

#### g. 臨床症状と身体所見

肺血流シンチグラムは 2 名の放射線専門医がブラインドで読影し、異常所見の有無を判定する。

- 3) 症例登録直後に、低容量の腸溶性アスピリン（バイアスピリン 100mg/日）投与群と非投与群にコンピューター乱数表により無作為割付する。投与は手術前日から開始し、35 日間またはイベント発症時まで続ける。
- 4) エンドポイントは肺血栓塞栓症（無症候性および顕性）および下肢静脈血栓症の発症とする。

#### （倫理面への配慮）

本研究は、岩手医科大学医学部倫理委員会で承認され、患者へ十分な説明を行い文書で同意を得ている。また、下肢静脈造影と肺血流シンチグラムに異常所見を認めた症例はアメリカ心臓協会 (AHA) のガイドラインに沿った治療を行い、患者の不利益にならないように配慮した。症例の登録およびデータの収集はセキュリティーの高いインターネット上で行い、限定された ID とパスワードを有する者のみがアクセス可能である。

#### C. 研究結果

症例の登録を開始した。インターネット上での症例登録方法に問題はなかった。87 例が登録されアスピリン投与群 43 例と非投与群 44 例に無作為に割り付けられた。対照（アスピリン非投与）群で下肢深部静脈血栓症が 10 例 (22. 8%) に、無症候性肺塞栓症が 3 例 (6. 8%) に認められた。アスピリン投与群では、下肢深部静脈血栓症が 2 例、肺血栓塞栓症が

1 例に認められ、発症率が低い傾向を認めたが有意差はなかった。65 歳以上の患者 66 名中、アスピリン群の 1 例と対照群の 9 例、計 10 例に下肢深部静脈血栓症が認められた。65 歳未満の患者 21 例中、アスピリン群 1 例と対照群 1 例、計 2 例に下肢深部静脈血栓症が発症した。男性では 38 例中 5 例、女性では 49 例中 7 例に発症し、女性に多い傾向であった。肺血栓塞栓症は、65 歳以上のアスピリン群 1 例と対象群 2 例に、65 歳未満の対照群 1 例に認められた。男性 (38 例) 1 例、女性 3 例であった。下肢深部静脈血栓症と肺塞栓症を発症した患者の臨床背景では、肥満度、糖尿病合併の有無、術前の胸部レントゲン写真および血液一般検査には、非発症者と比較して有意差を認めなかった。発症者の一部で術前に血液凝固能の亢進傾向が認められたが、非発症者と比較して有意差はなかった。アスピリン投与によると思われる有害事象は 1 件も見られなかった。

#### D. 考察

セキュリティーの高いインターネットを用いた臨床介入試験は簡便、迅速かつ低コストであると考えられた。欧米人に比較して日本人は、下肢深部静脈血栓症や肺血栓塞栓症の発症は低率と考えられていたが、症状がないために今まで診断されていなかった可能性がある。藤田らは静脈造影法を用いて、股関節または膝関節置換術患者を検討し、深部静脈血栓症の発生率は、膝関節置換術後 43. 5%と高率であったと報告しているが、肺塞栓の発症率は不明であった。本研究では、より診断精度の高い CT 静脈造影法により深部静脈血栓症を診断した。その結果、下肢深

部静脈血栓症の発症頻度は 22.8%で、従来の静脈造影では疑陽性率が高かったことが推測された。本研究では、無症候性肺血栓塞栓症の発症頻度は 6.8%と高率で、手術前後に肺血流シンチグラムを行うことにより、診断精度が向上したと考えられた。年齢的には、65 歳以上の高齢者に下肢深部静脈血栓症の発症が多く、日本人でも、高齢者の整形外科手術後に、無症候性の下肢深部静脈血栓症とそれに関連した肺血栓塞栓症が発症していることが明らかとなった。肺血栓塞栓症は症状が出現すると、致命的になることが多く、無症候の肺血栓塞栓症を早期に診断し、顕性の肺血栓塞栓症を予防することが重要である。今回の検討で、整形外科手術患者では、手術前から低容量の腸溶性アスピリンを投与することにより、下肢深部静脈血栓症および肺血栓塞栓症を予防できる可能性が示唆された。アスピリン投与による副作用は全く発現せず、また、低容量腸溶性アスピリンは安価（1錠 6.4 円）であり、その投与は簡便で安全かつ安価な予防法と考えられた。今後、症例数を増やし、さらに検討する必要がある。

#### E. 結論

高齢日本人の整形外科手術後には、無症状ではあるが高率に下肢深部静脈血栓症と肺血栓塞栓症が発症している。手術前からのアスピリン投与により発症を予防できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

心配された出血性合併症は 1 例も発症せず、下肢深部静脈血栓症および肺血栓塞栓症による死亡その他の事件は 1 件も発生して

いない。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Satoh M., Nakamura M., Akatsu Y., Iwasaka J., Shimoda Y., Segawa I. and Hiramori K., Expression of Toll-like receptor 4 is associated with enteroviral replication in human myocarditis, *Clinical Science*, 104, 577-584, 2003
- 2) Ueshima K., Kobayashi N., Saitoh M., Yamazaki T., Segawa I., Nakamura M., Froelicher V. and Hiramori K., Pathophysiology of atrial fibrillation evaluated by cardiopulmonary exercise testing, *Jpn. J. Appl. Physiol.*, 33, 143-150, 2003
- 3) Taniguchi Y., Ueshima K., Chiba I., Segawa I., Kobayashi N., Saitoh M. and Hiramori K., A new method using pulmonary gas-exchange kinetics to evaluate efficacy of  $\beta$ -blocking agents in patients with dilated cardiomyopathy, *Chest*, 124, 953-961, 2003
- 4) 伊藤智範、瀬川郁夫、糖尿病大血管症、冠動脈硬化、実地医家のための糖尿病合併症診断・治療ガイドブック（繁田幸男監修）、エルゼビア・ジャパン、東京、130-140、2003
- 5) 伊藤智範、瀬川郁夫、平盛勝彦、糖尿病と虚血性心疾患、循環器 New Trends シリーズ、虚血性心疾患のリスクファクター

と予防戦略、メジカルビュー社、東京、  
46-56、2003

- 6) 瀬川郁夫、虚血性心疾患の評価、PRACTICE、  
22、665-671、2003

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

カテーテル検査・手術後の下肢深部静脈血栓症および肺塞栓症予防法の策定

分担研究者 錦見尚道 名古屋大学医学部 脈管外科

研究要旨

名古屋大学医学部附属病院では、術後の重篤な合併症となる下肢深部静脈血栓症・肺塞栓症予防のためのプロトコールを作成し、運用を開始した。2003年2月末より8月7日までに、危険因子を評価し予防方針を立てた患者457例の評価票を解析した。65歳以上を高齢者とする評価の対象になった患者の43.3%であった。これらのなかで、プロトコールによる評価を受けることで初めて明らかになった凝固制御因子（Protein C, Protein S）欠乏症患者が5例（1.1%）あり、このうち1例は過去に深部静脈血栓症を起こしていたが、他の4名に明らかな血栓症の既往が無く、しかも65歳以上の高齢者が2名あった。

本プロトコールの医療経済的な面の検討を行う必要があるが、有用性は明らかとなった。

A. 研究目的

昨年の本研究で、術後の重篤な合併症となる下肢深部静脈血栓症・肺塞栓症予防のためのプロトコールを作成し、名古屋大学医学部附属病院で運用を開始した。このプロトコールの特徴は、1) 入院患者で治療要因にもとづく危険因子、患者自身の要因に基づく危険因子をスコア化し、一定以上のレベルの患者には特殊凝血的検査を含む精密な術前検査を行うこと、2) さらに、凝血的危険因子が大きい患者には、下肢静脈還流検査、カラードプラー検査を行うこと、3) それらの結果に基づいて、A) 早期離床・適切な補液のみ、B) 弾カストッキングの着用、C) 間欠的空気圧迫装置の装着、D) 保険適応外であるが、欧米では既にその有効性と安全性の評価が定まってきている低分子ヘパリンを、病院の費用負担で使用することである。本年は、評価票の結果の一部を収集し、その解析を行った。

B. 研究方法

プロトコールでは、危険因子を評価し予防方針を立てた患者は原則として医療安全管理室に評価票をFAXで送信する事にした。その評価票を元に解析をしたが、評価票を送る手間が不評を招き、評価期間を2003年8月7日で打ち切った。この間に457例の評価票が送られ、それらを検討した。

C. 研究結果

65歳以上を高齢者とする評価の対象になった患者の43.3%に上る。治療要因、身体要因では、特に高齢者に特徴的なものはなかった。極めて興味深い点は、凝固制御因子（Protein C, Protein S）欠乏症患者が5例（1.1%）あり、このうち1例は過去に深部静脈血栓症を起こしていたが、他の4名に明らかな既往がなかったこと、しかも65歳以上の高齢者が2名いたことである。本プロトコール

ルで初めて検出され、その結果弾カストッキングや間欠的空気圧迫装置を使用した  
が、1.1%の潜在的な危険をもつ患者の検出ができたこと  
の医学的・経済的評価が必要である。

#### E. 結論

評価票送付の手間により当初の予定より少ない患者数しか得られなかった。この反省から、病院情報システムを新たに開発し、2004年4月  
から評価票の自動送付、および評価票のリストが得られるようになる。来年度は、更に大きな症例数での検討が可能になる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

錦見尚道、上田裕一、高松純樹. 向血栓性素因のスクリーニング検査 静脈学 14:315-318, 2003

##### 2. 学会発表：岩田博英、平井正文、錦見尚道、他. 深部静脈血栓症における予防的運動の有用性. 第12回日本血管外科学会・東海北陸地方会 パネルディスカッション「深部静脈血栓症の予防-対策と問題点」 2004年3月6日 名古屋

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究要旨

胆道癌の根治切除には肝切除が必要となる症例が多いが、広範囲肝切除により、20%の症例に肝不全が発症し、10%の患者が不幸な転帰をとる。特に高齢者では、術後肝不全の発症・在院死亡が多く、手術成績向上のためには、胆道癌肝切除後の肝不全の病態解明とその対策が急務である。胆道癌に対する広範囲肝切除例（名古屋大学大学院器官調節外科学、n=137）の検討により、75歳以上の高齢者では75歳未満に比べ、術後在院死亡率が有意に高く（27.3% vs 10.3%）、肝不全発症率も高齢者で有意に高率であった（36.4% vs 18.3%）。また、胆道癌（n=200）に対する肝切除例では術後に19%に菌血症が見られたのに対し、肝細胞癌（n=101）、転移性肝癌（n=62）、良性疾患（n=42）では、それぞれ、4%、3%、2%であり、胆道癌、特に閉塞性黄疸合併例で、肝切除後に感染性合併症が多いことが明らかとなった。胆道癌肝切除後の高ビリルビン血症のメカニズムを明らかにするため、肝細胞毛細胆管膜に存在し、肝細胞内のビリルビンの排泄に必要不可欠なMRP2蛋白の発現を、胆道癌肝切除例の開腹時生検材料を用いて評価した。閉塞性黄疸を経験した肝臓ではMRP2の発現が障害されており、胆道ドレナージを行ってもMRP2発現が回復しない症例で術後の肝不全の発症が多いことがわかった。閉塞性黄疸時の感染免疫能の低下のメカニズムを明らかにするため、マウスの閉塞性黄疸モデルにおけるサイトカイン産生性を検討した結果、閉塞性黄疸における感染免疫能の低下には、Kupffer細胞の産生するIL-10が関与していることが明らかとなった。以上より、高齢者に対する肝切除後肝不全の予防のためには、術後の肝不全、感染性合併症を抑制するための術前処置が必要と考えられた。

### A. 研究目的

胆道癌（胆嚢癌、肝門部胆管癌、肝内胆管癌）の根治切除のためには、広範囲肝切除が必要不可欠である。しかし、広範囲肝切除により、20%の症例に肝不全が発症し、10%の患者が不幸な転帰をとる。特に高齢者では、術後肝不全の発症・在院死亡が多い。

胆道癌による閉塞性黄疸肝では、術前の経皮経肝胆道ドレナージ(PTBD)によって肝機能の改善を図った後でも、大量肝切除後に、

高率に高ビリルビン血症がみられる。また、胆道癌肝切除後には、感染性合併症が発症しやすく、それを契機に肝不全が発症し、それがさらに感染を悪化させるという悪性サイクルが形成される。高齢者の胆道癌の手術成績向上のためには、肝不全の病態解明とその対策が急務である。

本研究では、上記臨床的問題点を踏まえ、次の項目について検討した。

#### I. 胆道癌肝切除例の肝不全、感染性合併症

の実態

- II. 閉塞性黄疸を経験した肝臓の術後高ビリルビン血症発症のメカニズム
- III. 閉塞性黄疸肝の感染防御能低下のメカニズム
- IV. 胆道癌肝切除例の肝不全対策

## B. 研究方法 & C. 研究結果

- 1. 高齢者では胆道癌肝切除後の肝不全が多い

胆道癌肝切除後の合併症を、1992年からの10年間に名古屋大学大学院器官調節外科で手術を行った220例で検討した。肝切除量50%未満の肝切除における術後合併症の頻度は75歳未満が29.2% (21/72)、75歳以上では36.4% (4/11) (NS)であったのに対し、50%以上の肝切除例では、それぞれ、54.0% (68/126)、90.9% (10/11) ( $p < 0.01$ )であった。また、術後在院死亡は、50%未満肝切除例では、75歳未満と75歳以上で差を認めなかったが(6.9% vs 9.1%)、50%以上肝切除例では、それぞれ10.3% (12/126)、27.3% (3/11)と有意差を認めた( $p < 0.01$ )。在院死亡には肝不全(術後血漿ビリルビン値 $> 10\text{mg/dl}$ )が最も関与しており、75歳未満で18.3% (23/126)であったのに対し、75歳以上では36.4% (4/11)であった( $p < 0.01$ )。

- 2. 胆道癌、特に閉塞性黄疸合併例で、肝切除後に感染性合併症が多い
- 肝切除後の菌血症の頻度を、1990年から10年間に名古屋大学大学院器官調節外科で手術を行った405例で検討した。胆道癌( $n=200$ )に対する肝切除例では術後に

19%に菌血症が見られたのに対し、肝細胞癌( $n=101$ )、転移性肝癌( $n=62$ )、良性疾患( $n=42$ )では、それぞれ、4%、3%、2%であった。また、術前に閉塞性黄疸を合併していた症例の菌血症の頻度は24% ( $n=141$ )であったのに対し、非黄疸例では5% ( $n=262$ )であった。

- 3. 胆管閉塞は肝細胞毛細胆管膜MRP2の発現を低下させ、減黄術はそれを回復させる

肝細胞毛細胆管膜に存在し、肝細胞内のビリルビンやグルタチオンの排泄に必要不可欠なMRP2蛋白の発現を、胆道癌肝切除例の開腹時生検材料を用いて評価した。肝門部胆管癌で左右いずれかの肝葉のみに胆汁鬱滞のあった症例( $n=7$ )の肝組織から細胞膜分画を分離、Western blotを行い、MRP2の発現を同一症例の胆汁鬱滞葉と非鬱滞葉で比較した。densitometryによって定量化すると、鬱滞葉のMRP2の発現は非鬱滞葉の $46 \pm 26\%$ であった。さらに、胆道癌で左右の肝内胆管に拡張があり、片側葉にのみ胆道ドレナージを行った症例( $n=9$ )でMRP2の発現を検討すると、ドレナージ葉のMRP2発現量は非ドレナージ葉の158% (90~360%)であった。

- 4. 減黄術後にもMRP2の発現が不良な症例で肝切除後肝不全の発症が多い

胆道癌広範囲肝切除例( $n=39$ )の予定残存肝のMRP2の発現を開腹時肝生検材料の免疫染色で評価した。MRP2発現をI(良好)、II(中等度)、III(不良)にグレード分類すると、術後に肝不全を発症した5例のMRP2グレードはI/II/IIIが0/1/4

例であったのに対し、肝不全を発症しなかった 34 例では、26/6/2 例であり、両群間に有意差を認めた ( $p=0.001$ )。肝不全のリスクファクターを明らかにするため、肝不全群と非肝不全群で検討すると、年齢、MRP2 発現グレード、術前の胆管炎の有無、手術時間に有意差を認めた。年齢と MRP2 発現のグレードとの相関では、高齢者ほど MRP2 発現が不良となる傾向が見られた。

5. 閉塞性黄疸における感染免疫能の低下には、Kupffer 細胞の産生する IL-10 が関与している

C57BL/6 マウスの総胆管を結紮することにより、閉塞性黄疸マウスを作成、結紮後 5 日で血漿総ビリルビン値はプラトー (13.2  $\pm$  4.6mg/dl) に達することを確認し、これを以下の実験に使用した。胆管結紮マウスでは、sham マウスに比べ、大腸菌の腹腔内感染後の、腹腔、肝臓、脾臓における細菌排除が著明に遷延した。sham マウスでは、大腸菌感染後の血漿、肝臓中で、IL-12、IFN-g 優位のサイトカイン産生が見られたのに対し、胆管結紮マウスでは、IL-10 の産生が著明で、IL-12、IFN-g の産生は抑制されていた。胆管結紮マウスの腹腔内マクロファージと肝 Kupffer 細胞を分離して *in vitro* で LPS 刺激すると、腹腔マクロファージが IL-12 優位のサイトカイン産生性を示したのに対し、Kupffer 細胞では IL-10 優位のサイトカイン産生性が見られた。胆管結紮マウスに、抗 IL-10 抗体を前投与した後、大腸菌を感染させると、各臓器の細菌排除能は、sham マウスと同程度であった。

また、胆管結紮マウスに胆道ドレナージを行うと、大腸菌感染後の細菌排除能は sham マウスと同程度に回復した。

#### D. 考察 & E. 結論

胆道癌に対する広範囲肝切除では、特に高齢者において、肝不全の発症、在院死亡が多い。本研究では、胆道癌による胆管閉塞は、ビリルビンの排泄に重要な MRP2 の発現を低下させ、また、閉塞性黄疸は、感染免疫能を低下させることがあきらかとなった。高齢者に対する肝切除後肝不全の予防のためには、術後の肝不全、感染性合併症を抑制する術前処置が必要と考えられる。すなわち、高齢者では、低下している MRP2 の発現や免疫能を回復させる術前胆道ドレナージや、胆汁排泄能を高めることが知られている経皮経肝門脈枝塞栓術などを行い、肝予備能を術前に高めておくべきである。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) 新井利幸：感染と肝障害. 二村雄次編 胆道外科の要点と盲点, 文光堂, 東京, 2002, P369
- 2) 新井利幸、神谷順一、柳野正人、上坂克彦、湯浅典博、小田高司、二村雄次: 肝門部胆管癌の外科治療の進歩. 乾和郎、神谷順一、富田栄一、宮川秀一 編. 胆・膵疾患診療の最先端と展望 95-101, 診療新社, 大阪, 2002, 95-101



- 3) 新井利幸、柳野正人、二村雄次：肝臓外科における胆道感染：日本外科学会雑誌  
103 (12) : 869-872,2002

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢手術患者における老年医学的総合評価法を用いた術後せん妄に関する研究

分担研究者 安井章裕 愛知県済生会病院 外科部長

研究要旨

75歳以上の高齢者全身麻酔腹部手術例 79 例を prospective に検討した結果、「痴呆」などの術前状態、「1週間後手放し歩行可能」などの術後の ADL と有意に相関した。また 80 歳以上で、各種心理テストとせん妄係数について検討した結果、「STAI」などの不安の状態を含めて、個人の性格とは相関はみられなかった。

A. 研究目的

近年の外科技術の発達により、高齢者でも全身麻酔による手術が頻繁に行われるようになった。一方、高齢者では術後せん妄を起しやすく、それは術後回復期に起こるため、術後ケアや回復そのものの妨げになる。本研究では、高齢者における術後せん妄の起こることを予測する因子の解析を試み、その予防法や高齢者にせん妄を生じた場合の治療法の開発の一助としたい。

B. 研究方法

本年度は、病態解明および発生予測因子解析のため、75歳以上の高齢者全身麻酔腹部手術例 79 例を集計し、高齢者術後せん妄発症 16 例と非発症 63 例について 257 項目について prospective に検討し、また 80 歳以上の 64 例については、同様に prospective に各種心理テストとせん妄係数について検討し、せん妄発症 6 例と非発症 32 例について術後せん妄を目的変数として重回帰分析をステップワイズ法を用いて推定した。

（倫理面への配慮）

本研究は疫学的研究であり、検査および治

療行為は日常診療で施行されているものであり、患者さんに直接の不利益や危険性を伴うものではない。データ公表についてはプライバシーには十分に配慮した方策をとっており、本人及びその家族に対して十分な説明をしている。また、本人及びその家族からの申し入れがあった場合は、統計の対象から除外している。

C. 研究結果&考察

75歳以上の高齢者全身麻酔腹部手術例 79 例を集計し、高齢者術後せん妄発症 16 例と非発症 63 例について 257 項目について prospective に検討した結果、「痴呆」などの術前状態、「1週間後手放し歩行可能」などの術後の ADL と有意に相関した。また 80 歳以上の 64 例についての、各種心理テストとせん妄係数について、せん妄発症 6 例と非発症 32 例（施行 38 例）について重回帰分析を行った結果、予想に反して「STAI」などの不安の状態を含めて、個人の性格とは相関はみられなかった。

D. 結論

75歳以上の高齢者全身麻酔腹部手術例79例を prospective に検討した結果、「痴呆」などの術前状態、「1週間後手放し歩行可能」などの術後のADLと有意に相関した。また80歳以上で、各種心理テストとせん妄係数について検討した結果、「STAI」などの不安の状態を含めて、個人の性格とは相関はみられなかった。

E. 健康危険情報  
特になし。

F. 研究発表  
論文発表

- 1) Hayashi E, Yasui A, Oda K, Nagino M, Nimura Y, Nakanishi M, Motoyama N, Ikeda K, Matsuura A, Loss of p27(kip1) accelerates DNA replication after partial Hepatectomy in mice. *J Surg Res.*2003 15;111(2)196-202.
- 2) Sekoguchi E, Sato N, Yasui A, Fukada S, Nimura Y, Aburatani H, Ikeda K, Matsuura A. A novel mitochondrial carnitine-acycarnitine translocase induced by Partial hepatectomy and fasting. *J Biol Chem.* 2003 3;278(40): 38796-802. Epub 2003 Jul 25.
- 3) Kawamura T, Yasui A, Shibata Y, Yuasa N, Nimura Y.: Evaluation of gastroesophageal reflux disease following various Reconstructive procedures for a distal gastrectomy. *Langenbecks Arch Surg.*2003 388(4):250-4Epub 2003 Aug 09.
- 4) Xiang L, Murai A, Sugahara K, Yasuui A, Muramatsu T.: Effects of leptin gene expression in mice in vivo by electroporation and Hydrodynamics-based gene delivery.

*Biochim Biophys Res Commun.* 2003 1;307(3): 440-5.

- 5) 安井章裕「高齢者の腹痛」 長寿科学辞典 pp244 祖父江逸郎 監修 医学書院、東京 2003
- 6) 安井章裕、森岡 淳、横山幸浩: 嚥下障害に対する輪状咽頭筋切断術・喉頭挙上術 高齢者への手術適応の拡大 手術: 847-851, 2003

## 厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

### 分担研究報告書

遺伝子、蛋白解析による高齢者術後合併症危険予測の可能性の研究

分担研究者 磯部健一 国立長寿医療研究センター老化機構 部長

#### 研究要旨

手術に際し、術中、術後様々なストレスがかかる、生体はそれに反し、ストレス反応あるいは防御遺伝子を発現させると考え、様々なストレス応答遺伝子の発現制御実験を行っている。今年度は、酸化ストレスの発生場所であるミトコンドリアの老化による変異を観察した。マウス実験で肝臓のミトコンドリア DNA の deletion が老化に伴い上昇することが判明した。また、ミトコンドリア DNA の deletion が少ない脾臓を培養し、放射線を照射すると deletion が増強した。ER ストレスとして知られるタプシガルギン、ツニカマイシン、DTT 刺激で GADD34 の発現は著明に増加した。蛋白合成のシャットオフを最も鋭敏に検出できる eIF2 $\alpha$  のリン酸化で GADD34 wild type, knockout マウスの ER ストレスによる変化を検索すると、GADD34 wild type では ER ストレス刺激にて eIF2 $\alpha$  のリン酸化とともに蛋白合成が停止したが、すぐに eIF2 $\alpha$  のリン酸化の低下により合成が回復した。一方、knockout マウスは eIF2 $\alpha$  のリン酸化、蛋白合成停止が遅延した。年齢に伴い GADD34 の発現は低下した。外科手術時には血流遮断によって細胞内の ER に負荷がかかり、細胞内蛋白合成の一時的シャットオフそれよりの回復といった急性反応が惹起されると考えられる。高齢者の手術時は ER ストレスに対する防御能が落ちている可能性が推測される。

#### A. 研究目的

高齢者は手術に際し、術中、術後様々なストレスがかかる、生体はそれに反応し、ストレス反応あるいは防御遺伝子を発現させると考え、様々なストレス応答遺伝子の発現制御実験を行っている。今年度は酸化ストレス、虚血ストレスに最も影響を受けるミトコンドリアの遺伝子の老化による変化を若いマウスから老化マウスで検索した。また、外科手術時には血流遮断によって細胞内の ER に負荷がかかり、細胞内蛋白合成の一時的シャットオフそれよりの回復といった急性反応が惹起されると考えられる。その基礎的研究として、GADD34 を中心に遺伝子欠損マウ

スを使用して研究を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. ストレス刺激

細胞へのストレス刺激は放射線、ER ストレスとして知られるタプシガルギン、ツニカマイシン、DTT を使用した。

##### 2. 遺伝子発現、蛋白発現

組織の mRNA 発現はノザンハイブリダイゼーション、インサイツウハイブリダイゼーションで検索した。組織の蛋白発現はウエスタンブロットング、免疫染色で検索した。細胞内蛋白合成はメチオニラベル実験で検索した。

### 3. ミトコンドリア DNA

ミトコンドリアの DNA を PCR で増幅し、欠失の有無を検索した。また、DNA 切断の内、DSB を LM-PCR で測定した。

### 4. マウス

C57BL マウスを使用した。各年齢マウス、GADD34 wild type, ノックアウトを飼育した。胎児繊維芽細胞を培養した (MEF)。(倫理面への配慮)

動物実験はマウス個体を使用した。長寿医療研究センター動物施設実験指針に従って研究を行った。

## C. 研究結果

### 1. 老化マウスでは肝臓に最も強くミトコンドリア DNA の Deletion がみられた。

C57BL/6 マウスの各年齢別のミトコンドリア DNA の Deletion を調べると老化に伴い肝臓に最も強く Deletion が見られた。脾臓では Deletion は比較的早い年齢から見られたがそれ程強いものではなかった。脾臓を培養し、放射線照射すると LM-PCR で DNA の切断が確認された。老化に伴うミトコンドリア DNA の Deletion はストレスによるものが示唆された。

### 2. GADD34 は ER ストレスによる蛋白合成のシャットオフからの回避に働く。

ER ストレスとして知られるタプシガルギン、ツニカマイシン、DTT 刺激で GADD34 の発現は著明に増加した。蛋白合成のシャットオフを最も鋭敏に検出できる eIF2  $\alpha$  のリン酸化で GADD34 wild type, knockout マウスのタプシガルギン、DTT による変化を検索すると、GADD34 wild type では ER ストレス刺激にて eIF2  $\alpha$  のリ

ン酸化とともに蛋白合成が停止したが、すぐに eIF2  $\alpha$  のリン酸化の低下により合成が回復した。一方、knockout マウスは eIF2  $\alpha$  のリン酸化、蛋白合成停止が遷延した。

### 3. GADD34 の各組織による発現差、年齢変化

マウス GADD34 は正常マウスでは肺と脾臓に比較的強く発現した。脳、筋肉、心臓には弱く、肝臓、小腸、睪丸、卵巣にはほとんど発現しなかった。発現は年齢とともに低下する傾向にあった。

## D. 考察

今回マウス実験で肝臓のミトコンドリア DNA の deletion が老化に伴い上昇することが判明した。また、ミトコンドリア DNA の deletion が少ない脾臓を培養し、放射線を照射すると deletion が増強した。高齢者におけるミトコンドリア DNA の deletion は手術等ストレスからの回復に影響を与える可能性がある。また、脳の虚血再環流の実験で GADD34 が上昇することが知られている。腸管の手術においても同様の状態が惹起される可能性があり、GADD34 が虚血再環流にともなって起きる蛋白合成シャットオフからの回避に重要な役割を担っている可能性が示唆される。

## E. 結論

マウス実験で肝臓のミトコンドリア DNA の deletion が老化に伴い上昇することが判明した。また、ミトコンドリア DNA の deletion が少ない脾臓を培養し、放射線を照射すると deletion が増強した。GADD34 は ER ストレ

スによる蛋白合成のシャットオフからの回避に働くことを証明した。虚血再環流は ER ストレスを誘起することが知られており、GADD34 が上昇する。老化にともない、GADD34 が低下することから ER ストレスからの回避が遅れる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Kojima E, Takeuchi A, Haneda M, Yagi A, Hasegawa T, Yamaki K, Takeda E, Akira S, Shimokata K, Isobe K The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. FASEB J. 17; 1573-1575, 2003.
- 2) Lin P, Asai A, Okada A, Isobe K, Nakajima H. ; Dramatic increase of telomerase activity during dendritic cell differentiation and maturation. J Leukoc Biol 74; 270-276,2003.
- 3) Yagi A, Hasegawa, Y, Xiao H , Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, Hasegawa T, Shimokata K, Isobe K. GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription.; J Cell Biochem. 90:1242-1249, 2003.
- 4) Nakajima H, Asai A, Okada A, Lin P, Hamajima F, Sata T, Isobe K. Transcriptional regulation of ILT family receptors.; J Immunol 171 ; 6611-6620,2003.
- 5) 磯部健一；ストレスと老化；老年病学会誌 40;565-568,2003.

- 6) 磯部健一、城川哲也;ストレスと老化; 基礎老化研究, 27; 29-34,2003.

##### 学会発表

- 1) 磯部健一；日本の長寿科学基礎研究の最前線；ストレスと老化；第 23 回日本老年病学会総会；平成 15 年 6 月 19 日

研究成果の刊行に関する一覧表

1. Sekoguchi E., Fukata S., et al : A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting, *J Biol Chem* 25, 2003
2. 錦見尚道、上田裕一、高松純樹. 向血栓性素因のスクリーニング検査 静脈学 14:315-318, 2003
3. 北川雄光、小澤壯治: 高齢者食道癌手術の術中・術後管理(幕内雅敏 監修、幕内博康編集) 食道外科の要点と盲点、文光堂、東京 313-315, 2003.10
4. 北川雄光、藤井博史、久保敦司、北島政樹: 消化器癌 *Nippon Rinsho* Vol 61, Suppl 8, 335-340, 2003
5. 北川雄光: 頸部食道喉頭合併切除遊離空腸移植術(北島政樹、櫻井健司 編集) ビジュアル&アップデート「外科手術と術前・術後の看護ケア」-手術室から病棟まで/ナース・研修医のための最新ガイド 南江堂 東京 132-133, 2004.1
6. Kojima E, Takeuchi A, Haneda M, Yagi A, Hasegawa T, Yamaki K, Takeda E, Akira S, Shimokata K, Isobe K.: The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. *FASEB J.* 17; 1573-1575, 2003.
7. Lin P, Asai A, Okada A, Isobe K., Nakajima H.: Dramatic increase of telomerase activity during dendritic cell differentiation and maturation. *J Leukoc Biol* 74; 270-276, 2003.
8. Yagi A, Hasegawa Y, Xiao H, Haneda M, Kojima E, Nishikimi A, Hasegawa T, Shimokata K, Isobe K.: GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription.; *J Cell Biochem.* 90 ; 1242-1249, 2003.
9. Nakajima H, Asai A, Okada A, Lin P, Hamajima F, Sata T, Isobe K.: Transcriptional regulation of ILT family receptors.; *J Immunol* 171 ; 6611-6620, 2003.
10. 磯部健一: ストレスと老化; 老年病学会誌 40;565-568,2003.
11. 磯部健一、城川哲也: ストレスと老化; 基礎老化研究, 27; 29-34,2003.
12. Satoh M., Nakamura M., Akatsu Y., Iwasaka J., Shimoda Y., Segawa I. and Hiramori K., Expression of Toll-like receptor 4 is associated with enteroviral replication in human myocarditis, *Clinical Science*, 104, 577-584, 2003
13. Ueshima K., Kobayashi N., Saitoh M., Yamazaki T., Segawa I., Nakamura M., Froelicher V. and Hiramori K., Pathophysiology of atrial fibrillation evaluated by cardiopulmonary exercise testing, *Jpn. J.Appl. Physiol.*,33, 143-150, 2003
14. Taniguchi Y., Ueshima K., Chiba I., Segawa I., Kobayashi N., Saitoh M. and Hiramori K., A new method using pulmonary gas-exchange kinetics to evaluate efficacy of  $\beta$ -blocking agents in patients with dilated cardiomyopathy, *Chest*,124,953-961, 2003
15. 伊藤智範、瀬川郁夫、糖尿病大血管症、冠動脈硬化、実地医家のための糖尿病合併症診断・治療ガイドブック(繁田幸男 監修)、エルゼビア・ジャパン、東京、130-140、2003
16. 伊藤智範、瀬川郁夫、平盛勝彦、糖尿病と虚血性心疾患、循環器 New Trends シリーズ、虚血性心疾患のリスクファクターと予防戦略、メジカルビュー社、東京、46-56、2003
17. 瀬川郁夫、虚血性心疾患の評価、PRACTICE、22, 665-671, 2003
18. 新井利幸: 感染と肝障害. 二村雄次編 胆道外科の要点と盲点、文光堂、東京、2002、P369
19. 新井利幸、神谷順一、榑野正人、上坂克彦、湯浅典博、小田高司、二村雄次: 肝門部胆管癌の外科治療の進歩. 乾和郎、神谷順一、富田栄一、宮川秀一 編. 胆・膵疾患診療の最先端と展望 95-101, 診療新社、大阪、2002、95-101
20. 新井利幸、榑野正人、二村雄次: 肝臓外科における胆道感染: 日本外科学会雑誌 103(12): 869-872,2002
21. Hayashi E, Yasui A., Oda K, Nagino M, Nimura Y, Nakanishi M, Motoyama N, Ikeda K, Matsuura A: Loss of p27(kip1) accelerates DNA replication after partial Hepatectomy in mice. *J Surg Res.*2003 15;111(2)196-202.
22. Sekoguchi E, Sato N, Yasui A., Fukada S, Nimura Y, Aburatani H, Ikeda K, Matsuura A.: A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by Partial hepatectomy and fasting. *J Biol Chem.* 2003 3;278(40): 38796-802. Epub 2003 Jul 25.
23. Kawamura T, Yasui A., Shibata Y, Yuasa N, Nimura Y.: Evaluation of gastroesophageal reflux disease following various Reconstructive procedures for a distal gastrectomy. *Langenbecks Arch Surg.*2003 388(4):250-4Epub 2003 Aug 09.
24. Xiang L, Murai A, Sugahara K, Yasuui A., Muramatsu T.: Effects of leptin gene expression in mice in vivo by electroporation and Hydrodynamics-based gene delivery. *Biochim Biophys Res Commun.* 2003 1;307(3): 440-5.
25. 安井章裕「高齢者の腹痛」 長寿科学辞典 pp244 祖父江逸郎 監修 医学書院、東京 2003
26. 安井章裕、森岡 淳、横山幸浩: 嚥下障害に対する輪状咽頭筋切断術・喉頭挙上術-高齢者への手術適応の拡大-手術: 847-851, 2003

20030207

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。