

- 2) He J, Kryger MH, Zorick FJ, et al. Mortality and apnea index in obstructive sleep apnea. Experience in 385 male patients. *Chest* 1988; 94: 9-14.
- 3) Partinen M, Jamieson A, Guilleminault C. Long-term outcome for obstructive sleep apnea syndrome patients. Mortality. *Chest* 1988; 94: 1200-1204.
- 4) Nakamura T, Tokunaga K, Shimomura I, et al. Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. *Atherosclerosis* 1994; 107: 239-246.
- 5) Shinohara E, Kihara S, Yamashita S, et al. Visceral fat accumulation as an important risk factor for obstructive sleep apnoea syndrome in obese subjects. *J Intern Med* 1997; 241: 11-18.
- 6) Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351: 737-742.
- 7) Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, et al. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995; 44: 855-858.
- 8) Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N, et al. Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 1995; 96: 1647-1652.
- 9) Barzilai N, Wang J, Massilon D, et al. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest* 1997; 100: 3105-3110.
- 10) Engleman HM, Asgari JN, McLeod AL, et al. Self-reported use of CPAP and benefits of CPAP therapy: a patient survey. *Chest* 1996; 109: 1470-1476.
- 11) Tokunaga K, Matsuzawa Y, Ishikawa K, Tarui S. A novel technique for the determination of body fat by computed tomography. *Int J Obes* 1983; 7: 437-445.
- 12) Hosoda K, Masuzaki H, Ogawa Y, et al. Development of radio-immunoassay for human leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 234-239.
- 13) Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, et al. Treatment of visceral fat obesity. *Int J Obes* 1991; 2: 59-65.
- 14) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
- 15) Kaplan NM. The deadly quartet-upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension-. *Arch Intern Med* 1989; 149: 1514-1520.

低酸素換気抑制に対する抑制性神経伝達物質の関与

加藤 俊哉^{1) 2)} 林 文明²⁾ 福田康一郎²⁾ 巽 浩一郎¹⁾
栗山 喬之^{1) *}

はじめに

肥満・肺胞低換気症候群の病態生理として低酸素換気抑制 (Hypoxic Ventilatory Decline; HVD) の関与が考えられている¹⁾。HVDの発生機序としては脳幹部・呼吸中枢機構が低酸素によって直接あるいは間接的にかつ可逆的に抑制されることが考えられている²⁾。このうち、低酸素による抑制性神経伝達・修飾機構の増強の関与が最も注目されている。また、HVDのもう一つの特徴として、低酸素から高酸素条件に変わった際に観察される Post Hypoxic Apnea (PHA) にも関心が持たれている³⁾。

新生ラット摘出脳幹脊髓標本は呼吸調節研究に汎用されており、循環系、脳血液関門、高位中枢、末梢化学受容器等の影響を除外し、呼吸中枢に影響する薬物の直接の効果を判定できる。

我々は、抑制性神経伝達・修飾物質がHVD (及びPHA) の発現に関与しているという仮説を設け、この標本でこれらの物質の拮抗剤の効果を検討した。更にHVDの局在及び、その際の上気道と横隔膜への出力の不均衡性についても比較検討した。

対象と方法

Wistar系新生ラット (生後0から4日) よりエーテル深麻酔下に摘出脳幹脊髓標本を作成、記録用灌流槽に固定し、人工脳脊髄液 (組成; NaCl125, KCl4.0, NaH₂PO₄ 0.5, CaCl₂2.0, MgSO₄1.0, NaHCO₃26, Glucose30 (mM)、pH; 7.35-7.45, 温度; 23-27℃) で灌流した。標本は吻側橋を含まぬよう第VI脳神経根直下で切断した。対照液 (高酸素液) は5% CO₂ と95% O₂ の混合ガスで、低酸素液は5% CO₂ と95% N₂ の混合ガスで飽和させた⁴⁾。頸髄前根 (C₄) と舌下神経 (XII) の呼吸性活動をガラス製吸引電極で同時記録した (Fig.1A)。C₄活動のbursting

回数 (f) 及び、C₄活動 ($\int C_4$) とXII活動 ($\int XII$) の出力を記録した。HVDの局在を検討するためにC₁₋₂間に薄いプラスチック板を置き、脳幹部と脊髓部の分離灌流実験も行った (Fig.1B)⁵⁾。

プロトコル1. 呼吸性活動に対する低酸素の影響: 記録用灌流槽にて安定させた後、20分間低酸素液で灌流し、その後対照液に変更し、10分間観察した。活動が低酸素負荷以前の状態に戻ることを確認した⁶⁾。

プロトコル2. 抑制性神経伝達・修飾物質の拮抗剤の呼吸性活動に対する影響: 抑制性神経伝達・修飾物質の拮抗剤 (ピククリン = GABA_A受容体拮抗剤, 10 μ M; ストリキニン = glycine受容体拮抗剤, 10 μ M; アミノフィリン = adenosine受容体拮抗剤, 100 μ M; ナロキソン = μ -opioid受容体拮抗剤, 1 μ M; ヨヒンビン/イダゾキサラン = α_2 -adrenergic受容体拮抗剤, 10-400 μ

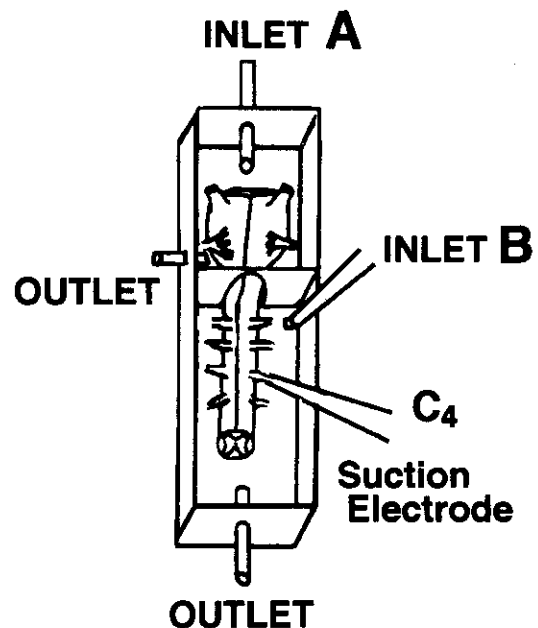


Fig. 1-A: Experimental set up (protocol1~3) Schematic drawing of the ventral surface of the preparation and the recording electrodes on the hypoglossal nerve (XII) and a cervical ventral root (C₄). The preparation were superfused with the mock CSF introduced from the inlet tube.

1) 千葉大学医学部呼吸器内科

2) 第2生理

* 「呼吸不全」調査研究班 主任研究者

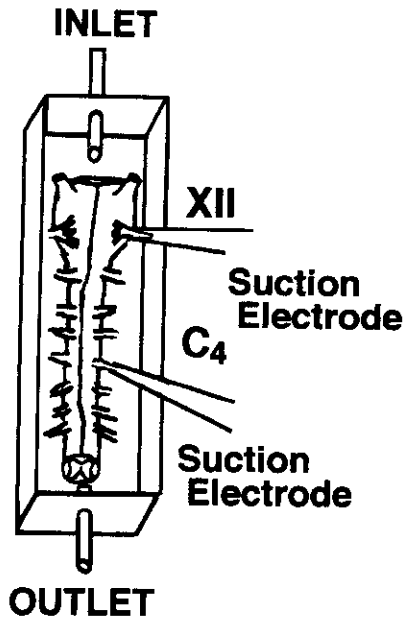


Fig. 1-B: Experimental set up (protocol 4) Both compartments were superfused with the mock CSF having different oxygenated condition via inlets A and B.

M) を含む灌流液で20分間灌流し、その後対照液に変更し、10分間観察した。

プロトコール3. HVDに対する抑制性神経伝達・修飾物質の拮抗剤の影響：前記拮抗剤を含む対照液で20分間灌流し、その後前記拮抗剤を含む低酸素液で20分間灌流、更に拮抗剤を含む対照液で10分間灌流した。

プロトコール4. 分離灌流実験：脳幹部のみ、あるいは脊髓のみを低酸素液で灌流し、プロトコール1と同様にHVDを評価した。

HVDの評価には20分間の低酸素負荷の最後の4分間における f を対照時の f で除し、%表示したものをを用いた。

結果

プロトコール1;(Fig.2)。低酸素液灌流の始めの約20秒間は f の一時的増加が認められるが、有意ではなかった。 f は5分後から有意に減少し始め、再酸素化にても6分間は減少し続けた。 f 及び f_{C4} は再酸素化にて対照値に戻った。 f_{XII} は有意な変化を示さなかった。低酸素液から対照液に切り替えた時、2分以上の呼吸性活動の停止(PHA)が認められた。

プロトコール2;(Fig.3、Table1)。 f_{C4} と f_{XII} は有意

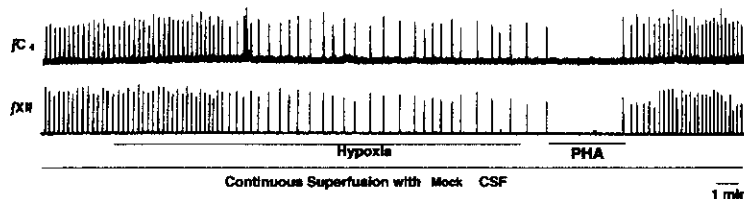


Fig. 2: Typical example of the integrated C_4 and hypoglossal activities (f_{C4} and f_{XII}) in response to hypoxic superfusate (bubbled with 5% CO_2 in N_2). PHA; post hypoxic apnea

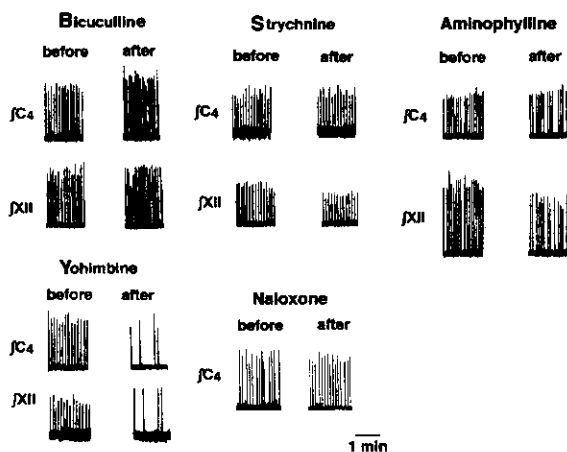


Fig. 3: Effects of antagonists for inhibitory neurotransmission on f_{C4} and f_{XII} during superfusion with hyperoxic-CSF. before and after; before and 20 min after superfusion with antagonists.

Table 1. Effects of antagonists on respiratory motor outputs

		% f	% f_{C4}	% f_{XII}
Bicuculline	14	126.0 ± 11.4*	101.4 ± 5.2	95.9 ± 9.4
Strychnine	11	100.6 ± 5.8	105.8 ± 4.7	88.5 ± 9.9
Aminophylline	13	83.6 ± 4.9*	103.5 ± 2.5	87.8 ± 5.6
Naloxone	11	97.0 ± 4.3	101.0 ± 2.5	not done
$\alpha 2$ -antagonists	10	50.3 ± 8.8*	92.1 ± 5.6	107.9 ± 7.8

* $P < 0.05$, values are mean ± SEM

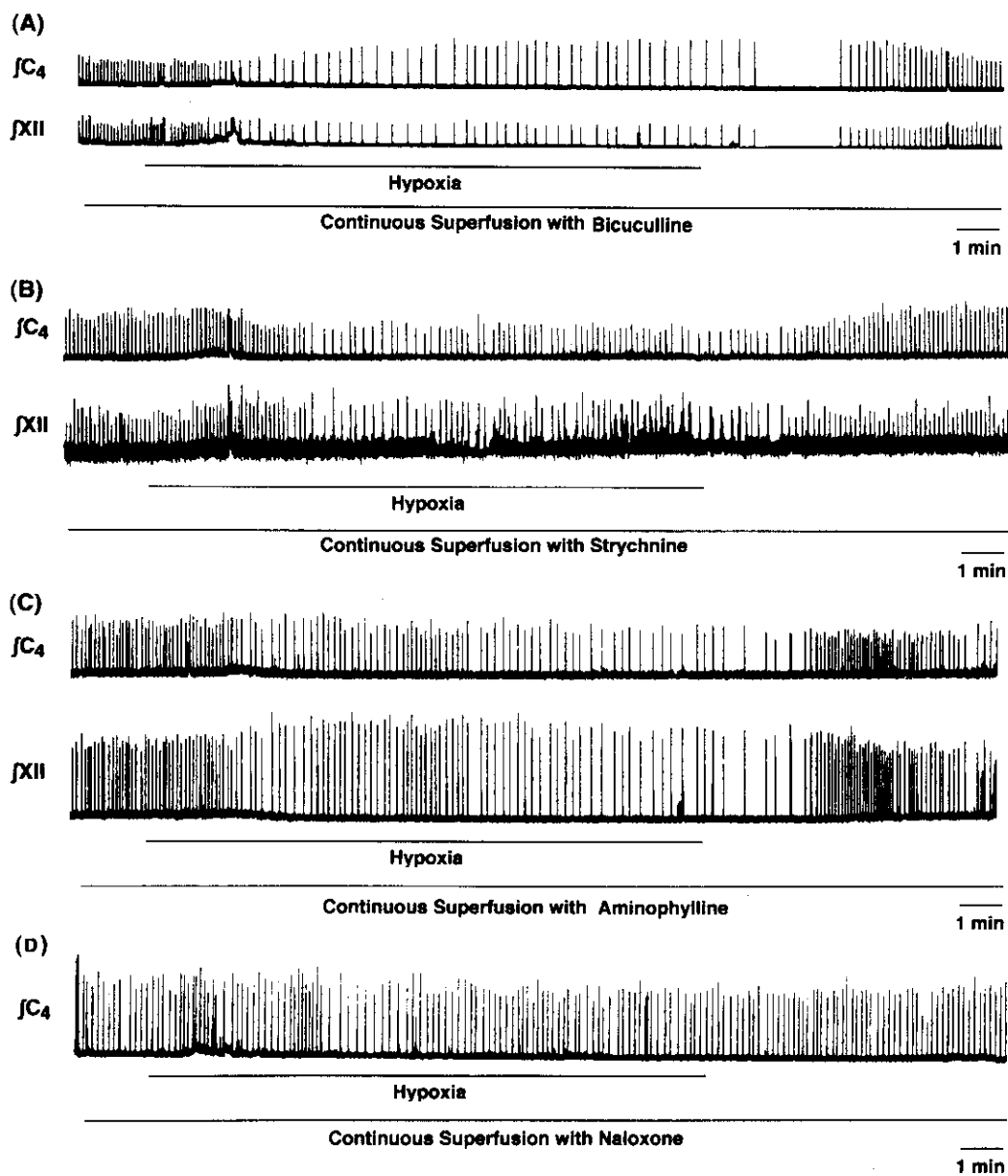


Fig. 4 : Effects of antagonist for inhibitory neurotransmission on HVD. A : bicuculline 10 μ M, B : strychnine 10 μ M, C : aminophylline 100 μ M, D : naloxone 1 μ M.

な変化を示さなかったが、 f はビククリン負荷で増加、アミノフィリン負荷で減少した。 α_2 -adrenergic受容体拮抗剤では f は不可逆的に減少した。このためプロトコル3では α_2 -adrenergic受容体拮抗剤負荷は行わなかった。プロトコル3 ; (Fig.4, Table2)。対照群に比し、ストリキニンとナロキソン負荷は有意にHVDを減弱させた。 f_{C4} と f_{XII} は有意な変化を示さなかった。PHAはストリキニン、アミノフィリン、ナロキソン負荷にて短縮した。PHAの最長時間は546秒であった。プロトコル4 ; 脳幹部のみの低酸素灌流液曝露では f の有意な減少及びPHAが認められたが、脊椎部のみの低酸

Table 2. Effects of natagonists on HVD and PHA

	n	HVD (%f)	PHA (sec)
Control	12	36.4 \pm 5.6	187.6 \pm 36.7
Bicuculline	7	37.4 \pm 6.3	108.7 \pm 18.4
Strychnine	9	56.9 \pm 11.2*	96.0 \pm 25.3*
Aminophylline	10	37.6 \pm 4.2	91.2 \pm 17.4*
Naloxone	6	52.6 \pm 5.7*	40.1 \pm 5.7*

*P < 0.05, values are mean \pm SEM
HVD : Hypoxic Ventilatory Decline
PHA : Post Hypoxic Apnea

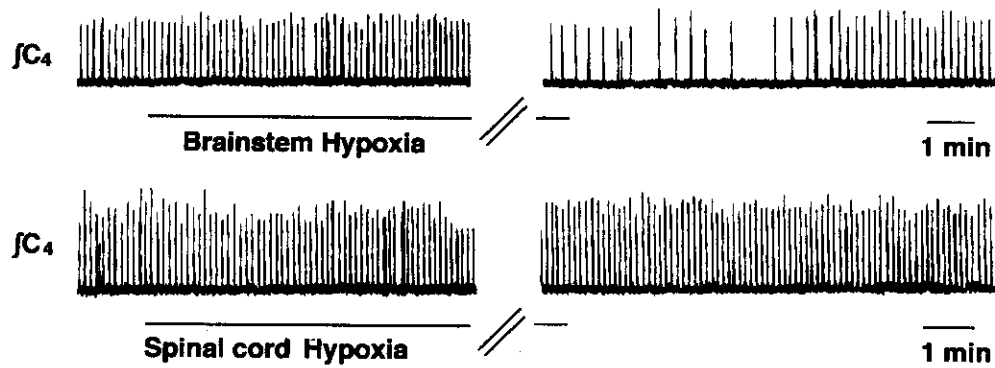


Fig. 5 : Typical neurogram of fC_4 during separate superfusion. Upper trace : Brainstem Hypoxia, Lower trace : Spinal cord Hypoxia.

素灌流液曝露では認められなかった (Fig.5)。

考案・結論

種々の抑制性神経伝達・修飾物質がHVDに関与しているとされる。今回我々はストリキニン及びナロキソンが直接中枢系に作用してHVDを減弱させることを見いだした。即ち呼吸数を調節する延髄呼吸中枢において、低酸素負荷時にはグリシン及びオピオイド機構が増強された結果、HVDが生じることが示唆された。

また灌流液を低酸素から高酸素に切り替えた時に、PHAが観察された。PHAの発生機構は明らかではないが、PHAの長さはHVDの程度と良く相関していた。(Fig.6)。PHAの延長はグリシン、アデノシン、オピオイド等の機構の増強が延髄呼吸中枢で発現・持続した結果と考えられる。上気道出力 (f_{XII}) により強力にHVDの効果が現れ、閉塞性の無呼吸症候群の機序の一端を示すことが出来るのではないかと考えていたが、今回の検討では、20分間の低酸素負荷で fC_4 は有意な増加が観察されたが f_{XII} は無変化であった。

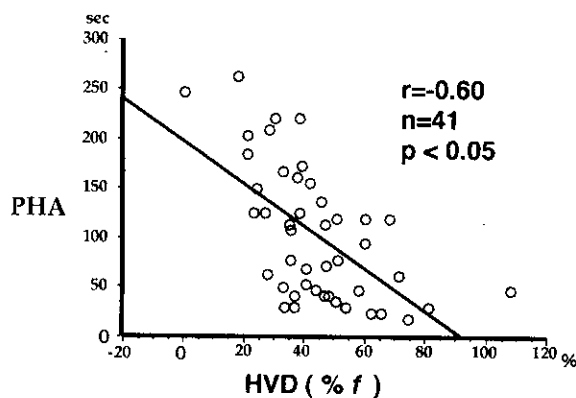


Fig. 6 : Relationship between the degree of HVD and the duration of PHA.

参考文献

- 1) 川上義和他：シンポジウム「肥満低換気症候群・肺泡低換気症候群の病態と治療」日呼吸会誌1998；36：7-10
- 2) 福田康一郎、丸山良子：低酸素換気抑制の生理学的意義。呼吸1993；12：1324-1332。
- 3) Coles SK, Dick TE:Neurones in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency-decline in rats. J Physiol (Lond) 1996；497：79-94.
- 4) Suzue T, Murakoshi T, Tamai S:Electrophysiology of reflexes in an isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. Biomed Res1983；4：611-614.
- 5) Suzue T:Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. J Physiol (Lond) 1984；354：173-183.
- 6) Kawai A, Okada Y, Muckenhoff P, Scheid P:Theophylline and hypoxic ventilatory response in the rat isolated brainstem-spinal cord. Respir Physiol1995；100：25-32.

中枢性ヒスタミンによる呼吸変化

泉崎 雅彦^{1) 2)} 岩瀬みち子¹⁾ 木村 弘²⁾ 栗山 喬之^{2) *}
本間 生夫¹⁾

はじめに

呼吸、延髄を中心とした化学性調節、上位脳による調節、あるいは神経調節によりコントロールされている。しかしながら、上位脳による呼吸調節系は延髄以下の領域に比べ、不明な点が多い。呼吸不全においても上位脳が関係していると考えられている疾患が存在しており、更なる研究発展が期待されている。近年、遺伝子工学の発展とともに遺伝子操作マウスを使った疾患の解明、治療法の開発が行われており、呼吸器分野においてもその応用が進んでいる。しかしながら、呼吸生理学的な応用については特にその大きさが問題となり、殆ど進んでいない。

我々はマウス用 body plethysmograph を作成しその呼吸パラメータを測定した。昨年は上位脳による呼吸調節といわれている体温変化により、覚醒マウスの呼吸パターンが変化することを示した¹⁾。今回は中枢性ヒスタミンの覚醒マウスの呼吸へ影響を、H1 レセプター拮抗薬である pyrilamine と histidine decarboxylase (HDC) 阻害剤である [S]- α -fluoromethylhistidine (α -FMH) の投与、ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスを用い検討を行った。中枢性ヒスタミンは高体温時、覚醒マウスの呼吸数を減少させることが示唆された。

対象と方法

1: 呼吸パラメータの測定

Vijayaraghavan²⁾ の方法に基づき、double chamber plethysmograph 及び解析システムを作製した。head chamber 及び body chamber よりそれぞれ呼吸曲線を記録し、コンピュータを使い各パラメータを検討した。呼吸数 (frequency)、一回換気量 (VT)、吸気時間 (Ti)

は head chamber より得られた波形から、連続する 10 個の波を平均し、決定した。なお、VT は体重 10g あたりの BTPS 量に換算した。また VT-Ti 曲線を描き、呼吸パターンの変化を検討した。統計学的検討には two-way repeated measure ANOVA を用い、 $P < 0.05$ をもって有意とした。データは mean \pm SEM で表示した。

(1) pyrilamine 脳室内投与

合計 14 匹の 8 週令の C57BL/6 雄性マウスを使用した。呼吸パターンの測定の 5 日以上前に、脳定位固定装置下にて、カニューレ (C315G, Plastics ONE) を右側脳室に刺入し、歯科用セメントで固定した。body plethysmograph にマウスを装着したのち、Animal Blanket Controller (ATB-1100, Nihon Kohden) により体温を 39 度に保持した。pyrilamine 投与群 ($n = 7$) には pyrilamine 15 μ g/body を人工脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) に溶解し、2 μ l とし、カニューレから注入した。注入 10 分後より 0%、5%、7%、9% の CO₂ ガス濃度をもつ CO₂、O₂ 混合ガスを吸入させ、各種呼吸パラメータを測定した。また対照群 ($n = 7$) には CSF を投与し同様に呼吸パラメータを測定した。

(2) α -FMH 腹腔内投与

合計 12 匹の 8 週令の C57BL/6 雄性マウスを使用した。 α -FMH 投与群 ($n = 6$) には α -FMH 100mg/kg を滅菌生理食塩水に溶解し、0.2ml とし、腹腔内注射した。注入 4 時間後より、同様に CO₂、O₂ 混合ガスを吸入をさせ、各種呼吸パラメータを測定した。また対照群 ($n = 6$) には滅菌生理食塩水を投与した。

(3) ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウス

合計 14 匹のマウスを使用した。遺伝子欠損群 ($n = 7$)、対照として littermate の野生群 ($n = 7$) を使用した。体温を 39 度に保持し、同様に CO₂、O₂ 混合ガスを吸入をさせ、各種呼吸パラメータを測定した。

1) 昭和大学第 2 生理

2) 千葉大学呼吸器内科

* 「呼吸不全」調査研究班 主任研究者

2: 免疫組織化学的研究

5匹のC57BL/6雄性マウスを使用した。ネブタールで麻酔し、左心室より生理食塩水を灌流後、4% 1-ethyl-3 (3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDCI; Sigma, USA) を灌流し固定した。脳を摘出、同固定液に2-4 hr浸漬した後20% sucrose/0.1M phosphate buffer (PB) に浸漬、一晚冷蔵保存した。クリオスタットで厚さ20 μ mの切片を作成、スライドガラスにマウントし、そのスライドガラスの上でABC法を施行した。Normal goat serum (1:40) に30分浸した後、ヒスタミン抗体 (DiaSorin, 1:3000) に4°Cで一晩浸漬した。その後PBでリンスし、抗ウサギビオチン化IgG (Vector, 1:200) に30分、次いでPBリンス後avidin-biotin complex (Vector, 1:200) に30分浸漬し、DAB反応により免疫陽性細胞を可視化した。コントロールとしてヒスタミン抗体の代わりにあらかじめヒスタミンで吸収した抗体 (100 μ g/ml) 或いはPBを用い、免疫活性が陰性であることを確認した。

結果

1: 呼吸パラメーターの測定

(1) pyrilamine脳室内投与

Fig. 1 (A) と (B) が示すように、frequency、VTともにFICO₂の増大に伴い増加した。VTは対照群と有意差を認めなかったが、frequencyについては有意な交互作用を認めた。またFig. 2 (A) に示すが、両群においてVT-TI曲線は双曲線に回帰された。しかし、pyrilamine脳室内投与による曲線の変移は明らかではなかった。

(2) α -FMH腹腔内投与

Fig. 1 (C) と (D) が示すように、frequency、VTと

もFICO₂の増大に伴い増加した。VTは対照群と有意差を認めなかったが、frequencyは対照群に比べ有意に減少していた。またFig. 2 (B) が示すように、両群においてVT-TI曲線は双曲線に回帰され、 α -FMH腹腔内投与により曲線は右側へ変移した。

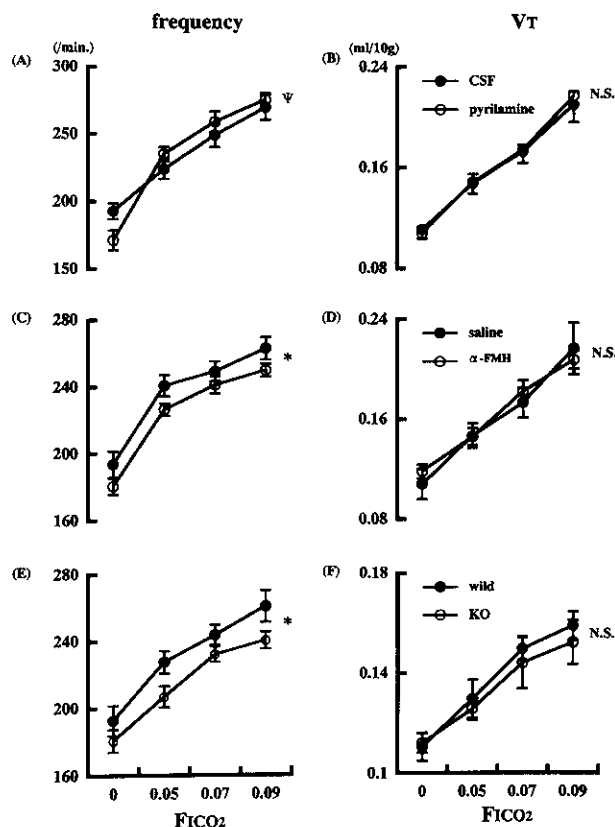


Fig. 1. FICO₂に対するfrequencyとVTの変化

AとBはpyrilamine投与群とCSF投与群、CとDは α -FMH投与群とsaline投与群、EとFはH1受容体遺伝子欠損群(KO)と野生群(wild)の比較

* p < 0.05: 要因 (個体間) 変動 Ψ p < 0.01: 交互作用

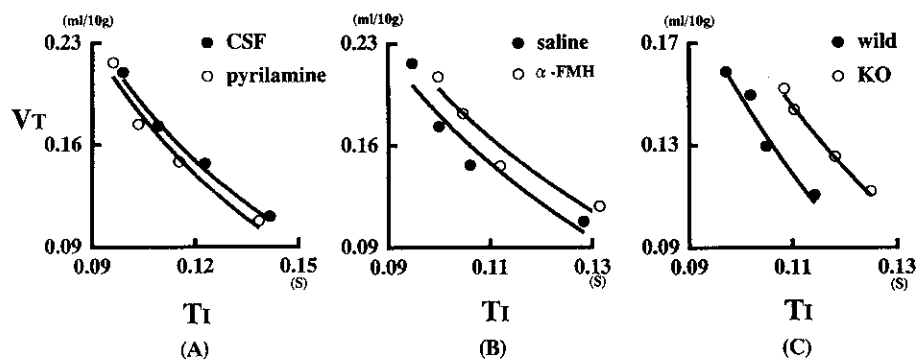


Fig. 2. VT-TI relationship

Aはpyrilamine投与群とCSF投与群、Bは α -FMH群とsaline投与群、

CはH1受容体遺伝子欠損群(KO)と野生群(wild)の比較

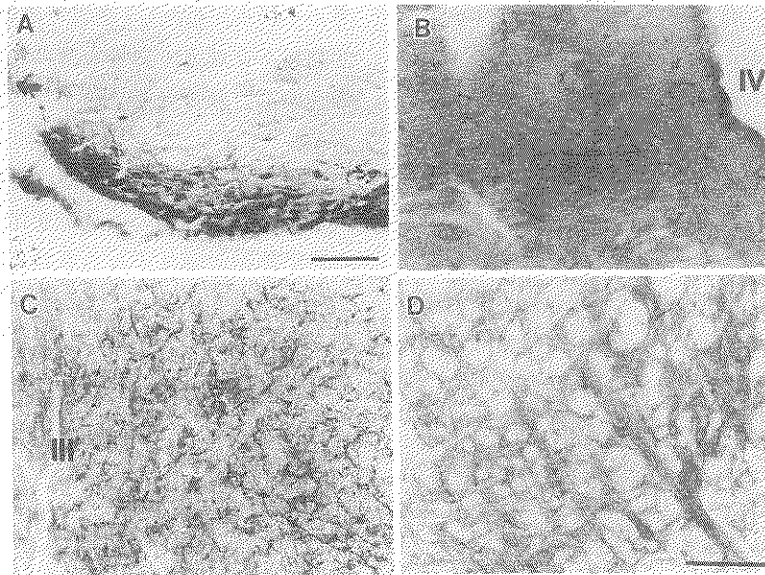


Fig. 3. ヒスタミン免疫陽性神経の分布.

A: 後部視床下部, 結節乳頭核に分布する陽性細胞体. B: 孤束核の陽性神経線維.
 C: 視索前野の陽性神経線維. D: 延髄腹側の網様体中に散在する陽性神経線維.
 III = 第三脳室, IV = 第四脳室. scale barは, 100 μ mを表す. B, CはDに同じ.

(3) ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウス

Fig. 1 (E) と (F) が示すように、frequency、VTとも FICO₂ の増大に伴い増加した。遺伝子欠損群 (KO) は、VTについては対照群と有意差を認めなかったが、frequencyは野生群 (wild) に比べ有意に減少していた。また Fig. 2 (C) が示すように、この実験においても両群の VT-TI 曲線は双曲線に回帰された。 α -FMH 投与実験と同じように、遺伝子欠損群の曲線は野生群の曲線よりも右側に存在した。

2: 免疫組織化学的研究

Fig. 3に示す。ヒスタミン免疫陽性神経細胞体は、後部視床下部結節乳頭核に局限して存在した。いずれのレベルでも乳頭体の両外側に密集し、最後部ではさらに腹側表層に沿って分布している細胞が認められた。mammillary recess 近傍では、その背外側部に分散して分布しており正中隆起のレベルでは、第三脳室の両側から更に外側に向けて bundle 様に分布していた。これらの部位では、ヒスタミン陽性神経線維も密に観察された。

ヒスタミン陽性神経線維は、前視床下部、視索前野、視索上核、視床下部腹内側核などに密に分布し、varicosity をもった線維が観察された。varicosity がそれぞれの核の細胞に接している像も認められた。延髄では、吻側の孤束核に中程度の密度で分布し、腹外側部では、広い領

域にまばらな分布が認められた。縫線核群では、比較的密度は低いものの多くの varicosity を持った陽性神経線維が観察された。

考案・結論

今回、体温を上昇させた覚醒マウスにおいて、内因性中枢性ヒスタミンが一回換気量を変化させず、呼吸数を増加させることが示唆された。

中枢性ヒスタミンニューロンの細胞体は後部視床下部乳頭体の結節乳頭核に局限して存在している³⁾。そしてその軸索は嗅球から脊髄に至る広い範囲に軸索を送り出している⁴⁾。その作用は睡眠覚醒、体温調節、情動、食欲飲水、学習などに関わりがある⁵⁾とされているが、その詳細には未だ不明な点が多い。上位脳による呼吸調節という問題において、我々が中枢性ヒスタミンに注目した大きな理由はその作用として体温降下作用を持つということ⁶⁾に加えて、神経細胞体が視床下部に局限しているということである。今回、視床下部にのみ細胞体をもつヒスタミンが、覚醒マウスの呼吸数を増加させ、呼吸パターンを変化させていることが示唆されたのは、上位脳によっても呼吸が変わりうるということを示したものである。更に過去、代謝系による呼吸パターンの変化は VT-TI 曲線上を動くのみである⁷⁾ということが示されており、ヒスタミンが代謝変化によらずに呼吸パターンを変化させてい

ると考えられる。しかし、残念ながらその機序については、今のところ不明である。その機序解明の手がかりの一つとして、我々はマウスにおけるヒスタミン細胞とその線維について免疫組織化学的手法にて検討した。延髄領域のヒスタミン神経線維の分布についての詳細な報告は今まで無いが、今回マウスにおいてその分布を詳細に確認した。VRG 領域や、またマウスにおける DRG の存在は明らかではないが、延髄背側にヒスタミン神経線維が存在していたことは、その直接の入力が呼吸中枢に影響している可能性もある。あるいは体温調節の面からは、マウスにおいても視索前野にヒスタミン神経線維が豊富に存在するという事実から考えると、ヒスタミン神経が前視床下部の体温調節中枢へ入力し、heat loss のメカニズムを活性化し、呼吸を促進しているのではないかという予想もたつ。この機序に関しては今後の更なる研究が必要である。中枢性ヒスタミンの作用を検討するため、ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスを用いた⁸⁾。薬理学的研究と遺伝子欠損マウスを使った研究の結果が必ずしも一致しないことはしばしば指摘される。今回も pyrilamine 投与と遺伝子欠損マウスの結果が必ずしも一致していない。

pyrilamine 投与については、常に濃度や投与量が問題となり、これによってムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗作用、セロトニン受容体拮抗作用、トランスポーターの非特異的阻害作用が起こりうるとされる。このような問題は遺伝子欠損マウスでは発生しないが、当然欠損した遺伝子を代償するような機能が働いていると考えられ、これを考慮しなければならない。

この実験で使用した α -FMH の処理は中枢性ヒスタミンをほぼ完全に、かつ特異的に枯渇させる作用があり⁹⁾、中枢性ヒスタミンの薬理学的作用を調べるため以前よりしばしば使用されてきた。これによって得られた高体温時の呼吸数の減少という結果は、中枢性ヒスタミンの機能が強く抑制されたためにもたらされたものとみなすことができ、これは、遺伝子欠損マウスを使った実験と合致していた。これらをあわせると中枢性ヒスタミンの呼吸数への関与が強く示唆される。

また pyrilamine 投与で frequency において交互作用がみられたことはまた別の仮説を提起しているとも考えられる。すなわち基本的には上位脳による呼吸調節系は、延髄を中心とした化学調節系ほど強いものではなく、化学調節系が強くなればその効果が相対的に減弱していくのではないかということである。例えば過換気症候群において、CO₂ 負荷を行っているが化学調節系の支配に戻していくという視点に立てば合目的であると

考えられる。しかし、体温や遺伝子欠損などの条件は、化学調節系を越えて影響を及ぼしてしまうのではないかと考えることができる。いずれにせよ十分な検討が必要である。

今回は体温の変化、今回は中枢性ヒスタミンと上位脳により覚醒マウスの呼吸が変化するというを示した。上位脳が関与すると思われる呼吸不全に対し、遺伝子操作マウスを含めて、覚醒マウスを用いた生理学的手法を用いたアプローチは、種々の克服すべき困難はあるものの、有用であると考えられる。

参考文献

- 1) 泉崎雅彦、岩瀬みち子、木村弘、他：マウスの呼吸パターンと気道抵抗の測定。厚生省呼吸不全調査研究班平成9年度研究報告書 1998；116-119.
- 2) Vijayaraghavan R, Schaper M, Thompson R, et al: Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. Arch Toxicol 1993；67 (7)：478-90.
- 3) Inagaki N, Toda K, Taniuchi I, et al: An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rat. Exp Brain Res 1990；80 (2)：374-80.
- 4) Inagaki N, Yamatodani A, Ando-Yamamoto M, et al: Organization of histaminergic fibers in the rat brain. J Comp Neurol 1988；273 (3)：283-300
- 5) Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, et al: Histaminergic transmission in the mammalian brain. Physiol Rev 1991 Jan；71 (1)：1-51.
- 6) Chen Z, Sugimoto Y, Kamei C: Effects of intracerebroventricular injection of histamine and its related compounds on rectal temperature in mice. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1995；17 (10)：669-75.
- 7) Bradley GW, von Euler C, Marttila I, et al: Steady state effects of CO₂ and temperature on the relationship between lung volume and inspiratory duration (Hering-Breuer threshold curve). Acta Physiol Scand 1974；92 (3)：351-63.
- 8) Inoue I, Yanai K, Kitamura D, et al: Impaired locomotor activity and exploratory behavior

in mice lacking histamine H1 receptors.
Proc Natl Acad Sci U S A 1996 ; 93 (23) :
13316 - 20.
9) Maeyama K, Watanabe T, Taguchi Y, et al :

Effect of alpha-fluoromethylhistidine, a suicide
inhibitor of histidine decarboxylase, on histamine
levels in mouse tissues. Biochem Pharmacol
1982 ; 31 (14) : 2367 - 70.

呼吸不全治療に関する分子生物学的研究

白澤 卓二* 小泉 健一 鈴木 陽一

はじめに

慢性呼吸不全症では、種々の換気不全により末梢臓器が慢性の低酸素状態に暴露されている。本プロジェクトでは、この組織低酸素状態を改善させる方法として、肺から組織への酸素運搬を担っているヘモグロビン分子に着目している。ヘモグロビン分子は赤血球中で4量体を形成し、生理学的O₂濃度で高率に酸素を解離する生化学的特性つまりアロステリック効果を有している。ヘモグロビン分子で観察される酸素解離特性は、脊椎動物の進化の過程において様々な分子進化をとげたと考えられている。例えば、ワニには獲物を獲得するため長時間の水中滞在が可能であるが、ワニヘモグロビンに認められる重炭酸に対するアロステリック効果が効率的組織呼吸に重要であると考察されている。実際、ワニ特異的のアミノ酸配列をヒトヘモグロビン遺伝子に導入したワニ-ヒトキメラヘモグロビン分子は重炭酸に対するアロステリック効果を試験管内で獲得できると報告されている (Komiyama et al., Nature, 373, 244-246, 1995)。一方ヒトにおいては、酸素親和性の異なる異常ヘモグロビン血症が数多く報告されている。興味深いことに酸素親和性に変化を及ぼす遺伝子変異の多くはヘモグロビン4量体サブユニットの $\alpha 1/\beta 2$ インターフェイスに集中している。 $\alpha 1/\beta 2$ インターフェイスを構成するアミノ酸残基の変異が4量体としてのヘモグロビン分子の酸素親和性に影響を及ぼし、多血症等の臨床症状をもたらしている。これらの背景を基盤に、本プロジェクトでは、ヘモグロビン遺伝子に導入した変異が組織呼吸に及ぼす影響を実験動物レベルで検討することを目的としている。そのために遺伝子工学的、胚工学的手法を用いてヘモグロビン遺伝子改変マウスを作製し、その生理学的特性を検討する。将来的展望として慢性呼吸不全症に対する遺伝子治療の可能性を検討したい。

方法

標的遺伝子改変ベクターの作製

マウス染色体遺伝子より α グロビン遺伝子特異的配列(プロモーター領域の約360bp)および β グロビン遺伝子特異的配列(プロモーター領域の約320bp)をPCR増幅し、特異的プローブとして使用した。マウス129染色体遺伝子ライブラリーを上記プローブでスクリーニングし、フェージDNAから α グロビン染色体断片、 β グロビン染色体断片を単離しプラスミドベクターにサブクローン化した。これらの遺伝子断片より5'側相同組換えDNA断片、3'側相同組換えDNA断片をPCR増幅し、標的遺伝子改変ベクターを構築した。変異の導入は、Altered Sites II in vitro Mutagenesis Systems (Promega)を使用した。Titusville型ヘモグロビン症変異として α グロビン遺伝子94位のアミノ酸にアスパラギンをコードする変異塩基配列を導入した。Presbyterian型ヘモグロビン症変異として β グロビン遺伝子108位のアミノ酸にリジンをコードする変異塩基配列を導入した。ワニ型キメラヘモグロビン変異として α 鎖グロビン遺伝子と β 鎖グロビン遺伝子にワニ特異的のアミノ酸変異を導入した。具体的には α グロビン遺伝子では34位のアミノ酸残基にシステインをコードする変異塩基配列を導入したのはじめ、35位にアラニン、36位にスレオニン、38位にグルタミン、41位にイソロイシン、100位にフェニルアラニン、103位にグルタミンをコードする変異塩基配列を導入した。 β 鎖グロビン遺伝子は30位のアミノ酸残基にセリンをコードする変異塩基配列を導入したのはじめ、37位にメチオニン、39位にリジン、40位にアルギニンをコードする変異塩基配列を導入した。変異遺伝子が導入されたES細胞を選択する為にネオマイシン耐性遺伝子を導入した。非相同組換え体をネガティブ選択するためにジフテリア毒素Aフラグメント(DT-A)を用いた。ES細胞での相同組み換えを確認後、ネオマイシン耐性遺伝子をゲノムから欠失させるためにCre-loxPシステムを使用した。

東京都老人総合研究所

*「呼吸不全」調査研究班 研究協力者

相同組み換え体の単離、同定

標的遺伝子改変ベクターを *Not*I 消化し直線化したDNAをエレクトロポレーション法にてES細胞へ導入した。G418にて薬剤選別後、G418耐性コロニーを単離し、染色体DNAを精製した。精製した染色体DNAに対してサザン解析、PCR増幅反応を行い相同組み換え体の同定を行った。Titusville型変異遺伝子導入ESクローンのサザン解析のために3'側相同組換えDNA断片3'下流の *Sma*I制限酵素部位より約800bp下流のプロープとネオマシシ耐性遺伝子配列を有するプロープを用いた(図1)。Presbyterian型変異導入ESクローンのサザン解析のために3'側相同組換えDNA断片の3'下流約340bpの範囲をPCR増幅したプロープとネオマシシ耐性遺伝子の配列を有するプロープを用いた(図2)。Titusville型変異遺伝子導入ESクローンの5'側相同組み換え確認のために、5'側相同組換えDNA断片上流のセンスプライマーとネオマシシ耐性遺伝子のアンチセンスプライマーの組合わせによるPCR増幅反応を用いた。Titusville型変異遺伝子導入ESクローンの3'側相同組み換え確認のために、ネオマ

シシ耐性遺伝子の中のセンスプライマーと3'側相同組換え用DNA断片下流のアンチセンスプライマーの組合わせによるPCR増幅反応を用いた。

キメラマウスの作製

相同組み換えの同定が確認されたES細胞をC57BLAK/6マウス胚由来の8細胞期胚に凝集法を用いて注入後、ICR擬妊娠マウス子宮に戻し、キメラマウスを作製した。

結果

標的遺伝子改変ベクターの作製マウス129染色体遺伝子ライブラリーより α グロビン染色体遺伝子を含む14kb、16kb、17kb、19kbのオーバーラッピングクローン、 β グロビン染色体遺伝子を含む14kb、16kbのオーバーラッピングクローンを単離した。これらのクローンより α グロビン染色体遺伝子、 β グロビン染色体遺伝子の制限酵素地図を作製した。この制限酵素地図をもとに異常ヘモグロビン血症モデルマウスであるTitusville型変異とPresbyterian型変異を導入した標的遺伝子改変ベクターを作製した(図1、2、2段目)。

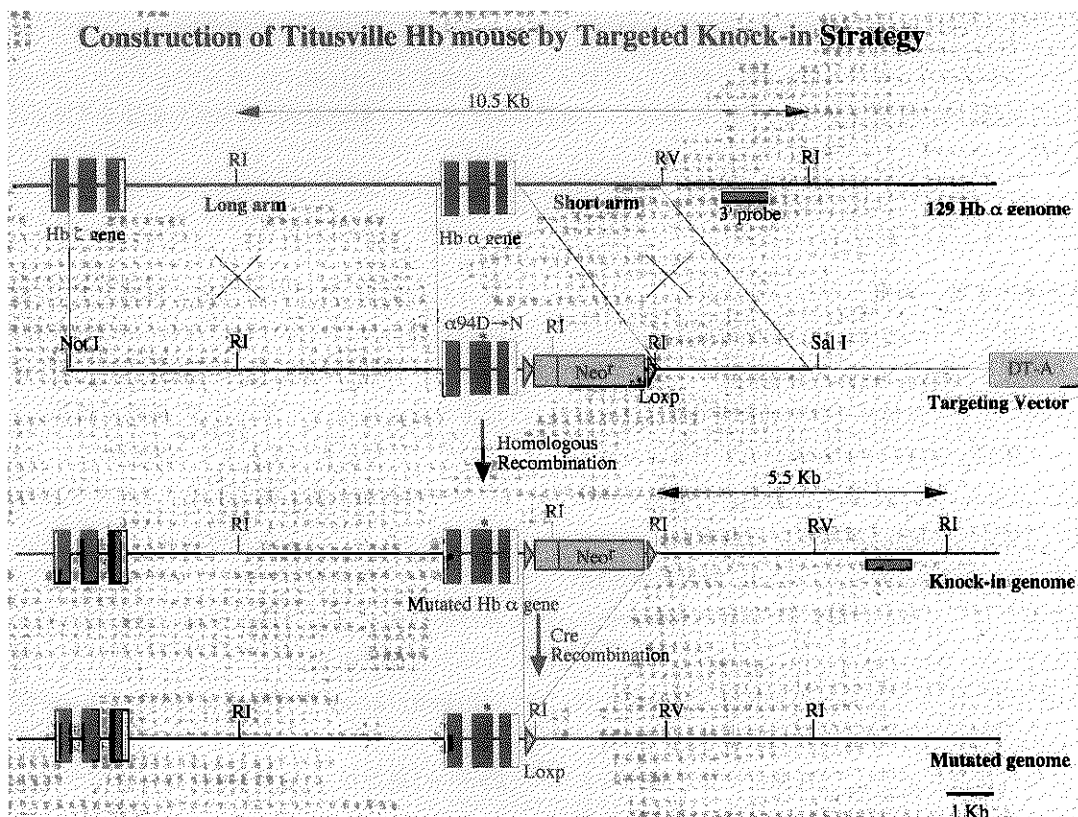


図1 Titusville型 α グロビン (Asp α 94Asn) マウスの作製の戦略1段目にマウス α グロビンゲノム遺伝子、2段目に α グロビン遺伝子変異 (Asp94Asn) を有するノックインベクター、3段目に相同組換え後の変異 α グロビンゲノム遺伝子、4段目にネオマイシシ耐性遺伝子欠失後の変異 α グロビンゲノム遺伝子を示した。

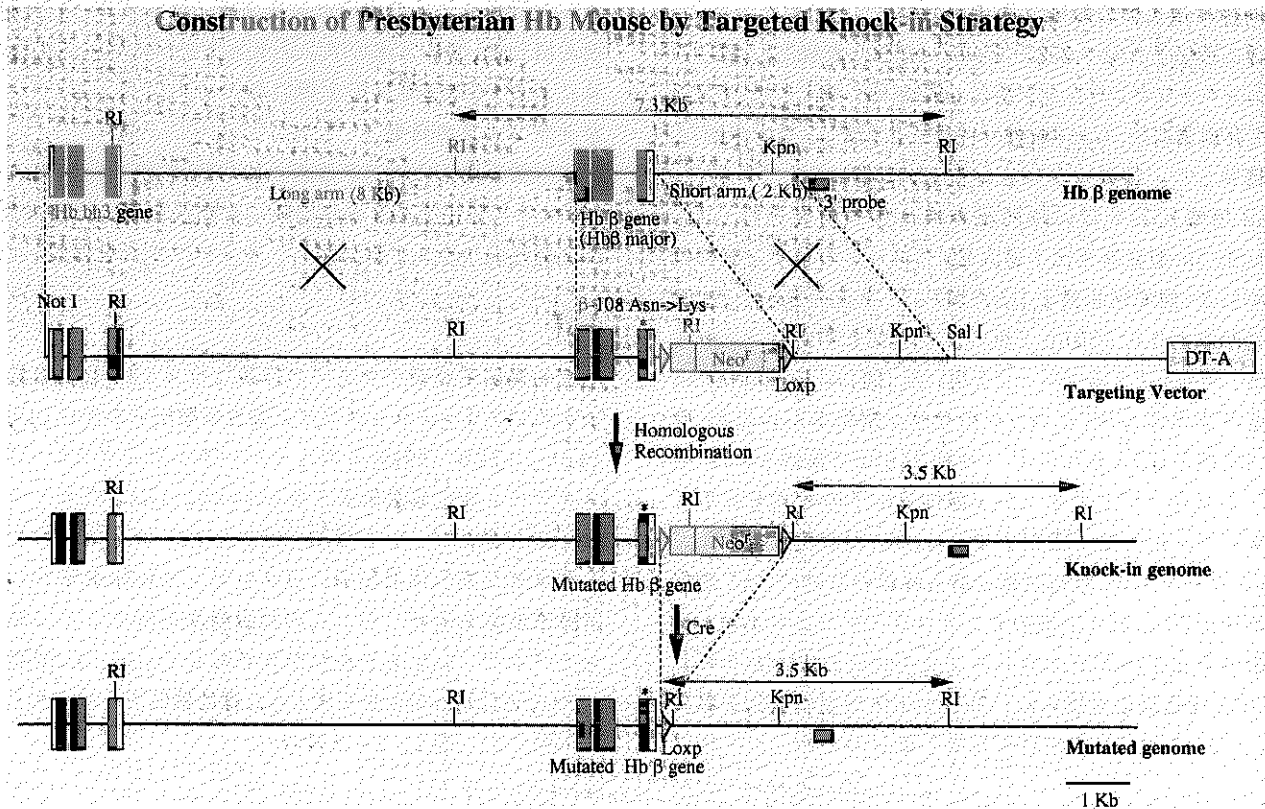


図2 Presbyterian型 β グロビン (Asn β 108Lys) マウスの作製の戦略

1段目にマウス β グロビンゲノム遺伝子、2段目に β グロビン遺伝子変異 (Asn108Lys) を有するノックインベクター、3段目に相同組換え後の変異 β グロビンゲノム遺伝子、4段目にネオマイシン耐性遺伝子欠失後の変異 β グロビンゲノム遺伝子を示した。

相同組み換え体の単離、同定

Titusville型およびPresbyterian型標的遺伝子改変ベクターをそれぞれES細胞にエレクトロポレーション法にて導入した。ジフテリア毒素Aフラグメント (DT-A) によるネガティブ選別、G418によるポジティブ選別を行った。Titusville型変異では167個のES細胞、Presbyterian型変異では240個のES細胞を回収し、それぞれのクローンから染色体DNAを精製した。Titusville型変異導入ESクローン167個に対して図1に示す3'プローブを指標にサザン解析を行った。Eco RI消化後、58番ESクローンで10.5kbの野生型アレルと5.5kbの変異導入アレルを検出した。他のESクローン166個 (例、60番ESクローン) や129マウス染色体遺伝子では、10.5kbの野生型アレルのみ検出した (図3A)。また、図1のネオマイシン耐性遺伝子プローブによるサザン解析では、Bam HI消化後、58番ESクローンのみ6.3kbの変異導入アレルを検出した (図3B)。5'側相同組換えDNA断片上流のセンスプライマーとネオマイシン耐性遺伝子のアンチセンスプライマーの

組合せで5'側相同組換え領域をPCR増幅した。相同組み換え後に増幅され得る8.5kbのPCR断片を58番ESクローンから増幅した (図3C)。ネオマイシン耐性遺伝子のセンスプライマーと3'側相同組換えDNA断片下流のアンチセンスプライマーの組合せによるPCRでは、3'側の相同組み換え後に増幅され得る2.2kbのPCR断片を58番ESクローンから増幅した (図3D)。これらの結果より167個のESクローンのうち58番ESクローンのみ目的の α グロビン遺伝子座で相同組み換えが起きていることを確認した。

Presbyterian型変異導入ESクローン240個に対して3'プローブでサザン解析を行った (data not shown)。Eco RI消化後、34番ESクローンで7.3kbの野生型アレルと3.5kbの変異導入アレルを検出した。他のESクローン239個や129マウス染色体遺伝子では、7.3kbの野生型アレルのみ検出した。Bam HI消化後、34番ESクローンのみ7.1kbの野生型アレルと8.4kbの変異導入アレルを検出し、他のESクローン239個及び129マウス染色体

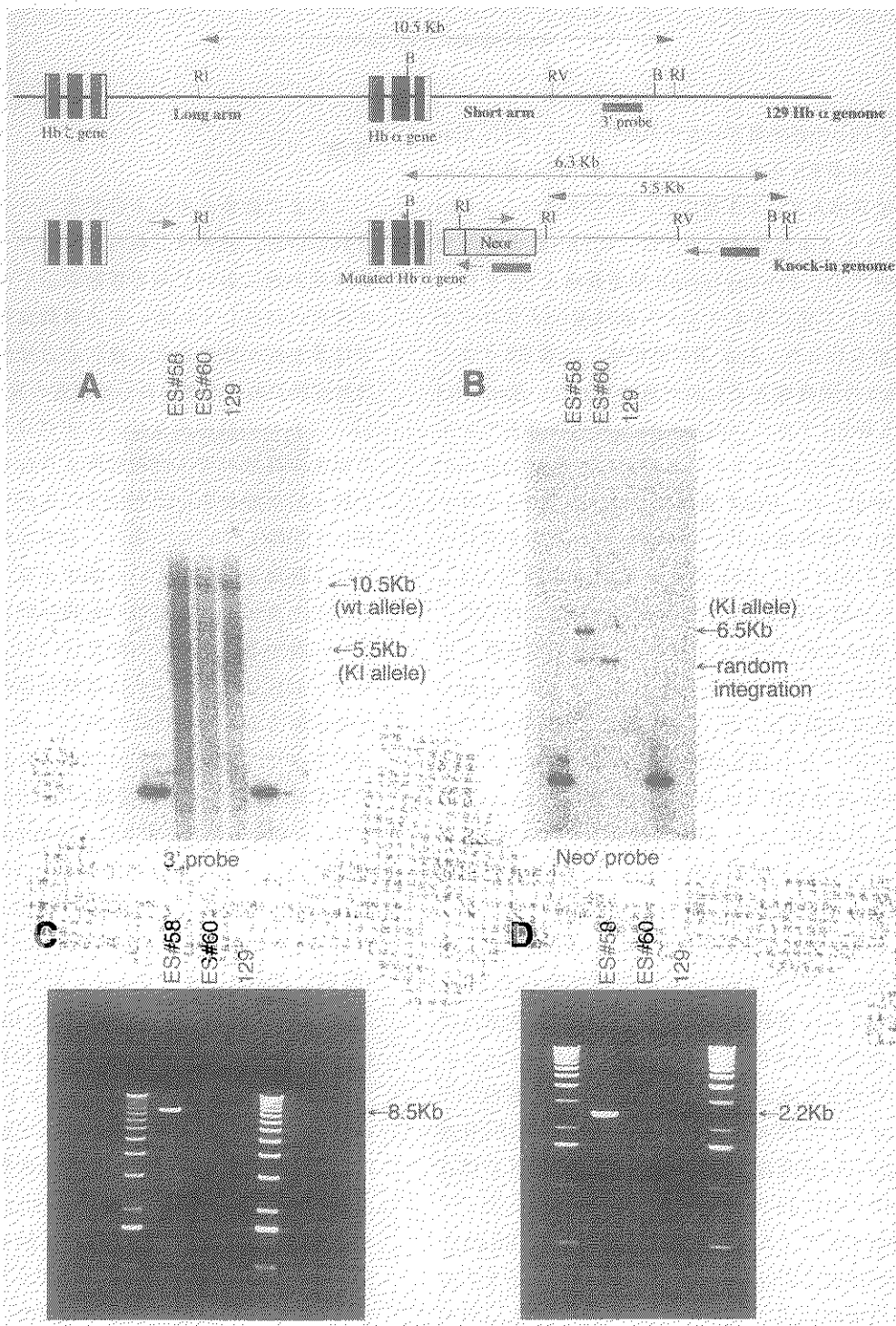


図3 Titusville型変異導入ES細胞における相同組換え体の同定

- A、ESクローンから精製した染色体DNAを*Eco* RI消化後、3'プローブを用いサザン解析を行った。
- B、ESクローンから精製した染色体DNAを*Bam* HI消化後、ネオマイシン耐性遺伝子プローブを用いてサザン解析を行った。
- C、ESクローンから精製した染色体DNAに対して5'側相同組換え用DNA断片上流のセンスプライマーとネオマイシン耐性遺伝子のアンチセンスプライマーを用いてPCR増幅反応を行った。
- D、ESクローンから精製した染色体DNAに対してネオマイシン耐性遺伝子の中のセンスプライマーと3'側相同組換え用DNA断片下流のアンチセンスプライマーを用いてPCR増幅反応を行った。
- 58番、ヘテロ変異体；60番、野生型；129番、129svjマウス（コントロール）。

遺伝子では7.1kbの野生型アレルのみ検出した。また、*Eco* RV消化後、34番ESクローンのみ3.7kbの野生型アレルと5.0kbの変異導入アレルを検出し、他のESクローン239個及び129マウス染色体遺伝子では、3.7kbの野生型アレルのみ検出した。Presbyterian型変異導入ESクローン240個に対して更にネオマイシン耐性遺伝子プローブでサザン解析を行った。*Eco* RV消化後、34番ESクローンのみ5.0kbの変異導入アレルが認められた。*Bam* HI消化では34番ESクローンのみ8.4kbの変異導入アレルとランダムインテグレーションと考えられた4.4kbのゲノム断片を検出した。*Hind* III消化では、34番ESクローンのみ9.4kbの変異導入アレルとランダムインテグレーションと考えられた4.2kbのゲノム断片を検出した。Presbyterian型変異導入ESクローン240個に対してプロモーター領域のセンスプライマーと3'側相同組換え用DNA断片下流に位置するアンチセンスプライマーの組み合わせによるPCR増幅を試みた。34番ESクローンのみ5.7kbの変異導入アレルと4.4kbの野生型アレルを検出し、他のESクローン及び129マウス染色体遺伝子では4.4kbの野生型アレルのみ検出した。以上の結果より、34番ESクローンでは目的の β グロビン遺伝子座に予想された相同組み換えが起きている他に、別の染色体部位にターゲットベクターのランダムな挿入が起きていると考察した。相同組み換えが確認されたPresbyterian型変異34番ESクローンに対してCre処理を行いネオマイシン耐性遺伝子の欠失を試みた。loxP配列に挟まれているネオマイシン耐性遺伝子の欠失を確認するため、loxP配列を挟むプライマーの組み合わせでPCR増幅を行い、さらにそのPCR増幅産物を*Eco* RI消化後、電気泳動によるサイズの確認を行った(図4A)。34-30番ESクローンでは、ネオマイシン耐性遺伝子がゲノムに残存しているため、190bpの野生型増幅断片と1.4Kbのネオマイシン耐性遺伝子を含む変異アレル由来のPCR増幅断片を検出した。これに対し34-1番ESクローンでは190bpの増幅断片のみ検出した。*Eco* RI消化により34-1番ESクローンでは、野生型アレル由来の190bpのPCR増幅断片と変異導入アレル由来の163bpのPCR増幅断片を検出した(図4B)。さらにこの34-1番ESクローンのloxP配列前後の塩基配列を決定した結果、ネオマイシン耐性遺伝子のみが予想通り欠失していることを確認した(図4C)。34-1番ESクローンを凝集法を用いて、C57BL/6マウス胚由来の8細胞期胚とin vitroで凝集させ、ICR擬妊娠マウスの子宮に戻し、キメラマウスを作製した。

考察

これまで数多くのヒトの異常ヘモグロビン血症が報告されている。我々はこれらの異常ヘモグロビンの中で酸素解離曲線において左方移動を示す変異と右方移動を示す変異に注目している。左方移動変異が認められた症例では多血症が認められ、逆に右方移動変異を示した症例は無症候であったかあるいは軽度の貧血が認められた(表1)。これらの臨床所見は、ヘモグロビンの酸素解離特性の変化が肺でのガス交換効率よりむしろ末梢組織における酸素の解離効率により生体に生理学的影響を及ぼす可能性を示唆している。また、右方移動によりチアノーゼを伴う貧血を認めるという臨床記載より、より少量の変異ヘモグロビンが、末梢の組織呼吸を代償している可能性を示唆する。これらの所見は、右方移動を伴うヘモグロビン血症は、生物学的には機能獲得型の変異である可能性を示唆する。以上の背景から、本プロジェクトでは異常ヘモグロビン血症モデルマウスとして、 α グロビン遺伝子変異により右方変異を認めたTitusville型変異と、 β グロビン遺伝子変異により右方移動を認めたPresbyterian型変異を取り上げた。ヘモグロビン分子の立体構造上、Titusville型変異(α 鎖94位アスパラギン酸)はヘモグロビン4量体の $\alpha 1/\beta 2$ サブユニット接触面に位置する(図5)。このインターフェイス面において α 鎖94位のアスパラギン酸は酸素化状態で β 鎖102Asnに水素結合し化学的に安定化している。この94位のアミノ酸残基がアスパラギンに置換することにより $\alpha 1/\beta 2$ 鎖で構成されるインターフェイスの極性に変化が起これ、酸素化状態の化学的安定性が低下し、その結果酸素親和性が低下したと考えられる(図5)。またPresbyterian型変異では、ヘモグロビン4量体の中心部で β 鎖108Lys側鎖、 β 鎖104Arg側鎖、 α 鎖99Lys側鎖がクロライドイオンを囲む様に結合し、脱酸素状態を化学的に安定化することにより、酸素親和性の低下が起これると考えられている(O'Donnell et al., 1994)。この様にTitusville型右方変異とPresbyterian型右方変異は異なる分子機構により酸素親和性が低下していると考察されている。また、これまでの異常ヘモグロビン血症の解析は試験管内で酸素解離特性の変化を検討したものが主な研究であった。これらの試験管内データの多くは、大腸菌で作製したりコンビナントヘモグロビン蛋白を生化学的に解析したものである。それに対し本プロジェクトで取り上げた基本戦略は、変異ヘモグロビンを有するマウスを作製し、それらの遺伝子変異が生体に及ぼす影響、特に組織への酸素運搬効率に関して生理学的に検討するものであり、これま

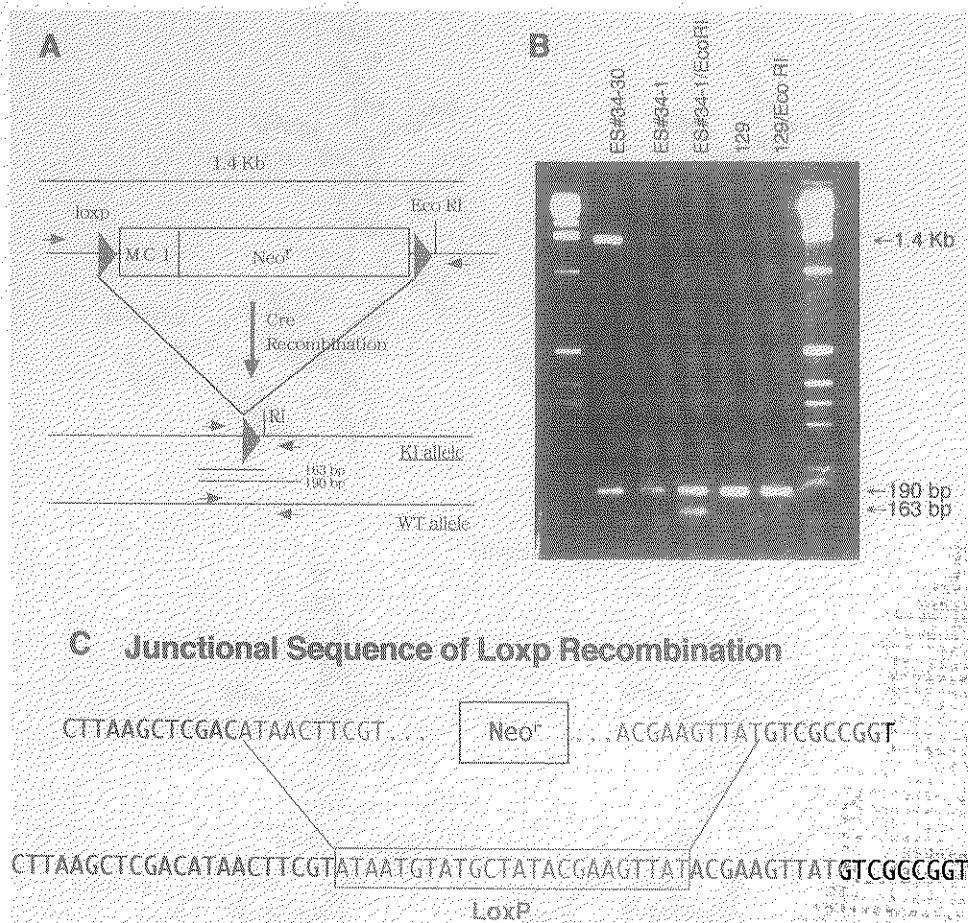


図4 Presbyterian型変異導入ES細胞におけるCre REcombination

- A、Cre処理を行う前後のノックインアレルと野生型アレルを示す。矢印はPCRプライマーの位置を示す。Cre処理前のノックインアレルからPCRにて1.4kbの断片が増幅される。Cre処理後のノックインアレルからPCR増幅後、Eco RI消化すると、163bpの断片を検出される。野生型アレルから190bpのPCR増幅断片が検出される。
- B、PCR増幅反応後、産物をアガロースゲルで分画した。ES # 34-30、ネオマイシン耐性遺伝子が欠失していないクローン；ES # 34-1、Cre処理にてネオマイシン耐性遺伝子を欠失したクローン；ES # 34-1/Eco RI、ES # 34-1をEco RI消化；129、野生型コントロール；129/Eco RI、129由来PCR産物をEco RI消化。
- C、ES # 34-1クローンのloxP前後の塩基配列を決定した。

表1 Clinical and Laboratory Profiles for Hb Titusville and Hb Presbyterian

Abnormal Hbs	Hb Titusville	Hb Presbyterian	Hb A
Clinical Report	3-year-old black female	28-year-old Japanese female	
Mutations in Hb genes	Hb α 94Asp \rightarrow Asn	Hb β 108Asn \rightarrow Lys	
RBC ($\times 10^6$ /mm)	4.95	3.86	4.2
Hb (g/dl)	12.5	11.5	13
Ret (%)	1.5	0.8	1
P50 (mmHg, pH7.4, 25 $^{\circ}$ C)	7.4	7.6	4.1
Hill's coefficient	1.06	2.47	2.55
Borhr effect (dolgP50/dpH)	-0.18	-0.62	-0.51
Reference	BBA, 400 : 365-373, 1992	FEBS, 92 : 53-56, 1978	

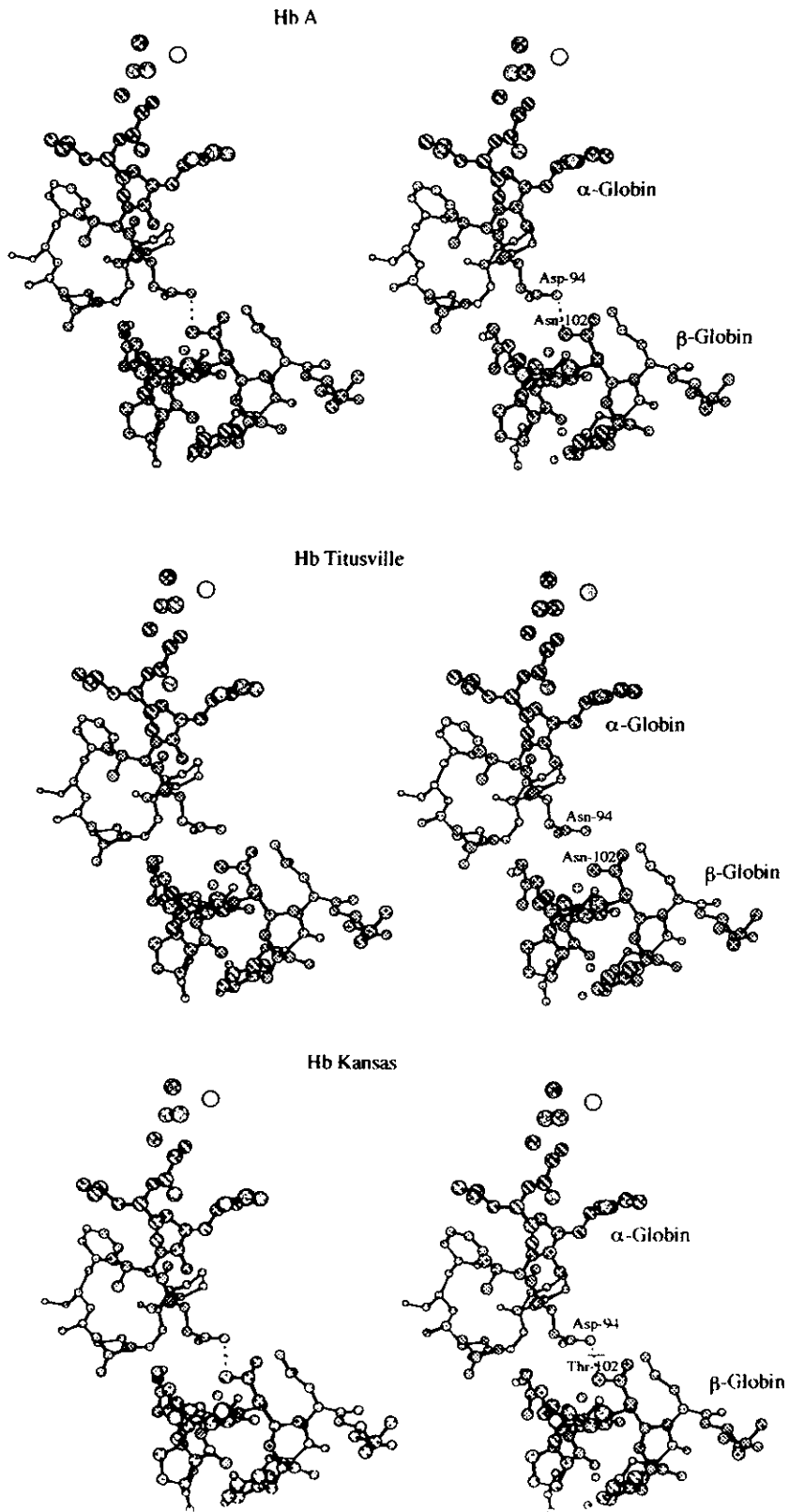


図5 ヒトヘモグロビンの $\alpha 1/\beta 2$ インターフェイスの3次元構造

- 上段、HbAの $\alpha 1/\beta 2$ インターフェイス。R stateにおいて α 鎖94Aspと β 鎖102Asnが水素結合している。
- 中段、Hb Titusvilleの $\alpha 1/\beta 2$ インターフェイス。R stateにおいて α 鎖94AspがAsnに置換することによって β 鎖102Asnとの水素結合が形成されない。
- 下段、Hb Kansasの $\alpha 1/\beta 2$ インターフェイス。R stateにおいて β 鎖102AsnがThrに置換することによって α 鎖94Aspとの水素結合が形成されない。

でに例を見ない新たな試みである。本プロジェクトの最終目標は、慢性呼吸不全症に対する治療を目指している。慢性呼吸不全症の多くは、肺に一次的な原疾患を有していることから、根本的治療は肺における原因疾患の治療であることは論を待たない。しかし実際の臨床では呼吸不全を示す原因疾患の多くが進行性の難治性疾患で、根本治療法が確立されていないのが現状である。慢性呼吸不全症の病態の中で組織低酸素が深刻な臨床上的問題点であることを考慮し、将来これらの組織低酸素を改善させる治療法の1つとして変異ヘモグロビンの投与または変異ヘモグロビンを使用した遺伝子治療の可能性を探索する事を視野にいれている。

文献

1. Komiyama, N. H., Miyazaki, G., Tame, J., and Nagai, K. (1995). Transplanting a unique allosteric effect from crocodile into human haemoglobin. *Nature* 373, 244 - 246.
2. Schneider, R. G., Atkins, R. J., Hosty, T. S., Tomlin, G., Casey, R., Lehmann, H., Lorkin, P. A., and Nagai, K. (1972). Haemoglobin Titusville: α 94 Asp \rightarrow Asn, a new haemoglobin with a lowered affinity for oxygen. *Biochim. Biophys. Acta*, 400, 365 - 373.
3. Moo-Penn, W. F., Wolff, J. A., Simon, G., Vacek, M., Jue, D. L., and Johnson, M.H. (1978). Haemoglobin Presbyterian: beta108 (G10) asparagine leads to lysine, A hemoglobin variant with low oxygen affinity. *FEBS Lett* 92, 53 - 56.
4. A. Villegas, J. B. Wilson, S.S. Chen, F. Calero, L. Reinales, T. H. J. Huisman, D. Espios. (1986). Haemoglobin Presbyterian (beta 108 (G 10) Asn \rightarrow Lys) in a Spanis Family. *Acta Haemat.* 76, 161 - 163.
5. J. Kevin O'Donnell, Patrick Birch, Cynthia T. Parsons, Steven P. White, Jeannine Okabe, Mike J. Martin, Connie Adams, Karuna Sundarapandiyam, Belur N. Manjula, A. Seetharama Acharya, John S. Logan, and Ramesh Kumar. (1994). Influence of the Chemical Nature of Side Chain at β 108 of Hemoglobin A on the Modulation of the Oxygen Affinity by Chloride Ions. *The Journal of Biological Chemistry.* 269, 44, 27692 - 27699.

重症度基準よりみた原発性肺高血圧症の臨床的検討

岡田 修 田辺 信宏 巽 浩一郎 木村 弘
栗山 喬之*

はじめに

原発性肺高血圧症 (PPH) は、30 - 40 歳代の女性に好発のみられる原因不明の前毛細血管性肺高血圧症の総称であり、著明な肺高血圧の存在により患者の Quality of life (QOL) は著しく制限されるうえ、生命予後も極めて不良とされている¹⁾²⁾。本症の病因は未だ不明であるが、内科的治療法としては、欧米を中心にプロスタサイクリン (PGI₂) の持続静注療法³⁾ および Ca Blocker の大量療法⁴⁾ が試みられ、QOL のみならず予後の改善も報告され第一選択の治療法とも考えられている。さらに、重症例に対しては外科的治療法として肺移植も選択肢の一つとされ、成功例では QOL の著明な改善が認められている⁵⁾⁶⁾。

わが国においても、平成 9 年 10 月より脳死患者からの臓器移植が可能となり、肺移植のレシピエントとして PPH 症例の登録もみられている。また、欧米で有用性の認められた PGI₂ 持続静注療法も保険適応となる可能性が高く、外科的治療法も含め PPH の病態ないしは重症度に応じた治療指針の作成が急務とされる。

平成 10 年度の特特定疾患事業として、NYHA 心機能分類を基本とし、右心機能をも考慮した PPH の重症度基準を作成した。今回、この重症度基準の妥当性を評価する目的で、昨年度実施した全国疫学調査により収集された PPH 例をもとに、肺循環諸量や予後との比較検討を行った。

対象と方法

平成 9 年度に実施した PPH 全国疫学調査により本症と診断された 97 例のうち⁷⁾、初回右心カテーテル検査が 1990 年以降に行われた症例 60 例 (61.9%) を対象とした。今回、累積生存曲線による予後の比較検討を行うため、初回右心カテーテル検査が行われた日時を診断確定日とし生存曲線の開始日とした。重症度分類は、二次調査用紙に記載されている診断時の NYHA 分類をもとに、Fig-1

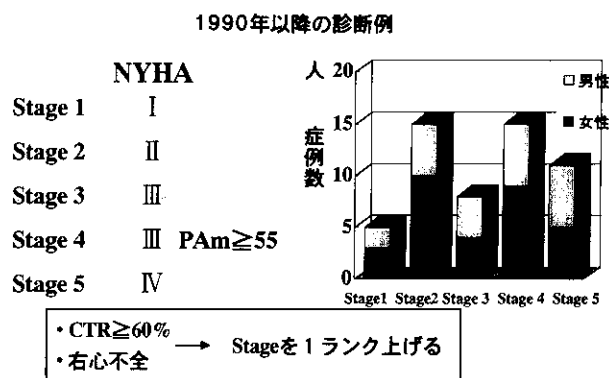


Fig-1 重症度基準

に示すように、NYHA I 度は Stage1、NYHA II 度は Stage2、NYHA IV 度は Stage5 にまず分類し、NYHA III 度の症例は肺動脈平均圧 (PAm) により 55mmHg 未満は Stage3、55mmHg 以上は Stage4 に分類した。さらに、付帯項目として、胸部 X 線写真での心胸郭比 (CTR) が 60% 以上、または右心不全の既往のある症例は Stage を 1 ランク上げることとした。今回右心不全の既往の判定としては、右心カテーテル検査にて右房平均圧が 10mmHg 以上であったもの、および診断時の臨床所見で肝腫大または下腿浮腫のみられた症例とした。

重症度基準により分類された各 Stage 毎に、診断時の肺循環諸量および CTR を比較検討すると同時に、予後の比較を Kaplan-Meier 法による累積生存曲線を用いて行った。今回累積生存曲線を作成するにあたり、前回の二次調査用紙の転帰に生存と記載されていた 72 例を対象に転帰に関するアンケート調査を行い予後の再調査を行った。

結果

平成 9 年度の調査にて生存の確認された症例 72 例に対する予後の再調査では、56 例 (77.8%) より回答が得られ、生存確認が 43 例、死亡が 10 例に認められ、前回の

千葉大学呼吸器内科

* 「呼吸不全」調査研究班 主任研究者

調査と合わせ死亡例の合計は30例となった。初回右心カテーテル検査日を診断日と定義した場合の診断年別症例数を、生存例、死亡例に分けてFig-2に示した。今回対象とした症例は1990年以降の診断例であるが、全国疫学調査を実施した1996年が症例の登録のピークであった。

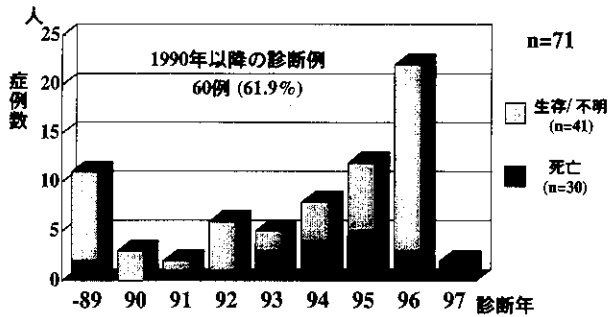


Fig-2 診断年別症例数

対象例60例の基本データを、1987年アメリカで行われたPPH RegistryでのPPH症例187例の成績¹⁾、および1990年当教室において実施した全国調査により収集されたPPH症例215例⁸⁾と対比させTable-1に示す。男女比は1:1.5と女性優位であり、平均年齢は37.3 ± 17.9 (平均 ± SD) 歳、PAmは52.3 ± 12.0mmHg (n = 59)、心係数は2.51 ± 0.74 l/min/m² (n = 47) であり、PaO₂やPaCO₂などのガス交換諸量を含め、これまで行われた大規模なPPH調査例と比較しても大きな差のないものであった。

Table-1 原発性肺高血圧症解析対象症例の比較

	厚生省班会議 (1998)	NIH PPH Registry (1987)	千葉大学 (1990)
n	60	187	215
Gender	F:M 36:24 (1.5:1)	118:69 (1.7:1)	141:74 (1.9:1)
Age	yr 37.3	36.4	29.4
PAm	mmHg 52.3	60	57.8
C.I.	l/min/m ² 2.51	2.27	2.72
PRA	mmHg 6.4	9	6.0
PaO ₂	Torr 73.9	71	70.3
PaCO ₂	Torr 35.6	31	35.6

診断時のNYHA心機能分類が記載されていた症例は54例であり、これを今回の重症度基準をあてはめ分類すると、Fig-1に示すように、最も軽症なStage1が5例、Stage2

が15例、Stage3が8例、Stage4が15例、最重症のStage5が11例となった。各Stage毎の男女比、年齢、肺循環諸量、CTRの比較をTable-2に示すが、Stage5の重症例では男女差がみられず、平均年齢も5群で最も若いものであった。PAmでは、Stage1の症例は全例60mmHg未満であったが、Stage2以上の群では明らかなStageによる差は認められなかった。一方、Stageが重症になるにつれて心係数(C.I.)は減少し(Fig-3)、肺小動脈抵抗(PAR)は増加を示した(Fig-4)。また、CTRはStage3以上の群において、50%以上を示す症例の比率が増加していた(Fig-5)。

Table-2 重症度分類

	Stage1	Stage2	Stage3	Stage4	Stage5
n	5	15	8	15	11
Gender	F:M 3:2	10:5	4:4	9:6	5:6
Age	yr 30.6	35.3	46.9	44.7	24.9
PAm	mmHg 50.6	53.2	51.3	53.8	53.3
C.I.	l/min/m ² 3.06	2.62	2.48	2.15	2.57
PRA	mmHg 894	969	1027	1264	1172
PaO ₂	Torr 6.0	3.4	7.4	7.9	7.7
PaCO ₂	Torr 49.9	50.6	58.6	55.2	56.8

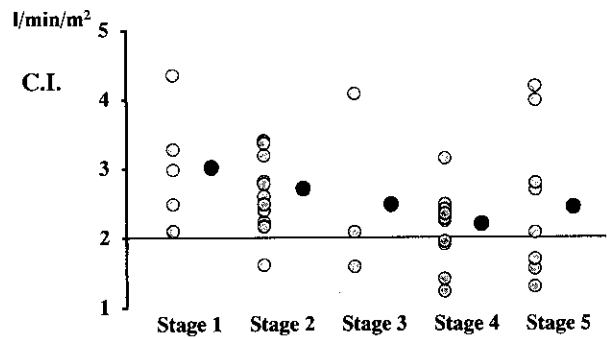


Fig-3 心係数

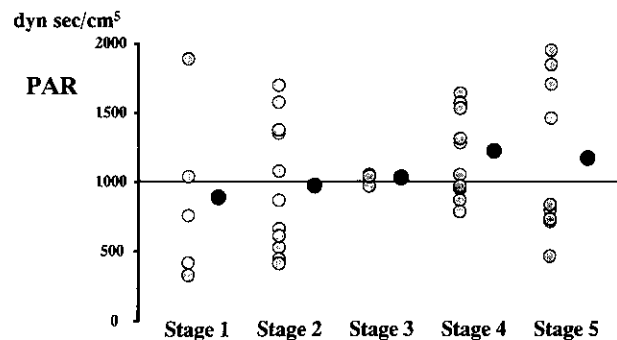


Fig-4 肺小動脈抵抗