

1), 2) は回収率補正、多項超幾何分布からの推計値とやや異なるが、3) はほぼ同様な値となる。より慎重な吟味が必要である。

文 献

- 1) Palli D, Masala G, Trallori G, Bardazzi G, Saieva C. A capture-recapture estimate of inflammatory bowel disease prevalence : the Florence population-based study. *Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1998 Feb ; 30(1) : 50-3.
- 2) O'Callaghan FJ, Shiell AW, Osborne JP, Martyn CN. Prevalence of tuberous sclerosis estimated by capture-recapture analysis [letter]. *Lancet* 1998 May 16 ; 351 (9114) : 1490
- 3) Berger B, Stenstrom G, Chang YF, Sundkvist G. The prevalence of diabetes in a Swedish population of 280, 411 inhabitants. A report from the Skaraborg Diabetes Registry. *Diabetes Care* 1998 Apr ; 21(4) : 546-8
- 4) Morris AD, Boyle DI, MacAlpine R, Emslie-Smith A, Jung RT, Newton RW, MacDonald TM. The diabetes audit and research in Tayside Scotland (DARTS) study : electronic record linkage to create a diabetes register. DARTS/MEMO Collaboration. *BMJ* 1997 Aug 30 ; 315(7107) : 524-8.
- 5) Voss A, Green A, Junker P. Systemic lupus erythematosus in Denmark : clinical and epidemiological characterization of a county-based cohort. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1998 ; 27(2) : 98-105.
- 6) Leonard H, Bower C, English D. The prevalence and incidence of Rett syndrome in Australia. *European Child & Adolescent Psychiatry* 1997 ; 6 Suppl 1 : 8-10.
- 7) Martyn CN. Capture-recapture methods in surveys of diseases of the nervous system [editorial ; comment]. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1998 Jan ; 64(1) : 2-3
- 8) Frongia O, Mastinu F, Sechi GM. Prevalence and 4-year incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in the province of Oristano (Sardinia, Italy). *Acta Diabetologica* 1997 Oct ; 34(3) : 199-205.
- 9) Rangasami JJ, Greenwood DC, McSparran B, Smail PJ, Patterson CC, Waugh NR. Rising incidence of type 1 diabetes in Scottish children, 1984-93. The Scottish Study Group for the Care of Young Diabetics. *Archives of Disease in Childhood* 1997 Sep ; 77(3) : 210-3.
- 10) Sarangi J, Coleby M, Trivella M, Reilly S. Prevention of post splenectomy sepsis: a population based approach. *Journal of Public Health Medicine* 1997 Jun ; 19(2) : 208-12
- 11) Gourley IS, Patterson CC, Bell AL. The prevalence of systemic lupus erythematosus in Northern Ireland. *Lupus* 1997 ; 6(4) : 399-403.
- 12) Blanchard JF, Dean H, Anderson K, Wajda A, Ludwig S, Depew N. Incidence and prevalence of diabetes in children aged 0-14 years in Manitoba, Canada, 1985-1993. *Diabetes Care* 1997 Apr ; 20(4) : 512-5.
- 13) Hay G, McKeganey N. Estimating the prevalence of drug misuse in Dundee, Scotland : an application of capture-recapture methods. *Journal of Epidemiology & Community Health* 1996 Aug ; 50(4) : 469-72.
- 14) Murphy M, Seagroatt V, Hey K, O'Donnell M, Godden M, Jones N, Botting B. Neural tube defects 1974-94--down but not out. *Archives of Disease in Childhood Fetal & Neonatal Edition* 1996 Sep ; 75(2) : F133-4.
- 15) Brenner H. Effects of misdiagnoses on disease monitoring with capture--recapture methods. *Journal of Clinical Epidemiology* 1996 Nov ; 49(11) : 1303-7.
- 16) Papoz L, Balkau B, Lellouch J. Case counting in epidemiology : limitations of methods based on multiple data sources. *International Journal of Epidemiology* 1996 Jun ; 25(3) : 474-8.
- 17) Nelson LM, Anderson DW. Case finding for epidemiological surveys of multiple sclerosis in United States communities. *Multiple Sclerosis* 1995 Apr ; 1(1) : 48-55.
- 18) Squires NF, Beeching NJ, Schlecht BJ, Ruben SM. An estimate of the prevalence of drug misuse in Liverpool and a spatial analysis of known addiction. *Journal of Public Health Medicine* 1995 Mar ; 17(1) : 103-9.
- 19) Domingo-Salvany A, Hartnoll RL, Maguire A, Suelves JM, Anto JM. Use of capture-recapture to estimate the prevalence of

- opiate addiction in Barcelona, Spain, 1989. *American Journal of Epidemiology* 1995 Mar 15 ; 141(6) : 567-74.
- 20) Garancini MP, Sergi A, Lazzari P, Gallus G. Epidemiology of known diabetes in Lombardy, north Italy. Clinical characteristics and methodological aspects. *Acta Diabetologica* 1995 Dec ; 32(4) : 268-72.
- 21) Hook EB, Regal RR. Capture-recapture estimation [letter; comment]. *Epidemiology* 1995 Sep ; 6(5) : 569-70.
- 22) Anonymous. Capture-recapture and multiple-record systems estimation II: Applications in human diseases. International Working Group for Disease Monitoring and Forecasting. *American Journal of Epidemiology* 1995 Nov 15 ; 142(10) : 1059-68.
- 23) Hook EB, Regal RR. Internal validity analysis : a method for adjusting capture-recapture estimates of prevalence. *American Journal of Epidemiology* 1995 Nov 1 ; 142(9 Suppl) : S48-52.
- 24) Michalkova DM, Cernay J, Dankova A, Rusnak M, Fandakova K. Incidence and prevalence of childhood diabetes in Slovakia (1985-1992). Slovak Childhood Diabetes Epidemiology Study Group. *Diabetes Care* 1995 Mar; 18(3) : 315-20.
- 25) Xia ZL, Jin XP, Lu PL, Gu XQ, LaPorte RE, Tajima N. Ascertainment corrected prevalence rate (ACPR) of leukopenia in workers exposed to benzene in small-scale industries calculated with capture-recapture methods. *Biomedical & Environmental Sciences* 1995 Mar ; 8(1) : 30-4.
- 26) Egeland GM, Perham-Hester KA, Hook EB. Use of capture-recapture analyses in fetal alcohol syndrome surveillance in Alaska. *American Journal of Epidemiology* 1995 Feb 15 ; 141(4) : 335-41.
- 27) 縣 俊彦、西村理明、浅尾啓子、清水英佑、新村真人、大塚藤男、玉腰暁子、川村 孝、大野良之、高木廣文、稲葉 裕 「非回答集団を考慮したNF 1 の有病率推計」厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成 8 年度研究業績 5～9, 1997
- 28) 縣 俊彦、西村理明、門倉真人、新村真人、本田まり子、舟崎裕記、大塚藤男、中内洋一、吉田純、玉腰暁子、川村 孝、大野良之、高木廣文、稲葉 裕 「神経皮膚症候群全国疫学調査・第 1 次調査—中間報告—」厚生省特定疾患神経皮膚症候群調査研究班平成 6 年度研究業績 5～9, 1995

NF1患者の治療に関する意識調査

研究協力者 大塚藤男, 市川栄子, 今門純久, 川内康弘
(筑波大学臨床医学系皮膚科)
土田哲也, 倉持 朗 (埼玉医科大学皮膚科)
新村真人 (東京慈恵会医科大学皮膚科)

【はじめに】

NF1の生命予後は一般によいものであり、大部分の患者は天寿を全うしNF1そのものが死因となることはまれである。しかしながら小児期に発症するカフ・エ・オレ斑に始まり、思春期以降に発生する神経線維腫は年齢とともに増加し、中年期以降には全身が無数の神経線維腫で覆われることもまれではなく、本症は患者にとっては長期にわたる精神的苦痛を伴うものである。我々はNF1の患者を対象にアンケート調査を行い、治療に関する患者の意識調査を行なった。

【方 法】

調査は筑波大学病院、埼玉医科大学病院、東京慈恵会医科大学病院において本年9月から11月までの3か月間に受信したNF1患者に対しアンケート調査を行なった。質問内容および回答の集計を表1に示す。

【結果および考察】

- 1) アンケートの回収率は50% (18/36)、性別は男性6名女性12名、年代は10代2名、20代5名、30代5名、40代1名、50代2名、60代3名であった。
- 2) アンケートの結果、88%の患者がカフェ・オ・レ斑や神経線維腫などのNF1の皮膚症状を気にしていると回答した。これは調査対象が大学病院に通院している患者であるということに起因していると考えられる。カフェ・オ・レ斑のほうがより気になると答えた2名はともにまだ神経線維腫の出現していない、または数の少ない10代の患者であった。
- 3) 神経線維腫に関しては77%の患者が切除術を受けており、61%が複数回にわたっている。手術の結果には64%が満足していると回答しており、その理由としては目立つ場所で気になった、数を少しでも減らしたい、といった整容的理由をあげる患者が多かった。
- 4) カフェ・オ・レ斑の治療を受けたことのある患者は11%と少数であった。カフェ・オ・レ斑の治療を積極的に行っている医療施設が少ないことがその理由と考えられる。
- 5) 研究、治療への要望としては表現は様々であったが大別して過半数の患者がNF1の皮膚症状に対する治療薬（特に内服薬）の開発を待ち望んでいると回答した。

表1 アンケートの質問と回答の集計

- 1) レックリングハウゼン病の皮膚症状はカフェオレ斑（皮膚のしみ、色素斑）と神経線維腫（神経線維腫）に大別されます。どちらが気になりますか？
- | | |
|---------------|----------|
| ア) カフェ・オ・レ斑 | 2名 (11%) |
| イ) 神経線維腫 | 8名 (44%) |
| ウ) どちらも気になる | 6名 (33%) |
| エ) どちらも気にならない | 1名 (5%) |
| 無回答 | 1名 (5%) |
- 2) あなたの体にはレックリングハウゼン病による神経線維腫はだいたい何個ありますか？
- | | |
|-----------|----------|
| ア) 100個未満 | 9名 (50%) |
| イ) 100個以上 | 8名 (44%) |
| なし | 1名 (5%) |
- また、体のどの部分にできていますか？（複数選んでもよいです）
- | | |
|-----------------------------|-----|
| ア) 体（服で覆われるところ） | 16名 |
| イ) 頸、手足（服から出るところ） | 14名 |
| ウ) 顔、あたま | 14名 |
| ア) イ) ウ) すべてと答えたのが12名 (70%) | |
- 3) あなたは、その神経線維腫（皮膚の出来物）を取り除く手術を、今までに何回くらい受けましたか？
- | | |
|---------|----------|
| ア) 0回 | 4名 (22%) |
| イ) 1回 | 3名 (16%) |
| ウ) 2～5回 | 7名 (39%) |
| エ) 6回以上 | 4名 (22%) |
- 4) その手術の目的は何ですか？（複数選んでもよいです）
- | | |
|----------------------------|----|
| ア) 目立つ場所にあったので気になって | 7名 |
| イ) 少しでもたくさん取って、数を減らしたかったから | 6名 |
| ウ) 診断を確実にするため、医師に勧められて | 4名 |
| エ) 大きかったので心配になって | 3名 |
| オ) 痛かったので取りたくなった | 1名 |
| カ) その他（理由：まぶたにあり邪魔だった） | 1名 |
- 5) あなたは、その手術の結果に満足していますか？
- | | |
|--------|-----------------------|
| ア) はい | 9名 (64%) (手術を受けた14名中) |
| イ) いいえ | 2名 (14%) |
| 無回答 | 3名 (21%) |
- いいえ、と答えた理由があったら選んでください。（複数選んでもよいです）
- | | |
|--|----|
| ア) 手術の傷跡が残ったので不満である | 1名 |
| イ) たくさん取ったわりには、あまり見た目が改善されなかったので不満である | 1名 |
| ウ) また新しい神経線維腫がでてきて、手術する前の状態に戻ってしまったので不満である | 1名 |
- 6) あなたは今までにカフェオレ斑に対する治療を何か受けたことがありますか？
- | | |
|--------|-----------|
| ア) はい | 2名 (11%) |
| イ) いいえ | 16名 (89%) |
- はい、と答えた方は、それはどんな方法ですか？また、その結果はどうでしたか？
- | | | |
|----|----------------|----|
| 方法 | 軟膏を塗った | 2名 |
| 結果 | 効果は無かった | 1名 |
| | まだ始めたばかりでわからない | 1名 |
- 7) 最後にあなたはこの病気の今後の治療や研究にどのような要望をおもちですか？何でも結構ですでおかきください。
- | | |
|---|-----|
| 色素斑を目立たなくする、または神経線維腫を増やさなくする薬（特に内服薬）を研究、開発して欲しい | 10名 |
| 見えるところの神経線維腫を傷が目立たないように取りたい | 1名 |
| 遺伝による発病であるなら、遺伝子による治療が出来るようにして欲しい | 1名 |

分節型神経線維腫症（NFV）ならびに限局性カフェ・オ・レ斑の病態に関する研究

—限局性カフェ・オ・レ斑の母親より生じたレックリングハウゼン病の2家族例について—

研究協力者 新村真人, 谷戸克巳, 澤田俊一, 太田有史
(東京慈恵会医科大学皮膚科)

はじめに

片側の腹部に限局してカフェ・オ・レ様色素斑をもつ母親より, 明らかな古典的レックリングハウゼン病 (NF1) の患児が発生した症例を2家族について経験したので, その2症例を報告し, 統計的観察を加えた。さらに, 分節型神経線維腫症 (NFV) ならびに限局性カフェ・オ・レ斑患者におけるNF1遺伝子の変異について考察した。

症 例

患者1: 11カ月, 女児。

既往歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 生後まもなくより全身の色素斑に気付いていた。鹿児島大学皮膚科を受診し, 当科紹介となった。

現 症: 躯幹を中心に鶏卵大までの褐色楕円形の色素斑が合計20個ほど多発している。一部のカフェ・オ・レ斑の存在する部位では, 蒙古斑が同部を避けるようにhaloを形成している (図1)。右肩甲骨部には直径1mm大の若年性黄色肉芽腫を認める。患児の成長, 発達は正常範囲であった。以上の所見より患児をNF1と診断した。

家族歴 (図2-1): 患児は第1子であり, 他に子はいない。家系内に明らかなNF1の罹患者はいない。30歳の父親には特に色素斑, 神経線維腫をみない。35歳, 母親の左側腹部に手拳大の淡褐色斑を2個認める。境界は明瞭だが辺縁は不整である。それよりも濃い褐色を呈する多数の小レックリングハウゼン斑様小色素斑が, 淡い色素斑の内部にみられる (図3)。

患者2: 2カ月, 男児。

既往歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 妊娠37週と2日, 2680gで出生した, 双生児の兄である。保健所の1カ月健診で色素斑を指摘され, 当科を受診した。

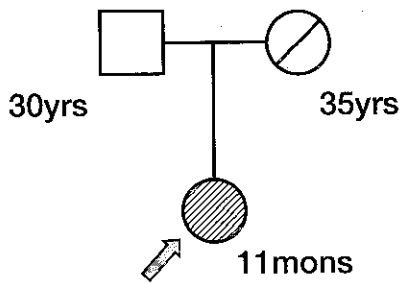
現 症: 躯幹, 四肢に鶏卵大までの褐色楕円形の色素斑が合計10個ほど多発していることよりNF1と診断した (図4)。患児の成長, 発達は正常範囲であった。

家族歴 (図2-2): 患児は第2子であり, 第1子 (4.5歳) に同症はない。双生児の弟にも色素斑はみられない。また, 家系内に明らかなNF1の罹患者はいない。32歳の父親には特に色素斑, 神経線維腫をみない。31歳, 母親の左側腹部, 腰部に限局して, 淡い褐色を呈する1cm程度の小色素斑が多発している (図5)。

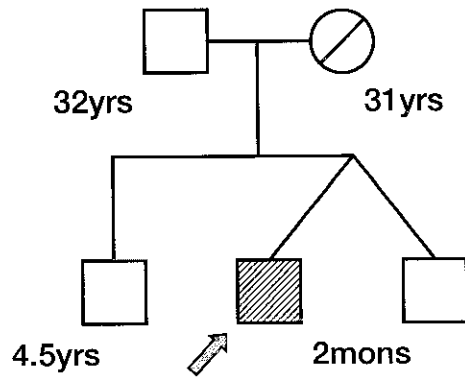


1

(Fig. 2-1)
Case 1



(Fig. 2-2)
Case 2



Mother : Localized café-au-lait spots



Child : Full brown NF1



図 3

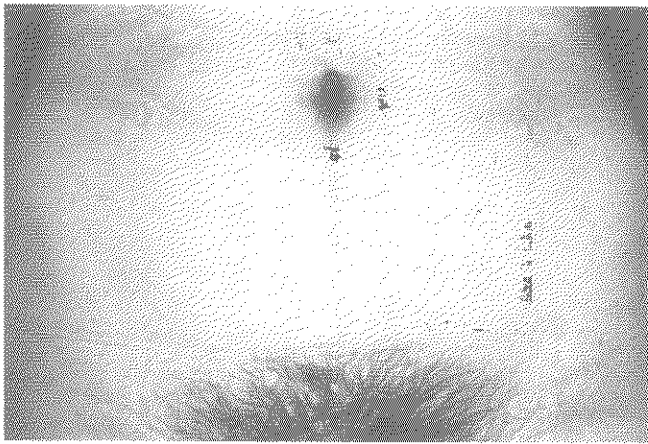


図 5



図 4

(表1) Riccardiの分類とそれに基づく慈恵医大皮膚科におけるNF症例数

NF-I	古典的レックリングハウゼン病	1592
NF-II	聴神経腫瘍型神経線維腫症	57
	そのうち, 多発性神経鞘腫症	12
NF-III	多発性脳脊髄腫瘍型神経線維腫症 (前2者の混合型)	
NF-IV	特殊型神経線維腫症 (血管腫などを合併する)	
NF-V	分節型神経線維腫症	18
	(体の一部にのみ神経線維腫とカフェ・オ・レ斑がみられる)	
NF-VI	カフェ・オ・レ斑型神経線維腫症	
	(優性遺伝するが神経線維腫はみられない)	
NF-VII	遅発型神経線維腫症	
	(カフェ・オ・レ斑はみられるが神経線維腫は中年期以後に初発する)	
NF-VIII	その他の神経線維腫症 (I~VIIに分類されないもの)	
近縁疾患	限局性カフェ・オ・レ斑	95
	限局性多発性神経線維腫	31

考 察

Riccardiの分類に基づき、当科で診察したNF症例数を(表1)に示す。NFVは、分節に限局してカフェ・オ・レ斑と神経線維腫が生じるタイプであり、当科では18例を経験している。限局性カフェ・オ・レ斑(localized café-au-lait spots)は、一部の分節に一致して色素斑を生じるが神経線維腫はなく、Riccardiの分類外のNF近縁疾患としてされており、当科では95症例を経験している。また、分節型多発性神経線維腫(localized neurofibromas)の患者では、色素斑がみられず神経線維腫のみが多発するもので、31例の来院患者がある。この3疾患の臨床像はそれぞれ異なるが、ときに疾患の独立性に問題のある症例が存在する。

限局性カフェ・オ・レ斑の一亜型としてbilateral segmental café-au-lait spotsという病態がある。通常のNF1において皮膚神経線維腫は思春期頃より多発するが、bilateral segmental café-au-lait spotsの症例においては、50歳台とlate onsetで神経線維腫の発生をみる。当科で経過観察している限局性カフェ・オ・レ斑の95症例については神経線維腫を生じた症例はないが、いずれも乳幼児や若年者の症例が多く十分に経過を追えておらず、高齢になり神経線維腫を生じてくる可能性も否定できない。現時点で限局性カフェ・オ・レ斑と診断された症例が、将来NFVとなる場合もある。

こうした疾患においてNF1遺伝子はどのような変異の状態を呈しているのか、病態を明らかにした報告は未だなされていない。NFVについては、胎児期のある時期において卵割細胞の一部にNF1変異を生じたため、個体の一定領域のみNF1になり、モザイク状態を呈すると仮説されている。すなわちconstitutionalにNF1変異はなく、一定領域のsomatic cellにNF1変異があるとされているが、これについて実験的証明はされていない。

今回報告した2家系の母親にみられた色素斑は、いわゆるNF1にみられるカフェ・オ・レ斑とは異なり、限局性カフェ・オ・レ斑と呼ばれているものである。腹部に限局性カフェ・オ・レ斑をもつ母親より、子に完全なNF1が生じた2家系を経験した。これは単なる偶発の可能性はあるものの、何らかの遺伝関係があると仮定すれば、母親のgerm cellの一部にNF1変異が存在し、これにより子はfull brown NF1として発生したことになる。こうした場合母親においては、卵細胞の一部を含めて一定領域のsomatic cellにNF1変異が存在するものと考えられる。これはNFVにおける仮説と同様で、NF1遺伝子について両疾患ともにその変異NF1遺伝子の存在がmosaicになっていることが予想される。

両親のいずれかがNFVであり、子にNF1が発生した報告例は下記の文献がある^{1)~4)}。また文献⁵⁾では、gonosomic mosaicsという表現を用いて、NFVの患者では一部のgerm-line cellならびにsomatic cellsにおいて、NF1遺伝子異常がモザイクで存在すると考察している。

今後の課題として、自験例においてNF1遺伝子変異のmosaic状態を実験的に証明することを計画中である。解析法は既に報告したNF1 somatic mutationの検出方法と同様であるため確立されている⁶⁾。まず、子の末梢白血球分画でconstitutional cellにおけるNF1 mutationを検出する。次いで、親の色素斑部位の皮膚において、同じNF1 mutationが存在するかを証明する。これが立証されれば遺伝したことは明確となる。さらに、親の末梢白血球あるいは離れた部位の正常皮膚に、このNF1 mutationがなければ、親のsomatic cellはmosaicになっていることが証明される。また、卵子を摘出し、そのモザイクを証明出来れば、gonosomic mosaicsという仮説も立証されることになる。遺伝子については解析中で結果はまだであるが、今後の展望を含めて、興味あるNFの2家系を報告した。

参考文献

- 1) Rubenstein AE, Bader JL, Aron AA and Wallace S. Familial transmission of segmental neurofibromatosis. *Neurology*, 33 : 76, 1983.
- 2) Riccardi VM and Lewis RA. Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. *Am. J. Hum. Genet.*, 42 : 284-289, 1988.
- 3) Boltshauser E, Stocker H and Mackler M. Neurofibromatosis type 1 in a child of a parent with segmental neurofibromatosis. *Neurofibromatosis*, 2 : 244-245, 1989.
- 4) Huson SM. Neurofibromatosis 1: clinical and genetic overview. In : Huson SM, Hughes RAC (eds) *The neurofibromatosis* :

a pathogenetic and clinical overview. Chapman and Hall Medical, London, pp204-232, 1994.

- 5) Colman SD, Rasmussen SA, Ho VT, Abernathy CR and Wallace MR. Somatic mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. *Am. J. Hum. Genet.*, 58 : 484-490, 1996.
- 6) Sawada S, Florell S, Purandare S, Ota M, Stephens K and Viskochil D. Identification of NF1 mutation in both alleles of a dermal neurofibroma. *Nature Genet.*, 14 : 110-112, 1996.

神経線維腫における血管増生因子の発現

研究協力者 大塚藤男, 川内康弘, 市川栄子, 今門純久
(筑波大学臨床医学系皮膚科)

はじめに

神経線維腫症1 (以下NF1) に多発する神経線維腫ないしそのvariantであるびまん性神経線維腫は、大小の血管が腫瘍内に増生していることが従来より知られており、ときに腫瘍内出血をきたして、また手術時に大量出血して患者の生命をおびやかすこともあり、本症罹患患者のADL上大きな問題となっている。一方近年腫瘍の発育、浸潤に血管新生機構が活性化されていることが重要であり、その血管新生機構には血管増殖因子が深く関与していることが注目されている。血管増殖因子としては種々の因子が知られているが、中でも、それらの特異的レセプターとして細胞内ドメインとしてチロシinkinナーゼ・ドメインを持つVEGF-f1k系、塩基性FGF-FGFR系、HGF-cMET系、PDGF-fms系が種々の腫瘍の血管新生機構で重要であることが知られてきている。そこで本研究では、まずNF1患者皮膚に生じた神経線維腫およびびまん性神経線維腫でどの血管増殖因子が強く発現しているかを免疫組織化学、ELISA法およびRT-PCR法を用いて検索した。

材料と方法

神経線維腫およびびまん性神経線維腫の手術標本を種々の血管増殖因子 (VEGF, PDGF-B, basic FGF, HGF) に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体で染色した。さらに上記腫瘍からmRNAを抽出し、RT-PCR法により上記血管増殖因子の発現をmRNAレベルでも検索し、どの血管増殖因子が神経線維腫およびびまん性神経線維腫の血管増生にドミナントに作用しているかを解析した。

- 1、神経線維腫症1の患者から手術により切除された神経線維腫およびびまん性神経線維腫を液体窒素中で凍結・OCT包埋した。
- 2、上記凍結組織をクライオトームを用いてスライド切片とする。一次抗体として種々の血管増殖因子 (VEGF, PDGF-B, basic FGF, HGF) に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、二次抗体として抗うさぎIgG抗体を用い、また発色法としてアビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法を用いて組織染色を行い、どの血管増殖因子が神経線維腫において発現しているかを比較検討した。
- 3、神経線維腫組織片および健常部真皮を培養し、培養細胞から定法により腫瘍組織からRNAを抽出した。抽出したRNAをテンプレートとし、種々の血管増殖因子 (VEGF, PDGF-B, basic FGF, HGF) に特異的なDNAプローブを用いてRT-PCRを行い、上記血管増殖因子の発現をRNAレベルでも比較検討した。
- 4、神経線維腫組織片および健常部真皮を培養し、培養上清中の上記血管増殖因子の発現をELISA法により、検討した。

結 果

- 1、VEGFは、周囲の健常真皮にはほとんど発現がなく、神経線維腫において腫瘍細胞細胞質に強い発現が認められた (図1a)。びまん性神経線維腫においても同様の強い発現が認められ、神経束様に器質分化した部分では、特に強い発現が認められた。
- 2、basic FGFは、周囲の健常真皮にはほとんど発現がなく、神経線維腫において腫瘍細胞細胞質に強い発現が認め

られた (図1b)。びまん性神経線維腫においても同様の強い発現が認められたが、神経束様に器質分化した部分では、発現が認められなかった。

3、PDGF-Bは、周囲の健常真皮には強い発現があり、神経線維腫において腫瘍細胞細胞質には発現が認められなかった (図1c)。びまん性神経線維腫においても同様に発現が認められず、神経束様に器質分化した部分でも、発現が認められなかった。

4、HGFは、周囲の健常真皮にも腫瘍組織においてもほとんど発現がなかった (図1d)。ただし腫瘍内に浸潤している肥満細胞にfocalな発現が認められた。

5、神経線維腫由来培養細胞から抽出したRNAをレンプレートとしたRT-PCRでは、健常部由来線維芽細胞に比して、VEGF, basic FGFの高い発現が認められた (図2)。

6、神経線維腫由来培養細胞の培養上清中のVEGF, PDGF-B, basic FGF, HGF濃度を測定したところ、VEGF, basic FGFは高い発現を示したが、PDGF-B、HGFはほとんど発現が認められなかった。

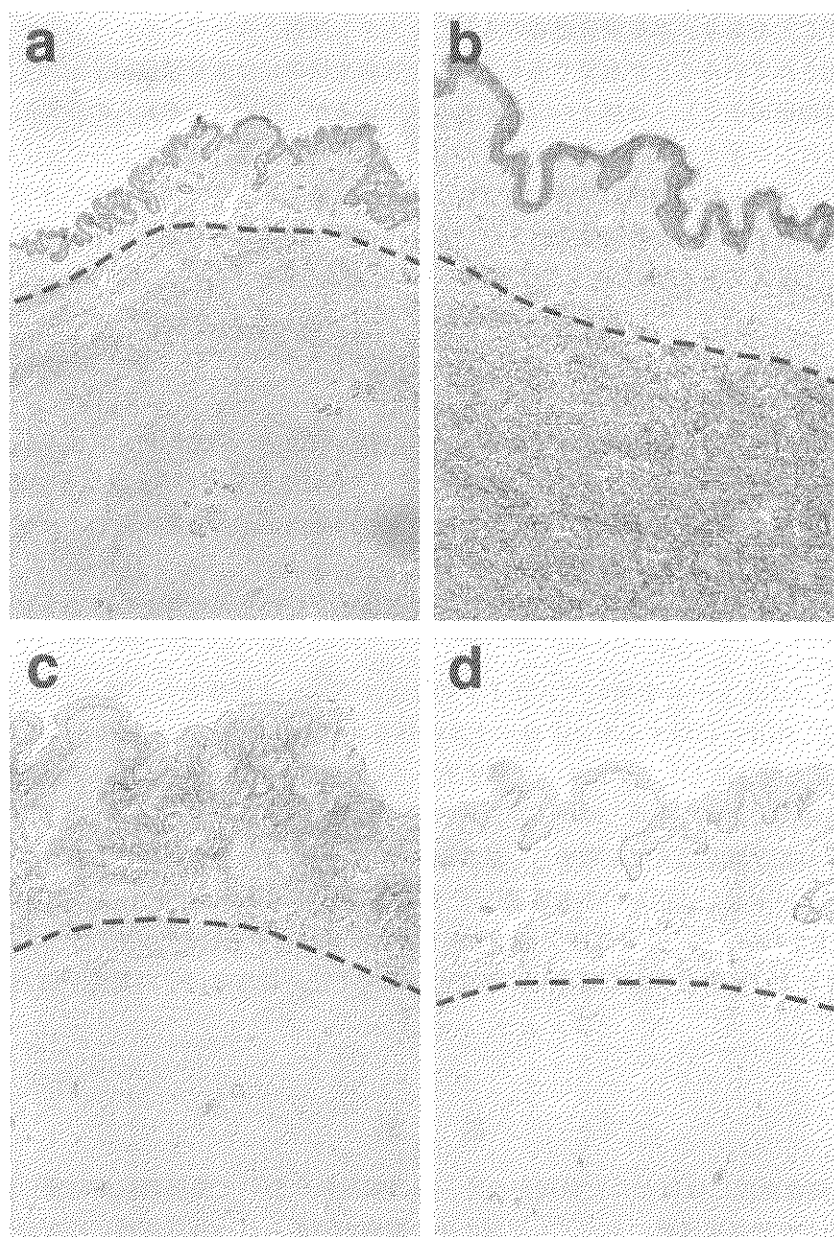


図1：神経線維腫組織の免疫組織化学染色結果

a: VEGF染色、b: basic FGF染色、c: PDGF-B染色、d: HGF染色
点線は健常真皮と腫瘍組織の境界を示す。



図2：各種血管増生因子のRT-PCR

レーン1, 3, 5, 7：健常部真皮由来線維芽細胞、レーン2, 4, 6, 8：神経線維腫由来培養細胞

考 察

血管新生は正常の血管新生以外に炎症や糖尿病性網膜症、腫瘍の増殖に必要な腫瘍血管などに病的血管新生が認められ、疾患の進展に深く関与している(1)。本研究では、腫瘍内血管増生が認められる代表的腫瘍の一つである神経線維腫とその亜型であるびまん性神経線維腫において、主要な血管増生因子(2)であるVEGF, PDGF-B, basic FGF, HGFの発現を検討した。その結果、VEGF, basic FGFは腫瘍周囲健常真皮にほとんど発現がなかったが、腫瘍組織には強い発現が認められた。また、PDGF-Bは前2者とレシプロカルな発現パターンを呈した。すなわち、腫瘍周囲健常真皮に強い発現があり、腫瘍組織にはほとんど発現が認められなかった。HGFは腫瘍周囲健常真皮にも腫瘍組織にもほとんど発現が認められなかった。神経線維腫由来培養細胞においてもRNAレベル、蛋白レベルで同様の結果が得られた。従って、NF1における神経線維腫腫瘍組織内の血管増生には、VEGF、basic FGFが関与している可能性が強く示唆された。

文 献

- (1) 阿部まゆみ、佐藤靖史：血管形成・新生—最近の動向—。実験医学：vol. 16 (5), 570-576, 1998
- (2) Iruela-Arispe ML and Dvorak HF：Angiogenesis； a dynamic balance of stimulators and Inhibitors. Thrombosis and Haemostasis 78 (1)： 672-677, 1997

レックリングハウゼン病のカフェ・オ・レ斑に対する活性型ビタミンD3の効果：活性型ビタミンD3軟膏のカフェ・オ・レ斑に対する外用効果と培養ヒトメラノサイトに対する活性型ビタミンD3の増殖抑制効果

研究協力者 中山樹一郎, 渡邊亜紀, 松村文子, 古賀哲也
(福岡大学医学部皮膚科)

はじめに

レックリングハウゼン病に生ずるカフェ・オ・レ斑の成因は不明であるが、神経線維腫と同様一種の過誤腫といえるかもしれない。カフェ・オ・レ斑の電顕的研究により表皮基底層のメラノサイト内の特異的に大きなメラノソームの存在が特徴的とされている。現在このカフェ・オ・レ斑に対する有効な治療法はなく、レーザー療法にても再発が問題とされている。

以前培養神経線維腫に対する活性型ビタミンD3の増殖抑制効果を*in vitro*, *in vivo*で検討し、その明らかな抑制効果を報告した^{1,2)}。今回、さらに活性型ビタミンD3のカフェ・オ・レ斑に対する*in vivo*効果と培養メラノサイトに対する*in vitro*効果について検討したのでその結果について報告する。

方法と結果

ヌードマウス移植カフェ・オ・レ斑に対する22-oxacalcitriol軟膏の外用効果

レックリングハウゼン病患者の典型的なカフェ・オ・レ斑を切除しこれをヌードマウス皮膚に以前述べた方法²⁾で移植した。22-oxacalcitriol軟膏(中外製薬)を1日2回、2週間連日外用し、実験終了前2日間 bromodeoxyuridine (BrdU)を腹腔内に投与した。移植したカフェ・オ・レ斑の凍結標本を作成し抗BrdU抗体で免疫組織化学的染色を行った。図1にその結果を示す。コントロールの白色ワセリンを外用した標本では多数の陽性細胞が観察されたが(図1-a)、22-oxacalcitriol軟膏外用標本ではその陽性細胞の数は80%以上減少した(図1-b)。

レックリングハウゼン病患者のカフェ・オ・レ斑に対するtacalcitol軟膏の外用効果

上腕の典型的なカフェ・オ・レ斑の上半分にtacalcitol軟膏、下半分に白色ワセリンを1日1回、4週間外用し、外用部位を生検した。生検皮膚組織のFontana-Masson染色を行い表皮基底層のメラニンの染色性の違いを検討した。臨床的には図2-bに示すごとくtacalcitol軟膏塗布部は軽度ではあるが明らかな黒褐色調の減少が観察された。Fontana-Masson染色所見では図3-bに示すごとくtacalcitol軟膏塗布部の明らかなメラニンの減少が観察された。

培養ヒトメラノサイトおよびケラチノサイトに対する活性型ビタミンD3の増殖抑制効果

正常ヒトメラノサイト(NHEM:KM-4009)およびケラチノサイト(HEKn:C-001-5C)はクラボウより購入した。両細胞を各 2×10^5 /Wellおよび 1×10^5 /Wellでそれぞれ専用の培養液で培養し、細胞に 10^{-7} Mの22-oxacalcitriol, tacalcitol, calcitriolを添加した。添加3日および6日目の細胞数をコールターカウンターで測定した。その結果を図4および5に示す。メラノサイトに対しては図4に示すごとくいずれの活性型ビタミンD3も6日目には30%以上の増殖抑制効果を認めた。とくにtacalcitolでは40%以上の抑制が観測された。ケラチノサイトに対しても図5に示すごとく添加6日目でtacalcitol, calcitriolは40%, 22-oxacalcitriolは25%の抑制率を示した。さらにヒトメラニン細胞を 5×10^4 /Wellで

培養し、それぞれ試薬を添加し1, 3, 5日目に細胞のトリチウムチミジン ($^3\text{[H]}\text{-TdR}$) の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。結果を図6に示す。tacalcitol, calcitriolは添加1日目より50%の取り込み率の低下が認められ、3日後ではいずれの試薬も80%以上の取り込み率の低下が観測された。これらの結果は以前報告¹⁾した培養神経線維腫細胞での結果とほぼ同様の結果であった。

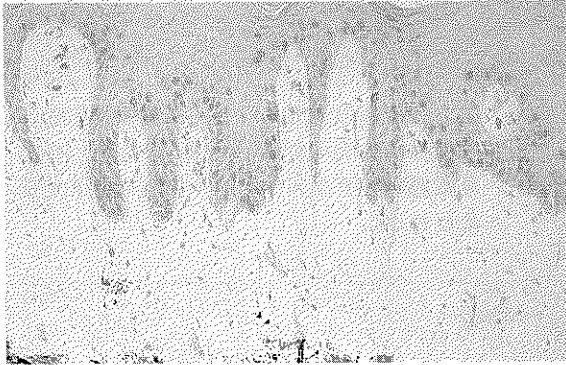


図1-a ヌードマウス移植カフェ・オ・レ斑の表皮基底層におけるBrdUの取り込み像。コントロール（ワセリン外用2週間）。

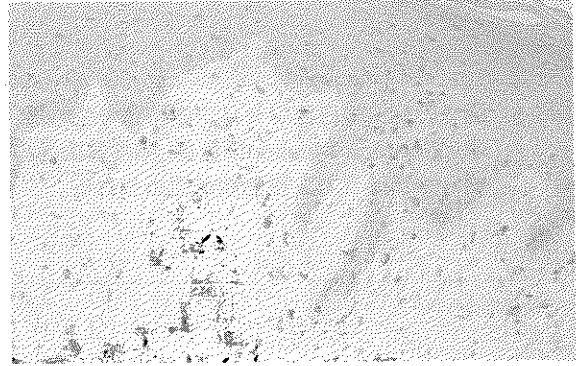


図1-b ヌードマウス移植カフェ・オ・レ斑の表皮基底層におけるBrdUの取り込み像。22-oxacalcitriol軟膏外用2週間後。著明な取り込み低下が認められる。

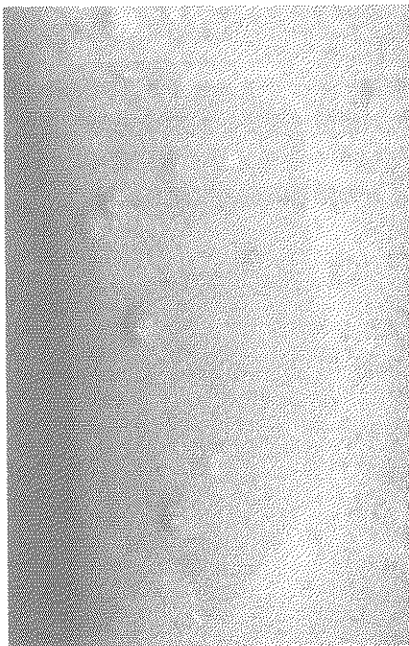


図2-a 典型的レックリングハウゼン病患者上腕のカフェ・オ・レ斑の臨床像。治療前。

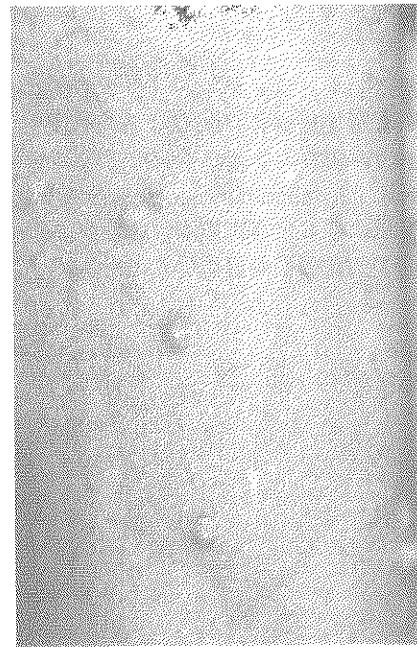


図2-b 図2-aのカフェ・オ・レ斑の上半分にtacalcitol軟膏、下半分に白色ワセリンの外用を4週間した後の臨床像。上方の色素斑の色調の低下が認められる。



図3-a 図2の症例の白色ワセリン塗布部の生検標本のFontana-Masson染色像。表皮基底層の明らかなメラニン染色性が認められる。

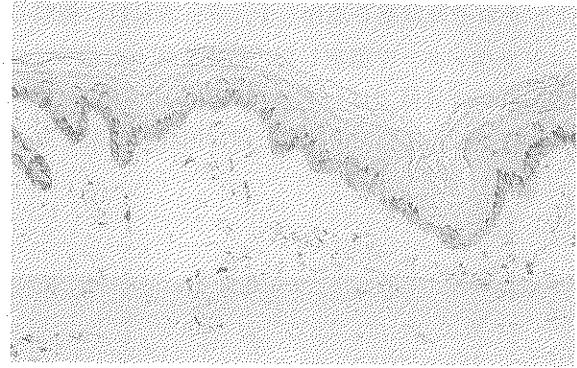


図3-b 図2の症例のタカルシトール軟膏塗布部の生検標本のFontana-Masson染色像。表皮基底層の著明なメラニン染色性の低下が認められる。

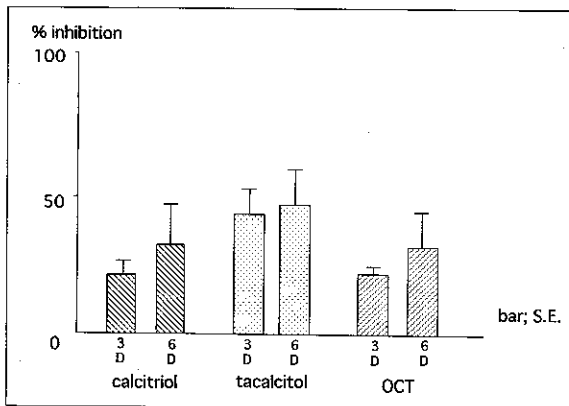


図4 培養ヒトメラノサイト（クラボウより購入）の活性型ビタミンD3による増殖阻害。2×10⁵/Wellのメラノサイトに各10⁻⁷Mのtacalcitol, 22-oxacalcitriol, calcitriolを添加, 3日目および6日目に細胞数を測定。データは5回の実験の平均値を示す。±S.E.

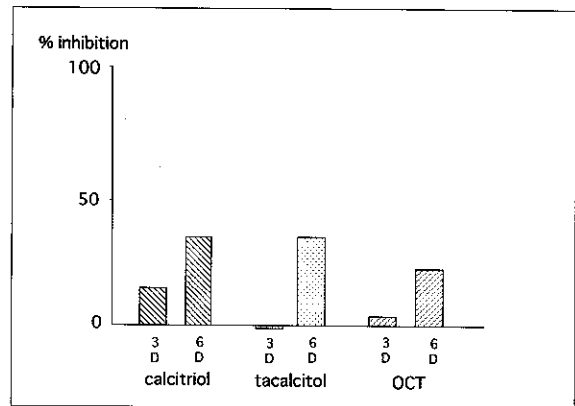


図5 培養ヒトケラチノサイト（クラボウより購入）の活性型ビタミンD3による増殖阻害。1×10⁵/Wellのケラチノサイトに図4に示すメラノサイトの時と同様の実験を施行。

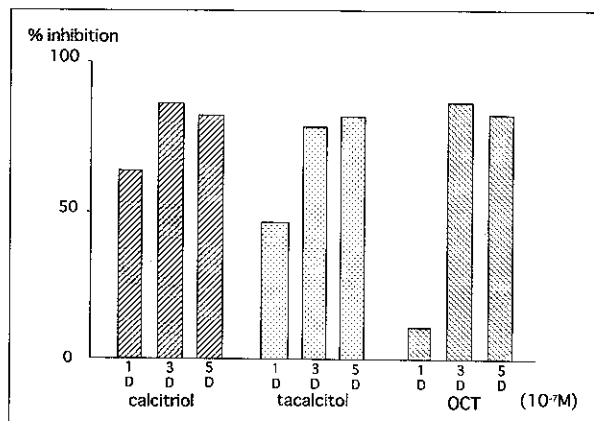


図6 培養ヒトメラノサイトの活性型ビタミンD3による³[H]-TdR取り込み阻害。5×10⁴/Wellのメラノサイトに図4と同様に試薬を添加し, 1, 3, 5日目に細胞の³[H]-TdRの取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定。

かんがえ

今回、種々の活性型ビタミンD3のカフェ・オ・レ斑に対する効果を検討したが、22-oxacalcitriol軟膏をヌードマウス可移植性カフェ・オ・レ斑に外用すると、表皮基底層の細胞のDNA合成が明らかに抑制された。またレックリングハウゼン病患者のカフェ・オ・レ斑にtacalcitol軟膏を外用すると基底層のメラニンの染色性が明らかに減弱した。これらの結果は、活性型ビタミンD3はヒトケラチノサイトの増殖を抑制するという他施設からの報告を追試するものと考えられるが、カフェ・オ・レ斑では表皮基底層のメラノサイトが増加しているという事実を考えると、活性型ビタミンD3はメラノサイトの増殖も抑制するのではないかと推測された。またFontana-Masson染色での結果は活性型ビタミンD3がメラノサイトのみならずケラチノサイト内のメラニン量を低下させている可能性も示唆するものと思われた。

上記の結果をふまえてヒトメラノサイト増殖に対し活性型ビタミンD3がどのように働くのかを*in vitro*で検討した。結果は程度の差はあるものの用いた3種類の活性型ビタミンD3のいずれもが 10^{-7} Mの濃度でメラノサイトの増殖を明らかに抑制した。この抑制効果は 10^{-8} Mの濃度でも認められた（データは示さない）。また3種類の活性型ビタミンD3の中でtacalcitolが最も強い抑制効果を示した。この抑制効果は、また、トリチウムチミジンの取り込み率の明らかな低下でも示された。

以上の結果より、活性型ビタミンD3は表皮基底層のケラチノサイトのみならずメラノサイトの増殖を抑制することによりカフェ・オ・レ斑の色調を低下させるのではないかと考えられた。今後、活性型ビタミンD3がメラノサイトのメラニン産生に対しどのような影響を及ぼすのか、あるいはメラニン顆粒のケラチノサイトへのtransferへの影響はあるのか、などについての研究が必要であると思われる。

文 献

- 1) Nakayama J, Kokuba H, Terao H, et al : Inhibitory effects of various vitamin D3 analogues on the growth of cells isolated from neurofibromas in patients with von Recklinghausen neurofibromatosis 1. *Eur J Dermatol* 7 : 169-172, 1997.
- 2) Nakayama J, Matsuo S, Rikihara Y, et al : Inhibitory effect of a new vitamin D3 analogue, 22-oxacalcitriol, on the growth of neurofibroma cells xenografted into nude mouse skin *in vivo*. *Eur J Dermatol* 7 : 475-479, 1997.

ロキシシロマイシンのNF1神経線維腫由来培養細胞の増殖に及ぼす影響の検討

研究協力者 今門純久, 市川栄子, 河島智子, 川内康弘, 大塚藤男
(筑波大学臨床医学系皮膚科)

はじめに

NF1患者の皮膚に多発する神経線維腫の治療法としては、外科的に切除するのが一般的である。しかし、神経線維腫が無数に多発してきた場合は、外科的にそのすべてを切除するのは不可能であり、その意味では、神経線維腫の増殖を抑える作用のある薬物の発見が待たれてると言えよう。今回我々は、NF1患者の神経線維腫の増殖を抑える作用のある薬物を検索する目的で、神経線維腫由来培養細胞に対するロキシシロマイシンの作用を検討した。

方 法

<細胞数の定量化>

NF1患者の神経線維腫由来培養細胞 (P1からP3) を96穴プレートに各well 5×10^3 個に蒔き、10%のNBCS (new born calf serum) を含んだDMEMに、ロキシシロマイシンを5ないしは、 $50 \mu\text{g/ml}$ finalに加えて、4日間培養し、細胞の増殖活性をAbacus cell proliferation kit (Clontech) を用いたacid phosphatase assayで測定した。ロキシシロマイシンは、エーザイより供与を受けた。同様に、ロキシシロマイシンを10ないしは、 $50 \mu\text{g/ml}$ finalに加えて、8日間培養し、細胞の増殖活性をAbacus cell proliferation kit (Clontech) を用いて測定した。

<TGF- β 1およびTGF- β 2の定量化>

6穴プレートに、各well 3×10^5 個の神経線維腫由来培養細胞を蒔き、1mlの無血清培地に5ないしは、 $50 \mu\text{g/ml}$ のロキシシロマイシンを加えて2日間培養し、培地を回収し、培地中のTGF- β 1およびTGF- β 2の濃度をELISA法にて測定した。

<TGF- β 1およびPDGF-BBによる増殖亢進に対するロキシシロマイシンの影響>

NF1患者の神経線維腫由来培養細胞 (P1からP3) を96穴プレートに各well 5×10^3 個に蒔き、無血清培地で24時間培養した後、TGF- β 1を1ng/mlに加えた。さらに、ロキシシロマイシンを10ないしは、 $50 \mu\text{g/ml}$ finalに加えて、4日後の細胞の増殖活性をAbacus cell proliferation kit (Clontech) を用いて測定した。同様に、PDGF-BBを10ng/mlに培地に加え、さらに、ロキシシロマイシンを $50 \mu\text{g/ml}$ finalに加えて4日後の細胞の増殖活性をAbacus cell proliferation kit (Clontech) を用いて測定した。

<PDGF-BBによるMAPKinaseのリン酸化に及ぼすロキシシロマイシンの影響の検討>

6 cmシャーレに、confluentになったNF1患者の神経線維腫由来培養細胞を、2日間無血清培地にて培養した後、無血清培地のみ、無血清培地に10ng/mlのPDGF-BB、無血清培地に10ng/mlのPDGF-BBと $50 \mu\text{g/ml}$ のロキシシロマイシン、あるいは無血清培地に10ng/mlのPDGF-BBと $50 \mu\text{M}$ のMEK1 inhibitor (PD98059) を加えて18時間培養し、cell extractを回収した。それぞれ15 μl のcell extractを、12.5%のSDS-PAGEゲルにて電気泳動し、ニトロセルロースフィルターに移した後、抗MAPKinase抗体、あるいは抗リン酸化MAPKinase抗体を用いてimmunoblotを行った。

結 果

<ロキシスロマイシンのNF1神経線維腫由来培養細胞の増殖に及ぼす影響>

比較的、典型的なNF1患者数名の細胞を用いて検討を行った。10%NBCSの存在下に、ロキシスロマイシンを5ないしは、50 μ g/ml finalに加えて、4日間培養し、細胞のacid phosphatase活性を測定した。ロキシスロマイシン無添加の細胞群のacid phosphatase活性を100%として、相対的な値で表した(図1)。ロキシスロマイシン5 μ g/ml、4日間の培養で、無添加群の97%に、活性は低下したが、統計的に有意ではなかった。ロキシスロマイシンを50 μ g/ml finalに加えて、4日間培養した場合、無添加群の89.6%に、活性は有意に低下した。次にロキシスロマイシンを10ないしは、50 μ g/ml、8日間培養した場合のacid phosphatase活性を加えない場合と比較して表した。図2aに示すとおり、5%のNBCSの存在下では、ロキシスロマイシンを10 μ g/mlに加えて8日間培養すると、添加しない場合の91.8%に活性は有意に低下した。NBCSを10%にすると、ロキシスロマイシン10 μ g/ml存在下では、無添加群の95.2%と有意な低下となった(図2b)。別のNF1患者の細胞では、5%NBCSでは、ロキシスロマイシン10 μ g/mlでは91.1%、ロキシスロマイシン50 μ g/mlでは84.8%と有意の低下がみられた(図3a)。10%NBCSでは、ロキシスロマイシン10 μ g/mlで、無添加群の94.7%にacid phosphatase活性は低下したが有意ではなかった(図3b)。正常人由来皮膚線維芽細胞を10%NBCS存在下で培養したところロキシスロマイシン10 μ g/mlの濃度で98.4%(有意差なし)、50 μ g/mlの濃度で95.3%(有意差あり)と低下した(図4)。

<NF1神経線維腫由来培養細胞からのTGF- β 1およびTGF- β 2の分泌>

図5aおよび図5bにあるように、TGF- β 1は、ロキシスロマイシンを50 μ g/mlに加えた場合、約0.1ng/mlの濃度で培地から検出された。TGF- β 2は、ロキシスロマイシンの添加の有無に関係なく検出できなかった。ロキシスロマイシンは、50 μ g/mlの濃度で、NF1神経線維腫由来培養細胞からのTGF- β 1の分泌を促す可能性が高い。

<TGF- β 1により誘導された増殖亢進に対するロキシスロマイシンの影響>

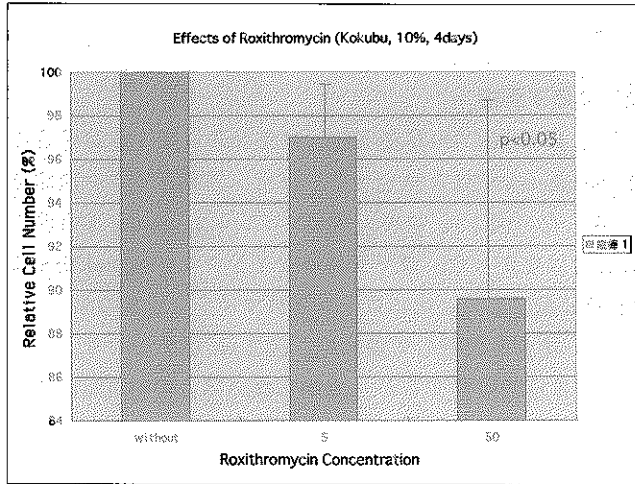
図6に示すように、TGF- β 1の1ng/mlの濃度での添加で、添加しない場合の128%にacid phosphatase活性は増加した。TGF- β 1に加えてロキシスロマイシンを10 μ g/mlに加えると111.3%、50 μ g/mlに加えると113%と、それぞれ、TGF- β 1単独の場合と比較して有意にacid phosphatase活性は低下した。

<PDGF-BBにより誘導された増殖亢進に対するロキシスロマイシンの影響>

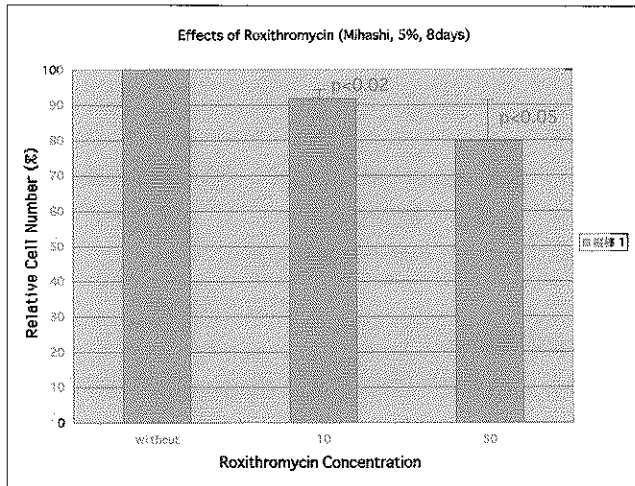
図7に示すように、培地に10ng/mlのPDGF-BBを加えてNF1神経線維腫由来培養細胞を培養すると、無添加の場合の137%にacid phosphatase活性は増加した。ロキシスロマイシン50 μ g/mlを加えても、このPDGF-BBによる増加は抑制できなかった。

<PDGF-BBによるMAPKinaseのリン酸化に及ぼすロキシスロマイシンの影響>

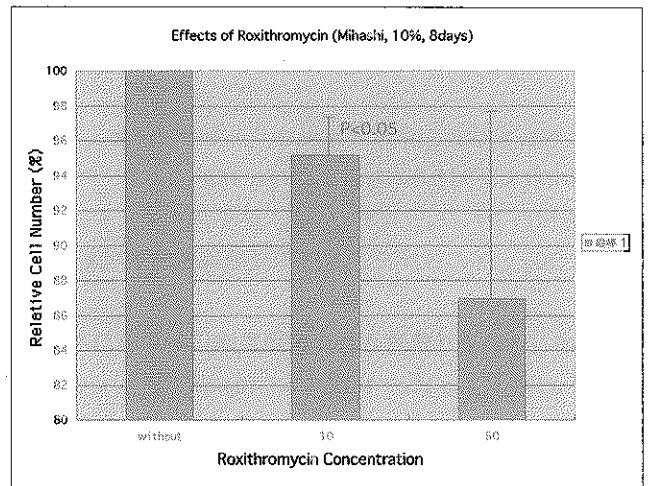
図8に示すとおり、p44/42MAP Kinaseのリン酸化の程度は、無血清の培地に、PDGF-BBを添加することで増加するが、このリン酸化はMEK1インヒビターであるPD98059の添加で抑制されるが、ロキシスロマイシン50 μ g/mlでは抑制されなかった。



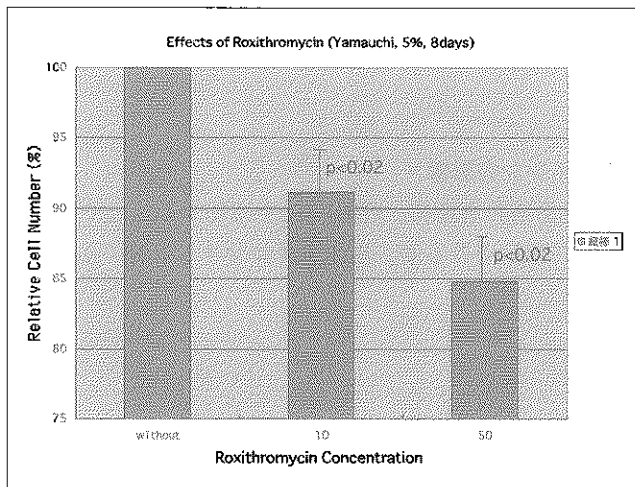
☒ 1



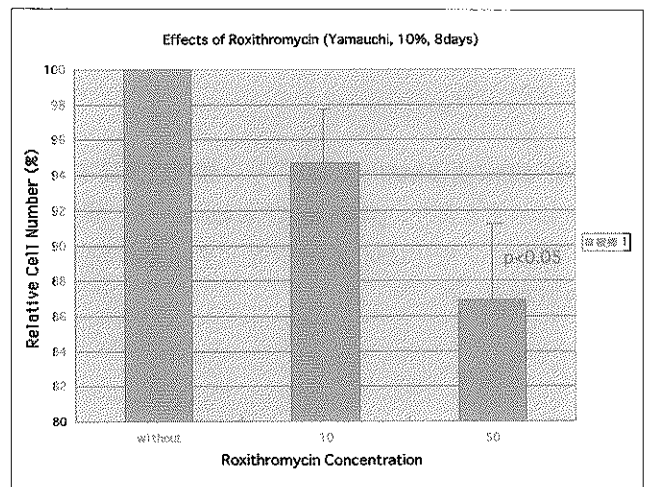
☒ 2 a



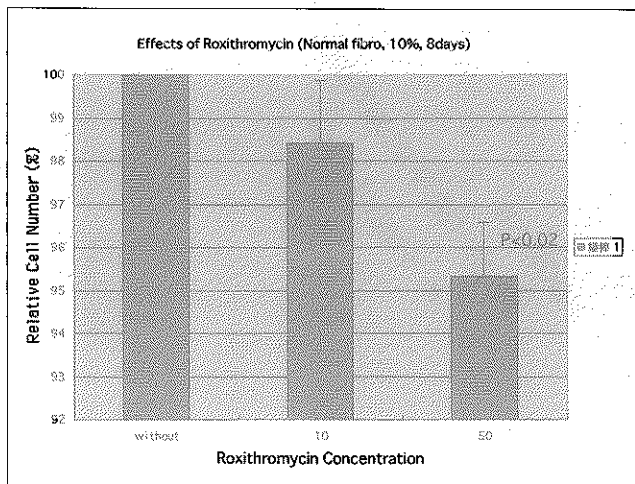
☒ 2 b



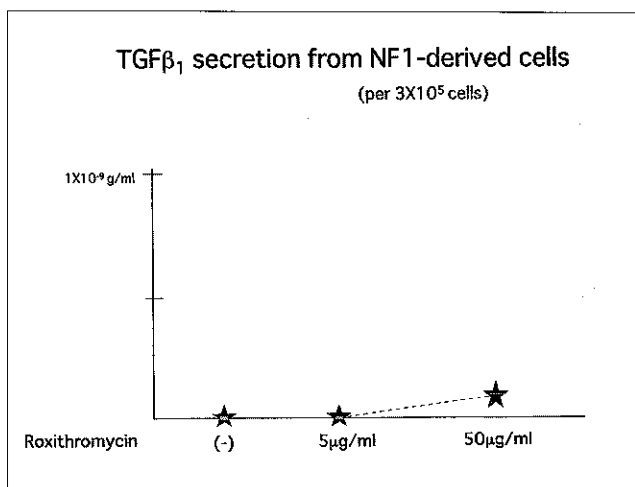
☒ 3 a



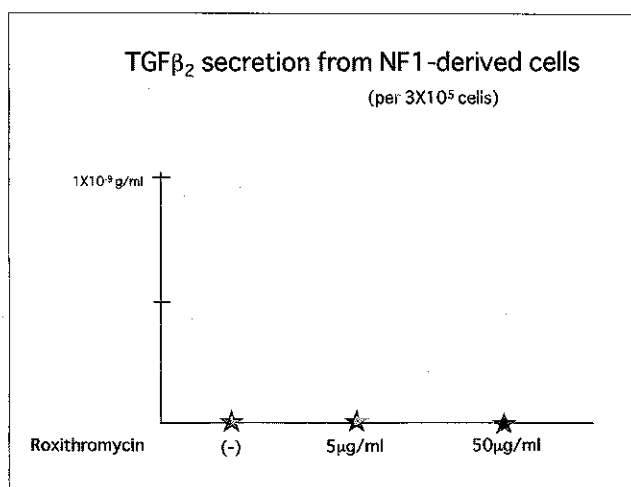
☒ 3 b



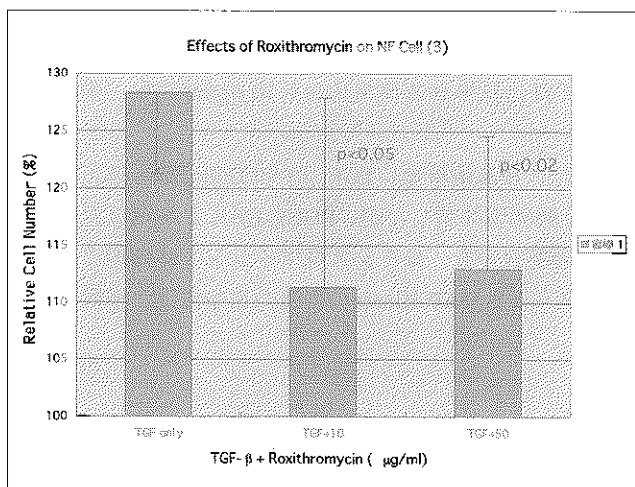
☒ 4



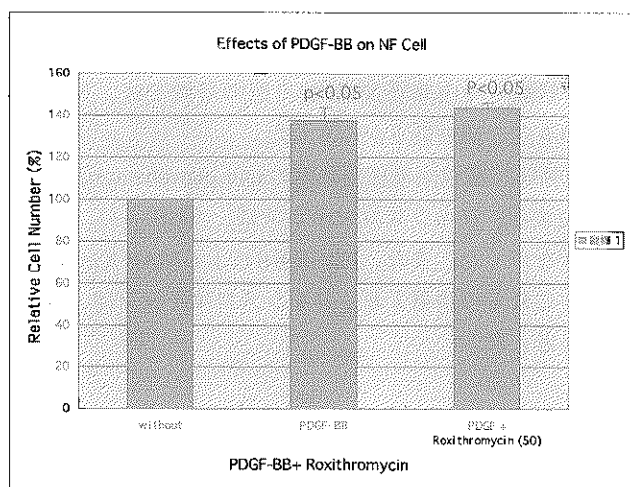
☒ 5 a



☒ 5 b



☒ 6



☒ 7