

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawamura A, et al	Correlation between microsatellite instability and metachronous disease recurrence after endoscopic mucosal resection of patients with early stage gastric carcinoma	Cancer	91	339-345	2001
Kinoshita Y, et al	What is the role of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 2C peptide produced in the gastrointestinal tract?	J. Gastroenterology	36	62-64	2001
Kazumori H, et al	Analysis of gastrin receptor gene expression in laser capture microdissection	FEBS LETTERS	189	208-214	2001
Watanabe M, et al	Partial obstruction of the colon caused by postoperative adhesions after cholecystectomy as a rare form of postcholecystectomy syndrome	Am. J. Gastroenterol	96	255-256	2001
Fukuda R, et al	Co-infection by serologically-silent hepatitis B virus may contribute to poor interferon response in patients with chronic hepatitis C by down-regulation of type-1 interferon receptor gene expression in the liver	J Med Virol	63	2210-227	2001
Fukuda R, et al	Gastrointestinal stromal tumor with a novel mutation of KIT proto-oncogene	Internal Medicine		in press	
Kawamura A, et al	Prevalence of functional dyspepsia and relationship with Helicobacter pylori infection in a Japanese population	J. Gastroenterol Hepatol		in press	
Kawamura A, et al	Prevalence of irritable bowel syndrome and its relationship with Helicobacter pylori infection in a Japanese population	Am J Gastroenterol		in press	
Watanabe M, et al	Report of a case showing a recovery from liver cirrhosis to chronic hepatitis, type C, after glycyrrhizin injection for two years and a sustained response by the following interferon therapy	Am. J. Gastroenterol		in press	
Adachi K, et al	Efficacy of ecabot sodium for Helicobacter pylori eradication triple therapy in comparison with a lansoprazole-based regimen. Alimentary Pharmacology	Therapeutics		in press	
Rumi MAK, et al	Peroxisome proliferator -activated receptor γ ligand induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma	British J Cancer		in press	

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

高齢者における腸管粘膜防御機構の解析

-腸管上皮細胞 IgG Fc レセプター結合蛋白の役割に関する基礎的研究

日比紀文（慶應義塾大学医学部内科 教授）

研究要旨

高齢者におけるストレス刺激に対する腸管粘膜局所免疫装置の機能を明らかにするために、病原性大腸菌を用いた腸内細菌抗原刺激に対する IgG Fc-Binding Protein による防御反応を *in vitro* の系において解析した。

A. 研究目的

免疫能の低下傾向にある高齢者における腸内細菌抗原刺激に対する粘膜防御機構を *in vitro* の系において解析する。

B. 研究方法

Fc-Binding Protein (FcBP)の生理機能活性の解析

1) ELISA による FcBP と IgG の結合活性の評価

a) HRP 標識ヒト IgG, A およびラビット IgG の FcBP との結合を ELISA により測定し、その binding activity を解析する。

b) ヒト mucin に対する monoclonal Ab (M23) ならびに FcBP に対する monoclonal Ab (K9) と FcBP の結合を測定する。さらに腸内細菌抗原としての病原性大腸菌 (rabbit diarrheagenic E. coli (RDEC)) と抗血清 (anti-rabbit IgG) との binding activity についても同様に検討する。

2) RDEC の抗血清ならびに FcBP 投与による凝集性の変化を M23, K9 を用いた免疫染色により検討する。

3) ヒツジ赤血球細胞 (SRBC) と anti-SRBC の補体を介した溶血反応の FcBP 存在下での変動を検索する。

C. 研究結果

a) FcBP と各種 HRP-Ig の結合

FcBP と HRP-ウサギ IgG との結合を ELISA で見てみると HRP-ヒト IgG より以上に FcBP に結合することがわかった。さらにこの結合は容量依存的に増加した。これらのことより FcBP はヒトのみならずウサギの IgG とも結合し以下の実験に支障がないことが明らかとなった。

b) 細菌-IgG 結合物と FcBP との結合

ウサギ下痢原性大腸菌 (RDEC-1) は抗 RDEC-1 ウサギ IgG を介して FcBP と粘液と結合することが、FcBP に対する抗体である K9 と粘液に対する抗体である M23 を用いた ELISA にて証明された。

c) 細菌の増殖における FcBP と IgG の効果

ウサギ下痢原性大腸菌 (RDEC-1) と抗 RDEC-1 ウサギ IgG と FcBP を含む 10K 上清を混合培養したものは RDEC-1 のコロニー数は RDEC に非免疫ウサギ IgG と FcBP を含まないバッファーのみを混合培養したものに比べて著明に減少していた。抗 RDEC-1 ウサギ IgG または FcBP のどちらかを含む場合でも中等度にコロニー数は減少していた。ヒト病原性大腸菌 (0111) と抗 0111 ウサギ IgG と FcBP を含む 10K 上清を混合培養

したものでも 0111 のコロニー数は 0111 に非免疫ウサギ IgG とかつ FcBP を含まないバッファのみを混合培養したものに比べて著明に減少していた。抗 0111 ウサギ IgG または FcBP のみのどちらかを含む場合でもコロニー数は減少していた。ネズミチフス菌を用いた実験でもヒト病原性大腸菌の実験結果とほぼ同様の結果が得られた。

d) 補体に対する FcBP の影響

羊赤血球 (SRBC) を抗羊赤血球ウサギ IgG、FcBP およびウサギ補体で反応させた時の補体による溶血は FcBP を抜いたものに比べて著明に抑制された。また FcBP を 5 分間ポイルし失活させたもの、FcBP を先に過剰の非免疫ウサギ IgG でブロックしたものでは溶血は阻止できず、FcBP を抜いたものとはほぼ同程度の溶血を起こした。

D. 考察

腸粘液は腸の杯細胞から分泌され腸粘膜を覆う粘液層を形成することで種々の有害な外来の刺激から腸上皮細胞を保護しているとされ、生体防御機構における最前線のバリアーとして重要な役割を演じているとされているが、この粘液が腸管免疫 (IgG) に関与しているという報告はなく、免疫能の低下しつつある高齢者においてはこのバリアー機能が十分に働いていない可能性が考えられる。我々はヒト腸管の杯細胞粘液中に IgG の Fc 部分に対する Binding Protein (FcBP) が存在することを発見した。この FcBP は杯細胞の粗面小胞体で生産され粘液とともに腸管腔中に放出され腸粘膜の表面を覆うことを明らかにした。これらのことから FcBP は、たとえば急性または慢性の腸炎などにより、腸粘膜から IgG が漏れでる様な状態での腸管免疫に関与している可能性が示唆されるが、いまだ明らかではない。今回、我々が行なった実験は高齢者においてこの FcBP が以下の 2 点につき腸粘膜の防御機構に合目的なものかどうかを証明するものである。

1) FcBP は各種の有害な腸内細菌とそれに対する特異的 IgG との免疫複合体と結合する。

2) FcBP は抗原・抗体複合体に対する補体の影響を阻害する。

即ち、我々の実験では FcBP と粘液はウサギ下痢病原性大腸菌 (RDEC-1) とそれに対する特異的 IgG との免疫複合体と結合することが明らかとなった。さらに驚くべきことにウサギ下痢病原性大腸菌、ヒト病原性大腸菌 (0111)、ネズミチフス菌 (04) のそれぞれに対して特異的 IgG と FcBP を含む 10K 上清とを混合し培養すると細菌のコロニー数が著明に減少した。このことは FcBP と IgG が細菌の増殖を押さえる可能性を持っているか、FcBP を含む粘液中に細菌の増殖を抑制する物質が含まれている可能性を示唆している。またこれらの結果と一見矛盾するようにもみえるがなんと FcBP は IgG と補体による補体結合反応による溶血を阻害した。これらの現象を生体内における生理作用として完全に説明するにはこれらの実験結果だけでは不十分ではあるが仮説として考えてみるならば、生体が IgG を作らなくてはならないようなある有害な抗原が腸管内に入ってきたときに、その抗原の腸粘膜内への侵入を阻止するためにはまず抗原が粘膜内に侵入しにくい状態を作りだすことである。FcBP も粘液も腸管内腔、即ち生体外に存在するもので、これらが特異的 IgG と協力して抗原-IgG-FcBP-ムチンという複合物を作りだし、腸粘膜への侵入を抑制し、かつこれらの複合物が大きな凝集塊を形成すればなお蠕動運動などで運び出されやすくなる。逆にもしこれらの複合物が腸粘膜に付着できた場合そこに補体が結合すれば粘膜障害を助長しかねないわけであるから、FcBP が補体による細胞障害を阻止することは抗原の破壊という面では不利に働くが 2 次的な細胞障害がおこるとするなら腸粘膜にとって有利に働いている可能性はないであろうか、または腸粘膜に対する自己抗体が補体と協力して粘膜障害を

おこすよな病態のときには腸粘膜にとって FcBP は有利になってはいないであろうか。さらに加齢にともなう腸管粘膜からの粘液産生の低下により、FcBP を中心とした消化管粘膜防御機構に障害が来しやすい状態が恒常的に存在することが考えられないだろうか。今後とも高齢者における FcBP の機能解析に全力を注ぎ、今述べてきた仮説を証明するべき努力したいと考えている。

E. 結論

1) FcBP は腸粘液中に存在し、粘液と共に細菌に結合した特異的な IgG と結合する。さらにこの細菌-特異的な IgG- FcBP -粘液からなる結合物は細菌の増殖を阻害する。

2) FcBP は羊赤血球に対しての特異的 IgG と補体による補体依存性細胞障害を特異的に阻害した。

これらのことよりムチン中に含まれる FcBP はヒトの腸管腔内に存在し、IgG を介して有害な抗原や補体による粘膜障害に対する防御機構に極めて重要な役割を果たし、ムチンや FcBP の産生が低下している高齢者においてはそのバリエーション機構が低下した状態にあることが示唆された。

F. 健康危険情報

今回の検討において使用した FcBP は、recombinant 蛋白であり、いずれも in vitro の系において行ったことから、倫理面での問題は特にないと考えられる。

G. 研究発表

a) 論文発表

1. Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T, et al.: Interferon-inducible gene family 1-8U expression in colitis-associated colon cancer and severely inflamed colonic mucosa in ulcerative colitis. *Cancer Research* 59: 5927-5931, 1999.

2. Watanabe M, Ueno Y, Hibi T, et al.: Mucosal IL-7-mediated immune responses in chronic colitis-IL-7 transgenic mouse model-*Immunol. Res.* 20: 251-259, 1999.

3. Takashi H, Ohara S, Hibi T, et al.: Circulating autoantibodies against purified colonic mucin in ulcerative colitis. *J. Gastroenterol* 35: 20-27, 2000.

4. Nakazawa A, Hibi T: Is fish oil(n-3 fatty acids) effective for the maintenance of remission in Crohn's disease. *J. Gastroenterol* 35: 173-175, 2000.

5. Kanai T, Watanabe M, Hibi T, et al.: Regulatory Effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. *Br. J. Cancer* 82: 1717-1723, 2000.

6. Kashiwagi K, Watanabe M, Hibi T, et al.: Microsatellite instability in the mucosa with chronic gastritis is a predictable maker for progression from gastritis to adenoma and well-differentiated adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 82: 1814-1818, 2000.

7. Kanai T, Watanabe M, Hibi T, et al.: IL-18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 119: 1514-1523, 2000.

8. Naganuma M, Iwao Y, and Hibi T, et al.: Analysis of clinical course and long term prognosis of surgical and non-surgical patients with intestinal Behcet's disease. *Am J Gastroenterol* 95(10): 2848-2851, 2000

b) 学会発表

1. Kanauchi O, Andoh A, Hibi T, et al.: The mechanism of germinated barley foodstuff in attenuating intestinal inflammation in colitis 2000.5.21 San Diego DDW 2000

2. Kanai T, Mamoru W, Hibi T, et al.: Macrophage-derived IL18 mediated colitis in the murine model of crohn's disease 2000.5.21 San Diego DDW 2000

3. Nakamaru K, Watanabe M, Hibi T, et al.: IL-7 Regulates the proliferation of mucosal lymphocytes by enhancing the fas-mediated apoptosis 2000.5.21 San Diego DDW 2000

4. Okazawa A, Kanai T, Hibi T, et al.: Synergistic effect of IL12 and IL18 in driving intestinal Th1-mediated

inflammation in crohn's disease 2000.5.21 San Diego DDW 2000

5. Tahara T, Hisamatsu T, Hibi T, et al : Clinical usefulness of I-8u expression and microsatellite instability in the inflamed mucosa for the prediction of colonic neoplasm in ulcerative colitis 2000.5.22 San Diego DDW 2000

6. Nakano M, Hibi T, and Yoshida T : Development of a gene therapy for colorectal cancer using a recombinant adenovirus vector expressing an antisense k-ras RNA 2000.5.23 San Diego DDW 2000

7. Fukui K, Watanabe M, Hibi T, et al : Dysregulation of interleukin-7 mediated immune responses in chronic inflamed mucosa of T cell receptor alpha chain mutant mouse 2000.5.23 San Deigo DDW 2000

8. Sato T, Watanabe M, Hibi T, et al : Up-regulation of

inducible co-stimulator (ICOS) expression and itsregulation of cytokine production in inflammatory bowel disease 2000.5.23 San Deigo DDW 2000

9. Naganuma M, Iwao Y, Hibi T, et al : Measurement of tissue 5-ASA concentration in the colonic muclsa is useful for predicting its effectiveness in the treatment of distal ulcerative colitis 2000.5.24 San Deigo DDW 2000

10. Iwao Y, Watanabe M, Hibi T, et al : Clinical usefulness of magnifying endoscopic findings and IL-7 mRNA expression in remission mucosa for the prediction of recurrence of ulcerative colitis 2000.5.24 San Deigo DDW 2000

高齢者の鉄・電解質の吸収能の検討

高後 裕 (旭川医科大学医学部内科学第三講座 教授)

高齢者においては、慢性疾患、慢性炎症の合併を背景とした鉄代謝異常に起因する貧血を発症する。この貧血発症機序を解析するため、消化管上皮での鉄吸収に関与する遺伝子として同定された Nramp2 の役割を、消化管上皮細胞株である Caco2 と、Nramp2 遺伝子導入肝癌細胞株を用いて検討した。

A. 研究目的

高齢者には、鉄欠乏性貧血と類似した貧血を高頻度に認め、鉄の消化管からの吸収障害、肝臓・脾臓への鉄の蓄積、骨髄での赤血球産生障害などが原因と考えられているが、その機序は不明である。近年、十二指腸粘膜での鉄吸収に関与する Nramp2 (DMT-1) 遺伝子や遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子である HFE 遺伝子が見いだされ、これら遺伝子の、鉄代謝全体における役割が注目されている。今回の研究では、高齢者が種々の慢性疾患、慢性炎症の合併を背景として、体内鉄が、骨髄での赤血球造血へ向かわず、肝臓・脾臓へ貯蔵鉄として蓄えられることによる鉄利用障害を呈していることに注目し、慢性炎症時における Nramp2 発現増強を想定して、肝細胞への鉄貯留におよぼす Nramp2 の役割を検討した。

B. 研究方法

1. Nramp2 に対するポリクローナル抗体を作成し、消化管上皮、肝組織における Nramp2 蛋白の発現を免疫組織学的に解析した。

2. Nramp2 遺伝子を肝癌細胞株 HLF に導入し、

消化管上皮細胞株である Caco2 における Nramp2 の発現とその発現様式を検討した。また、それらの細胞株におけるトランスフェリン鉄および自由鉄の取り込みを ^{59}Fe を用いて検討した。

C. 研究成果

Nramp2 の発現をポリクローナル抗体を用いて免疫組織学的に検討したところ、十二指腸上皮では絨毛上皮内腔側細胞表面に強く発現を認めた。それに対し肝組織では肝細胞細胞質に点状に発現が見られたが細胞表面への Nramp2 の発現はほとんど見られなかった。この発現様式の違いが単純に発現量の違いに起因しているためかどうか明らかにするために、肝癌細胞株 HLF に Nramp2 遺伝子を導入し、Nramp2 蛋白の発現を検討したところ、導入細胞株では肝組織で見られたものと同様に、細胞質に強く発現したが細胞膜での発現はほとんど認められなかった。それに対して Caco2 細胞では細胞質に加えて細胞表面に発現が認められ、Nramp2 の発現には組織特異性があるものと考えられた。

この発現の違いが、鉄の吸収にどのように影響するか検討した。始めに、最も代表的な細胞内への鉄取り込み機構である、トランスフェリン受容体を介するトランスフェリン鉄の取り込みを調べたところ、Nramp2 遺伝子導入 HLF 細胞におけるトランスフェリン鉄取り込みには影響がなく、Nramp2 は、トランスフェリン受容体を介した鉄の取り込みには影響しない事が示された。現在、2 価のイオンで存在する自由鉄の取り込みにおける影響を Caco2 細胞と比較して検討中である。

D. 考察

Nramp2 mRNA は、IRE (iron responsive element) を有しており、細胞内鉄濃度の低下や低酸素、酸化ストレスなどで誘導される IRP (iron regulatory protein) によって発現が増強されると考えられる。事実、消化管上皮では、鉄欠乏時には、Nramp2 発現が増強し、腸管での鉄吸収が増加する。しかしながら、高齢者においては、単純な細胞内鉄濃度による発現調節だけでなく、慢性炎症などの種々の基礎疾患の合併による全身的な影響が考えられる。今回の検討では、Nramp2 は、消化管上皮と肝組織で発現に差があることは示せたが、その機能的な差を示せていない。高齢者における貧血発症機序を明らかにするうえで、Nramp2 が鉄の吸収 (消化管)・利用 (骨髄)・貯蔵 (肝) それぞれの場で、鉄代謝にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることは重要で今後明らかにしたい。

E. 結論

Nramp2 遺伝子導入肝癌細胞株を作成し Nramp2 の発現が、消化管上皮細胞と肝組織で異なる事を見いだした。過剰発現した Nramp2 は、

トランスフェリン受容体を介する鉄の取り込みには影響を及ぼさなかった。現在自由鉄の取り込みについて検討中である。

F. 研究発表

1 論文発表

- ① Ikuta K, Fujimoto Y, Suzuki Y, Tanaka K, Saito H, Ohhira M, Sasaki K, Kohgo Y, Overexpression of hemochromatosis protein, HFE, alters transferrin recycling process in human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1496 (2-3): 221-231, 2000
- ② 斉藤浩之、長谷部千登美、高後 裕、瀉血療法が奏効した C 型慢性肝炎の症例、治療学、33: 344-347, 1999
- ③ 鳥本悦宏、高後 裕、トランスフェリン受容体と赤血球造血、臨床血液 41: 554-558, 2000
- ④ 高後 裕、鳥本悦宏、トランスフェリン受容体の分子生物学、血液フロンティア、10: 1269-1277, 2000
- ⑤ 鳥本悦宏、高後 裕、造血要素の欠乏による貧血 鉄欠乏性貧血 (鉄過剰症を含む)、Current Therapy, 18: 115-119, 2000
- ⑥ 斉藤浩之、鈴木康秋、鈴木晶子、藤本佳範、大平基之、高後 裕、肝癌細胞株 HepG2 へのエタノール負荷における鉄代謝関連分子の発現についての検討、アルコールと医学生物学、20: 135-139, 2000
- ⑦ 高後 裕、鳥本悦宏、藤本佳範、鉄代謝とその異常の分子機構、Annal Review 血液 2001 (高久文麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉謙、編)、中外医学社、63-71, 2001
- ⑧ 高後 裕、斉藤浩之：赤血球造血に関わる鉄代謝の腸管-肝臓-骨髄 axis 調節の分子機構。臨床血液 (印刷中)

2 学会発表

- ① Shindo M, Torimoto Y, Kohgo Y, et al. Two soluble transferrin receptors and one transferrin make a complex as a native form in serum. World Congress on Iron Metabolism Bioiron '99. Sorrento, Naples, Italy, 1999 May 23-28
- ② Ikuta K, Fujimoto Y, Kohgo Y, et al. HFE gene transduction to human hepatoma cells alters transferrin recycling process in addition to the decrease of receptor affinity. World Congress on Iron Metabolism Bioiron '99. Sorrento, Naples, Italy, 1999 May 23-28
- ③ Torimoto Y, Hamano A, Kohgo Y, et al. Structure of serum soluble transferrin receptor-transferrin complex in healthy volunteers and antigenic differences of the complex between hematologic disorders and liver diseases. *Blood* 94; 7b, 1999
- ④ Kohgo Y, Torimoto Y, Fujimoto Y et al. Alteration of transferrin recycling process by overexpression of hemochromatosis protein, HFE, in human hepatoma cells. *Blood* 94; 406a, 1999
- ⑤ Kohgo Y, Ikuta K, Fujimoto Y et al. Hemochromatosis gene protein HFE inhibits iron uptake through the retardation of transferrin recycling from endosome to surface in HFE gene-transfected hepatoma cell. DDW 2000 (AASLD), 2000 May 21
- ⑥ Saito H, Suzuki Y, Kohgo Y, et al. Upregulation of hereditary hemochromatosis gene, HFE by ethanol exposure in hepatoma cell line, HepG2. ISBRA 2000, 2000 February 7
- ⑦ 鳥本悦宏, 高後 裕: シンポジウム: 赤血球造血の基礎と臨床, トランスフェリン受容体と赤血球造血, 第 41 回日本臨床血液学会総会, 秋田, 1999 年 10 月 13-15 日
- ⑧ 高後 裕, 齊藤浩之: シンポジウム: 赤血球造血と鉄代謝研究の分子生物学的展開, 赤血球造血に関わる鉄代謝の腸管-肝臓-骨髄 axis 調節の分子機構, 第 42 回日本臨床血液学会総会, 倉敷, 2000 年 11 月 8-10 日

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

高後 裕、鳥本悦宏、藤本佳範：鉄代謝とその異常の分子機構、(高久文麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉譲、編)、Annal Review 血液 2001、中外医学社、東京、2001、63-71

雑誌

- ① Ikuta K, Fujimoto Y, Suzuki Y, Tanaka K, Saito H, Ohhira M, Sasaki K, Kohgo Y :
Overexpression of hemochromatosis protein, HFE, alters transferrin recycling process
in human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 1496 (2-3): 221-231, 2000
- ② 斉藤浩之、長谷部千登美、高後 裕：瀉血療法が奏効した C 型慢性肝炎の症
例、治療学、33: 344-347, 1999
- ③ 鳥本悦宏、高後 裕：トランスフェリン受容体と赤血球造血、臨床血液 41:
554-558, 2000
- ④ 高後 裕、鳥本悦宏：トランスフェリン受容体の分子生物学、血液フロンテ
ィア 10: 1269-1277, 2000
- ⑤ 鳥本悦宏、高後 裕：造血要素の欠乏による貧血 鉄欠乏性貧血 (鉄過剰
症を含む)、Current Therapy, 18: 115-119, 2000
- ⑥ 斉藤浩之、鈴木康秋、鈴木晶子、藤本佳範、大平基之、高後 裕：肝癌細胞
株 HepG2 へのエタノール負荷における鉄代謝関連分子の発現についての検討、
アルコールと医学生物学、20: 135-139, 2000
- ⑦ 高後 裕、斉藤浩之：赤血球造血に関わる鉄代謝の腸管-肝臓-骨髄 axis 調節
の分子機構。臨床血液 (印刷中)

高齢者胆管癌の新しい内視鏡治療法の開発

菅野健太郎（自治医科大学消化器内科 教授）

高齢者胆管癌のより安全で確実な内視鏡治療を行う事を目的に胆管内超音波検査（Intraductal ultrasonography: IDUS）を用いた胆道鏡下マイクロ波腫瘍焼却療法を動物実験で行い、安全性及び有用性を確認した上で臨床応用を行った。

分担研究者 玉田喜一（自治医科大学消化器内科 講師）

A. 研究目的

高齢者の胆管癌の安全で効果的な内視鏡治療を行うこと。

B. 研究方法

1. 基礎的検討。

はじめは人間の胆管モデルとして犬の胆管の使用を考慮した。しかし、予備的検討により、経皮経肝的胆道ドレナージを施行した後の人間の胆管壁は1-2mm幅の繊維層を脂肪層が囲んだ状態であり、内腔は経10mm程度である。従って犬、豚等の胆管は人間の治療モデルとしては不相当であり、犬の小腸が内腔の経及び壁の厚さ共にモデルとして適当であると判断した。雑種犬をペントバルビタールにて全身麻酔し開腹。小腸に小切開を置き内視鏡を挿入し、マイクロ波用プローブを内視鏡鉗子孔から挿入し、小腸壁の焼却を行った。条件は1ショットあたり

15watt, 30watt, 45watt, 60watt で各々15秒と30秒で行った。焼却後、内視鏡鉗子孔から経2mm, 周波数20

MHzの細経超音波プローブを挿入し、小腸壁の超音波像の変化を観察した。検査終了後に薬物にて安楽死させた後に小腸を取り出しホルマリン固定し、HE染色後、顕微鏡にて腸管壁の変化を病理学的に検討した。

2. 臨床的検討

胆管癌は閉塞性黄疸の状態で診断されるため、経皮経肝的胆道ドレナージ（percutaneous transhepatic biliary drainage: PTBD）が入院時に挿入されている。高齢者でも、全身麻酔に対するリスクがなく、癌の進展度から手術が適切と考えられた症例は手術を選択した。合併症による高リスク群及び手術拒否例は放射線療法と胆管ステントとの併用が一般的治療であるが、これらの症例に十分な文書によるインフォームドコンセントを得た後に、胆道鏡下のマイクロ波腫瘍焼却術を行った。焼却前に胆道鏡鉗子孔から経2mm, 周波数20MHzの細経超音波プローブを挿入（intraductal ultrasono-

graphy: IDUS)し、周囲の門脈及び肝動脈の位置関係を検討し、これらの血管の焼却を防止した。焼却後にも胆道鏡鉗子孔から細経超音波プローブを挿入し、胆管壁の超音波像の変化を観察した。治療は IDUS 所見で腫瘍全体に焼却変化が見られるまで施行した。

C. 研究結果

1. 基礎的検討

1 ショットあたり 45watt で 15-30 秒が安全かつ有用な出力であった。IDUS 所見で腸管壁が高エコー化した部位は、病理学的に壁細胞の十分な変性が認められた。

2. 臨床的検討

IDUS 所見にて、マイクロ波焼却後に動物実験同様に腫瘍内部の高エコー化が認められた。IDUS によるモニタリングにより、出血、穿孔等の合併症は認めなかった。一度の胆道鏡で約 30 ショットの治療を行い全例で胆管内腔の十分な改善が得られ、ステントを使用する事なく退院可能であった。診断時既に肝動脈と門脈双方に浸潤を認めた症例の生存は 2 年以内であったが、診断時血管浸潤を認めなかった症例は、多病死例を除き生存が得られている(最高 2 年)。

D. 考察

切除不能または合併症の為に手術が施行できない胆管癌に対しては放射線療法と胆管ステントの併用療法が選択されている。しかし従来使用されていたプラスチックステントは胆

泥による閉塞が大きな問題であった。一方、近年開発されたメタリックステントは大口径が得られるが腫瘍がステントメッシュ間に増殖するイングロウスが問題点であった。我々の方法はステントを必要としないのでこれらの問題が解決されクオリティのよい外来での生活が可能となった。まだ最長の観察期間が 2 年であるため、長期予後の検討がこれからの課題である。

これまで門脈及び肝動脈との距離が近い肝門部においてはマイクロ波治療は危険とされていたが、我々は IDUS を併用する事でマイクロ波療法安全性を高める事ができた。

E. 結論

胆道鏡下のマイクロ波腫瘍焼却術は、合併症のため手術不能または手術拒否の高齢者の胆管癌の治療に有用である。IDUS によるモニタリングは手技の安全性確保と治療効果の判定に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamada K, Wada S, Ohashi A, Tomiyama T, Satoh Y, Miyata T, Nakazawa M, Ido K, Sugano K. Intraductal US in assessing the effects of radiation therapy and prediction of patency of metallic stents in extrahepatic bile duct carcinoma. *Gastrointest Endosc* 51: 405-11, 2000.
- 2) Tamada K, Sugano K. Diagnosis and non-surgical treatment of bile duct carcinoma: developments in the past decade. *J*

- Gastroenterol 35:319-25, 2000.
- 3) Wada S, Tamada K, Tomiyama T, Ohashi A, Utsunomiya K, Higashizawa T, Satoh Y, Isoda N, Sugano K. Intraductal ultrasonographic assessment of coagulation depth during endoscopic microwave coagulation therapy in a canine model. J Gastroenterol 35:284-9, 2000.
- 4) Wada S, Tamada K, Tomiyama T, Ohashi A, Utsunomiya K, Higashizawa T, Satoh Y, Isoda N, Sugano K. Endoscopic microwave coagulation therapy for bile duct cancer with intraductal ultrasonographic monitoring: brief case report. Am J Gastroenterol 95:1104-5, 2000.
- 5) Tamada K, Miyata T, Tomiyama T, Wada S, Ohashi A, Satoh Y, Ido K, Sugano K. Placement of endoscopic naso-biliary drainage does not preclude subsequent percutaneous transhepatic biliary drainage. J Gastroenterol 35: 445-9, 2000.
- 6) Tamada K, Ohashi A, Tomiyama T, Miyata T, Wada S, Satoh Y, Ido K, Sugano K. Double-catheter method to prevent dislodgement during percutaneous transhepatic cholangioscopy. Gastrointest Endosc 52:246-50, 2000.
- 7) Tamada K, Wada S, Tomiyama T, Ohashi A, Satoh Y, Miyata T, Higashizawa T, Gotoh Y, Ido K, Sugano K. Percutaneous recanalization of the bile duct along an endoscopic naso-biliary catheter. J Gastroenterol 35:622-6, 2000.
- 8) Tamada K, Tomiyama T, Wada S, Ohashi A, Satoh Y, Higashizawa T, Miyata T, Ido K, Sugano K. Catheter dislodgement of percutaneous transhepatic biliary drainage: identification of role of puncture sites and catheter sheath. Abdom Imaging 25:587-591, 2000.
- 9) Tamada K, Tomiyama T, Ohashi A, Wada S, Miyata T, Satoh Y, Higashizawa T, Gotoh Y, Ido K, Sugano K. Access for percutaneous transhepatic cholangiography in patients with nondilated bile ducts using nasobiliary catheter cholangiography and oblique fluoroscopy. Gastrointest Endosc 52:765-9, 2000.
- 10) Tamada K, Yasuda Y, Nagai H, Tomiyama T, Wada S, Ohashi A, Satoh Y, Ido L, Sugano K. Limitation of three-dimensional intraductal ultrasonography in the assessment of longitudinal spread of extrahepatic bile duct carcinoma. J Gastroenterol 35:919-23, 2000.
- 11) Tamada K, Tomiyama T, Wada S, Ohashi A, Satoh Y, Higashizawa T, Gotoh Y, Ido K, Sugano K. Hyperechoic lines as a sonographic confirmatory sign during percutaneous transhepatic biliary drainage. Abdom Imaging 26:39-42, 2001.
- 12) Tamada K, Higashizawa T, Tomiyama T, Wada S, Ohashi A, Satoh Y, Ido K, Sugano K. et al. New ropeway-type bile duct biopsy forceps with a side-slit for a guidewire. Gastrointest Endosc 53: 89-93, 2001.
- 13) Tamada K, Tomiyama T, Ohashi A, Wada S, Satoh Y, Higashizawa T, Gotoh Y, Ido K, Sugano K. Intraductal ultrasonography for evaluating the patency of biliary metallic

- stents: correlation with cholangioscopic findings. *Abdom Imaging* 26; 210-4, 2001
- 14) Tamada K, Ohashi A, Tomiyama T, Wada S, Satoh Y, Higashizawa T, Ido K, Sugano K. Comparison of intraductal ultrasonography with percutaneous transhepatic cholangioscopy for the identification of residual bile duct stones during lithotripsy. *J Gastroenterol Hepatol* 16:100-3, 2001
- 15) Tamada K, Nagai H, Yasuda Y, Tomiyama T, Ohashi A, Wada S, Kanai N, Satoh Y, Ido K, Sugano K. Transpapillary intraductal US prior to biliary drainage in the assessment of longitudinal spread of extrahepatic bile duct carcinoma. *Gastrointest Endosc* 53:300-7, 2001
- 16) Tamada K, Satoh Y, Tomiyama T, Ohashi A, Wada S, Ido K, Sugano K. Multiple biliary ductal biopsies using a sheath with a side port: usefulness of intraductal sonography. *AJR* 176:797-802, 2001
- 17) Tamada K, Kanai N, Wada S, Tomiyama T, Ohashi A, Ido K, Sugano K. Utility and limitation of intraductal ultrasonography in distinguishing between longitudinal cancer extension along the bile duct and inflammatory wall thickening. *Abdom Imaging* 26: (in press) 2001
- 18) Tamada K, Tomiyama T, Wada S, Ohashi A, Ido K, Sugano K. Intraductal ultrasonography for hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the bile duct: comparison with polypoid cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 16: (in press) 2001.
- 19) Gotoh Y, Tamada K, Tomiyama T, Wada S, Ohashi A, Satoh Y, Ido K, Sugano K. A new method for deep cannulation of the bile duct by straightening the pancreatic duct. *Gastrointest Endosc* 53: (in press) 2001
- 20) Ohashi A, Tamada K, Tomiyama T, Wada S, Higashizawa T, Gotoh Y, Satoh Y, Ido K, Sugano K. Epinephrine irrigation for the prevention of pancreatic damage after endoscopic balloon sphincteroplasty. *J Gastroenterol Hepatol* 16: (in press) 2001
- 21) Eda A, Tamada K, Tomiyama T, Wada S, Ohashi A, Ido K, Sugano K. Sulindac-associated choledocholithiasis. *Am J Gastroenterol* (in press) 2001

グレリンの摂食調節機序ならびに高齢者における臨床的意義に関する研究

分担研究者 中里雅光 宮崎医科大学医学部第三内科

研究要旨 グレリンは、上部消化管で産生され、下垂体からの成長ホルモン分泌を促進するペプチドである。グレリンの摂食とエネルギー代謝調節作用を解析し、グレリンが強力な摂食亢進ペプチドであることを示した。さらに高齢者や老齢実験動物では、グレリンによる成長ホルモン分泌や摂食亢進作用が減弱していることを明らかにした。

A. 研究目的

グレリン(ghrelin)は、成長ホルモン分泌促進物質受容体(GHS-R)に対する内因性リガンドとして、1999年にヒトとラットの胃から発見されたペプチドである。グレリンは28アミノ酸からなるペプチドで、脂肪酸のオクタン酸によって修飾されており、しかもこの修飾が活性発現に必要であるというユニークな構造をしている。グレリン受容体は消化管を初め、全身臓器で発現している。グレリンはまた、視床下部でも産生され、全身のエネルギー代謝調節や摂食にも機能している。新規消化管ペプチドであるグレリンの作用を解析し、消化管疾患との関連を明らかにすることは意義深いと考えられる。

B. 研究方法

合成ラットグレリンを若齢と高齢 Wistar 系雄(各グループ n = 10-20)ラットの側脳室内へ、単回投与(5 pmol - 2 nmol/10 μ l 生食)と浸透圧ミニポンプを用いた慢性投与(12日間、250 pmol/日)を行った。その後、行動量、摂

食量、体重、摂水量、概日リズムを解析した。グレリン受容体のアンタゴニストならびにグレリンに対する特異的中和抗体より精製した IgG(0.05 - 5 μ g/10 μ l 生食)を脳室内投与し、グレリン作用の特異性を検討した。さらに、グレリンの摂食亢進作用とレプチンの摂食抑制作用との関連を、暗期と明期の摂食実験により解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、日本生理学会ならびに宮崎医科大学動物実験施設の定める動物実験に関するガイドラインに基づいて行い、倫理的問題はない。

C. 研究結果

in situ hybridization と免疫電顕により、胃のグレリンは特殊な内分泌細胞で産生されることが示された。グレリン産生細胞は、分泌顆粒を多く含み、膵臓の内分泌細胞の一種でグルカゴンを産生する A 細胞に類似していることから A-like 細胞(または X 細胞)と呼ばれていた細胞そのものであることが判明した。

この細胞は1960年代から存在が知られていたが、顆粒の内容物は不明であった。グレリンは胃や腸から血中に分泌される。グレリンはヒトとラットへの静脈内投与により、強力な成長ホルモン放出活性を示した。高齢者ではグレリンによる成長ホルモン分泌作用は、若年者より低下していた。

グレリンはラット脳室内投与により、10 pmol から強力な摂食亢進作用を示した。明期、暗期、絶食後のいずれでも摂食効果を認めた。高齢ラットではグレリンによる摂食亢進作用は若齢ラットよりも有意に低下していた。抗グレリン IgG の脳室内投与により、内因性グレリン作用を阻止すると暗期および絶食後の摂食量は減少したことから、グレリンは内因性の摂食亢進物質として機能していることを証明した。グレリンの摂食亢進作用は、成長ホルモン欠損の dwarf ラットでも見られることから、成長ホルモンを介した作用でない。浸透下ポンプを用いてグレリンを 250 pmol/日、12 日間投与すると摂食量と著明な体重増加を認めた。この時血清中の血糖、インスリン、中性脂肪、コレステロール値に変動はなかった。グレリンの連続皮下投与でも体重は著増した。グレリンを投与するとレプチンの摂食抑制効果は減衰した。さらにグレリンは摂食を亢進させるペプチドであり、レプチンに拮抗するホルモンであることも明らかにした。

空腹時のヒト血漿グレリン濃度は、C 端抗体を用いたラジオイムノアッセイ (RIA) では、 148 ± 28 fmol/ml で、脂肪酸化された生物活性のあるグレリン分子だけを測定できる N 端抗体を用いた RIA では 5.4 ± 1.4 fmol/ml であった。血漿グレリン濃度は、肥満者で低く、神経性食思不振症のようなやせでは高く、

body mass index (体格指数) と逆相関を示した。一方、胃癌でカヘキシアの強い症例では血漿グレリン濃度が低下しており、食思低下の原因の一つと考えられている。

D. 考察

これまで肥満はセルフ・コントロールの欠如が原因と考えられてきたが、近年の摂食調節ホルモンの研究、その中でも特にレプチンの発見により、肥満は生化学的因子による食欲ならびにエネルギー代謝調節機構が、複雑に絡み合った疾患であると認識されるようになった。グレリンはその構造と発見された組織が、極めてユニークである。グレリンの発見により、胃が成長ホルモンの分泌調節に重要な働きをしていることが示された。また老化における成長ホルモンの機能低下にグレリンの作用不足が関与していることが推察される。

E. 結論

グレリンは成長ホルモンの分泌促進と摂食亢進作用に機能している。グレリンと肥満や老化との関連解析および高齢者において成長ホルモン分泌刺激による同化作用を期待した臨床研究も進捗している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Date Y, Matsukura S, Nakazato M, et al, Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the

gastrointestinal tracts of rats and humans, *Endocrinology*, 141: 4255-4261, 2000.

② Date Y, Matsukura S, Nakazato M, et al, Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats, *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 477-480, 2000.

③ Nakazato M, Date Y, Matsukura S, et al, A role for ghrelin in the central regulation of feeding, *Nature*, 409: 194-198, 2001.

④ Date Y, Nakazato M, Matsukura S, et al, Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion, *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 904-907, 2001

⑤ Toshinai K, Nakazato M, Matsukura S, et al, Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration, *Biochem Biophys Res Commun*, 281: 1220-1225, 2001

⑥ 中里雅光：新規摂食調節ペプチドの同定と作用機構の解析 肥満研究 印刷中

2. 学会発表

① 中里雅光、松倉 茂：新たな消化管ペプチド グレリンの細胞局在と作用機構の検討第43回日本糖尿病学会総会 (2000)

② 伊達 紫、中里雅光、児島将康、細田洋司、寒川賢治、松倉 茂：新たな成長ホルモン分泌促進ペプチド グレリンの消化管における細胞局在と作用機構の検討 第73回日本内分泌学会学術総会 (2000)

③ 前田修司、中里雅光、伊達 紫、児島将康、寒川賢治 松倉茂：新たな成長ホルモン分泌

促進ペプチド グレリンの摂食と胃酸分泌状況の差異による変動 第73回日本内分泌学会学術総会 (2000)

④ 中里雅光、伊達 紫、松倉 茂、児島将康、細田洋司、寒川賢治：新規成長ホルモン分泌刺激ペプチド グレリンの脳内分布と中枢作用機構の検討 第73回日本内分泌学会学術総会 (2000)

⑤ 宮里幹也、中里雅光、伊達 紫、松倉 茂、児島将康、寒川賢治：新規視床下部ペプチドグレリンによる新たなGH分泌調節機構 第73回日本内分泌学会学術総会 (2000)

⑥ 中里雅光：Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing acylated peptide, synthesized in a distinct endocrine cell type in rats and humans. 82nd Annual Meeting, Endocrine Society (2000)

⑦ 中里雅光、松倉 茂：胃内分泌細胞から発見された新たな成長ホルモン分泌促進ペプチドグレリンの細胞生理と分子生物学的研究 消化管分子機構研究会 (2000)

⑧ 中里雅光、伊達紫、児島将康、寒川賢治、松倉 茂：新規成長ホルモン分泌刺激ペプチド グレリンの脳内分布と中枢作用機構の検討 Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing acylated peptide, synthesized in a distinct endocrine cell type in rats and humans. 第23回日本神経科学学会 (2000)

⑨ 中里雅光、伊達 紫、松倉 茂、児島将康、寒川賢治：新規成長ホルモン分泌刺激ペプチド グレリンの脳内分布と中枢作用機構の検討 第27回日本神経内分泌学会総会(2000)

⑩ 中里雅光、松倉 茂、児島将康、寒川賢治：摂食調節ペプチドに機能する新規ペプチドの同定 第21回日本肥満学会 (2000)

⑪ 中里雅光：Novel neuropeptides

implicated in the control of food intake

第 43 回日本神経化学会大会 (2000)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添6 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高後 裕、鳥元悦宏、藤本佳範	鉄代謝とその以上の分子機構	高久文麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉 譲	Annual Review血液	中外医学社	東京	2001	63-71

雑誌

発表氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Oshima C, Okazaki K, Matsushima Y, Sawada M, Chiba T, Takahashi K, Hiai H, Katakai T, Kasakura S, Masuda T	Induction of follicular gastritis following post-thymectomy autoimmune gastritis in Helicobacter pylori-infected BALB/c mice.	Infect Immun	68	100-106	2000
Takaishi S, Sawada M, Morita Y, Seno H, Fukuzawa H, Chiba T	Identification of a novel alternative splicing of human FGF receptor 4: Soluble form splice variant expressed in human gastrointestinal epithelial cells.	Biochem Biophys Res Commun	267	658-662	2000
Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Matsushima Y, Kawanami C, Oshima C, Ikada Y, Chiba T	Development of an oral drug delivery system targeting immuno-regulating cells in experimental inflammatory bowel disease: A new therapeutic strategy.	J Pharmacol Exp Therapeutics	229	15-21	2000
Okazaki K, Uchida K, Ohana M, Nakase H, Uose S, Inai M, Matsushima Y, Katamura K, Ohmori K, Chiba T	Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response.	Gastroenterology	118	573-581	2000
Ishihara S, Kaji T, Kawamura A, Rumi MAK, Sato H, Okuyama T, Adachei K, Fukuda R, Watanabe M, Hashimoto T, Hirakawa K, Matsushima Y, Chiba T, Kinoshita Y	Diagnostic accuracy of a new non-invasive enzyme immunoassay for detecting Helicobacter pylori in stools after eradication therapy.	Aliment Pharmacol Ther	14	611-614	2000

Okazaki K, Onodera H, Watanabe N, Nakase H, Uose S, Matsushita M, Kawanami C, Imamura M, <u>Chiba T</u>	A patient with improvement of ulcerative colitis after appendectomy.	Gastroenterology	119	502-506	2000
Watanabe T, Matsushima Y, Nakase H, Iwano M, Hosotani R, Imamura M, Kinoshita Y, <u>Chiba T</u>	Effects of Helicobacter pylori infection on Zollinger-Ellison syndrome.	J Gastroenterol	35	735-741	2000
<u>Chiba T</u>	The end of the era of maintenance therapy for peptic ulcer disease?	J Gastroenterol	35	873	2000
Watanabe N, Ikuta K, Fagarasan S, Yazumi S, <u>Chiba T</u> , Honjo T.	Migration and differentiation of autoreactive B-1 cells induced by activated $\gamma\delta$ T cells in antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice.	J Exp Med	192	1577-1586	2000
Uchida K, Okazaki K, Konishi Y, Ohana M, Takakuwa H, Hajiro K, <u>Chiba T</u>	Clinical analysis of autoimmune-related pancreatitis.	Am J Gastroenterol	95	2788-2794	2000
Seno H, Takaishi S, Sawada M, <u>Chiba T</u> .	Enhanced expression of transforming growth factor TGF- α precursor and TGF- β 1 during Paneth cell regeneration.	Dig Dis Sci		(in press)	2000

Chiba T, Watanabe T, Ito T	Helicobacter pylori infection and acid secretion in patients with duodenal ulcer in Japan.	Gut		(in press)	2000
Kanai M, Konda Y, Izumi Y, Nakajima T, K, Takeuchi T, Chiba T	TGF- α blocking apoptotics of gastric pit cells via NF- κ B.	Gastroenterology		(in press)	2001
Honda K, Chiba T, et al.	Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis.	J Exp Med	193	621-630	2001
Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Nishi T, Debreceni A, Itoh T, Iwano M, Kawanami C, Ikada Y, Chiba T	An oral drug delivery system targeting immuneregulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzen sulfonic acid-induced colitis with strong inhibition of activated nuclear factor-kappa B in the inflammed colon	J Pharmacol Exp Therapeutics		(in press)	2001
Uchida K, Okazaki K, Uose S, Nakase H, Ohana M, Oshima C, Matsushima Y, Kawanami C, Hiai H, Masuda T, Chiba T.	Analysis of cytokines in the early development of gastric secondary lymphoid follicles in Helicobacter pylori-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy.	Infect Immun		(in press)	2001
Ohana M, Okazaki K, Oshima C, Debreceni A, Nishi T, Uchida K, Uose S, Nakase H, Matsushima Y, Chiba T	Blocking of IL-7R signaling prevents the development of Helicobacter felis induced gastritis in mice.	Gastroenterology		(in press)	2001
千葉 勉	病因論による酸関連疾患へのアプローチ] 過酸	消化器の臨床	3	134-136	2000
仲瀬裕志、河南智晴、岡崎和一、千葉 勉	Microsphereを用いた新しい経口治療法	消化器科	30	426-430	2000
千葉 勉	高齢者の消化器疾患	日本老年医学会雑誌	37	353-359	2000