得た心アミロイドーシスの一例. 第35回心筋生検研究会, 2014. 11.

古川力史, 奥村泰男, 渡辺一郎, 真野博明, 園田和正, 佐々木直子, 大久保公恵, 中井俊子, 國本聡, 平山篤史：多源性心室性期外収縮を有し左心室機能低下を合併した不整脈右室心筋症の一例. 第9回東京心臓病理フォーラム, 2013. 2.

大矢俊之, 遠山一人, 山田勉, 地家豊治, 加藤真帆人, 高山忠輝, 廣高史, 杉谷雅彦, 平山篤史, 東京女子医科大学病理診断科 山本 智子, 西川俊郎：下肢筋力低下を主訴に来院し低心機能を認めた40代男性症例. 第11回東京心臓病理フォーラム, 2014. 3.

Toshiyuki Ohya M.D., Ph.D Mahoto Kato M.D., Kiyoshi Iida M.D., Ph.D. seiji Fukushima M.D., Ph.D, Atsushi Hirayama M.D., Ph.D and SAKURA AHF registry investigators : Meteorological Factors Affecting Epidemiology of Heart Failure. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, 2014. 3.

大矢俊之, 地家豊治, 渡辺一郎, 逸見明博, 石井敬基, 村井一郎, 平山篤史：心筋細胞陥入膜の電気生理学的形態学的解析の試み. 第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会, 2013. 6.

大矢俊之, 山田勉, 地家豊治, 奥村泰男, 高山忠輝, 渡邊一郎, 杉谷雅彦, 石井敬基, 平山篤史：日本大学医学部付属板橋病院における心筋生検超微形態診断の意義第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会, 2013. 6.

大矢俊之：透過電子顕微鏡を用いたヒト心筋細胞間隙開大の臨床的意義に関する研究。

平成25年度厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 特発性心筋症に関する調査研究第1回北風班 総会・研究報告会, 2013. 10.

医用電子系

【医用電子室】

体位性頻脈症候群 (POTS) と神経調節性失神 (NMS) における起立試験における脳血流・脳酸素代謝に関する検討 (会議録)

遠藤あゆみ (日本大学医学部小児科学系小児科学分野), 藤田之彦, 桃木恵美子, 河村由生, 石井和嘉子, 富尾則子, 瀧上達夫, 高橋昌里, 酒谷薫
臨床神経生理学 (1345-7101) 41巻5号 Page459 (2013. 10)

中高年女性の抑うつに対する運動のリラクゼーション効果 (原著論文)

小松一俊 (日本大学 医学部脳神経外科系), 辻井岳雄, 酒谷薫
自律神経 (0288-9250) 50巻3号 Page219-223 (2013. 09)

光イメージング法を用いた薬理評価法 抗ヒスタミン薬の投与が前頭葉機能に及ぼす影響 (解説)
辻井岳雄 (日本大学 医学部脳神経外科学系光量子脳工学分野), 酒谷薫
日本中医学会雑誌 1巻4号 Page11-16 (2011. 10)

起立性調節障害の病態 脳血流の変化 子どもの不定愁訴 (著書)

藤田之彦, 遠藤あゆみ, 神山八弓
小児科学レクチャー p82-87, 総合医学社. 東京, 2014. 2. 10

体位性頻脈症候群の小児における起立負荷による脳循環動態の非対称性変化に対する検討 (シンポジウム)
神山八弓, 藤田之彦, 瀧上達夫, 遠藤あゆみ, 酒谷薫.
第20回医用近赤外線分光法研究会. 東京. 2013. 10.

Ayumi ENDO, Yukihiko FUJITA, Tatsuo FUCHIGA-

MI, Shori TAKAHASHI, Hideo MUGISHIMA, and Kaoru SKATANI: Changes in cerebral blood oxygenation induced by active standing test in children with POTS and NMS. 41st Annual Meeting of the International Society on Oxygen Transport to Tissue (ISOTT), New Hampshire, 2013. 6.

生物化学系

【化学分析室】

【感染ゲノム研究室】

論文業績

臨床検査医学分野

Haketa A, Soma M, Nakayama T, Kosuge K, Aoi N, Hishiki M, Hatanaka Y, Ueno T, Doba N, Hinohara S: Association between SIRT2 gene polymorphism and height in healthy, elderly Japanese subjects. *Translational Research* 161(1): 57-58, 2013. 1.

Shimodaira M, Niwa T, Nakajima K, Kobayashi M, Hanyu N, Nakayama T: Correlation between mean platelet volume and fasting plasma glucose levels in prediabetic and normoglycemic individuals. *Cardiovasc Diabetol* 12: 14, 2013. 1 (doi: 10.1186/1475-2840-12-14.)

Pan S, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Soma M, Aoi N, Ma Y: A Haplotype of the GOSR2 Gene Is Associated with Essential Hypertension in Japanese Men. *Clinical Biochemistry* 46(9): 760-765, 2013. 6.

Pan S, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Soma M, Aoi N, Ma Y: A Haplotype of the GOSR2 Gene Is Associated with Myocardial Infarction in Japanese Men. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 17(6): 481-488, 2013. 06.

Shimodaira M, Nakayama T, Sato I, Sato N, Izawa N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T: Glucocorticoid synthesis related-genes: HSD11B1 and HSD11B2 in hypertensive disorders in pregnancy. *Gynecological Endocrinology* 29(7):657-661, 2013. 7.

Shimodaira M, Niwa T, Nakajima K, Kobayashi M, Hanyu N, Nakayama T: Correlation between mean platelet volume and blood glucose levels after oral glucose loading in normoglycemic and prediabetic Japanese subjects. *Journal of Diabetes Investigation* 5(1): 66-71, 2014. 2 (doi: 10.1111/jdi.12117. Epub 2013 Jun 25)

Shimodaira M, Niwa T, Nakajima K, Kobayashi M, Hanyu N, Nakayama T: Gender differences in the relationship between serum uric acid and mean platelet volume in a Japanese general population. *Platelets*. 25(3): 202-206, 2014. 3. (doi: 10.3109/09537104.2013.790013. Epub 2013 May 30)

Shimodaira M, Niwa T, Nakajima K, Kobayashi M, Hanyu N, Nakayama T: Correlation between serum lipids and 1-hour postload plasma glucose levels in normoglycemic individuals. *Journal of Clinical Lipidology*. 8(2): 217-222, 2014. (doi: 10.1016/j.jacl.2013.12.003. Epub 2013 Dec 11)

Shimodaira M, Niwa T, Nakajima K, Kobayashi M, Hanyu N, Nakayama T: Serum Triglyceride Levels Correlated with the Rate of Change in Insulin Secretion Over Two Years in Prediabetic Subjects. *Annals of Nutrition and Metabolism* 64(1): 38-43, 2014. 4.

Miyashita T, Sugiyama T, Yamadate S, Nagashima M, Satomura A, Nakayama T: Study of a newly developed high-performance liquid chromatography analyser for glycosylated haemoglobin measurements in blood containing haemoglobin variants in the Japanese population. *Annals of Clinical Biochemistry* 2014 in press.

Satomura A, Nakayama T et al: Comment on: p.E66Q mutation in the GLA gene is associated with a high risk of cerebral small-vessel occlusion in elderly. *European journal of neurology* 2014 in press.

伊藤聡, 内丸亮子, 渡部真実, 長倉芳樹, 金崎章, 岩崎直子, 内瀧安子, 山元俊至, 佐藤直之, 中山智

祥, 青木一孝, 寺内康夫: 糖尿病ケトアシドーシス発症時に代謝性アルカローシス, 低K血症, 低Mg血症を伴ったMODY5の症例. *糖尿病* 56 (2): 93-101, 2013. 2. 28.

Kitano H, Koyama Y, Komiya M, Sato N, Nakayama T: Basal cell nevus syndrome: New mutation of the patched homologue 1 gene. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2014 in press.

藤岡彰, 藤岡和美: 木村病を合併した配合降圧剤(テルミサルタン/ヒドロクロロチアジド配合錠)による光線白斑黒皮症. 第32回蒲田医師会学術集談会誌13-17, 2013.

藤岡彰, 藤岡和美: 木村病を合併した配合降圧剤(テルミサルタン/ヒドロクロロチアジド配合錠)による光線白斑黒皮症. *大田区医学会誌* 5: 27-33, 2013.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関, FMD/NMD ratioとeGFR間の正相関. *日本超音波医学会第86回学術集会プログラム/講演抄録集* 40: S618, 2013.

藤岡彰, 藤岡和美: アトピー性皮膚炎の「ア」と阿弥陀仏の「阿」は同じ意味である. 第114回日本医史学会総会 抄録号59: 278, 2013.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関, FMDとSUA間の逆相関, SUAとeGFR間の逆相関(女性例での検討) *日本超音波医学会第87回学術集会プログラム/講演抄録集* 41:S678, 2014.

藤岡和美: フローイメージング研究部会企画「臨床でフローイメージングをいかに利用するか」: 皮膚科領域におけるフローイメージングを用いた超音波検査の有用性について 第32回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会プログラム・予稿集3: 75, 2014.

星野忠, 宮下真一, 山舘周恒, 中山智祥: 全自動電気泳動装置エパライザ2を用いたALPアイソザイム

活性染色法とALP活性測定法との整合性に関する検討. (技術論文) 日本臨床検査自動化学会誌. 38 (1) : 83-86, 2013. 1.

杉山貴大, 小林仁美, 山口道子, 山本千鶴子, 橋都隆子, 宮下徹夫, 山舘周恒, 中山智祥: 全自動糖分析装置GA09の基礎的検討(試薬と機器論文). 医学検査. 62 (3) : 308-313, 2013. 3.

中山智祥: 標榜診療科としての臨床検査医学科における遺伝学的検査体制の構築. (技術論文) 臨床病理. 61 (3) : 242-246, 2013. 3.

Ogura S, Shimosawa T, Mu S, Sonobe T, Kawakami-Mori F, Wang H, Uetake Y, Yoshida KI, Yatomi Y, Shirai M, Fujita T. Oxidative stress augments pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice overexpressing oxidized LDL receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 305: H155-62. 2013.

腎臓内分泌内科

Shimizu C, Fujita T, Fuke Y, Yabuki M, Kajiwara M, Hemmi S, Satomura A, Soma M. Effects of cyclosporine on bone mineral density in patients with glucocorticoid-dependent nephrotic syndrome in remission. *Int Urol Nephrol.* 2013 Jun; 45(3): 803-8.

Fujita T, Hemmi S, Kajiwara M, Yabuki M, Fuke Y, Satomura A, Soma M. Complement-mediated chronic inflammation is associated with diabetic microvascular complication. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012 2013 Mar; 29(3): 220-6.

Fujita T. Extra-immunological role of complement activation in diabetic nephropathy. *OA Nephrology* 2013 Oct 25; 1(2): 19.

Fujita T, Hemmi S, Kajiwara M, Yabuki M, Fuke Y, Satomura A, Soma M. Diminished complement-activating capacity through the classical pathway in sera from type 2 diabetes mellitus. *Immunol Invest.* 2014; 43(2): 170-81.

生理学分野

H. Kitano, A. Mamiya, S. Kokubun, C. Hidai: Efficient nonviral gene therapy with FasL and Del1 fragments in mice. *Journal of Gene Medicine* 14: 642-650, 2012.

A. Mamiya, H. Kitano, K. Takao, S. Kokubun, M. Komiya, C. Hidai: An epidermal growth factor motif from del1 protein increases the efficiency of *in vivo* gene transfer with a non-viral vector. *Molecular Biotechnology* 54, 445-450, 2013.

総合内科学分野

T Ozaki*,1, D Wu1,2, H Sugimoto1, H Nagase3 and A Nakagawara2 Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage *Cell Death and Disease* (2013) 4, e610

DNA hypermethylation of zygote arrest 1 (*ZARI*) in hepatitis C virus positive related hepatocellular carcinoma.

Keiko Takagi, Kyoko Fujiwara, Tadatoshi Takayama, Takao Mamiya, Masayoshi Soma, Hiroki Nagase *Springerplus.* 2013 Apr 10; 2(1): 150. Print 2013 Dec.

A novel gene regulator, pyrrole-imidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration.

Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Masumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M. *J Mol Med (Berl).* 2014 May; 92(5): 509-21.

Effects of an angiotensin II receptor blocker on the impaired function of endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension.

Suzuki R, Fukuda N, Katakawa M, Tsunemi A, Tahira Y, Matsumoto T, Ueno T, Soma M. *Am J Hypertens.* 2014 May; 27(5): 695-701.

Taguchi A1, Niwa M2, Hoshi M3, Saito K4, Masutani T5, Hisamatsu K1, Kobayashi K1, Hatano Y1, Tomita

H1, Hara A1.

Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is upregulated in activated microglia in mice cerebellum during acute viral encephalitis. *Neurosci Lett*.2014 Apr 3; 564: 120-5.

Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, Ozaki T, Koshikawa N, Toshio K, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma M, Nagase H. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif Original Research Article. *FEBS Open Bio* 2014 Apr 4 (4): 328-334.

Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Shinjima Y, Igarashi J, Ghosh S, Wang X, Fujiwara K, Ikeda T, Koshinaga T, Soma M, Nagase H. Nr4a3, a possible oncogenic factor for neuroblastoma associated with CpG methylation within the third exon. *Int J Oncol*. 2014 May; 44(5): 1669-77.

Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, Morien E, Soma M, Nagase H. Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. *Molecular Carcinogenesis* 2013 doi: 10.1002/mc.22085.

Sato A, Nagase H, Obinata D, Fujiwara K, Fukuda N, Soma M, Yamaguchi K, Kawata N and Takahashi S. Inhibition of MMP-9 using a pyrrole-imidazole polyamide reduces cell invasion in renal cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2013 in press.

Sugito K, Kawashima H, Yoshizawa S, Uekusa S, Hoshi R, Furuya T, Kaneda H, Hosoda T, Konuma N, Masuko T, Ohashi K, Ikeda T, Koshinaga T, Tomita R, Shinjima Y, Fujiwara K, Watanabe T, Held WA, Nagase H. Non-promoter DNA hypermethylation of Zygote Arrest 1 (ZAR1) in neuroblastomas. *J Pediatr Surg*. 2013 Apr; 48(4): 782-8.

Takagi K, Fujiwara K, Takayama T, Mamiya T, Soma M, Nagase H. DNA hypermethylation of *Zygote arrest*

I (ZAR1) in hepatitis C virus positive related hepatocellular carcinoma. *SpringerPlus* 2013 Apr 2(1): 150

Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, Ozaki T, Koshikawa N, Toshio K, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma M, Nagase H. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif Original Research Article. *FEBS Open Bio*

Zhou X, Fukuda N, Matsuda H, Endo M, Wang X, Saito K, Ueno T, Matsumoto T, Matsumoto K, Soma M, Kobayashi N, Nishiyama A. Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice. *American journal of physiology. Renal physiology* 305(7): F957-F967, 2013.

呼吸器内科

Kumasawa F, Hashimoto S, Mizumura K, Takeshita I, Onose A, Jibiki I, Maruoka S, Gon Y, Kobayashi T, Takahashi N: Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates leukotriene D4-induced HB-EGF and ADAM12 expression in human airway smooth muscle cells. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 31(1): 58-66, 2013.

Nakagawa Y, Shimizu T, Takahashi N, Hashimoto S: Impact of thymidylate synthase protein expression on efficacy of chemotherapy in advanced lung cancer patients. *Molecular and Clinical Oncology*. 1(3): 411-417, 2013.

山口賢二, 石渡裕作, 古川典子, 関山忠孝, 平沼久人, 伊藤玲子, 原田智紀, 服部知洋, 馬島徹, 相澤信, 橋本修: ガス吸着分解装置設置後の解剖実習に伴うホルムアルデヒド (FA) 吸入による呼吸機能・気道過敏性への影響 *日本気管食道科学会会報*: 64巻2号 13, 2013.

権寧博, 橋本修: 【気管支喘息の病態機序解明の最新展開】 気道上皮細胞と喘息病態 *臨床免疫・アレルギー*

ギー科：59巻1号 71-75, 2013.

Hayashi S, Maruoka S, Yoshiko N, Takahashi N, Hashimoto S. : Diffuse alveolar hemorrhage associated with low molecular weight heparin. *Respirology Case Reports*. 1(1) : 2-4, 2013

総説・受賞・業績報告

臨床検査医学分野

中山智祥：トピックス：循環器疾患と遺伝的要因
(1) 高血圧と遺伝的素因. *臨床病理*. 61 (2) : 144-149, 2013. 2

中山智祥：TOPICS 高血圧症の感受性遺伝子とその単離法について. *日本臨床生理学会雑誌* 43 (3) : 97-104, 2013. 6

中山智祥：ハプロタイプを用いた関連解析の効用.
(総説) *日本臨床検査自動化学会会誌*. 39 (2) : 157-165, 2014. 4

1 藤岡和美：糖尿病が疑われる60歳代女性. *Nikkei Medical 日経メディクイズ腹部エコー*. 65-66, 2013

平成26年2月 第33回日本画像医学会 (大会長 松永尚文 山口大学大学院医学系研究科放射線医学分野教授) 「IMTとeGFR間の逆相関, FMDとeGFR間の正相関, FMDとIMT間の逆相関」の演題に対して会長賞を取得. 2014. 2.

呼吸器内科

伊藤玲子, 橋本修：[肥満とアレルギー] *臨床 肥満とアレルギー疾患 アレルギー・免疫* : 20巻11号 1586-1590, 2013.

伊藤玲子, 橋本修：[アレルギー疾患と睡眠] 10. 気管支喘息と睡眠 *PROGRESS IN MEDICINE* : 33巻12号, 2617-2620, 2013.

橋本修, 伊藤玲子, 丸岡秀一郎, 権寧博：オランダ仮説を分子レベルから探る *呼吸と循環* : 62巻2号, 108-113, 2014.

権寧博：気道上皮透過性制御因子の同定 *日本大学医学部総合医学研究所紀要* : 1巻1号 71-72, 2013

権寧博, 橋本修：【気管支喘息: 診断と治療の進歩】
病因と病態 アレルギー性気道炎症と気道上皮細胞
日本内科学会雑誌 : 102巻6号 1370-1377, 2013.

橋本修, 権寧博：【間質性肺炎とアレルギー】
膠原病による間質性肺炎 (解説/特集) アレルギーの臨床 : 59巻1号 429-434, 2013

著書

臨床検査医学分野

中山智祥：RET 遺伝学的検査の対象と検査法は？
多発性内分泌腫瘍症診療ガイドブック 多発性内分泌腫瘍症診療ガイドブック編集委員会 金原出版株式会社 2013. 04. 30.

呼吸器内科

権寧博, 橋本修：COPD 病態理解のための基礎知識；
疾患感受性遺伝子解析の方法
慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のマネジメント 改訂3版 : 71-72, 医薬ジャーナル社, 2013.

権寧博, 橋本修：COPD 研究の今後の方向性；基礎
研究 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のマネジメント
改訂3版 : 266-268, 医薬ジャーナル社, 2013.

シンポジウム

臨床検査医学分野

Shimodaira M, Nakayama T, Sato I, Sato N, Izawa N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T: Glucocorticoid synthesis related-genes: HSD11B1 and HSD11B2 in hypertensive disorders in pregnancy. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業研究成果公開シンポジウム. 東京, 日本大学医学部 2013.2.23 (Oral 2.23)

呼吸器内科

橋本修, 権寧博, 丸岡秀一郎：オランダ仮説を分子レベルから検証する. 第53回日本呼吸器学会学術講演会 (東京), 2013. 4.

権寧博, 橋本修: 喘息の治療標的としてのIgE. 第53回日本呼吸器学会学術講演会(東京), 2013. 4.

Maruoka S. The initiation of allergic asthma; bacterial products revisited. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama Japan, Nov 13 2013.

小山大輔, 権寧博, 丸岡秀一郎, 平沼久人, 関山忠孝, 新谷榮崇, 曾田香織, 竹下郁子, 橋本修: 気道感作には何が重要か? マウス喘息モデルの網羅的遺伝子解析. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2013. 11.

丸岡秀一郎, 権寧博, 関山忠孝, 平沼久人, 新谷榮崇, 小山大輔, 井上寿男, 竹下郁子, 曾田香織, 橋本修: 血清中エクソソームmiRNAはアレルギー性気道炎症のリアルタイムバイオマーカーとなりうるか? 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2013. 11.

ワークショップ, 特別講演, 招待講演, 受賞講演 臨床検査医学分野

中山智祥: ランチョンセミナー 遺伝子関連検査の基礎的知識について

—マイコプラズマ核酸検査に絡めて—, 第9回東京都医学検査学会, 東医健保会館, 2013.2.17 (Oral 2.17)

藤岡和美: フローイメージング研究部会企画「臨床でフローイメージングをいかに利用するか」: 皮膚科領域におけるフローイメージングを用いた超音波検査の有用性について第32回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会, 横浜, 2014. 5.

呼吸器内科

丸岡秀一郎, 権寧博, 橋本修: 環境因子と気管支喘息. 第23回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術講演会(東京), 2013. 10.

学会発表

臨床検査医学分野

藤岡和美, 大石実, 矢野希世志, 阿部修, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとestimated glomerular filtration rate (eGFR)間の正相関. 第32回日本画像医学会, 東京, 2013.2.22-2.23

小倉彩世子, 下澤達雄, 永井恒志, 吉田謙一: Oxidative stress augments pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice overexpressing oxidized LDL receptor. 第77回日本循環器学会学術集会. 2013. 3.

中山智祥, Jiang Jie¹, 下平 雅規, 佐藤直之, 青井則子, 相馬正義: 血管平滑筋構成タンパクSmoothelinをコードするSMTN遺伝子と心筋梗塞(MI)との関連解析. 第110回 日本内科学会総会・講演会, 東京, 2013.4.12-4.14 (Poster 4.14)

中山智祥, Jie Jiang, 下平雅規, 佐藤直之, 青井則子, 佐藤三佳乃, 泉洋一, 相馬正義, Yietong Ma: 心筋梗塞としての遺伝子マーカーとしてのSMTN遺伝子. 第86回 日本内分泌学会学術総会, 仙台, 2013.4.25-4.27 (Oral 4.26)

福森龍也, 神森眞, 吉川啓一, 山田哲, 小野瀬裕之, 石井新哉, 山田恵美子, 中山智祥: MEN1型の新規一家系. 第25回日本内分泌外科学会総会, 山形, 2013.5.23-5.24 (Oral 5.23)

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関, FMD/NMD ratioとeGFR間の正相関. 日本超音波医学会第86回学術集会, 大阪, 2013. 5.24-5.26 (Oral 5.26)

中山智祥, Jiang Jie, 相馬正義, 青井則子: SMTN遺伝子と本態性高血圧症との関連解析. 第20回日本遺伝子診療学会大会, 浜松, 2013.7.18-7.20 (Oral 7.20)

出野健, 石関治, 山川道子, 武居宣尚, 上野恵子, 荒木秀夫, 山舘周恒, 中山智祥: 自動血球計数装置(XN2000およびDxH800)の比較検討. 第45回日本

臨床検査自動化学会, 横浜, 2013.10.10-10.12.

荒木秀夫, 石関治, 出野健, 深井喜久子, 山川道子, 武居宣尚, 上野恵子, 山舘周恒, 中山智祥: STA-CIAによる自己免疫疾患項目の適用について—抗好中球細胞質抗体および抗CCP抗体の院内導入効果—第45回日本臨床検査自動化学会, 横浜, 2013.10.10-10.12.

中山智祥, Jiang Jie, 相馬正義, 伊澤則子: 本態性高血圧症とSmoothelinをコードするSMTN遺伝子との関連解析. 第45回日本臨床検査自動化学会, 横浜, 2013.10.10-10.12 (Oral 10.13)

宮下徹夫, 山舘周恒, 中山智祥: HbA1c測定における遠沈後の赤血球層を試料とする場合の溶血の影響. 第45回日本臨床検査自動化学会, 横浜, 2013.10.10-10.12.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関. FMDとSUA間の逆相関, SUAとeGFR間の逆相関. 日本超音波医学会関東甲信越地方会第25回学術集会, 東京, 2013.10.19-10.20 (Oral 10.20)

青井則子, 中山智祥, 相馬正義, 浅井聡: STIM1遺伝子多型と本態性高血圧症との関連性の検討について. 第36回日本高血圧学会総会, 大阪, 2013.10.24-26.

中山智祥, Jiang Jie, 相馬正義, 青井則子: 管平滑筋蛋白SMTN遺伝子と本態性高血圧症との関連解析. 第36回日本高血圧学会総会, 大阪, 2013.10.24-26 (Poster 10.25)

星野忠, 武居宣尚, 荒木秀夫, 山舘周恒, 里村厚司, 中山智祥: 45°C熱処理試料のCK-MB活性残存比を用いたCKアイソザイム判定に関する検討. 第60回日本臨床検査医学会学術総会, 神戸国際会議場, 2013.10.31-11.03 (Oral 11.1)

里村厚司, 藤田宜是, 永島正明, 小倉彩世子, 荒島康友, 星野忠, 志方えりさ, 藤岡和美, 土屋達行,

中山智祥: ファブリー病スクリーニングにおけるE66Q変異と腎組織像. 第60回日本臨床検査医学会学術総会, 神戸国際会議場, 2013.10.31-11.03 (Oral 11.1)

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関, SUAとeGFR間の逆相関. 第60回日本臨床検査医学会学術総会, 神戸国際会議場, 2013.10.31-11.03 (Oral 11.2)

中山智祥, Jiang Jie, 相馬正義, 青井則子: SmoothelinをコードするSMTN遺伝子と本態性高血圧症との関連解析. 第60回日本臨床検査医学会学術総会, 神戸国際会議場, 2013.10.31-11.03 (Oral 11.2)

小倉彩世子, 土屋達行, 下澤達雄, 里村厚司, 永島正明, 星野忠, 荒島康友, 志方えりさ, 藤岡和美, 中山智祥: 血中CRP複合体測定についての検討. 第60回日本臨床検査医学会学術総会, 神戸国際会議場, 2013.10.31-11.03 (Oral 11.2)

中山智祥, Jiang Jie, 相馬正義, 青井則子: ハプロタイプを用いたSMTN遺伝子と本態性高血圧症との関連解析. 第58回日本人類遺伝学会大会, 仙台, 2013.11.20-11.23 (Poster 11.22)

中山智祥, Jiang Jie, 相馬正義, 青井則子: SMTN遺伝子と本態性高血圧症とのハプロタイプを用いた関連解析. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.3-12.6 (Poster 12.5)

青井則子, 中山智祥, 羽毛田公, 相馬正義: Association study: STIM1 gene and essential hypertension in Japanese Subjects 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.3-12.6.

中山智祥, ジャンジー, 相馬正義, 青井則子: 血管平滑筋構成タンパクSmoothelinをコードするSMTN遺伝子と本態性高血圧症(EH)との関連解析. 第111回日本内科学会総会・講演会, 東京, 2014.4.11-4.13 (Poster 4.11)

青井則子, 中山智祥, 相馬正義, 浅井聡: ORAI2遺

伝子多型と本態性高血圧症との関連性の検討. 第87回 日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014.4.24-4.26 (Poster 4.24)

羽毛田公, 上野高浩, 原元彦, 伊澤則子, 田平和宣, 畑中善成, 田中翔, 中山智祥, 相馬正義: 埼玉県高齢者検診集団における血漿アディポネクチン濃度の検討. 第87回 日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014.4.24-4.26 (Poster 4.25)

中島理津子, 皆川晃伸, 伊藤大輔, 栗原進, 大堀哲也, 安田重光, 波多野雅子, 中山智祥, 栗田卓也, 片山茂裕: 低K性ミオパチーを契機に発見されたGitelman症候群の一例. 第87回 日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014.4.24-4.26 (Oral 4.26)

中山智祥, Jiang Jie, 相馬正義, 青井則子: 本態性高血圧症の遺伝子マーカーとしてのSMTN遺伝子. 第87回 日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014.4.24-4.26 (Poster 4.26)

藤岡彰, 藤岡和美: 木村病を合併した配合降圧剤(テルミサルタン・ヒドロクロロチアジド配合錠)による光線白斑黒皮症 第32回蒲田医師会学術集談会, 東京, 2013. 2.

藤岡彰, 藤岡和美: 木村病を合併した配合降圧剤(テルミサルタン・ヒドロクロロチアジド配合錠)による光線白斑黒皮症 第5回大田区医学会, 東京, 2013. 3.

藤岡彰, 藤岡和美: アトピー性皮膚炎の「ア」と阿弥陀仏の「阿」は同じである-言語と歴史の側面からの考察-第33回蒲田医師会学術集談会, 東京, 2014.. 2.

藤岡彰, 藤岡和美: アトピー性皮膚炎の「ア」と阿弥陀仏の「阿」は同じである-言語と歴史の側面からの考察-第6回大田区医学会, 東京, 2014. 3.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとestimated glomerular filtration rate (eGFR) 間の正相関. 第32回日本画像医学会, 東京, 2013. 2.

藤岡彰, 藤岡和美: アトピー性皮膚炎の「ア」と阿弥陀仏の「阿」は同じ意味である. 第114回日本医史学会総会・学術大会 東京, 2013. 5.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関, FMD/NMD ratioとeGFR間の正相関. 日本超音波医学会第86回学術集会, 大阪, 2013. 5.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関, FMDとSUA間の逆相関, SUAとeGFR間の逆相関. 日本超音波医学会関東甲信越超音波地方会第25回学術集会, 東京, 2013. 10.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関, SUAとeGFR間の逆相関. 第60回日本臨床検査医学会学術集会, 神戸, 2013. 11.

里村厚司, 藤田宜堤, 永島正明, 小倉彩世子, 荒島康友, 星野忠, 志方えりさ, 藤岡和美, 土屋達行, 中山智祥: ファブリー病スクリーニングにおけるE66Q変異と腎組織像. 第60回日本臨床検査医学会学術集会, 神戸, 2013. 11.

小倉彩世子, 土屋達行, 下澤達雄, 里村厚司, 永島正明, 星野忠, 荒島康友, 志方えりさ, 藤岡和美, 中山智祥: 血中CRP複合体測定についての検討. 第60回日本臨床検査医学会学術集会, 神戸, 2013. 11.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: IMTとeGFR間の逆相関, FMDとeGFR間の正相関, FMDとIMT間の逆相関. 第33回日本画像医学会, 東京, 2014. 2.

藤岡和美, 大石実, 中山智祥, 藤岡彰: FMDとeGFR間の正相関, FMDとSUA間の逆相関, SUAとeGFR間の逆相関(女性例での検討) 日本超音波医学会第87回学術集会, 横浜, 2014. 5.

腎臓内分内分泌科

藤田宜是, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 相馬正義: 2型糖尿病におけ

る腎症の進展とASPを介した補体仲介型慢性炎症の関連, 第110回日本内科学会総会・講演会, 2013.4.12, 東京, 抄録: 日本内科学会雑誌 Vol.102 No.2 臨時増刊号 p.177 P-94.

福家吉伸, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 藤田宜是, 相馬正義: MPO-ANCA関連血管炎における腎限局型と全身型での腎障害の比較, 第56回日本腎臓学会学術総会, 2013.5.10, 東京, 抄録: 日本腎臓学会誌 Vol.55 No.3 p.355 P-052.

藤田宜是, 渡邊英綱, 村田悠輔, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 里村厚司, 相馬正義: 2型糖尿病患者におけるDPP4阻害薬の尿アルブミン排泄量に及ぼす影響, 第56回日本腎臓学会学術総会, 2013.5.11, 東京, 抄録: 日本腎臓学会誌 Vol.55 No.3 p.313 O-129.

小林有子, 逸見聖一朗, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 藤田宜是, 相馬正義: ループス腎炎における血清IL-22の臨床的意義, 第56回日本腎臓学会学術総会, 2013.5.11, 東京, 抄録: 日本腎臓学会誌 Vol.55 No.3 p.329 O-225.

里村厚司, 藤田宜是, 中山智祥, 丸山尋晴, 浜田寛昭, 高山英一, 草野浩幸: 維持血液透析患者における機能的マンノース結合レクチンを含めた各種生命予後因子の検討, 2013.6.20, 福岡, 抄録: 第58回(社)日本透析医学会学術集会・総会特別号, 日本透析医学会雑誌 Vol.46 supplement p.628 O-1255.

藤田宜是, 渡邊英綱, 村田悠輔, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 里村厚司, 相馬正義: 糖尿病性腎症患者においてDPP4阻害薬投与が腎血管障害に及ぼす影響について, 第28回糖尿病合併症学会 ワークショップ23-1 腎症8, 2013.9.14, 旭川, 抄録: 第28回糖尿病合併症学会プログラム・抄録集 p.146 W-23-1.

原田智紀, 壺井功, 古作和寛, 原弘之, 井上達, 相澤信. 加齢に伴う造血微小環境の機能低下がB細胞造血に与える影響について. 第2回日本大学幹細胞研究フォーラム・2013年1月.

生態構造学

原田智紀, 壺井功, 古作和寛, 原弘之, 井上達, 相澤信. 加齢マウスにおけるストローマ細胞機能低下が肥満細胞造血に与える影響について. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会・2013年3月.

原田智紀, 壺井功, 平林容子, 菅野純, 井上達, 相澤信. 加齢に伴うストローマ細胞機能低下により骨髓破壊後のマウス肥満細胞造血再生は減弱する. 第75回日本血液学会学術集会・2013年10月.

吉川雅朗, 平林瑞紀, 伊藤 遼多, 尾崎繁, 増田知之, 松川睦, 今田 正人, 先崎浩次, 相澤信, 志賀隆. マウス胎仔舌下神経ニューロンの部位特異的な軸索投射におけるRunx1の役割. 第119回日本解剖学会総会・学術集 2014. 3.

糖尿病代謝内科

Ishihara H, Otsuka Y, Yamaguchi S, Hurukawa A, Nakazaki M.

Zinc regulates insulin secretion through interaction with histidine residues of SUR1.

The 73rd Scientific sessions of American Diabetes Association.

Chicago, USA, 2013.6.23.

耳鼻科

長谷川央, 西川智子, 山崎元美, 豊澤恵子, 山本樹生, 池田稔, 古阪徹: 清水一史鼻粘液が有する抗インフルエンザウイルス活性

第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 札幌, 2013. 5.

田中真琴, 高尾恭一, 関根大喜, 古阪徹, 池田稔: ラットにおける抗腫瘍薬パクリタキセルの味覚受容体遺伝子発現への影響と血清亜鉛値 第24回日本微量元素学会学術集会, 大阪, 2013. 6.

生理学分野

真宮淳, 北野尚孝, 小宮正道, 日台智明, 國分眞一郎: Del1タンパクを用いた*in vivo*遺伝子導入法. 日本口腔科学会総会, 広島, 2012年05月.

真宮淳, 北野尚孝, 小宮正道, 日台智明, 國分 眞

一郎：Del1タンパクを用いた*in vivo*遺伝子導入法。Del1 protein increases the Efficiency of gene transfer and induces apoptosis *in vivo*. 日本口腔外科学会総会, 横浜, 2012年10月.

真宮淳, 北野尚孝, 小宮正道, 日台智明, 國分眞一郎：Del1タンパクによる*in vivo*における遺伝子導入率の向上とアポトーシスの誘導. 日大医学会, 東京, 2012年11月.

真宮淳, 相澤聡一, 加藤美弥, 北野尚孝, 小池文彦, 吉田美昭, 絹川雅夫, 田中茂男, 秋元芳明, 小宮正道：ヒアルロン酸製剤の注射が原因と考えられる頬部腫瘍の1例. 日本口腔外科学会関東支部学術集会, 千葉, 2013年6月.

Hisataka Kitano, Chiaki Hidai. Enrichment of transgene products with a deposition domain from Del1 protein. BIO tech 2012. 第11回国際バイオテクノロジー展/技術会議(東京), 2012. 4.

北野尚孝, 真宮淳, 日台智明, 小宮正道：Del1由来のペプチドの遺伝子治療への応用. 第66回日本口腔科学会総会(広島), 2012. 5.

北野尚孝, 真宮淳, 日台智明, 國分眞一郎：A Del1 peptide improves the efficiency of FasL gene therapy with a non-viral vector in a mouse explanted tumor model. 第18回日本遺伝子治療学会(熊本), 2012. 6.

北野尚孝, 真宮淳, 日台智明, 小宮正道. 口演：Del1由来のペプチドによるがん遺伝子治療への応用. 第57回日本口腔外科学会総会(横浜), 2012. 10.

石川友美, 北野尚孝, 真宮淳, 日台智明, 小宮正道：Del1タンパクを用いた*in vivo*遺伝子導入法. 第57回日本口腔外科学会総会(横浜), 2012. 10.

真宮淳, 石川友美, 北野尚孝, 日台智明, 小宮正道：Del1遺伝子を利用した口腔扁平上皮癌への遺伝子治療の検討. 第57回日本口腔外科学会総会(横浜), 2012. 10.

加藤美弥, 北野尚孝, 真宮淳, 小宮正道, 環椎軸椎回旋位固定に伴い顎位の偏位をきたした一例. 第57回日本口腔外科学会総会(横浜) 2012. 10.

Hisataka Kitano, Chiaki Hidai, Shinichirou, Kokubun. Enrichment of transgene products with a deposition domain from Del1 protein. ESGCT 20th Anniversary Congress jointly organised with the FSTCG (Versailles). 2012. 10.

北野尚孝, 真宮淳, 日台智明, 國分眞一郎：Coagulation factor IX Regulates cell migration *in vitro*. 第65回日本口細胞生物学会(名古屋), 2013. 6.

北野尚孝, 真宮淳, 小宮正道：舌動脈における超選択的動注化学療法で支配領域が壊死した1例. 第58回日本口腔外科学会総会(博多), 2013. 10.

相澤聡一, 北野尚孝, 真宮淳, 小宮正道：上顎洞に迷入した歯科用インプラントが複視を合併した上顎洞炎を発症させた1例. 第58回日本口腔外科学会総会(博多), 2013. 10.

広畑直子, 北野尚孝, 真宮淳, 小宮正道：放射線併用超選択的動注化学療法が有効であった進行性口腔癌の一例. 第58回日本口腔外科学会総会(博多), 2013. 10.

Hisataka Kitano, Chiaki Hidai, Shinichirou, Kokubun. Coagulation factor IX regulates cell migration via modulation of de-adhesion at the tailing end of cells. 2013 The American Society for Cell Biology Annual Meeting (New Orleans) 2013. 12.

Chiaki Hidai, Hisataka Kitano, Shinichirou, Kokubun. Membrane endocytosis plays a significant role in de-adhesion induced by activated coagulation factor IX. 2013 The American Society for Cell Biology Annual Meeting (New Orleans) 2013. 12.

臨床研究センター探索医療・ゲノム疫学部門

青井則子, 中山智祥, 相馬正義, 浅井聡：STIMI遺伝子多型と本態性高血圧症との関連性の検討について

て第36回 日本高血圧学会総会, 大阪, 2013. 10.

青井則子, 中山智祥, 羽毛田公, 相馬正義: Association study: S77M7 gene and Essential hypertension in Japanese Subjects. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013. 12.

青井則子, 中山智祥, 相馬正義, 浅井聡: ORAI2 遺伝子多型と本態性高血圧症との関連性の検討第87回日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014. 4.

総合内科

五十嵐潤, 福田昇, コモンマーモセットを用いたヒト TGF- β 1 PI ポリアミドの創薬開発. 第49回高血圧関連疾患モデル学会総会, 日本大学会館: 市ヶ谷, 2013. 9. 7.

五十嵐潤, 福田昇, 斎藤孝輔, 青山隆彦, 松本宣明, 上野高浩, 相馬正義, ヒト TGF- β 1 に対する遺伝子転写制御薬 PI ポリアミド創薬開発. 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 千里ライフサイエンスセンター: 大阪, 2013. 11. 23.

五十嵐潤, 福田昇, 斎藤孝輔, 青山隆彦, 松本宣明, 上野高浩, 相馬正義, ヒト TGF- β 1 に対する新規バイオ医薬 PI ポリアミドの創薬開発. 第8回日本大学先端バイオフォーラム2013, 日本大学会館: 市ヶ谷, 2013. 11. 27.

五十嵐潤, 福田昇, 井上貴史, 伊藤豊志雄, 佐々木えりか, 皮膚癬瘡マーモセットモデルを用いたヒト TGF- β 1 に対する新規バイオ医薬 PI ポリアミドの前臨床試験. 第3回日本マーモセット研究会大会, 九州大学医学部 百年講堂: 福岡, 2013. 12. 12.

五十嵐潤, 中井茂樹, 福田昇, コモンマーモセットを用いたヒト TGF- β 1 に対する新規バイオ医薬ピロール・イミダゾールポリアミドの前臨床試験. 平成25年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業報告会: 日本大学医学部, 2014. 3. 1.

HCV陽性肝細胞癌における *Zar1* 遺伝子のメチル化異常の検討

高木恵子, 高山忠利, 藤原恭子, 間宮孝夫, 森口正

倫, 永瀬浩喜

口演, 第49回日本肝臓研究会 2013年7月12日 東京.

Development of PI polyamide targeting TGF- β 1 to inhibit progression of liver cancer

Keiko Takagi, Tadatoshi Takayama, Kyoko Fujiwara, Masayoshi Soma, Hiroki Nagase

ポスター, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月5日, 横浜.

HCV陽性肝細胞癌における WNK1 遺伝子発現の検討

高木恵子, 高山忠利, 桧垣時夫, 窪田信行, 青木優, 梶原崇弘, 吉田直

口演, 第75回日本臨床外科学会総会, 2013年11月23日, 名古屋.

動脈硬化病変抑制薬である細胞膜トランスポーター ABCA1 をターゲットとした新規遺伝子制御薬 PI ポリアミドによる HDL 増加機序

常見明子, 上野高浩, 福田昇, 羽毛田公, 田平和宣, 畑中善成, 田中翔, 相馬正義

第36回日本高血圧学会総会 於: 大阪国際会議場, 2013. 10.

アディポネクチン増加させる新規遺伝子発現制御薬 PI ポリアミドの開発

常見明子, 上野高浩, 福田昇, 田平和宣, 羽毛田公, 畑中善成, 田中翔, 松本太郎, 相馬正義

第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会 於: 京王プラザホテル(東京), 2013. 7.

ABCA1 を up regulation する PI ポリアミドは培養肝細胞において nascent HDL を増加させる

常見明子, 上野高浩, 福田昇, 田平和宣, 羽毛田公, 畑中善成, 田中翔, 松本太郎, 相馬正義

第45回日本動脈硬化学会総会・学術集会 於: 京王プラザホテル(東京), 2013. 7.

HDL コレステロールを上昇させる ABCA1 をターゲットとした PI ポリアミドの開発

常見明子, 上野高浩, 福田昇, 田平和宣, 羽毛田公, 畑中善成, 田中翔, 松本太郎, 相馬正義

第49回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 於：日本大学会館, 2013. 9.

健常人および本態性高血圧患者の血管内皮前駆細胞とロサルタンの作用

鈴木亮, 福田昇, 片川まゆみ, 常見明子, 上野高浩, 松本太郎, 相馬正義

第36回日本高血圧学会総会 於：大阪国際会議場, 2013. 10.

健常成人におけるタウリン及びマグネシウム摂取による血管内皮前駆細胞 (EPC) 機能に対する効果の検討

片川まゆみ, 福田昇, 常見明子, 渡辺めぐみ, 森真理, 家森幸男, 松本太郎, 相馬正義

第36回日本高血圧学会総会 於：大阪国際会議場, 2013. 10.

3T3-L1脂肪細胞蓄積過程におけるHeat Shock Protein 70の役割

上野高浩, 福田昇, 常見明子, 羽毛田公, 田平和宣, 畑中善成, 田中翔, 相馬正義第36回日本高血圧学会総会 於：大阪国際会議場, 2013. 10.

第13回日本再生医療学会総会2014年3月4-6日(京都) TGF- β 抑制PIポリアミドによる神経膠腫に対する腫瘍化抑制効果の検討

藤原恭子: E-box 認識PIポリアミドによる抗腫瘍効果の検討. 第22回癌病態治療研究会, 東京, 2013.6

藤原恭子, 相馬正義, 永瀬浩喜: 抗腫瘍効果を持つE-box 認識ピロール・イミダゾール・ポリアミドの開発. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013. 10.

藤原恭子, 相馬正義, 永瀬浩喜: Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in skin cancers. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013. 12.

齋藤孝輔, 福田昇, 五十嵐潤, 上野高浩, 相馬正義: ヒトTGF- β 1を標的とした遺伝子制御薬PIポリア

ミドによる上皮間葉移行 (EMT) の制御. 第86回日本内分泌学会学術総会, 仙台, 2013. 4. 25.

齋藤孝輔, 福田昇, 五十嵐潤, 上野高浩, 相馬正義: ヒトTGF- β 1に対する遺伝子制御薬PIポリアミドによる上皮間葉移行 (EMT) の制御. 第49回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 東京, 2013. 9. 7.

齋藤孝輔, 福田昇, 五十嵐潤, 藤原恭子, 上野高浩, 相馬正義: Induced of E-cadherin gene expression by a novel gene silencing PI polyamide targeting of TGF- β 1. 横浜, 2013. 10. 4.

齋藤孝輔, 福田昇, 五十嵐潤, 藤原恭子, 上野高浩, 相馬正義: ヒトTGF- β 1遺伝子プロモーター領域特異的PIポリアミドによる上皮間葉移行 (EMT) の制御. 第36回 日本高血圧学会総会, 大坂, 2013. 10. 26.

齋藤孝輔, 福田昇, 五十嵐潤, 上野高浩, 相馬正義: ヒトTGF- β 1に対する遺伝子転写抑制薬PIポリアミドによる上皮間葉化現象の制御. 第17回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 大坂, 2013. 11. 23.

齋藤孝輔, 福田昇, 五十嵐潤, 上野高浩, 相馬正義: TGF- β 1に対する新規遺伝子制御薬ピロール・イミダゾールポリアミドによる細胞リプログラミングの制御. 第17回 循環器再生医療研究会, 東京, 2013. 11. 30.

齋藤孝輔, 福田昇, 五十嵐潤, 上野高浩, 相馬正義, ヒトTGF- β 1遺伝子発現抑制剤ピロール・イミダゾールポリアミドを用いたiPS細胞誘導法の開発. 第13回 日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 4.

呼吸器内科

山口賢二, 伊藤玲子, 服部知洋, 橋本修, 今田正人, 相澤信: 解剖実習に伴うホルムアルデヒド (FA) 吸入による呼吸機能・気道過敏性への影響. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 (高松), 2013. 3.

Maruoka S, Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Zeldin D, Kraft M, Garantzotis S, Gon Y, Hashimoto

S, Cook DN. The mechanism of TLR5 ligand, flagellin-mediated allergic sensitization through the airway in mice 第53回日本呼吸器学会学術講演会（東京），2013. 4.

新谷榮崇，丸岡秀一郎，小山大輔，平沼久人，関山忠孝，松本健，権寧博，橋本修：気道上皮バリア機能におけるステロイド誘導性遺伝子の役割. 第53回日本呼吸器学会学術講演会（東京），2013. 4.

神津悠，権寧博，関山晶子，寺門正裕，竹下郁子，松本健，丸岡秀一郎，橋本修：気道過敏性感受性遺伝子であるPCDH1の気道バリア機能における役割. 第53回日本呼吸器学会学術講演会（東京），2013. 4.

山口賢二，関山忠孝，平沼久人，伊藤玲子，服部知洋，権寧博，相澤信，橋本修：ホルムアルデヒド（FA）吸入による呼吸機能・気道過敏性への影響. 第53回日本呼吸器学会学術講演会（東京），2013. 4.

熊澤文雄，小林朋子，大木隆史，権寧博，林伸一，高橋典明，橋本修：ステロイド・シクロスポリン・エンドトキシン吸着療法の併用療法により良好な転帰が得られた急性間質性肺炎の2例. 第53回日本呼吸器学会学術講演会（東京），2013. 4.

中川喜子，清水哲男，畑岡つかさ，浅井康夫，辻野一郎，大地康司，高橋典明，橋本修：進行非小細胞肺癌に対するペメトレキセド+カルボプラチン併用療法の臨床第II相試験における治療効果とチミジル酸合成酵素発現との関係. 第53回日本呼吸器学会学術講演会（東京），2013. 4.

伊藤玲子，権寧博，古川典子，関山忠孝，平沼久人，服部知洋，丸岡秀一郎，布村聡，岡山吉道，羅智靖，橋本修：Omalizumab投与患者における血清free IgEの測定. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会（横浜），2013. 5.

Eyring K, Maruoka S, Hollingsworth JW, Pedersen B, Yang IV, Schwartz DA. Key Methylation And Gene Expression Changes That Modulate Allergic Airway Disease In Mice. American Thoracic Society Interna-

tional Conference, Philadelphia USA, May 19 2013.

Shintani Y, Maruoka S, Koyama D, Kozu Y, Hiranuma H, Sekiyama T, Gon Y, Hashimoto S. Steroid-Inducible Genes Regulate Airway Epithelial Barrier Function. American Thoracic Society International Conference, Philadelphia USA, May 21 2013.

Gon Y, Kozu Y, Maruoka S, Sekiyama A, Terakado M, Tsuboi E, Takeshita I, Hashimoto S. PCDH1, An AHR Susceptibility Gene, Promotes Epithelial Barrier Integrity And Is Induced By Glucocorticoids In The Human Airway. American Thoracic Society International Conference, Philadelphia USA, May 21 2013.

Shintani Y, Maruoka S, Koyama D, Kozu Y, Hiranuma H, Sekiyama T, Gon Y, Hashimoto S. Steroid-Inducible Genes Regulate Airway Epithelial Barrier Function. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama Japan, Nov 12 2013.

Ito R, Gon Y, Kogawa N, Sekiyama T, Hiranuma H, Hattori T, Maruoka S, Hashimoto S. Measurement Of Serum Free Ige In The Patients Treated With Omalizumab. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama Japan, Nov 13 2013.

Koyama D, Gon Y, Maruoka S, Shintani Y, Sekiyama T, Hiranuma H, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S. Global Gene Expression Profiles During Allergic Airway Sensitization To House Dust Mite Allergen In Mice. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama Japan, Nov 13 2013.

Maruoka S, Gon Y, Sekiyama T, Hiranuma H, Shintani Y, Koyama D, Inoue T, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S. Exosomal Micrnas In The Serum Are Potential As A Real-Time Biomarker For Allergic Inflammation In The Airway Of Mice. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama Japan, Nov 13 2013.

Gon Y, Maruoka S, Shintani Y, Koyama D, Sekiyama T, Hiranuma H, Inoue T, Takeshita I, Soda K, Hashimoto S. Selective Secretion Of Exosomal Micrnas In A Mice Model Of Bronchial Asthma. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama Japan, Nov 13 2013.

Shimizu T, Nakanishi Y, Nakagawa Y, Tsujino I, Takahashi N, Hashimoto S, Nemoto N. Thymidylate synthase expression can guide anti-cancer drug selection for advanced non-small cell lung cancer patients. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama Japan, Nov 13 2013.

権寧博, 丸岡秀一郎, 平沼久人, 関山忠孝, 小山大輔, 新谷榮崇, 曾田香織, 竹下郁子, 井上寿男, 橋本修: 喘息病態におけるエクソソームを介した新たな遺伝子発現制御機構. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2013. 11.

伊藤玲子, 権寧博, 古川典子, 関山忠孝, 平沼久人, 服部知洋, 丸岡秀一郎, 橋本修: Omalizmab投与患者における血清free Omalizmabとfree IgEの測定. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2013. 11.

新谷榮崇, 丸岡秀一郎, 権寧博, 関山晶子, 神津悠, 小山大輔, 曾田香織, 竹下郁子, 橋本修: 気道上皮バリア機能におけるステロイド誘導性遺伝子の役割. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2013. 11.

平沼久人, 権寧博, 伊藤玲子, 岡本直樹, 山口賢二, 丸岡秀一郎, 服部知洋, 橋本修: 喘息患者における血清キチナーゼ様蛋白YKL-40の検討. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京), 2013. 11.

ラジオアイソトープ・環境保全系

【R I 実験室】

RI施設を使用しての業績

学術論文

生体機能医学系 生化学分野

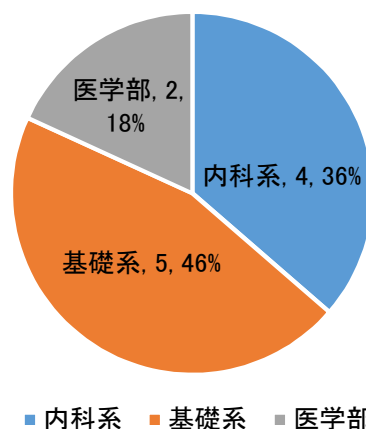
Takeru Kudo, Michiyasu Ishizawa, Kazuki Maekawa, Makoto Nakabayashi, Yusuke Watarai, Hikaru Uchida, Hiroaki Tokiwa, Teikichi Ikura, Nobutoshi Ito, Makoto Makishima, and Sachiko Yamada. Combination of Triple Bond and Adamantane Ring on the Vitamin D Side Chain Produced Partial Agonists for Vitamin D Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014, 57: 4073-4087.

Sarah Tamar Lancaster, Julia Blackburn, Ashley Blom, Makoto Makishima, Michiyasu Ishizawa, Jason Peter Mansell. 24, 25-Dihydroxyvitamin D3 cooperates with a stable, fluoromethylene LPA receptor agonist to secure human (MG63) osteoblast maturation. *Steroids* 2014, 83: 52-61.

平成25年度 R I 実験室登録者数

内科系	基礎系	医学部	合計
4	5	2	11

系別利用者比率



ラボラトリーアニマル系

【動物飼育室 (実医研)】

【動物実験室】

平成25年版紀要 医学研究支援部門ラボラトリーアニマル系を使用した業績

論文

外科学系 心臓血管・呼吸器・総合外科学分野

河内秀臣, 前田英明, 梅沢久輝, 服部勉, 中村哲也, 梅田有史, 小林宏彰, 飯田絢子, 石井雄介, 塩野元美, 松本太郎, 加野浩一郎: 脱分化脂肪細胞を用いたブタ虚血肢に対する自家細胞移植治療の検討. 血管外科, 32 (1) : 18-24, 2013.

猪野崇, 秦光賢, 本間琢, 中田金一, 谷口由樹, 折目由紀彦, 秋山謙次, 三俣昌子, 塩野元美: 軽度低体温循環停止, 急速冷却復温による脳保護効果に関する実験的検討. 日大医学雑誌, 72 (6) : 312-319, 2013.

Tomokazu Kato, Takashi Eriguchi, Norio Fujiwara, Yoshihuro Murata, Atsuo Yoshino, Kaoru Sakatani, Yoichi Katayama: Effects of enriched environment on hippocampal neuronal cell death and neurogenesis in rat global ischemia.

脳神経外科学系 神経外科学分野

Adv Exp Med Biol 2014;812:203-8. *In press*

皮膚科学系 皮膚科学分野

Nunomura S, Shimada S, Kametani Y, Yamada Y, Yoshioka M, Suemizu H, Ozawa M, Itoh T, Kono A, Suzuki R, Tani K, Ando K, Yagita H, Ra C, Habu S, Satake M, Sasaki E, : Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Callithrix jacchus* (common marmoset). *Int Immunol* 2012 Sep; 24(9): 593-603.

機能形態学系 生体構造医学分野

岡村浩人, 平林幸生, 原田智紀, 古作和寛, 壺井功, 相澤信: 長期低酸素環境下におけるマウスモデルを

用いた造血機構の検討. 日大医学雑誌 72 (5) : 266-273, 2013.

Matsukawa, M., Imada, M., Murakami, T., Aizawa, S. and Sato, T. : Rose odor can innately counteract predator odor. *Brain Res* 1381: 117-123, 2011.

Murakami, T., Matsukawa, M., Katsuyama, N., Imada, M., Aizawa, S. and Sato, T. : Stress-related activities induced by predator odor may become indistinguishable by hinokitiol odor. *NeuroReport* 23: 1071-1076, 2012.

佐藤孝明, 松川睦, 古殿雄一: 匂い情報処理アルゴリズム. 応用物理, 83 (1) : 43-47, 2013.

Sato, T., Hirono, J., Matsukawa, M., Furudono, Y., Kajiwara, R., Takashima, I. and Iijima, T. : Algorithm of olfactory information processing for discrimination of similar odors. *Aroma Res* 15: 3-9, 2014.

Tsuboi I, Hokari T, Harada T, Yuda M, Aizawa S: In vitro effect of neopterin on erythropoiesis in mice. *Pteridines* 20: 115-118, 2009.

Tsuboi I, Aizawa S: Effect of neopterin on hematopoietic system *Pteridine* 20: 129-134, 2009.

Tsuboi I, Harada T, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S: Inflammatory biomarker, neopterin, predominantly enhances myelopoiesis, which suppressed erythropoiesis via activated stromal cells. *Immunobiology* 215: 348-355, 2010

Tsuboi I, Harada T, Oshima H, Aizawa S: Effect of neopterin on splenic erythropoiesis in mice. *Pteridines* 21: 7-10, 2010.

Hokari T, *Tsuboi I*, Harada T, Oshima H, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S: Mast cell development and biostresses: different stromal responses in bone marrow and spleen after treatment of myeloablater, 5-fluorouracil, and inflammatory stressor, lipopolysaccharide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 34:

1533-1541, 2011.

Hirabayashi Y, Hatta Y, Takeuchi J, Tsuboi I, Harada T, Ono K, Glomm WR, Yasuda M, Aizawa S: Novel three-dimensional long-term bone-marrow culture system using polymer particles with grafted epoxy-polymer-chains supports the proliferation and differentiation of hematopoietic stem-cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 236:1342-1350, 2011.

病態病理学系 微生物学分野

相澤 (小峰) 志保子, 早川智: CBA/J × DBA/2J 流産マウスモデルにおける“当帰芍薬散”“柴苓湯”の効果. 産婦人科 漢方研究の歩み, 29巻: 71-73, 2012. 4.

社会医学系 法医学分野

内ヶ崎西作, 鉄堅, 磯部英二, 飯酒孟勇, 高橋大介, 名児耶忠章, 勝又純俊, 岩上悦子, 長谷川智華, 熊澤武志: オゾン・紫外線と電磁波照射による新しい遺体保存法について. 第93次日本法医学会総会 (浜松) 日本法医学雑誌 66, p90, 2012.

学会発表

内科学系 総合内科学分野

Keiko Takagi, Tadatoshi Takayama, Kyoko Fujiwara, Masayoshi Soma, Hiroki Nagase: Development of PI polyamide targeting TGF-β1 to inhibit progression of liver cancer. 第72回日本癌学会総会, 横浜, 2013. 10.

内科学系 循環器内科学分野

Seiji Fukushima, et al. Hemodialysis for removal of contrast medium from the coronary sinus could reduce proximal tubular damage. *euroPCR*, Paris May 2013.

外科学系 心臓血管・呼吸器・総合外科学分野

折目由紀彦, 飯田絢子, 中田金一, 和久井真司, 塩野元美, 谷口由樹: 冠動脈バイパスグラフト流量波形に関する実験的検討: IABPの影響. 第18回冠動脈外科学会学術大会, 福岡, 2013. 7.

海内秀臣, 前田英明, 梅沢久輝, 服部勉, 中村哲也, 梅田有史, 飯田絢子, 加野浩一郎, 松本太郎, 塩野元美: プタ虚血肢モデルに対する脱分化脂肪細胞自家移植の効果. 第41回日本血管外科学会総会, 大坂, 2013. 4.

整形外科学系 整形外科学分野

海老原貴之, 江角真理子, 楠美嘉晃, 沼口俊平, 相馬大鋭, 吉田明生, 遠藤美智子, 尾花ゆかり, 徳橋泰明: 受動喫煙がラット軟骨組織に及ぼす分子病理学的変化. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012. 10.

沼口俊平, 江角真理子, 海老原貴之, 遠藤美智子, 相馬大鋭, 吉田明生, 尾花ゆかり, 楠美嘉晃, 徳橋泰明: 受動喫煙高齢ラットにおける腰椎椎間板の遺伝子発現解析. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012. 10.

形成外科学系 形成外科学分野

Soejima K, Shimoda K, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects Of bFGF and DFAT (Dedifferentiated fat) cells in cases of artificial dermis grafts; rat experimental study. 11th Japan - Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, Awaji Japan, 2012. 5.

Soejima K, Kazama T Asami T, Shimoda K,, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of DFAT (dedifferentiated fat) cells in cases of artificial dermis grafts; rat experimental study. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Society, Yokohama, 2012. 9.

Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of DFAT (dedifferentiated fat) cells in cases of artificial dermis grafts - rat experimental study. ASAIO (American Society of Artificial Internal Organs) 59th Annual Conference, Chicago, USA, 2013. 6.

産婦人科学系 産婦人科学分野

神尾宜昌, 今井健一, 田村宗明, Cueno Marni, 清水一史, 落合邦康: 口腔細菌のインフルエンザウイ

ルス感染促進と重症化に及ぼす影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013. 11.

皮膚科学系 皮膚科学分野

大坪美乃, 布村聡, 羅智靖: 接触過敏症におけるFc receptorの機能解析. 第62回日アレルギー学会秋季学術大会, 2012.

Ohtubo M, Nunomura S, Ra C: Crucial role of Fc receptor in the elicitation phase of contact hypersensitivity to oxazolone, *2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology*, 2012.

視覚科学系 眼科学分野

庄司純: アトピー性角結膜炎モデルマウスにおけるinducible CALTの検討. 角膜カンファランス, 沖縄, 2014. 1.

山田愛, 崎元暢, 石森秋子, 大西貴子: 角膜炎症におけるIL-17, IL-17Rの検討. 第54回日本組織細胞化学会総会学術集会, 東京, 2013. 9.

Yamada A, Sakimoto T, Ishimori A, Ohnishi T, Sugaya S, Sawa M: Effects of Interleukin-17(IL-17) and IL-17 receptor on ocular surface inflammation. *2013 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting*, Seattle, USA, 5.6, 2013.

山田愛, 崎元暢, 石森秋子, 大西貴子, 菅谷哲史, 澤充: 前眼部炎症とTh17細胞系蛋白. 第37回日本角膜学会総会, 和歌山, 2013. 2.

Sugaya S, Sakimoto T, Yamada A, Ohnishi T, Ishimori A, Sawa M: The effects of IL-6 receptor blockade on gene expressions in experimental corneal alkali burn. *ARVO*, Seattle, WA, 5.7.2013.

泌尿器科学系 泌尿器科学分野

大日方大亮, 高山賢一, 藤原恭子, 伊藤亜希子, 芦荻大作, 村田保貴, 浦野友彦, 福田昇, 井上聡, 高橋悟: 転写強調因子を抑制することにより脂質代謝遺伝子を標的とする前立腺癌新規治療薬の開発. 第23回泌尿器科分子・細胞研究会, 山形, 2014. 3.

Daisuke Obinata, Ken-ichi Takayama, Kyoko Fujiwara, Noboru Fukuda, Tomohiko Urano, Akiko Ito, Daisaku Ashikari, Taro Murata, Tetsuya Fujimura, Kazuhiro Ikeda, Kunuko Horie-Inoue, Satoshi Inoue, Satoru Takahashi: Polyamide targeting transcription of long chain acy-CoA synthetase 3: A novel therapeutic approach for prostate cancer. *29th Annual Congress of the European Association of Urology*, Stockholm, 2014. 4.

大日方大亮, 藤原恭子, 高山賢一, 浦野友彦, 永瀬浩喜, 相馬正義, 井上聡, 高橋悟: 前立腺癌特異的融合遺伝子TMPRSS2-ERGの生成を抑制するピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの開発. 第72回日本癌学会学術総会, 東京, 2013. 10.

Daisuke Obinata, Kyoko Fujiwara, Kenichi Takayama, Tomohiko Urano, Hiroki Nagase, Noboru Fukuda, Masayoshi Soma, Satoshi Inoue, Satoru Takahashi: The efficacy of Pyrrole-imidazole(PI)polyamide targeted to TMPRSS2 and ERG gene fusion for prostate cancer. *The 18th Korea-Japan Cancer Research Workshop*, Gifu, 2013. 11.

Daisuke Obinata, Kenichi Takayama, Kyoko Fujiwara, Noboru Fukuda, Tomohiko Urano, Akiko Ito, Daisaku Ashikari, Taro Myrata, Tetsuya Fujimura, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie-Inoue, Satoshi Inoue, Satoru Takahashi: Polyamide targeting transcription of long chain acy-CoA synthetase 3: A novel therapeutic approach for prostate cancer. *29th Annual Congress of the European Association of Urology*, Stockholm, 2014. 4.

機能形態学系 生体構造医学分野

Matsukawa, M., Katsuyama, N., Imada, M., Aizawa, S. and Sato, T. Changes in the density of activated neurons in the medial part of the bed nucleus of stria terminalis following electrical stimulation in the mice olfactory bulb. *Neurosci. Res.*, 68 Suppl.1: e389, 2010.

Matsukawa, M., Imada, M., Katsuyama, N., Murakami, T., Aizawa, S. and Sato, T. Rose odor conteract the

predator odor induced stress-related activation in the bed nucleus of stria terminalis. *J. Physiol. Sci.*, 61 Suppl. 1: S130, 2011.

Matsukawa, M., Murakami, T., Katsuyama, N., Imada, M., Aizawa, S. and Sato, T. Two distinct mechanisms of odorants which can counteract the predator odor induced stress responses. *The 8th IBRO World Congress of Neuroscience. IBRO*. Florence, Italy, 2011.

Matsukawa, M., Murakami, T., Katsuyama, N., Imada, M., Aizawa, S. and Sato, T. Masking effect of Hinokitiol, a woody odor, on predator odor-induced stress-related activation. *Neurosci. Res.* 71 Suppl:e357., 2011.

松川睦, 今田正人, 相澤信, 佐藤孝明. (2014) 先天的な捕食者臭誘発ストレス反応を生育環境臭が軽減する. 第119回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014. 3.

壺井功: ネオプテリンの造血系に対する作用 第23回 Japan Pteridine Conference, 第17回日本サイトカイン・ネオプテリン研究会 第5回合同研究発表会, 東京, 2009. 8.

原田智紀, 壺井功, 大橋晶子, 大島秀規, 原弘之, 相澤信: マウス骨髄の赤血球造血に対するネオプテリンの効果. 第115回日本解剖学会総会, 盛岡, 2010. 3.

壺井功: 加齢に伴いB細胞造血制御機構は低下する, 日本大学医師会学術奨励賞受賞特別講演, 東京, 2010. 5.

壺井功: 加齢に伴う造血微小環境の機能低下はB細胞造血における抑制的平衡悪循環を引き起こす 第33回基礎老化学会シンポジウム, 名古屋, 2010. 6.

壺井功, 原田智紀, 平林容子, 菅野純, 井上達, 相澤信: SAMP1: 加齢に伴う造血間質細胞の機能低下により炎症時の肥満細胞造血反応は低下する. 第25回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会, 金沢, 2010. 7.

Hirabayashi Y, Tsuboi I, Harada T, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Hatta Y, Takeuchi J, Aizawa S. Effect of neopterin on erythropoiesis in mice. 第72回日本血液学会, 横浜, 2010. 9.

保刈岳雄, 壺井功, 原田智紀, 大島秀規, 相澤信: 造血微小環境による肥満細胞造血の制御機構についての検討. 第499回第471回日大医学会例会, 東京, 2010. 10.

原田智紀, 壺井功, 大島秀規, 原弘之, 井上達, 相澤信: 造血微小環境による肥満細胞造血の制御機構. 第116回日本解剖学会総会, 横浜, 2011. 3.

壺井功, 原田智紀, 平林容子, 菅野純, 井上達, 相澤信: 炎症性貧血の加齢に伴う重症化の機序についての検討. 第26回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会, 岐阜, 2011. 7.

相崎一雄, 原田智紀, 大島秀規, 壺井功, 相澤信: 老化促進モデルマウスを用いた, 炎症性貧血の加齢に伴う重症化の機序についての検討 第506回日大医学会例会, 東京, 2011. 9.

Tsuboi I, Harada T, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S: Age-related change in erythropoietic response to neopterin in senescence accelerated mice 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011,10.

原田智紀, 壺井功, 大島秀規, 原弘之, 井上達, 相澤信: 高分子微粒子担体とMS-5細胞を用いた三次元骨髄培養モデルにおける造血支持能. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 甲府, 2012. 3.

壺井功, 原田智紀, 平林容子, 菅野純, 井上達, 相澤信: 加齢に伴う間質細胞の機能低下により炎症時の赤血球造血抑制は遷延する. 第35回日本基礎老化学会. 千葉, 2012. 7.

壺井功, 原田智紀, 平林容子, 菅野純, 井上達, 相澤信: SAMP1: 加齢に伴う間質細胞の機能低下により炎症時のB細胞造血反応は低下する. 第27回老化促進モデルマウス研究協議会, 東京, 2012. 7.

Harada T, Hokari T, Tsuboi I, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Regulation of mast cell development by hematopoietic microenvironment in mice. 第74回日本血液学会学術集会, 京都, 2012. 10.

壺井功: 造血制御機構の加齢変化 日本大学医学部同窓会学術奨励賞受賞特別講演, 東京, 2012. 10.

原田智紀, 壺井功, 古作和寛, 原弘之井上達, 相澤信: 加齢マウスにおけるストローマ細胞機能低下が肥満細胞造血に与える影響について 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013. 4.

壺井功, 原田智紀, 平林容子, 菅野純, 井上達, 相澤信: SAMP1: 加齢に伴う間質細胞の機能低下により5-FU投与後の肥満細胞造血反応は低下する. 第28回老化促進モデルマウス研究協議会, 名古屋, 2013. 7.

Harada T, Tsuboi I, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Age-related stromal cell impairment reduces mast cell regeneration in mice after myeloablation. *The 75th annual meeting of the Japanese society of hematology*, Sapporo, 2013.

相澤信: 環境因子と造血幹細胞の増殖・分化 大阪大学大学院工学研究科 核酸制御共同研究講座設立記念シンポジウム, 大阪, 2013. 5.

大橋 晶子, 西元 奈穂氏, 相澤 信氏, 長谷川 宏幸氏: テトラヒドロピオプテリン前駆体セピアプテリンの末梢からの投与による芳香族モノアミン神経の活性化. 第17回活性アミンに関するワークショップ, 徳島, 2013. 8.

大橋晶子, 相澤信氏, 長谷川宏幸: セピアプテリン投与による脳内セロトニンの生合成促進と代謝回転の亢進. 日本ビタミン学会第66回大会, 姫路, 2014. 6.

生体機能医学系 生化学分野

石澤通康, 平湯彩子, 池田和正, 槇島誠: ビタミン

D依存性E-cadherin発現誘導に対する亜鉛の抑制効果. 第65回ビタミン学会総会, 東京, 2013. 5.

石原務, 平野展孝, 斎藤義雄, 青木満, 宇野茂之, 槇島誠: Development of polymeric nanoparticles for liver-specific ribavirin delivery. 平成25年度化学系学協会東北大会, 2013. 9.

社会医学系 法医学分野

磯部英二, 谷口由樹, 塚本昭次郎, 内ヶ崎西作: エタノールの小腸吸収に及ぼす腸管運動の影響. 平成25年度日本アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 岡山, 2013. 10.

Uchigasak Si, Tie J, Isobe E, Isahai I, Hasegawa C, Kumazaw T. Forensic study of new storage method of corpses. *8th International Symposium Advances in Legal Medicine*, Frankfurt am Main (Germany), 2011.

生体機能医学系 分子細胞免疫・アレルギー学分野

吉岡美乃, 布村 聡, 岡山吉道, 片岡竜貴, 羅智靖: マスト細胞に発現するFcR β の関わりウマチにおける役割. 第61回アレルギー学会秋季学術大会, 2011. 11.

Mino Yoshioka, Satoshi Nunomura, Tatsuki Kataoka, Yoshimichi Okayama, Chisei Ra: Fc receptor beta-chain deficiency exacerbates arthritis in anti-type II collagen antibody induced-experimental mouse model. 第40回日本免疫学会学術集会, 2011. 11.

大学院総合科学研究科

Ikeda K, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Kobayashi N, Soma M, Matsumoto K. Role of complement 3a in the growth of mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2013 May 28.

博士課程

外科系 循環器外科学専攻

飯田絢子: IABPが冠動脈バイパスグラフト流量波形に及ぼす影響に関する実験的検討.

外科系 整形外科学専攻

木下豪紀：ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞移植と副甲状腺ホルモン投与による治療効果。

NUBIC技術移転

総合医学研究所 医学研究支援部門

藤田順一, 石田和久, 村井一郎：実験動物移動用バッグ。日本大学産官学連携知財センター(NUBIC)
2013. 6.

日本大学医学部総合医学研究所紀要
Bulletin of the Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine

編集委員会

委員長 照井 正
委員 石井敬基, 内山 真, 嶋村政男, 黒田和道, 佐貫榮一, 杉谷雅彦,
平野雄二, 柳島 力, 山本隆充
幹事 井上広一, 烏山芳織, 平井孝政, 藤田順一, 藤原宏樹

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Tadashi TERUI
Associate Editors Yukimoto ISHII, Makoto UCHIYAMA, Masao SHIMAMURA,
Kazumichi KURODA, Eiichi SANUKI, Masahiko SUGITANI,
Yuji HIRANO, Chikara YANAGISHIMA, Takamitsu YAMAMOTO
Managing Editors Koichi INOUE, Yoshiori UYAMA, Takamasa HIRAI,
Jun-ichi FUJITA, Hiroki FUJIHARA

発行者 日本大学医学部総合医学研究所長 照井 正
発行所 日本大学医学部
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1 TEL.03-3972-8111
Publisher Tadashi TERUI
Director, Research Institute of Medical Science,
Nihon University School of Medicine
30-1, Ohyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610 JAPAN
Phone +81-3-3972-8111
