

単球に対するTNF阻害薬の効果の検討

東野 俊洋, 相原 智子, 星山 隆行, 有沼 良幸, 永井 立夫, 廣畑 俊成

北里大学医学部膠原病・感染内科学

背景及び目的: 生物学的製剤はIL-6やTNF α などの炎症性サイトカインの抑制を機序として関節リウマチの治療に大きな変革をもたらした。しかしながらいくつかの*in vitro*の研究結果では、これら生物学的製剤の免疫担当細胞に対する直接的な効果が報告されており、関節リウマチに対する詳細な効果のメカニズムにおいてはいまだに不明な点が多い。一方、関節リウマチの病態形成において、単球の異常が重要な役割を担っているであろうということは以前から指摘されている。本研究においては、生物学的製剤であるエタネルセプト、インフリキシマブの単球に対する影響を検討することで、これら生物学的製剤の関節リウマチに対する効果の詳細を検討した。

方法: 健康人ボランティアより末梢血を採取し、ファイコール比重遠心法にて末梢血単核球を分離した。その後、磁気ビーズ法により単球を単離し、staphylococcal enterotoxin B (SEB)の存在下で、治療域の濃度に調節したエタネルセプト、インフリキシマブ、もしくは対照としての健康人IgGを添加してそれぞれ培養をおこなった。単球のアポトーシスに関してはannexin Vおよびpropidium iodide (PI)で染色を行い、フローサイトメトリーで検討した。CD80及びCD86の発現に関してもフローサイトメトリーで検討を行った。細胞の培養上清中のIL-6濃度に関してはELISA法で検討を行った。IL-6のmRNAの発現に関してはRT-PCR法で測定を行った。

結果: エタネルセプト、インフリキシマブのすべてで、SEB刺激単球に対してアポトーシスを引き起こすことが確認された。また、これらの効果は健康ヒトIgGの添加によって阻害されるが、IgG F(ab)₂の添加によっては阻害されなかった。これらの結果から、エタネルセプト、インフリキシマブの単球に対するアポトーシス効果は、IgG-Fc部分を介して引き起こされる可能性が示唆された。また、エタネルセプトとインフリキシマブはSEB刺激単球のCD80およびCD86の発現を有意に抑制した。また、これらSEB刺激単球の培養上清中IL-6の濃度は、エタネルセプトとインフリキシマブでは対照群に比べて有意に減少していた。これらSEB刺激単球において、IL-6のmRNAはエタネルセプト、インフリキシマブのすべてで対照群と比較し有意に減少していることが確認された。

結論: 以上の結果より、これらのTNF α 阻害薬はヒトの単球に対してアポトーシスを引き起こすという直接的な効果を持っており、またその効果は単球表面のFc受容体を介して引き起こされる可能性が強く示唆された。また、細胞上清中IL-6およびIL-6のmRNAはエタネルセプト、インフリキシマブのすべてで減少しており、関節リウマチに対する効果と矛盾しないことが確認された。

Key words: 単球, TNF阻害薬, アポトーシス, mRNA, IL-6

進行胃癌における原発巣内での遺伝子発現の比較

成毛 哲¹, 東 瑞智¹, 竹内 敦子¹, 三枝 信², 小泉 和二郎¹

¹北里大学医学部消化器内科

²北里大学医学部病理学

背景: 本研究は、前治療のないステージII～III進行胃癌の手術検体を用い、特に原発巣において腫瘍内の位置毎の遺伝子発現の差異を明らかにすることを目的として行われた。

方法: 2001年1月から2004年3月までに北里大学東病院にてステージII～III進行胃癌に対し定型的胃切除術が施行された連続的な29例を対象に、ホルマリン固定パラフィン切片の胃切除検体から、laser-captured microdissectionを用いて以下の3箇所より組織を採取した: ①正常粘膜部, ②原発巣表層部(原発巣の粘膜層), ③原発巣先進部(原発巣筋層以深で腫瘍の最も先進した部分)。遺伝子発現に関しては定量的リアルタイムPCRにて測定した。標的遺伝子はフルオロピリミジン代謝関連遺伝子として、チミジレートシンターゼ(TS), チミジンホスホリラーゼ(TP), デヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(DPD), 血管新生因子として、上皮増殖因子受容体(EGFR), 血管内皮細胞増殖因子(VEGF), 低酸素誘導因子-1 α (HIF1 α)を選択した。

結果: 原発巣先進部のTP, EGFR, HIF1 α の遺伝子発現は、原発巣表層部よりも有意に高くなっており、また、全ての標的遺伝子において、遺伝子発現と採取部位に正の相関を認めた。

結論: 腫瘍細胞内のいくつかの遺伝子はその位置する部位により発現が変化し、その発現は深度が深くなるほど高くなることが示された。

Key words: 進行胃癌, 深度別遺伝子発現, レーザーキャプチャーマイクロダイセクション

北里式OCTによる上鼻側と上耳側における強膜勾配の比較検討

笠原 正行^{1,3}, 庄司 信行^{1,2}, 森田 哲也³, 清水 公也^{1,3}

¹北里大学大学院医療系研究科臨床医科学群眼科学

²北里大学医療衛生学部リハビリテーション学科視覚機能療法学

³北里大学医学部眼科学

目的: トラベキュレトミーにおける強膜弁作成部位にあたる上鼻側と上耳側の強膜の形状の違いについては、これまで報告がない。筆者らは上鼻側と上耳側強膜の形状の相違について前眼部OCTを用いて比較検討したので報告する。

方法: 対象は白内障、屈折異常以外に眼科的疾患を有さない22例38眼とした。対象の平均年齢は63.8 \pm 15.7歳(28～80歳)であった。北里式前眼部OCTを用い、瞳孔中心を通る水平な線から、それぞれ60度の上鼻側と上耳側の強膜を同一検者が3回ずつ撮像し、平均値を採用した。画像解析ソフトImage J (National Institute of Health; Bethesda, MD, USA)を用いて強膜表面の曲率半径と強膜凸部分の面積を算出し、上鼻側群(N群)と上耳側群(T群)とで比較検討した。統計学的検討にはMann-WhitneyのU検定を用いて行い、危険率5%未満を統計学的有意とした。

結果: 強膜曲率半径は、N群, T群でそれぞれ、39.6 \pm 10.9 mm, 19.2 \pm 3.8 mmであった。T群に比べN群において有意に長い結果となった(P<0.001)。強膜凸部分面積は、N群, T群でそれぞれ、0.32 \pm 0.1 mm², 0.61 \pm 0.1 mm²であった。T群に比べN群において有意に小さい結果となった(P<0.001)。

結論: 前眼部OCTを用いて強膜の形状を解析した。強膜の勾配は上耳側に比べ上鼻側の方がなだらかであることが分かった。

Key words: 緑内障, 光干渉断層像, 強膜形状, 曲率半径, 線維柱帯切除術

三次元高密度培養法を用いた肝組織の再構成

細谷 智¹, 渡邊 昌彦¹, 上野 正樹², 安達 栄治郎³

¹北里大学医学部外科学

²北里大学医療衛生学部基礎医学部門解剖・組織学

³北里大学大学院医療系研究科細胞組織再生医学

目的: 高密度コラーゲン細線維モデル組織間に培養ヒト肝癌由来細胞 (HepG2) を包埋して肝組織 (高密度サンドイッチ型包埋肝組織) の再構成を試みた。

方法: アテロI型コラーゲン (0.5 mg/ml) を含む氷冷したDMEM液45 mlにてリアクターを還流した。還流開始1時間後に包皮由来線維芽細胞 (HFO, 1.0×10^7) 懸濁液5 mlをリザーバーボトルに投入して還流を継続した。還流開始5時間後にDMEM液45 mlに交換してヒト肝癌由来細胞 (HepG2, 3.0×10^7) 懸濁液5mlをリアクター上流から5分間かけて投入した。還流開始8時間後には氷冷したアテロI型コラーゲン (0.25 mg/ml) を含むDMEM液50 mlに交換して還流を継続した。還流開始11時間後に再構成した高密度サンドイッチ型包埋肝組織をPLAシートとともに新しいステンレス鋼製シリンダーに移し, DMEM液50 mlにて3日間還流した。高密度サンドイッチ型包埋肝組織は定法に従って固定, 脱水, 包埋, 薄切, 染色して走査あるいは透過電顕的, 光顕的に観察した。

結果: 高密度サンドイッチ型包埋肝組織は白色で光沢のある直径17 mm厚さ0.5~1.0 mmの円盤状組織を構成していた。高密度サンドイッチ型包埋肝組織は2枚の高密度コラーゲン細線維層 (厚さ0.1~0.3 mm) をそれに挟まれた細胞層 (厚さ0.2~0.3 mm) から構成されていた。透過電顕で観察したところ球状ないし卵円状のHepG2細胞内には多くの粗面小胞体, ミトコンドリア, ゴルジ装置が観察された。細胞間には毛細胆管が観察された。

結論: 高密度培養システムを用いることにより11時間でHepG2細胞 ($2.0 \sim 3.0 \times 10^7$) を再構成した高密度コラーゲン組織内に包埋することが出来た。本研究により11時間で人工肝組織を再構成することができ, 実験動物の代替組織や部分肝移植などに応用可能と思われる。

Key words: 人工肝組織, コラーゲン細線維, バイオリアクター, HepG2細胞

運動負荷後の脈波伝搬速度の変化から評価した機能的動脈硬化度は 糖尿病合併/非合併高血圧症患者の動脈硬化の重症度を反映する

小倉 彩^{1,2}, 亀川 大輔¹, 神谷 健太郎¹, 清水 良祐¹,
秋山 綾子¹, 鎌田 裕実¹, 田中 伸弥¹, 増田 卓^{1,2}

¹北里大学大学院医療系研究科臨床医科学群循環器内科学

²北里大学医療衛生学部リハビリテーション学科

目的: 高血圧症 (HT) 患者において、運動負荷前後の上腕足首脈波伝搬速度 (ba-PWV) の変化によって評価した機能的動脈硬化度が、器質的な動脈硬化の指標である頸動脈内膜中膜複合体肥厚 (cIMT) を反映するか否かを検討した。

方法: 本態性HT患者を、糖尿病 (DM) の有無によってHT群 (N = 102, 62 ± 10歳) とHT + DM群 (N = 76, 62 ± 9歳) とに分類した。中等度負荷を用いた19分間の自転車エルゴメータ運動の前後でba-PWVを測定し、その差 (Δ PWV) を機能的動脈硬化度の指標とした。各群の患者を運動後にba-PWVが低下した Δ PWV (-) 群と、不変あるいは上昇した Δ PWV (+) 群とに分類し、cIMTを比較した。また、cIMTを従属変数、 Δ PWV、臨床的背景因子、血管内皮機能および自律神経活動を独立変数としたステップワイズ法による重回帰分析を行った。

結果: HT群とHT + DM群のcIMTは、 Δ PWV (-) 群と比較して Δ PWV (+) 群で有意に高値を示した ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。重回帰分析の結果、年齢 ($\beta = 0.314$, $P < 0.001$)、 Δ PWV ($\beta = 0.257$, $P < 0.001$) およびHDL-コレステロール ($\beta = -0.205$, $P < 0.01$) がcIMTの有意な規定因子であった ($R^2 = 0.21$, $P < 0.001$)。

結論: 機能的動脈硬化度はHT患者の動脈硬化の重症度を反映することが示された。

Key words: 高血圧症, 糖尿病, 動脈硬化, 上腕足首脈波伝搬速度, 頸動脈内膜中膜複合体肥厚, 機能的動脈硬化度

ピロカルピン処理マウスでは、持続的なカルパインの活性化に伴って 海馬神経細胞の細胞死が誘発される

板倉 誠, 大城戸 太朗, 高橋 正身

北里大学医学部生化学

目的: げっ歯類に対するピロカルピン投与は、てんかん重積後に、海馬神経変性や側頭葉てんかん様の自発的てんかんを引き起こす。本研究では、遺伝子改変動物によく用いられるC57BL/6Nマウスを用いて、ピロカルピン処理後の海馬神経細胞死のメカニズムを検討した。

方法: C57BL/6Nマウスへのピロカルピン投与によるてんかん重積を、てんかん重積1.5時間あるいは4.5時間経過後に抗てんかん薬によって停止した。その後、神経細胞のマーカーであるNeuNの抗体を用いて、免疫染色を行った。また、ピロカルピン処理後のさまざまな日数におけるNMDA型グルタミン酸受容体の発現を免疫プロットングによって検討した。

結果: てんかん重積4.5時間マウスでは、重積4日後に海馬CA1領域において顕著な神経細胞死が観察された。非常に興味深いことにてんかん重積1.5時間マウスでは、海馬の神経細胞死は、ほとんど見られなかった。NMDA型グルタミン酸受容体のサブユニットGluN2A, GluN2Bはカルパインによって切断されることが報告されている。てんかん重積4.5時間マウスでは、重積後1, 4, 18日の海馬において、C末側が切断されたGluN2A, GluN2Bの増加が観察された。これに対して、てんかん重積1.5時間マウスでは4日後ではC末側が切断されたGluN2の増加が観察されるが、18日後にはコントロールレベルに戻っていた。また他のカルパイン基質であるスペクトリンやCDK5の活性化ユニットp35も同様の切断パターンを示した。

結論: てんかん重積4.5時間のマウスでは、てんかん重積後カルパインの活性化が持続する。この持続的なカルパインの活性化が海馬CA1領域の神経細胞死を誘発すると考えられる。

Key words: てんかん, ピロカルピン, NMDA型グルタミン酸受容体, カルパイン

原 著

Kitasato Med J 2014; 44: 167-173

ラット海馬においてAMPA型受容体結合膜タンパク質 γ -8は SNAREタンパク質複合体と結合している

板倉 誠, 菅谷 津貴子, 高橋 正身

北里大学医学部生化学

目的: AMPA型受容体結合膜タンパク質TARPはAMPA型グルタミン酸受容体と結合し, その小胞輸送やイオンチャネル活性を制御している。そこでAMPA型受容体の輸送や局在を制御する機構を明らかにするために, TARP γ -8に結合しているタンパク質を, 質量分析法を用いて同定した。

方法: ラット海馬P2から抗 γ -8抗体を用いて免疫沈降を行い, その沈降物を質量分析法とイムノブロット法によって解析した。次に γ -8とそれぞれのタンパク質の結合を確認するために, COS-7細胞への一過的な強制発現実験を行った。

結果: 抗原ペプチドとして70-84残基と358-372残基それぞれを用いた2種類の抗 γ -8抗体を用いて, ラット海馬P2分画から免疫沈降を行ったところ, SNAREタンパク質Syntaxin-1, SNAP-25, VAMP-2が共沈してきた。COS-7細胞への強制発現実験の結果, γ -8はSyntaxin-1を介してSNAREタンパク質と結合していることがわかった。さらに γ -8以外のTARPファミリータンパク質もSyntaxin-1と結合活性を持っていた。細胞染色実験を行うと γ -8とSyntaxin-1はCOS-7細胞において共局在を示した。

結論: 本研究ではラット海馬においてTARP γ -8が, SNAREタンパク質Syntaxin-1に結合していることを示した。この結合は, AMPA受容体とTARP γ -8とのアッセンブリーや局在化に重要な役割をしている可能性がある。

Key words: AMPA型受容体, AMPA型受容体結合膜タンパク質, γ -8, Syntaxin-1

原 著

Kitasato Med J 2014; 44: 174-177

口腔血管腫に対するエタノール注入療法

落合 敦, 中山 明仁, 岡本 牧人

北里大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

目的: 合併症なしに口腔血管腫を治療する。

方法: 23 G針で血管腫内の血液を吸引除去した後, 新しい23 G針で99%エタノールを0.1~0.2 ml注入した。血管腫が広範囲な場合, 注入療法を繰り返した。

結果: 注入後一時的に局所の疼痛, 浮腫を来たしたが, 速やかに血管腫は縮小した。その後血管腫の増大や再発を認めず, 疼痛, 腫脹や変形等の合併症もなく良好な治療効果が得られた。

結論: 手技が簡便であり, 病変部以外の組織障害が避けられ, 患者への侵襲が少ない本法は有用な治療法と考えられた。

Key words: エタノール注入療法, 口腔血管腫, 吸引

成人鼠径ヘルニア手術におけるmesh plugと 腹膜前腔剥離を必要とするmesh使用に関する検討

渡辺 栄一郎^{1,2}, 宮本 匠¹, 徳家 敦夫¹, 小坂 愉賢², 武田 憲子²

¹島根県立中央病院外科

²北里大学医学部外科学

背景: 鼠径ヘルニア手術は外科手術の中で最も基本となる手術手技のひとつである。今回われわれは、過去5年間で経験した鼠径ヘルニア手術症例の臨床像を検討した。

方法: 2006年1月～2010年12月の5年間で経験した成人鼠径ヘルニア手術について検討した。初めの4年間はmesh plugを主に使用し、最後の1年間はULTRAPRO® plugとULTRAPRO® Hernia Systemを主に使用した。統計学的有意差検定はFisherの直接検定を用いて行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結果: 2006年～2009年の4年間で460病変に対して手術を行った。合併症は122例 (26.5%) で、血腫17例 (3.7%) および再発21例 (4.6%) を含んでいた。2010年の1年間で129病変に対して手術を行った。合併症は22 (17.1%) 例で、血腫9例 (7.0%) および再発2例 (1.6%) を含んでいた。

結論: 術前ヘパリン投与 ($P < 0.01$) や腹膜前腔剥離を必要とするmeshの使用 ($P = 0.048$) は術後血腫発症が有意に高かった。また、直接ヘルニアに対するmesh plugの使用は再発率が有意に高かった ($P = 0.0036$)。

Key words: 鼠径ヘルニア, mesh plug, 血腫, 再発

スーパーオキシドジスムターゼ阻害薬は神経軸索内輸送を抑制する

磯中 理沙

北里大学医学部生理学

背景: 神経系の情報伝達機構の基盤を構成する神経細胞には、細胞の形態と機能の維持に重要な役割を演ずる軸索内輸送が存在する。ゆえに、軸索内輸送の障害は神経変性を引き起こす要因の一つと考えられている。一方、酸化ストレスもまた神経変性疾患の成因であり、神経障害の病態に深く関わっていることが知られている。しかし、酸化ストレスと軸索内輸送の関係は未だ不明な点が多い。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は、生体内の代謝過程で生じる内因性の活性酸素を除去する抗酸化酵素である。本研究では、SODを阻害することにより軸索内輸送にどのような影響を及ぼすのか検討した。

方法: マウスの培養脊髄後根神経節細胞を実験に供した。ビデオ増感顕微鏡を使用し、リアルタイム画像処理により軸索内輸送の変化を観察した。

結果: SOD阻害薬は、輸送粒子数を順行性、逆行性共に有意に抑制した。しかし、同条件における軸索径ならびに神経線維に明らかな形態的な変化は認められなかった。また、SOD阻害薬が軸索内輸送に及ぼす現象については、抗酸化薬である α -tocopherol投与により有意に減弱化した。

結論: SOD阻害薬により神経細胞内に増加した内因性の活性酸素は、神経軸索内輸送を抑制することが明らかとなった。また、 α -tocopherolは酸化ストレスによる軸索輸送障害の抑止に寄与することを示唆した。

Key words: 軸索内輸送, スーパーオキシドジスムターゼ, ビデオ増感顕微鏡, α -tocopherol

原 著

Kitasato Med J 2014; 44: 189-194

中枢神経系作用物質の第一相臨床試験への応募者に見られた脳波異常

齋藤 正範¹, 田ヶ谷 浩邦², 大嶋 明彦³, 熊谷 雄治⁴, 宮岡 等¹¹北里大学医学部精神科学²北里大学医療衛生学部³茨城県立こころの医療センター⁴北里大学医学部附属臨床研究センタープロジェクト実施部門

目的: 中枢神経系作用物質の第一相臨床試験への応募者(男性に限る)における脳波異常率を明らかにする。

方法: 全ての応募者について、北里大学東病院治験管理センター(現北里大学臨床試験センター)へ約一週間入院させ、医療面接と身体的スクリーニング(理学的・神経学的診察、血液学的検査、心電図、脳波)を実施した。脳波は日本臨床神経生理学会認定医が判読した。

結果: スクリーニングの実施に同意した応募者数は男性296名(年齢は20~44歳と65~85.5歳)で、そのうち51名に基礎波の異常が指摘され、64名に突発波が指摘された。

考察: 中枢神経系作用物質の第一相臨床試験への応募者群では、脳波異常が指摘される者の割合が無視出来ないことが示された。この群においては、応募者本人が気づいていないか、もしくは隠している神経学的病態の検出に脳波が有用である可能性が示唆された。

Key words: 第一相臨床試験, スクリーニング, 脳波, 臨床情報

原 著

Kitasato Med J 2014; 44: 195-200

加齢黄斑変性症例における色光刺激による瞳孔反応の有用性

浅川 賢¹, 石川 均¹, 市邊 義章², 清水公也²¹北里大学医療衛生学部リハビリテーション学科視覚機能療法学専攻²北里大学医学部眼科学

目的: 加齢黄斑変性症例に対して色光刺激時の瞳孔反応を評価すること。

方法: 対象は、60~83歳(平均年齢71.8 ± 7.2歳)の非対称性の加齢黄斑変性21例である。眼底や視力、視野が正常な健眼は対照とした。100 cd/m²の輝度にて10秒間、赤色(635 nm)と青色(470 nm)の光刺激時の対光反射を測定し、縮瞳率と縮瞳潜時(1 mm縮小するまでの時間)を評価した。

結果: 主な結果は以下のごとくである。1) すべての症例で青色光刺激時に顕著かつ持続的な縮瞳が認められた。2) 縮瞳潜時は赤色光刺激にて加齢黄斑変性眼のみ延長した(P < 0.0001)。

結論: 赤色光刺激において見られた縮瞳潜時の延長は、加齢黄斑変性の所見を反映しており、色光の違いによる縮瞳潜時の差は、網膜外層疾患の早期診断や鑑別に有用なパラメータとなり得る可能性がある。

Key words: 加齢黄斑変性, 色光刺激, 瞳孔反応, 縮瞳潜時, メラノブシン含有網膜神経節細胞