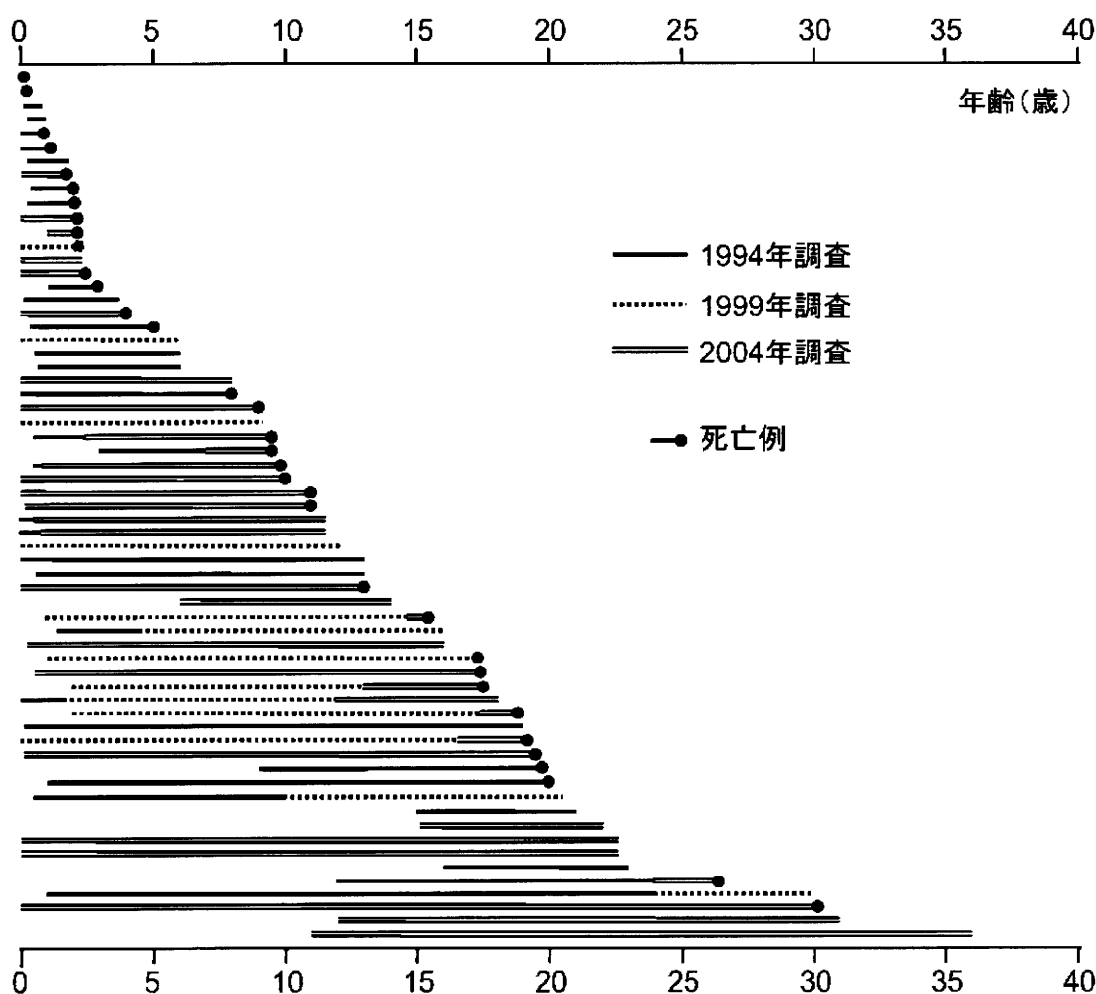


わが国の腭嚢胞線維症の発症年齢と観察期間



今後、腭嚢胞線維症の生命予後をさらに改善し、学校に休まずに行けるなど生活の質を向上させるためには、繰り返す肺炎に適切に対応し、栄養状態を良好に保つ工夫が必要です。そこで、厚生労働省難治性腭疾患に関する調査研究班では、第4回（2009年）の全国疫学調査を行うこととなりました。今回の調査では、日本の腭嚢胞線維症の患者さんの数をできるだけ正確につきとめ、さらに、症状、治療の内容、栄養状態の経過と栄養管理の実態を明らかにし、今後の対策に役立てたいと思いますので、ご協力をお願いいたします。

研究方法

専門家による調査によって、あなたが腭嚢胞線維症という病気だということがわかりました。そこで、あなたにこの調査へのご協力をお願いしています。全国から集まった調査票から、(1) 患者さんの数、年齢性別の分布をできるだけ正確に把握し、(2) 病状の経過、(3) 治療の内容、(4) 栄養状態の経過、(5) 栄養管理の実態を集計します。また既に遺伝子診断が行われている場合には、患者の皆さんが同意された場合のみ、その結果が調査票に記入されます。

カルテに記載されている内容から、主治医に必要事項を調査用紙に転記していただきま

すので、あなたの負担はありません。

また、数年後に、あなたの病状がどのように変化したかをお尋ねしたいと考えています。

(遺伝子診断について)

今までに遺伝子診断を受けられていない患者さんで、遺伝子診断を希望される方は、主治医にその旨をお伝えください。この調査とは別になりますが、対応させていただきます。

研究期間：平成 24 年 3 月 31 日まで

研究計画の開示

ご希望があれば研究計画の詳細をごらんいただけます。

3. 研究対象者として選定された理由

専門家による診断あるいは調査によって、あなたが腓嚢胞線維症という病気だということがわかりました。腓嚢胞線維症は非常に少ない病気ですので、患者さん全員に参加をお願いしています。

4. 同意について

あなたがこの説明をよく理解でき、調査個人票の調査項目を確認していただき、あなたが研究に協力してもよいと考える場合には、「同意書」に署名することにより同意の表明をお願いいたします。未成年の場合は、代諾者（親権者）の承諾を得て行います。その場合でも、できる限り本人の意向を確認し、それを尊重します。16 歳以上の方は、ご本人の同意も確認させていただきます。

5. 研究協力の任意性と撤回の自由および参加しなくてもそのための不利益はないこと

この研究への協力の同意はあなたの自由意志で決めてください。強制いたしません。また、同意しなくても、あなたの不利益になるようなことはありません。一旦同意した場合でも、あなたが不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができます。ただし、同意を取り消した時すでに研究結果が論文などで公表されていた場合などのように、この研究からあなたを外すことができない場合があります。

6. 研究参加者にもたらされる利益及び不利益

(利益) この調査で腓嚢胞線維症の長期の経過を明らかにすることができます。この病気を正確に早く診断する方法、肺炎と気管支炎への対策、栄養状態を良くする方法を提唱することができると考えています。

(不利益) あなたのイニシャル、生年月日、カルテ番号を調査票に記載します。これらの

情報が漏洩した場合には、個人が特定され社会的に不当な扱いを受ける危険性が考えられます。これを防ぐために、個人情報管理専門の係を設け、あなたのイニシャルや生年月日、カルテ番号を調査票とは切り離し厳重に管理します。調査票は個人が特定できないように匿名化処理を行なった上で解析します。

7. 当該研究に係る資金源、起こりうる利害の衝突及び研究者等の関連組織との関わり

この研究は厚生労働省調査研究費によって行われますので、その費用をあなたが払う必要はありません。研究の参加に対しての報酬は支払われません。

8. 個人情報の保護の方法

研究に協力いただいた人の個人が特定されるような情報は個人情報管理専門の係がカギのかかる保管庫に厳重に保護し、外部に出されることはありません。ただし、あなたの協力によって得られた研究の成果は、提供者本人やその家族の氏名などが明らかにならないようにした上で、学会や学術雑誌及びデータベース上等で公に発表されることがあります。

9. 研究成果の公表

研究の成果は、提供者本人やその家族の氏名などが明らかにならないようにした上で、学会や学術雑誌およびデータベース上等で公に公表されることがあります。研究の成果には、調査個人票に記載されたあなたの CFTR 遺伝子の情報を含みます。

10. 研究から生じる知的所有権について

本研究結果の公表における著作権などの知的財産権は、大学と研究者に帰属します。

11. 研究が終わった試料・資料がどう扱われるか

数年後に、あなたの病状がどのように変化したかをお尋ねしたいと考えています。もし同意していただければ、あなたの調査資料をカギのかかる保管庫に保管させていただきます。同意のない場合はシュレッダー処理します。数年後に経過をお尋ねする場合には、改めてその研究について倫理委員会の承認を受けた上で行います。

12. 遺伝の悩み及び不安に対する遺伝カウンセリング

病気のことや遺伝子研究体制に関して、不安に思うことがあったり、相談したいことがある場合には、担当主治医にその旨申し出てください。担当主治医および研究実施責任者が対応いたします。

13. 問い合わせ、苦情等の窓口の連絡先に関する情報

この研究について何か分からないことや心配なことがありましたら、いつでも担当者にご相談下さい。連絡先は以下のとおりです。

- ・ 問合せ先 名古屋大学大学院医学系研究科健康栄養医学（総合保健体育科学センター）
担当者：石黒 洋 TEL：052-789-3946 FAX：052-789-3957

平成 年 月 日 説明者（説明医師）署名

- ・ 苦情の受付先 名古屋大学医学部総務課（052-744-2804）

同意書

研究責任者：（名古屋大学大学院医学系研究科健康栄養医学） 石黒 洋 殿

研究課題名：腓膵線維症の全国疫学調査

《説明を受け理解した項目》（□の中にご自分でレ印を入れて下さい）

- 研究協力を自らの意思で行うことと撤回の自由があること
- 研究計画の概要、調査個人票の調査項目およびCFTR遺伝子の働きについて
- 研究に参加した場合に考えられる利益及び不利益
- 個人情報の保護
- 個人情報を完全に伏せた上で、研究結果が公表されうること
- 調査票の保管と廃棄
- 遺伝カウンセリング
- 問い合わせ・苦情の受付先

《この研究に参加することの同意》（「はい」または「いいえ」に○を付けて下さい）

この研究に参加することに同意しますか？

はい いいえ

遺伝子診断の結果を調査票に記入してよろしいですか？

はい いいえ

この全国調査を集計した全体の結果を知りたいですか？

はい いいえ

数年後にあなたの病状がどのように変化したかをお尋ねしたいと考えていますが、それまで、この調査の資料を保存してもよろしいですか？

はい いいえ

[16歳以上の場合]

本人氏名： _____

本人署名又は記名・押印： _____ ④

住所： _____

平成____年____月____日

[20歳未満の場合]

代諾者（親権者）氏名： _____

代諾者署名又は記名・押印： _____ ④

代諾者（親権者）と本人との関係： _____

平成____年____月____日

膵嚢胞線維症の未承認薬の使用状況

研究報告者 成瀬 達 みよし市民病院 院長

共同研究者

石黒 洋（名古屋大学大学院健康栄養医学）、吉村邦彦（日本赤十字社大森赤十字病院呼吸器内科）
辻 一郎、栗山進一（東北大学大学院公衆衛生学）、下瀬川徹、菊田和宏（東北大学大学院消化器病態学）

【研究要旨】

平成22年度の医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議において海外で承認されている膵嚢胞線維症治療薬も取り上げられた。厚生労働省から開発企業の募集又は開発要請を行った医薬品のリストがより公表されたことをふまえ、これらの未承認薬の使用経験と今後の調査または治験等への参加希望につき、第4回膵嚢胞線維症全国疫学調査の付随調査としてアンケート調査を行った。11症例の主治医から回答を得、コリスチンは2症例、トブラマイシンは3症例、ドルナーゼ・アルファは1症例、パンクレアチンは6症例が使用経験有りであった。今後の調査等には7名の患者から協力可能との返答を得た。

A. 研究目的

膵嚢胞線維症（嚢胞性線維症 CF）は cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) の遺伝子変異を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患である。本遺伝子は CFTR と命名されたクロールイオンチャネルをコードしている。このイオンチャネルは全身の外分泌腺におけるクロールイオンの分泌ならびにそれに伴う水分分泌を調節している。CFTR 遺伝子変異により CFTR の機能が著しく障害されると、粘稠な分泌液により消化管、膵管や気管支線の導管細胞が閉塞されやすくなる。その結果、新生児における腸閉塞（メコニウムイレウス）、膵外分泌不全による消化吸収障害、および反復する慢性気管支炎、細気管支炎および副鼻腔炎がおきる¹⁾。

本症の治療は消化酵素を補充することにより発育栄養障害を予防すると共に、繰り返す肺の感染症をコントロールすることである。これまで肺感染症のため多くの患者は生存期間が20年を越えることが稀であった。欧米人では CF は最も頻度の高い遺伝疾患であるため社会の関心も高く、様々な治療法が開発されている。その結果、患者の生存期待年齢の中央値が37.4歳に達しようとしている²⁾。CF はわが国では極

めて稀な疾患で、本研究班による全国調査では CF の発症頻度は150～200万人に1人、年間生存罹患患者数は10名程度であると推計されている^{3,4)}。このため欧米で承認されている標準治療薬が、わが国では治験を行うに足る患者がないため、使用できない状態が続いてきた。

CF の治療薬には海外で開発承認され、医療上の効果が確立しているが、わが国では承認されていない薬が複数存在する。CF 患者の中には、やむにやまれぬ状況でこれらの未承認薬を個人輸入している人もいる。国内での一刻も早い承認を求める患者および家族の要請を受け、医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議では CF 治療薬も取り上げられた⁵⁾。この会議での検討結果を受けて本年5月には厚生労働省が開発企業の募集又は開発要請を行った医薬品のリストがより公表された。このリストにはコリスチンメタンサルホン酸ナトリウム塩（CF の多剤耐性緑膿菌気道感染症の治療薬：吸入用製剤の剤形追加）、トブラマイシン（CF 患者の緑膿菌気道感染症の治療薬で吸入用製剤の剤形追加）、ドルナーゼ アルファ（CF の喀痰排泄促進作用および呼吸機能の改善薬）、パンクレアチン（CF 患者の脂肪吸収および栄養状態の改善薬）の4つの CF 治療薬（表1）が含

表 1 平成22年医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議を受け開発企業の募集又は開発要請が行なわれた CF 治療医薬品のリスト

未承認薬名	海外での販売名	使用経験あり	情報収集に協力可能	治験に参加可能
コリスチン	Colomycin	2	7	7
トブラマイシン	TOBI	4	7	7
ドルナーゼアルファ	Pulmozyme	1	6	6
パンクレアチン	Creon	6	7	7

まれている。今後、これらの治療薬の承認に向け、治験などを開始する必要がある。そこで第4回膵嚢胞線維症全国疫学調査の付随調査として、治験に参加できる患者の数を把握するために、これらの未承認薬の使用経験と今後予定される開発企業の調査および治験に参加への意向を問うアンケート調査を行った。

B. 研究方法

1. アンケート調査の対象期間は2005年から2009年までの5年間とした。
2. 第4回膵嚢胞線維症全国疫学調査の一次調査で「症例有り」と回答された施設、②症例報告(論文発表および学会発表)がされている施設、③過去3回の全国調査で症例の回答のあった施設の主治医へアンケート(表2)を送付した。

(倫理面への配慮)

1. 本調査の第4回膵嚢胞線維症全国疫学調査は、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会、名古屋大学医学部生命倫理委員会およびみよし市民病院倫理委員会で承認されている。
2. 本調査に付随するアンケート調査(資料1)はみよし市民病院倫理委員会で承認されている。
3. アンケートの内容は患者の性と年齢および未承認薬の使用経験と今後の治験参加の希望の有無のみである。患者もしくはその家族の同意を得て主治医が記入するため患者の匿名性ならびに自由意志は守られている。

C. 研究結果

2005年から2009年までの5年間に生存が確

認された30症例の主治医に未承認のCF治療薬の使用経験についてアンケートを送付し、11症例から回答を得た。コリスチンは2症例、トブラマイシンは3症例、ドルナーゼ・アルファは1症例、パンクレアチンは6症例が使用経験有りであった(表1)。今後の承認に必要な調査および治験には6~7名の患者から協力可能との返答を得た。

D. 考察

今回のアンケート調査では11名の主治医より返答をいただくことができた。忙しい日常診療の中で患者およびその家族と面談の上、ご回答いただいたことにまず深謝したい。未承認薬の中で使用経験が最も多かったのは消化酵素薬のパンクレアチン(Creon)であった。CFでは膵外分泌不全のため消化酵素を補充しないと多量の脂肪便が生じる。患者の脂肪吸収および栄養状態の改善のためには消化酵素の補充が絶対に必要である¹⁾。わが国で承認市販されている消化酵素の常用量ではCFにおける膵外分泌不全には不十分であり、その数倍量を服薬する必要がある。日々の食事毎に必要な薬であることも使用経験が多い理由かもしれない。2名は個人輸入をしており月数万円の個人負担が生じている。わが国でもこの高力価のパンクレアチン製剤は治験が終了し、平成21年12月末に承認申請がされている。

トブラマイシンによる吸入量法(TOBI)は4名が経験されていた。本剤は個人輸入する場合にはかなり高価(約\$5,000)であり、間歇投与しても月額約26万円の負担となる。吸入療法は緑膿菌感染を制御できる高濃度のトブラマイシンを気道内にもたらし、一方で血中濃度の上昇を抑えることにより全身の副作用のリスクを下げる事が期待できる。本剤の間歇投与(4週投与/4週休薬)は肺機能を改善させ、緑膿菌量を減少させ、入院のリスクを減らし、かつ体重増加をもたらすことが知られており^{6,7)}、欧米における標準的な治療法の一つである^{8,9)}。わが国では注射薬が承認されているため、今回の調査でも特例として適応外使用されている例もあった。

コリスチンはわが国で開発された7つのアミノ酸からなる環状ペプチド系抗生物質である。細胞質膜を傷害することにより殺菌的に作用し、グラム陰性菌に対して優れた抗菌作用を示すが、腎毒性、神経毒性が強いため使用されなくなった。現在、注射薬は未承認の状態となっているが、緑膿菌感染症や細菌性赤痢に対して有効性が高いため、コリスチン点眼薬および内服薬として使用されている。近年、コリスチンは多剤耐性緑膿菌(MDRP)などの多剤耐性グラム陰性桿菌感染症に比較的有効な貴重な治療薬の一つとして欧米で見直されている。特にCFにおける緑膿菌の持続感染は多剤耐性菌を生みやすい病態である^{10,11)}。最近、わが国でもMDRP 感染症の制御のために肺移植の術前後に治験審査委員会の承認を得てコリスチン使用したCF症例が報告されている¹²⁾。今回の公募は、トブラマイシンと同様に、吸入薬の開発要請であったが、残念ながら応募企業はなかった。今年になり、わが国でも多剤耐性アシネトバクターやNDM1 耐性大腸菌検出されるようになり、コリスチンの承認を後押しする動きが見られる。コリスチンの吸入薬は注射薬に比べ全身の副作用が少ないことが期待できるので、同時に吸入薬が開発されればその恩恵が大きいと思われる。

CFにおける膿性粘稠痰の原因は多量に含まれるDNAが原因の一つと考えられている。実際、遺伝子組み換え型ヒトデオキシリボヌクレアーゼが痰の粘稠性を改善することが示され¹³⁾、本剤(ドルナーゼ アルファ)の長期連日エアロゾル投与は、肺機能低下の速度を遅らせ、重度の気道増悪の頻度を低下させることが示された^{14,15)}。痰の喀出を容易にする手段として標準的に用いられている^{8,9)}。今回の調査では本剤の使用経験は1例のみであったが、肺機能の改善のみならず日常生活の質(QOL)の向上が期待できる薬剤である。

E. 結論

本年、医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議で取り上げられたCF治療薬は欧米のガイドラインで重症のCF患者に対して強

く推奨されている標準薬である。今回のアンケート調査では、数名が個人輸入によりその恩恵にあずかっているのみであることが明らかとなった。国内承認を得るための治験等に参加できるCF患者数は年間6~7名である。海外の治験にて承認され有効性が確立した治療薬を、国内で承認するために必要な条件を早急に決定する必要がある。

F. 参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班. 膵嚢胞線維症の診療の手引き(大槻眞, 成瀬達編). アークメディア 2008.
2. What is the life expectancy for people who have CF in the United States? Cystic Fibrosis Foundation-Frequently Asked Questions (<http://www.cff.org/AboutCF/Faqs/>)
3. 成瀬 達, 玉腰暁子, 林 櫻松, 吉村邦彦, 広田昌彦, 大槻 眞. 膵嚢胞線維症の診断基準と疫学調査. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性膵疾患に関する調査研究班」平成15年度研究報告書 2004: 231-235.
4. 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 広田昌彦, 大槻 眞 第3回膵嚢胞線維症全国疫学調査 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究平成17~19年度総合研究報告書 2008: 205-215.
5. 医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議. 厚生労働省関係審議会議事録等その他(医薬食品局) (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2010/04/s0427-12.html>)
6. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, Vasiljev-K M, Borowitz D, Bowman CM, Marshall BC, Marshall S, Smith AL. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. N Engl J Med. 1999; 340: 23-30.
7. Moss RB. Long-term benefits of inhaled tobramycin in adolescent patients with cystic

- fibrosis. *Chest*. 2002; 121: 55–63.
8. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ Jr, Willey-Courand DB, Bujan J, Finder J, Lester M, Quittell L, Rosenblatt R, Vender RL, Hazle L, Sabadosa K, Marshall B; Cystic Fibrosis Foundation, Pulmonary Therapies Committee. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176: 957–69.
 9. Heijerman H, Westerman E, Conway S, Touw D, Döring G; consensus working group. Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: A European consensus. *J Cyst Fibros*. 2009; 8: 295–315.
 10. Döring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Høiby N, Smyth A, Touw DJ. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*. 2000; 16: 749–67.
 11. Conway SP, Brownlee KG, Denton M, Peckh. Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med*. 2003; 2: 321–32.
 12. Yamamoto Y, Izumikawa K, Hara A, Fujita H, Amenomori M, Sakamoto N, Seki M, Kakeya H, Yanagihara K, Takasaki K, Miyazaki T, Tsuchiya T, Yamasaki N, Tagawa T, Nagayasu T, Kohno S. Importance of controlling drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection: experience from lung transplantation in a cystic fibrosis case. *Intern Med*. 2010; 49: 2353–8.
 13. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 9188–92.
 14. McCoy K, Hamilton S, Johnson C. Pulmozyme Study Group. Effects of 12-week administration of dornase alfa in patients with advanced cystic fibrosis lung disease. *Chest*. 1996; 110: 889–95.
 15. Quan JM, Tiddens HA, Sy JP, McKenzie SG, Montgomery MD, Robinson PJ, Wohl ME, Konstan MW; Pulmozyme Early Intervention

Trial Study Group. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr*. 2001; 139: 813–20.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

嚢胞性線維症（腭嚢胞線維症）の主治医ならびに患者の皆様へのお願い

この度は第4回嚢胞性線維症全国調査にご協力いただきありがとうございます。前回の全国調査では、本症の治療の進歩により長期に生存される方が増えていることがわかってまいりました。このことは大変喜ばしいことではありますが、2つの大きな問題があります。

まず、本症はわが国では極めて稀な疾患であるため、新しい治療法が開発されてもわが国では通常の治療を行うことができません。このため欧米で確立された治療薬であっても、未承認薬として保険診療の対象とはなっておりません。もし、未承認の治療薬や医療機器を個人輸入しようとするれば、患者さんの経済的負担は極めて大きくなります。第2に、本症の医療費は小児慢性特定疾患治療研究事業により公費負担となっておりますが、特定疾患治療研究事業対象疾患の認定を受けていないため、成人になると公費負担がなくなるという問題があります。

本年5月21日に厚生労働省より「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議での検討結果を受けて開発企業の募集又は開発要請を行った医薬品のリスト」が発表されました。幸いなことに、このリストに海外で本症に対する有効性が確立されている4つの治療薬が含まれております。今後、これらの薬剤がわが国で承認されるように、開発を担当していただく企業と共に早急に承認に必要なデータを集める予定であります。しかし、患者数が極めて少ないため、どの程度の皆様が治療・調査にご参加いただけるかを承認申請の計画策定の段階で把握する必要があります。

そこで、これらの治療薬の個人輸入などによる使用経験の有無、負担された金額、使用経験があった場合、開発企業からの情報収集に協力が可能か、将来、治療・調査が行われた場合に協力が可能かなど、アンケート調査にご協力をお願いします。また、患者の皆様のご自己負担もかなり高額になっていると思われまので、今後、特定疾患治療研究事業対象疾患の認定を受けられるようにするため、入院や外来における医療費の負担額についてもお教えいただければ幸いです。尚、今回のアンケートで協力可能とお答えいただいた場合でも、将来、ご協力願えない状況が生じた場合には、遠慮なくお申し出ください。

お忙しい所、誠に恐れ入りますが、よろしく願いいたします。

平成22年5月

厚生労働省難治性疾患克服研究事業
難治性腭疾患に関する調査研究
研究代表者 下瀬川 徹
分担研究者 成瀬 達
研究協力者 石黒 洋

医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議

医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議での検討結果を受けて・開発企業の募集又は開発要請を行った医薬品のリスト（抜粋）

（公表日：平成22年5月21日）

1. 開発企業を募集する医薬品

No.5 コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム塩（販売名 Colomycin Injection）
吸入用製剤の剤形追加、腭嚢胞線維症の気道感染症

2. 企業に開発の要請を行った医薬品

No.52 トブラマイシン（販売名 TOBI）
吸入用製剤の剤形追加 腭嚢胞線維症患者の緑膿菌気道感染症の治療
ノバルティス ファーマ（株）

No.55 ドルナーゼ アルファ（販売名 Pulmozyme）
腭嚢胞線維症患者の喀痰排泄促進作用および呼吸機能の改善
中外製薬（株）

No.62 パンクレアチン（販売名 Creon）
腭嚢胞線維症患者の脂肪吸収および栄養状態の改善
アボット製薬（株）

照会先

厚生労働省医薬食品局審査管理課

厚生労働省医政局研究開発振興課

TEL 03-5253-1111（内線4221）

嚢胞性線維症（腭嚢胞線維症）の未承認薬に関するアンケート

施設名 _____ 主治医 _____

患者年齢 _____ 歳 性 1. 男 2. 女

1. コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム塩（販売名 Colomycin Injection）

使用経験 1. あり 2. なし
 1. の場合 1. 個人輸入 2. その他（ _____ ）
 およその費用 月額 _____ 円

開発企業からの情報収集に協力 1. できる 2. できない
 今後予定される治験・調査に協力 1. できる 2. できない

2. トブラマイシン（販売名 TOBI）

使用経験 1. あり 2. なし
 1. の場合 1. 個人輸入 2. その他（ _____ ）
 およその費用 月額 _____ 円

開発企業からの情報収集に協力 1. できる 2. できない
 今後予定される治験・調査に協力 1. できる 2. できない

3. ドルナーゼ アルファ（販売名 Pulmozyme）

使用経験 1. あり 2. なし
 1. の場合 1. 個人輸入 2. その他（ _____ ）
 およその費用 月額 _____ 円

開発企業からの情報収集に協力 1. できる 2. できない
 今後予定される治験・調査に協力 1. できる 2. できない

4. パンクレアチン（販売名 Creon）

使用経験 1. あり 2. なし
 1. の場合 1. 個人輸入 2. その他（ _____ ）
 およその費用 月額 _____ 円

開発企業からの情報収集に協力 1. できる 2. できない
 今後予定される治験・調査に協力 1. できる 2. できない

承認申請のための計画を7月中に立てる必要があります。6月末までに返送をお願いします。
 患者さんがお亡くなりになっていた場合でも、使用経験があれば調査にご協力をお願いします。
 す。

Ⅳ. 膵嚢胞線維症
2) 各個研究プロジェクト

わが国の cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異の解析

研究報告者 吉村邦彦 日本赤十字社大森赤十字病院呼吸器内科 部長

共同研究者

安斎千恵子（虎の門病院呼吸器センター内科）

【研究要旨】

嚢胞性線維症(cystic fibrosis, CF)は、従来わが国では稀な疾患と考えられていたが、その臨床的実態と原因遺伝子 CFTR の変異様相は、次第に明らかにされつつある。CF では約80%の症例で膵外分機能障害(pancreatic insufficiency, PI)を伴うものの、大多数は呼吸機能不全で死亡する。PCR 増幅および直接塩基配列解析を用いた遺伝子変異の検出により、すでにわが国における30例に及ぶ CF 患者においてその遺伝子変異が確認されてきている。この中でわれわれが解析し得た症例はこれまで本研究班の2008-2010年度研究を含めて、合計25例に及ぶ。わが国の CF 患者における CFTR 遺伝子変異は、国際的 CFTR 遺伝子変異データベース(CFMD)にもこれまで報告のない新規の変異、もしくは世界的にもかなり稀なものが大半を占め、欧米人の CFTR 変異スペクトラムと明らかに様相を異にしている。さらに、同一の遺伝子変異が直接的血縁関係のない複数の症例において共通に検出されてきている。今後もさらに日本人 CF 症例を出来る限り多く集積・解析し、原因となる CFTR 遺伝子の病的変異の種類や頻度を明らかにしたうえで、産学協同的なわが国独自の遺伝子変異スクリーニングシステムを確立する必要がある。

A. 研究目的

嚢胞性線維症(cystic fibrosis, CF)は肺、膵臓、消化管などの全身の外分泌管腔臓器を冒す常染色体劣性遺伝性疾患であり、cAMP 依存性 Cl⁻ イオンチャネル CFTR をコードする遺伝子の突然変異に起因する¹⁻⁵⁾。CF は欧米白人種にきわめて高率に発症する疾患であるが、一方日本人をはじめとする東洋人種における CF の発症頻度はきわめて低いと考えられている³⁾。わが国の CF 症例に関しては昭和57年からの厚生省特定疾患難治性膵疾患研究班による全国調査から29例の確診例が報告されているが⁶⁾、Yamashiro ら⁷⁾の報告によるとわが国ではこれまでに文献的に約120例の CF 臨床診断例が記載され、発症頻度も出生35万人あたり1人程度と推定された。これはハワイ在住の東洋人での CF 発症頻度(出生9万人以上あたり1人)と概ね矛盾しないため⁸⁾、わが国では、およそ出生10万人あたり1人程度の発症率と考えられる。

わが国の患者における CFTR 遺伝子変異解析に関して、過去には DNA 検体の得られ

た少数例の患者での“c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)” (legacy name: ΔF508)など欧米で頻度の高い数種の変異検索、あるいは限られた数のエクソンでの PCR 増幅と single strand conformation polymorphism (SSCP)解析などが検討されたが、これらの方法では有意な CFTR 遺伝子異常は確認されず、変異状況は長らく不明であった^{3,5,6)}。この主要な理由は、わが国の CF 患者における CFTR 変異が欧米患者と比較して、変異の頻度もさることながら、そのスペクトラムが全く異なっていることに起因する。しかしながら、このような経緯の中、約10年前から漸くわが国での CFTR 変異の状況が明らかにされてきている^{3,6)}。2008-2010年度における本研究では、わが国の CF 患者における CFTR 遺伝子変異の実態をさらに解明することを目的とした。

B. 研究方法

著者らはこれまでに、PCR-SSCP 法、直接シーケンス法などによる27エクソン全ての変異検出体制を確立し、当研究班によるわが国

での全国調査で集積された症例などを中心に CF 確診例ないし疑診例の CFTR 遺伝子変異検索を進めてきた^{3,6)}。その研究方法の詳細はこれまでの報告書に記載した通りである⁶⁾。

汗の電解質濃度は Wescor 社の Macroduct および Sweatchek を用いたピロカルピン負荷試験により測定し, conductivity から換算して得られた Cl⁻ 値 60 mEq/L 以上を異常とした^{3,6)}。

倫理面への配慮:「虎の門病院 ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理委員会」において「日本人嚢胞性線維症患者における CFTR 遺伝子変異の検索」研究の審査を受け, 承認を得た研究計画(受付番号第2005-5号)に従い, 主治医から当該症例の CFTR 遺伝子変異検索の臨床的, 遺伝学的意義を患者本人ないし未成年の場合は保護者に説明した上, 同意を取得した。

C. 研究結果

われわれの施設において CFTR 遺伝子変異解析が行われ, 現時点までに変異が突き止められた CF 症例合計25例の一覧を表1に示す。解析の結果, 全ての CF 症例において, 少なくとも一方のアリルの遺伝子変異を確認し得た。これらの中には, 欧米でもきわめて稀な変異や, これまで国際的な CF Mutation Database (CFMD) に登録記載のない CFTR 変異が大半を占めている^{9,10)}。

さらに, 解析全25症例のうち, 8例が同一変異を両アリルに有するホモ接合体, また12例が2種以上の異った変異を2つのアリルに有する複号ヘテロ接合体であった。一方, 5例において片側の遺伝子変異が確認されていない。表2に25症例における遺伝子変異の種類とアリル頻度を示した。

表1 これまでに確認された CF 症例の臨床的特徴とその CFTR 遺伝子変異

Case	Age	Sex	PI/PS	Cl ⁻	Mutation	Exon	Mutation	Exon	Outcome
1	15 y	F	PI	201	H1085R	17b	H1085R	17b	alive
2	1 y 5 m	F	PI	126	M152R	4	1540del10	10	alive
3	1 y 1 m	F	PI	ND	ΔF508	10	L571S	12	deceased
4	15 y	M	PI	74	125C	1	Q98R	4	alive
5	42 y	F	PS	ND	E217G	4	Q1352H	22	deceased
6*	21 y	M	PI	166	125C	1	L441P	9	alive
7*	16 y	F	PI	100	125C	1	L441P	9	deceased
8	9 y	F	PI	166	1540del10	10	1540del10	10	alive
9*	30 y	M	PS	403	125C + T1086I	1, 17b	125C + T1086I	1, 17b	alive/ABPA
10*	28 y	F	PS	ND	125C + T1086I	1, 17b	125C + T1086I	1, 17b	alive
11	17 y	F	PS	ND	R75X	3	R347H	7	alive
12	26 y	F	PI	121	E267V	6b	T663P	13	alive/TP
13	28 y	M	PI	117	125C	1	460insAT	4	deceased
14	11y	M	PI	154	125C + dele16-17b	1, 16-17b	125C + dele16-17	1, 16-17b	deceased
15	24 y	F	PI	91	L548Q	11	2848delA	15	alive
16	2 y	F	PI	ND	L441P	9	ND	?	deceased
17	18 y	M	PS	93	125C + del16-17b	1, 16-17b	125C + del16-17b + V1318I	1, 16-17b, 21	alive/ABPA
18	9 y	F	PI	40	5T	intron 8	D924N	15	alive
19	13 y	F	PI	55	Q98R	4	Q98R	4	alive
20	29 y	F	PI	60	125C	1	R347H	7	alive
21	11 y	F	PS	22	R1453W	24	ND	?	alive
22	18 y	M	PI	ND	I556V	11	ND	?	alive
23	4 m	F	PI	ND	125C	1	G85R	3	alive
24	42 y	F	PS	ND	E217G	4	Q1352H	22	alive
25	2 y	F	PS	207	dele16-17b	16-17b	dele16-17b	16-17b	deceased

PI/PS: pancreatic insufficiency/sufficiency, CP: consanguineous parents, * siblings, TP: live lung transplantation, ABPA: allergic bronchopulmonary aspergillosis, ND: not detected

表2 わが国のCF 25症例のCFTR 遺伝子変異のアリル頻度

dele16-17b	6
T1086I	4
Q98R	3
L441P	3
1540del10	3
E217G	2
R347H	2
H1085R	2
Q1352H	2
460insAT	1
R75X	1
G85R	1
M152R	1
E267V	1
deltaF508	1
L548Q	1
I556V	1
L571S	1
T663P	1
2848delA	1
D924N	1
V1318I	1
R1453W	1
5T	1
125C	13

(ホモ接合体 8 例, 複号ヘテロ接合体12例, ヘテロ接合体 5 例)

D. 考察

わが国のCF 研究は、本研究班およびその前身である厚生省特定疾患難治性腭疾患調査研究班を中心に進められ、主に腭機能不全を呈した重症例の集積と全国施設での実態調査などに主眼が置かれてきた。しかしながら、これら症例における原因遺伝子CFTRの変異解析と遺伝子診断に関しては必ずしも十分ではなかった。近年わが国においても変異検出体制が確立され、変異の様相が次第に明らかにされつつある^{3,6,9,10}。2008-2010年度研究でも改めて明らかにされたように、すでに全世界ではCFMDに1,800種以上の変異が報告されているにもかかわらず、わが国のCF患者におけるCFTR遺伝子変異は、きわめて稀なもの、あるいはこれまで報告のないものが大半を占め、欧米人の変異スペクトラムと全く様相を異にしている^{3,6}。したがって欧米人を対象としたスクリーニング体系では変異は検出され得ない。

このなかで、今年(2010年)度報告に記した症例はCFTRdele16-17b [c.(?_2909)_(33367_?)del] 変異のホモ接合体であり、すでにこれまでわが国で2例の同様のホモ接合体症例が確認されていることから、アリル頻度は6となり、これまでで最頻の変異となった。

E. 結論

人種や民族によりCFTR変異のスペクトラムが大きく異なっていることがすでに明らかにされている^{1,3}。したがって、診断や保因者スクリーニングの上で、対象集団の人種、民族性がきわめて重要である。今後もわが国の日本人CF症例に関し、本研究班を中心として、さらに単一臓器病変のみを呈するCFTR関連疾患にもその対象を広げて出来る限り多く解析し、原因となるCFTR遺伝子の病的変異の種類、頻度を明らかにしたうえで、わが国独自の疾患特異的なスクリーニング体制を確立して行きたい。

F. 参考文献

1. Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th edn. McGraw-Hill, New York, p3799-p3876, 1995.
2. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 256: 774-779, 1992.
3. 吉村邦彦. Cystic fibrosis. *日本胸部臨床*, 69 (8): 723-733, 2010.
4. Tsui L-C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med*, 151: S47-S53, 1995.
5. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>.
6. 吉村邦彦, 安斎千恵子. 日本人CF症例のCFTR遺伝子変異に関する検討. 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. 平成21年度 総括・分担研究報告書, P311-315, 2010.
7. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The estimated incidence

of cystic fibrosis in Japan. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 24: 544-547, 1997.

8. 吉村邦彦. 日本人における Cystic Fibrosis の実態とその CFTR 遺伝子変異. Ther Res 26: 1467-1475, 2005.
9. Yoshimura K, Wakazono Y, Iizuka S, Morokawa N, Tada H, Eto Y. A Japanese patient homozygous for the H1085R mutation in the CFTR gene presents with a severe form of cystic fibrosis. Clin Genet, 56: 173-175, 1999.
10. Morokawa N, Iizuka S, Tanano A, Katsube A, Muraji T, Eto Y, Yoshimura K. Severe cystic fibrosis in a Japanese girl caused by two novel CFTR gene mutations M152R and 1540del10. Hum Mut, Mutation and Polymorphism Report #109, 2000 (online).

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉村邦彦, 安齋千恵子, 衛籐義勝. わが国の嚢胞性線維症患者における責任 CFTR 遺伝子変異の解析. 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. 平成19年度総括・分担研究報告書, p263-265, 2008.
- 2) 吉村邦彦, 安齋千恵子, 衛籐義勝. わが国の嚢胞性線維症患者における責任 CFTR 遺伝子変異の解析. 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. 平成17年度~19年度総合分担研究報告書, p300-303, 2008.
- 3) 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 広田昌彦, 大槻 眞. 腭嚢胞線維症の診断マニュアルの作成. 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. 平成19年度 総括・分担研究報告書, p147-150, 2008.
- 4) 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 広田昌彦, 大槻 眞. 第3回腭嚢胞線維症全国疫学調査. 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. 平成17年度~19年度総合分担研究報告書, p205-215, 2008.

- 5) 吉村邦彦. 呼吸器症候群(第2版) I —その他の呼吸器疾患を含めて— III 閉塞性肺疾患 気管支の異常 A. 閉塞性肺疾患 嚢胞性線維症. 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 8 p654-663, 2008.
- 6) 吉村邦彦. A. 日本人の CFTR 遺伝子変異. 「腭嚢胞線維症の診療の手引き」厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究班(主任研究者 大槻 眞, 分担研究者 成瀬 達), アークメディア, 東京, p16-17, 2008.
- 7) 吉村邦彦. 汗中クロール濃度の異常: ピロカルピンイオン導入法. 「腭嚢胞線維症の診療の手引き」厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究班(主任研究者 大槻 眞, 分担研究者 成瀬 達), アークメディア, 東京, p20-21, 2008.
- 8) 吉村邦彦. 呼吸器症状. 「腭嚢胞線維症の診療の手引き」厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究班(主任研究者 大槻 眞, 分担研究者 成瀬 達), アークメディア, 東京, p26-27, 2008.
- 9) 吉村邦彦. 遺伝子診断. 「腭嚢胞線維症の診療の手引き」厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究班(主任研究者 大槻 眞, 分担研究者 成瀬 達), アークメディア, 東京, p34-35, 2008.
- 10) 吉村邦彦. 非定型的 CF. B. びまん性汎細気管支炎「腭嚢胞線維症の診療の手引き」厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究班(主任研究者 大槻 眞, 分担研究者 成瀬 達), アークメディア, 東京, p48-49, 2008.
- 11) 吉村邦彦. 非定型的 CF. C. 先天性両側精管欠損症「腭嚢胞線維症の診療の手引き」厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究班(主任研究者 大槻 眞, 分担研究

- 者 成瀬 達), アークメディア, 東京, p50-51, 2008.
- 12) 吉村邦彦. 治療法 B. 肺感染症の治療, 在宅酸素療法, 肺理学療法「腭嚢胞線維症の診療の手引き」厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究班(主任研究者 大槻 眞, 分担研究者 成瀬 達), アークメディア, 東京, p54-55, 2008.
- 13) 吉村邦彦. 患者さん・家族への説明 遺伝子カウンセリング「腭嚢胞線維症の診療の手引き」厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究班(主任研究者 大槻 眞, 分担研究者 成瀬 達), アークメディア, 東京, p62-63, 2008.
- 14) Izumikawa K, Tomiyama Y, Ishimoto H, Sakamoto N, Imamura Y, Seki M, Sawai T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mukae H, Yoshimura K, Kohno S. Unique mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene of three cases of cystic fibrosis in Nagasaki, Japan. Intern Med, 48(15): 1327-1331, 2009 (Epub 2009 Aug 3).
- 15) 吉村邦彦, 安斎千恵子. 日本人 CF 症例の CFTR 遺伝子変異に関する検討. 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. 平成21年度 総括・分担研究報告書, P311-315, 2009.
- 16) 成瀬 達, 石黒 洋, 吉村邦彦, 辻 一郎, 栗山進一, 菊田和宏, 下瀬川徹. 第4次腭嚢胞線維症全国疫学調査(共同研究). 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. 平成20年度総合・分担研究報告書, p251-253, 2009.
- 17) 吉村邦彦, 安斎千恵子. 日本における嚢胞性線維症. 呼吸器科, 15(3): 383-392, 2009.
- 18) 吉村邦彦, 安斎千恵子. わが国でみられる嚢胞性線維症(cystic fibrosis)—その実態と診断方法—日本胸部臨牀, 68(8): 693-705, 2009.
- 19) 吉村邦彦. Cystic fibrosis. 日本胸部臨牀, 69(8): 723-733, 2010.
2. 学会発表
- 1) 泉川公一, 坂本憲穂, 関 雅文, 澤井豊光, 掛屋 弘, 山本善裕, 柳原克紀, 迎寛, 吉村邦彦, 河野 茂. 当院で経験した嚢胞性線維症の3例と遺伝子多型について. 第48回日本呼吸器学会総会, 神戸(神戸ポートアイランド), 2008年6月15-17日.
- 2) 蛸井浩行, 林 宏紀, 服部久弥子, 阿部信二, 神尾孝一郎, 森本泰介, 松本亜紀, 赤川玄樹, 臼杵二郎, 吾妻安良太, 弦間昭彦, 吉村邦彦. CFTR 遺伝子変異を認めた副鼻腔気管支症候群の兄弟例. 第182回日本呼吸器学会関東地方会, 東京(エーザイ本社), 2008年11月15日.
- 3) 蛸井浩行, 林 宏紀, 服部久弥子, 阿部信二, 神尾孝一郎, 森本泰介, 松本亜紀, 赤川玄樹, 吾妻安良太, 吉村邦彦, 弦間昭彦. CFTR 遺伝子異変を認めた副鼻腔気管支症候群の兄弟例. 第7回DPB・難治性気道疾患研究会, 東京(品川コンファレンス), 2009年2月7日.
- 4) 吉村邦彦. 呼吸器疾患の発症と病態に関する分子遺伝学. 第13回東邦大学呼吸器セミナー, 東京(東邦大学大森医療センター), 2010年2月22日.
- 5) Yoshimura K, Anzai C, Tsujikawa Y, Ejima M, Tomoyasu H. Analysis of CFTR gene mutations in 24 Japanese individuals with cystic fibrosis. European Respiratory Society Annual Congress 2010, Barcelona, Spain, September 18-22, 2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

嚢胞性線維症における SLC26 の役割

研究報告者 石黒 洋 名古屋大学大学院健康栄養医学 教授

共同研究者

山本明子, Song Ying, Andrew Stewart, 中莖みゆき, 近藤孝晴 (名古屋大学大学院健康栄養医学)

洪 繁 (名古屋大学大学院医学系研究科消化器内科学)

藤木理代, 北川元二 (名古屋学芸大学管理栄養学部栄養学科)

成瀬 達 (みよし市民病院)

【研究要旨】

強制発現系を用いた研究により, SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- exchanger の活性は CFTR に依存し, 両者は協調して HCO_3^- 輸送を担うとされている. 本研究では, モルモット及び Slc26a6 ノックアウトマウスの膵臓から単離した小葉間膵管を用いて *in vivo* における機能連関を検討した. BCECF を用いて細胞内 pH を測定し, アルカリ負荷後の管腔内 Cl^- に依存する HCO_3^- 分泌 (Cl^- - HCO_3^- exchange) を測定した. モルモット膵管及びワイルドタイプマウス (+/+) 膵管では, cAMP 刺激下の Cl^- 依存性 HCO_3^- 分泌は, CFTRinh-172 (CFTR の阻害剤) を加えると増強された. Slc26a6 (-/-) 膵管では, CFTRinh-172 を加えると逆に Cl^- 依存性 HCO_3^- 分泌が減少した. SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- exchanger は CFTR を代償していると考えられる.

A. 研究目的

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) は, 膵導管や気道上皮などに発現する陰イオンチャネルであり, 嚢胞性線維症 (cystic fibrosis; CF) の原因分子である. 強制発現系を用いた研究により, CFTR は, SLC26 陰イオン輸送体ファミリー蛋白と分子複合体を形成する (図 1) ことにより, HCO_3^- 輸送を担うと考えられている¹⁾. SLC26 のいくつかは, 上皮膜組織の管腔膜に発現し, Cl^- - HCO_3^- exchanger として機能する²⁾. 膵導管細胞には, SLC26A3 と SLC26A6 が存在する³⁾ が, 生理学的なデータから SLC26A6 が主要な Cl^- - HCO_3^- exchanger であろうと考えられている^{4,5)}.

本研究では, まず, 膵液の HCO_3^- 濃度がヒトと同様に高いモルモットの膵臓から単離した小葉間膵管を用いて, 管腔膜の Cl^- - HCO_3^- exchanger の HCO_3^- 分泌における生理学的役割及び CFTR との機能連関を解析した. さらに, Slc26a6 ノックアウトマウス⁶⁾ の膵臓から単離した小葉間膵管を用いて, 膵導管細胞管腔

膜を介する HCO_3^- 分泌における SLC26A6 と CFTR との相互作用を解析した.

B. 研究方法

- ① モルモットから膵臓を摘出し, コラゲナーゼで処理した後, 実体顕微鏡下で直径約 $100 \mu\text{m}$ の小葉間膵管を単離した. pH 感受性蛍光色素である BCECF を用いた microfluorometry により細胞内 pH を測定した. 単離膵管を microperfusion し, 表層を HCO_3^- - CO_2 緩衝液で, 管腔内を HCO_3^- を含まない HEPES 緩衝液 (140 mM Cl^-) で灌流し, acetate pulse (20 mM) により膵導管細胞にアルカリ (HCO_3^-) 負荷した (図 2). 表層灌流液に H_2DIDS (0.5 mM) を加えて基底側膜を介する HCO_3^- efflux を阻害しておけば, 細胞内 pH の変化 (低下) を測定することにより管腔膜を介する Cl^- 依存性の HCO_3^- efflux (HCO_3^- 分泌) を経時的に観察することができる.
- ② 単離膵管の表層と管腔内を HCO_3^- - CO_2 緩衝液で灌流し, 管腔灌流液の Cl^- 除去お

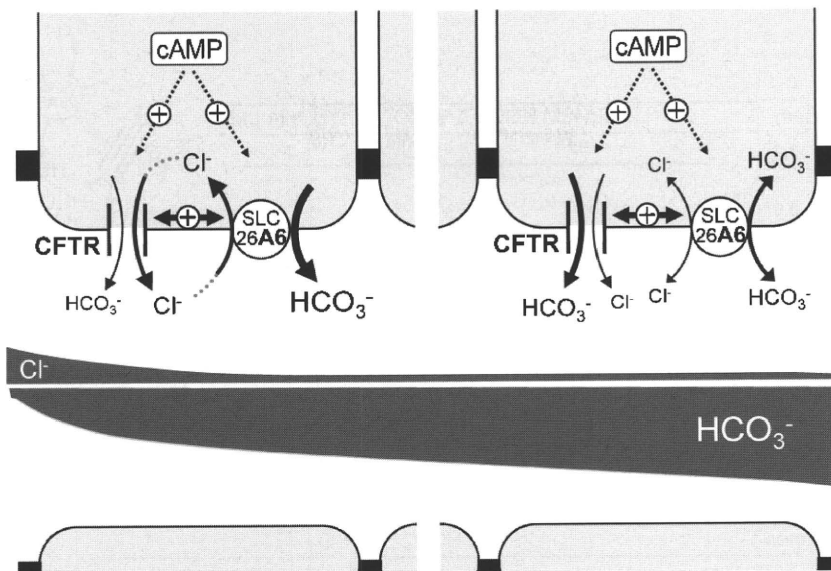


図1 膵導管細胞の HCO_3^- 分泌における SLC26A6 の役割 (仮説)

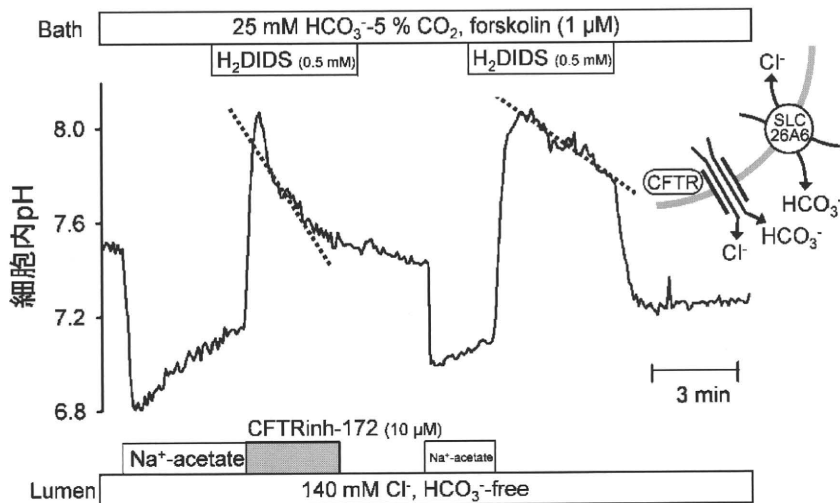


図2 CFTR 阻害剤が Cl^- 依存性 HCO_3^- 分泌に及ぼす影響

よび負荷による細胞内 pH の変化から管腔膜上の Cl^- - HCO_3^- exchange 活性を解析した(図3). 管腔灌流液の Cl^- 除去による細胞内 pH の上昇は細胞内 $\text{Cl}^- \rightleftharpoons$ 管腔内 HCO_3^- 交換輸送, 管腔内 Cl^- 負荷による細胞内 pH の低下は管腔内 $\text{Cl}^- \rightleftharpoons$ 細胞内 HCO_3^- 交換輸送を示す.

- ③ Slc26a6 ノックアウトマウスの膵臓から小葉間膵管を単離した. ①と同様の方法によって, 管腔膜を介する Cl^- 依存性の HCO_3^- efflux (HCO_3^- 分泌)を測定した.

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋大学医学部動物実験委員会(承認番号20020, 21243)および名古屋大学医学

部組織換え DNA 実験安全委員会(承認番号08-50)の承認を受けて行った.

C. 研究結果

- ① 実験は, forskolin ($1 \mu\text{M}$)を用いて cyclic AMP によって最大刺激された条件で行った. CFTR 阻害剤としては, CFTRinh-172を $10 \mu\text{M}$ の濃度で用いた. 管腔内灌流液に CFTRinh-172を加えると, アルカリ (HCO_3^-)負荷後の管腔膜を介する Cl^- 依存性の HCO_3^- 分泌が促進された(図2).
- ② 管腔内灌流液に CFTRinh-172を加えると, 管腔膜上の Cl^- - HCO_3^- exchange が促進された(図3).