

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Recklinghausen 病に合併した ganglioneuroma の一例

研究協力者 大原 國章 虎ノ門病院皮膚科部長

研究要旨

23 歳女性。幼少時からレックリングハウゼン氏病にて経過観察されていた。数ヶ月前から右下顎部の皮下腫瘤を自覚した。頸部 CT では頸動静脈に接した 3.5 cm x 2.6 cm 大の境界明瞭な腫瘤であり Schwannoma や neurilemmoma を疑い手術を行った。手術時、腫瘤は周囲と剥離でき、全摘出できた。腫瘤は薄い被膜に覆われ表面平滑であり、断面は黄白色・myxoid であった。病理所見は neurofibroma 様の myxoid な間質の中に類円型の ganglion cell が散在していた。ganglioneuroma と診断した。

Ganglioneuroma は縦隔や後腹膜に好発する良性神経系腫瘍で、クロム親和性組織または交感神経節起源と考えられている。Recklinghausen 病に合併した ganglioneuroma の報告は少なく、特に皮膚科領域では稀なため報告する。

A. 研究目的

レックリングハウゼン病に合併する皮下腫瘍について

黄白色・myxoid であった。病理所見は neurofibroma 様の myxoid な間質の中に類円型の ganglion cell が散在していた。ganglioneuroma と診断した。

B. 研究方法・結果

当科経過観察中の 23 歳女性のレックリングハウゼン病患者。数ヶ月前から右下顎部の皮下腫瘤を自覚したため精査。頸部 CT では頸動静脈に接した 3.5 cm x 2.6 cm 大の境界明瞭な腫瘤であり Schwannoma や neurilemmoma を疑い手術を行った。手術時、腫瘤は周囲と剥離でき、全摘出できた。腫瘤は薄い被膜に覆われ表面平滑であり、断面は

C. 結論・考察

神経節神経腫 (ganglioneuroma) は神経堤 (neural crest) 由来の交感神経芽細胞系腫瘍に属し、組織学的には良性腫瘍である。10 歳以上の若年者に多く、交感神経節の存在する縦隔や後腹膜などに好発する。¹⁾ 大多数は de novo 発生すると考えられている¹⁾ が、neuroblastoma が先行しその成

熟過程で発生するという報告もある。¹⁾²⁾発生頻度は Neurilemmoma や neurofibroma のような良性神経系腫瘍と比べて極めて稀である。NF-1 に合併した ganglioneuroma は消化管・副腎などで報告される³⁾⁴⁾が、具体的な頻度などは検討されていない。皮膚科では頸部の報告が少数のみである。⁵⁾

臨床的な特徴に乏しく、無症状のものや自験例のように腫瘍の神経圧迫症状を認める例がある。また、他の神経系腫瘍のように腫瘍が vasoactive intestinal peptide を含むため、下痢など消化器症状が出現することもある。¹⁾

組織学的には、シュワン細胞を背景に ganglion cell が多数散在し、軽度の異型を示す。

正常神経節と比較すると、周囲の satellite cell や Nissl 小体を欠く。自験例は既存の ganglion cell が腫瘍に接して存在することから頸部の交感神経節近傍から発生したものと推測できる。

また、NF-1 に合併した ganglioneuroma の鑑別として、正常の ganglion を取り込んだ neurofibroma が挙げられる⁶⁾が、異型な ganglion cell を有することより、ganglioneuroma そのものと考えた。

D. 論文発表

1. 論文発表 Visual dermatology 投稿中
2. 学会発表 日本皮膚科学会第 67 回東京支部総会

E. 知的所有権の取得状況

なし

E. 文献

- 1) Enzinger & Weiss' s : Soft tissue tumors, 4th edition
- 2) 山根秀一ら:小児がん 第 38 巻第 6 号:202-207, 2001
- 3) Anthony P Geraci, et al : Journal of Child Neurology; vol 13, no 7, 357-358, July, 1998
- 4) 山家仁ら、日消外会誌 35 (6) :603-607, 2002
- 5) E. R. Walrond et al; W. I. Med. J. (1975) XXIV, 202
- 6) Christopher A et al, The American Journal of Dermatology 25(3) :239-242, 2003

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

選択的動脈造影・塞栓術を術前に行った pachydermatocele の治療例
— 神経線維腫症 1 の pachydermatocele への対応 —

分担研究者 土田 哲也 埼玉医科大学皮膚科教授

研究要旨

Pachydermatocele は、内在する豊富な奇形血管の破綻に基づく腫瘍内出血・血腫形成や、悪性末梢神経鞘腫瘍の発生のため、神経線維腫症 1 患者において、Q.O.L. や生命予後を決める因子の一つとなる。悪性化を伴わない病変に対する手術療法を考える際、最大の問題点は、出血に対する対策である。

今回新たな試みとして、術中大量出血を防ぐために、術前に選択的動脈造影ならびにゼラチンスポンジ細片を用いた塞栓術を行い、出血量を最小限にすることをめざし、目的を達成しえた。四肢・体幹症例では、特に有用な方法と考えられた。

倉持 朗 埼玉医科大学皮膚科講師
田中淳司 埼玉医科大学放射線医学助教授
平数淳子 埼玉医科大学放射線医学教授

neurofibroma からの悪性変化、MPNST の発生であり、もうひとつは、ここで問題にする、巨大な diffuse plexiform neurofibroma 中の anomalous vessel の破綻に基づく、時には致命的ですらある腫瘍内での出血である。

A. はじめに

diffuse plexiform neurofibroma (いわゆる pachydermatocele) は、neurofibromatosis 1 (NF1) の skin manifestation 中、malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) と共に、NF1 の生命予後および QOL を左右する最も重要な因子の一つである。ひとつは、diffuse plexiform neurofibroma から、或いはこの中の nodular plexiform

今回、他院で上腕の diffuse plexiform neurofibroma に切除を受けた際、大量の出血があった男児が、前腕の 2 個連続した pachydermatocele の切除を希望し、来院した。新たな試みとして、術中の大量出血を防ぐために、術前に選択的動脈造影ならびにゼラチンスポンジ細片を用いた塞栓術を行い、出血量を最小限にすることができた。四肢・体幹症例では有用な方法と考えられたので

報告する。

B. 症例

症例：15 歳 4 カ月 男、sporadic type の neurofibromatosis1 (NF1)

主訴：「右腕の 2 つのコブを取りたい」

家族歴：家系内に NF1 はなく、特記すべき既往もない。

現病歴：出生時より、右上腕全体に茶褐色の色素斑が存在し、体幹には多数の木の葉状の褐色斑が存在していた。小学校 4 年ころから、肘から前腕にかけて、2 個コブ状の隆起が生じ漸次増大してきた。又、上腕、前腕全体には色素斑があり、ブヨブヨと盛りあがってきて、左上肢よりあきらかに太くなった状態である。

2003 年 2 月、友人とふざけて遊んでいて右上腕骨折を生じた。他院整形外科にて治療。この際、骨折部周囲の open biopsy が行われ (osteosarcoma も考慮されたため、組織学的に否定、benign と診断された)、この際、皮切時から大量の出血があり、止血が難しかったという。この他院、整形外科受診時に、はじめて患者は NF1 と診断された。osteosarcoma が否定され、「2 つのコブ」の切除を希望し、来院した。

現症：受診時臨床像を図 1 に示す。上肢全体に、巨大 Recklinghansen 斑があり、全体が有毛性（患者が剃っている）で、隆起性である。肘から前腕よりには 2 個の典型的な so-called pachydermatocele が認められるが、前医での大量出血のあった open biopsy の皮切部も、巨大 Recklinghansen 斑のある pachydermatocele 内で切り込んだものと分る。図 2 に患者が切除を希望している 2 個の腫瘤を示す。

画像診断 (MRI)：腫瘤は手拳大で、二連球状にならんでいた。やや圧縮性ではあるものの、腫瘤を動かすと、同時に下床も動くため MRI を施行した。筋層内にも neurofibroma が霜降り状にみられ、intramuscular neurofibroma の存在が明らかであ

った。(図 3：Gd-DTPA 静注後 T1 強調画像)

治療 (1)：選択的動脈造影・塞栓術：前医で大量出血があったため、術中の出血を防ぐ手段として、術前に選択的動脈造影（セルジンガー法）ならびにゼラチンスポンジ細片を用いた塞栓術を行った。

①4F ロングシースを右大腿動脈から挿入し、4F C A カテーテルにて右上腕動脈造影を施行した。右上腕深動脈の末梢に、肘部の pachydermatocele の部位に一致する腫瘍濃染が認められた。A V シェントや動脈瘤、また sinusoidal vasodilatation の高度な奇形血管は認められなかった。

②右上腕深動脈を 3F マイクロカテーテルで選択し、少量のスポンゼル細片を注入した。この結果を図 4、図 5 に示す。各々 a が塞栓前、b が塞栓後である。図 4 a は上腕深動脈とその枝による腫瘍部の濃染・hypervascularity を示す。b は塞栓後であるが、明らかに血流が減少していることが分る。図 5 a は塞栓前の、b は塞栓後の venous return であるが、塞栓後、明らかに venous return が減少していることが分る。すなわち、この両者より塞栓後、腫瘍内の血管、および腫瘍に供給される血流が極めて少なくなったことが確認できた。また塞栓術を行った当日から、腫瘤の体積が約 15% 縮小し、手術を行う 4 日後までその効果は持続した。

治療 (2)：切除縫縮術：全麻下に、エアターニケットやエピネフリン入りキシロカインを使用せず、切除、比較的容易に縫縮しえた。筋層内病変に対しては手をつけなかった。手術時、腫瘤全体は、触診上、柔らかくなった印象であり、また全出血量は 10ml 以下であった。図 6 に術後 4 月の臨床像を示す。

病理：図 7 に切除標本(マクロ)断面を示す。diffuse pigmented plexiform neurofibroma として矛盾しない。組織学的に表皮直下から切除断端まで、好酸性の紡錘形細胞の稠密な増殖がみられる (neurofibroma である) とともに、動脈、静脈、動・静脈いずれともいいがたい奇形血管が極めて多数認められた (図 8)。図 9 では、血管内に泡沫

状構造物の塞栓像が認められる。これがスポンゼル細片であるか否か、現在検討中である。

C. 考察

私達は、これまで、大きな pachydermatocele に対する治療として、さまざまな工夫をしてきた。基本的な考えは、以下の通りである。(1) 手術手技について：巨大な腫瘍は、体積を減らすことを目的とし、分割手術にして構わない。顔面の腫瘍も何回かの手術に分けて整容的改善をめざす。また、なによりも術後の創部の圧迫止血が大切で、包交も頻回にすべきではない。(2) 手術不能例・拒否例に対して：ショックアブソーバーをぬいつけた装具を服の様に作製し、着用してもらうこととし、これも腫瘍内出血・反復する血腫形成を防ぐ意味で極めて有効である。そして、同様の治療法の報告例は調べたかぎり無かったが、(3) 今回新たな試みとして、術中の大量出血を防ぐために、術前に選択的動脈造影ならびにゼラチンスポンジ細片を用いた塞栓術を行い、出血量を最低限にすることをめざし、目的を達成しえた。この方法の考え方は図 10 のように図示できる。腫瘍内に供給される血流（動脈の血流及び venous return の血流）を減少させることで、血流の乏しくなった腫瘍内で切除をするというものである。ここで示した症例は、以前であれば 400~500cc の出血は考慮しなければならなかった症例と考えるが、出血量を極めて少量に抑えることができた。この症例ののち、私達は臀部、顔面（コメカミ）の症例に対し、同様の治療を行った。臀部症例は 20cc の出血であったが、顔面の症例は 120cc（これも以前に比べれば、はるかに少ない出血量といえるが）の出血があった。後者の場合は眼動脈の塞栓、脳血管の塞栓など、リスクが高く、塞栓術を、多くの血管に密に行えないためと考えた。すなわち、本法も、四肢や体幹症例に適応があるものと考えられるし、また腫瘍内血管が高度な sinusoidal vasodilatation を伴う奇形血管が主体であるよう

な場合も、有効性は低いと考えられる。症例を重ねて、どのような症例に選択的動脈造影・塞栓術が良い適応であるか、また、うまくいかない症例では、別の方法のコンビネーションにより良い結果を得ることができないか、など、更に考えを進めていきたいと考えている。



图 1



图 2

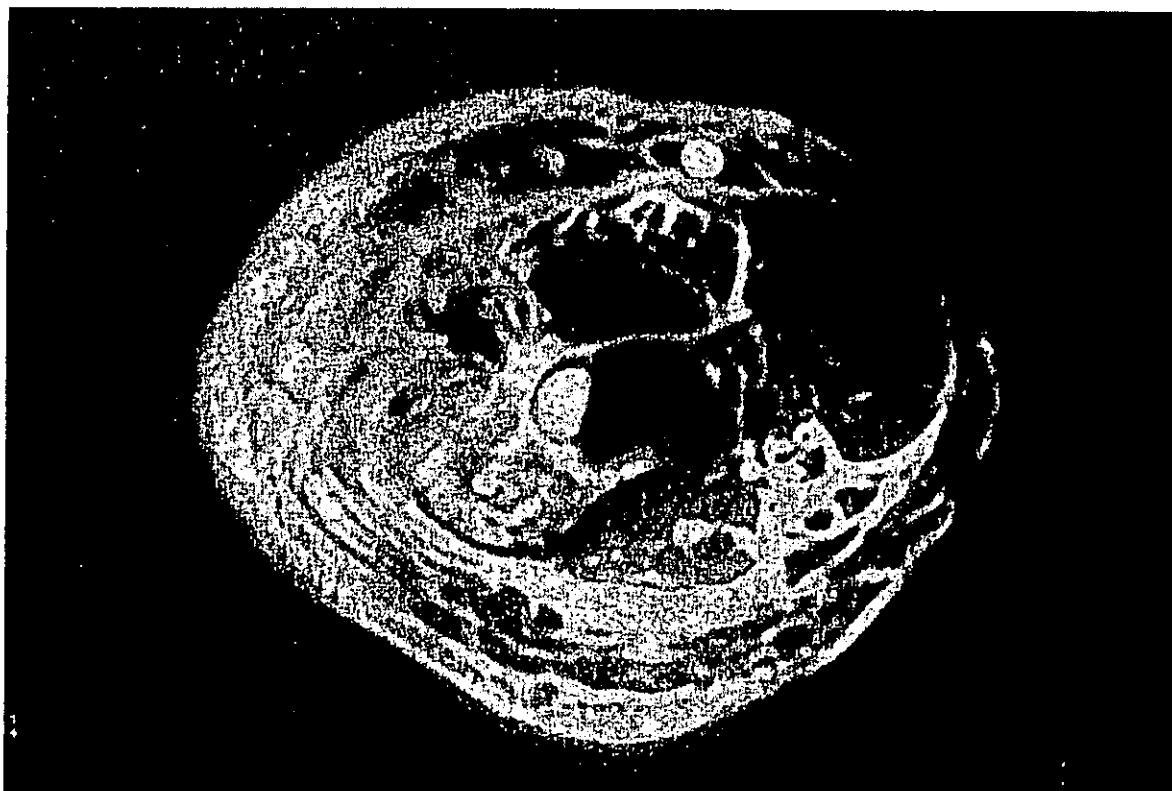
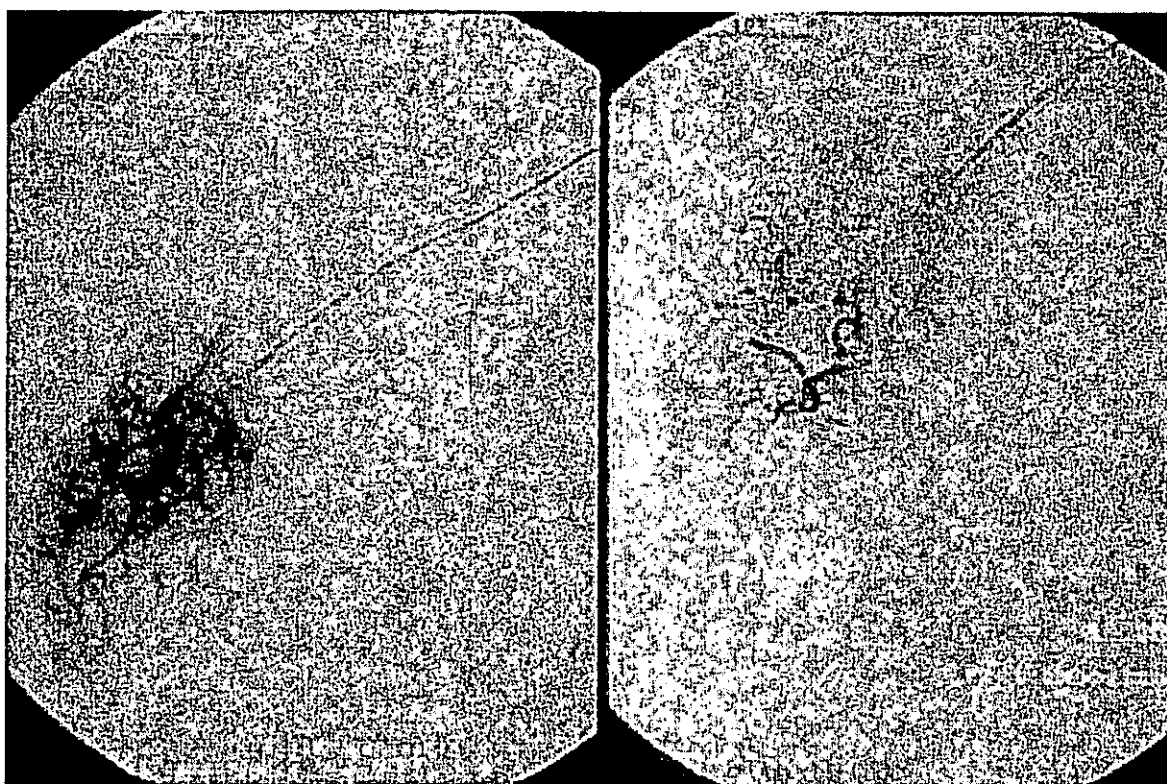


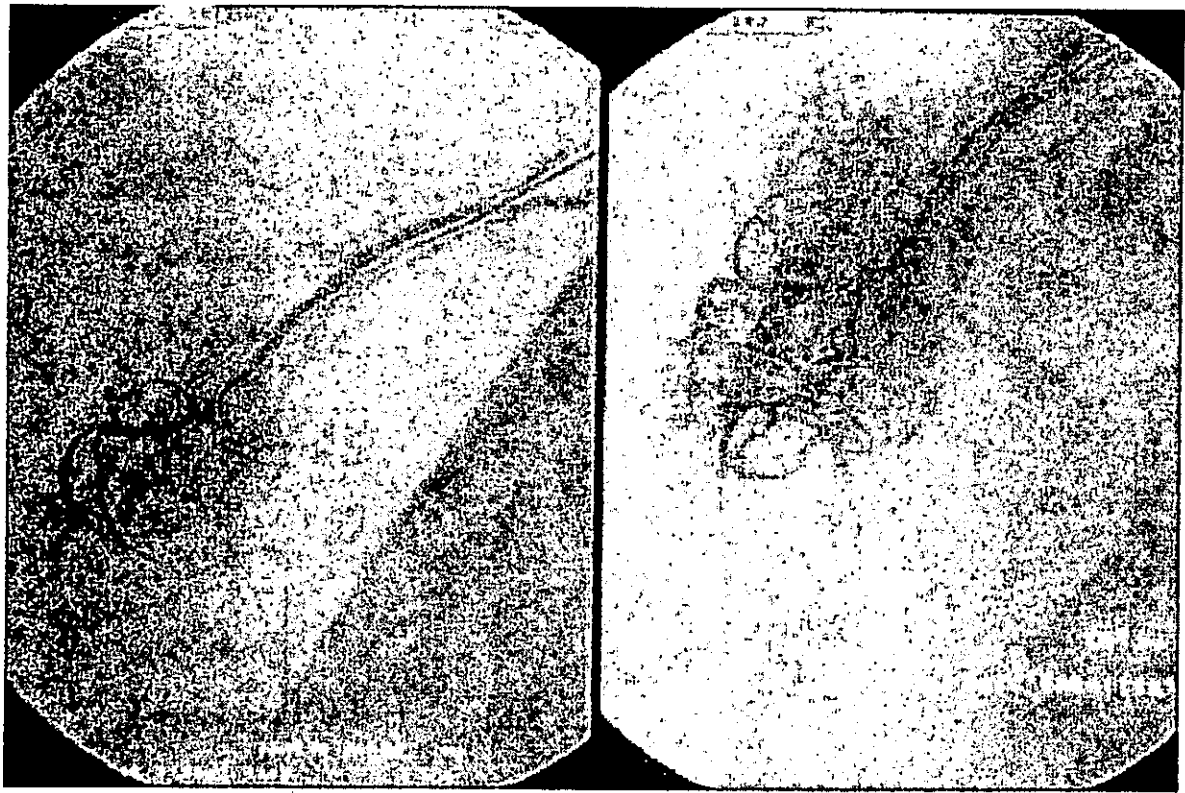
图 3



a

图 4

b



a

图 5

b

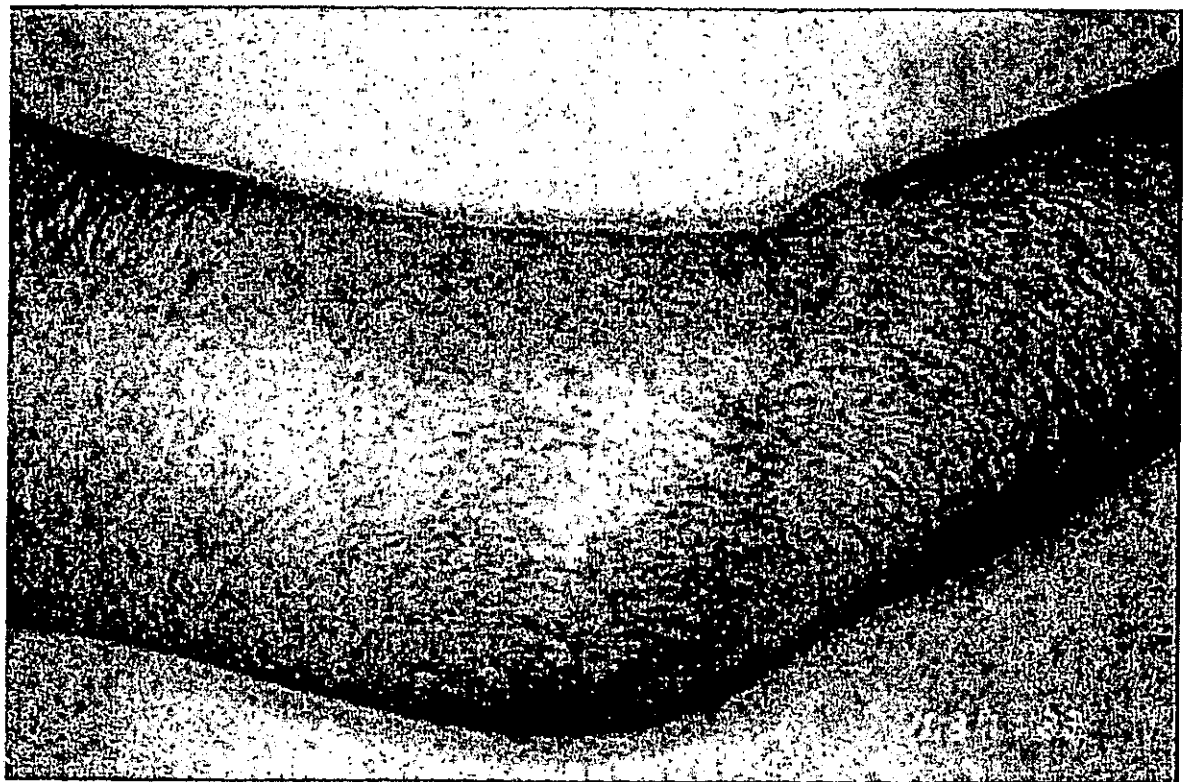


图 6

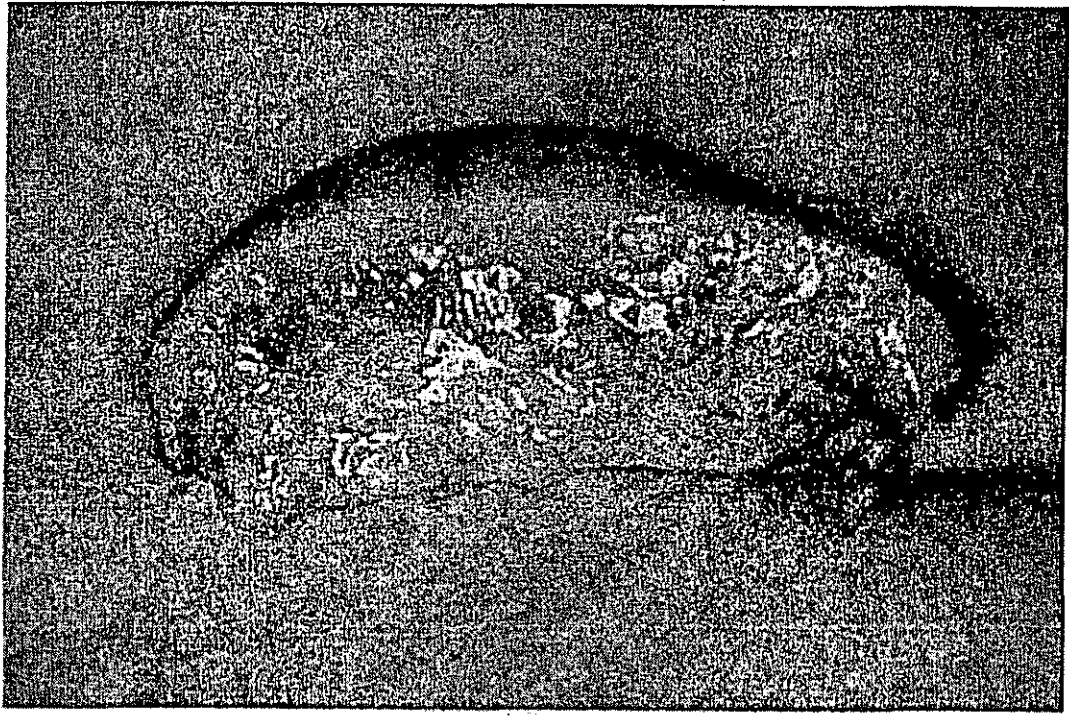


图 7

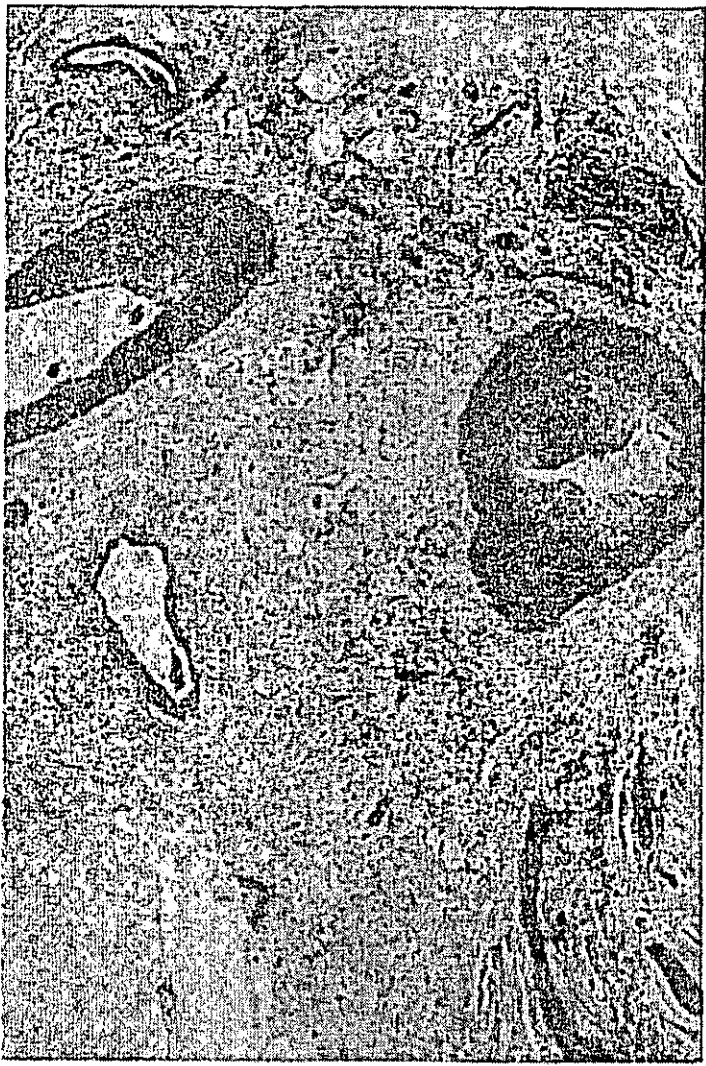


图 8



图 9

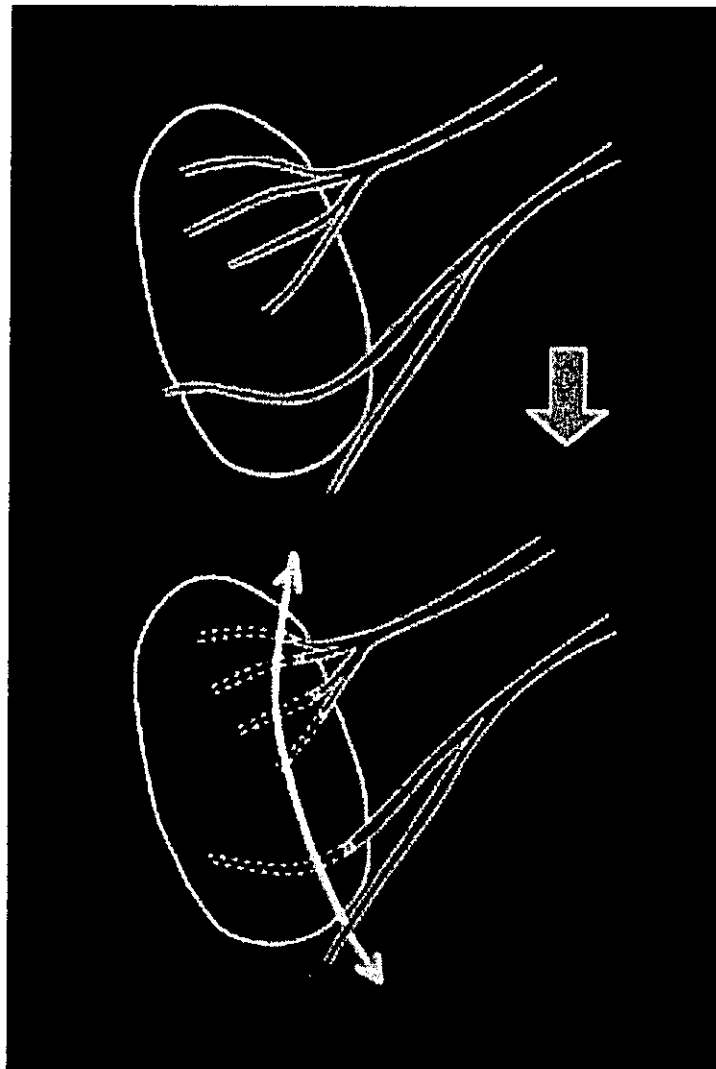


图 10

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

牽引ストレスを用いた血管形成

分担研究者 中村耕三 東京大学大学院医学研究科整形外科教授

研究要旨

ビーグル脛骨延長モデルで牽引ストレスに伴う腓腹筋、長趾伸筋、前脛骨筋内の血管形成の定量評価を行った。骨軸方向の延長では、血管密度が各筋ともに延長群が有意に増加し、平均値では腓腹筋が 1.34 倍、長趾伸筋が 1.44 倍、前脛骨筋が 1.43 倍に増加していた。方向別では骨軸（延長）方向で血管密度が増加した。

大西五三男、松山順太郎、今井一博、岡崎裕司、
佐藤和強

東京大学大学院医学研究科整形外科

移植の生着促進、治療薬剤の組織への移行促進があげられる。本研究では、仮骨延長術の手技を応用して牽引ストレスを治療対象組織に有効に作用させ、組織中の血管形成を促進する治療法を開発することを最終目標とする。

ビーグル脛骨延長モデルを作成し、血管形成の定量評価を組織学的に行ない、血管形成を定量化したので報告する。動物実験での仮骨延長術により、一定の量と方向をもった牽引ストレスを軟部組織に作用させ、血管形成がどの部位にどの程度生じるかを定量的に評価することを目的とした。

A. 研究目的

下腿偽関節の治療にイリザロフ法が用いられ、良好な骨癒合率を得ている。良好な骨癒合が得られる一因に、骨および周囲軟部組織に豊富な血管形成が起こることが臨床的に示唆されている。しかしその実態については明らかでない。整形外科領域で行われている組織形成術に仮骨延長術、すなわち牽引ストレスを用いて軟部組織を形成し延長するという方法があるが、仮骨延長術によって骨および軟部組織中の血管形成が促進されることが知られている。本法による血管形成促進により得られる臨床的有用性として、動脈硬化性あるいは血栓性の閉塞性血管障害の改善、難治性骨癒合不全の癒合促進、骨髄炎の治癒促進、遊離筋皮弁

B. 研究方法

実験動物は成犬ビーグル 8 匹（ 31 ± 8.3 月齢、 11.0 ± 0.9 kg：平均±標準偏差）を用いた。全身麻酔下に左脛骨にリング式創外固定器を装着後、腓骨を骨切除し脛骨を骨幹部で骨切りした。待機期間を 7 日間、延長速度を 12 時間毎に 0.5mm とし、

30日間延長した。60日間の骨成熟期間後、98日目に延長器を抜去し、標本を採取した。右脛骨は無処置でコントロールとした。

剖検直前に両側大腿動脈、左頸動脈にカニュレを留置し、末梢静脈よりヘパリン添加後に随時左頸動脈より脱血しながら両側大腿動脈より生食灌流した。生食灌流後に注入圧140mmHgで硫酸バリウムを注入してmicroangiographyを行った。

両下腿の腓腹筋(Gastrocnemius)、長趾伸筋(EDL)、前脛骨筋(TA)を採取し筋体積を測定後20%中性ホルマリン固定した。

各下腿筋を厚さ5mmにスライスした後に軟X線(SOFRON社ソフロン)を28kVp、240mAsの条件で撮影を行い、軟X線画像をスキャナーにてマトリクス1200dpi、ピクセル幅が0.021mmで取込んだ。これを画像解析ソフトPhotoshop 5.5(Adobe)で2階調化し、血管および筋肉全体のピクセル数を計測した。血管ピクセル数÷筋肉ピクセル数×100を血管密度とした。

2階調化した画像を1.7倍に拡大し、5mm×5mmで区切った格子を重ね、格子と交叉した血管数と測定領域内の格子数との比をangiographic scoreとした。angiographic scoreは縦方向と横方向に分けて算出した。

次に血管形成の評価を組織学的に行うため、各筋をパラフィン包埋後厚さ3μmに薄切して横断切片を作成し、HE染色を行った。筋腹中央部2.6mm×2.0mmの領域をAxio Vision(ZEISS)を用いて1300×1030pixelで取り込んだ。硫酸バリウムおよび血管内皮細胞の核を指標に血管を認識してLUZEX AP(NIRECO)を用いて領域内の血管数を求めた。コントロール群と延長群をWilcoxon検定を用いて比較し、有意水準を0.05未満とした。

C. 研究結果

血管密度は、腓腹筋、長趾伸筋、前脛骨筋ともに延長群が有意に高くなっていた。平均値では腓腹筋が1.34倍、長趾伸筋が1.44倍、前脛骨筋が1.43倍に増加していた(Fig.1)。

Angiographic scoreは、縦方向では、長趾伸筋、前脛骨筋で延長群が有意に高く、腓腹筋で延長群が高い傾向があった。平均値では腓腹筋が1.33倍、長趾伸筋が1.32倍、前脛骨筋が1.87倍に増加していた(Fig.2)。

一方、横方向のangiographic scoreは、各筋ともに差がなかった(Fig.3)。

組織学的評価では、領域内の血管数は、長趾伸筋で1.32倍、前脛骨筋で2.25倍に有意に増加、腓腹筋で1.19倍に増加していた(Fig.4)。

Fig. 1: Blood Vessel Density (*P<0.05, Wilcoxon test)

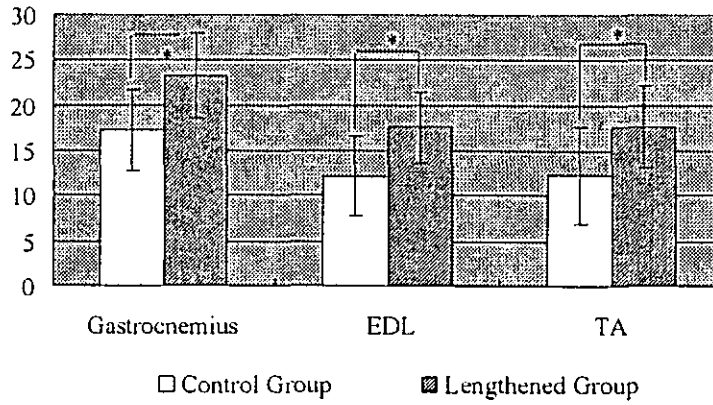


Fig. 2: Longitudinal Angiographic Score (*P<0.05, Wilcoxon test)

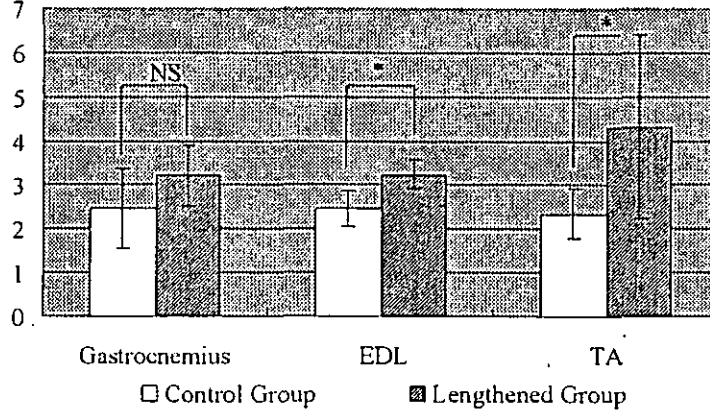


Fig. 3: Transverse Angiographic Score

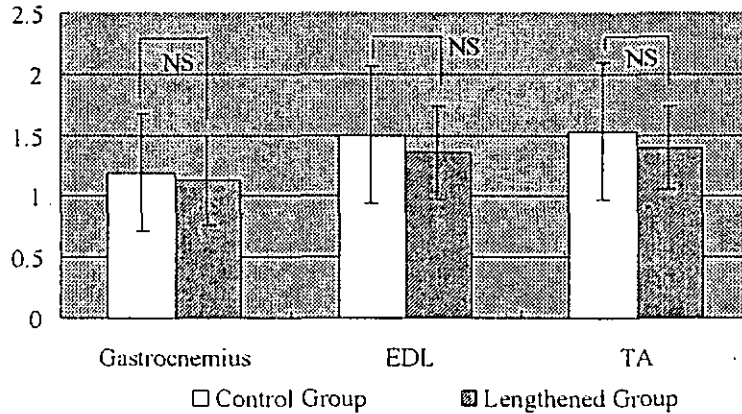
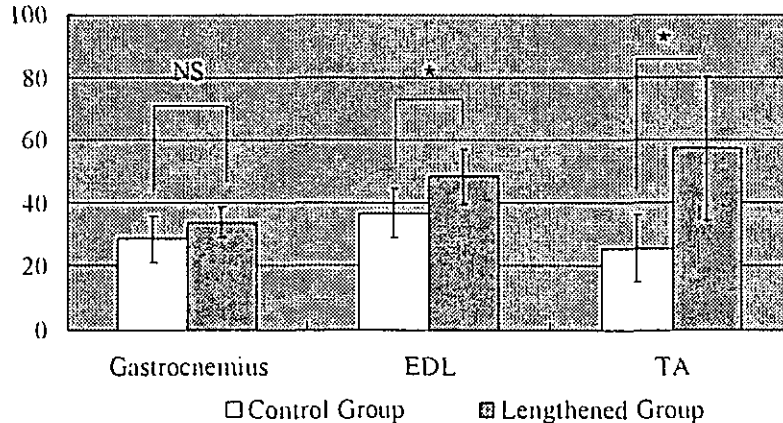


Fig. 4: Number of vessels per unit of test muscle volume (*P<0.05, Wilcoxon test)



D. 考察

ビーグル脛骨延長モデルで延長群の血管密度が1.34~1.44倍に増加した。方向別では縦方向、すなわち延長方向で血管密度が増加した。この結果は、牽引ストレスにより筋肉内に血管形成が起こること、牽引ストレスがかかる方向と血管形成の方向に相関性がある可能性を示唆している。血管形成を促進する増殖因子として vascular endothelial growth factor (VEGF)が注目され、VEGFを発現させたり投与することにより血管形成を促進させる方法が研究されてきているが、本法は物理的因子である牽引ストレスを用いて血管形成を促進する独創的な方法である。イリザロフ法は臨床に用いるか骨延長法であるが、牽引ストレスを持続的に作用させて仮骨形成を促す方法である。临床上では難治骨折の骨接合術、難治性の偽関節、大きな骨欠損の補填等に用いられ、良好な成績を収めている。また骨髄炎の治療にも有効であることが示されている。神経皮膚症候群1型に合併する先天性下腿偽関節症は骨接合に極めて難渋する。これは偽関節部が極めて骨形成環境が悪く、骨癒合機転が働かないことによる。イリザロフ法を用いることによって骨癒合率が大いに改善しており、イリザロフ法を用いる施設が増えた。これは本法が低侵襲であると同時に、旺盛な骨形成を促すことができることによる。特に牽引ストレスによる骨形成については仮骨延長と呼ばれ現在臨床に用いることのでき、唯一大量の骨欠損を補填できる方法となっている。牽引ストレスによって骨内および骨外の血管形成が本研究結果のように促進することがこの作用に大いに寄与している。本研究結果では、仮骨延長を行う骨周囲の筋内の血管形成を見たが、結果として、血管形成が促進していた。これは骨内の血管形成促進とあい

まって骨周囲から骨膜への血管進入を促し、骨膜形成を促進しひいては骨形成を促進することにつながる。本症にともなう先天性下腿偽関節症では偽関節部分の病変部位は通常5から6cmにわたる。現状ではこれを残して骨癒合機転を期待することは不可能である。外科的にこの部分を切除し、残った大きな骨欠損をイリザロフ法を用いた仮骨延長法によって補填した骨接合を行う。この方法は骨癒合率を飛躍的に高めた。背景には本研究で示した血管形成促進が有効に作用していると考えられる。

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

横延長モデルを用いた骨形成・血管新生の研究

分担研究者 中村耕三 東京大学大学院医学研究科整形外科教授

研究要旨

ビーグル脛骨延長モデルで牽引ストレスに伴う腓腹筋、長趾伸筋、前脛骨筋内の血管形成の定量評価を行った。骨軸方向の延長では、血管密度が各筋ともに延長群が有意に増加し、平均値では腓腹筋が 1.34 倍、長趾伸筋が 1.44 倍、前脛骨筋が 1.43 倍に増加していた。方向別では骨軸（延長）方向で血管密度が増加した。骨軸垂直方向の延長でも血管密度が各筋ともに延長群が有意に増加し腓腹筋が 1.23 倍、長趾伸筋が 1.27 倍、前脛骨筋が 1.42、足底筋で 1.24 になっていた。延長により周囲組織において血管形成が促されることが明らかとなった。

大西五三男、松山順太郎、今井一博、岡崎裕司、
佐藤和強

東京大学大学院医学研究科整形外科

A. 研究目的

先天性下腿偽関節の骨接合術にイリザロフ法が用いられ、良好な成績を得ている。しかし治療後にしばしば骨の横径の狭小化が残存し、再骨折や荷重歩行の制限を余儀なくされることがあり、骨の横幅を拡大する方法が望まれることがある。ビーグル犬の脛骨横延長モデルを作成し骨形成・骨内血管形成を観察することで骨形成の機序を検討し、横方向延長の臨床的応用の可能性を確かめた。

B. 研究方法

脛骨縦延長による血管新生の研究に引き続き脛骨の一部を骨軸に対し垂直方向に延長する横延長モデルを作成しこのモデルにおける骨新生・血管新生の研究を行った。横延長モデルにおける血管新生の定量的評価の報告はいまだ無い。今回の実験では慢性虚血モデルを作成しそれに対し横延長を行い、周囲組織の血管形成を定量評価し今後の血管閉塞性疾患への応用の可能性について探求した。

実験には、临床上健常な、体重 8.0～12.0(9.9 ± 1.0)kg、年齢 29～52(38.0 ± 7.6)ヵ月齢のビーグル成犬 9 頭を用いた。No. 1 から No. 7 の 7 頭を仮骨延長群とし、左脛骨に創外固定器および骨延長器を装着する手術を実施し、脛骨骨片を横延長した。No. 8 と No. 9 の 2 頭は、sham 群とし、同様

に手術を実施したが、脛骨骨片を延長しなかった。また、全頭において右脛骨を無処置のコントロール群とした。

創外固定器装着後、7 日間を待機期間、延長期間を 14 日間とし、さらに 28 日間の骨硬質化期間を設けた。延長期間中の骨延長速度は、1 回延長距離 0.5mm を 1 日 2 回とし、合計 1 日当たり 1mm を 14 日間行った。手術より 49 日目に全頭を検体に供した。骨形成は X 線写真、QCT、マイクロ CT および石灰化速度、組織所見で評価した。延長部の血管形成の評価としては剖検時にマイクロアンギオグラフィーを行い、それを軟 X 線撮影にて評価した。周囲軟部組織の血管形成の評価として延長肢、コントロール肢ともに前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋、足底筋を採材し固定した後に CT、軟 X 線、第Ⅷ因子を用いた免疫染色による筋肉内血管の定量評価ならびに H.E 染色による病理組織学的検討を行った。(以上の実験はすべて動物実験規約に従って行われた。)

C. 研究結果

14 日間の延長操作での仮骨延長距離は、最大値が 13.75mm、最小値が 11.69mm で平均値は 12.82mm であり全例において良好な骨形成が得られていた。骨塩密度の経時的変化では 21~35 日目の間に骨添加のピークが訪れリモデリングによる骨髄形成がすでに行われていることが予想できた。個体間差も少なく横延長では安定した速い石灰化が行われていた。延長領域部のスライス厚 64 μm で行った Micro-CT より構築した 3D 画像では周囲に骨形成を伴う延長方向へ牽引されている血管が観察された。骨量の配向を定量的に示す mean intercept length 法によりマイクロ CT 画像の骨

量を形態計測すると骨梁が延長方向に配列している成分が多いことが示された。

一週間おきに撮影した X 線写真にて経時的な仮骨形態を観察した。延長終了時点では X 線透過性を持つ interzone が延長中心領域に観察された。骨硬質化期間の 4 週目に入ると、interzone は消失し、さらに剖検前の 7 週目では延長領域の X 線透過性が高くなる傾向があり、骨硬化が示唆された。2 週ごとに行った Q-CT 撮影より延長仮骨を経時的に観察した。術後 3 週では、単純 X 線写真像と同様に中心領域に interzone が認められ、術後 5 週の骨硬質化期間に入るとその interzone の消失とともに、骨髄腔の形成とみられる X 線透過性領域が認められるようになった。また、7 週目では新たな骨皮質の形成がみられた。骨量ファントムとともに撮影した Q-CT により求められた延長仮骨中央部を関心領域とする延長 7 頭の平均 BMD の経時的推移を見ると、延長開始より BMD は急激に増加したが、骨硬質化期間ではゆっくりと BMD が減少した。術後 21 日目に投与したアリザリンと術後 42 日目に投与したテトラサイクリンの 2 標識間の石灰化速度は平均 2.1 $\mu\text{m}/\text{day}$ であった。これは犬の石灰化速度は成犬 1 日あたり約 0.75 μm という報告と比較するとより速い石灰化が観察されたことになる。

剖検時に腹大動脈より硫酸バリウムを注入してマイクロアンギオグラフィーをおこない摘出した脛骨を軟 X 線撮影し、骨髄血管の形態観察を行った。コントロールと比較すると、骨髄動脈は、血管径の拡大と、延長方向への変位および分岐血管の新生が認められた。

摘出脛骨の軟 X 線画像を画像解析ソフトにより白と黒の 2 階調化し、血管の全ピクセルを観察延長領域の全ピクセル数で除しこれを骨髄血管密度

とした。仮骨延長群は平均 11.7%、コントロール群は平均 3.5%であった。仮骨延長群はコントロール群に対し有意に高い値を示し、旺盛な血管新生が存在したことが示唆された。

組織標本にて延長領域の中心部を観察すると、中央部は線維性結合組織で満たされる interzone がみられ、これに向かい合うように micro column formation が存在した。その境界部には多数の細胞が配列しており Primary mineralizing front を形成していた。この組織構造は長軸方向延長の構造と同様であった。

軟 X 線による周囲筋の肉眼所見では前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋、足底筋すべてにおいて、延長肢は細い血管が一様に広く分布していた。コントロール肢では 1 本の太い血管が中心を走行し、そこより中程度の血管がまだらに分岐していた。血管密度は前脛骨筋ではコントロール肢で 17.35 ± 3.03%、延長肢で 20.7 ± 3.05%、長趾伸筋ではコントロール肢で 16.4 ± 1.88%、延長肢で 20.43 ± 3.34%、腓腹筋ではコントロール肢で 16.62 ± 3.09%、延長肢で 18.81 ± 3.71%、足底筋においてはコントロール肢で 18.08 ± 3.66%、延長肢で 20.41 ± 5.26%であった。コントロール肢に比較して延長肢の血管密度が有意に高い傾向を示した。

Sham Op 群においては、前脛骨筋ではコントロール肢で 21.15 ± 6.15%、実験肢で 19.43 ± 3.18%、長趾伸筋ではコントロール肢で 17.51 ± 5.86%、実験肢で 17.04 ± 1.75%、腓腹筋ではコントロール肢で 15.51 ± 1.41%、実験肢で 17.95 ± 5.59%、さらに足底筋ではコントロール肢で 18.06 ± 6.23%、実験肢で 20.04 ± 7.95%であった。また、直径 300 μ 以上の小動脈レベルでは延長肢とコントロール肢の間の血管密度に有意差は見られなかった。

筋組織標本における免疫染色をおこない染色さ

れた血管内皮細胞数から算出した血管密度では前脛骨筋でコントロール肢は 35.57 ± 5.64 (本/mm²)、延長肢は 50.43 ± 5.71 (本/mm²)、長趾伸筋ではコントロール肢で 32.26 ± 9.73 (本/mm²)、延長肢では 40.92 ± 10.01 (本/mm²)、腓腹筋はコントロール肢で 36.97 ± 12.23 (本/mm²)、延長肢で 45.62 ± 12.67 (本/mm²)、足底筋はコントロール肢で 32.91 ± 9.57 (本/mm²)、延長肢で 40.81 ± 7.92 (本/mm²) となり、前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋、足底筋の全てにおいてコントロール肢に比較して延長肢の血管密度が有意に (p=0.028) 大きかった。Sham Op 群では、前脛骨筋のコントロール肢は 34.94 ± 9.52 (本/mm²)、実験肢は 31.73 ± 4.08 (本/mm²)、長趾伸筋ではコントロール肢で 47.44 ± 1.81 (本/mm²)、実験肢では 52.56 ± 11.79 (本/mm²)、腓腹筋はコントロール肢で 63.78 ± 19.49 (本/mm²)、実験肢で 58.01 ± 23.12 (本/mm²)、足底筋はコントロール肢で 37.50 ± 14.05 (本/mm²)、実験肢で 30.38 ± 12.40 (本/mm²) となった。

D. 考察

横方向仮骨延長では骨形成が旺盛に起こることが示された。また牽引方向に骨梁が配向し、骨形成が牽引ストレスによって形成されることが示唆された。また骨形成の形態は長軸方向延長と同様であったが、石灰化速度は極めて速く、骨形成が促進していることが明らかとなった。これまでは横方向延長は臨床応用がきわめて限られており、有用性について評価できる段階に至っていない。しかしこの動物実験からは長軸方向延長と同等以上の骨形成を期待できることが示唆された。

コントロール肢に対する実験肢の筋内血管密度の比は延長群では、前脛骨筋で 1.42、長趾伸筋で 1.27、

腓腹筋で 1.23、足底筋で 1.24 であった。これに対し Sham Op 群では前脛骨筋で 0.91、長趾伸筋で 1.11、腓腹筋で 0.91、足底筋で 0.81 あった。延長群では各筋肉の平均で 1.22 倍の変化率を示し、Sham Op 群では 1.04 倍の変化率を示した。すなわち延長を行うことによって、コントロール肢に対しての実験肢の血管密度は延長群で優位に増加することが明らかとなった。横延長により細動脈・毛細血管レベルで血管新生おこりこれは牽引ストレスが直接かからない筋組織においても行われていた。仮骨周囲の軟部組織の血管形成が促進することは仮骨形成にとっても有用である。骨膜形成や骨膜性仮骨形成にとって有利な環境を形成できる。

実験を通じ、周囲組織の血管形成を定量的に評価したことで骨延長は周囲組織に対し明らかな血管新生作用を及ぼすことが確認できた。また、この作用は隣接筋のみでなく対側肢に対しても作用している可能性が見出されこれらのメカニズムの解明は今後の課題となった。

本方法は骨幅の少ない病態や、骨移動法が困難なきわめて大きな骨欠損の補填方法として臨床応用の可能性が指摘されてきた。しかし横方向の仮骨延長法は動物実験や臨床応用においてきわめて報告が少なく、骨形成の実態や臨床応用の可能性については不明であった。本研究ではまず動物実験を行い、骨形成、血管形成の状態を把握することを目的とした。この研究結果からは横方向延長は、長軸方向仮骨延長以上に骨形成が促進し、また血管形成も促進することが明らかとなった。骨幅の少ない症例に対して骨幅を増やすことや、大きな骨欠損に対する骨の分割横方向延長による骨欠損の補填が十分臨床応用可能と思われる。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

カフェ・オーレ斑、扁平母斑の glivec による治療のための基礎実験

研究協力者 占 部 和 敬 九州大学大学院医学研究院皮膚科助教授

研究要旨

カフェ・オーレ斑、扁平母斑に対するレーザー治療の効果は一様ではなく、再発が多く、治療に難渋する例が多い。当科でも試験照射 3 ヶ月後に再発している症例が多く、有効な治療法の開発を要する。我々は、慢性骨髄性白血病に適用のあるチロシンキナーゼ阻害剤である glivec（メシル酸イマチニブ）がメラノサイトの遊走、生存維持に必要な cKIT のチロシンキナーゼも阻害することに注目し、レーザー治療後に glivec を外用することにより、メラノサイトの再分配が阻害され、上記色素斑の治療成績が上がるかどうか検討する予定である。今回、ヒト新生児包皮表皮メラノサイト（NHEM）を用いて、glivec の *in vitro* での効果を検討した。その結果、培養系において SCF 50ng/ml の添加により、NHEM 細胞の増殖遊走が促進されたが、その遊走能は glivec 0.1, 1.0, 5.0 10 μ M を加えることにより、濃度依存的に抑制されること、また、ウエスタンブロットにて、glivec が NHEM 細胞の cKIT のリン酸を抑制していることが確認できた。これらの結果より今後の臨床応用が期待できる。

A. 研究目的

カフェ・オーレ斑、扁平母斑の治療法は確立したものがなく、現在レーザー治療を中心に脱色剤など他の治療法の組み合わせとかが検討されているが、無効のものも多い。glivec（メシル酸イマチニブ）は慢性骨髄性白血病に適応のある内服薬で、多くの患者に使用され安全性が確認されている薬である。本剤はチロシンキナーゼ阻害剤であり、慢性白血病細胞の bcr-abl チロシンキナーゼ阻害することにより、白血病細胞の増殖を抑制することにより効果をしますのであるが、そのほか

に PDGF 受容体および幹細胞因子（SCF）受容体である cKIT のチロシンキナーゼ活性をも阻害し、PDGF や SCF が介する細胞内シグナル伝達を阻害することが知られている。またメラノサイトが SCF の刺激によって cKIT 受容体を介して増殖、遊走することが知られている。今回我々は、glivec がメラノサイトの cKIT のチロシンキナーゼ活性化を阻害し、遊走を阻止できるのであれば、カフェ・オーレ斑、扁平母斑のレーザー治療後に本剤を使用することによって色素の再発を抑えることができるのではないかと考え、その基礎的実験を行なっ

た。

B. 方法

メラノサイト増殖に関しては NHEM 細胞 (ヒト新生児包皮表皮メラノサイト) を 1×10^4 ずつ 96 穴のプレートに播き、24 時間後に 10% FBS 入の HuMedia-KB 培地に変更、24 時間後に FCS、glivec を加え、24 時間後に MTT 法にて細胞の増殖能を検討した。メラノサイトの遊走能に関しては Boyden chamber 法によって検討した。8 μm の孔の開いている上のウェルを 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のフィブロネクチンでコートし、 5×10^5 の NHEM 細胞を播き、24 時間後に glivec を加え、さらに 12 時間後に下のウェルに 50ng/ml の SCF を加え、5 日後に上のウェルを通過した細胞数を測定した。cKIT のリン酸化能の阻害実験は、無血清培地で培養した NHEM 細胞に glivec を加え 100 分培養し、そこにさらに 50ng/ml の SCF を加え、15 分後に細胞を回収し、抗リン酸化 cKIT 抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。

C. 結果、D. 考察、E. 結論

細胞増殖に関しては NHEM 細胞は SCF を 10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml と加えると濃度依存的に増殖能の上昇がみられた。一方、glivec を 0.1 μM 、1.0 μM 、5.0 μM 、10 μM と加えても増殖能に関してコントロールと比べて差はなく、10 μM においても細胞毒性はないことが明らかとなった。また、50ng/ml の SCF をともに加えると、SCF によって蜂起された増殖能は glivec の濃度依存的に抑制された。次に glivec がメラノサイトの遊走を抑制するかどうかを検討した。Boyden chamber 法において上

のウェルに 0.1 μM 、1.0 μM 、5.0 μM 、10 μM の glivec を加えた 100 分後に走化因子として下のウェルに 50ng/ml の SCF を加え、上のウェルを通過した細胞数を測定した。その結果、glivec の濃度依存性にその遊走能は抑制された。さらに glivec が cKIT のリン酸化を抑えることによりキナーゼ活性を抑えているかどうかを確かめるために、glivec を 0.1 μM 、1.0 μM 、5.0 μM 、10 μM 加えた後に 50ng/ml の SCF を加え、細胞を回収し、抗リン酸化 cKIT 抗体を用いて解析した。その結果 glivec の添加によりリン酸かの抑制が認められた。これらのことより、10 μM の glivec は、メラノサイトに対して、増殖抑制をもたらすような毒性はなく、また cKIT 受容体のチロシンキナーゼ活性の抑制を介してメラノサイトの遊走能を抑制することがあきらかとなった。

今後の臨床応用が期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 発表

占部和敬、夏 建新、師井洋一、古江増隆. グリベックの NHEM 細胞における遊走抑制作用. 第 17 回日本色素学会年次学術大会 2003/11/29