

腎尿酸輸送を促進する乳酸輸送体 SMCT1/2 の 結合タンパク質の解明

安 西 尚 彦¹ 金 井 正 美² 楊 國 昌³
木 村 徹¹ 福 富 俊 之¹

¹ 杏林大学医学部薬理学

² 杏林大学医学部解剖学

³ 杏林大学医学部小児科学

研究目的

ヒト及び霊長類は、尿酸酸化酵素を欠損しているため、尿酸は代謝を受けずに腎臓より排泄される。ヒト腎臓では尿酸再吸収に働く *urate/anion exchanger* の存在により腎尿酸輸送は再吸収優位となり、他の哺乳類と比べ血中尿酸値が高い。そこで尿酸排泄低下は高尿酸血症・痛風の原因となり、尿酸排泄亢進が腎性低尿酸血症の成因となる。研究代表者らは血中尿酸値の決定に関与する尿酸トランスポーター (URAT1) 遺伝子同定に成功し、これが腎尿細管管腔側膜の *urate/anion exchanger* であり、URAT1 遺伝子変異が特発性腎性低尿酸血症の一因となることを報告した (榎本ら *Nature*, 2002)。更に研究代表者らは URAT1 の C 末端配列を利用した酵母 Two-Hybrid 法を行い、細胞内 PDZ 蛋白質の PDZK1 を同定し、PDZK1 が URAT1 C 末端とのタンパク質間相互作用を介し、URAT1 の尿酸輸送活性を増加させることを見出した (安西ら *J.Biol.Chem.*, 2004)。

URAT1 による尿酸輸送は、乳酸やニコチン酸などのモノカルボン酸の細胞内から細胞外に向う外向きの濃度勾配により促進される。乳酸を含むモノカルボン酸を Na⁺ 依存性に尿細管細胞内に取り込む新規トランスポーター SMCT1 (Sodium-dependent monocarboxylate transporter 1) および SMCT2 が最近海外共同研究者の Ganapathy 教授のグループにより同定された (Gopal et al., *J.Biol.Chem.*, 2004; Gopal et al., *Biochim Biophys Acta.*, 2007)。これらの遺伝子群の同定により、腎臓における尿酸輸送分子機能ユニット (尿酸トランスポートソーム) という概念を本研究代表者らは提唱した。現在その全貌

の解明が高尿酸血症・痛風だけでなく、メタボリック・シンドロームにおける高尿酸血症の分子機序の解明につながることが期待されている。

そこで「尿酸トランスポートソーム」全貌解明の端緒として、本研究において研究代表者は URAT1 による腎尿酸輸送を促進する乳酸の輸送体 SMCT1/2 の結合タンパク質の解明を目指す。SMCT1 および SMCT2 C 末端がそれぞれ PDZ モチーフを持つことから、URAT1 と同様に腎近位尿細管管腔側膜で、PDZ タンパク質を介して SMCT1/2 と結合して乳酸輸送活性を変化させ、さらには駆動力である乳酸の細胞内濃度が変化することで URAT1 による尿酸輸送活性が制御される可能性に着目した。その後研究代表者は SMCT1 および SMCT2 の C 末端配列をベイトとし、ヒト腎臓 cDNA library に対して酵母 Two-hybrid スクリーニングを行っても、同様に PDZK1 が両者の結合タンパク質として同定されることを見出した (Anzai ら, *Renal Week* 2006)。同時に SMCT1 には機能が十分に検討されていない PDZRN3 と呼ばれる新規の PDZ タンパク質が、また SMCT2 には Harmonin と呼ばれる別の PDZ タンパク質が結合することを見出している。これを受けて、乳酸を介した「Na⁺ 依存性尿酸輸送分子複合体」の実証を目指し、平成 20 年度の助成期間内に、1) SMCT1/2-PDZK1 結合の解析と URAT1-PDZK1-SMCT1/2 という 3 者複合体形成の検討、2) SMCT1-PDZRN3 結合解析と乳酸輸送活性の変動、についての解明を目指し検討を行った。

研究方法と結果

1. SMCT1/2-PDZK1 結合の解析

1.1. SMCT1/2-PDZK1 相互作用の解明

1.1.1, SMCT1/2 C 末端 PDZ モチーフの PDZK1 結合への意義

SMCT1 C 末端のアミノ酸配列は G-T-R-L であり、また SMCT2 C 末端のアミノ酸配列は T-T-H-F であり、Type I PDZ モチーフに分類される。そこでこの最後の 3 アミノ酸残基の欠損変異体 (d3) と、2 箇所の結合必須アミノ酸のアラニン置換変異体 (SMCT1: T608A, L610A; SMCT2: T616A, F618A) を作成し、PDZK1 全長ブレイベクターとの結合性を酵母 Two-hybrid assay を用いて検討した。

その結果図 1 A で示されたように、C 末端の 3 種の変異体において、PDZK1 との結合が失われたことから、SMCT1/2 と PDZK1 との結合には SMCT C 末端の PDZ モチーフが重要であることが確認された。

1.1.2, PDZK1 単一 PDZ ドメインの SMCT1/2 C 末端との結合 profile の解明

URAT1 では、その C 末端が PDZK1 の 4 つの PDZ ドメインのうち、ドメイン 1, 2, 4 と結合することは既に報告している。本研究では SMCT1/2 C 末端が PDZK1 の 4 つの PDZ ドメインのうちどれと結合するかを明らかにするため、URAT1 での検討の際に用いた PDZK1 の単一の PDZ ドメインだけを持つ vector construct を用いて、酵母 Two-hybrid 法により結合ドメインを特定する。

図 1 B に示すように、SMCT1 と PDZK1 との結合には PDZK1 の第一および第三 PDZ ドメインが、SMCT2 と PDZK1 との結合には PDZK1 の第一、第二および第四 PDZ ドメインが重要であることが確認された。

2. SMCT1/2 遺伝子一過性発現細胞を用いたモノカルボン酸輸送に与える PDZK1 効果の検討

SMCT1/2-PDZK1 結合のモノカルボン酸輸送に対する影響を解明する。

図 1 C および D に示すように、URAT1 の際には認められた PDZK1 による輸送活性増加効果は、SMCT1 において認められ、SMCT2 では認められなかった。

3. PDZRN3 と SMCT1 とのタンパク質間相互作用の解析

3.1, SMCT1-PDZRN3 相互作用の解明

3.1.1, SMCT1 C 末端 PDZ モチーフの PDZRN3 結合への意義

1.1.1 と同様に、SMCT1 C 末端の 3 つの変異体と、PDZRN3 全長ブレイベクターとの結合性を酵母 Two-hybrid assay を用いて検討した。

図 2 A で示されたように、C 末端の 3 種の変異体において、PDZRN3 との結合が失われたことから、SMCT1 と PDZRN3 との結合には SMCT C 末端の PDZ モチーフが重要であることが確認された。

3.1.2, PDZRN3 単一 PDZ ドメインの SMCT1 C 末端との結合 profile の解明

本研究では SMCT1 C 末端が PDZRN3 の 2 つの PDZ

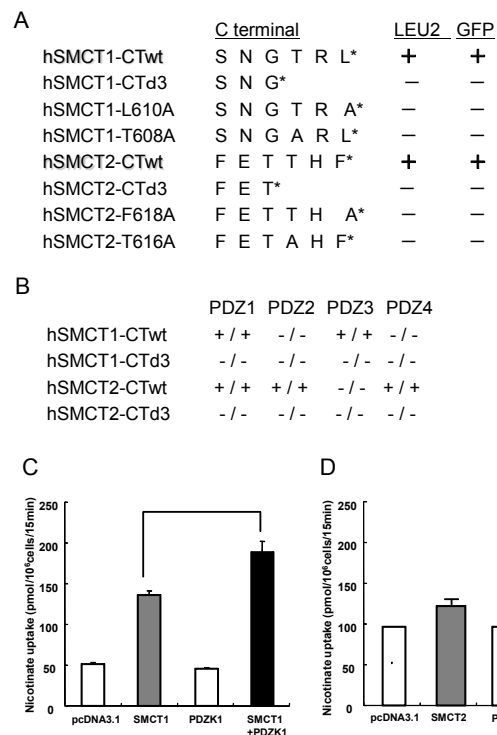


図 1

ドメインのうちどれと結合するかを明らかにするため、新たに PDZRN3 の単一の PDZ ドメインだけを持つ vector construct を用いて、酵母 Two-hybrid 法により結合ドメインを特定した。

図 2 B に示すように、SMCT1 と PDZRN3 との結合にはその第一 PDZ ドメインが重要であることが確認された。

4. SMCT1 遺伝子一過性発現細胞を用いたモノカルボン酸輸送に与える PDZRN3 効果の検討

SMCT1-PDZRN3 結合のモノカルボン酸輸送に対する影響を解明する。

図 2 C に示すように、PDZRN3 による SMCT1 輸送活性増加効果は認められなかった。

考察

SMCT1/2-PDZK1 結合は、SMCT1/2 C 末端の PDZ モチーフと、PDZK1 のいくつかの PDZ ドメインが重要であった (図 1 A,B および図 2 A,B) が、特に SMCT1 と PDZK1 第三 PDZ ドメインとの結合は、URAT1 との物理的リンクを考える上で重要である。すなわち URAT1 では、その C 末端が PDZK1 の 4 つの PDZ ドメインのうち、ドメイン 1, 2, 4 と結合することを既に報告しているが、第三ドメインでの URAT1 の結合は生じない。すなわちこの空席の第三ドメインを SMCT1 が占めることで、URAT1-PDZK1-SMCT1 という 3 者複合体が理論上可能となると言える。

URAT1 と PDZK1 の HEK293 細胞への遺伝子共発現

A

	C terminal	LEU2	GFP
hSMCT1-CTwt	S N G T R L*	+	+
hSMCT1-CTd3	S N G*	—	—
hSMCT1-L610A	S N G T R A*	—	—
hSMCT1-T608A	S N G A R L*	—	—

B

	PDZ1	PDZ2
hSMCT1-CTwt	+/+	-/-
hSMCT1-CTd3	-/-	-/-

C

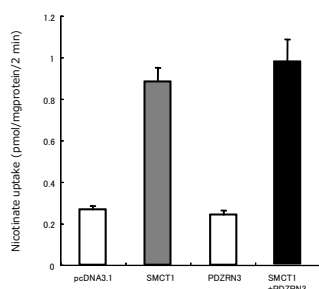


図 2

により, URAT1 の尿酸輸送活性が約 1.4 倍に増加した。そこで, 3 者複合体形成時の解析の第一段階として, 今回は SMCT と PDZK1 の HEK293 細胞への共導入を行った。しかし図 1 C,D に示すように, SMCT1/2 輸送活性の増加効果は認められなかった。

SMCT1-PDZRN3 結合は, SMCT1 C 末端の PDZ モチーフと, PDZRN3 の第一 PDZ ドメインが重要であった (図 2 A, B)。興味深いことに, PDZRN3 は 3 者複合体 URAT1-PDZK1-SMCT1 を形成し, 尿酸輸送の中心分子である URAT1 とは結合しない (data not shown)。これは, 3 者複合体との関連および PDZRN3 の生理的役割を考える上で重要で, URAT1-PDZK1-SMCT1 という 3 者複合体が担う「Na⁺ 依存性尿酸輸送機構」は, 尿酸輸送を担う責任分子の URAT1 にダイレクトに PDZ 相互作用が及ぼされる訳ではなく, その調節因子となる尿酸輸送のレベルで制御を受ける可能性を示唆する。すなわち, PDZRN3 が SMCT1 C 末端との結合を PDZK1 と競合する中で, PDZK1 との結合がはずれ PDZRN3 と結合すると, 細胞内への内在化が起り, 細胞膜上に発現する SMCT1 量が減少し, 引いてはそれが担っていた尿酸輸送が減少する事で, 駆動力の低下から尿酸輸送も低下するのではないかと推察される。それを考慮に入れると, SMCT1 と PDZRN3 の結合が, SMCT1 の輸送活性自体に影響しないとしても何ら驚く事にはならない。さらに PDZRN3 と結合した SMCT1 はユビキチン化を受けて分解されるか, あるいは核内に移行して, 何らかの遺伝子の転写調節に関与することも考えられる。

(論文投稿準備中)

List of publications

- Morimoto E, Kanai Y, Kim do K, Chairoungdua A, Choi HW, Wempe MF, Anzai N, Endou H. Establishment and characterization of mammalian cell lines stably expressing human L-type amino acid transporters. *J Pharmacol Sci.* 108: 505-516, 2008.
- Tachibana K, Anzai N, Ueda C, Katayama T, Yamasaki D, Kirino T, Takahashi R, Ishimoto K, Komori H, Tanaka T, Hamakubo T, Ueda Y, Arai H, Sakai J, Kodama T, Doi T. Regulation of the human PDZK1 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *FEBS Lett.* 582: 3884-3888, 2008.
- Anzai N, Ichida K, Jutabha P, Kimura T, Babu E, Jin CJ, Srivastava S, Kitamura K, Hisatome I, Endou H, Sakurai H. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter uratl1 (slc2a9) in humans. *J Biol Chem.* 283: 26834-26838, 2008.
- Endou H, Anzai N. Urate transport across the apical membrane of renal proximal tubules. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 27: 578-584, 2008.
- Torres AM, Anzai N, Endou H. Renal organic anion transporters: Knowledge from animal models. *Curr Topics Pharmacol.* 12: 45-50, 2008.
- Yokoyama H, Anzai N, Ljubojevic M, Ohtsu N, Sakata T, Miyazaki H, Nonoguchi H, Islam R, Onozato M, Tojo A, Tomita K, Kanai Y, Igarashi T, Sabolic I, Endou H. Functional and immunochemical characterization of a novel organic anion transporter Oat8 (Slc22a9) in rat renal collecting duct. *Cell Physiol Biochem.* 21: 269-278, 2008.
- Nakagawa H, Hirata T, Terada T, Jutabha P, Miura D, Harada KH, Inoue K, Anzai N, Endou H, Inui K, Kanai Y, Koizumi A. Roles of organic anion transporters in the renal excretion of perfluorooctanoic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 103: 1-8, 2008.
- Islam R, Anzai N, Ahmed N, Ellapan B, Jin CJ, Srivastava S, Miura D, Fukutomi T, Kanai Y, Endou H. Mouse organic anion transporter 2 (mOat2) mediates the transport of short chain fatty acid propionate. *J Pharmacol Sci.* 106: 525-528, 2008.
- Tachampa K, Takeda M, Khamdang S, Noshiro-Kofuji R, Tsuda M, Jariyawat S, Fukutomi T, Sophasan S, Anzai N, Endou H. Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins. *J Pharmacol Sci.* 106: 435-443, 2008.
- Giusto GD, Anzai N, Endou H, Torres AM. Elimination of organic anions in response to an early stage of renal ischemia-reperfusion in the rat. Role of basolateral plasma membrane transporters and cortical renal blood flow. *Pharmacology.* 81: 127-136, 2008.
- Minami S, Ito K, Honma M, Ikebuchi Y, Anzai N, Kanai Y, Nishida T, Tsukita S, Sekine S, Horie T, Suzuki H. Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 296: G406-G413, 2009.
- Di Giusto G, Anzai N, Endou H, Torres AM. Oat5 and NaDC1 Protein Abundances in Kidney and Urine Following Renal Ischemic Reperfusion Injury. *J Histochem Cytochem.* 57: 17-27, 2009.
- Yamauchi K, Sakurai H, Kimura T, Wiriyaesermkul P, Nagamori S, Kanai Y, Kohno N. System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Cancer*

Lett. 276: 95-101, 2009.

- 14) 安西尚彦, 三浦大作, 遠藤 仁: 有機アニオントランスポーター OAT4 によるオロト酸輸送, 痛風と核酸代謝, 32: 141-146, 2008
- 15) 安西尚彦, 加国雅和, 大房 健, 遠藤 仁: ヒト肝細胞キメラマウスにおける血中ヒトアルブミン値と血清尿酸値の相関性, 痛風と核酸代謝, 32: 13-18, 2008
- 16) 安西尚彦: 特集: 腎構成細胞の細胞学的特性 — 新しい知見を含めて — 腎尿細管細胞の細胞特性 II, 日本腎臓学会誌, 50: 566-569, 2008
- 17) 安西尚彦: 特集: 水電解質と輸液 膜輸送蛋白質 Up-to-Date, 日本腎臓学会誌, 50: 110-113, 2008
- 18) 安西尚彦: 特集「痛風・高尿酸血症のすべて」腎の尿酸輸送とトランスポーター, 腎と透析, 64: 469-476, 2008
- 19) 安西尚彦, 遠藤 仁: 連載「腎臓の有機溶質・薬物トランスポーター」第 3 回, スクレオシドトランスポーター SLC28, SLC29 / ペプチドトランスポーター SLC15, 高尿酸血症と痛風, 16: 164-167, 2008
- 20) 安西尚彦, 遠藤 仁: 連載「腎臓の有機溶質・薬物トランスポーター」第 2 回, 尿酸トランスポーター URAT1 有機イオントランスポーター SLC22, 高尿酸血症と痛風, 16: 62-66, 2008

講演記録

- 1) Anzai N, Shin H, Miyao K, Endou H (ポスター): Interaction of the multivalent PDZ domain protein PDZK1 with novel liver-specific organic anion transporter 7, *Experimental Biology* 2008, San Diego, 平成 20 年 4 月 8 日
- 2) Srivastava S, Anzai N, Yamanishi A, Ganapathy V, Endou H (ポスター): Identification of the multivalent PDZ domain protein PDZK1 as a binding partner of sodium-coupled monocarboxylate cotransporter 2 by yeast two-hybrid assay, *Experimental Biology* 2008, San Diego, 平成 20 年 4 月 8 日
- 3) 安西尚彦: ヒト有機酸トランスポーター OAT7 とマルチバレント PDZ タンパク質 PDZK1 の相互作用 (ポスター), 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 青森, 平成 20 年 5 月 17 日
- 4) 佐藤正延^{1,2)}, 俣田秀章^{1,2)}, 富士剛純^{1,2)}, Yan Li³⁾, 白坂善之^{1,2)}, 安西尚彦, 玉井郁巳^{1,2)} (¹⁾金沢大学院・薬, ²⁾東京理大・薬): 尿酸調節における OAT2 の役割, 第 23 回日本薬剤学会年会, 札幌, 平成 20 年 5 月 20 日 -22 日
- 5) 山道寛子¹⁾, 伊藤晃成¹⁾, 高田龍平¹⁾, 安西尚彦, 金井好克²⁾, 鈴木洋史¹⁾ (¹⁾東大病院薬剤部, ²⁾阪大院・医・生体システム薬理学): 脱ユビキチン化酵素 USP14 による BSEP の翻訳後調節機構の解析, 第 23 回日本薬剤学会年会, 札幌, 平成 20 年 5 月 20 日 -22 日
- 6) 池淵祐樹¹⁾, 高田龍平¹⁾, 伊藤晃成¹⁾, 吉門崇¹⁾, 安西尚彦, 金井好克²⁾, 鈴木洋史¹⁾ (¹⁾東大病院薬剤部, ²⁾阪大院・医・生体システム薬理学): MDR3/ABCB4 の共役因子 RACK1 による発現制御, 第 23 回日本薬剤学会年会, 札幌, 平成 20 年 5 月 20 日 -22 日
- 7) 安西尚彦: 腎尿酸輸送の分子機序: 最近の話題, 福岡大学医学部研究推進部主催研究会, 福岡, 平成 20 年 5 月 29 日
- 8) 安西尚彦, 小藤理絵, 宮崎博喜, 寺田智祐¹⁾, 福富俊之, 木村 徹, 金井好克, 乾 賢一¹⁾, 遠藤 仁 (¹⁾京都大学病院薬剤部) (ポスター): SUMO 化結合酵素 Ubc9 とヒトペプチドトランスポーター PEPT2 との結合の解析, 第 51 回日本腎臓学会学術総会, 福岡, 平成 20 年 5 月 31 日
- 9) 安西尚彦, 小藤理絵, 宮崎博喜, 福富俊之, 木村 徹, 櫻井裕之, 遠藤 仁 (ポスター): Yeast Two-hybrid 法を用いたヒトペプチドトランスポーター PEPT1 結合蛋白質の同定, 第 51 回日本腎臓学会学術総会, 福岡, 平成

20 年 5 月 31 日

- 10) 安西尚彦: ヒト有機酸トランスポーター OAT7 (OAT7) とマルチバレント PDZ タンパク質 PDZK1 の相互作用, 第 44 回日本肝臓学会学術総会, 松山, 平成 20 年 6 月 6 日
- 11) 福富俊之, 安西尚彦, Ho Jung Shin, 宮尾和洋, 遠藤 仁, 金井好克, 櫻井裕之: ヒト有機酸トランスポーター OAT7 (OAT7) とマルチバレント PDZ タンパク質 PDZK1 の相互作用, 第 3 回トランスポーター研究会年会 ワークショップ 1, 京都, 平成 20 年 6 月 7 日
- 12) 橘 敏祐¹⁾, 安西尚彦, 稲田大彦¹⁾, 山崎大典¹⁾, 石本憲司¹⁾, 田中十志也²⁾, 酒井寿郎²⁾, 児玉龍彦²⁾, 土井健史¹⁾ (¹⁾大阪大学大学院薬学研究科, ²⁾東京大学先端科学技術研究融合教育センター): 薬物トランスポーターと腎障害: 最近の話題, 第 3 回トランスポーター研究会年会 シンポジウム, 京都, 平成 20 年 6 月 8 日
- 13) 安西尚彦, Sophapun Ekaratanawong, 中田隆博¹⁾, 福富俊之, 宮尾和洋, 小林 靖¹⁾, 遠藤 仁 (¹⁾防衛医大・解剖第二): 酵母 Two-hybrid 法を用いたカルニチントランスポーター CT1 のラット脳における結合タンパク質の同定, 日本ビタミン学会第 60 回大会, 仙台, 平成 20 年 6 月 14 日
- 14) 安西尚彦, Suparat Khamdang, Sunena Srivastava, 金井好克, 遠藤 仁: ヒト有機アニオントランスポーターと造影剤 Iodipamide の相互作用, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京, 平成 20 年 6 月 27 日
- 15) 波多野亮¹⁾, 平田 拓, 安西尚彦, 松原光伸²⁾, 武藤重明³⁾, 永森收志¹⁾, 遠藤 仁, 金井好克¹⁾ (¹⁾大阪大学大学院医学系研究科, ²⁾東北大学大学院医学系研究科, ³⁾自治医科大学医学部腎臓内科): 新規腎特異的プロスタグランジン輸送体 OAT-PG の同定と生理機能の検討, 生理学研究所研究会「上皮膜輸送制御の分子機構: 体内環境恒常性維持機構解明を目指して」, 岡崎, 平成 20 年 7 月 16 日
- 16) 安西尚彦: ヒト腎臓の経細胞性尿酸輸送分子機序: 新規尿酸トランスポーター分子 URATv1, 生理学研究所研究会「上皮膜輸送制御の分子機構: 体内環境恒常性維持機構解明を目指して」, 岡崎, 平成 20 年 7 月 17 日
- 17) 山道寛子¹⁾, 伊藤晃成¹⁾, 高田龍平¹⁾, 安西尚彦, 金井好克²⁾, 鈴木洋史¹⁾ (¹⁾東大病院薬剤部, ²⁾阪大院・医・生体システム薬理学): BSEP 相互作用因子としての脱ユビキチン化酵素の同定, 第 5 回東日本胆汁酸研究会, 東京, 平成 20 年 7 月 19 日
- 18) Matsuo H¹⁾, Anzai N, Chiba T¹⁾, Ichida K²⁾, Kimura T, Nakayama A¹⁾, Nakanishi K¹⁾, Domoto H³⁾, Kikuchi Y³⁾, Hisatome I⁴⁾, Oda T³⁾, Nishiyama J³⁾, Endou H, Sakurai H, Shinomiya N¹⁾. (¹⁾防衛医大・生体制御, ²⁾東京薬科大・病態生理, ³⁾防衛医大・腎臓内科, ⁴⁾鳥取大学大学院医学研究科) (ポスター): Renal hypouricemia caused by mutations in a renal urate transporter GLUT9 encoded by SLC2A9. Gordon Research Conference Membrane Transport Protein, Il Ciocco, Italy, 平成 20 年 7 月 20-25 日
- 19) 安西尚彦, 木村 徹: 新たな PDZ 蛋白質と Na⁺ 依存性乳酸輸送体 SMCTs の結合による腎尿酸輸送への影響, 財団法人ソルトサイエンス研究財団, 第 20 回平成 17 年度助成研究発表会, 東京, 平成 20 年 7 月 29 日
- 20) Anzai N, Jin CJ, Ichida K¹⁾, Kimura T, Jutabha P, Babu E, Srivastava S, Endou H, Sakurai H. (¹⁾東京薬科大・病態生理) (ポスター): Functional characterization of SLC2A9 as a renal basolateral voltage-driven urate transporter 1 (URATv1). *Transporters* 2008, Murten, Switzerland, 平成 20 年 8 月 27-30 日
- 21) Matsuo H¹⁾, Anzai N, Chiba T¹⁾, Ichida K²⁾, Kimura T, Nakayama A¹⁾, Nakanishi K¹⁾, Domoto H³⁾, Kikuchi Y³⁾, Hisatome I⁴⁾, Oda T³⁾, Nishiyama J³⁾, Endou H, Sakurai H,

- Shinomiya N¹. (¹ 防衛医大・生体制御, ² 東京薬科大・病態生理, ³ 防衛医大・腎臓内科, ⁴ 鳥取大学大学院医学研究科): Renal hypouricemia caused by mutations in a renal urate transporter GLUT9/SLC2A9. Transporters 2008, Murten, Switzerland, 平成 20 年 8 月 27-30 日
- 22) 安西尚彦, 松尾洋孝¹, 市田公美², 千葉俊周¹, 木村 徹, 金 春姫, 中山昌喜¹, 堂本英治³, 菊池勇一⁴, 中西和子¹, Promsuk Jutabha⁵, 北村健一郎⁶, 久留一郎⁷, 尾田高史⁴, 西山純一郎⁸, 内田俊也⁹, 四ノ宮成祥¹, 遠藤 仁, 櫻井裕之(¹ 防衛医大・生体制御, ² 東京薬科大・病態生理, ³ 自衛隊呉病院, ⁴ 防衛医大腎臓内科, ⁵ (株) 富士バイオメディックス, ⁶ 熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科, ⁷ 鳥取大学大学院医学系研究科再生医療学, ⁸ 自衛隊横須賀病院, ⁹ 帝京大学医学部内科): ヒト腎臓尿酸輸送の分子機構: 血管側への尿酸排出トランスポーター URATv1 の同定, 第 14 回分子腎臓研究会, 東京, 平成 20 年 9 月 6 日
- 23) 安西尚彦: ヒト腎臓尿酸輸送機構: 経細胞性輸送を担う尿酸トランスポーター, 富山大学薬学部薬物生理学研究室特別セミナー, 富山, 平成 20 年 9 月 11 日
- 24) 安西尚彦: 新規尿酸トランスポーター URATv1 と血清尿酸値異常, 金沢大学大学院自然科学研究科 膜輸送体研究会 2008 特別セミナー, 金沢, 平成 20 年 9 月 12 日
- 25) 安西尚彦, 市田公美¹, 木村 徹, 北村健一郎², 久留一郎³, 遠藤 仁, 櫻井裕之(¹ 東薬大・病態生理, ² 熊本大院・腎臓内科, ³ 鳥取大院・再生医療) (ポスター): 新規尿酸トランスポーター URATv1 (SLC2A9) の機能解析と腎性低尿酸血症, 文科省科研費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 20 年度第 1 回班会議, 淡路島, 平成 20 年 9 月 23-25 日
- 26) 木村 徹, Yuewei Li¹, 金井正美², 安西尚彦, 川上速人², 櫻井裕之, 金井好克¹ (¹ 大阪大院・医・生体システム薬理学, ² 杏林大・医・解剖) (ポスター): アミノ酸トランスポーター CAT5 の機能とカベオリンによる調節, 文科省科研費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 20 年度第 1 回班会議, 淡路島, 平成 20 年 9 月 23-25 日
- 27) 金井好克¹, 永森收志¹, 木村 徹, 田中秀和¹, 安西尚彦, 平田 拓, 福富俊之(¹ 大阪大院・医・生体システム薬理学) (ポスター): 有機溶質トランスポートソーム: その構築と機能的意義, 文科省科研費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 20 年度第 1 回班会議, 淡路島, 平成 20 年 9 月 24-26 日
- 28) 安西尚彦, 金 春姫, 市田公美¹, 木村 徹, Jutabha Promsuk², Babu Ellappan, 遠藤 仁, 櫻井裕之(¹ 東薬大・病態生理, ² (株) 富士バイオメディックス) (ポスター): SLC2A9 遺伝子産物は, 腎尿細管基底側膜の電位依存性尿酸トランスポーター URATv1 である, 日本人類遺伝学会第 53 回大会, 東京, 平成 20 年 9 月 28 日
- 29) 木村 徹, Yuewei Li¹, 金井正美², 安西尚彦, 川上速人², 櫻井裕之, 金井好克¹ (¹ 大阪大院・医・生体システム薬理学, ² 杏林大・医・解剖): アミノ酸トランスポーター CAT5 の機能解析, 第 119 回日本薬理学会関東部会, 東京, 平成 20 年 10 月 4 日
- 30) 金 春姫, 安西尚彦, 何 新¹, 木村 徹, 福富俊之, 酒井啓治², 岩下光利², 遠藤 仁, 櫻井裕之(¹ 天津中医薬大・中薬, ² 杏林大・医・産婦人科): ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞における L 型アミノ酸輸送特性の検討, 第 119 回日本薬理学会関東部会, 東京, 平成 20 年 10 月 4 日
- 31) 安西尚彦: Na⁺ 依存性中性アミノ酸トランスポーター B0AT1 (SLC6A19) の結合タンパク質の同定, 第 16 回日本消化器病関連学会週間 JDDW2008 ワークショップ W20: 栄養素吸収輸送システムに関する研究の進歩, 東京, 平成 20 年 10 月 4 日
- 32) 安西尚彦, 遠藤 仁: 腎尿酸トランスポーターと血清尿酸値異常, 第 23 回日本薬物動態学会年会 シンポジウム 1: 腎におけるトランスポーター・チャネル研究の基礎と臨床, 熊本, 平成 20 年 10 月 30 日
- 33) 金 春姫, 安西尚彦, 何 新¹, 木村 徹, 福富俊之, 櫻井裕之(¹ 天津中医薬大・中薬) (ポスター): ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞における L 型アミノ酸輸送特性, トランスポーターワークショップ IN 福岡, 福岡, 平成 20 年 11 月 2 日
- 34) 木村 徹, 安西尚彦, Jutabha Promsuk, Babu Ellappan, 市田公美¹, 北村健一郎², 久留一郎³, 遠藤 仁, 櫻井裕之(¹ 東京薬科大・病態生理, ² 熊本大院・腎臓内科, ³ 鳥取大院・再生医療) (ポスター): 新規尿酸トランスポーター URATv1 (SLC2A9) の機能解析と腎性低尿酸血症, トランスポーターワークショップ IN 福岡, 福岡, 平成 20 年 11 月 2 日
- 35) Kim S¹, Lee CH¹, Kang CM¹, Anzai N, Endou H, Kim G-H¹ (¹ Department of Internal Medicine, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea) (ポスター): Effect of Losartan Administration on Urate Transporters in Rat Kidney. American Society of Nephrology Renal Week 2008, Philadelphia, 平成 20 年 11 月 7 日
- 36) Jin CJ, Anzai N, Babu E, Fukutomi T, Srivastava S, Endou H, Sakurai H (ポスター): Functional characterization of SLC2A9 as a renal basolateral voltage-driven urate transporter 1 (URATv1): II. Interaction with uricosuric agents. American Society of Nephrology Renal Week 2008, Philadelphia, 平成 20 年 11 月 7 日
- 37) Anzai N, Jin CJ, Ichida K¹, Kimura T, Jutabha P, Endou H, Sakurai H (¹ 東京薬科大・病態生理) (ポスター): The Expression of Organic Anion Transporter Oat5 in Rat Kidneys is Gender-dependent. American Society of Nephrology Renal Week 2008, Philadelphia, 平成 20 年 11 月 7 日
- 38) 福富俊之, 安西尚彦, 木村 徹, 櫻井裕之 (ポスター): 尿酸トランスポーター URAT1 と PDZ ドメインタンパク質 PDZK1 との相互作用のリン酸化による動的制御の可能性, トランスポーターワークショップ IN 鶴岡, 鶴岡, 平成 20 年 11 月 15 日
- 39) 塚田 愛, 安西尚彦, 三浦大作, 何 新, 遠藤 仁 (ポスター): ヒト尿酸トランスポーター URAT1 によるオロ酸輸送, トランスポーターワークショップ IN 鶴岡, 鶴岡, 平成 20 年 11 月 15 日
- 40) Srivastava Sunena, 安西尚彦, 市田公美¹, Jutabha Promsuk, 木村 徹, 宮尾和洋, 土岐昭依, 遠藤 仁, 櫻井裕之(¹ 東京薬科大・病態生理) (ポスター): ヒト血清尿酸値を直接制御する電位依存性尿酸排出トランスポーター URATv1 (SLC2A9), トランスポーターワークショップ IN 鶴岡, 鶴岡, 平成 20 年 11 月 15 日
- 41) 金 春姫, 安西尚彦, 木村 徹, 福富俊之, 酒井啓治¹, 岩下光利¹, 櫻井裕之(¹ 医・産婦人科): ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞ににおける L 型アミノ酸輸送特性, 第 37 回杏林医学会総会, 三鷹, 平成 20 年 11 月 15 日
- 42) 木村 徹, 金井正美¹, 川上速人¹, 金井好克, 安西尚彦, 櫻井裕之(¹ 医・解剖): アミノ酸トランスポーター CAT5 のクローニングとカベオリンによる機能調節, 第 37 回杏林医学会総会, 三鷹, 平成 20 年 11 月 15 日
- 43) 安西尚彦, 金井正美¹, 楊 國昌², 木村 徹, 福富俊之(¹ 医・解剖, ² 医・小児科): 腎尿酸輸送を促進する乳酸

- 輸送体 SMCT1/2 の結合タンパク質の解明, 第 37 回杏林医学会総会平成 20 年度杏林大学医学部共同研究プロジェクト中間報告, 三鷹, 平成 20 年 11 月 15 日
- 44) 安西尚彦: ヒト有機酸トランスポーター 4 (hOAT4) は低親和性のパラアミノ馬尿酸 (PAH) トランスポーターである, 第 17 回杏林医学会賞記念講演, 三鷹, 平成 20 年 11 月 15 日
- 45) 安西尚彦: 臨床の疑問から始まる基礎研究の進展～新規尿酸トランスポーター URATv1 同定を例に～, Young Research Forum, 福岡, 平成 20 年 11 月 19 日
- 46) 安西尚彦, 木村 徹, 福富俊之, 小藤理絵, 何 新¹, 櫻井裕之, 遠藤 仁 (¹ 天津中医薬大・中薬) (ポスター): 痛風患者から同定された腎臓尿酸トランスポーター URAT1 (SLC22A12) 遺伝子変異における尿酸輸送活性の解析, 第 6 回日本予防医学会学術総会, 新宿, 平成 20 年 11 月 30 日
- 47) 安西尚彦, 市田公美¹, Jutabha Promsuk, 木村 徹, Babu Ellappan, 金 春姫, Srivastava Sunena, 北村健一郎, 久留一郎, 遠藤 仁, 櫻井裕之 (¹ 東京薬科大・病態生理, ² 熊本大院・腎臓内科, ³ 鳥取大院・再生医療学): 新規尿酸トランスポーター URATv1 (SLC2A9) の輸送特性と腎性低尿酸血症に見られた遺伝子変異, 第 29 回日本臨床薬理学会年会, 新宿, 平成 20 年 12 月 4 日
- 48) Srivastava S, Anzai N, Ichida K¹, Jutabha P, Kimura T, Endou H, Sakurai H (¹ 東京薬科大・病態生理) (ポスター): Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter, URATv1 (SLC2A9), in humans. トランスポーター研究会第二回関東部会, 文京区, 平成 20 年 12 月 6 日
- 49) 山道寛子¹, 伊藤晃成¹, 高田龍平¹, 安西尚彦, 金井好克², 鈴木洋史¹ (¹ 東大病院薬剤部, ² 阪大院・医・生体システム薬理学) (ポスター): BSEP/ABCB11 の細胞内局在制御に関わる相互作用因子の同定, トランスポーター研究会第二回関東部会, 文京区, 平成 20 年 12 月 6 日
- 50) 金 春姫, 安西尚彦, 何 新¹, 木村 徹, 福富俊之, 櫻井裕之 (¹ 天津中医薬大・中薬): ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞に見られる L 型アミノ酸輸送特性, トランスポーター研究会第二回関東部会, 文京区, 平成 20 年 12 月 6 日
- 51) 池淵祐樹¹, 高田龍平¹, 伊藤晃成¹, 吉門崇¹, 安西尚彦, 金井好克², 鈴木洋史¹ (¹ 東大病院薬剤部, ² 阪大院・医・生体システム薬理): MDR3/ABCB4 相互作用蛋白質の同定と機能解析, トランスポーター研究会第二回関東部会, 文京区, 平成 20 年 12 月 6 日
- 52) 塚田 愛, 安西尚彦, 三浦大作, 何 新¹, 櫻井裕之, 遠藤 仁 (¹ 天津中医薬大・中薬): ヒト尿酸トランスポーター URAT1 によるオロト酸輸送, トランスポーター研究会第二回関東部会, 文京区, 平成 20 年 12 月 6 日
- 53) Anzai N, Ichida K¹, Jutabha P, Kimura T, Babu E, Jin CJ, Srivastava S, Endou H, Sakurai H (¹ 東京薬科大・病態生理): Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter, URATv1 (SLC2A9), in humans. BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 平成 20 年 12 月 10 日
- 54) Kimura T, Kanai-Azuma M¹, Li Y², Anzai N, Kawakami H¹, Endou H, Sakurai H, Kanai Y² (1 杏林大・医・解剖, 2 大阪大院・医・生体システム薬理学) (ポスター): Cloning and Characterization of Cationic Amino Acid Transporter 5. 48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, 2008.12.16
- 55) 安西尚彦: The current progress of renal urate transport. Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Special Seminar, Bangkok, 平成 21 年 1 月 8 日
- 56) 佐藤正延¹, Li-Tain Yeh², 安西尚彦, 玉井郁巳¹ (¹ 金沢大学医薬保健研究・薬学系, ² 金 Andrea Bioscience Inc., San Diego): 新規非核酸逆転写酵素阻害薬 RDEA806 による尿酸値低下作用機構, 第 42 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 新宿, 平成 21 年 2 月 20 日
- 57) 安西尚彦, 市田公美¹, 木村 徹, 北村健一郎², 久留一郎³, 遠藤 仁, 櫻井裕之 (¹ 東京薬科大・病態生理, ² 熊本大院・腎臓内科, ³ 鳥取大院・再生医療学): 新規尿酸トランスポーター URATv1 (SLC2A9) 遺伝子変異と腎性低尿酸血症, 第 42 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 新宿, 平成 21 年 2 月 20 日
- 58) 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 木村 徹, 遠藤 仁, 櫻井裕之: 新規尿酸排出トランスポーター URATv1 の尿酸輸送特性の解析, 第 42 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 新宿, 平成 21 年 2 月 20 日
- 59) 大房 健¹, 山縣 彰¹, 加国雅和², 安西尚彦 (¹ 東環環境科学株式会社プロフェニックス, ² 株式会社フェニックスバイオ): 高尿酸血症を示すヒト肝細胞キメラマウス腎臓のプロテオーム解析, 第 42 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 新宿, 平成 21 年 2 月 20 日
- 60) 浦野和子¹, 谷口敦夫¹, 関田千恵子¹, 安西尚彦, 遠藤 仁, 鎌谷直之¹, 山中 寿¹, (¹ 東京女子医科大・膠原病リウマチ痛風センター): GLUT9 遺伝子多型と痛風発症の関連に関する検討, 第 42 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 新宿, 平成 21 年 2 月 21 日
- 61) 安西尚彦, 金 春姫, Promsuk Jutabha, Ellappan Babu, Sunena Srivastava, 福富俊之, 遠藤 仁, 櫻井裕之: 新規尿酸排出トランスポーター URATv1 (SLC2A9) の輸送特性: 尿酸降下薬との相互作用, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 平成 21 年 3 月 16 日
- 62) Sunena Srivastava, 安西尚彦, 宮内正二¹, 三浦大作², 福富俊之, Vadivel Ganapathy³, 金井好克, 櫻井裕之 (¹ 松山大・薬・薬理学, ² 兵庫医療大・薬・医療薬学, ³ Georgia 医科大学・生化学): 酵母 Two-hybrid 法による Na⁺ 共役モノカルボン酸トランスポーター SMCT1/2 結合タンパク質 PDZK1 の同定, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 平成 21 年 3 月 16 日
- 63) 三浦大作¹, 安西尚彦, 塚田 愛, 木村 徹, 福富俊之, 清宮健一¹, 櫻井裕之, 遠藤 仁 (¹ 兵庫医療大・薬・医療薬学) (ポスター): ヒト尿酸トランスポーター URAT1 はオロト酸を輸送する, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 平成 21 年 3 月 16 日
- 64) 木村 徹, 安西尚彦, 市田公美¹, Promsuk Jutabha, 北村健一郎², 久留一郎³, 遠藤 仁, 櫻井裕之 (¹ 東京薬科大・病態生理, ² 熊本大院・腎臓内科, ³ 鳥取大院・再生医療): 新規尿酸排出トランスポーター URATv1 (SLC2A9) の分子同定と腎性低尿酸血症, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 平成 21 年 3 月 17 日
- 65) 金 春姫, 安西尚彦, 何 新¹, 酒井啓治², 岩下光利², 遠藤 仁, 櫻井裕之 (¹ 天津中医薬大・中薬, ² 医・産婦人科): ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞に見られる L 型アミノ酸輸送特性, 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 平成 21 年 3 月 18 日
- 66) 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 木村 徹, 福富俊之, 櫻井裕之: 高尿酸血症と腎尿酸トランスポーター, 日本薬学会第 129 回年会シンポジウム S17 「トランスポーター研究のパラダイムシフト: 薬物輸送体から薬物標的へ」, 京都, 平成 21 年 3 月 25 日
- 67) 安西尚彦: 尿酸値低下に及ぼす尿酸トランスポーターの役割, 第 7 回村田フォーラム, 武蔵野, 平成 21 年 3 月 30 日

脊髄内の感覚運動機能統合と障害時の機能回復の解析

大 木 紫¹ 八 木 淳 一¹ 高 橋 雅 人²
渋谷 賢¹ 里 見 和 彦²

¹杏林大学医学部統合生理学

²杏林大学医学部整形外科

緒言

我々はこれまで頸髄症患者と動物実験で、脊髄内神経伝導障害時の運動障害とその後の機能回復について解析を行ってきた。その結果、錐体路から運動ニューロンへ直接シナプス結合する直接経路が伝導障害を起こしていても介在ニューロンを介した間接経路を使った運動機能回復が起こること、このことは上肢近位筋のみならず手指筋でも起こることを動物実験で観察してきた。このような機能回復は、脊髄内および脳内の神経回路の可塑的变化を伴うと考えられる。本研究では、被験者（正常者、患者）及びラットを用いた電気生理学的、及び行動解析実験を行い、脊髄内神経伝導障害時の運動及び感覚の障害と回復を観察し、障害を効率的に評価する検査法を開発、包括的な病勢評価の確立を行う。更に、脊髄及び脳損傷のモデル動物を作成して、障害時に脊髄内及び脳内神経回路に生じる可塑的变化とそのメカニズムを、電気生理学及び組織化学的手法を用いて明らかにする計画である。

方法

まず頸髄症の患者で、運動障害を評価する検査を確立する。近位筋への効果が強い間接経路の機能検査としては、我々がこれまで開発してきた腕を target へ伸ばす reaching 運動解析を用いる。また直接経路の影響が強い運動として、手指の巧緻運動の定量的検査法の開発を行う。動物実験で明らかにされた運動経路の機能的差異を考慮して、幾つかの手指運動検査を組み合わせる計画である。以上の運動検査と、経頭蓋磁気刺激による伝導障害の評価とあわせ、各経路のヒトでの機能的役割、及び

機能回復時の代償作用についての解析を行う。併せて、感覚機能障害の評価法の開発も行う。並行して、ラットを用いた動物実験を行い、機能代償を起こすメカニズムについて個体、及び細胞レベルの解析を行う。このためには in vivo patch clamp 法を用い、脊髄神経回路で起こる可塑的变化を検証し、この変化が損傷時やトレーニングにより影響を受けるかを解析する。可塑的变化については、イオンチャネルレベルの解析も計画している。また正常、及び損傷動物でトレーサーの注入を行い、神経投射の変化を組織化学的に検証する。

結果

計画のうち主に reaching 運動解析法について、以下に結果を報告する。

手術前の頸髄症患者の運動評価

我々が開発してきた装置を用い、巧緻運動機能障害を有する頸髄症患者 25 名（男性 16 名、女性 9 名：64±13 才）と age-match させたコントロール群 7 名（男性 4 名、女性 3 名：65±10 才）で運動評価を行った。頸髄疾患の内訳は、頸椎症性頸髄症が 13 名、環軸椎亜脱臼、頸椎後縦靱帯骨化症、頸椎椎間板ヘルニア、頸髄腫瘍、破壊性脊椎関節症が数名ずつであった。圧迫レベルは第 5－6 頸髄が 23 名、第 2 頸髄が 1 名、第 7 頸髄が 2 名であった。到達運動は原則的に、症状が重い側の腕で行わせた。図 1 A-B に、頸髄症患者とコントロール被験者の、運動中の示指の軌跡を示す。図中灰色線は reaching 運動の軌跡で、音刺激を合図に眼前約 40cm にある点灯する LED に腕を伸ばし触る運動を行わせた。一方、図中黒実線と

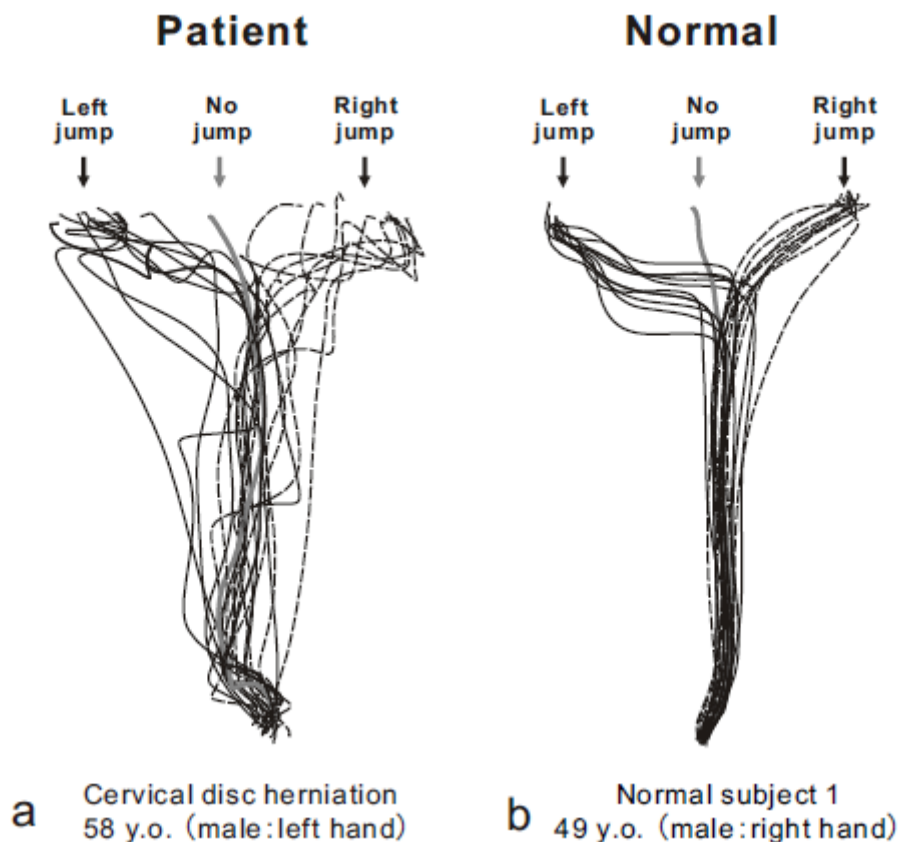


図1 頸髄症患者(a)とコントロール被験者(b)の運動の軌跡。被験者は、手前(図中下)から40cm前方(図中上)のターゲットに腕を伸ばしている。灰色の線は正面のターゲットに対するreaching運動(1試行のみ表示), 黒い実線は左, 破線は右ターゲットへのswitching運動を示す。

破線で示されているのは、reaching運動中の素早い運動補正を観察するためのswitching運動の軌跡である。このため運動開始25 msec後に点灯していた正面のLEDを突然消し、左右10 cmにあるいずれかのLEDを新たに点灯させた。被験者にはこの場合、新しく点灯したLEDに到達して触るよう指示してある。最終的なtargetが正面、左、右の試行はランダムな順序で呈示され、被験者には予測できないようにした。

軌跡から明らかなように、患者、コントロールともreaching, switching運動を行うことが可能であった。このことは、患者の主訴が巧緻運動障害であることから推測される。しかし何回かの試行の運動の軌跡を重ね書きすると、コントロール群ではかなり一定の運動であるのに対し、患者群では毎回のばらつきが大きく、また運動の滑らかさが失われる傾向が見られた。

運動を定量的に評価するため、以下のパラメータを計測した。反応時間は運動開始を指示する音刺激から実際の運動開始までの時間、動作時間は運動開始からLEDを固定したボードに触るまでの時間である。また、switching運動の修正時間は点灯するLED(ターゲット)

を変えてから運動修正が起こるまでの時間、到達位置はreachingとswitching運動後にボードに触った位置とその時のターゲットの間の距離として求めた。コントロールと患者群の平均値を、表1に示す。

表から明かなように、患者では到達位置の正確性が有意に低下していた。また動作時間、修正時間の延長が観察され、運動の素早さも低下していることが観察される。一方、反応時間に両群の差異は観察されなかった。

手術後の運動の変化

頸髄症患者群については、手術による圧迫除去後の運動の変化も解析した。表1からわかるように反応時間と動作時間については、有意な改善は観察されなかった。一方、修正時間は手術直後に優位な改善がみられ、この改善はその後持続していた。また優位には達していないが、到達位置の正確性も改善する傾向が見られた。

従来のパラメータとの比較

到達運動解析法の有用性を検討するため、これまで整形外科領域で用いられてきたパラメータとの比較を行った。

表 1 各パラメーターの平均と標準偏差

	n	反応時間 (msec)	動作時間 (msec)	修正時間 (msec)	到達位置 (mm)	経髄症 スコア	MMT (近位筋)
コントロール	7	650.8±247.3	661.7±79.3	229.8±26.0	6.1±0.8		
患者 (術前)	25	667.3±247.8	747.6±184.7*	263.6±50.6*	8.5±3.4*	11.1±1.7	4.7±0.4
患者 (術後 2 週間)	12	603.1±238.1	756.5±235.2	216.8±36.5†	7.6±2.4	12.8±1.2†	4.7±0.4
患者 (術後 3 カ月)	7	609.3±217.2	796.2±223.4	241.4±33.9	7.2±1.8	13.3±1.1†	4.8±0.4
患者 (術後 6 カ月)	14	534.0±157.3	676.7±209.9	205.2±40.1†	7.6±2.8	14.5±1.6†	4.9±0.3
患者 (術後 1 年)	4	702.5±267.8	824.6±237.9	241.6±63.3	5.9±1.4	14.0±0.4†	5.0±0

運動解析のパラメーターについて修正時間は左右ターゲット，その他は全ターゲットの平均値を示す。

* と † は t 検定で有意差 ($p<0.05$) が検出されたもので，* はコントロールと，† は術前との比較を示す。

日本整形外科学会の頸髄症スコアは，手術後徐々に改善することが観察された (表 1)。この変化は到達運動検査の修正時間と相関しており ($r=-0.423$, $p<0.05$)，修正時間が症状の改善を示すパラメーターであることが確認された。

一方筋力の検査である MMT テストの結果 (5 点が正常) は，修正時間と相関を示さなかった。これは，今回の患者では上肢遠位筋には筋力低下が認められるものの，近位筋の筋力低下は顕著でなかったためと考えられる。

また 10 秒テスト (手を握ると開くを，10 秒間になるべく速く繰り返す) の値も，修正時間との相関を示さなかった。

錐体路の伝導状態と運動

経頭蓋磁気刺激 (TMS) を用いて錐体路の伝導時間を計測，伝導障害の程度を判定した。一次運動野の当該領域を刺激することにより，ほとんどの患者で上腕二頭筋に運動誘発電位 (MEP) が観察された。しかし，錐体路から運動ニューロンへの単シナプス性入力を反映すると考えられる開始潜時は 14.9 ± 1.4 msec で，正常被験者の平均値 (10.9 ± 1.1 msec (筆者らの以前のデータによる)) より優位に遅れていた ($p<0.05$, t-test)。

一方で，開始潜時と到達運動のパラメーターの間に相関は見られなかった。このことは，運動と錐体路からの単シナプス性入力に必ずしも因果関係がないことを示している。近位筋の運動には，介在ニューロンを介した多シナプス性の皮質-運動ニューロン経路が重要な役割を果たすことが，動物実験で明らかにされている。我々の結果は，ヒトでも単シナプス性経路以外の系が，運動制御に関わる可能性を示唆している。

指の巧緻運動に関する検討

近位筋を用いた到達運動以外に，指の巧緻運動機能と錐体路伝導状態の比較を行った。近位筋と異なり，遠位筋運動には単シナプス性皮質-運動ニューロン経路が必須と考えられている。現在のところ巧緻運動を定量化する適当な検査が存在しないため，上述の 10 秒テ

ストを用いた。手指筋として第一背側骨間筋筋電図をとり TMS で一次運動野手指領域を刺激すると，上腕二頭筋と同様ほとんどの患者で MEP が観察された。しかし，開始潜時は 25.0 ± 3.6 msec と，やはり正常者の潜時 (20.9 ± 0.9 ms) からは優位に遅延していた ($p<0.05$)。

一方，開始潜時と 10 秒テストの間の相関は，やはり見られなかった。動物実験の結果では，脊髄内で錐体路を切断しても巧緻運動が回復することが示されており，ヒトでも同様の回復が起こる可能性を示唆する結果と考える。

一方で全指を同時に屈曲，伸展させる 10 秒テストは，巧緻運動とはいえない可能性も考えられる。サルの延髄で錐体路を切断した場合も，示指と母指でつまむ precision grip はできなくなるが，全指で握る power grip は可能であるとの報告がある。そこで precision grip の解析を行うための装置の開発を試み，最近完成させた。今後はこの装置を用い，巧緻運動の解析を行う予定である。

ラットの動物実験

現在，in vivo patch clamp のシステムの構築を終えており，ラットで予備実験を行なっている。今後は上述の錐体路傷害時の機能回復のメカニズムを探るため，動物実験を行っていく計画である。

まとめと考察

頸髄症患者の上肢機能障害を包括的に評価する方法の開発をめざし，reaching 運動検査を行った。Reaching 運動は従来の筋力検査では検出されない運動障害を見ることができ，これまで方法がなかった近位筋の運動機能評価法として有用であると考えられた。また頸髄症スコアと異なり，客観的に数値化できる点も評価できると考える。一方で，reaching 運動検査の結果と，錐体路伝導状態の評価は必ずしも一致せず，ヒトでも単シナプス性皮質-運動ニューロン経路によらない運動制御が行われる可能性が示唆された。今後はこの経路の同定や機能回復に関わるメカニズムについて，動物実験で明らかにする計画である。また同様の機構で，手指の巧緻運動も回復

する可能性が示唆された。これについても、今後の検討が必要と考える。

論 文

- 1) 五十嵐一峰・渋谷賢・佐野秀仁・高橋雅人・里見和彦・大木紫 (2008) 頸髄圧迫病変患者におけるリーチング運動を用いた上肢近位筋運動の評価法・脊髄機能診断学 30(1), 134-141

学会発表

- 1) 五十嵐一峰・渋谷賢・佐野秀仁・高橋雅人・里見和彦・大木紫 (2008) 頸髄症患者におけるリーチング運動の経時的変化. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会(京都). 2008 年 10 月
- 2) 五十嵐一峰・渋谷賢・佐野秀仁・高橋雅人・里見和彦・大木紫 (2008) リーチング運動を用いた頸髄症の上肢近位筋の運動機能評価. 臨床神経生理学学会第 38 回大会(神戸) 2008 年 11 月
- 3) 渋谷 賢 (2008) Effects of distractor stimuli on human switching movements by target shift. 日本スポーツ心理学

会第 35 回大会 (中京大学). 2008 年 11 月

- 4) K. Igarashi, S. Shibuya, H. Sano, M. Takahashi, K. Satomi & Y. Ohki (2008) Functional assessments of proximal arm muscles by target-reaching movements in patients with cervical myelopathy. Cervical Spine Research Society 36th annual meeting (Austin) 2008 年 12 月
- 5) 渋谷賢・五十嵐一峰・佐野秀仁・高橋雅人・高橋俊光・里見和彦・大木紫 (2008) 腕の到達運動に伴う空間的注意のダイナミックな変化. 日本基礎心理学会第 27 回大会 (仙台) 2008 年 12 月
- 6) S. Shibuya, K. Igarashi, H. Sano, M. Takahashi, T. Takahashi, K. Satomi, J. Sayadi, Y. Ohki (2009) Dynamic changes of spatial attention during human reaching movements. IUPS2009 (京都) 2009 年 7 月
- 7) H. Sano, Y. Ohki, K. Igarashi, M. Takahashi, K. Satomi (2009) Function analysis of spinal interneuronal systems reveals use-dependent differences relating to normal human arm movements. Spine Across the Sea 2009 (Hawaii) 2009 年 7 月
- 8) S. Shibuya, K. Igarashi, H. Sano, M. Takahashi, T. Takahashi, K. Satomi, Y. Ohki (2009) Movement-induced attentional shift under virtual environments. Neuroscience2009 (Chicago) 2009 年 10 月

前立腺癌転移巣及び局所再発巣に対する臓器特異性オステオカルシンプロモーターを組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-OC-TK) 及びバラシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究

桶 川 隆 嗣¹ 似 鳥 俊 明¹ 坂 本 穆 彦¹
富 士 幸 蔵² 後 藤 章 暢³ 東 原 英 二¹

¹ 杏林大学医学部泌尿器科

² 昭和大学医学部泌尿器科

³ 兵庫医科大学 先端医学研究所 細胞・遺伝子治療部

目的

癌に対する遺伝子治療の最も基本的な問題の一つとして、対象とする遺伝子をいかに癌細胞に特異的に効率良く発現させるかということがある。近年、癌細胞特異的に活性化される臓器特異性プロモーターを用いた癌遺伝子治療法の基礎研究、及び臨床試験が盛んにおこなわれているが、特に臓器特異性プロモーターと自殺遺伝子を組み合わせた治療法が注目を集めている。自殺遺伝子とは、細胞毒性の低いプロドラッグを高い細胞毒性を有する物質に変換する酵素をコードする遺伝子であり、この遺伝子を導入された細胞はプロドラッグの投与によって殺傷される。臓器特異性プロモーターと自殺遺伝子を組み合わせた場合、自殺遺伝子は癌細胞特異的に発現し、正常細胞に自殺遺伝子が導入されても発現せず、プロドラッグを投与しても正常細胞は殺傷されない。このように臓器特異性プロモーターを用いることによって癌遺伝子治療の安全性を高め、副作用を軽減させることができると考えられる¹⁻³⁾。

本研究は、内分泌療法抵抗性前立腺癌（骨転移、リンパ節転移及び局所再発例）に対し、自殺遺伝子：Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase（以下：HSV-TK）遺伝子を、臓器特異性プロモーター：Osteocalcin（以下：OC）プロモーターにより制御発現させるアデノウイルスベクター（以下：Ad-OC-TK）を単独で癌転移巣又は局所再発巣に局所内投与し、その後バラシクロビルを経口投与するという局所療法を施行した場合の安全性の検討及び治療効果の観察（評価可能症例）を目的とする第1/2相試験である。国内では既に神戸大学において、2003年8月から2006年3月の期間で6例の患者を対象に同様の

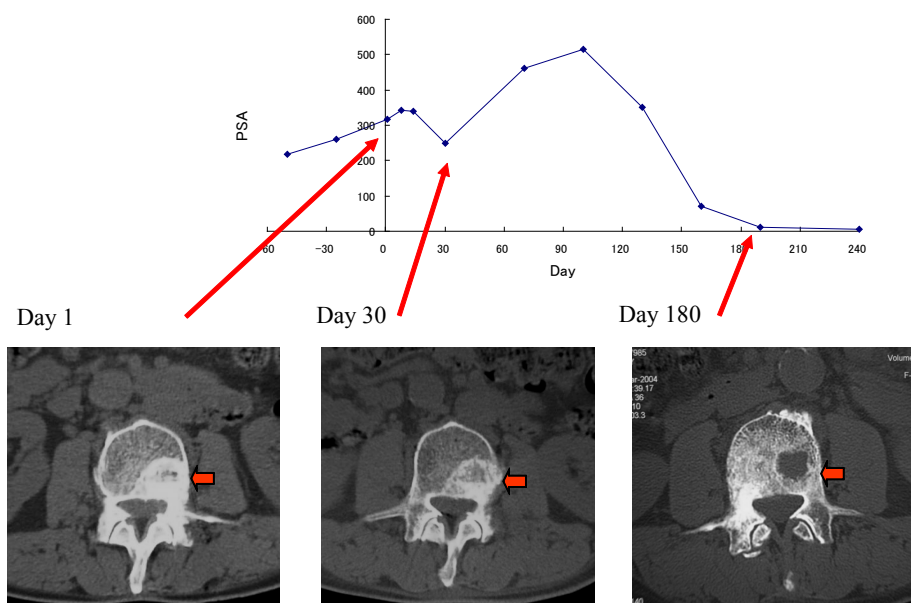
臨床研究が行われたが、3大学（杏林大学、兵庫医科大学、昭和大学）でも本研究を実施する事により安全性および効果の検証を更に進める事ができると考える。内分泌療法抵抗性前立腺癌症例で、画像診断学的（CT、MRI、超音波など）に転移又は局所再発巣を確認できる症例に対し、まず Ad-OC-TK を単独で CT 又は超音波ガイド下に腫瘍内に直接投与し、その後バラシクロビルを経口投与する。その際の質的、量的安全性を確認することを本試験の主な目的とする。また、治療効果の判定を行い、可能な症例においては画像診断学的な腫瘍退縮や腫瘍マーカーの低下を期待する際の根拠となる分子生物学的効果、ベクターの感染、OCプロモーター制御下の mRNA レベル及びタンパク質レベルでの HSV-TK 遺伝子の発現、アポトーシスの誘導について解析する。

対象疾患

根治的前立腺全摘出術後の前立腺癌再発症例又は、外科的切除により根治不能な進行性前立腺癌症例（臨床病期 C,D）で、内分泌療法（放射線療法、抗癌化学療法の併用を含む）を施行された経験があり、腫瘍マーカーである前立腺特異抗原（PSA:Prostate Specific Antigen）を用いた生化学診断上、内分泌療法抵抗性前立腺癌と診断され、かつ画像診断学的に評価可能な病巣（局所再発巣、リンパ節転移巣、又は骨転移巣）を有する患者を対象とする。

遺伝子及び遺伝子導入方法

我々が導入する遺伝子は臓器特異性プロモーター、OCプロモーターで発現制御可能な単純ヘルペスウイルス



Remarkable local anti-tumor effect was observed in patient 2 by CT scan.

図 1. Local anti-tumor effect in Patient 2

スチミジンキナーゼ, HSV-TK 遺伝子であり, その遺伝子はアデノウイルスベクターを介して癌細胞に導入する。

アデノウイルスは全質量の 13% を占める DNA と 87% を占めるタンパク質を含む, 直径 65-80nm の正二十面体の構造を有する。ウイルスの DNA は約 36kb の長さである。アデノウイルス蛋白の発現は, 一般的に早期と後期とに分類される。6 つのタンパク質が早期 (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4) に, 他のタンパク質 (L1, IV a2, IX) は後期に発現する。E1A と E1B はウイルス DNA の複製に重要な役割を果たす。E2A は DNA 結合タンパクをコードし, E2B は DNA polymerase 及びウイルスゲノムの 5' 末端に見られるタンパクをコードする。E3 はウイルス DNA の複製に関連しないが, ウイルスの感染に対する宿主免疫反応を引き起こすと考えられる。E4 蛋白はウイルスの構築と関連すると考えられている。本研究に用いられる Ad-OC-TK ベクターは, E1A 及び E1B 部分が欠損しておりその欠損部にマウス OC プロモーターで転写制御される HSV-TK 遺伝子が挿入されている。

Ad-OC-TK の作製方法: Ad-OC-TK は AdMire-OC-TK 及び pAdEasy-1 の二つのプラスミドにより作製される。AdMire-OC-TK は供与核酸, OC プロモーターの転写制御下にある HSV-TK 遺伝子を含む。pAdEasy-1 は Ad5 配列に Ampicilin 耐性遺伝子が挿入されており, E1 および E3 遺伝子が欠損しているため感染性を持たないアデノウイルスのバックボーンプラスミドである。AdMire はオランダの Crucell 社より供与され, pAdEasy-1 は米国 Stratagene 社より購入した。また OC プロモーター (m OG2 promoter) および HSV-TK は, pIII, 5TK プラスミド由

来であり, テキサス州立大学 MD アンダーソン癌センターの Gerard Karsenty 博士より供与された。AdMire-OC-TK と AdEasy-1 を混合し, DOTAP (Boehringer-Mannheim Corporation 社, 米国インディアナポリス) を用いたりポソーム法によって PER.C6 細胞 (ヒト胎児性網膜芽細胞) へ導入し, 相同組換えにより Ad-OC-TK を作製した。PER.C6 細胞は Ad5 の E1 領域, 約 4kb を内在しており E1 由来転写活性因子を産生する細胞株である。この転写活性因子が E1 領域を除去した Ad-OC-TK にトランスに働き, Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターが産生される。尚, PER.C 細胞は従来の 293 細胞と異なり, Ad-OC-TK の発現カセット前後との相同部位を E1 遺伝子の前後に持たないので, PER.C6 由来の E1 遺伝子と Ad-OC-TK の発現カセットとの相同組換えが理論上起こらず, RCA (Replication Competent Adenovirus) の発生も起こらないと考えられる。以上のように作製された Ad-OC-TK を増殖, 精製し, GMP 準拠アデノウイルスベクターを自主製造する。製造の過程では, マスターセルバンク, マスターウイルスバンクなどの原材料の作製, ウイルスの増殖から精製, 最終製品に至るまで, 米国 GMP 基準に従って GMP 準拠施設で行った^{4,5)}。

Ad-OC-TK を用いた治療法と評価

泌尿器科医, オンコロジスト, 弁護士, そして放射線科医より構成される患者選定委員会が患者の適応基準を評価した。プロトコル上, ウイルスの投与量は, 2.5×10^9 pfu および 2.5×10^{10} pfu の 2 段階の投与量を設定した, ウイルスの溶液量は, 投与に指定した腫瘍の体積によって 0.5-2ml の容量に設定した。各患者は 1 コース

表 1. Long-term follow up results

Patient No.	Dose (PFU)	Index lesion	Pre-treatment PSA (ng/ml)	Nadir * PSA (ng/ml)	PSA response (duration)	TTP# (months)	Survival (follow-up duration, months)
1	Low	Local prostatic fossa	112.4	(125.0)	—	1	Death (31)
2	Low	L3 spine	318.3	4.9	+ (7)	12	Alive (34)
3	Low	L3 spine	311.5	(482.6)	—	0.25	Death (8)
4	High	Sacral bone	455.5	264.5	—	5	Death (10)
5	High	Prostate	92.3	(93.2)	—	1	Death (9)
6	High	T12 spine	46.6	37.3	—	2	Death (10)

* Minimum PSA between Gene therapy and next treatment
 # TTP: Time to PSA Progression

の治療において、計2回のウイルス注入を受けた。1回目は第1日目、そして2回目は第8日目であった。第1回目のウイルス注射の後、患者は入院の上、30日間経過観察をおこなった。治療第1日目より、1日2回のバラシクロビルの経口投与を21日間行った。治療第1日目と第8日目のAd-OC-TKの注射に先立って、治療部位より最低2カ所若しくは3カ所の生検を18ゲージのBiopsy Needleにて行った。(図1)治療部位よりの生検は第30日目にも行った。この材料の一部は液体窒素の中で新鮮なまま保存され、一部は初代培養で細胞株を作るのに用いた。さらに病理学的評価と将来のマーカーでの評価のためにパラフィン化した。投与量、ドーズの増加は以下のスケジュールにて行われた:3人の患者が低用量のドーズ (2.5×10^9 pfu) の注射を受け、3人の患者が高用量のドーズ (2.5×10^{10} pfu) を受けた。(表1)おのおの患者は治療期間中、副作用及び病理学的な効果に対して注意深く観察された。観察は様々なタイプの血液ルーチンワーク、たとえばCBC、肝機能評価、PT/PTT、BUN/Cr、血清化学の測定、PSAの測定、そして検尿により行われた。治療開始後、最初の30日間は特に厳重に経過観察がなされた。ウイルスの体内動態は、治療前及び治療中に血清ウイルス量を測定する事によりモニターされた。全患者が治療前及び治療中に多くの画像診断を受けた。これは胸部X線写真、骨シンチ、腹部骨盤部のCT、骨のMRI、そして、適応があるときは前立腺部のTRUSが行われた。解剖学/形態学と機能検査の総合評価が、腫瘍関連パラメーターとの相互関係とも、アデノウイルス遺伝子治療の有効性の評価に用いられた。登録された全患者が、画像診断学的に二方向で測定可能な評価病巣を有するので、治療の有効性を画像診断学的に評価することが可能であった。治療の有効性は血清腫瘍マーカー(PSA)や痛みの軽減などにおいても評価された。QOLに関する、様々なパラメーターを評

価する広範囲の問診もプロトコルに含まれた。適応基準には、一般的な評価基準も含まれた。鎮痛薬の投与量が安定している、ホルモン療法抵抗性、ECOGのパフォーマンスステータス ≤ 2 、抗癌化学療法などの他の治療法が現在行われていない、そしてインフォームドコンセントを理解する能力を備える、などの項目である。加えて通常の肝機能、腎機能や通常の血小板数やPT/APTTが適切な血球数のパラメーター(ヘモグロビン ≥ 8.5 、好中球 > 1000)を示すことなどが適応基準項目に含まれた。

治療効果

低および高用量群(各dose levelにつき3人ずつ)は熱発、肝機能障害を除く臨床的合併症なしに治療を終了した。前臨床研究及び動物実験による副作用研究により予想されたように、OCプロモーターの活性は骨組織及び腫瘍に限定され、臨床的には、明らかな毒性は認められなかった。ウイルスの一過性の全身循環が認められたが、重篤な肝毒性は認められなかった。局所再発巣にウイルスを注射された患者においては、尿中に一過性にウイルスが検出されたが、すぐに消失した。多くの症例で、急性の(< 24 時間)“flu-like”症候群が認められた。これは熱発、時に悪寒、そして倦怠感の自覚などの症状を呈し、まれに筋痛、関節痛を伴った。この所見と関連して、リンパ球数の軽度の減少が72時間以内に認められた。(表2)また、骨転移巣にベクターを注入した4例の患者(患者#2, 3, 4, 6)については、ベクター注射後の生検組織の解析上、TUNEL法にて4例中4例にアポトーシスの誘導を認めた。また病理組織学的には4例全例に炎症細胞の出現や癌細胞の減少、線維化像などの変化を認めた。また腫瘍マーカーであるPSA値の推移では、6例中3例(症例1, 2, 4)においてFollow-up期間中にPSA値の低下を認めた(ただし症例1では

表 2. Acute Side Effects

Side effects	Number of Case		
	grade 1	grade 2	grade 3
Lymphopenia		5	3
Leukopenia	3		
Neutrocytopenia	2		
Fever	2	1	
Rigors, Chills	3		
Sweating	3		
Hypertension	4		
Hypotension		1	
Increased AST	1	1	
Increased ALT		1	
Increased γ -GTP	1	2	

- Totally 12 injections of Ad-OC-TK were performed in six patients
- Graded according to the Common Toxicity Criteria by the NCI

Follow-up 期間において Day90 より抗癌化学療法を施行した)。(図 1) ^{7,8)}

結論

ホルモン不応性前立腺癌の 6 症例に対し Ad-OC-TK 遺伝子治療臨床研究を行ったが、重篤な副作用は認めず、一部に有効性を認めた。ホルモン不応性前立腺癌患者のさらなる予後改善のための追加療法としての Ad-OC-TK 遺伝子治療の可能性が示唆された。

杏林大学での遺伝子治療臨床研究の状況

杏林大学では遺伝子治療倫理委員会にて承認を受けた。2008 年 11 月 GMP 準拠アデノウイルスベクターの製造を神戸バイオメディカル創造センターから九州大学生体防御医学研究所（ゲノム病態学分野：教授 谷 憲三朗）に変更した。現在、ベクターの安全性を確認中である。

文 献

- 1) Ko SC, Cheon J, Kao C, Gotoh A, Shirakawa T, Sikes RA, Karsenty G, Chung LWK Osteocalcin Promoted-based Toxic Gene Therapy for the Treatment of Osteosarcoma in Experimental Models. Cancer Research,1996 56(20):4614-4619
- 2) Shirakawa T, Ko SC, Gardner TA, Cheon J, Miyamoto T, Gotoh A, Chung LWK, Kao C. In Vivo Suppression of Osteosarcoma Pulmonary Metastasis with Intra Venous

Osteocalcin Promoter-Based Toxic Gene Therapy. Cancer Gene Therapy,1998 5(5):274-280.

- 3) Shirakawa T, Gotoh A, Wada Y, Kamidono S, Ko SC, Kao C, Gardner TA, Chung LWK. Tissue-specific promoters in gene therapy for the treatment of prostate cancer. Molecular Urology,2000 4(2):73-82
- 4) Koeneman KS, Kao C, Ko SC, Yang L, Wada Y, Kallmes DF, Gillenwater JY, Zhau HE, Chung LWK, Gardner TA Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis. World J Urol 2000 18,102-110
- 5) Kubo H, Gardner TA, Wada Y, Koeneman KS, Gotoh A, Yang L, Kao C, Lim SD, Amin MB, Yang H, Black ME, Matsubara S, Nakagawa M, Gillenwater JY, Zhau HE, Chung LW. Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer. Hum Gene ther,2003 14:227-241.
- 6) Shirakawa T, Terao S, Hinata N, Tanaka K, Takenaka A, Hara I, Sugimura K, Matsuo M, Hamada K, Fuji K, Okegawa T, Higashihara E, Gardner TA, Kao C, Chung LW, Kamidono S, Fujisawa M, Gotoh A. Long-term outcome of phase I/II clinical trial of Ad-OC-TK/VAL gene therapy for hormone-refractory metastatic prostate cancer. Hum Gene Ther.2007;18(12):1225-1232.
- 7) Shirakawa T, Fujisawa M, Gotoh A. Gene therapy in prostate cancer: past, present and future. Front Biosci,2007 70(5): 2115-2119.
- 8) Terao S, Shirakawa T, Acharya B, Miyata M, Hinata N, Tanaka K, Takenaka A, Hara I, Naoe M, Fuji K, Okegawa T, Higashihara E, Kamidono S, Fujisawa M, Gotoh A. A Pilot Study of Quality of Life of Patients with Hormone-refractory Prostate Cancer after Gene Therapy. Anticancer Res.2009;29(5):1533-1537.

新しい心電学的指標を用いての致死性不整脈による 心臓突然死の予知

池 田 隆 徳

杏林大学第二内科学

新しい心電学的指標である、①タイムドメイン解析による再分極異常を反映する指標 (time-domain T-wave alternans: TD-TWA) と、②自律神経活動異常を反映する指標の heart rate turbulence (HRT) の心臓死の予知における有用性を評価した。

① TD-TWA を用いての評価

目的：拡張型左室機能不全 (LVD) 患者において、24 時間 Holter 心電図の記録波形を用いて TD-TWA を測定し、TD-TWA が心臓死の予知指標として有用であるかを前向きに評価した。

方法：対象は、拡張型 LVD 患者連続 295 例 (平均年齢 66 ± 16 歳、男性 223 例) であった。患者は、虚血性 LVD 群 ($n=195$) と非虚血性 LVD 群 ($n=100$) の 2 つの群に分けられた。24 時間 Holter 心電図は、日常生活下で記録された。TD-TWA の解析は、新しい T 波の解析方法である modified moving average 法を用いて行われ、24 時間にわたり V_5 (NASA) 誘導と V_5 (CM_5 誘導) において自動解析された。これまでの報告に基づき、心拍数 ≤ 120 回 / 分における両誘導の 24 時間記録の最大 TD-TWA 値が $65 \mu V$ 以上の場合を陽性とし、それ以下の場合を陰性と判定した。本研究のエンドポイントは心臓死であった。

結果：最大 TD-TWA 値の平均は $54 \pm 16 \mu V$ であった。TD-TWA 陽性は 53 例 (18%)、陰性は 242 例 (82%) であった。観察期間 390 ± 212 日の間に、心臓死は 27 例で認められた (虚血性 LVD 群 17 例、非虚血性 LVD 群 7 例)。Cox 単変量解析では、高齢者、NYHA クラス III・IV、糖尿病、腎機能障害、非持続性心室頻拍、TD-TWA が、心臓死との間に有意な関連性を示した。どの指標が最も関連性があるかを Cox 多変量解析で検討したところ、TD-TWA が最も有用性の高い指標であることが示

された ($HR=17.1$, $P<0.0001$; 図 1)。また、虚血性 LVD 群、非虚血性 LVD 群のサブグループにおいても同様に、TD-TWA は心臓死に対して有意な関連性を示した (それぞれ $HR=19.0$ $P<0.0001$; $HR=12.3$ $P=0.002$)。

結語：拡張型 LVD 患者において、虚血性、非虚血性に関わらず、24 時間 Holter 心電図を用いて検出される TD-TWA は、心臓死に対する有用な予知指標であることが示唆された。

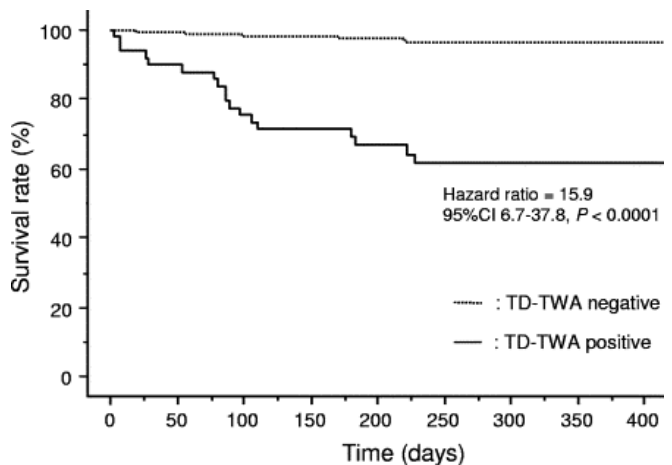


図 1. TD-TWA を用いたイベント (心臓死) フリー曲線

② HRT を用いての評価

目的：虚血性または非虚血性拡張型心筋症 (DCM) 患者において、24 時間 Holter 心電図を用いて記録される HRT の心臓死および致死性不整脈の予知における有用性を前向きに評価した。

方法：対象は、DCM 患者連続 375 例 (66 ± 15 歳、男性 265 例) であった (虚血性 DCM 患者: $n=241$, 非虚血性 DCM 患者: $n=134$)。HRT は 24 時間 Holter 心電図

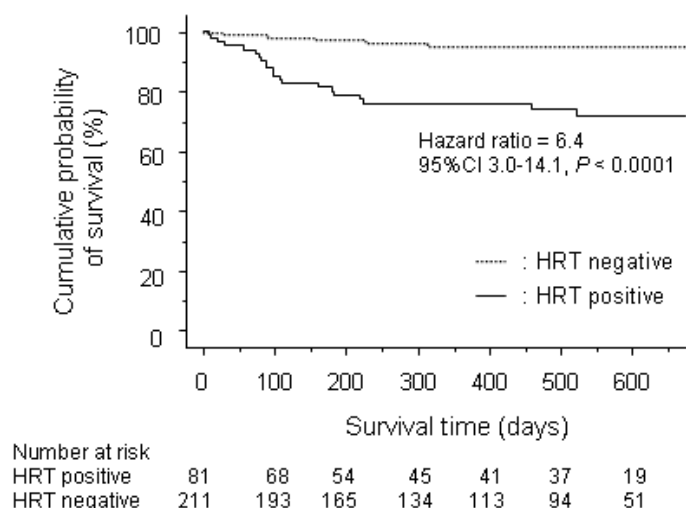


図 2. HRT を用いたイベント（心臓死）フリー曲線

を記録した後、自然発症した VPC 後の心拍の変化を、HRT 測定が可能な心電図解析装置を用いて自動計測した。HRT の判定は、turbulence onset (TO) と turbulence slope (TS) の 2 つのパラメーターを用いて行った。HRT の判定は、従来の報告に基づいて行い、TO が 0% 以上かつ TS が 2.5msec/RRi 以下の場合を HRT 陽性とし、それ以外の場合を HRT 陰性とした。第 1 エンドポイントを心臓死、第 2 エンドポイントを持続性心室頻拍の発現と定義した。

結果：対象患者のうち 83 例 (22.1%) は、VPC の発現が少ないなどの理由で評価対象から除外された。評価された 292 例中 81 例 (27.7%) で HRT は陽性と判定された。観察期間 445±216 日の間に、第 1 エンドポイントは 30 例、第 2 エンドポイントは 17 例に認められた。第 1 エンドポイントに対する HRT 陽性患者のハザード比 (HR) は 6.4 (95% CI 3.0 - 14.1, $P < 0.0001$) であった (図 2)。また、第 2 エンドポイントを含めた複合エンドポイントに対する HRT 陽性患者の HR は 5.1 (95% CI, 2.8 - 9.3, $P < 0.0001$) であった。サブ解析においても HRT 陽性患者は、虚血性 DCM、非虚血性 DCM 患者ともに、第 1 エンドポイント (それぞれ $HR = 4.9$, $P = 0.0006$; $HR = 12.3$, $P = 0.002$) と第 2 エンドポイント (それぞれ $HR = 6.1$, $P < 0.0001$; $HR = 5.0$, $P = 0.0001$) に対して有意な関連性を示した。

結論：HRT は、虚血性、非虚血性にかかわらず、DCM 患者における心臓死および不整脈イベントの発現に対する強力なリスク層別化指標であることが示唆された。

①と②の評価により、新しい心電学的指標である TD-TWA と HRT はともに心臓死の予知における有用な指標であることが示された。

講演記録

- 1) Sakaki K, Ikeda T, Miwa Y, Miyakoshi M, Ishiguro H, Tsukada T, Abe A, Mera H, Nakamura K, Yusu S, Yoshino H: Time-domain T-wave alternans determined on Holter electrocardiogram predicts cardiac mortality in a population undergoing risk assessment: A prospective study. 29th HRS (Heart Rhythm Society), San Francisco, 2008.5.15
- 2) Hohnloser SH, Ikeda T, Cohen RJ: Predictive accuracy of microvolt T-wave alternans testing in primary prevention patients with and without ICDs. 29th HRS (Heart Rhythm Society), San Francisco, 2008.5.15
- 3) 三輪陽介, 池田隆徳, 榊 桂, 宮越 睦, 石黒晴久, 塚田雄大, 阿部敦子, 米良尚晃, 中村健太郎, 柚須 悟, 吉野秀朗: ホルター心電図で測定した Heart Rate Turbulence の有用性: 日本人心筋梗塞患者における評価。第 23 回日本不整脈学会, 横浜, 2008.6.1
- 4) Miwa Y, Ikeda T, Sakaki K, Miyakoshi M, Hoshida K, Ishiguro H, Tsukada T, Abe A, Mera H, Yusu S, Yoshino H: Heart rate turbulence predicts cardiac mortality and arrhythmic events in patients with dilated cardiomyopathy: A prospective study. 30th HRS (Heart Rhythm Society), Boston, 2009.5.14
- 5) Sakaki K, Ikeda T, Miwa Y, Miyakoshi M, Hoshida K, Ishiguro H, Tsukada T, Abe A, Mera H, Yusu S, Yoshino H: Usefulness of time-domain T-wave alternans measured from Holter electrocardiograms to predict cardiac mortality in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: A prospective study. 30th HRS (Heart Rhythm Society), Boston, 2009.5.15
- 6) Sakaki K, Ikeda T, Miwa Y, Miyakoshi M, Abe A, Ishiguro H, Tsukada T, Mera H, Yusu S, Yoshino H: Time-domain T-wave alternans measured from Holter electrocardiograms predicts cardiac mortality in patients with left ventricular dysfunction: A prospective study. 第 73 回日本循環器学会, 大阪, 2009.3.21
- 7) Miwa Y, Ikeda T, Sakaki K, Miyakoshi M, Abe A, Tsukada T, Ishiguro H, Mera H, Yusu S, Yoshino H: Heart rate turbulence as a predictor of cardiac mortality and arrhythmic events in patients with ischemic or nonischemic dilated cardiomyopathy. 第 73 回日本循環器学会, 大阪, 2009.3.22

List of Publications

- 1) 三輪陽介, 池田隆徳, 榊 桂, 宮越 睦, 石黒晴久, 塚田雄大, 阿部敦子, 米良尚晃, 中村健太郎, 柚須 悟, 吉野秀朗: 自律神経活動異常を反映する heart rate turbulence と heart rate variability の相関性に関する検討。心臓 40(Suppl.1): 15-18, 2008
- 2) 榊 桂, 池田隆徳, 三輪陽介, 宮越 睦, 石黒晴久, 塚田雄大, 阿部敦子, 米良尚晃, 中村健太郎, 柚須 悟, 吉野秀朗: タイムドメイン解析による T-Wave Alternans: オルタナンス電位に関する検討。心臓 41(Suppl.1): 23-27, 2009
- 3) Sakaki K, Ikeda T, Miwa Y, Miyakoshi M, Abe A, Tsukada T, Ishiguro H, Mera H, Yusu S, Yoshino H: Time-domain T-wave alternans measured from Holter electrocardiograms predicts cardiac mortality in patients with left ventricular dysfunction: A prospective study. Heart Rhythm 6; 332-337, 2009
- 4) Miwa Y, Ikeda T, Sakaki K, Miyakoshi M, Ishiguro H, Tsukada T, Abe A, Mera H, Yusu S, Yoshino H: Heart rate turbulence as a predictor of cardiac mortality and arrhythmic events in patients with dilated cardiomyopathy: A prospective study. J Cardiovasc Electrophysiol 2009 July Issue (in press)

癌幹細胞を用いた癌の薬剤耐性機序の解明と 新たな検査・治療法の開発

大 西 宏 明

杏林大学医学部臨床検査医学

研究成果まとめ

本研究では、肺癌の薬剤耐性細胞株を用いて、幹細胞を高濃度を含むとされる SP 細胞分画を抽出し、ABCG2 等の薬剤耐性関連分子の発現等について検討を行った。また、これらの細胞株における薬剤併用による耐性克服効果について検討した。

(1) 肺癌細胞株における薬剤耐性株の樹立

肺癌細胞株 4 株において、gefitinib と同一機序を持つ分子標的薬である AG1478, およびトポイソメラーゼ阻害剤である Hoechst33342 に対する耐性株を樹立した。薬剤耐性の確認には、MTS assay を用いた。PC-14AG50R, NCI-1650AG20R 11-18AG10R の 3 株は、AG1478 に対する IC₅₀ values が親株では 1 mM 未満であるところが、いずれも 10 mM 以上となっており、AG1478 に対する耐性を示した。また、NCI-H1975H5R は親株が 1 µg/mL の Hoechst33342 に対し感受性であったのに対し、3 µg/mL の Hoechst33342 に耐性であった。

(2) S P 細胞の抽出とその評価

上記耐性株およびその親株において、Hoechst33342 を用いてフローサイトメトリーにより S P 細胞分画を抽出した。S P 細胞の検出の際には、通常 verapamil による Hoechst 排出阻害を指標として用いるが、肺癌では必ずしも verapamil による阻害が生じないため、AG1478 を阻害剤として用いた。親株では、3.54 - 22.0 % の SP 分画が認められた。Hoechst33342 耐性 NCI-H1975H5R 株では、親株に対し著明に SP 分画が増加していた (34.7% vs. 3.54%)。一方 AG1478 耐性株 PC-14AG50R, NCI-H1650AG20R および 11-18AG10R では、親株に比べ SP 分画は著明に減少していた。(0% vs. 6.67%, 0% vs.

15.0%, and 1.04% vs. 23.5%) (図 1)

(3) S P 細胞における薬剤耐性関連分子の検討

上記細胞株およびそこから抽出した S P 細胞において、Real Time PCR を用いて薬剤耐性関連分子 ABCG2, MDR, MRP1 の発現の変化を調べた。また、直接シーケンス法を用いて gefitinib 耐性に関連するとされる EGFR 遺伝子 T790M 変異の有無を検討した。ABCG2 は Hoechst33342 耐性 NCI-H1975H5R 株では、親株に比べ発現が亢進していたが、AG1478 耐性の 3 株では有意に発現が低下していた。これは、SP 細胞分画の変化と一致していた。MDR1 遺伝子は、いずれの細胞株でも発現は低値であった。MRP1 遺伝子の発現には、一定の傾向はみられなかった。EGFR 遺伝子 T790M 変異は、いずれの細胞株においても認められなかった。(図 2)

(4) 耐性細胞株における AG1478 および Hoechst33342 の併用による増殖抑制効果

MTT アッセイを用いて、これら耐性株が AG1478 および Hoechst33342 の併用により耐性を克服できるか否かについて検討した。単剤では、AG1478 1 mM, Hoechst33342 1 µg/mL の濃度においていずれの細胞株も増殖抑制効果は見られなかったが、両者の併用により、いずれの細胞株においても明らかな増殖抑制効果が認められた。(図 3)

結果

上記の結果から、ABCG2 の発現および S P 細胞は肺癌細胞の耐性化と深く関与しており、チロシンキナーゼ阻害剤とトポイソメラーゼ阻害剤の併用は単剤による耐性を克服できる可能性が示唆された。

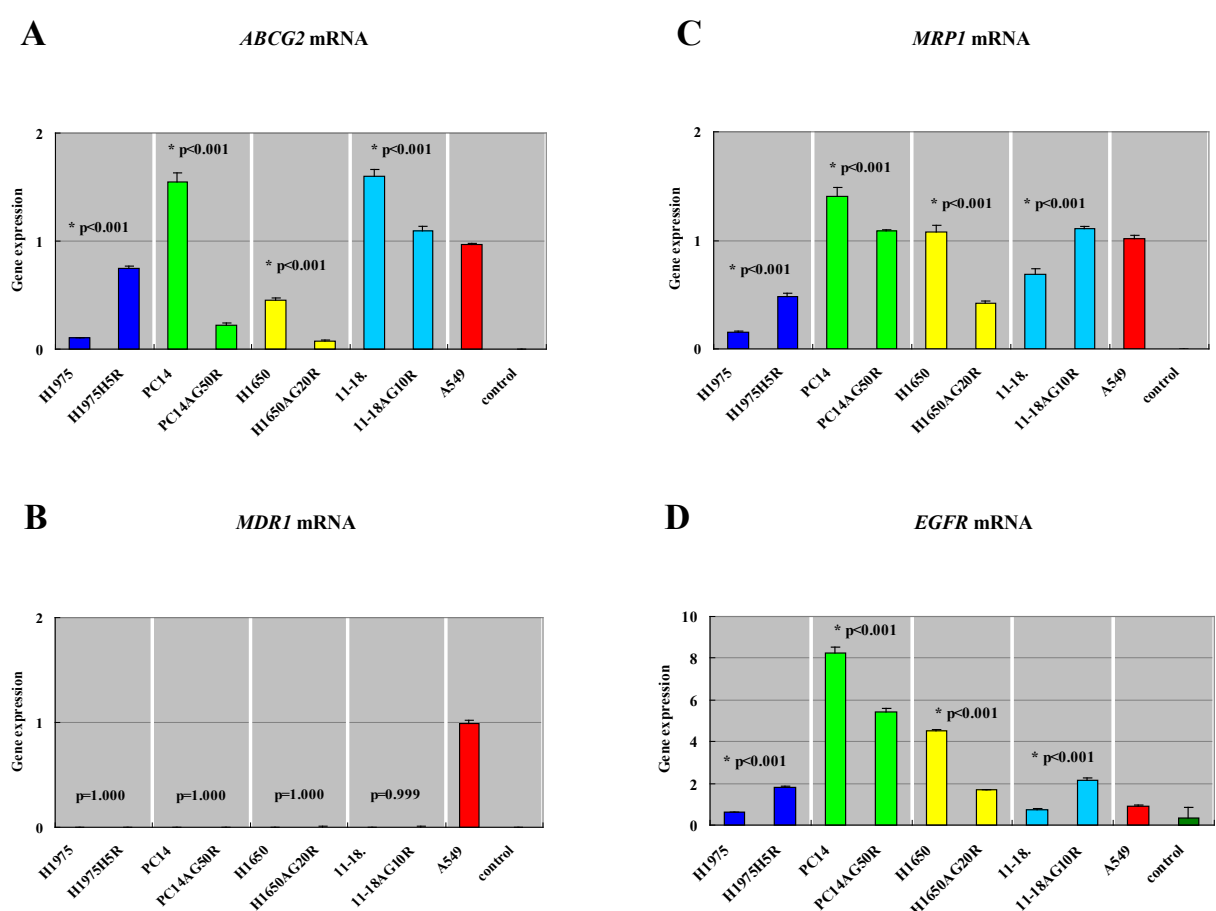


図 1

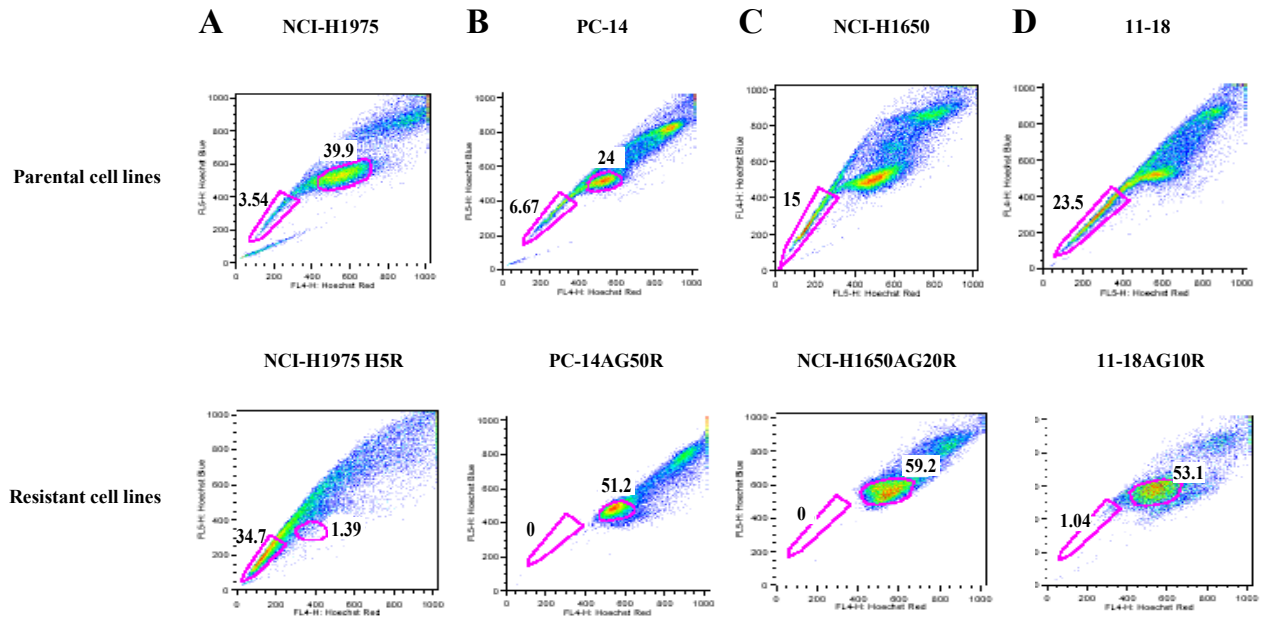


図 2

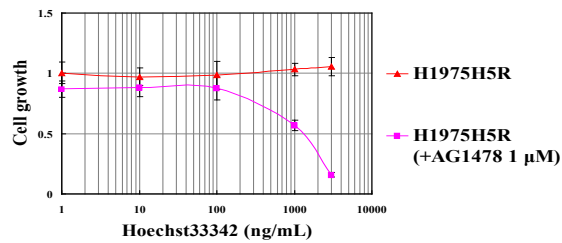
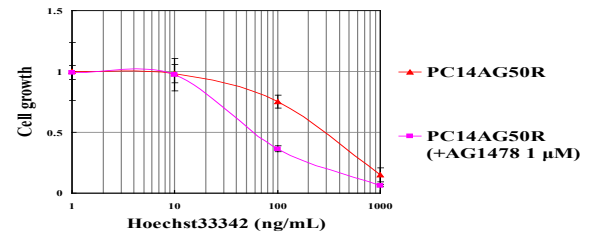
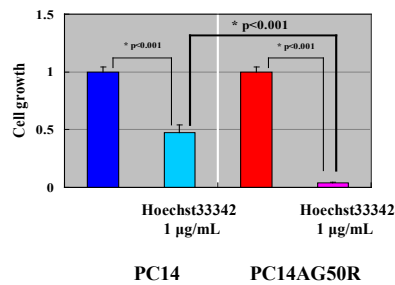
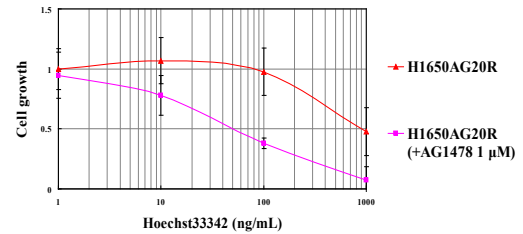
A**C****B****D**

図 3

講演記録

- 1) 大塚弘毅, 大西宏明, 呉屋朝幸, 渡邊卓: Side population (SP) 法による肺癌幹細胞研究 (抗癌剤耐性克服をめざして), 第 49 回日本肺癌学会総会, 北九州, 平成 20 年 11 月 14 日.

- 2) 大塚弘毅, 大西宏明, 小倉航, 千葉美佐紀, 松島早月, 岸野智則, 呉屋朝幸, 渡邊卓: Side population (SP) 法による肺癌幹細胞研究 (抗癌剤耐性克服をめざして), 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会, 名古屋, 平成 20 年 11 月 30 日.

HPC-1/ シンタキシン 1A ノックアウトマウスの 自閉症様行動異常に対する HPA-axis の関与

藤 原 智 徳

杏林大学医学部細胞生理学

HPC-1/ シンタキシン 1 A (STX1A) は、シナプス前終末での神経伝達物質の開口放出を制御する SNARE 蛋白質の 1 つと考えられている。我々は、特異な精神神経症状を呈することが知られるウイリアムス症候群の患者で STX1A 遺伝子が半接合体欠損していることを明らかにした。最近、ヒト遺伝子の解析により STX1A 遺伝子といくつかのヒト精神神経疾患との関連が示唆され、ヒト患者の精神神経症状のいくつかは STX1A が関与すると推測されている。我々は、STX1A の *in vivo* での機能を詳細に調べるために、遺伝子欠損マウスを作成し、その表現型解析をおこなった。このマウスでは顕著なシナプス伝達の異常はみられず、正常に発達した。しかしながら、行動学的解析の結果、記憶障害、認知機能障害等といった自閉症患者での障害と類似の行動異常が認められた。また、これらの異常の一部は向精神薬として使われているセロトニン作働薬の投与により顕著に改善した。これらの結果から、STX1A 欠損マウスにおいてセロトニンのシナプス伝達が障害されていることが推測された。

本研究計画において、STX1A 欠損マウスでのセロトニン作働性神経系についての検討に取り掛かるに当たり、まず脳内のセロトニン量の測定を行った。その結果、海馬および視床下部のセロトニン量が有為に上昇していることがわかった。これは STX1A の欠損によりセロトニン分泌が抑制され、細胞内に蓄積したためであると推測された。そこで、セロトニン分泌について検討するために、視床下部のスライス標本を用いた解析を行なった。非常に強い刺激条件（高濃度の K による脱分極刺激）ではその分泌に優位な差は認められなかったものの、低濃度のグルタミン酸刺激などの比較的弱い刺激条

件で視床下部へのセロトニン分泌が顕著に低下していることがわかった。一般に視床下部ではセロトニン神経系の作用により、CRF 合成・分泌が高まることが知られている。さらにこれに伴い、視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系 (HPA-axis) が賦活化されるとされている。そこで我々は次に STX1A 欠損マウスでの HPA-axis の制御について検討した。そのために、定常状態のマウスより血液を採取し、血漿中のホルモンの量を測定した。興味深いことに、STX1A 欠損マウスではコルチコステロンおよび ACTH の量が顕著に低下していた。この結果は STX1A 欠損マウスでの HPA-axis の機能低下を示唆していると思われる。そこで次に、ストレスに対する応答について検討した。本研究では、穏やかなストレス刺激を与える手法として一般に用いられる拘束ストレスを負荷した。これまでに報告されていたように、正常マウスでは急性の拘束ストレスにより血漿中の ACTH 量が一過性に (30 ~ 60 分) 上昇した。しかしながら、STX1A 欠損マウスではその上昇が顕著に抑制されていた。またさらに、ストレス応答について行動学的解析もあわせて行った。そのために、慢性の拘束ストレス (1 日 1 時間の拘束ストレスを 3 日間) の負荷を行った。正常マウスでは、行動量の低下および巣の滞在時間延長といった行動の変化が見られた。このような変化は慢性拘束ストレス刺激に適応するためのものだと考えられる。それに対し、STX1A 欠損マウスではこのような行動量の変化は見られなかった。これらの解析から、STX1A 欠損マウスではストレス刺激に対する適切な応答ができないことが明らかとなった。このような障害と STX1A 欠損マウスでみられる自閉症の患者と類似した行動異常の関連について引き続き検討を行っている。

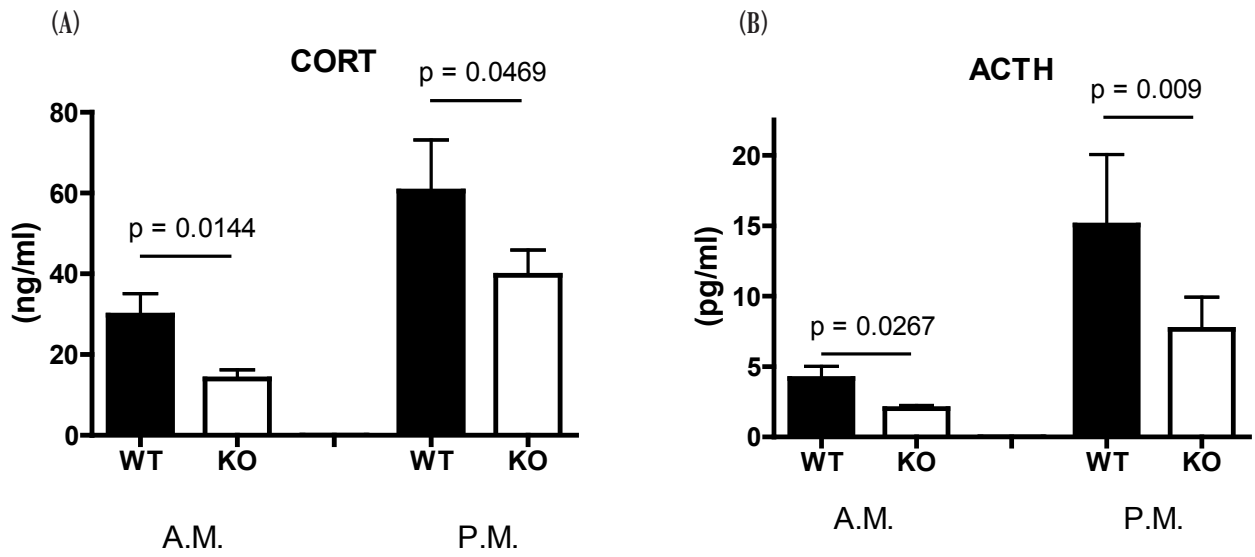


図 STX1A 欠損マウスの血漿中ホルモン濃度
(A) コルチコステロン, (B) ACTH の午前 (AM) と午後 (PM) の血漿中濃度。
STX1A 欠損マウスでは正常マウスと比べ血漿中濃度がいずれも有意に低下していた。

報 告

虚血性筋肉痛における酸感受性イオンチャネル 3 (ASIC3) の役割

八 木 淳 一

杏林大学医学部統合生理学

緒 言

虚血下で筋を収縮させると途端に強い痛みが起こる。「閉塞性動脈硬化症」, 「Buerger 病」で起こる間歇性跛行の痛みがその典型である。しかしながら, 虚血性筋収縮時の痛みの発生機序については, これまで有用な実験法がなく, その詳細は未だ明らかにされていない。そこで, 「骨格筋の虚血性筋収縮時, 脊髄後根神経節 (DRG) ニューロンに発現する酸感受性イオンチャネル 3 (ASIC3) が, 虚血による細胞外液の酸性化を感知し, 骨格筋の痛みを起こす」との仮説を立てた。本研究では, 独自に開発した「麻酔下全動物標本による DRG ニューロンのホールセルパッチクランプ記録法」を骨格筋を支配する DRG ニューロン (SK-DRG ニューロン) に適用し, この仮説の検証を試みた。

方 法

SK-DRG ニューロンの細胞体を標識する目的で, ラット (SD 系, 雌, 6 週齢) をネンブタール (50 mg/kg, ip.) で麻酔し, 左後肢の前脛骨筋に DiI (2.5 mg/ml, 5 μ l) を注入した。DiI 注入から 3 ~ 6 週間後, ラットをネンブタールで再び麻酔し, 椎弓切除を行い, 左側の L4 レベルの DRG (L4-DRG) を露出した。さらに, L4-DRG に続く坐骨神経を膝関節部まで露出し, 側枝を切断しながら剥離して 1 本の神経幹とした。L4-DRG 中枢端を切除し, ラットを正立顕微鏡のステージにマウントした後, L4-DRG をステージ上のチェムバー内に固定した。チェムバー内は, 人工脳脊髄液を灌流した。DiI 陽性ニューロン (すなわち, SK-DRG ニューロン) からホールセルパッチクランプ記録を行った (図 1 A)。

結 果

1. 麻酔下全動物標本にて, 小型の細胞体 (直径: 26 ~ 29 μ m) 並びに C 線維 (伝導速度 < 1 m/sec) を有する

(C-type) SK-DRG ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行った。Von Frey フィラメントで筋肉上の受容野を刺激するといずれも強い刺激に応答する高閾値型であった。記録した 8 個の C-type SK-DRG ニューロン中 4 個は, 温刺激 (39 ~ 41°C) に応じた。すなわち, 高閾値機械受容型 (C-HTM; n = 4) と温受容 - 高閾値機械受容型 (C-Warm-HTM; n = 4) を記録した。C-HTM と C-Warm-HTM の活動電位の形状は, いずれも幅が広く, 下降相に顕著な屈折点が認められた (図 1 Ba)。電位固定モードで過分極パルスを与えると, 緩徐な過分極誘発内向き電流 (H 電流) がわずかに生じた (図 1 Bb)。

2. C-type SK-DRG ニューロンにおいて, その膜電位を記録しながら, 前脛骨筋を虚血状態にし, さらに虚血下で筋収縮を起こす実験を行った。C-HTM 4 個中 3 個, C-Warm-HTM 4 個中 3 個が虚血性筋収縮下で興奮した (図 1 C)。虚血性筋収縮時に興奮した SK-DRG ニューロンの細胞体に, 電位固定モードで酸性液 (pH 5) を投与すると, 一過性の内向き電流が記録された (図 1 Bc)。電流応答の脱感作の時定数が 1 秒以下であることから, この電流応答は ASIC3 の活性化による Na⁺ 電流であると推察された。

まとめと考察

麻酔下のラットにおいて SK-DRG ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行う新規の技法を開発した。今回の実験で記録した SK-DRG ニューロンは, 1) C 線維を有する, 2) HTM タイプ, 3) 活動電位の幅が広い, 4) わずかな H 電流を生じる, などの特性から侵害受容性ニューロンと考えられた。また, これらのニューロンの多くが虚血性筋収縮時に放電した。したがって, この放電が虚血性筋収縮時の痛みを伝えるシグナルと考えられる。さらに, 虚血性筋収縮時に興奮する

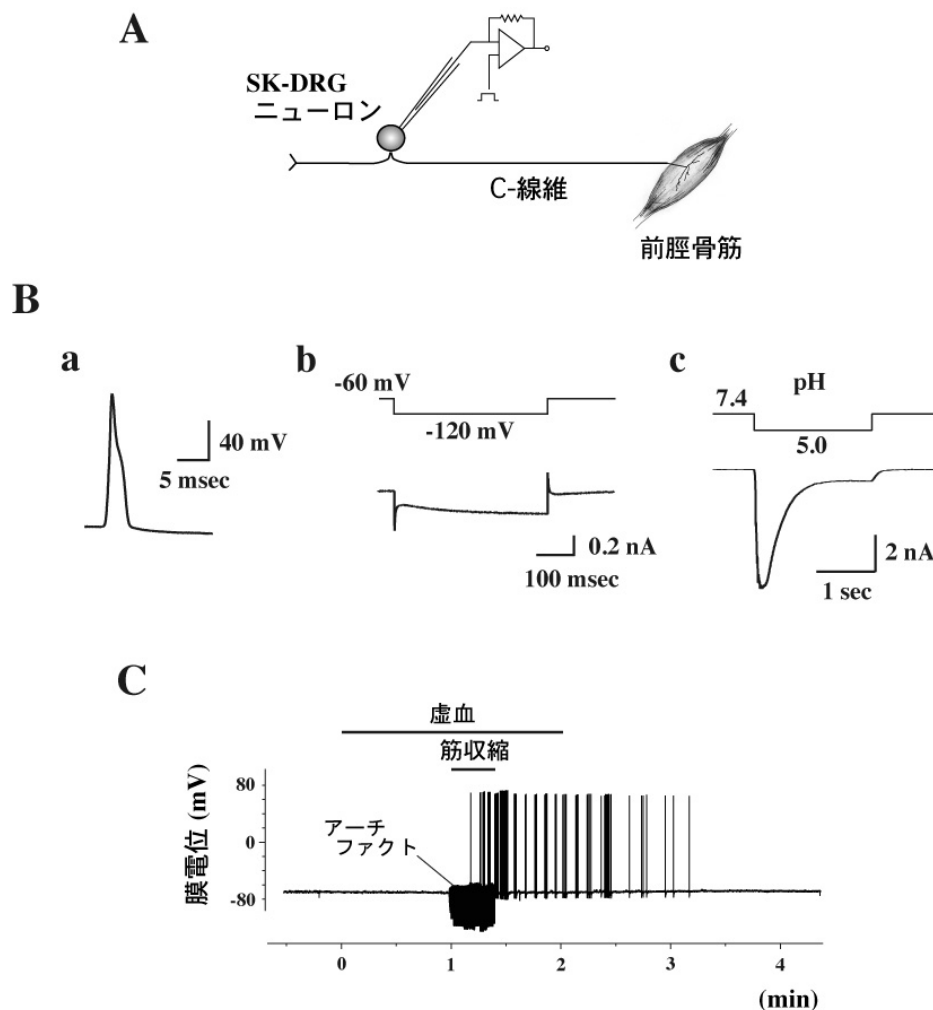


図1 SK-DRG ニューロンのホールセルパッチクランプ記録例

SK-DRG ニューロンの細胞体には、ASIC3 が発現していることが示唆された。ASIC 3 は、ASIC のサブタイプの中で酸に対して最も感度が高く、細胞外のわずかな酸性化 (pH 7.0) を感知し、持続的な内向き Na^+ 電流を発生することでニューロンを脱分極させることがわかっている (Yagi ら, *Cir.Res.*, 2006)。よって、当初の仮説通り、ASIC3 が虚血性筋収縮時の組織酸性化を感知して SK-DRG ニューロンを興奮させる可能性が示された。しかし、現段階では、記録の例数も少なく、虚血性筋収縮時の ASIC3 の活性化と SK-DRG ニューロンの放電を結びつける直接的証拠は得られていない。今後の戦略として、1) SK-DRG ニューロンの系統的分類 (どのタイプが虚血性筋収縮時に興奮するのか)、2) ASIC3 の発現量あるいは虚血性筋収縮時の筋内部の pH 値が、SK-DRG ニューロンの興奮とどのような相関関係にあるのか、3) SK-DRG ニューロンの受容野に、pH 緩衝液、ASIC3 阻害剤を注入した場合に、虚血性筋収縮時の SK-DRG ニューロンの反応がどのように変化するのか、等を分析することにより、虚血性筋収縮時の侵害情報処理機構の解明を目指したい。

論 文

- 1) 八木淳一, 小林靖¹, 平井直樹 (¹防衛医, 解剖): 麻酔下全動物標本による「骨格筋 DRG ニューロン」のホールセルパッチクランプ記録, *Pain Research* 24(3):109-116, 2009.

学 会 発 表

- 1) J. Yagi: In vivo patch-clamp recordings of rat DRG neurons. The Spring Pain Conference 2008, Grand Cayman, Apr. 26th - May 3rd 2008.
- 2) J. Yagi, Y. Kobayashi¹ and N. Hirai (¹Dept Anat, National Defense Med College): Classification of Cutaneous DRG neurons by In Vivo Patch Clamp Recording. The 3rd Asian Pain Symposium, Fukuoka, Jul. 18-19, 2008. (ポスター賞受賞)
- 3) 八木淳一, 小林靖¹, 平井直樹 (¹防衛医, 解剖): 麻酔下全動物標本による「骨格筋 DRG ニューロン」のホールセルパッチクランプ記録, 第 30 回日本疼痛学会, 福岡, 2008 年 7 月 19-20 日 (優秀演題に選出)
- 4) J. Yagi, Y. Kobayashi¹ and N. Hirai (¹Dept Anat, National Defense Med College): In vivo patch clamp recording from musculoskeletal DRG neurons in rats. 12th World congress on pain, Glasgow, Scotland, Aug. 17-22, 2008.
- 5) 八木淳一: 虚血性筋肉痛における酸感受性イオンチャネル 3 (ASIC3) の役割, 第 37 回杏林医学会総会・平成 20 年 11 月 15 日 (杏林大学研究奨励賞受賞; 中間発表会)

厚生労働省多目的コホート研究における 白内障，緑内障および加齢黄斑変性のリスク要因と 一次予防対策解明のための分析疫学的研究

吉 田 正 雄

杏林大学医学部衛生学公衆衛生学

研究の目的

1990 年にスタートした厚生労働省多目的コホート研究（Japan Public Health Center-based Prospective Study: JPHC Study）の対象地域の住民について質問票調査，眼科検診（簡易視野測定検査）を実施し，白内障，緑内障および加齢黄斑変性の症例をもれなく無症状の段階から早期発見するとともに，これらの疾患とベースライン（コホートⅠは 1990 年，コホートⅡは 1993 年），開始 5 年後，10 年後，15 年後，20 年後（コホートⅠは 2010 年，コホートⅡは 2013 年に実施予定）の各時点において入手された生活習慣情報，栄養摂取情報等の暴露要因との関連をコホート研究により検討することにより，これらの疾患のリスク要因と一次予防対策に資する情報を明らかにする。

研究コホートおよび対象者

本研究の対象者は，JPHC Study におけるコホートⅠ対象地域（岩手県二戸保健所管内，秋田県横手保健所管内，長野県佐久保健所管内，沖縄県石川保健所管内）に居住する住民 54,498 名，コホートⅡ対象地域（茨城県水戸保健所管内，新潟県柏崎保健所管内，高知県中央東保健所管内，長崎県上五島保健所管内，沖縄県宮古保健所管内）に居住する住民 62,398 名の計 116,896 名である。対象者の研究開始時における年齢は，コホートⅠは 40 歳以上 60 歳未満（1930 年 1 月 1 日から 1949 年 12 月 31 日に生まれた者），コホートⅡは 40 歳以上 70 歳未満の者（1923 年 1 月 1 日から 1952 年 12 月 31 日に生まれた者）である。

結果

平成 20 年度は，平成 18 年度にコホートⅠの佐久保健所管内の住民を対象に実施した眼科検診（簡易視野測定検査）によって得られたデータの集計と視野に異常が

認められた受診者への精密検査受診の勧告を行った。対象は，コホートⅠの佐久保健所管内（佐久市，佐久穂町，小海町，南牧村，川上村，南相木村，北相木村）に居住する住民である。対象者の 2006 年時における年齢は 56 歳から 75 歳である。眼科検診は，南佐久郡において通年的に実施されている市町村集団健康検診の中で実施した。眼科検診を実施するにあたり，事前に住民への徹底した広報を行った上で，集団健康検診を受診した際に書面を以って，眼科検診受診時に本調査の意義と内容を，すべての受診者に対して十分説明した。本調査研究への参加の同意が得られた者からは署名を受け取り，十分な説明に基づく同意獲得の下で，問診票調査と FDT（Frequency Doubling Technology）による簡易視野測定検査を実施した。簡易視野測定検査の結果は，検査終了後に検診会場にて個別に説明し，さらに後日，文書にて受診者に通知した。視野に異常所見が認められた受診者については地元眼科医療機関への紹介状と返信用封筒を添付した。返信が得られなかった者に対しては，再度紹介状と返信用封筒の送付を行った。眼科検診の受診者数は，佐久市 659 名，南相木村 154 名，小海町 476 名，川上村 291 名，南牧村 277 名，北相木村 149 名，佐久穂町 567 名の計 2,573 名で，このうち視野に異常所見が認められた者は，佐久市 76 名（11.5%），南相木村 18 名（11.7%），小海町 52 名（10.9%），川上村 24 名（8.2%），南牧村 34 名（12.3%），北相木村 16 名（10.7%），佐久穂町 59 名（10.4%）の計 279 名（10.8%）であった。現在までに，視野に異常がみられた 278 名（文書での結果の郵送を希望しなかった 1 名を除く）のうち，佐久市 51 名（68.0%），南相木村 12 名（66.7%），小海町 36 名（69.2%），川上村 17 名（70.8%），南牧村 27 名（79.4%），北相木村 13 名（87.5%），佐久穂町 45 名（76.3%）の計 201 名（72.3%）について精密検査の結果が得られている。精密検査の診

Table 1. Age-Adjusted and Multivariate Odds Ratios (ORs) with 95% CIs for Cataract Diagnosis and Extraction According to Energy-adjusted Vitamin C Intake by Quintile in Middle-aged Japanese Men and Women

	Quintiles of Energy-Adjusted Vitamin C†					<i>P</i> for Trend
	1 (Low)	2	3	4	5 (High)	
Men						
Cataract diagnosis						
No. of cases	54	46	47	40	29	
Age-adjusted OR (95% CI)	1.00	0.93 (0.63-1.35)	0.96 (0.68-1.37)	0.87 (0.61-1.22)	0.69 (0.45-1.02)	0.109
Multivariate OR* (95% CI)	1.00	0.91 (0.64-1.30)	0.94 (0.68-1.35)	0.83 (0.58-1.18)	0.65 (0.42-0.97)	0.094
Cataract extraction						
No. of cases	27	24	23	21	15	
Age-adjusted OR (95% CI)	1.00	1.05 (0.72-1.69)	0.96 (0.65-1.49)	0.92 (0.60-1.47)	0.75 (0.47-1.26)	0.186
Multivariate OR* (95% CI)	1.00	1.00 (0.70-1.63)	0.94 (0.64-1.46)	0.88 (0.58-1.42)	0.70 (0.44-1.20)	0.177
Women						
Cataract diagnosis						
No. of cases	132	120	112	110	77	
Age-adjusted OR (95% CI)	1.00	0.94 (0.65-1.33)	0.84 (0.66-1.09)	0.82 (0.64-1.06)	0.55 (0.35-0.86)	0.028
Multivariate OR* (95% CI)	1.00	0.97 (0.67-1.38)	0.87 (0.68-1.13)	0.84 (0.67-1.11)	0.59 (0.43-0.89)	0.047
Cataract extraction						
No. of cases	47	44	34	35	27	
Age-adjusted OR (95% CI)	1.00	0.98 (0.73-1.38)	0.74 (0.50-1.09)	0.79 (0.53-1.16)	0.61 (0.46-0.90)	0.055
Multivariate OR* (95% CI)	1.00	0.97 (0.71-1.39)	0.80 (0.52-1.21)	0.80 (0.51-1.24)	0.64 (0.41-0.94)	0.042

†Energy was adjusted by residual model for intake.

*Multivariate model adjusted for age, BMI (<21.0, 21.0-22.9, 23.0-24.9, and >25.0), history of hypertension and diabetes (yes or no), alcohol intake (g/week ethanol: non-drinkers and infrequent occasional drinkers for men and women, 1-299 for men and 1-59 for women, and > 300 for men and > 60 for women), cigarette smoking (non-smokers, current smokers, and ex-smokers), and PHC area.

断結果が得られた 201 名のうち、多かった眼疾患は、緑内障 (68 名)、白内障 (31 名)、網膜静脈分枝閉塞症 (17 名)、強度近視 (14 名) などであった。緑内障 (疑いを含む) は 70 名 (緑内障 68 名、緑内障の疑い 2 名) であったが、このうち 56 名 (緑内障 54 名、緑内障の疑い 2 名) が今回の眼科検診により初めて緑内障が発見された。また、加齢黄斑変性は 7 名が今回の眼科検診により初めて発見されたが、このうち 4 名が今回の眼科検診により初めて加齢黄斑変性が発見された。

また、コホート I 地域の住民 35,186 名を対象に、ビタミン C 摂取量と白内障との関連について解析した結果、ビタミン C 摂取量が増加するに従い、発症リスクが低くなる傾向が認められた (Table 1)。さらに、全コホート地域の住民 79,369 名を対象に、BMI と白内障と

の関連について解析した結果、BMI が上昇するに従い、発症リスクが高くなる傾向が認められた (Table 2)。

今後の研究計画

JPHC Study コホートにおいて申請者らが行った白内障研究における白内障診断の妥当性研究と同様に (図 1 参照)、本研究においても解析に先立ち、2009 ~ 2010 年に緑内障および加齢黄斑変性の診断に対する妥当性研究を実施する。対象者本人の同意を獲得した後、地元眼科医療機関において診療録調査を実施し、緑内障および加齢黄斑変性のスクリーニングの手段として FDT による簡易視野測定検査が妥当であるかどうか、精密検査による確定診断と比較し、スクリーニング結果判断の妥当性を検証する。

Table 2. Age-adjusted and multivariate odds ratios (ORs) with 95% CIs for cataract diagnosis according to body mass index in middle-aged Japanese men and women

Body Mass Index							<i>p</i> for trend
<19.0	19.0 - 20.9	21.0 - 22.9	23.0 - 24.9	25.0 - 26.9	27.0<		
Men							
No. of cases	34	97	178	213	143	101	
Age-adjusted OR	1	1.11	1.30	1.33	1.62	1.68	<0.001
(95% CI)	(Reference)	(0.75-1.65)	(0.90-1.88)	(0.92-1.91)	(1.11-2.35)	(1.14-2.48)	
Multivariate OR †	1	1.10	1.26	1.24	1.46	1.46	0.007
(95% CI)	(Reference)	(0.74-1.64)	(0.87-1.82)	(0.87-1.80)	(1.00-2.14)	(0.98-2.17)	
Women							
No. of cases	79	172	374	363	252	241	
Age-adjusted OR †	1.04	1.15	1.15	1.21	1.33	0.055	0.105
(95% CI)	(Reference)	(0.80-1.34)	(0.90-1.45)	(0.91-1.46)	(0.95-1.55)	(1.04-1.70)	
Multivariate OR †	1	0.95	1.05	1.02	1.10	1.22	0.105
(95% CI)	(Reference)	(0.72-1.24)	(0.81-1.34)	(0.80-1.31)	(0.85-1.41)	(0.97-1.55)	

† Multivariate model adjusted for age, history of hypertension and diabetes (yes or no), alcohol intake (g/week ethanol, ALC_0: non- infrequent occasional drinkers, ALC_1: 1-299 in men and 1-59 in women, ALC_2: >300 in men and >60 in women), cigarette smoking (non-smokers, current smokers, and ex-smokers), and PHC area.

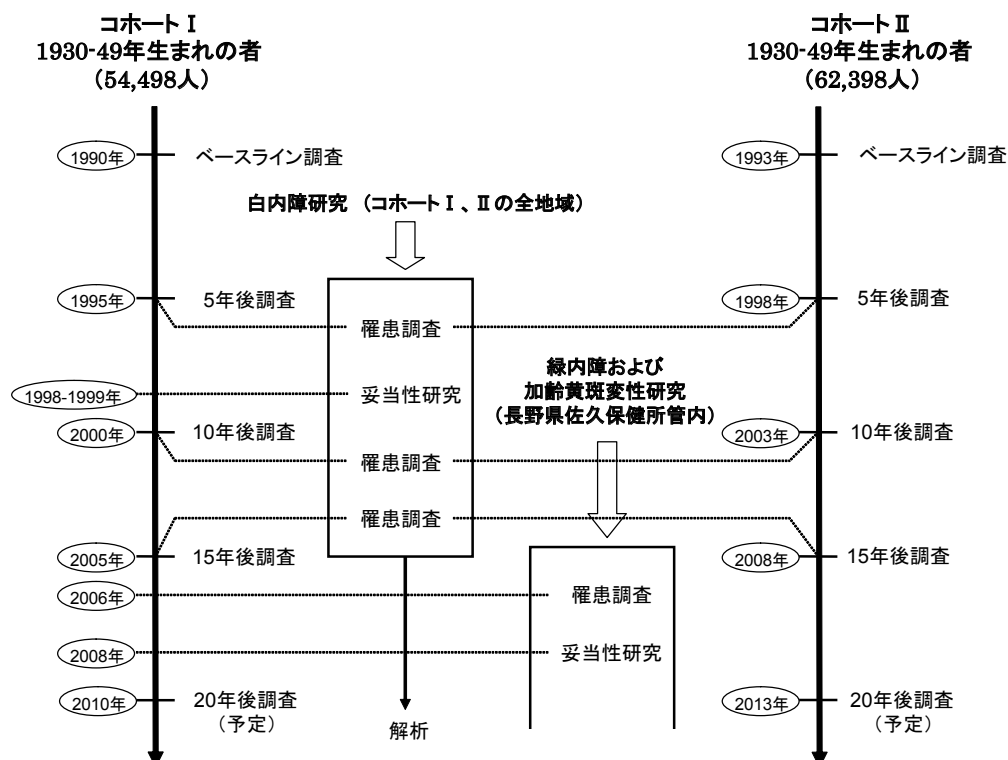


図 1. 厚生労働省多目的コホートにおける眼科疾患研究の研究計画