

- (4) 肺動脈弁狭窄症：軽症に相当し肺動脈弁逆流が多くないもの [注 3]
- (7) 肺動脈弁狭窄症：軽症でないもの [注 4]
- b 運動部（クラブ）活動禁（E 禁）以上の制限に該当する指針
- (8) 僧帽弁閉鎖不全症：軽症でないもの [注 5]
1. 治療前の先天性心疾患
2. 治療後の先天性心疾患
- (1) 心室中隔欠損症：肺高血圧のあるもの [注 1]
- (2) 心房中隔欠損症：肺高血圧のあるもの [注 1]
- (3) 動脈管開存症：肺高血圧のあるもの [注 1]
- (4) 大動脈弁狭窄症：軽症でないもの [注 2]
- (5) 大動脈二尖弁：大動脈基部・上行大動脈の中等度以上の拡張があるもの
- (6) 大動脈弁閉鎖不全症：軽症でないもの
- 手術を受けた医療機関の専門医による定期的な経過観察・検査で判断されるべきであるが、転居・医療機関の特性などによってそれが不可能なときには専門医の判断を仰ぐ。
- [注 1] ここでいう肺高血圧とは安静時の平均肺動脈圧 25mmHg 以上を目安とする。<sup>6)</sup>
- [注 2] 軽症大動脈弁狭窄症の判定は以下の所見が参考になる。
- 1) 心臓カテーテル検査での左室—大動脈引き抜き圧較差が 20

mmHg 未満

- 2) 心臓超音波連続波ドプラ法で得られた（上行大動脈内）最高血流速度が 2.5 m/s 未満または簡易ベルヌイ法による収縮期平均圧較差 20 mmHg 未満

[注 3] 軽症大動脈弁閉鎖不全症の判定は以下の所見が参考になる。

- 1) 聴診上、大動脈弁閉鎖不全による Levine 1/6 度以下の拡張期雑音<sup>7)</sup>
- 3) 上行大動脈造影法で 1 度の逆流<sup>8)</sup>
- 4) 心臓超音波カラードプラ法では下記の場合
- ① 左室内逆流ジェットの到達距離が僧帽弁前尖までのもの<sup>9)</sup>
- ② 傍胸骨長軸断面で逆流ジェッ

ト開始点（大動脈弁）から

1cm の範囲で逆流ジェット  
の幅と同部位での流出路径の  
比が 25%以下<sup>8,10)</sup>

- ③ 中学生以上で成人の体格に近い場合には縮流部（vena contracta）の幅 3mm 未満<sup>8,10)</sup>

[注 4] 軽症肺動脈弁狭窄症の判定は以下の所見が参考になる。  
1,8,11)

- 1) 心臓カテーテル検査で右室ー肺動脈引き抜き圧較差が 40 mmHg 未満

- 2) 心臓超音波連続波ドプラ法で得られた（主肺動脈内）最大流速が 3.5 m/s 未満

[注 5] 軽症僧帽弁閉鎖不全症の判定は以下の所見が参考になる。

- 1) 聴診上、僧帽弁閉鎖不全による Levine 2/6 度以下の収縮期雑音<sup>7)</sup> に近い場合では縮流部 (vena contracta) の幅 3 mm 未満<sup>7,10,13)</sup>
- 2) 左室造影法で I 度の逆流<sup>8)</sup>
- 3) 心臓超音波カラードプラ法で [注 6] 手術と関連がないと考えられる軽微な不整脈は除く。
- は下記の場合

① 心臓超音波傍胸骨四腔断

【解説】

面像や心尖部からの長軸像で逆流ジェットの間から左房後壁までの到達距離が左房内 3 分の 1 までのもの<sup>12)</sup>

1. 連続波ドプラ法による推定最大圧較差について  
大動脈弁狭窄症および肺動脈弁狭窄症の連続波ドプラ法による推定最大圧較差は実際の圧較差より過大評価

② 左房に占める逆流ジェット面積の割合 < 20 %<sup>8,10,12)</sup>

価する可能性があるため<sup>8,13,14)</sup>、最大血流速度はそのことを考慮した値とした。

ただし逆流ジェットが左房壁に沿って見られる場合は過少評価するので注意を要する。

2. カラードプラ法を行う場合のカラーゲインについて

③ 中学生以上で成人の体格

大動脈弁閉鎖不全および僧帽弁閉鎖不全でカラードプラ法を行う場合、

カラーゲインをノイズが発生しない  
最大値に設定し、折り返し血流速度を  
60-70 cm/s に調節して行う。

[注3] および [注5] の3) ①に示す  
カラードプラ法による逆流ジェット  
の到達度の評価方法は簡便で広く使  
われているが、到達点と同じでも逆流  
ジェット幅の大小により重症度が異  
なり、装置の設定条件の影響も受ける  
ため [注3] および [注5] の3) ②③  
の評価法も参考にすること。

### 3. 軽症大動脈弁狭窄について

米国心臓協会/米国心臓病学会ガイ  
ドライン<sup>8,13,14)</sup>によると、軽症大動脈  
弁狭窄症では全ての運動が可能とし、  
その基準として心臓超音波連続波ド  
プラ法で得られた収縮期平均圧較差  
25 mmHg 未満、最高血流速度 3.0 m/s

未満としている。日本循環器学会ガイ  
ドラインでもその基準に従っている<sup>15)</sup>。しかし小児は活動量が多く、運動  
強度も大きくなることも想定される  
ので、この値に安全域を設けた。ただ  
しレジスタンス運動（等尺運動；  
Isometric exercise）は左室圧が上昇し  
やすいので注意をする。

### 4. 縮流部 (vena contracta) について<sup>8, 10)</sup>

大動脈弁閉鎖不全や僧帽弁閉鎖不  
全では、縮流部の幅は有効逆流弁口面  
積を反映するとされている。

縮流部はカラードプラ法で逆流血流  
が逆流弁口を通過した直後の心腔内  
（大動脈弁閉鎖不全では左室・僧帽弁  
閉鎖不全では左房側僧帽弁直下）で最  
も狭く観察される部分であり、傍胸骨  
長軸断面でその幅を計測する。

## 2 : NO 吸入療法

NO は強力な血管拡張作用をもつが NO 吸入療法は吸気ガス内への投与によって肺血管に選択的に NO を供給することにより体血圧を下げずに肺血管抵抗を下げる効果があり、血行動態の不安定な肺高血圧やフォンタン型手術急性期における循環の維持に有効である。

2008 年 10 月から 2012 年 3 月までの 3 年 5 カ月で NO 吸入療法を施行したのは 46 例であった。44 例は先天性心疾患の心臓術後でそのうち 10 例は体静脈一肺動脈吻合（グレン手術・T CPC 手術）にたいして施行。34 例は術後肺高血圧にたいして施行。あと拡張型心筋症の肺高血圧合併の 1 例と先天性心疾患で気管出血後の肺高血

圧の 1 例に施行。37 例で血行動態の改善が得られた。9 例では効果みとめず中止した。有害現象・副作用はみられていない。P PHN にたいしては他社の製品で保険適応となっているが、新生児以外での適応なくいまだに承認の動きがない。日本での新生児 P PHN 以外の疾患（特に心臓手術後に需要が多いが）適応拡大のため小児循環器学会で調整中であるが、まだ適応承認の時期は不明である。P PHN にたいする NO 吸入療法は先天性心疾患術後の小児における保健適応はまだ認められていない。ヨーロッパでは適応拡大がなされが、本邦でも適応拡大への検討が望まれる。

## 3 : 低酸素換気療法

小児の先天性心疾患のうち肺体血流比が増大し低心拍出の心不全のコントロールが困難な症例に限って施行している。実際に施行したのは3例(HLHS 2, c TGA 1)であるが、この治療の必要度の高いと考えられた4例は準備だけして実際には使用しなかった。2例ではこの治療によって血行動態の安定が得られた。1例では効果は得られなかった。3例ともに合併症はみとめていない。今後は術前管理においても有効で安全な使用法

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Hokosaki T, Mori M, Nishizawa T, Nakamura T, Imagawa T, **Iwamoto M**, Yokota S. Long-term efficacy of plasma exchange treatment for refractory Kawasaki disease. *Pediatric International*.

の工夫を続けて適応のある症例に限って施行する。

### E. 結論

臨床症例を中心に内臓錯位症候群を含めた小児先天性心疾患治療の現行治療について検討した。本研究で開発した、アデニル酸シクラーゼサブタイプ選択的刺激薬や PDE3 阻害薬は、現在もつともよく使用されている PGE1 に替わりうる効果的な動脈管拡張薬になりうると考えられた。

### F. 健康危険情報

該当なし

Type 3 Long QT Syndrome, 2011, 32  
(7): 1048-52, *Pediatric Cardiology*.

3. 岩本眞理:【図解でどんだんステップアップ新生児循環管理なるほど Q&A】不整脈を理解しよう! 不整脈はどうして起こるの?メカニズムとその意味は?、Neonatal

Care(1341-4577)2012 春季増刊  
Page118-121(2012.03)

4. 吉永正夫, 泉田直己, 住友直方, 高橋良明, 富田英, 長嶋正實, 山内邦昭, 新垣義夫, 岩本眞理, 上野倫彦, 牛ノ濱大也, 太田邦雄, 佐藤誠一, 田内宣生, 高木純一, 立野滋, 檜垣高史, 堀米仁志, 市田露子, 白石裕比湖, 日本小児循環器学会学校心臓検診委員会, 先天性心疾患の学校生活管理指導指針ガイドライン(2012年改訂版)、日本小児循環器学会雑誌(0911-1794)28巻1号 Page2-5(2012.01)

2. 学会発表

1. 市川泰広、青木理加、岩本眞理、南沢亨、横山詩子、石川義弘、出生後の血清浸透圧の変化が動脈管収縮に

及ぼす作用の検討、2011年7月、福岡、日本小児循環器学会、ポスター

2. 市川泰広、金晶恵、咲間裕之、西澤崇、岩本眞理、難治性上室性頻拍に対するアミオダロン使用例の検討、2011年7月、福岡、日本小児循環器学会、ポスター

3. 岩本眞理、西澤崇、市川泰広、咲間裕之、金晶恵、笠間啓一郎、磯松幸尚、益田宗孝、ワーファリンによる抗凝固療法のモニタリングにおける簡易検査法の有用性について、2011年7月、福岡、日本小児循環器学会、ポスター

4. 咲間裕之、金晶恵、市川泰広、西澤崇、岩本眞理、栄養障害に伴う衝心脚気の1例、2011年7月、福岡、日本小児循環器学会、ポスター

5. 中野裕介、金晶恵、咲間裕之、鉾崎竜範、岩本眞理、重症先天性QT延長症候群(LQTS)2例におけるICD植込み後の管理、2011年11月、名古屋、第15回日本小児心電図学会、名古屋

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 取得予定なし
2. 実用新案登録 取得予定なし
3. その他

次ページに、参考文献および入院症

例の内訳を

の内訳を示す。

## 文 献

- 1) 長嶋正實、伊藤春樹、勝村俊仁、  
他. 心疾患患者の学校、職域、ス  
ポーツにおける運動許容基準に関  
するガイドライン(2008年改訂版)  
Guidelines for exercise eligibility at  
schools, work-sites, and sports in  
patients with heart diseases ( JCS  
2008) . 日本循環器学会ホームペ  
ージ.  
<http://www.j-circ.or.jp/guideline/>
- 2) 新・学校心臓検診の実際. 東京、  
日本学校保健会、平成 15 年 3 月  
31 日発行
- 3) 学校心臓検診の実際 スクリー  
ニングから管理まで—平成 20 年  
改訂—. 東京、日本学校保健会、  
平成 20 年 2 月 20 日発行
- 4) Guntheroth WG. A critical review of  
the American College of  
Cardiology/American Heart



- Association practice guidelines on bicuspid aortic valve with dilated ascending aorta. *Am J Cardiol.* 2008; 102(1):107-10.
- 5) El-Hamamsy I, Yacoub MH. A measured approach to managing the aortic root in patients with bicuspid aortic valve disease. *Curr Cardiol Rep.* 2009; 11(2):94-100.
- 6) Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: Suppl.1,S55-S66
- 7) Desjardins VA, Enriquez-Sarano M, Tajik AJ, Bailey KR, Seward JB. Intensity of murmurs correlates with severity of valvular regurgitation. *Am J Med.* 1996; 100(2):149-56.
- 8) Bonow RO, Carabello BA, Kanu C, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with valvular heart disease. *Circulation* 2006; 114 (5):e84-231.
- 9) 大塚 亮、吉川純一. 大動脈弁逆流. *臨床心エコー図学*、第3版、吉川純一編、文光堂、東京、p379-384, 2008
- 10) Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, Foster E, et al. Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2003; 16(7):777-802.
- 11) Steinberger J, Moller JH. Exercise

testing in children with pulmonary

valvar stenosis. *Pediatr Cardiol.*

1999; 20(1):27-31

Conference. Task Force 3: valvular

heart disease. *J Am Coll Cardiol.*

2005; 45(8):1334-40.

12) 渡邊 望、吉田 清. 僧帽弁をみ

る. 新・心臓病診療プラクティス

1. 心エコー図で診る、中谷 敏、

別府慎太郎編、文光堂、東京、

p102-113, 2004

15) 松田 暉、大北 裕、川副浩平、

他. 弁膜疾患の非薬物治療に関す

るガイドライン (2007 年改訂版) .

Guidelines for surgical and

interventional treatment of valvular

13) Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee

K, et.al. 2008 focused incorporated

into the ACC/AHA 2006 guidelines

for the management of patients with

valvular heart disease. *J Am Coll*

*Cardiol.*2008; 52(13); e1-142.

heart disease (JCS 2007). 日本循環

器学会ホームページ.

<http://www.j-circ.or.jp/guideline/>

14) Bonow RO, Cheitlin MD, Crawford

MH, Douglas PS. 36<sup>th</sup> Bethesda

## 2011 年 横浜市立大学附属病院小児循環器科 統計

総入院数 216 例 うち緊急入院 42 例

## 先天性心疾患 78、川崎 14、心臓カテーテル検査総数 93 件

VSD 16 件、MCLS 14 件、TOF 6 件、DORV 11 件、d-TGA 5 件、l-TGA 4 件、TA 4 件、その他 29 件

うち、インターベンション(延べ 26 件)

PTA for PA branch stenosis	13 件	PTA for BTS	1 件
PTA for supra AS	3 件	coil embolization for PDA	3 件
PTV for v-AS	1 件	coil embolization for collateral artery	2 件
PTA for CoA	2 件	POBA for MCLS CAL	1 件
PTA for RV-PA shunt	2 件	PTA for Glenn anastomosis site	1 件

## 不整脈;心臓カテーテル検査総数 3 件

循環器内科入院にて EPS/CA/PMI を施行した。AT 2 件 , NSVT 1 件

## 小児関連心臓手術 総件数 76 件、緊急手術 21 件

2 次孔 ASD	10 件
VSD	15 件
Rastelli	3 件
TCPC	2 件
bidirectional Glenn	3 件
modified BTS	3 件
TOF/DORV ICR	8 件
PA banding	8 件
UF	1 件
PAPVC	2 件
PDA ligation	9 件
TV plasty	1 件
PA/P valve plasty	2 件
AVR (含 弁輪拡大を伴うもの 2 件)	5 件
その他(redo, 止血術, デブリなど)	14 件

\* 成人先天性心疾患手術症例 16 件を含む

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

動物実験による検討を中心とした内臓錯位症候群に対する

新規治療薬の開発に関する研究

研究分担者 横山 詩子 横浜市立大学医学部循環制御医学 講師

研究要旨

内臓錯位症候群には高頻度で動脈管依存性先天性心疾患が合併する。これらの患児には手術まで動脈管を開存させておく必要があるが、現在のプロスタグランディンEによる治療には種々の問題点がある。初年度はアデニル酸シクラーゼのサブタイプに着目した副作用の少ない新規動脈管開存薬を開発した。さらに本年度は、動脈管はほかの血管と比べて血管の弾性線維形成が極端に低下し、それが出生後の血管収縮に関連している可能性を見出し、動脈管における弾性線維形成のメカニズムを解明した。プロスタグランディンE受容体EP4を介したシグナルが伝達することでリジルオキシダーゼの分解が起こり、弾性線維の架橋結合が阻害され、弾性線維の形成が低下することが示された。

## A. 研究目的

動脈管は胎生期に肺動脈と大動脈をバイパスする血管であり、出生後は速やかに閉鎖する。動脈管の閉鎖の過程には、次の二つの機序が関与している。① 出生直後からプロスタグランディン E 濃度の低下と血中酸素分圧の上昇により血管収縮がおこり、さらに② 出生前からプロスタグランディン E 刺激により平滑筋細胞からヒアルロン酸が分泌されることにより、平滑筋細胞の遊走に基づく内膜肥厚が生じ、完全に内腔が閉鎖する。生後の動脈管の閉鎖遅延（動脈管開存症）は、未熟児で循環不全などを引き起こし、生命予後を左右するため直ちに閉鎖させる必要がある。一方、内臓錯位症候群には、体または肺循環経路に高度狭窄や閉鎖を有する複雑心奇形を合併し、そのような患児では、生命を維持するための初期治療として、動脈管を開存させたままにして、必要な体血流または肺血流を補う必要がある。し

たがって、動脈管閉鎖の詳細な機序を理解し、動脈管を効果的に開存させる薬剤を開発することは、小児医療上非常に重要である。

動脈管は隣接する他の血管に比べて極端に弾性線維の形成が低下していることが報告されている。このことは、動脈管の開存、閉鎖に深くかかわっている。弾性線維の異常は、大動脈瘤や血管狭窄性疾患、肺気腫など多彩で重篤な疾患をもたらす。弾性線維は、エラスチン蛋白がマイクロフィブリルという線維に沈着し、凝集してから、リジルオキシダーゼ(Lox)が架橋結合することで形成される。特にエラスチン蛋白を架橋結合する Lox は弾性線維形成に重要である。このように弾性線維を形成する構成要素は明らかになっているが、ホルモンや受容体レベルでの弾性線維の制御は不明である。

本研究では、弾性線維が低形成であり、プロスタグランディン E2(PGE2)受容体の一つである EP4 が高発現することが知られている、胎

生期の血管である動脈管に着目し、PGE2-EP4 シグナルが弾性線維の形成を低下させているという仮説を検証することを目的とした。

## B. 研究方法

### I. 実験材料

#### 試薬

PGE2(SIGMA、アメリカ)、ONO-AE1-329(EP4 刺激剤)(小野薬品、大阪)、sulprostone(EP1/3 刺激剤)(SIGMA)、butaprost(EP2 刺激剤)(SIGMA)、beta-aminopropionitrile(BAPN、Lox 阻害剤)(SIGMA)、8-Bromoadenosine-3',5'-Cyclic Monophosphate(BrcAMP、非選択的 cAMP アナログ)(SIGMA)、PKA inhibitor(Protein Kinase A 阻害剤)(Calbiochem)、gallein( $G\beta\gamma$  阻害剤)(Calbiochem)、U73122(PhospholipaseC 阻害剤)(Calbiochem)、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate(PMA、Protein Kinase C 活性化剤)(SIGMA)、

bisindolylmaleimide(bis、Protein Kinase C 阻害剤)(和光純薬、大阪)、U0126(MEK 阻害剤)(Calbiochem)、NH<sub>4</sub>Cl(ライソゾーム阻害剤)(和光純薬)を使用した。

#### 実験動物と組織

全ての実験動物は横浜市立大学の倫理的規約を厳守して行った。本実験では日本 SLC(静岡)より購入した妊娠 Wister rat を使用した。ラットの動脈管および大動脈の組織は胎生 21 日の胎仔より摘出し、成熟動脈管として使用した。

EP4 遺伝子欠損マウスは京都大学の杉本幸彦教授から提供して頂いた。マウスの動脈管および大動脈の組織は胎生 18.5 日、生後 0 日の胎仔および新生仔より摘出した。

### II. 実験方法

#### ラット動脈管平滑筋細胞の初代培養

培養液は 10% の fetal bovine serum(FBS)(EQUITECH-BIO.INC)

と 100U/ml の penicillin-streptomycin(SIGMA)を溶解した Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(SIGMA)を使用した。初代培養には胎生 21 日の Wistar rat の動脈管および大動脈を用いた。摘出した動脈管を 800 $\mu$ l の collagenase-dispase 混合試薬[Hanks' balanced salt solution(SIGMA)に 1.5mg/ml の collagenase-dispase(Roche、スイス)、0.5mg/ml の elastase type II -A(SIGMA)、1mg/ml の trypsin inhibitor type I-S(SIGMA)、2mg/ml の bovine serum albumin fraction V(SIGMA)を混合した溶液]に入れ、37 $^{\circ}$ Cで動脈管 15 分間、大動脈 20 分間反応させた。細胞混濁液を 37 $^{\circ}$ C、1000rpm で遠心し、上清を取り除いたところに 800 $\mu$ l の collagenase II 混合試薬 [Hanks' balanced salt solution(SIGMA)に 1mg/ml の collagenase II (Worthington) 、0.3mg/ml の trypsin inhibitor type

I-S(SIGMA) 、 2mg/ml の bovine serum albumin fraction V(SIGMA)を混合した溶液]を入れた。37 $^{\circ}$ Cで 12 分間反応させた後、数回ピペッティングし、培養液 800 $\mu$ l を入れた。37 $^{\circ}$ C、1000rpm で遠心して上清を取り除いた後、培養液 1000 $\mu$ l を入れ数回ピペッティングした。Poly-L-lysine (SIGMA)でコーティングした 40mm 組織培養用ディッシュに細胞液を播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。培養液を 2-3 日毎に交換し、90-100%の細胞密度になった時点で継代を行い、本研究には 4 から 7 継代目の平滑筋細胞を使用した。

#### total RNA 抽出

氷上において動脈管組織、培養平滑筋細胞を PBS で 1-2 回洗浄後、TRIzol® (Invitrogen)を加えてセルスクレーパーで回収し、1.5ml チューブに移した。0.2ml のクロロホルムを加え、転倒混和後、4 $^{\circ}$ C、13500rpm、15

分間遠心し、上清のみを別の 1.5ml チューブに取った。これに、0.5ml のイソプロパノールを加え、10 分間室温に放置し、4°C、13000rpm、10 分間遠心の後、その上清を除去、さらに、ペレットに 1ml の 75%エタノールを加え、混和後 4°C、7500rpm、10 分間遠心し、再び上清を除去し、ペレットを得た。このペレットを風乾し、DEPC-treated water (Ambion, USA) を 10-20  $\mu$ l 加え、65°C、5 分間放置後、抽出した RNA の濃度を測定した。

### cDNA の作成

TaKaRa の PrimeScript RT reagent Kit をプロトコールに従い、氷上で 20  $\mu$ l の反応液 [5X PrimeScript Buffer 4  $\mu$ l、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1  $\mu$ l、50  $\mu$ l Oligo dT Primer 1  $\mu$ l、100  $\mu$ l Random 6 mers 1  $\mu$ l、total RNA 1  $\mu$ g 相当量を RNase Free dH<sub>2</sub>O に溶解した液]を調製し、37°C・15 分間、85°C・5 秒間の逆転写反応を行い、

cDNA を作成した。

### 半定量 RT-PCR、定量 RT-PCR

胎生 19 日、21 日、生後 0 日の動脈管組織または大動脈組織、動脈管平滑筋初代培養細胞から作成した cDNA をテンプレートとして、以下のプライマーを用い、半定量 RT-PCR または定量 RT-PCR により発現解析を行った。

### タンパク回収とタンパク定量(ブラッドフォード法)

氷上において動脈管平滑筋初代培養細胞を PBS で 3 回洗浄後、Carbonate Buffer[150mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(和光純薬)、1mM EDTA(SIGMA)]を加えてセルスクレーパーで回収し、1.5ml チューブに移した。

回収したタンパクはブラッドフォード法によって定量した。色素として Bio-Rad Protein Assay(Bio-Rad Laboratories Inc.、アメリカ)を用いた。



### ウエスタンブロッティング用サンプル調製

タンパク定量したサンプル、4× SDS サンプルバッファー [0.125M Tris (SIGMA)-HCl(和光純薬) (pH6.8)、4% SDS(和光純薬)、10% Glycerol(和光純薬)、0.01% BPB(和光純薬)]、2-Mercaptoethanol(和光純薬)を6.5:2.5:1.0の割合で混合し、100°Cで5分間加熱した。

### ウエスタンブロッティング

ウエスタンブロッティングに用いるアクリルアミドゲル(2枚分)の組成は以下の通りである。10%分離ゲルは4× Gel Buffer(pH8.8) [0.375M Tris、0.1% SDS] 4ml、30% アクリルアミド(和光純薬) 5.33ml、DDW 6.67ml、10%APS 160μl、TEMED(和光純薬) 8μl から成る。濃縮ゲルは4× Gel Buffer(pH6.8) [0.125M Tris、0.1% SDS] 1.68ml、30% アクリルアミド 1ml、DDW 4.26ml、10%APS 75μl、TEMED 7.5μl から成る。10%分離ゲ

ルをガラス板に流し込んで固めた後に、濃縮ゲルを流し込んでコームを挿し、アクリルアミドゲルを作製した。

アクリルアミドゲルを泳動槽 Novex Mini-Cell(invitrogen、アメリカ)にセットして1× Loading Buffer[0.25M Tris、1.92M Glycine(和光純薬)、1% SDS]を入れた。泳動槽を氷で冷やししながら、サンプルをアプライし、200V、80mA(1枚なら40mA)、25W、60分の条件でランニングを行った。ランニング後、ゲルに展開したタンパクをメンブレンに転写するため、ガラス板からはがしたアクリルアミドゲルをスポンジとろ紙の上に乗せた。その上にメンブレンを乗せ、ろ紙とスポンジではさんだものを泳動槽にセットした。1× Transfer Buffer[0.1M Tris、0.192M Glycine、20%メタノール(和光純薬)]を入れ、60V、200mA、17W、60分の条件でトランスファーを行った。トランスファー後、3% BSA(SIGMA)/TBS/0.1%Tween(SIG

MA)を入れ、1時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体をかけ4°Cでインキュベートした。本研究において一次抗体は、Rabbit Polyclonal to Lox(abcam、イギリス)、Lox propeptide Antibody (Novus Biologicals, Inc.、アメリカ)、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204) Antibody(cell signaling、アメリカ)、GAPDH(Santa Cruz Biotechnology、アメリカ)を用いた。一次抗体をインキュベートしたメンブレンをTBS/0.1%Tween で洗った後、二次抗体を1:5000の割合になるように混合し、メンブレンに1時間、室温でインキュベートした。1時間後洗浄し、LAS-3000 mini(FUJIFILM、東京)にて現像した。現像液には Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System(GE Healthcare、アメリカ)、または Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents(GE

Healthcare)を用いた。

### アデノウイルスによる過大発現

Loxを組み込んだアデノウイルスは久留米大学の青木浩之教授より譲渡して頂いた。MEK1を組み込んだアデノウイルスはカリフォルニア大学ロサンジェルス校の Yi-Bin 教授より譲渡して頂いた。

Lox、MEK1 アデノウイルスの過大発現の確認は以下の手順に沿って行った。トランスフェクション前日、動脈管平滑筋初代培養細胞を6cm dish にプレーティングした。1dishあたり、10%FBSを含むDMEM溶液4mlに80万個の細胞数になるようにプレーティングした。トランスフェクション当日、計算したウイルス量(1MOI、5MOI、10MOI、100MOI)のAdv.Lox、Adv.MEK1を細胞に添加し、48時間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub>のインキュベーターで培養した。48時間のトランスフェクション後、氷上にてPBSで3回洗浄後、Carbonate Bufferを加えて

細胞をセルスクレーパーで回収し、1.5ml チューブに移した。サンプル調製後、Lox と MEK1 のウエスタンブロットティングにより、発現解析を行った。Adv.LacZ コントロールと比較することで Lox および MEK1 の過大発現を確認した。

Lox 過大発現下での弾性線維の形成を検討するために、以下の実験を行った。トランスフェクション前日、動脈管平滑筋初代培養細胞を 24well plate にプレATINGした。1well あたり、10%FBS を含む DMEM 溶液 1ml に 10 万個の細胞数になるようにプレATINGした。トランスフェクション当日に 10MOI の Adv.Lox を細胞に添加し、10 日間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。培養してから5日目に再びトランスフェクションを行った。10 日後、エラスチンの細胞免疫染色を行った。

MEK1 の過大発現下での Lox の発現を検討するため、以下の実験を行った。トランスフェクション前日、動脈

管平滑筋初代培養細胞を 6cm dish にプレATINGした。1dish あたり、10%FBS を含む DMEM 溶液 4ml に 80 万個の細胞数になるようにプレATINGした。トランスフェクション当日、30MOI の Adv.MEK1 を細胞に添加し、2 日間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。2 日後、DMEM 溶液にメEDIUM交換を行い、さらに 24 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub>-21%O<sub>2</sub> のインキュベーターで培養した。24 時間後、氷上において PBS で 3 回洗浄し、Carbonate Buffer を加えてセルスクレーパーで回収した。サンプルを調製した後、Lox のウエスタンブロットティングを行った。

### パラフィン切片の作成

ラットとマウスの動脈管組織は、10% Bufferd Formalin(和光純薬)で 1 日、4°Cで固定した。ヒトの動脈管組織は 4% paraform aldehyde(和光純薬)で 1 日、4°Cで固定した。固定後、

70%エタノールに入れた。自動固定包埋装置(サクラファインテックジャパン、東京)で2時間(6回)脱水後、レモゾール A(和光純薬、大阪)で1時間(3回)透徹を行った。その後、65℃下でパソプレップ 580(和光純薬)を2時間(2回)組織に浸透させ、パラフィン溶解/包埋装置(Leica Microsystems Japan、東京)を用いて包埋を行った。パラフィンプロックを回転式マイクローム(Leica Microsystems Japan)を用いて4μmに薄切し、MASコート

#### 染色前の脱パラフィン操作と染色後の脱水、透徹、封入操作

脱パラフィン操作として、パラフィン切片をキシレン(和光純薬)に3分間(3回)浸せきした。パラフィン除去後、エタノール系列で脱水を行った。100%エタノール(和光純薬)に3分間(2回)、90%エタノールに3分間(1回)、80%エタノールに3分間(1回)、70%

エタノールに3分間(1回)の順で浸水し、最終的に超純水(DDW)で洗った。

染色後の脱水、透徹、封入の操作は以下の通りである。脱水は、70%エタノールに3分間(1回)、80%エタノールに3分間(1回)、90%エタノールに3分間(1回)、100%エタノールに3分間(3回)の順で行った。キシレンで3分間(3回)透徹し、ソフトマウント(和光純薬)を用いて封入した。

#### エラスチカ染色

パラフィンを取り除いたパラフィン切片を1%塩酸70%エタノールに2分間馴染ませた。その後、ワイゲルトレゾルシンフクシン液(武藤化学、東京)に室温で1時間浸し、弾性線維を染色した。水道水で余分な染色液を落とし、1%塩酸70%エタノールで分別し、DDWに入れた。その後ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液(武藤化学)に室温で3分間浸け、筋線維、細胞質、赤血球を染色した。染色後、水道水ですすぎ、0.5%塩酸水で軽く分別し、DDW