

Mamld1は、マウスライディッヒ腫瘍細胞において、 ステロイド合成酵素遺伝子Cyp17a1の発現調節を介し、 テストステロン産生に関わっている

北海道大学大学院 医学研究科 腎泌尿器外科学分野
中村美智子、野々村克也

(独)国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部
中村美智子、深見 真紀、宮戸 真美、須川 史啓、緒方 勤

要 旨

【背景】MAMLD1は、尿道下裂の責任遺伝子である。これまでの研究から、MAMLD1は胎児性分化臨界期の精巣におけるテストステロン産生に関与し、その変異はテストステロンの産生量低下を介して尿道下裂を引き起こすと考えられている。しかしながら、MAMLD1がどのような機序でテストステロン産生を制御しているかは未解明である。今回われわれは、この機序を解明するため、マウスライディッヒ腫瘍細胞を用いて、Mamld1ノックダウン実験を行った。

【対象と方法】マウスライディッヒ腫瘍細胞(MLTC-1)において、siRNAを用いてMamld1の発現を一過性に抑制し、1)コレステロールからテストステロンへ至る8種類のステロイドホルモン代謝産物濃度、2)内在性コントロール遺伝子β2-microglobulinに対する相対的遺伝子発現量、3)MLTC-1細胞数を測定した。

【結果】Mamld1の発現抑制により、17-ヒドロキシプレグネロン、17-ヒドロキシprogesterone、DHEA、アンドロステンジオン、テストステロンが有意に減少し、Cyp17a1のmRNA発現量が有意に低下した。Mamld1の発現抑制効果は3日目まで続いたが、その間MLTC-1の細胞数はコントロールと比べて変わらなかった。

【結語】Mamld1は、精巣のライディッヒ細胞において、ステロイド合成酵素遺伝子Cyp17a1の発現調節を介し、テストステロン産生に関わっていると考えられる。

キーワード：Mamld1ノックダウン、テストステロン、Cyp17a1

緒 言

尿道下裂は出生男児約250人に1人の割合で発症する性分化疾患(disorder of sex development, DSD)であり、外尿道口の腹側への開口、陰茎の腹側への屈曲、背側の余剰包皮を特徴とする¹⁾。胎児期の陰茎や尿道の形成にはアンドロゲン効果が必須であり、尿道下裂はその効果が低下することにより発症する。アンドロゲン効果の低下には、アンドロゲンの合成や反応に関わる遺伝子の異常といった遺伝的要因や、内分泌かく乱物質、母体への薬物投与などの環境要因が影響する。

MAMLD1 (Mastermind-like domain containing 1)は、ヒト染色体Xq28から単離された尿道下裂の責任遺伝子であり²⁾、現在までにナンセンス変異を含む複数の機能喪失変異が同定されている³⁻⁴⁾。これまでの研究から、マウス相同遺伝子Mamld1が胎児性分化臨界期のライディッヒ細胞とセルトリ細胞で強く発現していること²⁾、small interfering RNA (siRNA)を用いたMamld1の発現抑制により、マウスライディッヒ腫瘍細胞(MLTC-1)のテストステロン産生量が有意に減少する⁵⁾ことが分かっている。さらに、MAMLD1/Mamld1は性ホルモン合成経路に関わる遺伝子群の発現を調節するNR5A1 (SF-1, AD4BP)⁶⁾の推定結合領域である“CCAAG-GTCA”配列をプロモーター領域に持っており、NR5A1蛋白によりその転写が活性化されることも報告されている⁵⁾。これらのことから、MAMLD1/Mamld1は、胎児性分化臨界期における精巣でのテストステロン産生に関与し、その異常はテストステロンの産生低下を介して尿道下裂を引き起こすことが示唆される。しかしながら、MAMLD1/Mamld1がテストステロン産生をどのように制御しているかは未解明である。さらに、Mamld1は非古典的Notchシグナルの標的遺伝子であるHes

3の転写活性化能を有しているが⁵⁾、この機能がライディッヒ細胞におけるテストステロン産生と関連があるかも不明である。

そこで今回、Mamld1発現抑制時の、テストステロン産生の制御機序の解明を目的として、MLTC-1におけるさらに詳細なノックダウン実験を行った。

対象と方法

マウスライディッヒ腫瘍細胞(MLTC-1) (ATCC, CRL-2065™)を継代培養して使用した。MLTC-1は、human chorionic gonadotropin (hCG)への反応性、テストステロン産生能を保持しているcell lineである⁷⁻⁹⁾。培養は、培養液として10% FBSを含むRPMI 1640培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件下で行った。

遺伝子発現抑制法：MLTC-1に、Mamld1特異的配列を有する2種類のsiRNA (siRNA1 (sense : GCUUCCAGUUC AGAUGCCATT ; anti-sense : UGGCAUCUGAACUGGA AGCTT)、siRNA2 (sense : GGAACUAACCAAAAUUC AATT ; anti-sense : UUGAAUUUUGGUUAGUUCCTC))、もしくはnegative controlとして非特異的なコントロール配列を持つnon-targeting RNA (4611G) (Life Technologies) (最終濃度20 nM)を、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies)を用いて導入した。内在性コントロール遺伝子B2m (β2-microglobulin)に対するMamld1の相対的mRNA発現量は、TaqMan real-time PCR法で、ABI PRISM 7000 (Life Technologies)を使って測定し、実験ごとに、RNA干渉(RNAi)の有効性を確認した (Assay No. : Mamld1 : Mm01293665_m1 ; B2m : Mm00437762_m1)。

ステロイドホルモン代謝産物濃度の測定：MLTC-1は、テストステロンの産生能を有しているが、17α-hydroxylaseと

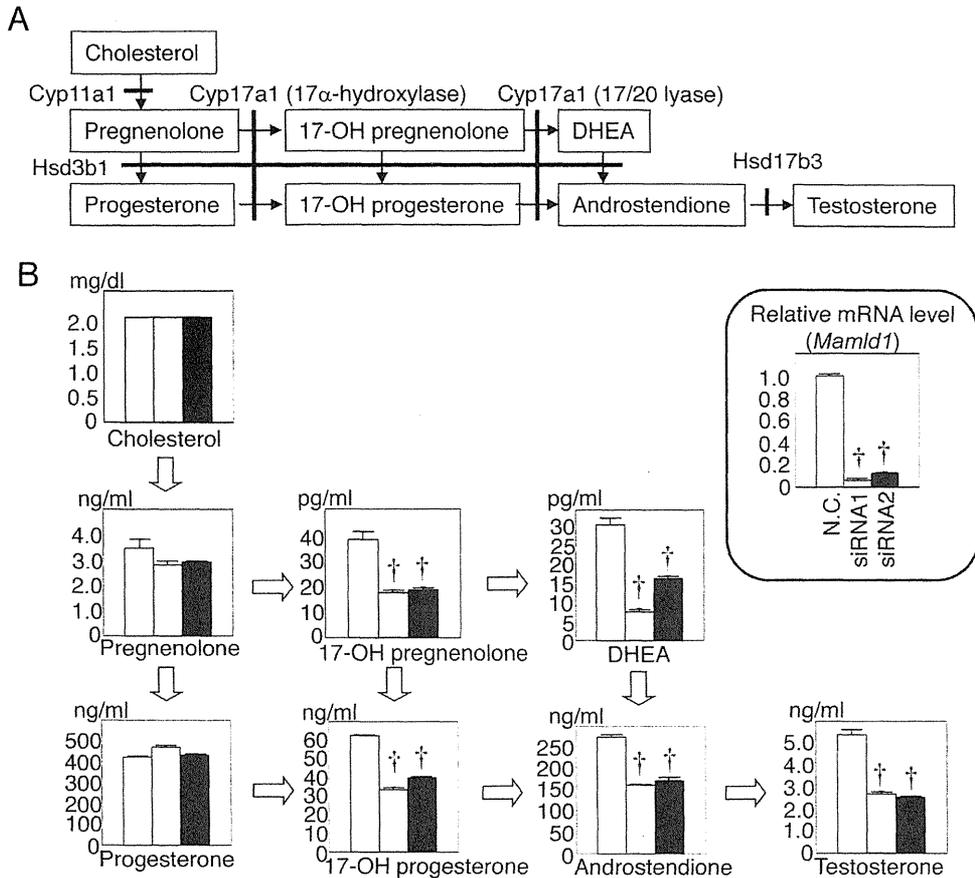


図1:ステロイドホルモン代謝産物
 A コレステロールからテストステロンへ至るステロイドホルモン合成経路
 B ステロイドホルモン代謝産物濃度とホルモン測定時の *Mamld1* mRNA発現量 (real-time RT-PCR)
 □ : negative control, ◻ : siRNA1, ■ : siRNA2
 * : $P < 0.05$; † : $P < 0.01$

Hsd17b3の活性が低い(ため⁷⁾、その量は少ない。また、MLTC-1は、hCGへの反応性を保持している。そこで、siRNAもしくはnon-targeting RNAを導入したMLTC-1を、12穴プレート、培養液1mlで48時間培養(細胞数: 1×10^5 cells/well)した後、hCG (Mochida Pharmaceutical)を、最終濃度50IU/Lとなるように添加した。hCG添加後1時間で培養上清を回収し、テストステロンならびにコレステロールからテストステロン産生へ至る経路の代謝産物濃度を、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)法によって測定した(ASKA Pharma Medical)。

遺伝子発現解析: real-time RT-PCRとマイクロアレイを用いて、解析を行った。これらに用いたRNAは、ステロイドホルモン代謝産物濃度を測定した際に、MLTC-1からRNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)、TURBO DNA-free Kit (Life Technologies)を用いて抽出、精製した。real-time RT-PCRでは、1 μ gのRNAをHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies)でcDNAに逆転写した後、ABI PRISM 7000 (Life Technologies)を使ったTaqman Gene Expression Assayによって、*B2m*に対する相対的なmRNA発現量を算出した。今回は、ステロイド合成に関わる遺伝子と、ライディッヒ細胞から分泌されるホルモンの1つで、精巣導帯の発達に関わり、機能低下により停留精巣を生じる*Insl*

3¹⁰⁻¹¹)を測定した(Assay No.: *Sfl*: Mm00446826_m1; *Star*: Mm00441558_m1; *Cyp11a1*: Mm00490735_m1; *Hsd3b1*: Mm01261921_mH; *Cyp17a1*: Mm00484040_m1; *Insl3*: Mm01340353_m1) (Life Technologies)。マイクロアレイによる解析には、300ngのRNAをテンプレートにして、RNA Spike-In Kit (one-color, Agilent)、Quick Amp Labeling Kit (one-color Agilent)を用いて、Cyanine-3でCTPを標識したcRNAを合成した。このcRNAをWhole Mouse Genome Oligo Microarray (4 \times 44 K G4122F) (Agilent Technologies)上でハイブリダイゼーションさせ、Agilent Scannerで蛍光シグナルを検出し、GeneSpring GX10 (Tomy Digital Biology)を用いて解析した。

細胞増殖実験: *Mamld1*発現抑制下でのMLTC-1の生細胞数を、CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega)を用いて、比色定量法で測定した。これは、生細胞数と吸光度に正の相関があることを利用した方法である¹²⁻¹³)。96穴プレートでsiRNAもしくはnon-targeting RNAを導入した 1×10^4 cell/wellのMLTC-1を培養し、24時間ごとに、プレートリーダー (Molecular Devices)を使って490 nmの吸光度を測定した。

統計解析: グラフは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析はStudent's *t*-testもしくはMann-Whitney's *U*-test.で行

い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

ステロイドホルモン代謝産物濃度(図1):

図1Bに、siRNAを用いてMamld1の発現を抑制したMLTC-1ならびにnegative controlの培養上清における、コレステロールからテストステロンへ至る8種類のステロイドホルモン代謝産物(コレステロール、プレグネノン、プロゲステロン、17-ヒドロキシプレグネノン、17-ヒドロキシプロゲステロン、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)、アンドロステンジオン、テストステロン)濃度を示した。本実験におけるMamld1 mRNA発現量は、siRNA1、siRNA2各々、negative controlの約6% ($P=0.0000060$)、13% ($P=0.0000019$)に減少しており、RNAiが有効に行われたことが確認された。negative controlにおいて、17-ヒドロキシプロゲステロンやアンドロステンジオンは、17-ヒドロキシプレグネノンやDHEAに比べて、その濃度が高く、MLTC-1におけるテストステロンの主たる産生経路は、通常のマウスと同様、プロゲステロンから17-ヒドロキシプロゲステロン、アンドロステンジオンへと進む Δ^4 の経路であると考えられた。そして、Mamld1発現抑制下でも、コレステロール、プレグネノン、プロゲステロン濃度は、negative controlと同等であった。しかし、17-ヒドロキシプレグネノン、17-ヒドロキシプロゲステロン、DHEA、アンドロステンジオン、テストステロンの濃度は、siRNAを用いてMamld1の発現を抑制したMLTC-1で、negative controlに比べて有意に低下していた。(17-ヒドロキシプレグネノン: siRNA1 ($P=0.0031$)、siRNA2 ($P=0.0037$)、17-ヒドロキシプロゲステロン: siRNA1 ($P=0.00071$)、siRNA2 ($P=0.00010$)、DHEA: siRNA1 ($P=0.00051$)、siRNA2 ($P=$

0.0025)、アンドロステンジオン: siRNA1 ($P=0.00029$)、siRNA2 ($P=0.0028$)、テストステロン: siRNA1 ($P=0.0016$)、siRNA2 ($P=0.00065$)。

遺伝子発現解析(図2):

siRNAを用いてMamld1の発現を抑制したMLTC-1では、real-time RT-PCR(図2A)、マイクロアレイ(図2B)の両方で、Cyp17a1の発現量が有意に減少していた(Cyp17a1 mRNA発現量: siRNA1: 56% ($P=0.0012$); siRNA2: 66% ($P=0.00077$), fold change: siRNA1: 0.5328 ($P=0.00027$); siRNA2: 0.721362 ($P=0.026$))。Cyp11a1とHsd3b1の発現量も、siRNA1を用いて発現抑制したMLTC-1では減少が認められたものの、siRNA2を用いた場合には再現性がなかった。また、Nr5a1(Sf1)、Star、Por、Ins3に関しては、negative controlと比較して、特に変化はなかった。

他に、今回の実験では、マイクロアレイ解析で、siRNA1、siRNA2ともに、fold changeが有意差をもって2倍以上の数値をとった遺伝子が47、0.5以下の数値をとった遺伝子が38同定された(data not shown)。その中には、Notchシグナルに関連が認められる遺伝子であるHey1が含まれていたが(fold change: siRNA1 2.14 ($P=0.0015$)、siRNA2: 2.59 ($P=0.0022$))、Hes3に変化は認めなかった(fold change: siRNA1 0.92 ($P=0.80$)、siRNA2 1.43 ($P=0.35$))。

細胞増殖実験(図3):

本実験におけるMamld1 mRNA発現量は、negative controlに対して、siRNA1、siRNA2それぞれ常に8-14% ($P=0.00000054-0.0041$)、11-15% ($P=0.0000011-0.0047$)であり、抑制効果は72時間の時点でも維持されていた(図3A)。24、

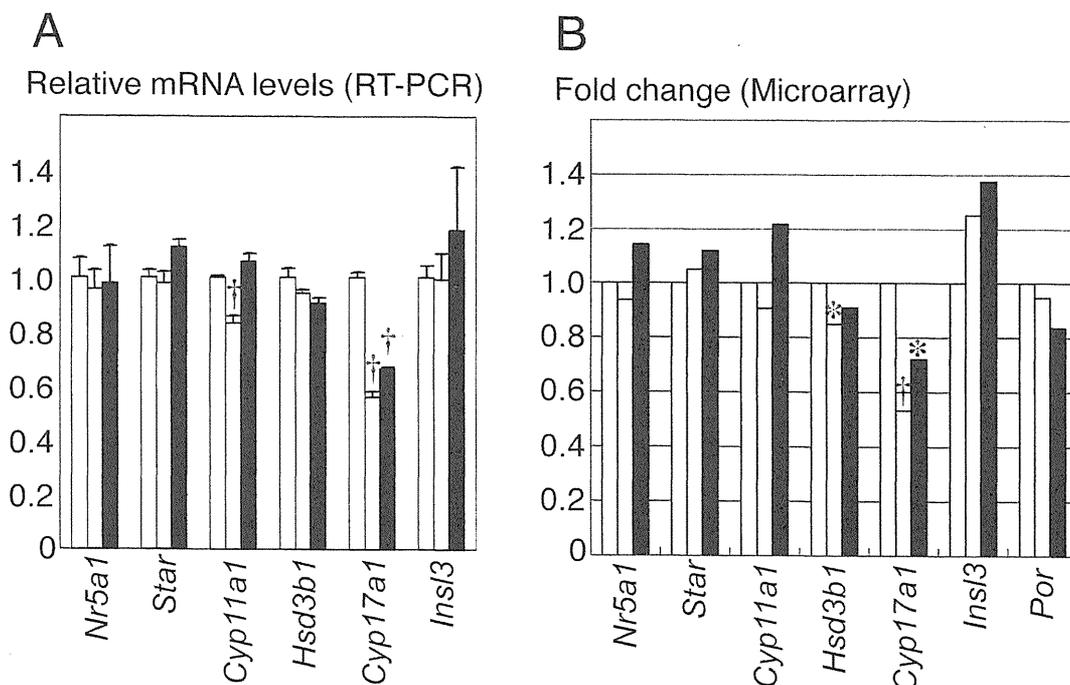


図2: 遺伝子発現解析

A real-time RT-PCRにおける相対的mRNA発現量

B マイクロアレイにおけるfold change

□: negative control、◻: siRNA1、◼: siRNA2

*: $P < 0.05$; †: $P < 0.01$

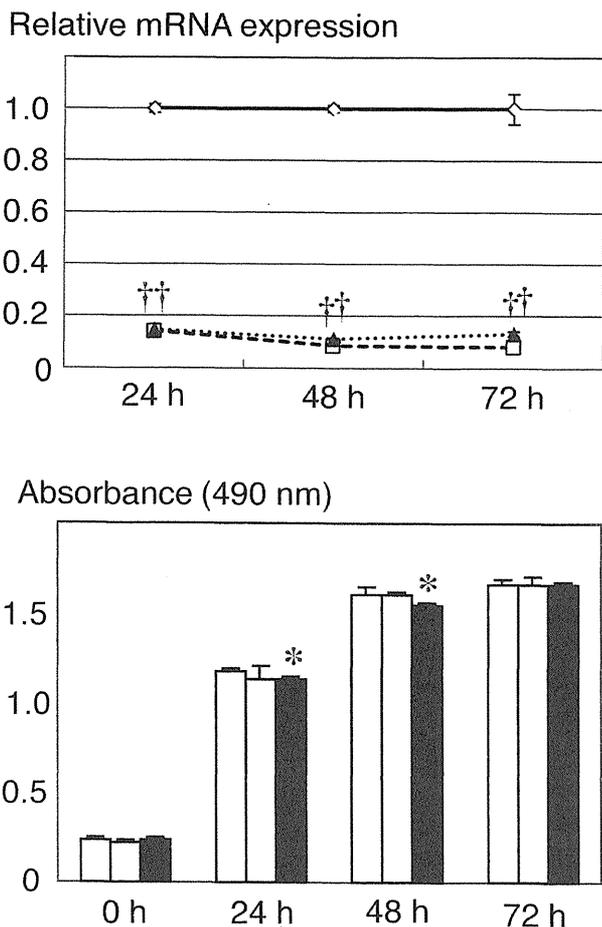


図3：細胞増殖実験
 A Mamld1 mRNA発現量 (real-time RT-PCR)
 B 吸光値 (490 nm)
 □ : negative control、◻ : siRNA1、◼ : siRNA2
 * : $P < 0.05$; † : $P < 0.01$

48時間の時点でsiRNA2を用いて発現抑制したMLTC-1の細胞数が有意に減少していたものの ($P=0.049$, $P=0.023$)、siRNA1での減少は見られず、72時間の時点では、細胞数はsiRNA1、siRNA2とも、negative controlと同等であった (図3B)。

考 察

MLTC-1において、siRNAによるMamld1の発現抑制によって、テストステロン濃度が減少し、Cyp17a1の発現量も減少した。このことは、Mamld1がテストステロンの産生に影響を及ぼしているというこれまでの報告に合致し、さらに、少なくともMLTC-1においては、Mamld1とCyp17a1が相互作用するということを初めて示唆するものである。

Mamld1は胎仔のライディッヒ細胞とセルトリ細胞には発現しているが、副腎にはほとんど発現が見られない^{2,14)}。また、Cyp17a1の発現はライディッヒ細胞におけるテストステロン産生に必須である¹⁵⁾。これらのことから、Mamld1は、ライディッヒ細胞においてCyp17a1の発現を主に調節し、男性の性分化に必要な量のテストステロンを産生するのに必要であると考えられる。加えて、Mamld1の発現を抑制したMLTC-1では、テストステロン産生に関わる他の遺伝子の発現量や、Insl3の発現量に明らかな影響はなかった。よって、Mamld1の発現抑

制が、MLTC-1の全般的な機能低下を来して、結果的にテストステロンの分泌低下を招くという可能性は考えづらく、Cyp17a1に特異的に作用した結果であると考ええる。しかしながら、Cyp17a1の発現量が減少したこと、17 α -hydroxylaseが低下したことを直接的に結び付けるのは難しい。17 α -hydroxylaseと17/20 lyaseは、どちらもCyp17a1酵素が利用されるが¹⁵⁾、17/20 lyase活性は、Mamld1の発現を抑制しても保持されていた。また、17 α -hydroxylase欠損症は常染色体劣性の疾患であり、50%の酵素活性の低下時にはステロイド合成にほとんど影響を及ぼさないが¹⁵⁾、今回の実験では、Cyp17a1に多い時には70%程度の発現量が残っていたにも関わらず、17-ハイドロキシプロゲステロンと17-ハイドロキシプレグネロン濃度の有意な減少、すなわち17 α -hydroxylase活性の低下が起こった。MLTC-1は元来、17 α -hydroxylase活性は低いが、17/20 lyaseは比較的良好に保持された細胞株である (図1)⁷⁾。今回、このようなMLTC-1自体の特徴的な性質によって、Mamld1の発現を抑制した際の17 α -hydroxylase活性の低下が顕著になったのかもしれない。

非古典的Notchシグナル標的遺伝子であるHes3⁵⁾の発現量は、Mamld1の発現を抑制しても、明らかな増減は認められなかった。Mamld1はHes3の転写活性化能を有しており、Hes3はMAMLD1変異体におけるin vitroでの転写活性の評価に有効である⁵⁾。加えて、異なる細胞が共存する精巣内では、Notchシグナルが胎児ライディッヒ細胞の分化に関与しているとの報告があり¹⁶⁾、さらに今回、Notchシグナルに関わる遺伝子の1つであるHey1¹⁷⁻¹⁹⁾は、Mamld1の発現を抑制することで、発現量が上昇した。しかしながら、これまでに、テストステロン産生をはじめとして、Hes3とHey1の作用を示唆する報告はない。また、Hes3はMLTC-1においては発現が見られるが⁵⁾、性分化臨界期におけるマウス胎仔性腺での発現は認められない¹⁶⁾。これらのことから、Hes3を介した非古典的Notchシグナルは、Mamld1とCyp17a1の作用、ひいてはテストステロン産生に関連がないことが考えられる。その他、マイクロアレイによる解析では、Mamld1の発現を抑制することにより、多数の遺伝子の発現量が増減したが、これまでにテストステロン産生に影響を及ぼすことが知られている遺伝子は同定できなかった。したがって、どのようにMamld1がCyp17a1の発現を制御し、テストステロン産生に関わっているかを解明することは出来ていない。

細胞増殖実験では、Mamld1の発現を抑制しても、MLTC-1の生細胞数の減少ははっきりしなかった。これは図1で見られたテストステロンをはじめとするステロイドホルモン代謝物濃度の減少が、MLTC-1の細胞数の違いによるものではないことを示唆する。しかしながら、MLTC-1のdoubling timeは35-40時間と言われており⁸⁾、細胞増殖における長期的な影響までは、今回の実験では言及できない。また、MLTC-1は腫瘍細胞株であるため、in vivoでのライディッヒ細胞とは異なった増殖形態をとっていることも考えられる。以上のことから、MAMLD1の変異が、出生までに多数回の細胞分裂が起こるライディッヒ細胞にどの程度影響するのか、尿道下裂の表現型にどのような影響を与えるのか、今回の実験では明らかにならなかった。

さらに、MLTC-1は、ライディッヒ細胞であるが、アダルトの腫瘍細胞であることから、今回の実験が、胎仔性分化臨界

期のin vivoの状態を正確に反映しているとはいえない。また、胎仔精巣ではセルトリ細胞でもMamld1が発現しているが^{2,14)}、今回は単一の細胞での増殖能や機能を見ているため、精巣での他の細胞との相互作用や、Notchシグナルとの関連が見いだせていない可能性もある。しかし、これらの問題点はあるにせよ、MLTC-1はテストステロンを産生するというライディッヒ細胞たる特徴を残した細胞株であり、Mamld1が、精巣のライディッヒ細胞において、Cyp17a1の発現調節を介し、テストステロン産生に関わっていることは明らかにできたと考える。また逆に、アダルトの細胞であるMLTC-1で、Mamld1の発現を抑制すると、テストステロン分泌低下を来したことから、MAMLD1変異陽性の尿道下裂症例では、出生後も性腺機能が低下している可能性が考えられるが、まだそのような報告はない。MAMLD1のような精巣に発現し、性腺機能に異常を来す可能性のある遺伝子変異を持った尿道下裂患者のスクリーニングと、尿道下裂修復術後の長期にわたる性腺機能のフォローも、尿道下裂における今後の重要な問題であると考ええる。

以上より、Mamld1は、Hes3に関連する非古典的Notchシグナルを介することなく、主にライディッヒ細胞におけるCyp17a1の発現を調節することにより、男性の性分化に必要な量のテストステロンを産生することが示唆される。そして、胎児期のMAMLD1発現量低下は、Cyp17a1の発現量の低下を生じ、アンドロゲンの産生量を減少させ、尿道下裂の原因となっていることが考えられた。今回の研究はMLTC-1を用いたin vitroの実験であるが、尿道下裂を含む46XY DSDに関連する因子を明らかにするのに有用であると考ええる。

参 考 文 献

- 1) Borer, JH., Retik, AB. : Hypospadias. In Campbell-Walsh Urology, 9th ed., pp3703-3704, Saunders Co., Philadelphia, 2006.
- 2) Fukami, M., Wada, Y., Miyabayashi, K., et al : CXorf6 is a causative gene for hypospadias. Nat. Genet., 38, 1369-1371, 2006.
- 3) Chen, Y., Thai, HT., Lundin, J., et al : Mutational study of the MAMLD1-gene in hypospadias. Eur. J. Med. Genet., 53, 122-126, 2010.
- 4) Kalfa, N., Liu, B., Klein, O., et al : Mutations of CXorf6 are associated with a range of severities of hypospadias. Eur. J. Endocrinol., 159, 453-458, 2008.
- 5) Fukami, M., Wada, Y., Okada, M., et al : Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1 or CXorf6) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. J. Biol. Chem., 283, 5525-5532, 2008.
- 6) Lin, L., Achermann, JC. : Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. Sex. Dev., 2, 200-209, 2008.
- 7) Panesar, NS., Chan, KW., Ho, CS. : Mouse Leydig tumor cells produce C-19 steroids, including testosterone. Steroids, 68, 245-251, 2003.
- 8) Rebois, RV. : Establishment of gonadotropin-responsive murine leydig tumor cell line. J. Cell Biol., 94, 70-76, 1982.
- 9) Ascoli, M., Puett, D. : Gonadotropin binding and stimulation of steroidogenesis in Leydig tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 75, 99-102, 1978.
- 10) Nef, S., Parada, LF. : Cryptorchidism in mice mutant for Ins13. Nat. Genet., 22, 295-299, 1999.
- 11) Hughes, IA., Acerini, CL. : Factors controlling testis descent. Eur. J. Endocrinol., 159 Suppl 1, 75-82, 2008.
- 12) Berridge, MV., Tan, AS. : Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch. Biochem. Biophys., 303, 474-482, 1993.
- 13) Cory, AH., Owen, TC., Barltrop, JA., et al : Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun., 3, 207-212, 1991.
- 14) Ogata, T., Laporte, J., Fukami, M. : MAMLD1 (CXorf6): a new gene involved in hypospadias. Horm. Res., 71, 245-252, 2009.
- 15) Achermann, JC., Hughes, IA. : Disorders of sex development. In Williams textbook of endocrinology, 11th ed., pp783-848, Saunders Co., Philadelphia, 2008.
- 16) Tang, H., Brennan, J., Karl, J., et al : Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. Development, 135, 3745-3753, 2008.
- 17) Bolos, V., Grego-Bessa, J., de la Pompa, JL. : Notch signaling in development and cancer. Endocr. Rev., 28, 339-363, 2007.
- 18) Katoh, M. : Integrative genomic analyses on HES/HEY family : Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. Int. J. Oncol., 31, 461-466, 2007.
- 19) Kageyama, R., Ohtsuka, T., Kobayashi, T. : The Hes gene family : repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. Development, 134, 1243-1251, 2007.

泌尿器科 Urological Nursing ケア

泌尿器科領域のケア専門誌

2011 年夏季増刊 (通巻 184 号)

「見ること・することリストで一目瞭然！
術式別泌尿器科の術前・術後ケア」

2011 年 6 月 1 日発行

MC メディカ出版

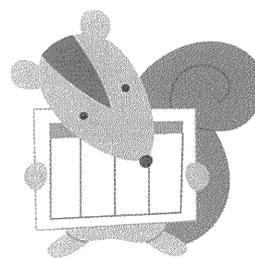
21

[精巣の手術]

高位精巣摘除術

● 見ること・することリスト

| | 医師の処置 | ナースが見ること・聞くこと (観察事項) |
|-----------|---|---|
| 術前 | <ul style="list-style-type: none"> ● 全身状態の確認 ● 術前検査データの再確認 ● 手術説明 ● 各種同意書の確認 ● 麻酔科受診の指示 ● 術後指示の確認 | <ul style="list-style-type: none"> ● 全身状態の確認 ● 術前データの再確認 ● 現在の症状の確認 ● 病状や手術に対する受け止めの確認 ● 患者と家族の将来についての思いの確認 (孝児希望の有無) |
| 手術当日 | <ul style="list-style-type: none"> ● バイタルサイン、全身状態の確認 ● 患者本人の確認 ● 患側の確認 | <ul style="list-style-type: none"> ● バイタルサイン、全身状態の確認 ● 手術搬送時の患者の確認 |
| 術直後 | <ul style="list-style-type: none"> ● バイタルサイン、全身状態の確認 ● 麻酔レベルおよび覚醒状態の確認 ● 完全覚醒後の経口摂取開始の指示 ● 施行された手術の説明 | <ul style="list-style-type: none"> ● 術中の状況の確認 ● バイタルサイン、全身状態の確認 ● 麻酔レベルおよび覚醒状態の確認 ● ドレーン排液の性状・量の確認 ● 創部の確認 ● 陰嚢の腫脹の有無の確認 ● 創部・陰嚢部痛の有無の確認 ● 手術に対する疑問点の確認 |
| 術後 1日目 | <ul style="list-style-type: none"> ● バイタルサイン、全身状態の確認 ● ドレーン排液の性状・量の確認 ● 創部の確認 ● 創部・陰嚢の圧迫の解除 ● 採血結果の確認 ● 安静解除の指示 ● 膀胱留置カテーテルの抜去 | <ul style="list-style-type: none"> ● バイタルサイン、全身状態の確認 ● ドレーン排液の性状・量の確認 ● 創部の確認 ● 陰嚢の腫脹の有無の確認 ● 疼痛の確認 ● 血液検査の確認 ● 安静度の確認 ● 経口摂取の状態の確認 ● 膀胱留置カテーテル抜去後の排尿状態の確認 |
| 退院まで | <ul style="list-style-type: none"> ● 全身状態の確認 ● 創部の確認 ● 次回受診日の確認 ● 退院の指示 | <ul style="list-style-type: none"> ● 全身状態の確認 ● 創部の確認 ● 手術後の思いや不安の確認 ● 今後の治療方針（化学療法の有無）について受け止めの確認 |



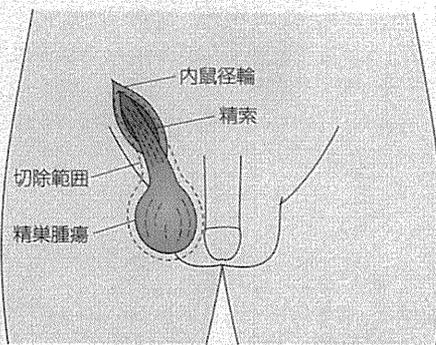
| ナースがすること (処置・ケア) | ナースの処置・ケアの 主な必要物品 |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ●精神的支援 ●術前オリエンテーション（手術前後の流れ、安静度、麻酔科指示、入室時間） ●末梢静脈血管の確保 ●消化管処置（坐薬、浣腸の使用） | <ul style="list-style-type: none"> ●術前オリエンテーション用紙 |
| <ul style="list-style-type: none"> ●消化管処置（坐薬、浣腸の使用） ●絶飲食の確認 ●着替え、身体装着物の取り外し ●弾性ストッキングの装着 ●手術室への搬送と看護師への申し送り ●術前補液の開始 | <ul style="list-style-type: none"> ●手術室看護師への申し送り表 |
| <ul style="list-style-type: none"> ●膀胱留置カテーテル、末梢静脈点滴などの管類の固定 ●ドレーンの状況確認と必要時ガーゼ交換 ●下肢圧迫装置の装着 ●体位変換 ●疼痛・発熱対処 ●抗菌薬投与 ●安静度の説明 ●家族の受け止めと精神的支援 ●経口摂取開始時の観察 ●補液、抗菌薬の投与 | <ul style="list-style-type: none"> ●固定用テープ、ガーゼ、聴診器 |
| <ul style="list-style-type: none"> ●安静解除後行動拡大 ●疼痛・発熱の対処 ●ドレーンの状況確認と必要時ガーゼ交換 | <ul style="list-style-type: none"> ●固定用テープ、ガーゼ、聴診器 |
| <ul style="list-style-type: none"> ●精神的支援 ●退院時指導 ●退院処方の調整 ●次回受診日の伝達 | <ul style="list-style-type: none"> ●退院時オリエンテーションの用紙 ●次回受診日、緊急連絡先の用紙 |

高位精巣摘除術

手術DATA

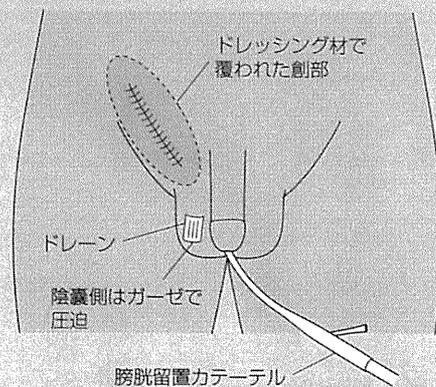
- 平均手術時間 約1時間
- 麻酔法 腰椎麻酔または全身麻酔
- 手術体位 仰臥位
- 手術費用 精巣悪性腫瘍手術9,460点 (K-833)

手術部位



精索を中枢側に内鼠径輪まで十分に剥離し、精索を精管と精巣血管などその他の組織を分けてそれぞれ絹糸で結紮、切断し精巣を摘出します。

術後のドレーン・カテーテル留置位置



最近ではドレーンを留置しないことも少なくありませんが、当院ではドレーンを留置し、筋膜、皮下、皮膚を縫合します。膀胱留置カテーテルを挿入します。最後に、陰嚢側から出血予防のためにガーゼを用いて圧迫します。

高位精巣摘除術とは

1. 手術の概要

当院では、以前は精巣腫瘍を疑う患者が受診したその日または翌日に緊急手術として高位精巣摘除術を行っていましたが、現在はいちばん早く予定手術として施行できる日に（一般的には1週間以内）に手術を施行しています。

麻酔は全身麻酔または腰椎麻酔で行います。腰椎麻酔の際には手術の際に精索の牽引に伴う痛みが生じることがあるため、第4胸髄レベル付近まで麻酔を十分に効かせる必要があります。その際にさらにレベル上昇することもあり、呼吸抑制、血圧低下などにも注意し、必要に応じて昇圧薬、酸素の投与も行います。

皮膚切開は、鼠径管に沿って皮膚を約7cm切開し、鼠径管を確認したのちに鼠径管を開放して精索を同定します。精索の周囲を剝離し、ネラトンカテーテルで精索を確保したのちに腫瘍細胞を播種させないように精索をネラトンカテーテルで縛ります。術前の検査で確実に精巣を摘出する場合は、太めの絹糸で精索を結紮します。続いて精索を遠位側（精巣の方向）に剝離を進め、陰嚢を裏返すようにしながら切開創より精巣を脱転し、精巣の状態を確認します。この時点で診断が疑わしい場合は、精巣生検を行うことがあります。精巣を摘出しない場合は、ネラトンカテーテルによるクランプを解除して精巣への血流を再開します。精巣腫瘍と診断し、摘除が必要と判断した場合は、精索を中枢側に内鼠径輪まで十分に剝離を進め、精索を精管と精巣血管などその他の組織を分けてそれぞれ絹糸で結紮、切断を行い、精巣を摘出します。この際の結紮糸は後腹膜リンパ節郭清の際の郭清組織の遠位端となるため、目印となるように長めに切っておきます。

十分に止血を行い、ドレーンを留置し（最近ではドレーンを留置しないことも少なくありません）、筋膜、皮下、皮膚を縫合します。膀胱留置カテーテルを挿入し、陰嚢側から出血予防のためにガーゼを用いて圧迫して終了します。

2
21

「精巣の手術」 高位精巣摘除術

2. 手術の適応

精巣腫瘍は、20～30歳の比較的若い男性に好発します。精巣腫瘍が発生すると、通常長径5 cm程度の精巣が徐々に大きくなり、場合によっては小児頭大になります。精巣の違和感や下腹部または鼠径部に鈍痛を認めることもあります。多くの場合発熱や痛みは伴わず、精巣が石のような硬さになります。精巣腫瘍のマーカーとして α -フェトプロテイン (AFP)、 β -ヒト絨毛性ゴナドトロピン (β -hCG) (またはhCG)、乳酸脱水素酵素 (LDH) がありますが、精巣腫瘍の診断に役立ちます。精巣腫瘍を疑った場合には高位精巣摘除術を行い、精巣組織を顕微鏡下に腫瘍細胞の有無、細胞の種類について調べます。

3. 手術の合併症

①出血、血腫

術中の出血はほとんどないか、あってもわずかですが、まれに陰嚢部に血腫が生じることがあります。時間の経過とともに軽快することがほとんどです。

②疼痛

創部の痛みが訴えられることがありますが、時間とともに軽快します。鎮痛薬が有効で、通常翌日から歩行を行うことができます。

③創部の腫脹

創部、とくに陰嚢の腫脹がみられます。手術に伴う腫脹は数日で引いてきます。

④創部感染

創に感染が生じると治りが悪く、創が開いてしまうことがまれにあります。その程度により、抗菌薬治療や創部洗浄などの追加治療が必要になることがあります。

⑤他臓器損傷

ごくまれですが、腸管や血管など他臓器の損傷が起こる可能性があります。

術前にすること

1. 医師の処置

①全身状態の把握

一般的には入院前に外来で行われていることが多く、手術に至るまでの期間が短いことからあまり変化はないかもしれませんが、手術前に再度確認します。第一に、病歴聴取を行います。主に疼痛、発熱の有無、陰囊内容の増大速度、陰囊・鼠径部手術歴の有無についてです。また、患者さんのこれまでの生活習慣や過去の疾患および治療の病歴、内服薬の状況（抗凝固薬など）についても調べ、とくに麻酔を含めた手術に影響がないか再度確認します。続いて、患部の所見を診察するために、陰囊の触診および超音波検査を行います。さらに腹部腫瘍、頸部リンパ節、鼠径部リンパ節腫脹の有無のチェックを行います。

②術前検査データの再確認

腫瘍細胞の種類、病期によって高位精巣摘除後の治療法が変わってきます。病期を決定する基準となっているのが、腫瘍マーカーと画像診断です。精巣腫瘍のマーカーとしてAFP、 β -hCG（またはhCG）、LDHが術前に採血をされているか確認します。また、全身状態の把握の1つとして血液検査での炎症反応の有無、肝機能・腎機能の異常の有無、凝固線溶系の異常の有無などについて確認します。画像診断では、可能な限り胸部X線写真、胸部・腹部CT検査を行い、他臓器への腫瘍転移の有無について把握します。肺転移がある場合は、呼吸器機能に影響を受けている場合があるため、術後に化学療法を行うことも考えると呼吸機能検査、動脈血液ガス検査も行っておいたほうが望ましいでしょう。

③手術説明、各種同意書の取得

外来受診から手術に至るまでの期間が比較的に短いため、患者さんとその家族にとって突然の出来事であり病状の把握が困難なことがあります。正確な理解が得られるように、よりていねいに説明を行うように心がけ、手術の同意を得ます。また、この際に病理結果や病期の状態によっては術後に化学療法、放射線療法、後腹膜リンパ節郭清などの追加治療が必要とな

第2部

21

「精巣の手術」 高位精巣摘除術

る場合もあることを、ある程度説明しておいたほうがよいと考えます。

④術前・術後指示の確認

術前、術後の補液、抗菌薬の指示、術後の疼痛時の指示など、予測できる範囲での指示を前もって出しておく必要があります。

2. ナースが見ること・聞くこと

①病状と全身状態の把握

肺転移や後腹膜リンパ節転移をしている場合もあるため、現在の病状を把握し術後の観察点を押さえる必要があります。既往歴や内服中の薬剤にも十分注意して確認します。

②患者本人、家族の病状の把握

外来受診から手術に至るまでの期間が比較的時間が短いいため、患者さんとその家族が精神的に動揺していることもあり、病状を正確に把握できていないことが少なくありません。入院時に患者さん本人と家族がどのように病状を理解されているかを確認し、不明点があれば医師からの病状についての説明が受けられるよう調整します。

3. ナースがすること

①術前オリエンテーション

緊急手術であることも多いため、手術前後の流れや注意点を患者にとって不明点のないようにオリエンテーション用紙を用いてわかりやすく説明する必要があります。この際に、可能ならば患者本人ばかりでなく家族も含めて説明をすると理解が得られやすいです。

②手術の承諾書の確認

手術の承諾書は医師がとりカルテに保管していますが、手術室入室前に看護師も承諾書が準備されていることを確認します。

③補液および抗菌薬の確認

指示の時間や投与速度などのダブルチェックを行い、術前補液、抗菌薬の投与を開始します。術中に抗菌薬投与を行う場合には、手術室看護師に申し送る必要があります。

④精神的支援

精巣腫瘍の診断を受けてから間もないことが多く、手術の準備で慌ただ

しいなかで心の整理ができない患者さんがいます。医師からの説明後は病状や手術の受け止めを確認し、患者さんが思いを表出できる機会を設ける必要があります。また、家族を支える立場である患者も多いため、家族の不安の有無や将来的な拳児希望の有無を確認します。

術直後にすること

1. 医師の処置

①バイタルサイン、全身状態の確認

一般的な手術と同様に発熱の有無、血圧の変動の有無、酸素濃度の低下の有無、尿量の状態など、術後の全身状態の把握を行います。

②麻酔レベルおよび覚醒状態の確認

腰椎麻酔の場合、麻酔レベルが高くなると呼吸状態の悪化がみられることがあります。術後麻酔レベルの上昇がないことを確認します。全身麻酔、腰椎麻酔ともに、術後の麻酔からの覚醒の状態を経時的に把握します。

③完全覚醒後の経口摂取開始の指示

完全覚醒が得られた段階で、経口摂取を開始します。最初は飲水より開始して、問題がなければ食事也开始します。腹腔内の手術ではないため、当院では帰室後3時間をめどに腹部の聴診を行い、問題がなければ飲水を開始する指示を出しています。

④施行された手術の説明

術後に、患者さん本人、家族に手術の経過、術中所見について説明をします。予定どおりの場合は術前に説明したとおりであったことを告げますが、術前の説明と異なる処置を要した場合は、その理由を含めて本人、家族が理解しやすいようにていねいな説明が必要です。実際には病理結果が出ないと詳細な治療方針が決まらないため、今後の予定についても簡単に説明するようにしています。

2. ナースが見ること・聞くこと

①バイタルサイン、全身状態の確認

手術から帰室後にはすぐにバイタルサインを測定します。全身の皮膚の

発赤の有無、苦痛症状の有無などを確認し、一般的な手術と同様に全身状態を観察します。精巣腫瘍は肺や後腹膜リンパ節に転移していることもあるため、呼吸状態や循環動態についても注意するように心がけています。

②創部の状態の確認

陰嚢内部や下腹壁動静脈から後出血をきたす可能性があり、ドレーン排液の性状・量とともに、創部・陰嚢部痛の有無、陰嚢の腫脹の有無の確認を行います。経時的に観察し変化がみられる際には、すみやかに主治医に報告し診察を依頼します。

③麻酔の覚醒状態の確認

帰室後から経時的に麻酔の覚醒状態を観察します。とくに腰椎麻酔の場合、麻酔レベルが高くなると呼吸状態の悪化がみられることがあり、術後麻酔レベルの上昇がないことを確認します。

④血液検査結果の確認

術直後に血液検査が行われた場合は、貧血症状の有無、炎症所見の有無などを確認し、術後看護の指標の1つにします。

3. ナースがすること

①飲水、食事開始指示の確認

麻酔から覚醒後は飲水開始となるため、医師の指示を確認します。当院では、一般的に帰室3時間後に腸蠕動を聴取し、問題がない場合には飲水を開始します。飲水開始時にはむせ込みの有無などを確認します。

②抗菌薬、補液の投与

点滴刺入部の腫脹などの異常がないことを確認し、術後の補液と抗菌薬を投与します。

③安静度の説明と介助

翌日まで床上となるため、安静度を説明し必要時体位変換などの身の回りの援助をします。食事についても臥位でも食べやすいように食事の内容も工夫する必要があります。また、下肢圧迫装置が装着されているため、その必要性について説明し、装着中の苦痛の有無について確認します。

④疼痛の有無の確認

術直後は創部や陰嚢の痛みを訴える場合が少なくありません。医師の指

示のもと、鎮痛対処を行い、十分な効果が得られていない場合は医師に新たな鎮痛薬の指示を依頼します。

⑤ 施行された手術に対する疑問点や不安な点の確認

医師より施行された手術について説明がありますが、患者さん本人や家族から説明後に疑問点や不安な点が出てくるのが少なくありません。医師の説明から少し時間を置いた後に患者さん本人や家族に疑問点や不安な点がないか確認することは今後の治療やケアを行っていくうえで大切です。もし、疑問点や不安な点がある場合には、医師に報告し場合によっては改めて説明をしてもらえるように依頼します。

退院前にすること

1. 医師の処置

① 全身状態の確認

発熱の有無、疼痛の有無など退院前に術後の全身状態の把握を行います。

② 創部の確認

退院前に創部の確認を行います。また、手術に伴う浮腫の有無、血腫の有無、創部感染の有無などの確認を行います。術後1週間以上経っての退院の際には退院前に抜糸（抜鉤）を行います。入院期間の短縮に伴い最近は外来で行っていることが多いです。

③ 血液検査結果の確認

術後採血を行い、貧血の有無、炎症所見の有無、肝機能・腎機能の異常の有無などを把握すると同時に、腫瘍マーカーの変化についても確認します。一般的に、AFPの半減期は5日、 β -hCGの半減期は1日であることから、腫瘍マーカーが高値で持続することは腫瘍細胞の残存を意味することになり、術後の腫瘍マーカーによる病期の診断や追加治療の必要性の判断に重要です（表1）。術後早期に退院する際には外来で血液検査を行うように外来での血液検査の指示、患者さんへの説明を行っておく必要があります。

表1 ●腫瘍マーカー数値の例

| 症例1 | 術前 | 術後 |
|----------------|---------|-----|
| β-hCG (mIU/mL) | 0.0 | 0.0 |
| AFP (ng/mL) | 1,603.6 | 5.0 |

術後にAFPは正常化しています。

| 症例2 | 術前 | 術後 |
|----------------|----------|------|
| β-hCG (mIU/mL) | 11,482.0 | 29.4 |
| AFP (ng/mL) | 1,962.0 | 61.9 |

術後もβ-hCG、AFPともにマーカーの高値が継続しており、腫瘍の残存が示唆されます。

| 正常値 | β-hCG | 0~0.5 (mIU/mL) |
|-----|-------|------------------|
| | AFP | 1.0~10.0 (ng/mL) |

④次回受診日の確認

病理結果が出るまでに2週間ほどかかることが少なくありません。そのため、退院後に病理結果を外来でお話しすることになります。そのことを踏まえて、次回受診日を調整する必要があります。

2. ナースが見ること・聞くこと

①全身状態の確認

退院まで患者さんの体調の変化と創部の状態を観察します。肺転移がある場合も多いため、血中酸素濃度や呼吸苦の有無についても観察します。

②鎮痛状態の確認

創部の痛みに応じて鎮痛対処を行います。十分な鎮痛効果が得られているか確認し、患者さんと相談し、必要であれば退院時に鎮痛薬の処方医師に依頼します。

③退院に向けての不安な点、疑問点の確認

転移がある場合、術後化学療法が必要となる場合があります。若年層で社会的、家庭的に重要な役割の患者が多く、今後の長期入院への不安が強まることもあるため精神的支援を行います。

3. ナースがすること

①退院時処方と次回受診日の確認

退院日が決定したら、退院時処方の有無を確認します。創部痛がある場合には患者さんと相談し、鎮痛薬の処方を医師に依頼します。退院前に次回受診日の予約がされていることを確認し、患者さんに伝達します。

②緊急連絡先の説明

術後早期に退院となることが多く、退院後の緊急連絡先を患者さんに説明する必要があります。どのような症状があるときに受診もしくは緊急連絡先への連絡が必要となるかを患者さんに指導します。

(三井貴彦・野々村克也・佐賀可奈子・植西佳奈・高木真弓)



尿道下裂術後の長期予後

守屋 仁彦 三井 貴彦 田中 博 中村美智子 野々村克也

北海道大学腎泌尿器外科*

要旨: 尿道下裂に対して当院で加療を行った患児達の長期予後を、排尿・陰茎外観・性行動・内分泌学的側面などから検討した結果を供覧し、尿道下裂の予後について考察した。排尿症状に関しては、対照群と比べて大差はないものの尿の切れに対する症状のみ差が認められ、特に近位型尿道下裂症例で顕著であった。外観・性行動については尿道下裂症例では陰茎のサイズに不満はあるものの、おおむね対照群と同様の性機能・性的活動を有していた。内分泌的には、停留精巣を合併しない症例では遠位型で29%、近位型で14%に異常を認めたが、停留精巣既往のある症例では50%に異常が認められた。以上のことより、外科的結果については長期的にも満足できるものの陰茎サイズや内分泌異常といった外科的治療以外の問題点が存在することが明らかとなった。

key words 尿道下裂, 思春期, 長期予後

はじめに

尿道下裂は尿道口の位置異常、陰茎背側の余剰包皮、陰茎の腹側への屈曲(索変形)を特徴とする男児の先天性疾患である。治療の目的は、尿道口の位置の矯正により立位排尿を可能とすること、索変形の矯正により思春期以降の性交渉が支障なく行えることとともに外観の改善により患児の心理学的な影響を減じることにある。心理学的検討から近年では1歳前後に手術が行われることが多く、非常に高度な尿道下裂症例を除いては1期的手術による治療が行われている。手術手技の進歩や手術材料の改良により、習熟した術者が行うことにより短期的な治療成績の改善とともにより満足すべき外観が得られるようになってきている。

Long-Term Outcome of Hypospadias Surgery
Kimihiko Moriya, Takahiko Mitsui, Hiroshi Tanaka,
Michiko Nakamura and Katsuya Nonomura
Department of Renal and Genitourinary Surgery, Hokkaido
University

key words : Hypospadias, puberty, long-term outcome

* 札幌市北区北15条西7丁目(011-716-1161) ☎060-8638

しかしながら幼少期に尿道形成および索変形の矯正といった外陰の手術を行った患児達の長期的な機能的・心理的予後については、これまで文化的背景の異なる諸外国からわずかな報告があるのみであり、本邦からはほとんど報告がみられなかった。本稿では当院で加療を行った患児達の長期予後を、排尿・陰茎外観・性行動・内分泌学的側面などから検討した結果を供覧し、外科的治療が終了した尿道下裂児の長期予後についての知見について概説する。

I 排尿症状

排尿に関しては上述の尿流量測定などによる他覚的評価とともに自覚的評価が重要となってくる。われわれは尿道下裂に対して治療を受けた症例のうち18歳以上となった22例と、対照群として尿道下裂のない同世代の38例(ともに平均年齢約21歳)に排尿症状についてのアンケート調査を行った¹⁾。尿線の方向・尿勢・頻尿・排尿姿勢には両者に差はみられなかったものの、尿の切れに関しては尿道下裂群で有意に不良であった(図1)。尿道下裂の程度で分けて検討を行うと、近位型尿道下裂群で排尿後に尿道を squeeze す

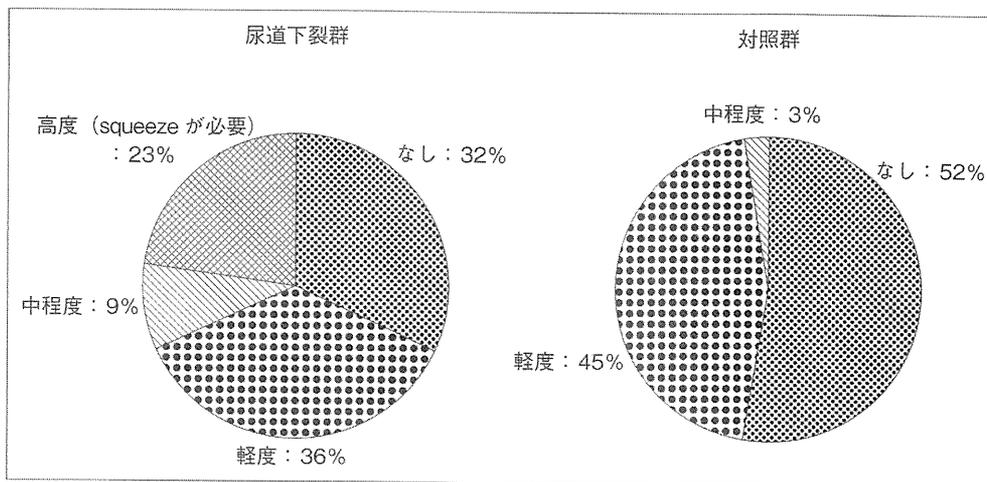


図1 排尿症状の長期予後一尿の切れに関して—
中等度以上の症状を有していたのは尿道下裂群で 22%，対照群で 3%であり，尿道下裂群で有意に不良であった。

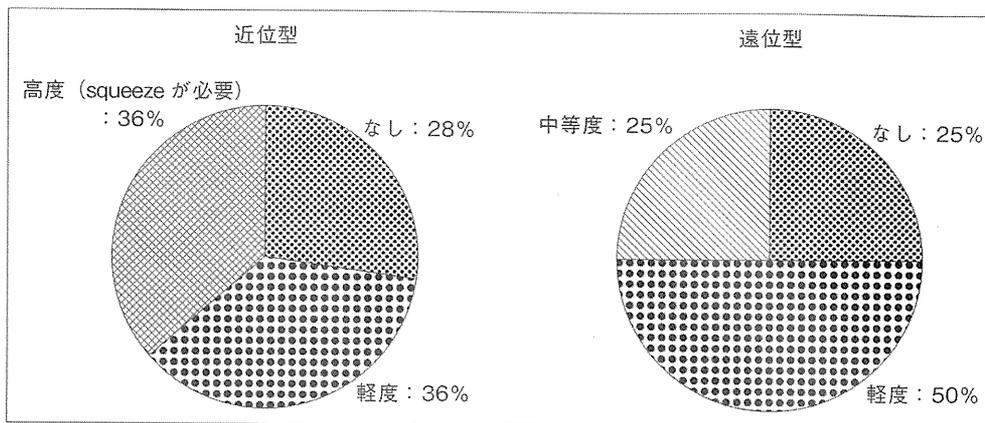


図2 排尿症状の長期予後一尿の切れに関して近位型 vs 遠位型—
排尿後に尿道を squeeze する必要がある症例を認めたのは近位型尿道下裂群のみであった。

る必要がある症例を 36% に認めたのに対して遠位型では squeeze を必要とする症例は認めなかった (図 2)。まとめてみると，尿道下裂症例の長期的排尿症状は同世代と比べて大差はないものの，尿の切れに対する症状のみ差が認められ，特に近位型尿道下裂症例で顕著であった。

過去の報告を見てみると，尿道下裂術後の特徴的な排尿症状は，尿線の飛散 (spraying) と尿の切れの悪いことである。spraying は 33% から 66% にみられると報告されているが²⁾，われわれの検討では下裂群・対照群とも 3/4 は真っ直ぐに飛ぶとしており，左右に偏りがあるとした症例が両群ともに 15% 程度で，spraying はほとんどみられなかった。この結果は 80 年代から 90 年代にかけての手術器具や技術の進歩，特に尿道口を亀頭先端に作成するといった手術手技の進歩によるものであろう^{3, 4)}。一方尿の切れの悪さは以前の

報告と同様に認められた。特に近位型尿道下裂において顕著であることから，原因としては尿道形成術で形成された尿道には本来あるべき尿道海綿体の裏打ちがないために，排尿終末時に尿道内の尿を排出することが困難であるためと考えられる。この点は尿道の欠損を周囲の皮膚を用いて形成するという現在行われている手術手技に共通している問題点と考えられるため，現時点では根本的な解決は困難であろう^{4, 5)}。

II 陰茎外観と性的予後

幼少期に尿道下裂を治療する上で両親が最も気になるのは，思春期における外観および性的な予後であろう。排尿症状と同時に行った陰茎外観と性的予後におけるアンケート調査の結果⁶⁾ について供覧する。質問票では，陰茎の外観・性功能・