

# IPH の病態形成における Fibulin-5 の関与

金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学  
中沼安二

共同研究者  
金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学  
佐藤保則、澤田星子

## 研究要旨

IPH では、病理組織学的に門脈周囲や末梢門脈域にエラスチンの沈着が高頻度にみられ、前類洞性の血管抵抗増加に深く関与しているが、このエラスチン沈着の機序は不明である。本研究では、生体内でのエラスチン生合成に必須の分子である fibulin-5 について、IPH 肝（15 症例）における発現を免疫組織化学的に検討し、対照症例群（ウイルス性肝炎/肝硬変12 症例、正常肝10 症例）との比較を行った。IPH では、約半数の症例で大型～中型の門脈壁に fibulin-5 の発現がみられ、一方、IPH の末梢門脈域における fibulin-5 の発現は全例で陰性であった。対照症例群における fibulin-5 の発現は、ウイルス性肝炎/肝硬変の 1 例でのみ大型～中型門脈壁に弱い発現があったが、これ以外は大型～中型門脈壁および末梢門脈域のいずれにおいても fibulin-5 の発現はなかった。以上より、IPH では肝内大型～中型門脈壁における fibulin-5 の発現亢進があり、これが血管壁の硬化と門脈圧亢進に深く関与している可能性が示された。

## はじめに

IPH は原因不明の非硬変性門脈圧亢進症であり、門脈域線維化と肝内小型門脈枝の狭小化による肝内門脈血管抵抗の増加がその病態形成の主体をなす<sup>1</sup>。病理組織学的に、IPH 肝では末梢門脈域や門脈周囲にエラスチンの沈着が高頻度にみられ、前類洞性の血管抵抗増加に深く関与していると思われる。しかし、現在まで IPH 肝におけるエラスチン沈着の機序は不明である。

近年、生体内でのエラスチン生合成に不可欠な分子として fibulin-5 が同定された<sup>2,3</sup>。Fibulin-5 は、エラスチンの主要な構成成分である fibrillin-1 と相互に作用し、弾性線維の形成を促進させることが報告されている<sup>4</sup>。

本研究では、IPH 肝における fibulin-5 ならびに

fibrillin-1 の発現を免疫組織化学的に検討し、IPH におけるエラスチン沈着の機序を明らかにすることを目的とした。

## 対象と方法

IPH（15 症例）の肝臓・ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。対照疾患としてウイルス性肝炎/肝硬変を 12 症例（HCV 陽性 11 例、HBV 陽性 1 例）、組織学的正常肝を 10 症例用いた。各症例群の詳細を表 1 に示す。各症例につき EVG 染色、ならびに fibulin-5 と fibrillin-1 に対する 1 次抗体を用いた Dako・EnVision 法による免疫染色を行った。Fibulin-5 と fibrillin-1 の免疫染色結果の評価は、大型～中型門脈壁および末梢門脈域における DAB の発色強度を各々 3 段階（2+、1+、-）で評価した。統計学的検討は Mann-Whitney's U test で行った。

表1 検討した症例の詳細

	n	(外科材料：剖検例)	年 齢	脾重量 (g) (剖検例)
IPH	15	(0 : 15)	60 ± 19	438 ± 194
ウイルス性肝炎/肝硬変	12	(7 : 5)	64 ± 10	429 ± 186
組織学的正常肝	10	(5 : 5)	62 ± 14	151 ± 50

## 結 果

EVG 染色による IPH の代表的な肝組織像を図 1 に示す。正常肝では大型の門脈周囲、あるいは末梢の門脈域にエラスチンの沈着は目立たなかったが、IPH では肝内外の主要な門脈の壁は硬化し、内膜の不規則な肥厚や門脈壁へのエラスチン沈着がしばしばみられ (図 1 A)、末梢門脈域ではエラスチン沈着を伴って、門脈枝が潰れた低形成性の門脈域が肝内に不規則に分布していた (図 1 B)。ウイルス性肝炎/肝硬変でも門脈域や線維性結合織内に種々

の程度にエラスチン沈着があったが、IPH のような特徴的な組織像はほとんどみられなかった。

Fibulin-5 の発現は、IPH の約半数の症例の大型～中型の門脈壁に認められた (図 2 A)。EVG 染色と比較すると fibulin-5 の発現はエラスチンの局在とよく一致していた (図 2 B)。一方、IPH の末梢門脈域における fibulin-5 の発現は検討した IPH 15 症例、全例で認められなかった (図 3)。対照群であるウイルス性肝炎/肝硬変および正常肝では、ウイルス性肝炎/肝硬変の 1 例でのみ大型～中型門脈

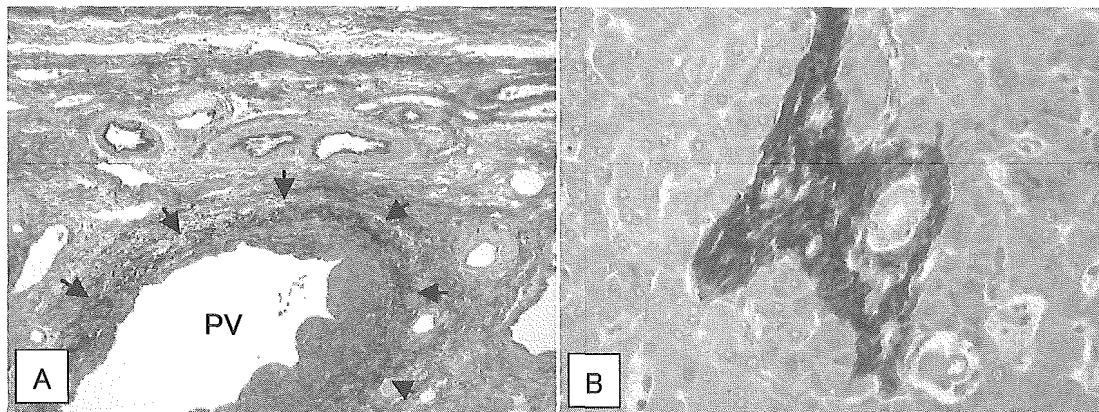


図 1 IPH の肝組織像。A. 肝門部大型門脈。内膜の不規則な肥厚と門脈壁へのエラスチンの沈着をみる (矢印)。B. 末梢門脈域。エラスチン沈着と門脈枝の潰れを伴う低形成性の門脈域。PV、portal vein。EVG 染色。

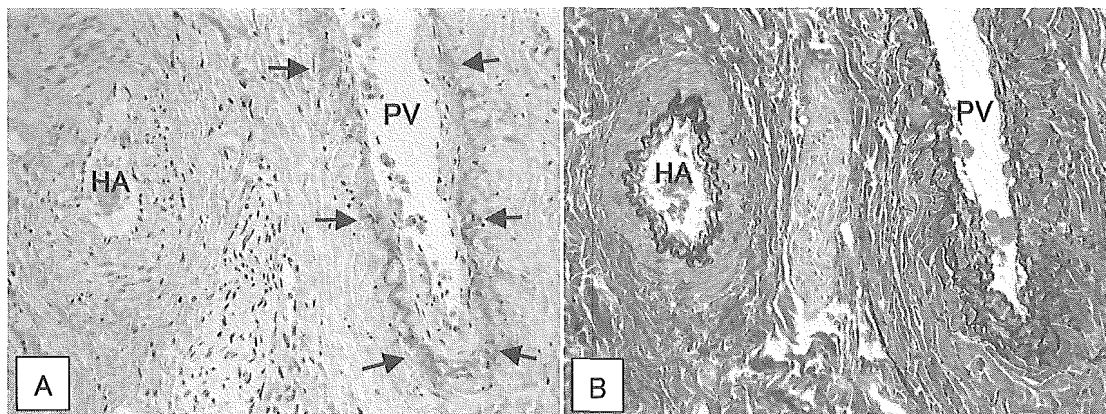


図 2 IPH 肝での fibulin-5 の免疫染色。中型門脈壁が fibulin-5 陽性である (A、矢印)。Fibulin-5 の局在は EVG 染色 (B) によるエラスチンの局在と一致している。HA、hepatic artery。PV、portal vein。

壁に fibulin-5 の弱い発現があったが、その他の症例は肝門部、末梢門脈域ともにすべての症例で陰性であった。

IPH 肝における fibrillin-1 の発現は、大型～中型門脈周囲においてエラスチンの局在とは無関係に、線維性結合織にびまん性にみられた (図 4 A)。しかし、他の IPH 症例では全く染色されない例もあり (図 4 B)、症例によって染色性に大きな違いがあった。IPH の末梢門脈域も同様、線維性結合織に fibrillin-1 の陽性所見がみられる症例とみられない症例とがあり、症例間での違いが目立った。対照群であるウイルス性肝炎/肝硬変および正常肝でも同様の結果であった。

以上の免疫染色の評価結果を表 2 にまとめた。大型～中型門脈壁における fibulin-5 の発現については、IPH およびウイルス性肝炎/肝硬変、正常肝との間に統計学的に有意な差があった。Fibrillin-1 に関し

ては、検討した 3 つの症例群、いずれにおいても症例による発現の差が大きく、統計学的有意差もなかった。

なお、データは示していないが、IPH 肝での fibulin-5 と fibrillin-1 の 2 重染色にて、fibulin-5 の発現のある門脈壁には fibrillin-1 も発現していることを確認した。

## 考 察

生体内において、エラスチンは以下の機序により生合成される<sup>5</sup>。すなわち、エラスチン前駆蛋白質であるトロポエラスチンが細胞外に分泌され、分泌されたトロポエラスチンは細胞表面に存在するマイクロフィブリルに沿って規則的に配列する。次いでトロポエラスチンが集合配列 (assembly) し、さらに架橋形成が生じ、エラスチンが形成される。こ

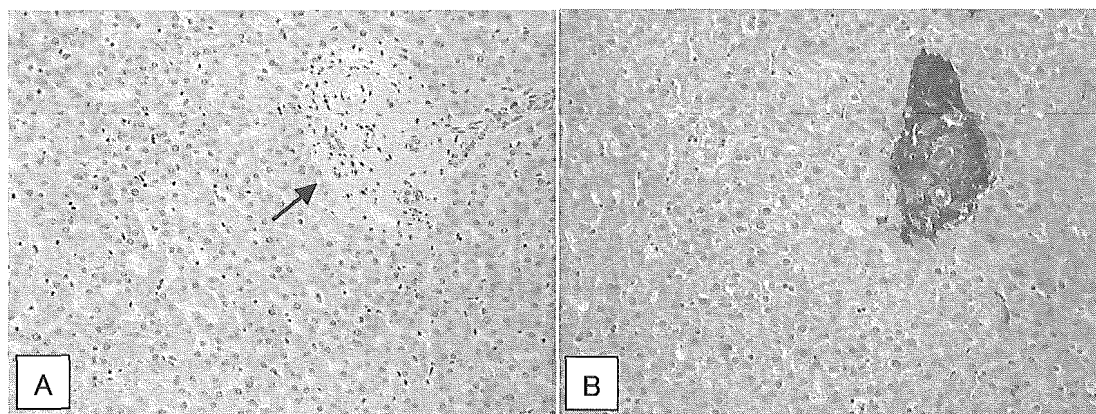


図 3 IPH 肝での fibulin-5 の免疫染色。末梢門脈域 (矢印) に fibulin-5 の陽性所見はみられない。A、fibulin-5 免疫染色。B、EVG 染色。

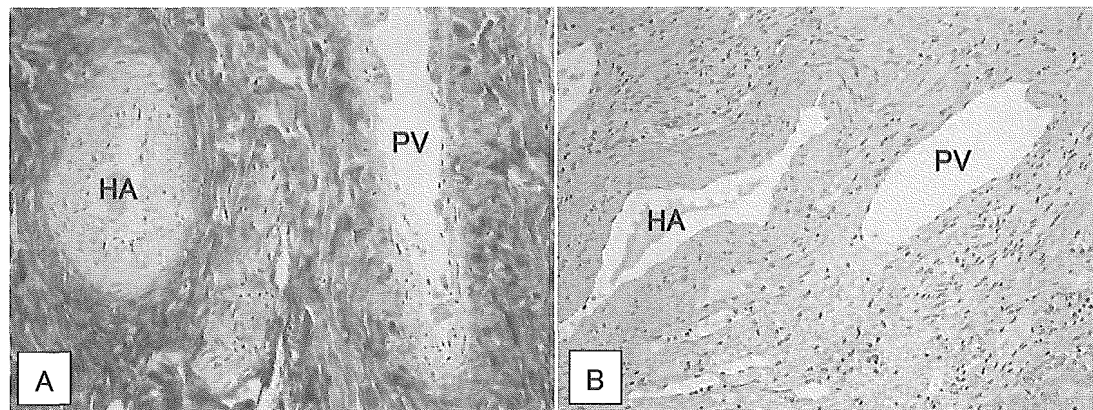


図 4 IPH 肝での fibrillin-1 の免疫染色。線維性結合織がびまん性に陽性となる症例 (A) と陰性の症例 (B) とがあり症例間での差が著しい。HA、hepatic artery。PV、portal vein。

表2 組織学的評価結果

	n	大型～中型門脈			末梢門脈域		
		2+	1+	-	2+	1+	-
Fibulin-5							
IPH	15	2	6	7	0	0	15
ウイルス性肝炎/肝硬変	12	0	1	11	0	0	12
組織学的正常肝	10	0	0	10	0	0	10
Fibrillin-1							
IPH	15	4	5	6	0	2	13
ウイルス性肝炎/肝硬変	12	6	5	1	2	2	8
組織学的正常肝	10	4	5	1	2	3	5

\*,  $p < 0.05$

うして形成されたエラスチンは、弾性線維の90%以上を占める主要な弾性線維の構成成分となる。

マイクロフィブリルはいくつかの糖蛋白からなる酸性糖蛋白質複合体であり、fibrillin-1はマイクロフィブリルの主要な構成蛋白の一つである<sup>5</sup>。また、fibulin-5はトロポエラスチンに結合して存在しており、fibrillin-1と相互作用することで、トロポエラスチンの集合配列 (assembly) に関与しているとされる<sup>4</sup>。

今回の検討結果から、IPH では大型～中型門脈における fibulin-5の発現亢進があり、これが血管壁へのエラスチン沈着を促進し、血管壁を硬化させ、門脈圧亢進を増悪させる機序が考えられた。Fibulin-5 発現亢進の原因については、IPH 固有の1次的な変化である可能性、あるいはIPH でみられる門脈本幹～主要分枝の拡張と門脈血流量増加に伴った、2次的な変化である可能性もある。一方、IPH の末梢門脈域線維化、小型門脈枝の狭小化における fibulin-5の関与は低いと思われた。

Fibrillin-1に関しては、fibulin-5との2重染色で共発現がみられたことから、fibulin-5とともに相互作用することで、IPH の大型～中型門脈壁へのエラスチン沈着に関与している可能性があるが、対照群との比較から、IPH の病態形成に積極的に関与している可能性は低いと考えられた。

## 結 語

IPH では、肝内大型～中型門脈壁における fibulin-5の発現亢進があり、それにより血管壁へのエラスチン沈着が促進することで、血管壁の硬化と門脈圧亢進に関与していることが示唆される。また、IPH の大型～中型門脈壁と末梢門脈域でのエラスチン沈着の機序は異なる可能性がある。

## 文 献

1. Nakanuma Y, Tsuneyama K, Ohbu M et al. Pathology and pathogenesis of idiopathic portal hypertension with an emphasis on the liver. *Pathol Res Pract* 2001, 197:65-76
2. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y et al. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* 2002, 415:171-175
3. Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC et al. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fiber development in vivo. *Nature* 2002, 415:168-171
4. Freeman LJ, Lomas A, Hodson N et al. Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils. *Biochem J* 2005, 388:1-5
5. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibers. *J Cell Sci* 2002, 115:2817-2828

[病因・病態]

# メタボローム解析技術による門脈血行病態での代謝マーカー解析

慶應義塾大学医学部医化学教室

末松 誠

共同研究者

慶應義塾大学先端生命科学研究所

曾我朋義

## 研究要旨

肝臓内機能的な最小基本単位を成す肝小葉は、肝内微小循環動態に基づいて領域特異的な酵素発現パターン (zonation) を示す。小葉内微小循環動態破綻を伴う門脈血行異常症では、臓器レベルでの適応結果として肝臓の種々の代謝活性を劇的に変化させるが、複雑に絡み合った代謝系が臓器として如何に変動するかはあまり知られていない。そこで本研究では、病態時に誘導される肝臓内代謝リモデリングを明らかにするために、肝臓内代謝変動を網羅的に全代謝産物 (メタボローム) 解析する実験系の確立とその有用性について肝再生モデルを用いて検討を行った。代謝活性変動を明らかにするために、メタノール・クロロホルム抽出により肝臓から分子量 5 kDa 以下の分画を採取し、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) にかき 34 種の陰イオン、56 種の陽イオンおよび 31 種のヌクレオチドを測定した。再生肝では肝臓内アミノ酸含有量が著明に増加し、それに伴い尿素回路および糖新生経路の活性化が認められた。一方、解糖系およびペントースリン酸回路は肝再生過程では抑制されることが明らかになった。これらの結果より、CE-MS を用いたメタボローム解析は大部分の肝臓内代謝活性変動を捉えることのできる有効な方法であると考えられた。また、肝再生過程においては血糖維持のためにタンパク質分解による糖新生経路の活性化が起きていることが確認できた。

## A. 研究目的

門脈血行異常症をはじめとする肝疾患では、肝小葉内微小循環動態の劇的な変化により生命機能維持に重要な肝臓が有する多種多様な代謝活性の代償性変動、つまり代謝のリモデリングが生じる。しかし、門脈血行異常症を呈する病態は一様でないため、肝小葉内に機能的にかつ不均一に分布する代謝関連酵素活性変化を画一的に議論することは出来ず、病態を反映する代謝マーカーの検索は門脈血行異常症の理解には重要な課題であると考えられる。また、病態依存性の肝臓内代謝変動を包括的に理解するため

には、従来の DNA 塩基配列の網羅的解析 (ゲノム解析) やタンパク質の網羅的解析 (プロテオーム解析) のみならず、時々刻々と劇的に変化する細胞内代謝物質の網羅的解析 (メタボローム解析) を行い理解することも非常に重要であると考えられる。そこで我々は、臓器や血清の低分子代謝物を数種類のセットアップで網羅的に探索できる新規技術である Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS) を用いたメタボローム解析法を用いて、肝臓内代謝産物を網羅的に測定することを試みた。また、その有用性を検討するために、マウス部分肝切除術モデルを用いた。

## B. 研究方法

8-12週齢の C57/BL6 雄性マウスを使用した。実験当日まで食事および飲水は自由に行わせ、全ての処置を午前中に行った。肝再生過程における代謝変動を解析するために、エーテル麻酔下にて Higgins と Anderson らが確立した方法に準じて70%部分肝切除術 (PH) を試行した。全ての肝臓は頸椎脱臼により屠殺後速やかに採取し-80℃に保存した。肝臓凍結組織300mg を、内部標準物質として終濃度300 $\mu$ M の2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) および L-methionine sulfone を含む 1 ml のメタノール溶液中でホモジナイズを行った。そこに0.5ml の滅菌蒸留水を加えた後、激しく混和した。この懸濁溶液0.3ml を新しいチューブに分け、0.2ml のクロロホルムを加えさらに激しく混和した。次に4℃下で15,000回転15分間遠心後上清を採取し、これをさらに分子量 5 kDa 以下を分離できるフィルター付き遠心管 (Ultrafree-CL; Amicon) を用いて遠心を行い、5 kDa 以下の分画を採取した。採取した検体は測定まで-80℃に保存した。測定前に採取した5 kDa 以下の分画50 $\mu$ l を冷却機能付き真空遠心機にて液相を蒸発させた後ペレットを再度蒸留水50 $\mu$ l に懸濁した。これを Agilent Technologies 社の CE-MSD システムにかけ測定を行った。本システムでは、陽イオンおよびヌクレオチドはフューズドシリカキャピラリーを用いて、陰イオンは SMILE(+)キャピラリーを用いて測定を行った。測定結果を Agilent Technologies 社のケミステーションを用いて解析した。

倫理的配慮：実験動物に関しては、実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

## C. 研究結果及び考察

肝臓には分子量1000以下の代謝物が少なくとも1000以上存在し、これらには既知のものばかりでなく構造解析の必要な未知化合物も存在することが知られている。本実験では CE-MSD システムを用い

て、現在までに標準物質として利用できる34種の陰イオン、56種の陽イオンおよび31種のヌクレオチドの測定を試みた。陰イオン低分子化合物は主に、解糖系、TCA 回路およびペントースリン酸回路の代謝産物を、陽イオン化合物はアミノ酸代謝産物を、ヌクレオチドは ATP、CoA 体をはじめとする代謝産物が含まれている。しかし、親水性の低い脂質代謝産物は本方法ではほとんどイオン化されないため測定が不可能である。また、測定感度は解析上 nM オーダーまで可能と考えられた。

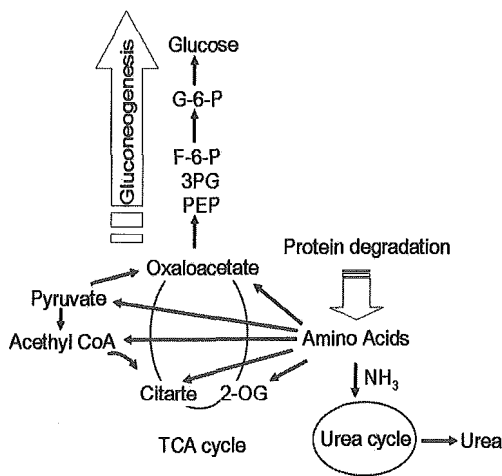
	Pre PH	PH at 72hr	
Glycolysis & Gluconeogenesis	G-6-P	22.1 ( $\mu$ M)	13.1 ↓
	F-6-P	6.7	3.2 ↓
	F-1,6-BP	0.5	0.3 ~
	3PG	18.4	36.3 ↑
	PEP	12.6	20.7 ↑
	Lactate	561.7	574.5 ~
	F-2,6-BP	3.4	N.D. ↓
TCA cycle	Acetyl CoA	0.5	N.D. ↓
	Citrate	18.5	30.2 ↑
	Succinate	6.6	13.0 ↑
	2-OG	22.6	48.9 ↑
Urea cycle	Ornithine	33.8	55.6 ↑
	Citrulline	16.1	37.7 ↑
	NAG	6.4	16.2 ↑
Glycogenesis	G-1-P	4.9	1.4 ↓
	Ser	51.1	94.7 ↑
PMS	Pro	16.7	55.6 ↑
	Gly	373.8	718.5 ↑
	Thr	13.9	42.6 ↑
	Glu	345.8	581.8 ↑
	6PG	1.7	0.7 ↓
	NADPH	3.7	1.3 ↓
	ATP	213.5	111.9 ↓

部分肝切除後の肝臓内代謝産物変動

PH 施行後3日目には、表に示したように解糖系のフルクトース6リン酸に至るまでの代謝産物の低下と解糖系に対する正のアロステリック因子であるフルクトース2、6ビスリン酸の低下が認められた。この結果は、再生肝では解糖系反応の抑制が起きていること示唆している。これに合致するように、糖新生系中間代謝産物であるホスホエノールピルビン酸と3ホスホグリセリン酸の増加が認められ、再生肝において逆に糖新生が亢進している可能性が示された。一方、グルコース6リン酸から分岐するグリコーゲン代謝経路およびペントースリン酸経路の中間代謝産物は低下する傾向が認められ、この2つの経路の活性が抑制されていることが示された。アミ

ノ酸代謝については、解析した幾つかの肝臓内アミノ酸含有量の上昇が認められ、これに伴い尿素回路の中間代謝産物およびその正のアロステリック因子である N-アセチルグルタミン酸の増加が認められた。これらの代謝変動は再生肝においてタンパク質の分解が亢進していることを示唆していると考えられた。

実際、アミノ酸の炭素骨格部分は TCA 回路の中間代謝産物へと変換され、グルコース産生へと繋がる糖新生経路へ供給されていることが、再生肝におけるアセチル CoA と細胞内 ATP の減少を伴った TCA 回路中間代謝産物の増加と合致している。



メタボローム解析に基づいた再生肝における代謝変動の流れ

以上の結果より、再生肝では血糖維持のために体内タンパク質の分解によるアミノ酸の異化を促進させることで糖新生基質の供給を行い、肝臓においてグルコースへと変換する代謝リモデリングが起きていることが示された。また、今回利用した網羅的メタボローム解析技術は時々刻々に劇的に変化する組織内代謝動態を正確に理解するツールとして非常に有用であることが明らかになった。今後、門脈血行異常症の病態を反映する代謝マーカーの検索を行い、病態形成に深く関与する代謝変動に対する新規治療法の開発に繋がる研究展開を目指している。

#### D. 健康危険情報

特になし

#### E. 研究発表

- 1) Soga, T., Baren, R., Suematsu, M., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakuragawa, T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert M, Nishioka, T., Tomita, M. Differential metabolomics mined ophthalmate as an oxidative stress biomarker indicating glutathione consumption. J. Biol. Chem. In review.
- 2) Fujii, K., Sakuragawa, T., Kashiba, M., Sugiura, Y., Maruyama, K., Goda, N., Nimura, Y., Suematsu, M. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver. Antioxid Redox Signal. 7(5-6), 788-794, 2005.
- 3) Tian, J., Bryk, R., Itoh, M., Suematsu, M., Nathan, C. Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a-ketoglutarate decarboxylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 10670-10675, 2005.
- 4) Suematsu, M., Tsukada, K., Tajima, T., Yamamoto, T., Ochiai, D., Watanabe, H., Yoshimura, Y., Goda, N. Carbon monoxide as a guardian against hepatobiliary dysfunction. Alcohol Clin Exp Res 29(11), 134S-139S, 2005.
- 5) Suganuma, K., Tsukada, K., Tsuneshige, A., Kashiba, M., Yonetani, T., Suematsu, M. T-state stabilization of hemoglobin allostery by nitric oxide: a protection against post-ischemic hepatobiliary dysfunction. Antioxid. Redox Signaling. 2006 in press.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし



# CTGF 組み換えアデノウイルス感染ラットにおける肝病変の検討

大阪市立大学大学院医学研究科核医学

塩見 進

共同研究者

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆臓病態内科学

森川浩安、田守昭博、羽生大記

兵庫医科大学内科学肝胆臓科

西口修平

## 研究要旨

IPH の動物モデル作成を検討するため、connective tissue growth factor (CTGF) 遺伝子の肝臓へ及ぼす影響を検討した。方法は Adenovirus Expression Vector Kit (Takara Biochemical) を用いて、human CTGF の cDNA をコスミドベクターの E1 領域に導入することにより CTGF 組み換えアデノウイルス (adeno-CTGF) を作成した。7 週齢 Wister 系雄性ラットに adeno-CTGF および大腸菌の  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入したコントロール用アデノウイルスベクターを静注し、経時的に肝組織の CTGF 遺伝子の発現を検討した。CTGF は投与 3 日目に肝に発現していたが 7 日目、14 日目には認められず、肝での発現は一過性であった。さらに adeno-CTGF 単独および TGF- $\beta$ 、thiacetamide (TAA) との併用効果を検討したが、いずれの場合も肝組織の変化は軽度であった。その原因として CTGF の肝臓での発現が一過性であることが考えられた。今後、動物モデルの作成には CTGF 遺伝子組み換えアデノウイルスを繰り返し投与する必要があると考えられた。

## はじめに

本班会議において運営されている検体保存センター<sup>1)</sup>にて保存されている特発性門脈圧亢進症 (IPH) の検体を用いて、Altas cDNA micro alley 法により IPH 肝に特異的に発現する数種類の遺伝子群をピックアップし、その中で特に connective tissue growth factor (CTGF) に注目し検討を行ってきた。その結果、IPH 症例では ELISA 法にて測定した CTGF 値は健常人や C 型慢性肝疾患患者に比べ異常高値を示す症例が存在し、それら症例では CTGF が病態と関連している可能性がある。<sup>2)</sup> さらに、

IPH の肝組織中の in-situ hybridization を用いた mRNA レベルの発現の検討では、IPH の特異的病変である門脈線維化の周辺にシグナルが認められた。<sup>3)</sup> この CTGF の機能解析のため、CTGF 遺伝子組み換えアデノウイルスを用い、肝臓に CTGF を発現させることにより惹起される肝組織の変化を検討した。

## 対象および方法

アデノウイルスへの遺伝子導入は Adenovirus Expression Vector Kit (Takara Biochemical) を用いて行った。human CTGF の mRNA から

cDNA を作製し、コスミドベクターの E1 領域に導入する。E1 領域を制限酵素で切断し欠失させたアデノウイルスのゲノム DNA (DNA-TPC) とこのコスミドベクターを E1 を恒常的に発現している 293 細胞に co-transfection により導入する。293 細胞内で相同組み換えが起こり、組換えアデノウイルスが出現する。これを調整、増殖させ動物に感染させることにより、目的の臓器に CTGF を発現させることができる。

動物として 7 週齢 SPF/VAF 雄性ラット (Wistar 系) を使用した。投与方法としてアデノウイルスベクター単独での効果を調べるため、CTGF 組み換えアデノウイルスベクター (adeno-CTGF) および大腸菌の  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入したコントロール用アデノウイルスベクター (adeno-LacZ) を使用した。さらに TGF- $\beta$  および thiacetamide (TAA) との併用効果を調べるため TGF-b+adeno-CTGF、TGF- $\beta$ +adeno-LacZ、TAA+adeno-CTGF、TAA+adeno-LacZ の組み合わせにより検討した (図 1)。CTGF 遺伝子の発現確認をするためラット肝から totalRNA を抽出し、逆転写にて cDNA を作成した。これを PCR 反応にて増幅し、電気泳動にて発現確認をした。Primer F として 5'-CCT GAC GGC GAG GTC ATG-3'、Primer R として 5'-CAT GCC ATG TCT CCG TAC-3' を用いた。

## 結 果

アデノウイルスの毒性を調べるため投与 3 日後の血清中 AST 値、ALT 値を測定した。AST 値は PBS 群  $73.1 \pm 12.7$  IU/L、adeno-LacZ 群  $76.3 \pm 20.2$  IU/L、adeno-CTGF 群  $77.5 \pm 15.1$  IU/L であり 3 群間に有意差を認めなかった。ALT 値は PBS 群  $19.6 \pm 3.8$  IU/L、adeno-LacZ 群  $19.1 \pm 5.3$  IU/L、adeno-CTGF 群  $20.5 \pm 4.8$  IU/L であり 3 群間に有意差を認めなかった。ラット肝からの cDNA を PCR 反応にて増幅し、CTGF の肝臓での発現を調べた。adeno-CTGF 投与 3 日目の肝臓には CTGF を示す 120bp の band を認めたが、7 日目、14 日目および adeno-LacZ 投与 3 日目の肝臓では認めなかった (図 2)。肝組織に関しては adeno-CTGF 単独投与 3 日目、7 日目は著変を認めなかった (図 3)。同様に adeno-CTGF+TGF-b 投与 7 日目、adeno-LacZ+TGF-b 7 日目 (図 4)、adeno-CTGF+TAA 投与 7 日目、adeno-LacZ+TAA 投与 7 日目 (図 5) の

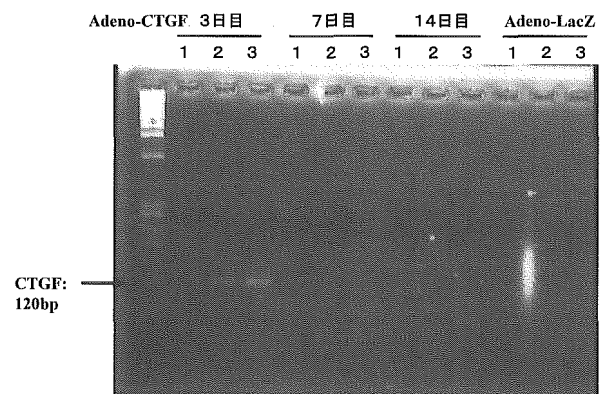


図 2 肝臓での CTGF 遺伝子の発現

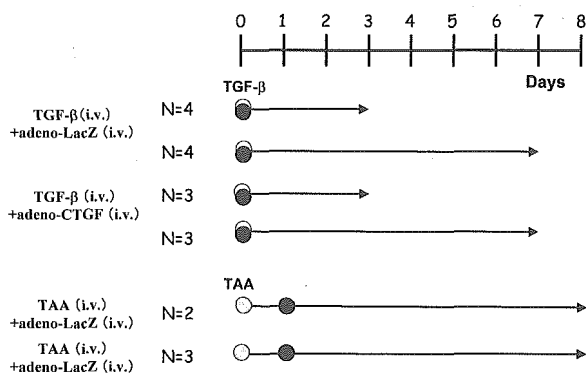


図 1 アデノウイルスベクターと TGF- $\beta$ 、TAA 併用群の投与方法

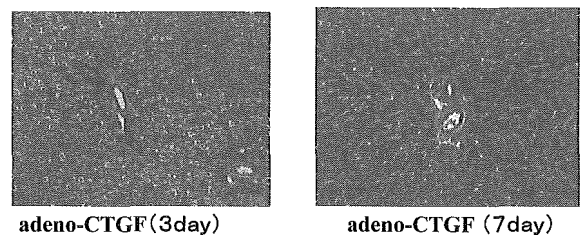
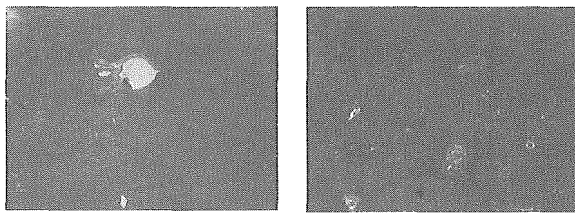
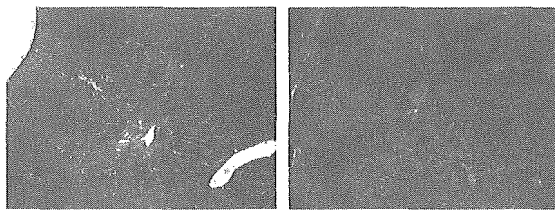


図 3 Adeno-CTGF 単独投与 3 日目および 7 日目の肝臓の組織像



TGF- $\beta$  + adno-LacZ      TGF- $\beta$  + adeno-CTGF

図4 Adno-CTGF+TGF- $\beta$  投与7日目および adeno-LacZ+TGF- $\beta$  投与7日目の肝臓の組織像



TAA+adeno-LaZ      TAA+adeno-CTGF

図5 Adeno-CTGF+TAA 投与7日目および adeno-LacZ+TAA 投与7日目の肝臓の組織像

肝組織についていずれも著変を認めなかった。

## 考 察

CTGFは様々な線維化という病態を持ちうる疾患に関して、主にノーザンやウエスタンブロッティングにより報告されてきた。肝疾患に関して、胆道閉鎖症、<sup>4)</sup>慢性肝炎、<sup>5)</sup>non-alcoholic steatohepatitis (NASH)<sup>6)</sup>などにおいて肝組織中にCTGF-mRNAの発現が報告されている。また、強皮症では通常の線維化の課程で発現するCTGFとは違い、オートクラインループがかかることが示唆されており、<sup>7)</sup>血清中にCTGFが過剰発現しているIPH症例においても同じことが起きている可能性がある。CTGFの線維化における機能解析を進めるにはトランスジェニックマウスの作成が必要となる。しかし、胚移植によるトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成は発育・継代が困難であるため、アデノウイルスを用いた遺伝子導入法を検討した。アデノウイルスは主として肝臓や神経系に集まるため組み換えアデノウイルスを用いれば目的のタンパクを肝

臓に発現させることが可能である。

今回の成績では投与3日目に肝臓にCTGFの発現を認めたが、7日目、14日目では認めなかった。さらに、アデノウイルスを用いる場合の問題点としてウイルスの毒性の問題がある。今回CTGFが発現している投与3日目のCTGF遺伝子導入アデノウイルス投与群、コントロール用アデノウイルス投与群、PBS投与群はいずれも血清中のAST、ALT値に有意差を認めなかった。このことよりアデノウイルスが肝臓に発現することによる直接の肝毒性はないものと思われた。しかし、肝病変の検討においてadeno-CTGF単独群、adeno-CTGFとTGF- $\beta$ 併用群、adeno-CTGFとTAA併用群すべてにおいて肝組織に有意な変化を認めなかった。その原因としてCTGFの肝臓での発現が一過性であることが考えられた。今後、CTGFの肝臓に対する検討や動物モデルの作成にはCTGF遺伝子組み換えアデノウイルスを繰り返し投与する必要があると考えられた。

CTGF組み換えアデノウイルスを作成をラットに静注し、経時的に肝組織の検討を行った。CTGFは投与3日目に肝に発現していたが一過性であった。CTGF組み換えアデノウイルス単独およびTGF- $\beta$ 、thiacetamide (TAA)との併用効果を検討したが、いずれの場合も肝組織の変化は軽度であった。その原因としてCTGFの肝臓での発現が一過性であることが考えられた。

## 文 献

- 1) 黒木哲夫、塩見 進、森川浩安ほか：門脈血行異常症検体保存センター構想。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告書1998：82-83.
- 2) 塩見 進、森川浩安、西口修平ほか：特発性門脈圧亢進症の遺伝子異常に関する研究。厚生省特定疾患門脈血行異常症調査研究班平成11年度研究報告書2000：17-19.
- 3) 塩見 進、森川浩安、西口修平ほか：特発性門脈圧亢進症の遺伝子に関する研究。厚生省特定

疾患門脈血行異常症調査研究班平成12年度研究報告書2001：20-22.

- 4) Tamatani T, Kobayashi H, Tezuka K, et al. Establishment of the enzyme linked immunosorbent assay for connective tissue growth factor (CTGF) and its detection in the sera of biliary atresia. *BBRC* 1998; 251: 748-796.
- 5) Paradis V, Dargere D, Vidaud M, et al. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999, 30: 968-976.
- 6) Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, et al. High glucose and hyper insulinemia stimulate connective tissue growth factor expression; a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34: 738-744.
- 7) Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 149-154.

# 門脈血栓症に認められたプロテインS欠損症の分子病態解析

名古屋大学医学部保健学科

小嶋哲人

共同研究者

名古屋大学医学部保健学科

高木 明、村手 隆

名古屋大学大学院医学研究科

岩崎年宏、勝見 章、松下 正

名古屋大学医学部附属病院輸血部

山本晃士、高松純樹

## 研究要旨

門脈血栓症の発症要因の一つに、まれではあるがアンチトロンビン欠損症など血栓性素因の関与が指摘されている。今回我々は、門脈血栓症を発症して凝血学的検査の結果プロテインS欠損症が強く疑われた症例を経験し、PS $\alpha$  遺伝子解析を含めてその病因・病態の解明を試みた。解析の結果、プロテインS $\alpha$  遺伝子の蛋白翻訳領域には病因と思われる遺伝子変異は見つからなかったが、プロテインS $\alpha$  遺伝子のプロモーター領域である転写開始点の21bp上流にC $\rightarrow$ Tの点突然変異を同定した。ルシフェラーゼ・レポーターを用いたプロテインS $\alpha$  遺伝子プロモーター活性解析の結果、C-21T変異は野生型に比べ著しくプロモーター活性が低下(20.1%)させることが判明し、C-21T変異は本患者におけるプロテインS欠損症の原因と考えられた。

## はじめに

門脈血栓症の発症要因の一つに、非常にまれではあるがアンチトロンビン欠損症など血栓性素因の関与が指摘されている<sup>1)</sup>。日本人にも比較的多く認められる血栓性素因には、アンチトロンビン欠損症のほかにプロテインC欠損症、プロテインS欠損症があるが、最近、プロテインS欠乏症の遺伝子変異としてPS K196Eは日本人に高頻度にみられることが報告された<sup>2)</sup>。プロテインSは肝細胞、内皮細胞、巨核球などで合成されるビタミンK依存性血漿糖蛋白で、血液凝固調節作用に重要な役割を果たしており、活性化プロテインCが活性化血液凝固

第V因子・第VIII因子を蛋白分解により不活性化する際に不可欠な cofactor として機能する<sup>3,4)</sup>。このためプロテインSが質的または量的な欠損を起こす先天性プロテインS欠損症は常染色体性優性遺伝を示す血栓性素因の一つとして知られており、我々も多くのPROS1遺伝子異常を報告してきた<sup>5-7)</sup>。

今回、門脈血栓症を発症しプロテインS欠損症を疑われ名古屋大学医学部附属病院に紹介された症例について、その原因を突き止めるべくプロテインS $\alpha$  遺伝子解析を行ったので報告する。

## 対象と方法

症例：32歳・男性。主訴：心窩部痛。既往歴：特

記すべき事項なし。臨床経過：H16 10/1心窩部痛にて近医受診。腹部CTで門脈内血栓（左枝）を認め、heparin 10,000U/日 7日間、以後WF 2 mg/日にて治療。10/20地域基幹病院を受診し、やはり腹部CTにSPV、LPVの血栓を認め、heparin 15,000U/日、WF増量するも、11/1の腹部CT上でPV本幹、SMVにも血栓出現したため、11/1-11/5 urokinase 24~48万単位/日使用。urokinase使用後より心窩部痛は消失し、11/18腹部CT再検にて血栓拡大認めず。血管外科での手術適応なしとされ、現在はWF6.5mg/日にて外来通院中。血栓性素因のスクリーニングを受け、プロテインSの抗原・活性値の低下を指摘され、今回、遺伝子検査を含めた精査を希望され名古屋大学を受診された。

インフォームドコンセントを得た後、患者末梢血ゲノムDNAを抽出した。PS $\alpha$ 遺伝子の15のエクソンをそのイントロンの境界領域を含めて、プロテインS $\alpha$ 遺伝子に特異的なプライマーを用いPCRを行った。PCR増幅後、Direct Sequence法にて各エクソンおよびエクソン-イントロン境界領域の塩基配列を解析した。患者ゲノムDNAから、同定した変異部位を含むプロモーター領域領域をPCRで増幅し、サブクローニング後に野生型と変異型をそれぞれルシフェラーゼレポーターベクター(pGL3)に組み込み、ヒト肝細胞株であるHuh7細胞を用いてルシフェラーゼレポーター解析を行った。  
(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て施行した。

## 結 果

患者プロテインS $\alpha$ 遺伝子の各エクソンについてエクソン・イントロン境界領域を含めてPCRにて増幅しその塩基配列を解析した結果、蛋白翻訳領域には変異は見つからなかったものの、プロテインS $\alpha$ 遺伝子の転写開始点より21bp上流のプロモーター領域にC→T (PS C-21T)の点突然変異がヘテロ接合体として同定された(図1)。

次に、C-21T変異がプロテインS $\alpha$ 遺伝子転写活

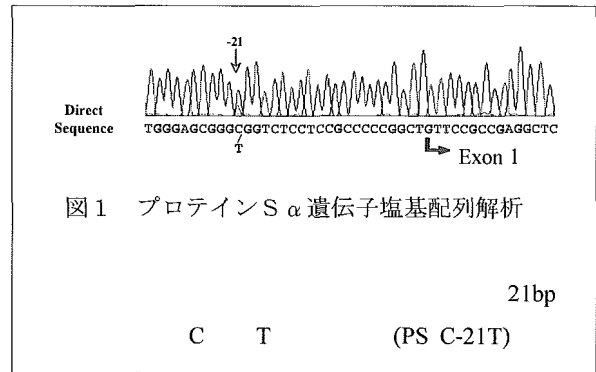


図1 プロテインS $\alpha$ 遺伝子塩基配列解析

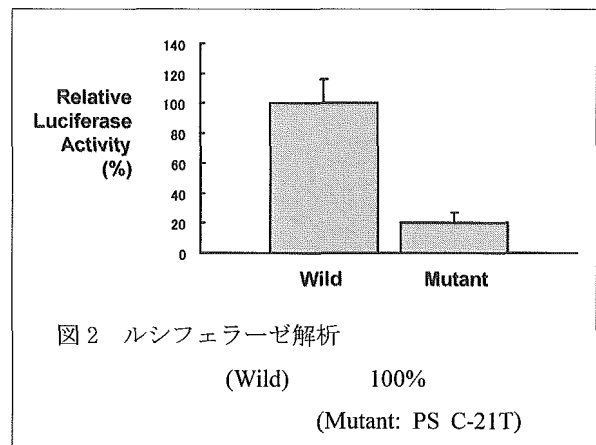


図2 ルシフェラーゼ解析

(Wild) 100%  
(Mutant: PS C-21T) 20.1%

性に及ぼす影響を検討する目的に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクターを同時に遺伝子導入してその導入効率を補正したルシフェラーゼ・レポーター解析を行った。その結果、変異型では野生型に比べて転写活性が20.1%まで低下することが判明した(図2)。

## 考 察

本患者ではPS抗原量の低下がみられたが、ルシフェラーゼレポーター解析の結果から同定されたプロテインS $\alpha$ 遺伝子のプロモーター領域-21C→Tの変異はプロテインS mRNAの生成量を低下させ、PS欠損症を引き起こしていることが推察された。プロテインS $\alpha$ 遺伝子のプロモーター領域の遺伝子異常によるPS欠損症の報告はほとんどなく、また、変異が起きた部位は転写因子Sp1の結合サイトである可能性が考えられ、今後 Electrophoretic mobility shift assay等を用いて、本変異のSp1結合性に与える影響を検討する必要があると思われる。

## 結 語

門脈血栓症を発症したPS欠損症の遺伝子解析によりのプロテインS  $\alpha$  遺伝子プロモーター領域に変異を同定した。ルシフェラーゼレポーター解析の結果PS遺伝子の変異にともなう産生低下が、プロテインS欠損症の病因と考えられた。

## 文 献

- 1) Primignani M, Martinelli I, Bucciarelli P, Battaglioli T, Reati R, Fabris F, Dell' Era A, Pappalardo E, Mannucci PM: Risk factors for thrombophilia in extrahepatic portal vein obstruction. *Hepatology*. 41: 603-608, 2005.
- 2) Kimura K, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Fumio Hayashi F, Yoshihiro Kokubo Y, Akira Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T: Protein S K196E mutation as a genetic risk for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood*. 107: 1737-1738, 2006.
- 3) Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: Components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb. Haemost.* 66: 49-61, 1991.
- 4) Dahlback B. The protein C anticoagulant system: Inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb. Res.* 77: 1-43, 1995.
- 5) Okada H, Takagi A, Murate T, Adachi T, Yamamoto K, Matsushita T, Takamatsu J, Sugita K, Sugimoto M, Yoshioka A, Yamazaki T, Saito H, Kojima T. Identification of protein S  $\alpha$  gene mutations including four novel mutations in eight unrelated patients with protein S deficiency. *Br. J. Haematol.* 126: 219-225, 2004.
- 6) Iwaki T, Matsushita T, Kobayashi t, Yamamoto K, Nomura Y, Kagami K, Nakayama T, Sugiura I, Kojima T, Takamatsu J, Kanayama N, Saito H. DNA sequence analysis of protein S deficiency identification of four point mutation in twelve Japanese subjects. *Semin. Thromb. Hemost.* 27: 155-160, 2001.
- 7) Yamazaki T, Katsumi A, Kagami K, Okamoto Y, Sugiura I, Hamaguchi M, Kojima T, Takamatsu J, Saito H. Molecular basis of a hereditary type I protein S deficiency caused by a substitution of Cys for Arg474. *Blood*. 87: 4643-4650, 1996.

# 特発性門脈圧亢進症における免疫異常 — 制御性 T 細胞との関連 —

昭和大学医学部消化器内科  
井廻道夫

共同研究者  
昭和大学医学部消化器内科  
馬場俊之

## 研究要旨

特発性門脈圧亢進症 (IPH) の病態には免疫異常の関与が推測されている。Th1/Th2バランスは免疫調節の重要な概念であり、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞 (Regulatory T cell、Treg) は Th1 反応を負に制御している。FoxP3 (forkhead box protein P3) は Treg に特異的に発現しているマーカーであり、Treg のマスター制御遺伝子と考えられている。そこで肝内に浸潤している Treg、つまり FoxP3 陽性細胞と病態との関連を検討した。各種肝疾患 (今回は IPH の検体がなく、対象に含まれていない) を対象に、パラフィン包埋した肝組織を用いて CD4、CD8、FoxP3 の免疫染色を行い、CD8<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>細胞の合計に対する FoxP3 陽性細胞数の割合を検討した。肝内に浸潤している FoxP3 陽性細胞の頻度は、自己免疫性肝炎 (AIH) や原発性胆汁性肝硬変 (PBC) よりも C 型慢性肝炎 (CH-C) で増加していたことから、既報における Treg の動態を反映していたものと考えられた。

## 【はじめに】

特発性門脈圧亢進症 (IPH) における免疫異常に関しては不明な点が多い。原因としてスーパー抗原の関与が推測されているが<sup>1)</sup>、何らかの要因により免疫状態が活性化すると、リンパ球系が活性化し、活性化 T 細胞<sup>2)</sup>、Vβ9+T 細胞<sup>3)</sup>、Th1 細胞が増加する<sup>4)</sup>。一方、肝臓の網内系細胞では HLA-DR<sup>5)</sup>、VCAM-1 の発現が増強し<sup>6)</sup>、リンパ球の接着、攻撃を受けやすくなる。免疫学的機序に基づいて末梢門脈のつぶれ、線維化がおこり、脾腫が生じるとされている。

サイトカイン産生パターンの違いによって分類される Th1/Th2 バランスは、免疫調節の重要な概念

である (Fig. 1)。MHC/ペプチド複合体を提示した抗原提示細胞はナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を刺激し、そして Th1 細胞あるいは Th2 細胞に分化する。Th1 細胞への機能分化は IL-12、IFN-g により促進され、Th2 細胞への機能分化は IL-4、IL-10 が関与する。さらに Th1 細胞は CD8 陽性 T 細胞を活性化し細胞性免疫を誘導し、Th2 細胞は抗体を産生し体液性免疫を誘導する。また、Th1 細胞は IFN-g を産生し Th2 細胞を、Th2 細胞は IL-4 や IL-10 を産生し Th1 細胞を相互に抑制し、Th1/Th2 バランスを維持している。Th1/Th2 バランスが破綻すると様々な疾患が発症する。Th1 への偏向は慢性関節リウマチ、クローン病、GVHD など自己免疫疾患の発症に関与し、Th2 への偏向はアトピー性皮膚炎、気管支喘息、潰瘍性大腸炎などアレルギー疾患の発症に関与



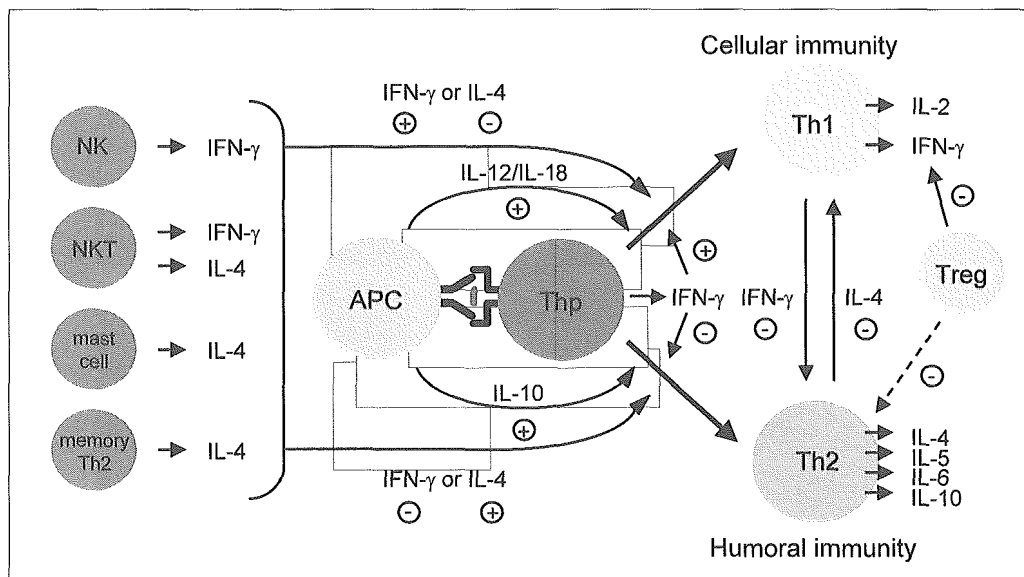


Fig.1. Interactions between polarised Th1/Th2 balance

する。

IPH における Th1/Th2 バランスは既に報告されている<sup>7)</sup>。健常者の末梢血リンパ球、IPH 患者の末梢血リンパ球、IPH の脾細胞における IL-4 と IFN-g の産生を検討すると、IFN-g 産生に代表される Th1 反応は何れも変化が認められないが、IL-4 産生に代表される Th2 反応は IPH 患者の末梢血リンパ球、脾細胞で低下していたことから、相対的に Th1 に偏向していると考えられている。

CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>制御性 T 細胞 (Regulatory T cell, Treg) は、CD4<sup>+</sup>T 細胞の 5-10% を占めるマイナーな集団であるが、Th 1 /Th2 バランスの調節に重要な役割をはたしている<sup>8)</sup>。Treg を除去すると自己免疫疾患の発症することから、Treg は自己反応性 T 細胞を抑制し、免疫自己寛容を維持すると考えられている。さらに、正常個体中の Treg において特異的に発現している FoxP3 遺伝子 (forkhead box protein P3) は、ヒトおよびマウスの自己免疫性・炎症性疾患 (IPEC 症候群) では遺伝的に欠損しており、また Naive T 細胞に FoxP3 遺伝子を導入すると、正常個体中の Treg の表現型と類似した Treg に転換されることから、FoxP3 は Treg のマスター制御遺伝子であると考えられている<sup>9)</sup>。FoxP3 は Treg の特異的マーカーと考えられ、PCR、FACS、さらに免疫染色により同定することができる。

IPH では免疫異常の関与が推測されており、今回の研究では、Treg と病態との関連を検討した。

#### 【目的】

IPH における免疫異常、特に Treg との関連を明らかにするため、肝組織内に浸潤している Treg と病態との関連を解析した。当施設には IPH の検体がなく、今回は Treg と病態との関与がすでに報告されている各種肝疾患について検討した。

#### 【対象と方法】

対象は自己免疫性肝炎 (AIH) 2 例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 4 例、C 型慢性肝炎 (CH-C) 2 例、転移性肝癌の背景肝組織 (control) 1 例、合計 9 例である。

パラフィン包埋した肝組織を用いて免疫染色を行った。染色したマーカーは、CD4、CD8、CD25、FoxP3 である。

Treg の頻度、つまり FoxP3 陽性細胞の頻度は、CD8<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>細胞の合計に対する FoxP3 陽性細胞数の割合を算出し百分率 (%) で表した。

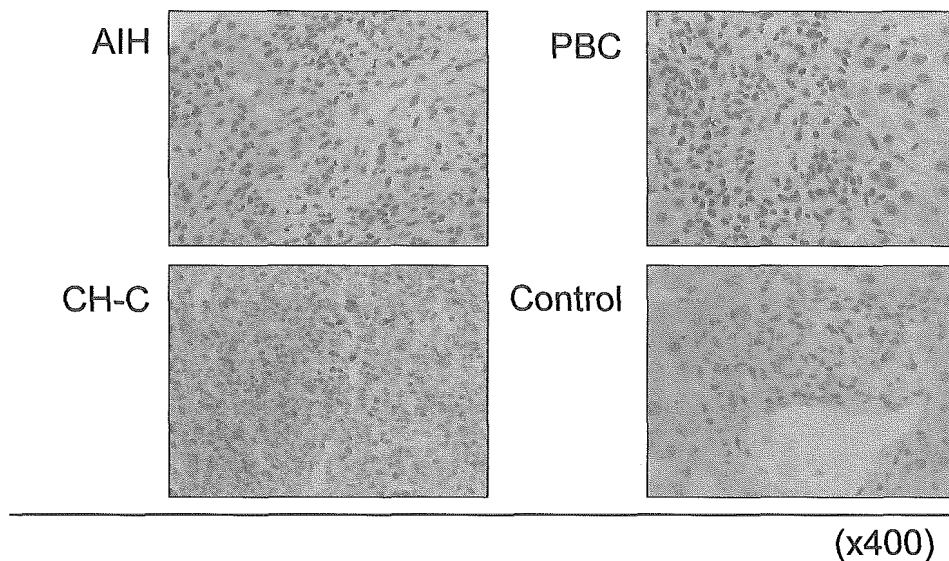


Fig.2. FoxP3免疫組織染色

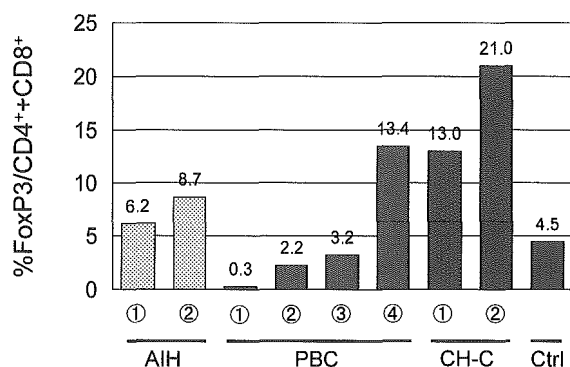


Fig.3. 結果

### 【結果】

FoxP3の免疫染色をFig.2に示す。FoxP3陽性細胞数は(Fig.3)、AIHではFoxP3陽性細胞は6~9%であった。PBCでは1例を除きFoxP3陽性細胞はごく少数であった。CH-CではAIHやPBCと比較し多数のFoxP3陽性細胞が浸潤していた。Controlはもともと浸潤リンパ球が少数であり、FoxP3陽性細胞も少数であった。

### 【結論】

肝内に浸潤しているFoxP3陽性細胞の頻度を比

較してみると、AIHよりもCH-Cで増加していた。

### 【考案】

IPHでは自己抗体の出現(39.4%)、高γグロブリン血症(26.3%)、自己免疫疾患(11.9%)の合併が認められ、特にSLEや慢性甲状腺炎の合併が多い<sup>10)</sup>。以上のことから、IPHには何らかの免疫異常の関与が推測されている。Th1/Th2バランスは免疫調節の重要な概念である。その調節にはTregが重要な役割をはたしていると考えられ、Tregと肝疾患との関連は既に報告されている。HBV感染では末梢血中のTregは増加し、HBVに対する免疫反応を抑制する<sup>11)</sup>。また、HCV持続感染でも末梢血中のTregは増加し、HCV特異的T細胞の機能を抑制する<sup>12-14)</sup>。一方、自己免疫性肝炎では末梢血中のTregは減少し、Tregの機能異常が発症に関与すると推測されている<sup>15-16)</sup>。今回の検討でも、肝内に浸潤しているFoxP3陽性細胞の頻度を比較してみると、AIHよりもCH-Cで増加していたことから、既報におけるTregの動態を反映している可能性がある。

TregはTh1反応を負に制御していると考えられているが、IPHはTh1>Th2タイプの疾患と考えられており、Tregの細胞数減少や機能異常をきたし

ている可能性がある。今後の研究課題として、症例の蓄積と同時に、肝臓内の Treg の動態と末梢血の Treg の動態、さらに機能解析を行うことが重要であると考えている。

#### 【参考文献】

- 1) 門脈血行異常症調査研究班平成9年度研究報告：3-5.
- 2) Tokushige K, J. Gastroenterol. Hepatol. 7: 270-273, 1992.
- 3) Tokushige K, Clin. Immunol. and Immunopathol. 75: 206-213, 1995.
- 4) Tokushige K, J. Gastroenterol. Hepatol. 15: 1312-1317, 2000.
- 5) Terada T, Arch. Pathol. Lab. Med. 115: 993-997, 1991.
- 6) Tokushige K, et al. J. Gastroenterol. 37: 1086-1089, 2002.
- 7) Tokushige K, et al. J. Gastroenterol. Hepatol. 15: 1312-1317, 2000.
- 8) Sakaguchi S, et al. J. Immunol. 155: 1151-1164, 1995.
- 9) Hori S, et al. Science 299:1057-1061, 2003.
- 10) Saito K, et al. Hepato-Gastroenterol. 40; 163-166, 1993.
- 11) Stoop JN, et al. Hepatology 41: 771-778, 2005.
- 12) Sugimoto K, et al. Hepatology 38: 1734-1448, 2003.
- 13) Cabrera R, et al. Hepatology 40: 1062-1071, 2004.
- 14) Boettler T, et al. J. Virol. 79: 7860-7867, 2005.
- 15) Longhi MS, et al. J. Hepatol. 41: 31-37, 2004.
- 16) Longhi MS, et al. J. Autoimmun. 25: 63-71, 2005.

# 医用画像解析及び流体力学的手法による バッドキアリ症候群発症機序の解明

九州大学大学院工学研究院機械科学部門

渡部正夫

共同研究者

九州大学大学院工学府機械科学専攻

松原瑞浦

九州大学大学院工学研究院機械科学部門

渡邊 聡

九州大学大学院医学研究院災害・救急医学

小西晃造、山口将平、橋爪 誠

琉球大学医学部機能制御外科学分野

稲福 齊、國吉幸男

## 研究要旨

バッドキアリ症候群（BCS）の発症に及ぼす肝静脈-下大静脈合流部付近の血流の流体力学的な因子に着目し、医用画像解析と数値流体力学的手法を用いて流体力学的に流れ場を解析することを目的とする。健常者の肝静脈-下大静脈付近の血流は非常に高速であり、血栓の生じにくい部位であると考えられるので、BCS患者には肝静脈-下大静脈血管形態が及ぼす血液流れ場に、健常者とは異なる何らかの流れ学的な特徴があり、それが原因となって血栓形成が誘発されている可能性が高い。本研究では健常者のMRI画像より、肝静脈-下大静脈合流部付近の血管を医用画像処理の手法を用いて抽出した。得られた血管形状を入力として、数値流体力学計算のための3次元計算格子を作成した。超音波CTにより得られた血流速度を代表速度とし、定常血流動を仮定の下で血流の流れ場シミュレーションを行った。その結果、血管合流部下流側で複雑流れ場が形成されていることが観察され、血管壁面せん断応力の上昇がみられた。

## はじめに

バッドキアリ症候群（BCS）の発症の原因、すなわち肝静脈-下大静脈合流部付近での血栓形成の原因として、血管内皮障害や、血液の凝固系の異常などの遺伝子的な問題が指摘されてきたが、それらの要因に加えて、肝静脈-下大静脈合流部付近の血流

の流体力学的な因子が指摘されてきた。血栓は本来であれば血流のよどみ部で形成するが、健常者の肝静脈-下大静脈付近の血流は非常に高速であり、血栓の生じにくい部位であると考えられる。従って、BCS患者には肝静脈-下大静脈血管形態が及ぼす血液流れ場に、健常者とは異なる何らかの流れ学的な特徴（よどみ部の形成、内皮細胞に対する壁面せん断応力の刺激等）があり、それが原因となって血