

略全身に小豆大から鳩卵大までの皮下腫瘍が、ところどころ索状物となって全身を覆い尽くすように存在している (図 5 a)。患者の希望する腫瘍を切除した。

病理組織学的所見：いずれも同様で、被膜を有する真珠様光沢を持つ大小のmassが連なって認められた (図 5 b)。組織学的に全て浮腫性で粘液腫状基質が豊富ななか、長円形の核を有し細長い細胞突起を持つ細胞が泳ぐように、また腫大した神経の断端が多数認められた。nodular PNFと診断した。

その後の経過：こののち nodular PNF はますます増えつづけ、大きくなっている。最近の MRI では胸壁・旁脊柱に極めて多数、小骨盤腔内は space を埋めつくすように nodular PNF が存在していることが分かっている (図 6)。平成 11 年 7 月からは両足のいたみ・しびれを訴え、平成 12 年 1 月からは異常な歩行で診療室を訪れるようになった。神経学的に大腿外側皮神経の感覚低下 (多発単神経炎)、深部感覚障害 (異常歩行はこれに基づく)、及び尺骨神経麻痺であった。

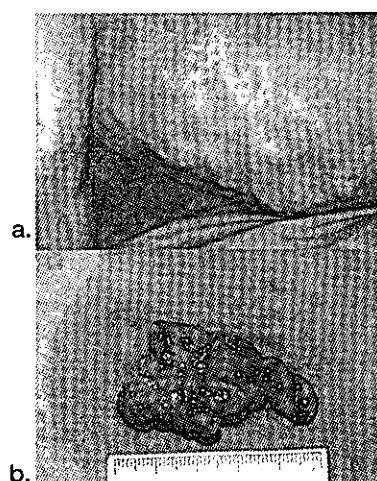


図 5. a. nodular PNF
b. 摘出標本



図 6. MRI：後腹膜腔 (T2)

【考 察】

本症例は、前症例の次男であり、phenotypeが全く異なるが、この点については前回報告した⁽¹⁰⁾。この症例は極めて稀な症例と考えられるが、このようにとどまることなく nodular PNF が増加・増大していることから、今後①神経症状の悪化、また臓器への圧迫症状の危険、また②nodular PNF から MPNST が異時性かつ多中心性に生じる危険が、予測される^(6,7,8)。現在ユベラ NS[®]、メチコバル[®]、テグレートール[®]、ロキソニン[®]内服で、しびれ・痛みはある程度抑えられているが、良い治療法を考えあぐねている。嚴重に経過を追跡するつもりである。

文 献

- (1) 大塚藤男 他. 厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班、神経皮膚症候群分科会. 平成10年度研究報告書：16～17, 1999
- (2) 新村真人、皮膚臨床16：15-21, 1974
- (3) Samuelsson B, et al. Neurofibromatosis 2：84-106, 1989
- (4) Johnson NS. et al. J Pediatr 134：767-772,1999
- (5) Harris EC. et. al Medicine 73：281-296, 1994
- (6) 倉持 朗 他.厚生省特定疾患.神経皮膚症候群調査研究班、平成5年度研究報告書：30～36,1994
- (7) 倉持 朗 他.厚生省特定疾患、神経皮膚症候群調査研究班、平成6年度研究報告書：28-33,1995
- (8) 倉持 朗.今日の皮膚疾患治療指針. 第2版. p398-399, 医学書院,1996
- (9) 日本整形外科学会、骨・軟部腫瘍委員会、整形外科・病理、悪性軟部腫瘍取扱い規約、第2版. p54～65, 金原出版、1989
- (10) 倉持 朗 他. 厚生省特定疾患皮膚・結合組織疾患調査研究班、神経皮膚症候群分科会. 平成10年度研究報告書：47～49,1999

NF1患者の炭酸ガスレーザー治療

研究協力者 大塚藤男, 市川栄子, 小辻智恵, 今門純久
筑波大学臨床医学系皮膚科

【研究要旨】

NF1の神経線維腫に対して炭酸ガスレーザーによる治療を試みた。連続照射で小さいものは蒸散させ、大きなものは輪郭をなぞるように連続照射し、腫瘍を持ち上げて切除した。照射後は約1週間で上皮化し、約3か月後にはほとんどが癒痕を残さず治癒した。炭酸ガスレーザーを用いた治療はNF1患者の特に小さい神経線維腫が多発するタイプの治療に有用であることが考えられた。

【研究目的】

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。

我々は昨年度の本研究会でNF1患者の治療に関する意識調査を行い、88%の患者がカフ・エ・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、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た。手術の理由としては目立つ場所になった、数を少しでも減らしたい、といった整容的理由が多く寄せられた。

実際に我々の施設においても定期的に神経線維腫を切除する目的で通院されている患者さんがいる。神経線維腫に対して有効な薬物療法のない現在、神経線維腫は大きなものに対しては切除することが最も有効な治療法であることは周知の事実であるが、多発する小さい神経線維腫を一つずつ切除することは時間的にも手技的にも不可能に近く、より短時間に多くの神経線維腫を切除できる方法が必要と考えられた。そこで我々は近年皮膚科、形成外科領域で有用性が注目されている炭酸ガスレーザーを用いて多発する神経線維腫の治療を試みた。

炭酸ガスレーザーは1977年、ナロンが手術に用いてその有用性を報告して以来、主にメスとして皮膚や筋肉の切開および皮膚表面の腫瘍の蒸散などに用いられてきた。炭酸ガスレーザー光線は中赤外線領域の10.6マイクロメートルに波長を有し、これは組織内の水分に主として吸収され、これが熱エネルギーに転換して蒸散、凝固壊死という形で組織の破壊が行われる。炭酸ガスレーザー光の焦点部は1500度に達し、切開の際、その周辺部の組織は熱作用により変性凝固し、血管は閉鎖されて止血される。同じく熱凝固層を生じて止血作用をもたらす電気メスと比べて、炭酸ガスレーザー光線は周辺組織の熱に寄る損傷が少なく安定しているという利点がある。そのため止血操作の煩雑さが少なく、また壊死組織が少なく、感染率の低下が期待できるといわれている。

【研究方法】

神経線維腫を切除する目的で定期的に通院している3名のNF1患者に対して炭酸ガスレーザーを照射する際の安定性、また比較的小さいものみに照射すること、等に関してのインフォームドコンセントをとり、照射を行った。使用したレーザーは日本赤外線工業製の炭酸ガスレーザー NHC レーザリール model IR101 で、波長は10.6マイクロメートル、レーザー出力1から7Wで照射した。連続照射で神経線維腫の大きさにより5mm以下の小さいものは蒸散させ、それより大きなものは輪郭をなぞるように連続照射し、腫瘍を持ち上げて切除した。局所麻酔は照射の1から1.5時間

前に皮膚表面麻酔剤（EMLA cream）をODT外用し、大きめの神経線維腫の下など麻酔効果が充分でない部分は1%キシロカインの局注を加えた。

【結 果】

多発する神経線維腫の部位を一回約10×10平方センチメートル程度、神経線維腫にして20から30個照射を行った。照射直後は炭化のために黒色を呈した。照射後はリンデロンVG軟膏を塗布し、ガーゼを貼付しアイスバックなどで冷却、照射の翌日からシャワー浴可とし、シャワー後にリンデロンVG軟膏外用し、上皮化を待った。

照射部位は大きなものでも約1週間で完全に上皮化が見られた。照射後二か月で、皮疹は扁平な状態となり照射部位に紅斑が残った。この紅斑は約3か月程で目立たなくなった。

患者さんに炭酸ガスレーザーによる治療の感想を聞いたところ、長所として、1) 切除に比べて一度に多数の神経線維腫の治療ができるがうれしい、2) 抜糸の必要がなく、シャワー浴も可であるのがよい、また短所として、大きなものだといつまでも上皮化しないのでわずらわしい、といった意見があげられた。実際に径が1cmを超えるものでは腫瘍の厚みもあり、切除後の創部が深くなるため上皮化に数週間を要することがわかった。そこで大きなものでは炭酸ガスレーザー切除後に縫縮を加えることによりこの問題が解決された。

【結 論】

炭酸ガスレーザーを用いた治療はNF1患者さんの特に小さい神経線維腫が多発するタイプの治療に有用であることが考えられた。その利点として止血操作の煩雑さがなく短時間に多数の神経線維腫の治療が可能であること、消毒、抜糸などが不要なため術後のケアが楽であることが考えられた。またメスによる切除に比べて小さなものではほとんど術後の痕を残さず治療が可能であり、照射の時間が短いので麻酔薬の投与量が節約できた。問題点としては1cmを越す神経線維腫では上皮化に時間がかかるため縫縮を要し、メスによる切除と差がないことが考えられた。

文 献

- 1) 森田泰鎮ほか；レーザーメスの基礎的問題と可能性；日本レーザー医学会誌 11：13-19, 1991
- 2) 齊藤浩；レーザーメスの可能性－蒸散CO₂レーザーによる小腫瘤の治療について；日本レーザー医学会誌 11：21-28, 1991
- 3) Anderson RR；Laser Medicine in Dermatology；J Dermatol 23：778-782, 1996
- 4) 橋本透ほか；炭酸ガスレーザーによる汗管腫の治療；臨皮 49：943-945, 1995
- 5) 橋本透ほか；炭酸ガスレーザーによる眼瞼黄色腫の治療；臨皮 50：1127-1129, 1996

神経線維腫に対するエタノール局所注入療法の研究

分担研究者 中山樹一郎, 渡邊亜紀, 佐藤典子,
清水昭彦, 久保田由美子
福岡大学医学部皮膚科

【研究目的】

レックリングハウゼン病に生ずる神経線維腫 (NF) の治療法は外科的切除が主になされてきたが, 小さな多数の NF の場合適用できないこと, また, 術後瘢痕が目立つという欠点がある。この点において, 他施設より CO₂ レーザーによる治療法の試みがなされているが, その臨床評価はまだ明確ではない。今回, 思春期~青年期に生じ始める小 NF に対し, 純エタノールの局所注入療法の臨床効果を検討した。また, NF 切除時の標本より NF 細胞を初代培養し, エタノール濃度依存性の細胞増殖阻害効果を検討した。

【研究方法】

29歳, 女性, および25歳, 女性のレックリングハウゼン病患者の小NF (径2~5mm) に対し, 外来にて純エタノールを局注した。局注は, 4~5個のNFに, 1個のNF当たり1回約0.3mlを腫瘍およびその周囲に行った。局注前に局所麻酔を行った。外来における治療では2~3週に1回局注を行った。

さらに, 上記29歳女性の患者が頭部のびまん性NFと右大腿の蔓状NFの切除目的で当科入院した際, 躯幹の多数の小NFにエタノールを局注した。手術および局注は全身麻酔下に行った。

倫理面への配慮として, 本療法は肝臓癌あるいは腎臓腫の治療に広く使用されていること, エタノールの局注により数日間局所疼痛があること, および全身的影響はないことを患者に説明し, 口頭にて患者の同意を得て本療法を施行した。

エタノールの局注時の疼痛の問題や, 多数のNFへの局注量の問題を検討する目的で, 上記びまん性NFおよび蔓状NFの切除標本の初代培養を行い, 得られた2種類NF細胞株を種々の濃度のエタノールで処理した。具体的には, 4×10^5 のNF細胞株を, 各100%, 50%, 25%, 0%の濃度のエタノール溶液 (MEM培養液で希釈) 2ml中で10分間懸濁し, 5分間遠心した。MEM培養液5mlで2回洗浄し, 実験に供した。なお, 細胞培養は10%FCS, 抗生物質を含むMEM培養液を用い, CO₂ インキュベータ中で行った。各エタノール処理細胞株は24Wellsのプレート中で培養し, Well中の細胞数を1日, 3日, および6日後にコールターカウンターで測定した。実験結果は3Wellsの平均値で求めた。

【研究結果】

図1a, bに29歳, 女性患者の小NFに対する外来でのエタノール局注前後の臨床像を示す。局注3カ月後にはNFは発赤を残して扁平化あるいは消失した。一般に, 局注2~3回後には70%以上の縮小がみられる。25歳, 女性患者の前腕の皮下のNFに対する2回の局注後においても, 発赤は残っているが, ほとんど皮下結節として触れなくなった (図は示さない)。図2a, bに2回エタノール局注後のNFの臨床像と病理組織像を示す。エタノール局注部は著明な壊死がみられた。

入院時, 上記患者の躯幹の約60個の小NFに対し全身麻酔下にてエタノール局注を行った。図3a, b, cに局注前, 1週間後, 4週間後の臨床像を示す。手術終了後, 局注部の疼痛は全く訴えがなかった。局注1週間後にはNFは紫紅色の壊死となった。4週間後には大半が脱落し, 色調も常色となった。

頭部のびまん性NFと大腿の蔓状NFの切除時の標本からNF細胞株を初代培養にて採取し, 種々の濃度のエタノールによる壊死効果を検討した。図4にびまん性NFより採取した細胞株を用いた実験結果を示す。NF細胞株は, エタ

ノール処理直後より細胞数は減少し、回収率は、コントロールに対し100%処理が9.6%、50%処理が30.7%、25%処理が64.0%であった。100%、および50%処理NF細胞株では、培養1日後には細胞数は著明に減少し、6日後には約4%の細胞数までに減少した。25%処理のNF細胞株でも培養1日後より細胞増殖は停止し、培養6日まで細胞数の増加は認められなかった。蔓状NFより得られた細胞株においてもほぼ同様の結果が得られた（データは示さない）。

【考 察】

今回、躯幹あるいは四肢の小さな皮膚NFに対し、純エタノールの局注を行い、その臨床効果を検討した。2～5mm大の腫瘍に対し、局所麻酔後、約0.3ml程度のエタノールを腫瘍およびその周囲に局注した。局所麻酔をしているにもかかわらず、エタノール注入時およびその後数日間局所に疼痛があり、その意味において外来では4～5個のNFへの局注が限度と思われた。2～3週間の期間をあけて数回局注し、良好な臨床効果を得た。本療法の意義は、思春期から青年期に生じ始めるまだ小さなNFに対しエタノールを局注することで、将来的なNFの増大を阻害することにある。また、全身に極めて多数の小NFが有る場合、全身麻酔下に全小腫瘍に局注が可能である。皮下深部のNFに対しては、エコーガイド下の局注が可能かもしれない。この点については、今後検討の予定である。

エタノール局注時の疼痛の緩和、あるいは一度に多数のNFへ局注する場合の純エタノールの局注量の減少をめざし、NF細胞に対する各段階のエタノール濃度の細胞傷害効果を培養細胞にて検討した。今回は、上記全身麻酔下にエタノール局注を施行した同一患者より切除したびまん性NFと蔓状NFを初代培養し、それぞれNF細胞株を得た。エタノール濃度100%と50%では、これらNF細胞株の壊死率は同程度と考えられた。また、エタノール25%でも、処理後NF細胞株の増殖は明らかに阻害された。以上の実験から、エタノール局注は、50%濃度エタノールにおいても同程度の効果が期待できること、また25%以上のエタノールの濃度であれば細胞の増殖の抑制は可能であること、が結論された。今後、エタノールと局所麻酔剤の各50%混合溶液による局注効果を検討する予定である。

【結 論】

レックリングハウゼン病の小神経線維腫に対するエタノール局注療法は有用な治療法と考えられた。

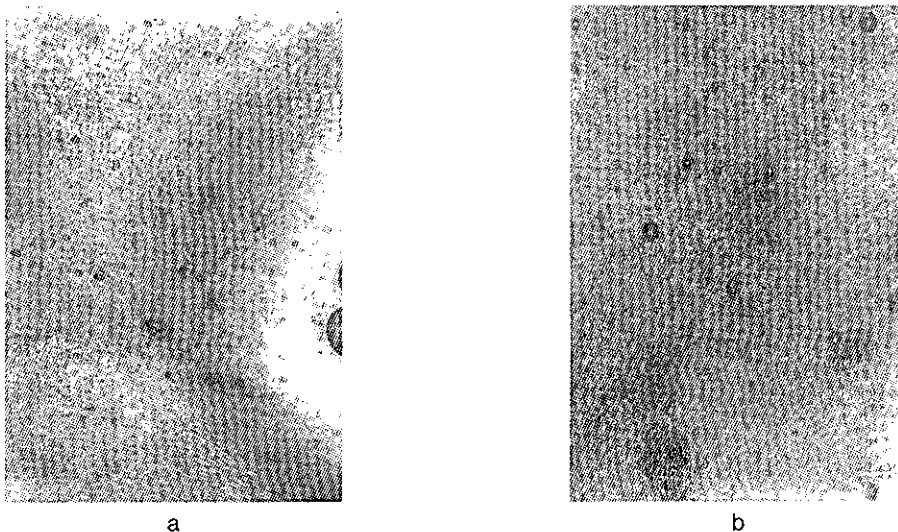


図1 レックリングハウゼン病患者（29歳、女性）の胸部の小神経線維腫に対し、純エタノールを2回局注した臨床像。a：治療前，b：治療3カ月後。

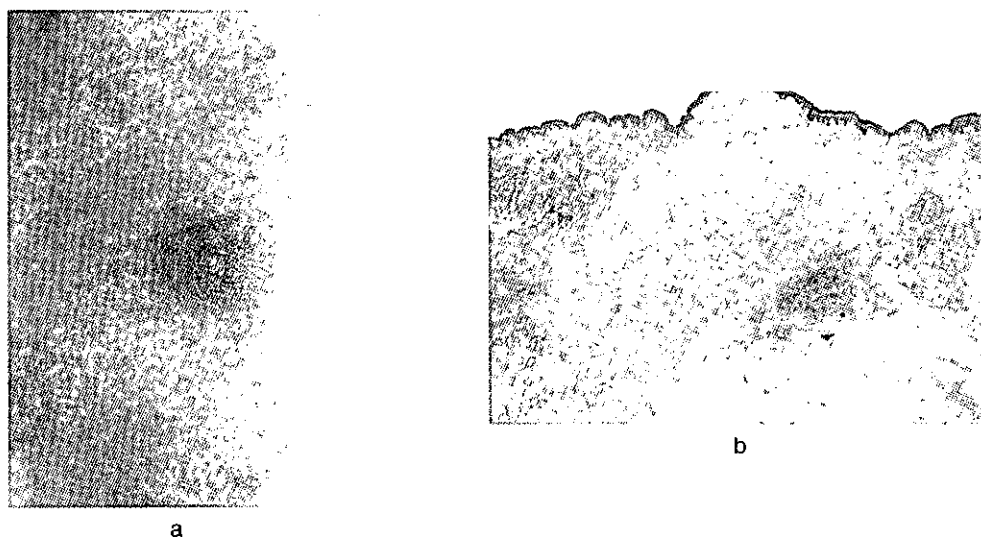


図2 レックリングハウゼン病患者(29歳, 女性)の左腋窩の小神経線維腫に対し, 純エタノールを2回局注し, 2週間後切除。a:局注後の臨床像, b:局注後の病理組織像, 腫瘍巢のびまん性の壊死がみられる。

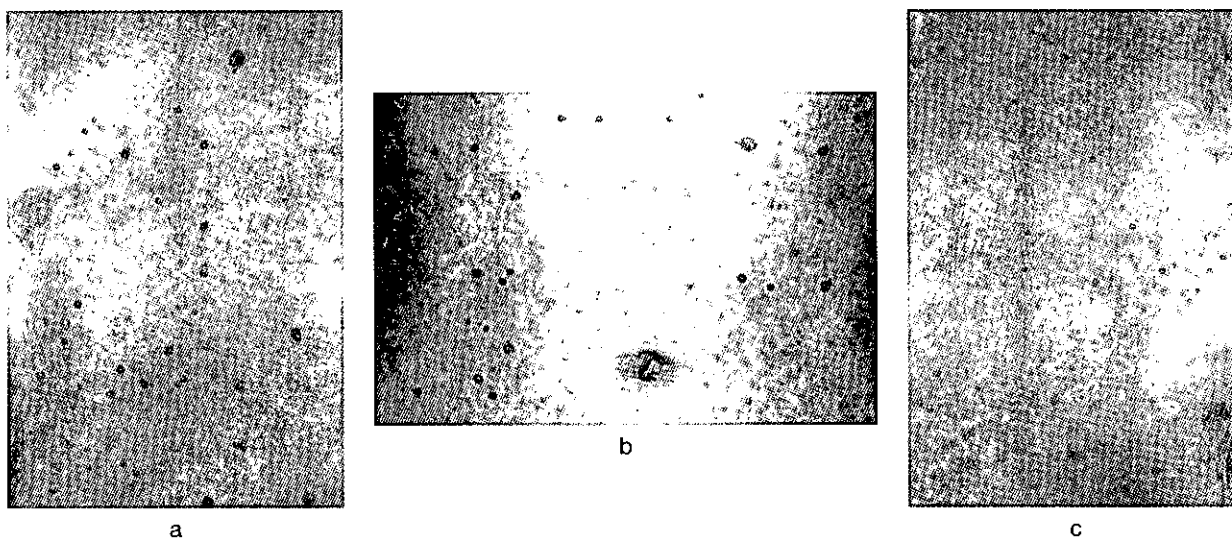


図3 全身麻酔下に施行したエタノール局注の臨床効果。a:治療前, b:局注1週後の腫瘍の壊死像, c:局注4週後の腫瘍の脱落像。

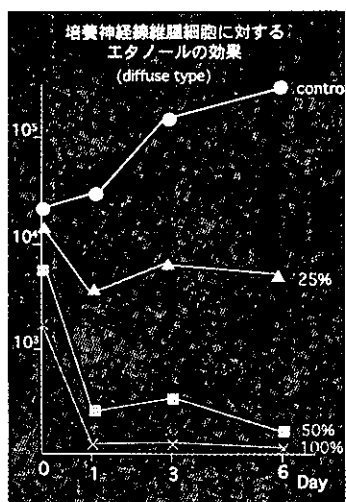


図4 種々の濃度のエタノールによる神経線維腫細胞株の壊死および細胞増殖抑制効果。方法の項で述べたごとく実験を行い, 50%および100%エタノール処理では培養6日後ではほぼ同程度の細胞壊死効果が得られた。

NF-1の色素斑のみの病期から孤立性皮膚神経線維腫の発現・増殖抑制を期待したケトチフェン長期内服療法の試み

研究協力者 緒方克己, 中山文子, 田島誠也, 立山 直,
黒川基樹, 井上勝平
宮崎医科大学皮膚科

【要 旨】

NF-1の思春期以降に出現、多発増生する皮膚の孤立性神経線維腫の発現・増殖抑制効果を期待し、色素斑のみの病期から長期間のケトチフェン内服療法を試み、その効果について検討した。1987年以降、現在まで経過観察を行っている10症例において、内服開始年齢は8歳から39歳までの平均17.4歳で、5年以上、最長12年間の観察では皮膚腫瘍の目立った発現・増殖は認められず、今後のさらなる症例追加、経過観察に期待が寄せられた。

【目 的】

思春期以降、多発増大して来るNF-1患者の皮膚孤立性神経線維腫(以下CSNFと略)は当事者にとって整容的、機能的かつ精神的に大きな負担となっている。CSNF腫瘍巣内には病理組織学的に肥満細胞が多数存在し、腫瘍増大に何らかの関与が指摘されている^{1)~3)}。肥満細胞抑制剤であるケトチフェンのCSNF発現・増殖抑制効果を期待した試み^{1,2)}があるが、その結果は定かではなく、また長期間におよぶ検討は行われていない。今回、われわれはケトチフェンの長期内服療法を行っている症例でのCSNF発現・増殖抑制効果の有無を検討した。

【対象と方法】

レックリングハウゼン斑からNF-1と診断し、色素斑のみでCSNFがまだ認められないか、認められても僅かで目立っていない症例を対象とした。内服開始年齢が5歳から39歳、平均17.4歳で男性5名、女性5名の合計10症例である。ケトチフェンの内服は1日1mgないし2mgで、1987年以降現在まで5年から最長12年に亘って、連続的あるいは断続的に内服を続け経過を観察した。皮膚腫瘍病変の発現・増大などの変化は肉眼的所見の記載および臨床写真記録の比較によって判定した。

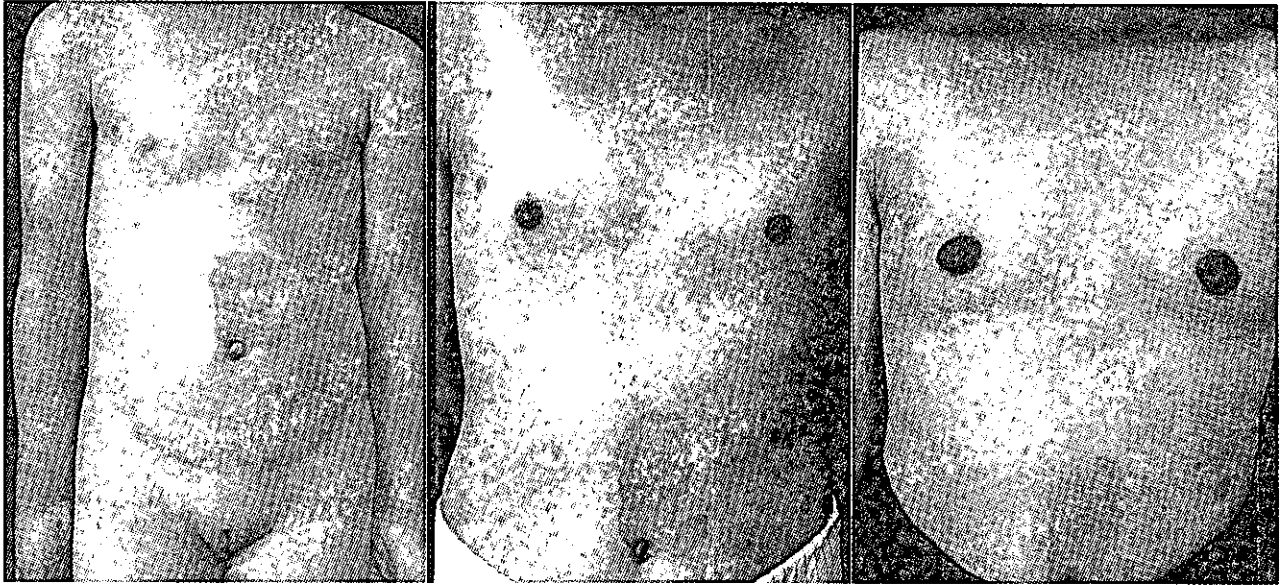
【結 果】

内服療法開始時期にCSNFをほとんど認めなかった8歳から15歳までの6症例(男性4例、女性2例)では、いずれも内服観察期間は10年から12年におよんだ。この6症例ではCSNFの明らかな出現は認めなかった。代表例を図1、2に示した。内服開始時期に散発性あるいは目立たない程度に小さなCSNFが認められた23歳から39歳までの4症例(男性1例、女性3例)の内服観察期間は5年から10年であった。この4症例では明らかな腫瘍の多発・増大は観察されなかった。またこの間、ケトチフェン内服によると思われる副作用は確認されなかった。

【考 察】

本療法の試みのいきさつ：NF-1にみられるCSNFは思春期以降に出現し、中年期以降では全身性に多発し増大することが多い。小腫瘍の多発増大は当事者にとって整容的、機能的かつ精神的に大きな負担となっている。この腫瘍

図1 11年間内服中の女性の臨床像



a. 5歳時、初診

b. 13歳時、内服開始

c. 18歳時、現在24歳で18歳時と変わりなく目立った皮膚腫瘍はまだない。

図2 10年間内服中の男性の臨床像



a. 5歳時、初診

b. 13歳時、内服開始

c. 22歳時、19歳時縦隔腫瘍摘出術手術痕あり、現在23歳、目立った皮膚腫瘍はない。

病変の治療には主として外科的切除術が行われて来た。しかし腫瘍が多数の場合、繰り返しの外科的切除は肉体的精神的苦痛も大きく、必ずしも十分な対応が出来ていない⁴⁾。そこで、本症はレックリングハウゼン斑により腫瘍発現前の早期診断が可能であり、腫瘍発現前からの腫瘍出現抑制、増大予防療法の対応が望まれる。一方、神経線維腫病変内には病理組織学的に肥満細胞が多数存在することが知られている¹⁾。1987年、Riccardi は、1) 神経線維腫病変の中に豊富にみられる肥満細胞は直接あるいは間接的に神経線維腫の発現や増殖に影響を与えているのではないかと、2) 神経線維腫増殖抑制に肥満細胞脱顆粒阻害剤が有用ではないかとの仮説から、NF-1 への肥満細胞脱顆粒阻害剤のケト

チフェン内服療法を試みている¹⁾。それによると、内服期間が約3年半足らずで、腫瘍の痒みや疼痛に対する効果を指標とした有効性の評価であり、さらに長期間の内服継続による腫瘍出現、増大についての評価はなされていなかった^{1,2)}。この指摘をきっかけにわれわれは1987年以降、ケトチフェン長期内服療法を CSNF の発現、増大の変化を評価の対象として観察を行って来た。また NF-1 では痒みの訴えも多く、強い搔痒感も CSNF の発育初期や急速な成長期をしばしば特徴づけるものとしても知られており¹⁾、以前からわれわれも抗ヒスタミン剤などの止痒剤を併用していたが、本邦で抗アレルギー剤とされているケトチフェンが米国の NF-1 治療ガイドラインにその治療薬として適応に上げられている³⁾。

本療法の試みの結果について：レックリングハウゼン斑のみの病期の8歳から15歳までの6例と CSNF が若干すでにみられていた23歳から39歳までの4例のいずれでも CSNF の明らかな発現、増殖はなく、その有効性をうかがわせる結果であった。しかし、類似の治療報告はほとんどない。本症における CSNF の出現形態・様式は多彩で個体差も大きく、また腫瘍の成長速度もきわめて緩徐である。したがって限られた少数例で、しかも10年前後の期間での非定量的な治療効果の評価は慎重を要し、現時点でのケトチフェンの CSNF の発現・増殖抑制効果の有無の判断は早計と思われる。今後のさらなる多数例での長期間の観察が必要で、その結果に期待が寄せられる。

【結 論】

肥満細胞抑制剤であるケトチフェンの長期内服療法は NF-1 の CSNF の発現・増殖抑制に有用性が期待される。この確認には今後、さらに多数例、長期間の観察が必要である。

参考文献

- 1) Riccardi VM.: Mast-cell stabilization to decrease neurofibroma growth, preliminary experience with ketotifen. Arch Dermatol, 123 : 1011-1016, 1987.
- 2) Riccardi VM.: A controlled multiphase trial of ketotifen to minimize neurofibroma-associated pain and itching. Arch Dermatol, 129 : 577-581, 1993.
- 3) 黒沢元博：肥満細胞研究の進歩。肥満細胞の新しい側面とアレルギー性疾患治療、1-8、Excepta Medica Ltd、Tokyo、1993.
- 4) 緒方克己ほか：NF-1における手術治療法の留意点の検討。厚生省特定疾患皮膚・結合組織調査研究班神経皮膚症候群分科会（班長 大塚藤男）平成10年度研究報告書、43-46、1999.
- 5) Eichenfield LF. et al.: Academy guidelines, guidelines of care for neurofibromatosis type 1, J Am Acad Dermatol, 37 : 625-630, 1997.

NF1の神経線維腫に対するTNP-470の影響に関する研究

主任研究者 大塚藤男, 小辻智恵, 市川栄子, 今門純久
筑波大学臨床医学系皮膚科

【研究要旨】

従来より血管増生抑制効果が報告されているTNP-470の神経線維腫由来培養細胞およびSCIDマウスに移植した神経線維腫に対する効果を検討した。まず、神経線維腫由来培養細胞を2%または5%のFBSの存在下にTNP-470を0.1ng/mlまたは1ng/mlに加えて培養し、トリチウム thymidine の取り込みを調べた。2%FBSの存在下にTNP-470を1ng/ml加えたところ、健常部由来培養細胞の30%に比べ腫瘍部由来培養細胞では50%とより大きく取り込みが減少した。また、PDGF-BB添加による増殖刺激に対するTNP-470の抑制効果は、健常部由来培養細胞よりも腫瘍部由来培養細胞において強かった。次に、神経線維腫を移植したSCIDマウスにTNP-470を30mg/mlの濃度で週5回、3週間皮下注射し、神経線維腫内の血管数を測定した。コントロールのアラビアガム生食投与群では、 34.1 ± 7.8 であるのに対してTNP-470群では、 15.1 ± 4.6 であった。

【研究目的】

血管増生抑制効果が報告されているTNP-470が、NF1の神経線維腫の増大を抑制するための治療薬として用いられるか否かを検討する。

【研究方法】

1) 神経線維腫由来培養細胞に対するTNP-470の影響の検討

神経線維腫由来培養細胞を2%または5%のFBSの存在下にTNP-470を0.1ng/mlまたは1ng/mlに加えて培養し、トリチウムthymidineの取り込みを調べた。同様に、PDGF-BBあるいはTGF- β 1により増殖を刺激した神経線維腫由来培養細胞にTNP-470を加えて培養し、トリチウムthymidineの取り込みを調べた。NF1患者の健常部由来培養線維芽細胞に対しても同様の実験を行い、神経線維腫由来培養細胞と比較した。また、

2) SCIDマウスに移植した神経線維腫に対するTNP-470の影響の検討

SCIDマウスに神経線維腫を移植した後、TNP-470を30mg/mlの濃度で週5回、3週間皮下注射した。移植した神経線維腫を取り出し、第8因子に対する抗体で免疫染色して腫瘍内の血管数を算定した。コントロールのアラビアガム生食投与群と比較した。

【研究結果】

1) 神経線維腫由来培養細胞に対するTNP-470の影響

無血清培地で48時間培養し休止期においた神経線維腫由来細胞を、2%のFBS存在下にTNP-470を0.1ng/mlまたは1ng/mlに加えて培養し、トリチウムthymidineの取り込みを調べた(図1)。TNP-470を1ng/ml加えたところ、健常部由来培養細胞の30%に比べ腫瘍部由来培養細胞では50%とより大きく取り込みが減少した。同様に、5%のFBS存在下にTNP-470を0.1ng/mlまたは1ng/mlに加えて培養し、トリチウム thymidine の取り込みを調べた(図2)。TNP-470を1ng/ml加えても、健常部由来培養細胞では明らかな取り込みの減少はなかったが、腫瘍部由来培養細胞では40%と明らかに取り込みが減少した。さらに、TGF- β 1 (2ng/ml) あるいはPDGF-BB (10ng/ml) を培地に加えて刺激した神経線維腫由来培

養細胞に、TNP-470を加えて培養しトリチウム thymidine の取り込みを調べたところ、TNP-470添加によりトリチウム thymidine の取り込みは減少した (図3)。また、PDGF-BBによる増殖刺激に対するTNP-470の増殖抑制効果は、神経線維腫由来培養細胞に対しての方が、健常部由来培養線維芽細胞に対してよりも大きかった。

2) SCIDマウスに移植した神経線維腫に対するTNP-470の影響

TNP-470を30mg/mlの濃度で週5回、3週間皮下注射し、第8因子に対する抗体で免疫染色して腫瘍内の血管数を算定した (図4)。コントロールのアラビアガム生食投与群では神経線維腫内の血管数が 34.1 ± 7.8 であるのに対して、TNP-470群では 15.1 ± 4.6 であり、TNP-470群では有意に (危険率1%) 血管数が減少した。

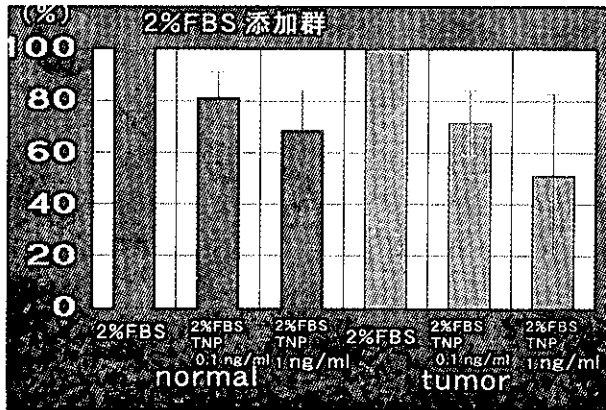
【考 察】

TNP-470はアスペルギルス菌より分離された、血管内皮細胞の増殖阻害による血管新生阻害作用をもつフマギリン誘導体である。血管新生阻害に基づき、種々の悪性腫瘍に対する抗腫瘍活性を示すことが知られている。TNP-470は *in vitro* では、神経線維腫由来培養細胞に対して1.0ng/mlという低濃度から増殖抑制作用を示した。2%FBS添加時やPDGF-BB添加時において、TNP-470による増殖抑制作用は健常部由来培養線維芽細胞に対してよりも神経線維腫由来培養細胞に対しての方が大きかった。

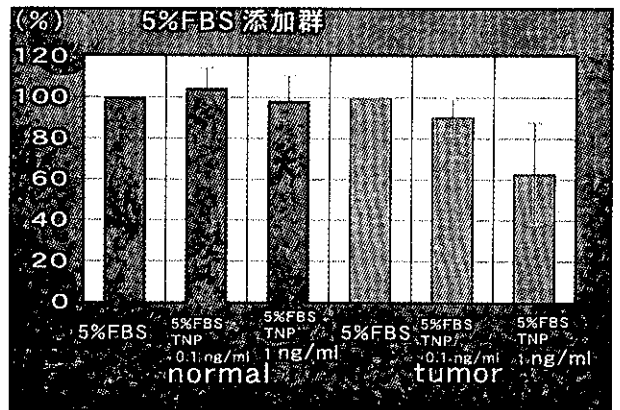
TNP-470はSCIDマウスに移植した神経線維腫に対しても、週5回、3週間の皮下注射で、腫瘍内の血管数を明らかに減少させた。

【結 論】

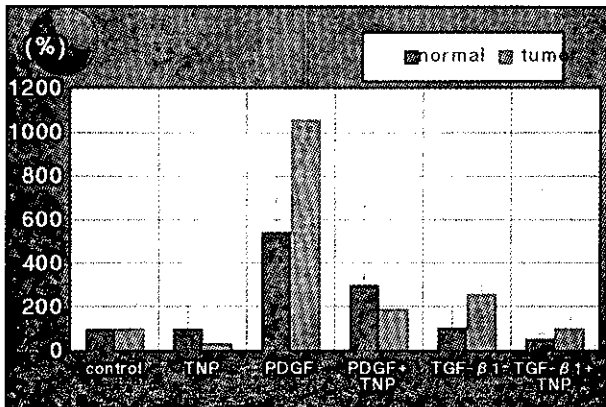
TNP-470が、神経線維腫の増殖を抑制する作用を持つことが、*in vitro*、*in vivo*両方の実験で示唆された。TNP-470が神経線維腫の治療に真に有用であるか否かは、今後のさらなる検討が必要である。



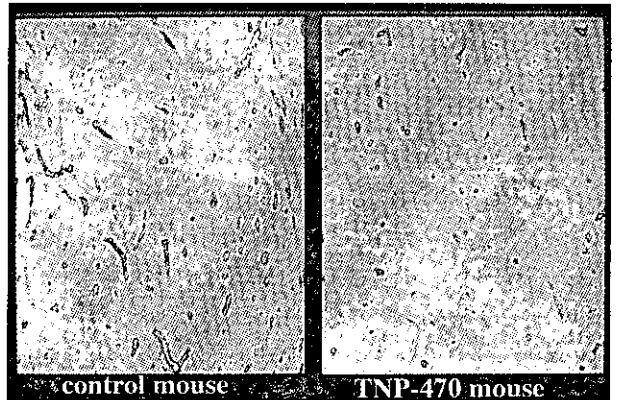
TNP-470 図1



TNP-470 図2



TNP-470 図3



TNP-470 図4

神経線維腫由来培養細胞に対するアクチビンAの影響に関する研究

研究協力者 今門純久, 小辻智恵, 市川栄子, 大塚藤男
筑波大学臨床医学系皮膚科

【研究要旨】

NF1の神経線維腫由来培養細胞に対するアクチビンAの影響を検討した。24穴プレートに蒔いた神経線維腫由来培養細胞を48時間無血清培地にて培養し休止期にした後、1nMから0.1pMの濃度のアクチビンAを培地に加えて24時間後のthymidineの取り込みを調べ、健常部由来培養線維芽細胞と比較した。腫瘍部由来細胞は、1pMの濃度のアクチビンAの添加でトリチウムthymidineの取り込みは最大（2.5倍）になった。健常部由来細胞では、10pMの濃度のアクチビンAの添加でトリチウムthymidineの取り込みは最大（4.5倍）になった。アクチビンAによる増殖刺激作用は神経線維腫由来培養細胞に対してよりも健常部由来培養線維芽細胞に対しての方が大きく、この結果よりアクチビンAあるいはフォリスタチンが神経線維腫の治療に用いられる可能性は低いものと考えた。

【研究目的】

アクチビンAあるいはフォリスタチンがNF1の神経線維腫の治療に用いられる可能性があるか、否かを検討する。

【研究方法】

NF1の神経線維腫由来培養細胞を24穴プレートに蒔き、48時間無血清培地にて培養し休止期にした後、1nMから0.1pMの濃度のアクチビンAを培地に加えて24時間後のトリチウムthymidineの取り込みを調べ、健常部由来培養線維芽細胞と比較した。また、神経線維腫由来培養細胞および健常部由来培養線維芽細胞におけるactivin receptor IIAの発現を、抗activin receptor IIA抗体を用いたimmunoblot法で比較検討した。

【研究結果】

腫瘍部由来培養細胞は、1pMの濃度のアクチビンAの添加でトリチウムthymidineの取り込みは最大（2.5倍）になった（図1）。健常部由来線維芽細胞では、10pMの濃度のアクチビンAの添加でトリチウムthymidineの取り込みは最大（4.5倍）になった（図1）。抗activin receptor IIA抗体を用いたimmunoblot法では、activin receptor IIAの発現は、神経線維腫由来培養細胞と健常部由来培養線維芽細胞の間で大差はなかった。

【考 察】

アクチビンはインヒビンの β サブユニット（ βA , βB など）の2量体でありアクチビンA、アクチビンBなどのアイソフォームが存在する。アクチビンAは、マクロファージ、線維芽細胞、ケラチノサイトなどで産生され、下垂体におけるFSH分泌促進作用の他、線維芽細胞に対する増殖促進作用も知られている。また、アクチビンAのこうした作用は、フォリスタチンにより阻害される。今回、NF1の神経線維腫由来培養細胞に対するアクチビンAの影響を調べ、アクチビンAあるいはフォリスタチンが神経線維腫の治療に用いられる可能性を検討した。神経線維腫由来培養細胞

と健常部由来培養線維芽細胞の間でアクチビンAに対する反応性に大差はなく、アクチビンAあるいはフォリスタチンが神経線維腫の治療に用いられる可能性は低いものと考えた。

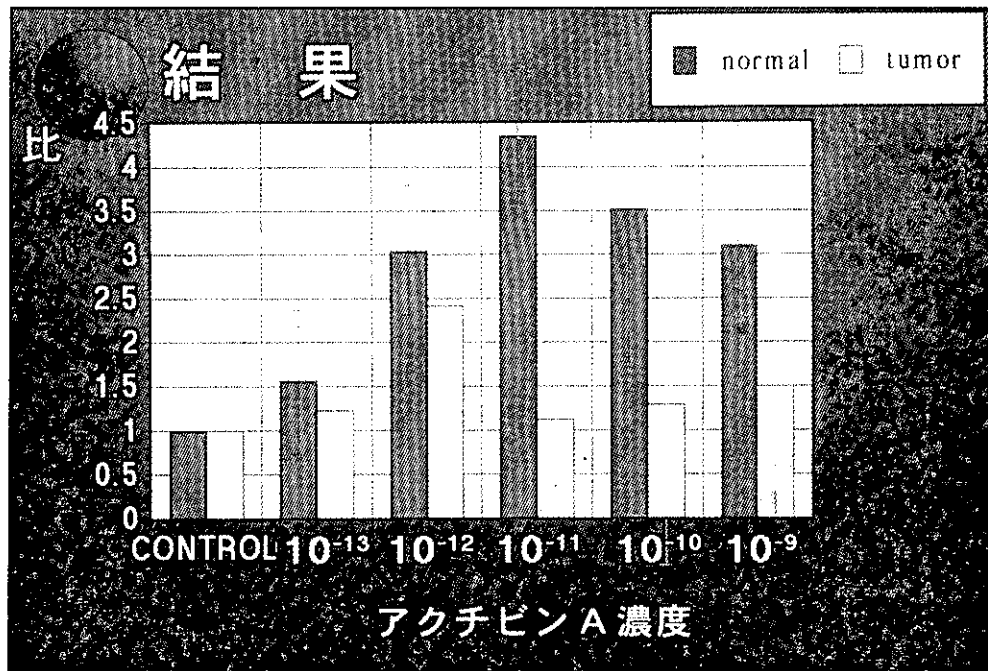


図 1

【結 論】

アクチビンAあるいはフォリスタチンが、NF1の神経線維腫の治療に用いられる可能性は低いと考えた。

神経鞘腫初代培養細胞における遺伝子導入の試み

研究協力者 吉田 純, 須崎法幸, 齋藤 清, 大塚吾郎
名古屋大学脳神経外科

【研究要旨】

NF2に伴う神経鞘腫2例および弧発性聴神経鞘腫4例で、手術時に採取した腫瘍細胞から初代培養を行った。全例初代培養は成功し、免疫染色でS100蛋白陽性のschwannoma細胞と確認した。アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入では、MOI=1において50%以上の細胞に、MOI=10ではほとんど100%にx-gal陽性の β -galactosidase遺伝子の発現がみとめられた。NF2は治療困難で予後不良の疾患であり、遺伝子治療などの新しい治療法の開発が望まれる。

【研究目的】

神経線維腫症2型（Neurofibromatosis type 2, NF2）に伴う聴神経鞘腫および脊髄神経鞘腫は組織学的には良性腫瘍であるが、多発し再発しやすいために、患者の生命機能予後は極めて不良である。手術による摘出が困難であることも多く、腫瘍の増殖を抑制する方法の開発が望まれる。我々は、治療法開発の基礎実験として、神経鞘腫の初代培養を行い増殖した細胞に対して遺伝子導入を試みた。

【研究方法】

対象は2例のNF2に発生した神経鞘腫および4例の弧発性の聴神経鞘腫で、手術時に採取した腫瘍細胞から培地として10%FCSを含んだDMEMを使用し初代培養を行った。confluentに近い状態で継代を重ねて細胞を増殖させた。手術時に得られた永久標本でschwannomaであることを確認し、in vitroで増殖させた細胞をschwannomaと確認するために継代ごとに一次抗体として兔S100蛋白polyclonal Abを使用し免疫組織染色を行った。negative controlとしてはgliomaおよびpituitary adenomaの細胞株、線維芽細胞を用いた。

次にチャンバースライド上に細胞を増殖させ、免疫組織学的にschwannomaであることを確認した腫瘍細胞に対し、 β -galactosidase遺伝子をアデノウイルスベクター（MOI=0, 0.1, 1, 2, 5, 10, 50）にて遺伝子導入した。1例ではリボソーム（0.003, 0.01, 0.03 μ mol/ml）による遺伝子導入も試みた。その後スライドを2%formaldehyde、0.2%gluteraldehyde含有PBSで固定した後、x-gal染色を行った。

【研究結果】

6例全例において初代培養は成功し、免疫染色でS100蛋白陽性であることを確認した。4例が4代目まで増殖したが、2例においては3代目以降は増殖しなかった。NF2に伴う神経鞘腫と弧発性神経鞘腫の間に継代数の差はみられなかった。negative controlのgliomaおよびpituitary adenomaの細胞株、線維芽細胞はS100蛋白陰性であった。

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入では、MOI=1において50%以上の細胞にx-gal陽性の β -galactosidase遺伝子の発現がみとめられ、MOI=10ではほとんど100%に発現した（図1）。これらの導入効率は、NF2に伴う神経鞘腫と弧発性神経鞘腫の間に差はなく、継代数にかかわらずほぼ同じ結果であった。リボソームによる遺伝子導入の結果は、0.03 μ mol/mlの濃度において約100個に1個の割合（導入発現率は約1%）でx-gal陽性細胞を認めたが、それ以下の濃度においては、陽性細胞を認めなかった。

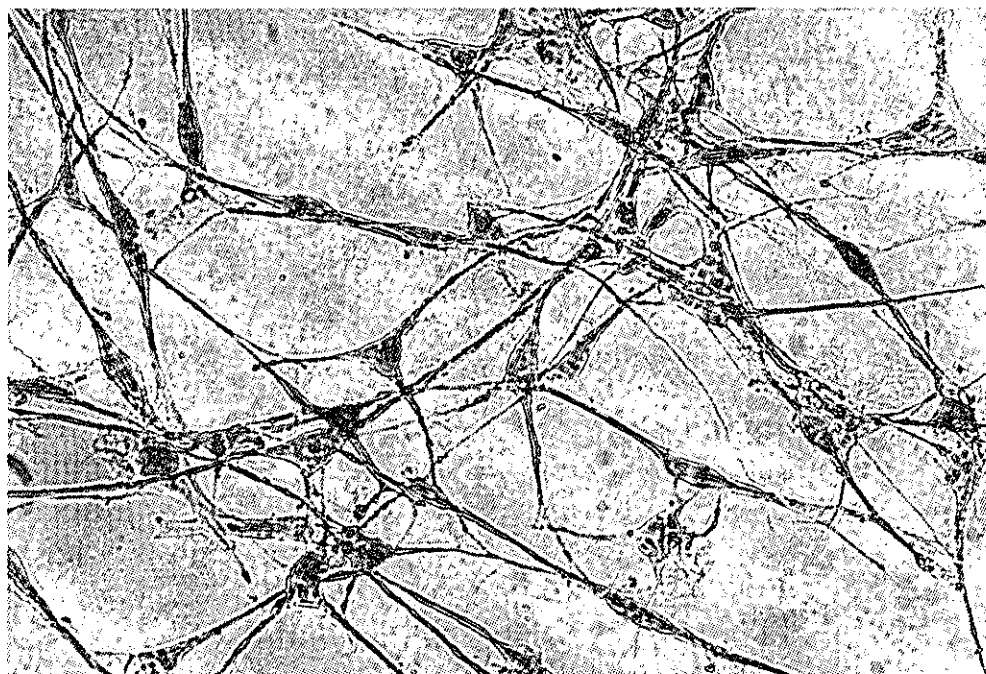


図1 神経鞘腫の初代培養細胞へのアデノウイルスベクターを用いた β -galactosidase遺伝子導入。MOI = 10ではほとんどの細胞がx-gal陽性を示す。

【考 察】

我々はNF2を含む神経鞘腫の初代培養細胞に遺伝子導入を試み、アデノウイルスベクターでは高い効率で遺伝子導入が可能であった。良性腫瘍では一般に治療に苦慮することが少なく、放射線手術以外の有効な補助療法は開発されていない。しかしNF2は今なお治療困難で予後不良の疾患であり、遺伝子治療などの新しい治療法の開発が望まれている。今回は、基礎実験としてアデノウイルスベクターにより遺伝子導入を行ったが、より安全で効率の良い遺伝子導入法の検討や、ベクター投与方法の検討が必要である。

成長の遅い良性腫瘍に対し、腫瘍の増殖抑制をどの様に達成するかは大きな課題である。NF2の遺伝子異常については、近年めざましい結果が報告され、今後もさらに研究が進むことが予想されている。近い将来、診断・研究におけるこうした進歩を治療学にも応用することが可能となることが期待される。

神経線維腫におけるFas Ligandの発現について

研究協力者 島田眞路, 斎藤 敦, 北村玲子
山梨医科大学皮膚科

【研究要旨】

我々は、すでにマウスの正常線維芽細胞をレチノイン酸とともに培養した時、メッセージレベルおよび蛋白レベルにおいてFas Ligand分子の発現の増強が認められることを報告している。そこで、レックリングハウゼン病における神経線維腫より腫瘍細胞をin vitroにおいてレチノイン酸とともに培養し、RNA抽出後RT-PCRを施行し、Fas Ligand分子の発現の違いを正常線維芽細胞と比較検討した。その結果、培養腫瘍細胞においては、レチノイン酸とともに培養しても、とくにFas Ligand分子のメッセージレベルでの発現の増強は認めなかった。しかし、FACS解析においては、一部の腫瘍細胞において、レチノイン酸が細胞表面上のFas Ligand分子の発現をわずかに増強させることが認められた。

【研究目的】

レックリングハウゼン病における神経線維腫のFas Ligand分子の発現調節を解析し、腫瘍成立の成因を解析するとともに、将来的には、治療への応用も考えていきたい。

【研究方法】

レックリングハウゼン病患者より神経線維腫を切除し培養系にて腫瘍細胞を培養する。この培養腫瘍細胞をレチノイン酸とともに培養し、RNAzolBを用いてトータルRNAを抽出する。また、正常皮膚の真皮より線維芽細胞を培養し、同様にレチノイン酸とともに培養し、トータルRNAを抽出する。Fas LigandのPCR用プライマーを用いRT-PCRを施行し、その発現の強弱を正常線維芽細胞由来のRNAを使用したRT-PCRのデータと比較検討する。さらに、抗Fas Ligand抗体を用いてその細胞表面の蛋白レベルでのFas Ligandの発現についてもFACS解析にて検討を加える。

【結 果】

培養腫瘍細胞においては、レチノイン酸とともに培養しても、とくにFas Ligand分子のメッセージレベルでの発現の増強は認めなかった。しかし、FACS解析においては、一部の腫瘍細胞において、レチノイン酸が、その細胞表面上のFas Ligand分子の発現をわずかに増強させることが認められた。

【考察及び結論】

我々のように神経線維腫を構成する腫瘍細胞についてアポトーシス関連分子であるFas Ligand分子のメッセージおよび蛋白レベルでの発現を検討した報告は認められない。近年、ある種の腫瘍においてFas Ligandの発現が認められ、このFas Ligandの発現のために、腫瘍を攻撃するcytotoxic T細胞（通常Fas Ag 陽性）にアポトーシスを生じさせ、いわゆる免疫寛容を形成し腫瘍の成立に関与しているものが存在するようになってきた。我々は、すでにマウスにおいてレチノイン酸を用いて皮膚線維芽細胞上にFas Ligandの発現が誘導されることを報告している。そ

ここで、今回神経線維腫を構成する腫瘍細胞を用いて、Fas Ligandの発現やレチノイン酸によるFas Ligand分子の発現調節について検討した。結果としては、正常皮膚線維芽細胞においては、Fas Ligand分子は、発現していないが、レチノイン酸とともに培養した時には、Fas Ligand分子の発現が認められるようになった。腫瘍細胞においては、Fas Ligand分子の発現は、一定した傾向がなく、レチノイン酸とともに培養した時にもとくにFas Ligand分子の発現に影響を与えなかった。

今後は、さらにRT-PCRやFACS解析のデータのみでなくRPAのテクニックを駆使して解析を進め、Fas Ligandやその他のアポトーシス関連分子の発現を定量的に分析していきたいと考えている。

また、分子生物学のテクニックを用い、上述のFas Ligandのレセプターを腫瘍細胞に導入することにより腫瘍の増殖を抑えられるかどうかを検討し、とくに治療に難渋する巨大神経線維腫などを含めた治療に応用したいと考えている。

神経線維腫培養細胞におけるVEGFの発現に関する研究

主任研究者 大塚藤男, 小辻智恵, 市川栄子, 今門純久
筑波大学臨床医学系皮膚科

【研究要旨】

NF1の神経線維腫由来培養細胞におけるVEGFの産生をELISA法にて検討した。35mmシャーレに confluent にした神経線維腫由来培養細胞を48時間無血清培地にて培養し休止期にした後、IGF-1 (100ng/ml)、TGF- β 1 (2ng/ml) あるいはPDGF-BB (10ng/ml) を培地に加えて48時間培養後の上清中のVEGFを定量した。IGF-1、TGF- β 1あるいはPDGF-BBの添加で、無添加群のそれぞれ約3倍、4倍、6倍とVEGF産生量が増加した。

【研究目的】

我々は、前年度の本研究で、神経線維腫は周囲の真皮や神経鞘腫に比較して血管に富み、また、basic FGFやVEGFを高発現していることを明らかにした。今回、神経線維腫由来培養細胞におけるVEGFの産生と、VEGF産生に及ぼすTGF- β 1やPDGF-BBの影響を調べた。

【研究方法】

35mmシャーレに confluent にした神経線維腫由来培養細胞を48時間無血清培地にて培養し休止期にした後、IGF-1 (100ng/ml)、TGF- β 1 (2ng/ml) あるいはPDGF-BB (10ng/ml) を培地に加えて48時間培養後の上清中のVEGFをELISA法にて定量した。また、同様にTGF- β 1あるいはPDGF-BB添加後のVEGFmRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。

【研究結果】

NF1の神経線維腫由来培養細胞におけるVEGFの産生は、IGF-1 (100ng/ml)、TGF- β 1 (2ng/ml) あるいはPDGF-BB (10ng/ml) の添加で、無添加群のそれぞれ約3倍、4倍、6倍とVEGF産生量が増加した(図1)。また、VEGFmRNAの発現はTGF- β 1あるいはPDGF-BB添加で誘導されることを確認した(図2)。NF1の健常部由来培養線維芽細胞におけるVEGFの産生と、VEGF産生に及ぼすTGF- β 1やPDGF-BBの影響を調べたが、病変部由来培養細胞に比較して明らかな違いは確認出来なかった。

【考 察】

VEGFは、血管内皮細胞の増殖を特異的に刺激することが知られており、basic FGFやTGF- β 1、PDEC GF、TGF- α などととも、angiogenicな増殖因子として知られている。今回、NF1の神経線維腫由来培養細胞は、10万個の細胞あたり10~60pg/mlのVEGFを産生することが分かり、このVEGFが神経線維腫における豊富な血管に寄与している可能性が示唆された。また、IGF-1、TGF- β 1あるいはPDGF-BBの添加で、神経線維腫由来培養細胞よりのVEGF産生量が増加したが、IGF-1は思春期や妊娠中に血中濃度が上昇することが知られており、濃度の上昇したIGF-1により誘導されたVEGFが思春期や妊娠中によく見られる神経線維腫の増大の一因となっていると考えた。また、従来より神経線維腫においてPDGF β receptorが高発現していることが報告されており、神経線維腫由来培養細胞においては周囲健常部由来培養線維芽細胞に比較して、TGF- β 1あるいはPDGF-BB刺激により、VEGFがより多く産生されることが予想され

れた。しかし、我々の実験系では、明らかな違いは確認出来なかった。

【結 論】

神経線維腫細胞から産生されるVEGFが、神経線維腫の豊富な血管や易出血性の一因となっていると考えた。また、神経線維腫からのVEGF産生はIGF-1、TGF- β 1あるいはPDGF-BB刺激により増大したが、この増大が思春期や妊娠中によく見られる神経線維腫の増大の一因となっていると考えた。

【研究発表】

1) 神経線維腫におけるVEGFの発現

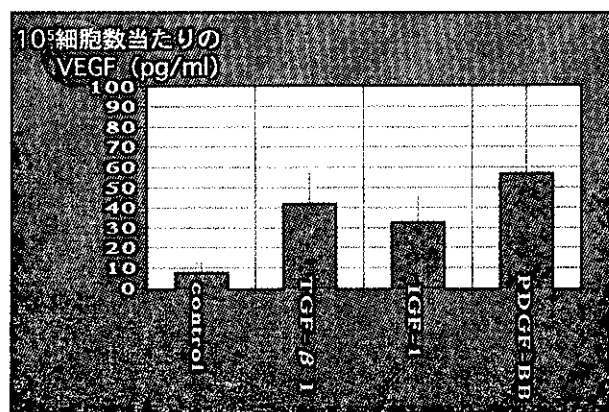
今門純久、川内康弘、小辻智恵、市川栄子、大塚藤男

第26回、日本皮膚科学会香川地方会

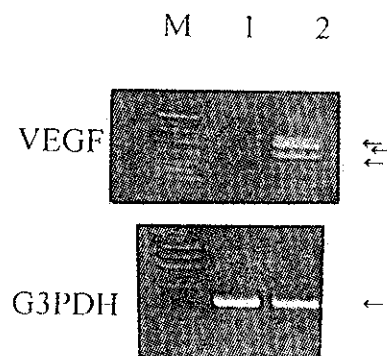
2) Vascular endothelial growth factor production of neurofibroma-derived cultured cells from patients of neurofibromatosis type 1.

T Kotsuji, S Imakado, Y Kawachi, E Ichikawa, F Otsuka

The 61st annual meeting of the society for investigative dermatology



VEGF 図 1



VEGF 図 2

Neurofibromatosis type 1 の脳 MRI 所見 — 特にいわゆる unidentified bright objects の臨床的意義について —

研究協力者 土田哲也, 倉持 朗,
埼玉医科大学皮膚科
西川 亮, 松谷雅生
埼玉医科大学脳神経外科

【研究要旨】

NF1患者の脳MRIを解析した。65例中19例（29%）において基底核，小脳脳幹にいわゆるunidentified bright objects (UBOs) を認めた。脳幹の腫大を伴う脳幹UBOsや，6年の経過で増大していた小脳UBOs症例も認められた。また小脳膠芽腫が一例認められた。自験例の解析および文献的考察から，特に後頭蓋窩のUBOsについては小脳脳幹グリオーマへ進展する症例が存在する可能性が示唆され，慎重な追跡が必要であると考えられた。

【研究目的】

Neurofibromatosis Type 1 (NF1) 患者の脳病変としては視神経膠腫が広く知られていて，その頻度は欧米においては15-36%と報告されている⁽¹⁻³⁾。一方，最近のmagnetic resonance imaging (MRI) の進歩に伴って，小脳脳幹および基底核を好発部位とするMRI・T2強調画像における高信号病変 (unidentified bright objects [UBOs]) が，NF1患者の多数（約60%）に認められることが注目されてきている^(2,3)。UBOsの成因については過誤腫説，heterotopia説や髄鞘形成異常説があるが，臨床的な意義や本態について結論は出ていない⁽⁴⁾。今回我々は，NF1患者の脳MRI所見，特にこのいわゆるUBOsについてその臨床的な意義を明らかにするために，過去の症例を解析し検討を加えた。

【研究方法】

1994年から1999年9月までに埼玉医科大学で脳MRIを施行したNF1患者65例を対象とした。年齢は1-72才。視神経膠腫の1例，小脳膠芽腫の1例，および発達発育障害を認めた1才児以外は，皮膚科において脳病変のスクリーニングのために施行されたMRIである。MRI・T2強調画像で認められた円形ないし類円形の限局性高信号病変をUBOとした。

【研究結果】

65例中32例（49%）では脳MRIに異常所見を認めなかった。

いわゆるUBOsを認めた症例は19例（29%）であった。典型例を図1に示す。T1強調画像では，低ないし等信号を示すものが21病変，高信号域を示すものは5病変であった。全病変ともガドリニウムによる造影効果を認めなかった。発生部位はテント上では淡蒼球および大脳脚に，テント下では中小脳脚および脳幹部に好発していた。テント上のみUBOsを認めた症例は9例で，その年齢は4-56才（中央値16才），テント上下にUBOsを認めた症例は6例で2-47才（中央値10才），テント下のみ症例は4例，1-17才（中央値3.5才）で，テント下病変ほど年齢が若い傾向が認められた（表1）。

橋の腫大所見を認めた一例（図2）を除いてmass effectは認めなかった。UBOsを2年以上の間隔で追跡し得た症例