

クの平均値を採用し、それ以外のタンパク質に関しては1(変動なし)として、各時間において増加または減少したタンパク質を抽出した (Fig. 2-B)。

NGF 刺激後継続的 (24 から 48 時間、48 から 72 時間、または 24・48・72 時間) に変動しているタンパク質を抽出したところ、継続的に発現増加するタンパク質は 62、減少するものは 35、合計 97 タンパク質であった (Fig. 2-B)。これら 97 分子について NGF 刺激後の各時間における mRNA とタンパク質の挙動を uncentered correlation でクラスター解析したところ、mRNA の 24 時間の挙動が、タンパク質の 24.48.72 時間と近い距離にクラスターされたことから、24h の mRNA の変動が 24.48.72 時間のタンパク質の動きに連動している可能性が示唆された (Fig 2-C)。

2. NF1-KD 細胞における異常シグナル分子群の抽出

NF1-KD 細胞内で生じる異常シグナル分子群を抽出するために、融合プロテオミクスのデータについてネットワーク解析を行った。mRNA で上昇している分子群を始点に、蛋白質レベルで上昇している分子を終点とし、ネットワークの構築を行った。ネットワークの中で、NGF 刺激を与えた後、mRNA24 時間で上昇し、継続的にタンパク質レベルで上昇している COX-1 と、2D-DIGE で検出される翻訳後修飾の異なる複数スポットが検出された Dynein IC2、これらをつなげる中心的存在である転写因子 GR からなるシグナルネットワーク (Dynein IC2-GR-COX signal) が注目された (Fig. 3)。

これらの解析結果から、NF1 ノックダウンによって上昇した分子群の中では、Dynein IC2 等の因子によって構成された複合体により GR が核へと移行して転写因子として機能した結果、COX-1 の転写が

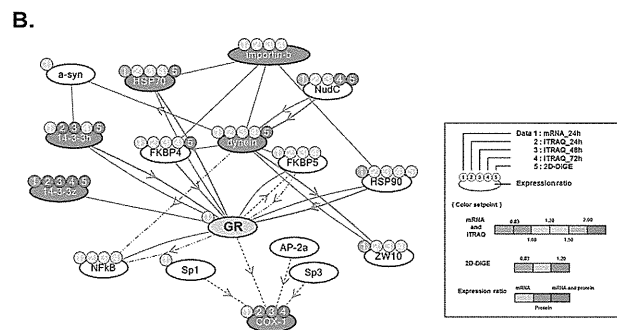


Fig. 3 NF1 ノックダウン細胞において発現上昇していた dynein IC2、GR、COX-1 を含む異常シグナリング (活性化分子ネットワーク群から抽出)

誘導されているのではないかという仮説が考えられた。またこのシグナルの亢進が NF1-KD 細胞において神経系の分化異常を引き起こしているのではないかと推測された。

2. 新規 NF1 病態関連シグナル伝達経路

Dynein-GR-Cox1 の検証

Dynein IC2 の経時的な発現変動を解析するために、Dynein IC 特異的抗体を用いて二次元ウエスタンブロット解析を詳細に行った。2D-DIGE で行った処理と同様の方法で、NF1 siRNA /control siRNA 処理細胞から lysate を調製し解析に供した。2D-WB 解析の結果、新たに 1' スポットが検出され、Dynein IC2 の alternative splicing form (Dynein IC2-B, IC2-C)、とそれらのリン酸化修飾によって変動した 6 つのスポットが確認できた (Fig. 4A)。

2D-DIGE の結果と同様に、Dynein IC2-B は control に比べて NF1-KD 細胞での発現量が低く、Dynein IC2-C は高いことがわかった。NGF 刺激を受けると、control 細胞ではリン酸化 Dynein IC2-B が上昇し、非リン酸化 Dynein IC2-B および Dynein IC2-C が減少するが、NF-KD 細胞では非リン酸化 Dynein IC2-B および Dynein IC2-C が高く、リン酸化 Dynein IC2-B が減少していたことがわかった。

次に Dynein IC2-C の発現とリン酸化の上昇が NF1-KD 細胞において顕著であったことから、Dynein IC2-C をノックダウンによる表現型への影響を調べるために、PC12 細胞に NF1 と Dynein IC2-C の両 siRNA の共導入を行った。両 siRNA 導入後、NGF 刺激 48 時間で回収したサンプルを Dynein IC 抗体を用いて、二次元ウエスタンブロットで解析した。NF1 ノックダウンによって発現上昇した Dynein IC2-C は確かに、発現が抑制されていることを確認した (Fig. 4-A)。この時の、PC12 細胞の表現型を調べたところ、NF1 ノックダウンによって

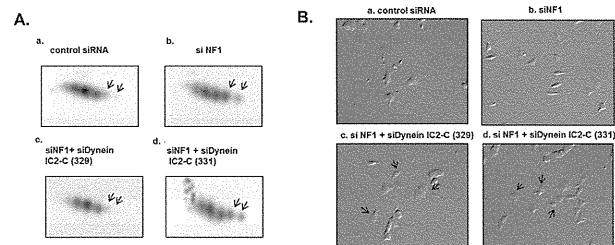


Fig. 4 二次元電気泳動/ウエスタンブロット解析による NF1 ノックダウン PC12 細胞内 Dynein IC2 の発現変動の検証と dynein IC2-C のノックダウンによる NF1-KD PC12 細胞の神経突起伸長阻害の回復

退縮した神経突起が、siDynein IC2-C を共処理することによって、顕著に伸長の改善を示すことが判明した (Fig. 4-B)。従って、Dynein IC2-C は NF1-KD 細胞内において、神経突起の伸長阻害に働く事が考えられた。

NF1 をノックダウンした PC12 細胞において、NGF 刺激により発現誘導されると同定された COX-1 の発現変動の検証をウェスタンブロット解析により行った。COX-1 の発現量は、コントロール細胞と NF1 をノックダウンした細胞と比較して、特に NGF 刺激を受けた後で、コントロールと比べて継続的に発現が有意に上昇していることが明らかとなった (Fig. 5)。

また核画分の GR 発現量をウェスタンブロット解析により比較し、GR の核移行を検討した結果、NGF 刺激した NF1 ノックダウン PC12 細胞の核内 GR 発現量は、コントロールと比較して有意に上昇していることが明らかとなった (Fig. 6)。

NF1 ノックダウンにより継続的に発現上昇した COX-1 の GR による発現制御を検証するため、GR のアンタゴニストである Mifepristone 処理を行い、COX-1 の発現への影響を調べた。PC12 細胞にコントロールまたは NF1 siRNA を導入後、30 分間 10mM Mifepristone 処理を行い、NGF 刺激 48 時

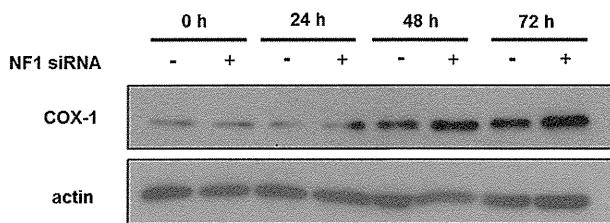


Fig. 5 NF1 ノックダウン PC12 細胞内における COX-1 発現量変化のウェスタンブロット解析による検証

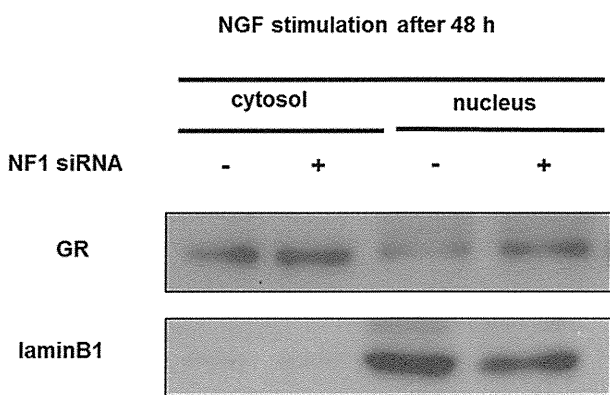


Fig. 6 NF1 ノックダウン PC12 細胞における GR の核内発現のウェスタンブロット解析

間後にサンプルを回収し、COX-1 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、NF1 ノックダウンにより発現上昇していた COX-1 は Mifepristone 処理によって発現が減少した (Fig. 7-A)。

Dynein IC2 が NF1 ノックダウン時に増加した GR の核局在の変化に関与を調べるために、siDynein IC2 を共処理し、GR の細胞内局在について解析を行った。PC12 細胞に siRNA を導入し、導入後 NGF 刺激 48 時間で細胞を回収し、細胞質と核画分の分画を行い、両画分において GR 抗体を用い、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、NF1 ノックダウンによって核局在を示した GR の量が Dynein IC2 siRNA との共処理によって減少することがわかった (Fig. 7-B)。

NF1 siRNA と siDynein IC2 の共導入による COX-1 の発現変化を解析した。NF1 ノックダウンによって発現上昇した COX-1 は、siDynein IC2 を共に処理することによって、コントロール細胞と同程度まで発現量が減少した (Fig. 7-C)。

最後に NF1 のノックダウンによって発現上昇する COX-1 について、siRNA を用いた発現抑制実験を行った。まず NF1-KD 細胞に COX-1 siRNA を導入したことによる表現型の影響について調べた。NF1 ノックダウンによって発現上昇した COX-1 は siCOX-1 との共処理によって発現が抑制されていることを確認した (Fig. 8A)。また、siCOX-1 を共処理した PC12 細胞では神経突起の伸長が観察された (Fig. 8B)。

これらの結果から、PC12 細胞において NF1 ノックダウンにより過剰に合成された COX-1 の発現を抑制することによって、NF1 モデル細胞に特徴的

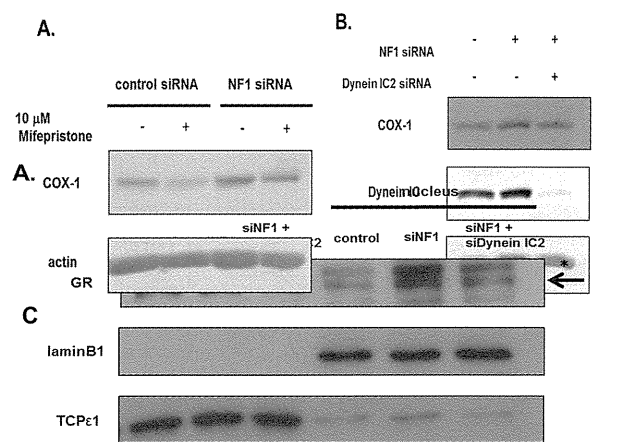


Fig. 7 Dynein IC2-GR-COX-1 ネットワークの検証

な神経突起退縮の改善が起こることがわかった。

D. 考察

本研究では、NF1 ノックダウンに伴う分化異常に連動して変動する分子群の中で、Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルを抽出して、その挙動を明らかにした。NF1 欠損PC12 細胞で上昇していた Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルの慢性的な亢進は、プロスタグランジン産生を増大することで、神経線維腫症 I 型で見られる神経系細胞の分化や増殖の異常を誘発している可能性が考えられる。

E. 結論

本研究では、NF1 病態モデル PC12 細胞において我々の研究室で開発した融合プロテオミクス法によって Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルの活性化による COX-1 の発現が NF1 ノックダウン細胞において亢進していることを見出した。

神経線維腫症 I 型で生じる神経系分化異常を始めとした多彩な症状の発症は、これらのシグナルの制

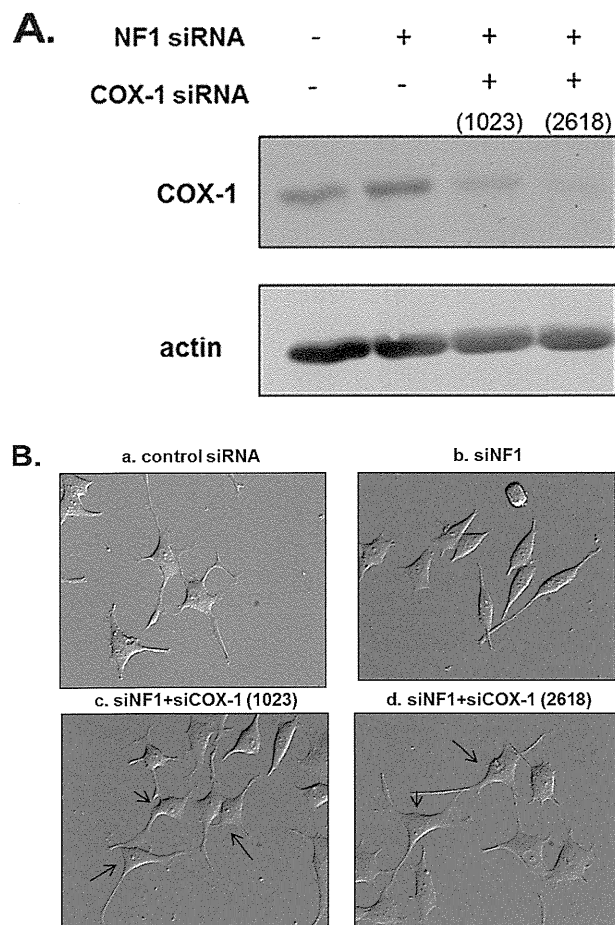


Fig. 8 COX-1 のノックダウンによる NF1-KD PC12 細胞における神経突起伸長阻害の回復

御異常に関与している可能性が考えられる。またこのシグナル経路の抑制は、新たな治療ターゲットとなるかもしれない。特に COX-1 は現在鎮痛剤等で治療に使われているが、NF1 モデル細胞で特徴的な表現形である神経突起の退縮を有意に回復させたことから、今後NF1 の治療において細胞の分化に焦点を当てた有用なターゲットになる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirayama M, Kobayashi D, Mizuguchi S, Morikawa T, Nagayama M, Yoshizawa A, Kawano S, and Araki N*. Integrated proteomics identified a novel activation signaling of dynein IC2-GR-COX-1 in NF1 disease model cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, in press 2013
- 2) Nambu, NA., Midorikawa U, Mizuguchi S, Hide T, Nagai M, Komohara Y, Nagayama M, Hirayama M, Kobayashi D, Tsubota N, Takezaki T, Makino K, Nakamura H, Takeya M, Kuratsu J and Araki N*. Glioma initiating cells form a differentiation niche via the induction of extracellular matrices and integrin α V. *PLOS ONE*. 2013. in press.
- 3) Nitta H, Wada Y, Kawano Y, Murakami Y, Irie A, Taniguchi K, Kikuchi K, Yamada G., Suzuki K, Honda J, Wilson-Morifuji M, Araki N, Eto M, Baba H and Imamura T. Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a-receptor (CD88). *Clinical Cancer Research*, 2013, 19(8); 1-10
- 4) Yamamoto T, Nakayama K, Hirano H, Tomonaga T, Ishihama Y, Yamada T, Kondo T, Koderu Y, Sato Y, Araki, N, Mamitsuka, H, Goshima N. The integrated view of human chromosome X-centric proteome project. *the J Proteome Res*. 2012; 12: 58-61
- 5) Sawanyawisuthi K, Wongkham C, Riggins GJ, Wongkham S, Araki N*. Possible involvement of Cyclophilin A processing in fumagillin-induced suppression of cholangiocarcinoma cell proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13 Suppl:137-41.
- 6) Irie A, Harada K, Araki N* Nishimura Y. Phosphorylation by PKD2 at Ser171 of SET reduced its

inhibitory effect on PP2A phosphatase in Tcells. *ProsOne*, 2012, ;7(12):e51242. doi: 10.1371

- 7) Khaenam P, Niibori NM, Okada S, Jearanaikoon P, Araki N*, Limpai boon T*. Contribution of RIZ1 in proliferation and migration of liver fluke-related cholangiocarcinoma cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2012; 13, 4007-4011,
- 8) Shimada H, Nambu-Niibori A, Wilson-Morifuji M, Mizuguchi S, Araki N, Mezaki, Y, Senoo H, Ishikawa K, Okamoto O, Fujiwara S. Epiplakin modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of three-dimensional cell clusters. *J. Dermatol.* 2013 40(4): 249-58.
- 9) Sawanyawisuth K, Wongkham C, Araki N, Zhao Q, Riggins GJ, Wongkham S*. Serial Analysis of Gene Expression Reveals Promising Therapeutic Targets for Liver Fluke-associated Cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13 Suppl:89-93.

2. 学会発表

- 1) 平成 23 年度日刊工業新聞 10 大新製品賞 (平成 24 年 1 月 26 日大阪)
- 2) 融合プロテオミクスによるがん幹細胞の分化誘導メカニズムの解析 荒木令江、南部 (新堀) 晶子、緑川宇一、水口惣平、小林大樹、平山未央、菰原義弘、秀拓一郎、竹屋元裕、倉津純一 日本プロテオーム学会 2012 年大会日本ヒトプロテオーム機構 (東京) 平成 24 年 7 月 26 日~27 日
- 3) 融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症 I 型 (NF1) 関連因子 TCTP の同定と、治療標的としての機能解析 小林大樹、平山未央、菰原義弘、水口惣平、ウィルソン-森藤政代、尹 浩信、竹屋元裕、倉持 朗、荒木令江 日本プロテオーム学会 2012 年大会日本ヒトプロテオーム機構 (東京) 平成 24 年 7 月 26 日~27 日
- 4) An integrated proteomics by iPEACH, a new application, identified novel activated signal cascades in chemotherapy resistant malignant gliomas Araki N, Mizuguchi S, Morikawa T, kawano S, Yamaguchi A, Kobayashi D, Hirayama M, Midorikawa U, Nakamura H, Kuratsu J. HUPUO 11th Annual World Congress (Boston,US), 9-13 September 2012

- 5) Integrated Proteomics Identified Translationally Controlled Tumor Protein as a Biological Target for Neurofibroma and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors Kobayashi D, Hirayama M, Komohara Y, Mizuguchi S, Wilson-morifuji M, Ihn h, Takeya M, Kuramochi A, and Araki N. HUPUO 11th Annual World Congress (Boston,US) 9-13 September 2012
- 6) Analysis of abnormal cellular signals via silencing of NF1 tumor suppressor protein in neuronal cells by integrated proteomic Hirayama M, Kobayashi D, Morikawa T, Nagayama M, Mizuguchi S, Araki N. HUPUO 11th Annual World Congress (Boston,US) 9-13 September 2012
- 7) 融合プロテオミクスによるグリオーマの化学治療予後予測分子ネットワークの解析 荒木令江、水口惣平、森川 崇、坪田誠之、小林大樹、平山未央、緑川宇一、中村英夫、倉津純一 第 70 回日本癌学会学術総会 (札幌) 平成 24 年 9 月 19 日~21 日
- 8) ヒト舌癌における HIF-1 α を介した高転移性がん細胞の増殖機構の解析 森藤政代、新堀晶子、水口惣平、小林大樹、荒木令江 第 70 回日本癌学会学術総会 (札幌) 平成 24 年 9 月 19 日~21 日
- 9) 薬学における融合オミクス解析 融合プロテオミクスによるがんの病態システムズバイオロジー 荒木令江、招待講演 生命医薬情報学連合大会 2012 (2012 年日本バイオインフォマティクス学会年会 情報計算化学生物学会 (CBI 学会) 年次大会オミックス医療研究会年会) (東京) 平成 24 年 10 月 16 日
- 10) プロテオミクスを基盤とした癌のシステムズバイオロジー 荒木令江、和歌山県立医科大学特別公演 (和歌山) 平成 24 年 10 月 19 日
- 11) 翻訳後の分子間相互作用をとらえる新しいタンパク質解析技術~融合プロテオミクスによる病態シグナルの検出と創薬への挑戦 荒木令江 シンポジウム招待講演 新薬理セミナー2012 (熊本) 平成 24 年 11 月 24 日
- 12) 融合プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞の分化誘導ニッチの解析 荒木令江、南部 (新堀) 晶子、緑川宇一、永井美奈子、小林大樹、水口惣平、秀拓一郎、中村英夫、菰原義弘、竹屋元裕、倉津純一 第 84 回日本生化学会大会 (福岡) 平成 24 年 12 月 14 日~16 日

- 13) 融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症1型(NF1)関連因子TCTPの同定と、そのNF1腫瘍における機能解析 小林大樹、平山未央、菰原義弘、水口惣平、ウイルソン森藤政代、尹浩信、竹屋元裕、倉持朗、荒木令江 第84回日本生化学会大会(福岡)平成24年12月14日~16日
- 14) 全自動2次元電気泳道装置を用いた腫瘍マーカータンパク質の解析 西村宗徳、緑川宇一、長山 慈、小林大樹、平山未央、廣田由夏、村上洋嗣、和田孝浩、今村隆寿、直江秀昭、佐々木裕、鶴沼豊、荒木令江 第84回日本生化学会大会(福岡)平成24年12月14日~16日
- 15) 腫瘍細胞内ピメンチンの翻訳後就職およびフラグメント化とその機能解析 山口 浩、小林大樹、荒木令江 第84回日本生化学会大会(福岡)平成24年12月14日~16日
- 16) 融合プロテオミクスによる癌特異的分子の統合的解析 荒木令江 産業総合技術研究所セミナー(つくば)平成25年3月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許出願

- 1) 特許出願：荒木令江*、小林大樹、水口惣平、平山未央 発明の名称：融合プロテオミクスによるNF1特異的タンパク質の同定方法、NF1特異的タンパク質発現抑制方法、NF1特異的タンパク質の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての使用方法 発願番号：特願2012-075242 出願日：平成24年3月28日 出願人：国立大学法人熊本大学
- 2) 特許出願：荒木令江*、水口惣平、森川 崇、坪田誠之、小林大樹、倉津純一、ウイルソン政代 発明の名称：統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法並びに同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法、およびそれを用いた原因物質同定方法 出願番号：特願2012-509621 出願日：2012年9月11日出願 出願人：国立大学法人熊本大学

神経線維腫症 1 型のバイオマーカーについて

研究分担者 吉田雄一 鳥取大学医学部感覚運動医学講座皮膚病態学分野准教授

研究要旨

我々は神経線維腫症 1 型 (NF1) に対して、臨床的に神経線維腫を含めて病状の進行に伴い上昇する有用な血清バイオマーカーの検索を行っている。Melanoma inhibitory activity (MIA) は悪性黒色腫の腫瘍細胞で発現がみられ、進行期悪性黒色腫の腫瘍マーカーとして一般的に用いられている。我々はこれまでに NF1 では健常人と比較して血清 MIA 値に有意な上昇がみられることを示してきた。さらに検討をすすめた結果、神経線維腫内では MIA mRNA の発現上昇がみられ、免疫組織化学染色では、神経線維腫内の CD117 (c-kit) 陽性細胞に MIA の発現がみられた。

NF1 における MIA の生物学的意義については現時点では不明であるが、メラノサイトに対してはアポトーシスの抑制に関与するとの報告もあり、今後さらに神経線維腫の発生に関わるシュワン細胞に対する作用について検討する予定である。

古村南夫
山元 修

久留米大学医学部皮膚科
鳥取大学医学部感覚運動医学
講座皮膚病態学分野

の神経線維腫の数や大きさと相関することを示し、バイオマーカーとして有用であることを報告した (BMD Med 9:82, 2011)。彼らはシュワン細胞から MIA が産生されるのではないかと推測したが、我々はその結果に疑問をもち、NF1 の神経線維腫における MIA の発現についてさらに検討を行うこととした。

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型 (NF1) は皮膚の神経線維腫、びまん性神経線維腫、悪性末梢神経鞘腫瘍などの腫瘍性病変を含め様々な症候を合併するが、家系内においても症状の個人差が大きく、将来的な合併症や悪性化を予測することはできない。NF1 ではこれまで血清バイオマーカーとして nerve growth factor (Arch Neurol 38: 401, 1981)、fetal antigen 1 (Br J Dermatol 140: 1054, 1999)、midkine (Clin Cancer Res 10: 5677, 2004)、adrenomedullin (Clin Cancer Res 16: 5048, 2010) などが有用であるとの報告がなされてきたが、皮膚の神経線維腫やびまん性神経線維腫との相関関係については確認されていない。

Melanoma inhibitory activity (MIA) は悪性黒色腫の腫瘍細胞で発現がみられ、進行期悪性黒色腫の腫瘍マーカーとして一般的に用いられている。我々はこれまでに NF1 では健常人と比較して血清 MIA 値に有意な上昇がみられることを示してきた。2011 年に Kolanczyk らは我々と同様に血清 MIA が NF1

B. 研究方法

まず NF1 患者背景について調査した上で ELISA 法 (MIA ELISA kit, Roche) により血清 MIA 値の測定を行った。さらに手術時に得られた神経線維腫から RNA を抽出し (RNeasy fibrous tissue mini kit, Qiagen)、cDNA を合成後 (cDNA synthesis kit, Roche)、MIA に対する特異的なプライマーを用いて、RT-PCR および real time-PCR を行った。免疫組織化学染色は抗 MIA 抗体 (R&D systems)、抗 CD117 抗体 (Thermo Fisher Scientific)、Red and Blue Map kit (Ventana Medical Systems) を用いて自動免疫染色装置にて施行した。

(倫理面への配慮)

当施設においては、患者から得られた試料を医学

研究に用いる場合には、口頭と文書により十分な説明を行い（インフォームド・コンセント）、文書による明確な同意が得られた患者においてのみ、医学研究用の試料として取り扱うこととなっているので、その規定を遵守して研究を遂行した。

C. 研究結果

NF1 患者 25 例で検討を行ったところ、血清MIA値はNF1では 13.1 ± 6.8 ng/ml であり、健常人 (9.3 ± 7.4 ng/ml) と比較して有意に高かった ($p < 0.05$) (図 1)。我々の検討では、MIA は小児では高値を示す傾向があり、びまん性神経線維腫を合併すると上

昇する傾向があったが、神経線維腫の数との相関関係はなかった。

RT-PCR による検討では、周囲の皮膚と比較し、神経線維腫内で MIA mRNA の発現の上昇がみられ (図 2)、real time PCR においても c-kit、stem cell factor と同様に MIA の発現上昇がみられた。

神経線維腫では周囲皮膚と比較して肥満細胞数の増加がみられ (図 3)、免疫組織化学染色では、興味深いことに神経線維腫内の CD117 (c-kit) 陽性細胞に MIA の発現がみられた (図 4)。

D. 考察

神経線維腫の発生には NF1-/- の Schwann cell と

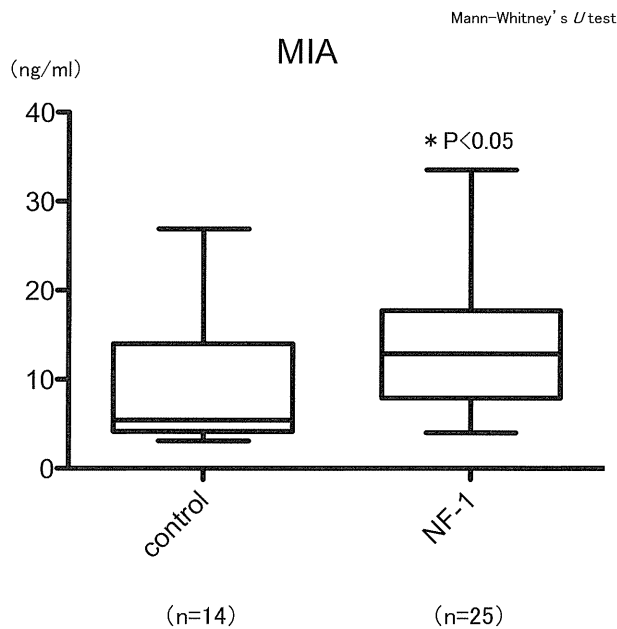


図 1

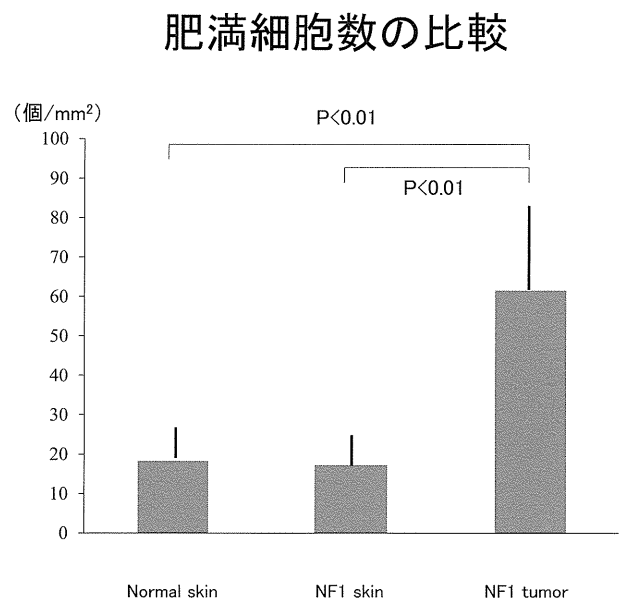
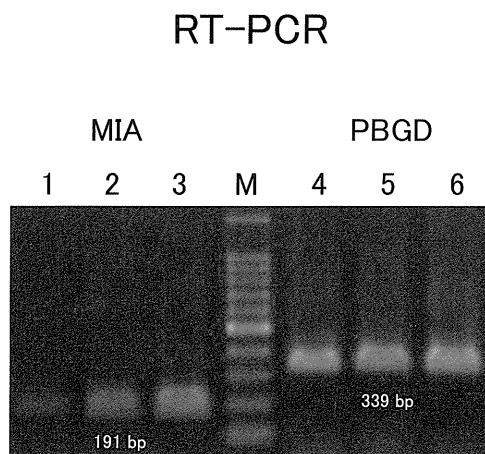


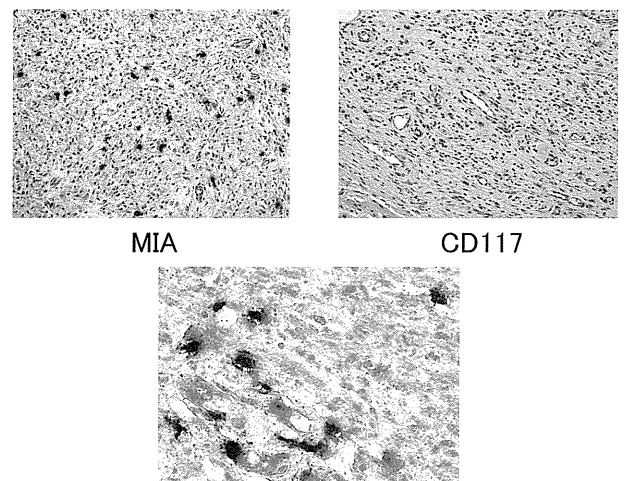
図 3



1, 4: 健常人皮膚; 2, 5: NF1皮膚; 3, 6: NF1神経線維腫

図 2

免疫組織化学染色



二重染色

図 4

NF1+/- の mast cell が極めて重要な役割を果たしている。今回の我々の検討では Kolanczyk らの報告と同様に MIA が NF1 のバイオマーカーとして有用であることが明らかとなった。血清 MIA 値は特に腹腔内の神経線維腫の合併の検索に有用であるかもしれない。しかしながら、小児では腫瘍の合併がなくても高値を示す傾向があり、注意が必要である。我々の検討では、神経線維腫の数との相関関係は明らかではなかったが、症例数や神経線維腫を合併していない若年者が多数含まれていたことが原因ではないかと考えられた。

NF1 において MIA が高値を示す要因としてシュワン細胞ではなく、肥満細胞の関与が示唆された。MIA は悪性黒色腫では転移に関わっていると報告されているが、NF1 における役割についてはいまだ不明な点が多い。MIA はメラノサイトに対してアポトーシスを抑制するとの報告があり、もしかすると肥満細胞から産生される MIA が神経線維腫内のシュワン細胞に対して何らかの役割を果たしているのかもしれない。今後、シュワン細胞を用いた in vitro の系でさらに詳細な検討を行う必要があると考えられる。

E. 結論

本研究により、MIA が NF1 のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。神経線維腫内の肥満細胞が MIA の産生に関与することが明らかとなったが、神経線維腫の構成細胞を用いたさらなる詳細な検討が必要である。

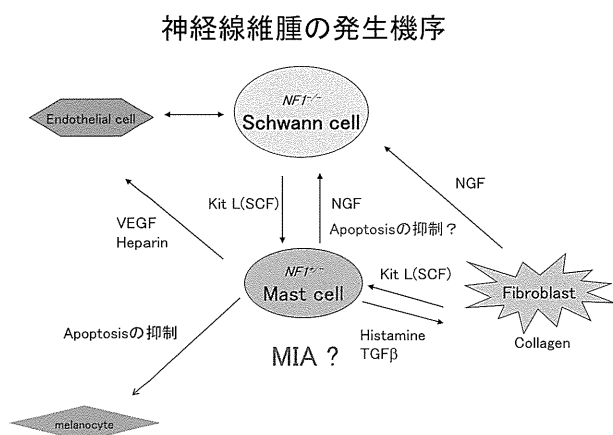


図 5

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida, Y., Furumura, M., Tahira, M., Horie, T. and Yamamoto, O.: Serum biomarker in neurofibromatosis type 1. J. Dermatol. Sci. 67(2): 155-158, 2012
- 2) 吉田雄一：皮膚科学 神経線維腫症 1 型に対する targeted therapy の可能性. 医学のあゆみ 242 (10) : 820, 2012
- 3) 吉田雄一、山元 修：全身に無数の神経線維腫を生じ、小脳出血をきたした神経線維腫症 1 型. 日レ病会誌 3 (1) : 33-35, 2012

2. 学会発表

- 1) 吉田雄一：神経線維腫症 1 型の診断と治療. 第 111 回日本皮膚科学会総会 6 月 1 日 2012 年 京都
- 2) 吉田雄一、山元 修：神経線維腫症 1 型に生じた骨形成異常を伴ったびまん性神経線維腫の 2 例. 第 10 回山陰形成外科懇話会 6 月 24 日 2012 年 松江
- 3) 後藤寛之、足立孝司、吉田雄一、山元 修：小児に生じた solitary neurofibroma の 1 例. 第 124 回山陰・第 20 回島根合同開催地方会 7 月 22 日 2012 年 米子
- 4) 吉田雄一、山田七子、山元 修：悪性末梢神経鞘腫瘍との鑑別を要した神経線維腫症 1 型モザイクに生じたリュプロレリン肉芽腫. 第 4 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 11 月 4 日 2012 年 東京
- 5) 吉田雄一、山元 修：神経線維腫症 1 型 (NF1) では血清 melanoma inhibitory activity (MIA) が上昇するのか? 第 8 回中国研究皮膚科セミナー 11 月 17 日 2012 年 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

3年の間に生じたNF1男児の脳幹部神経膠腫に対する 内視鏡的腫瘍摘出術

研究分担者 齋藤 清 福島県立医科大学脳神経外科教授

研究要旨

NF1に伴う神経膠腫として、視神経や脳幹部などに発生する毛様細胞性星状細胞腫が知られている。一般的に良性のためMRIで経過観察することが多い。しかし、悪性神経膠腫の報告もあり、ときに生検術が必要になることもある。症例は9歳男児。痙攣をおこし、MRI検査で視交差および脳幹部に腫瘍が見つかった。3年前のMRIでは脳幹部腫瘍はみられず、悪性の可能性も否定できないために手術を計画した。低侵襲で手術を行うために、2セットのhigh definitionカメラと4mmおよび2.7mmの神経内視鏡を用いて腫瘍を摘出した。短期間で発生した毛様細胞性星状細胞腫は希と思われる。手術には内視鏡を用いた低侵襲で安全な手技が有用と考える。

岸田悠吾	福島県立医科大学脳神経外科 講師
佐藤 拓	福島県立医科大学脳神経外科 講師
市川優寛	福島県立医科大学脳神経外科 講師
佐久間潤	福島県立医科大学脳神経外科 准教授

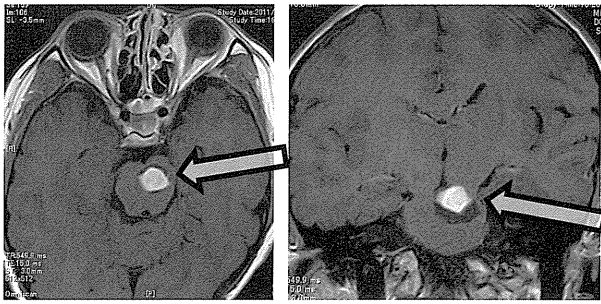
A. 研究目的

神経線維腫症1型(NF1)に伴う脳腫瘍としては、脳神経や眼窩および顔面や頭部に発生する神経線維腫と、視神経や脳幹部などに発生する良性の神経膠腫(毛様細胞性星状細胞腫pilocytic astrocytoma)が知られている。毛様細胞性星状細胞腫はWHO grade 1で成長は緩徐であり、自然退縮もみられる。特に脳幹部に発生する場合にはMRIで経過観察することが多い。しかし、悪性神経膠腫の報告もあり、ときに生検術が必要になることもある。今回は神経内視鏡を用いて腫瘍摘出をおこなった症例を経験したので報告する。

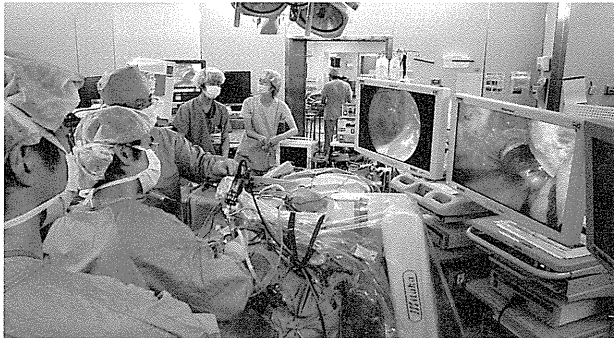
B. 症例報告

症例は9歳男児で、1.5歳時にNF1と診断されている。3年前(5歳時)のMRIでは脳腫瘍はみつかっていない。今回痙攣をおこし、MRI検査で視交差および脳幹部に腫瘍が見つかった。MRI所見からは毛様細胞性星状細胞腫が疑われたが、3年の間に発生しており、悪性神経膠腫の可能性も否定できないと考え手術を計画した。

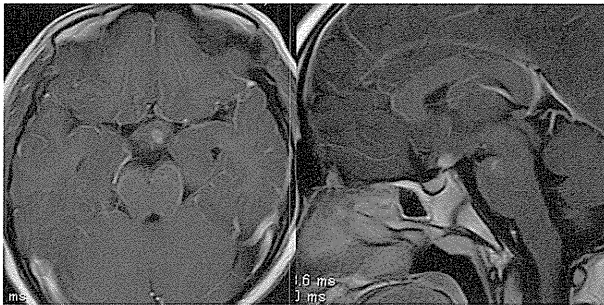
脳幹部内の腫瘍に対して最低限の侵襲で手術を行うために、神経内視鏡手術を選択した。アプローチは脳幹左からの進入とし(subtemporal approach)、ナビゲーション機器と2セットのhigh definitionカメラを準備した。4mmの内視鏡で脳幹表面を観察し、運動誘発電位の反応が出ない部位を穿刺し、2.7mmの神経内視鏡で腫瘍腔を観察しながら腫瘍を摘出した。病理検査結果は毛様細胞性星状細胞腫であった。腫瘍はほぼ全摘出され、術後神経症状も出現しなかった。



術前造影MRIと手術アプローチ



手術風景



術後造影MRI

C. 考察

NF1に伴う脳腫瘍としては視神経膠腫が有名であるが、神経膠腫は脳幹部などその他の部位にも発生する。通常病理学的には良性の毛様細胞性星状細胞腫pilocytic astrocytoma (WHO grade 1)であり、自然退縮もあることから経過観察されることが多い。

これに対して、NF1に伴う神経膠腫の100例を検討した論文では、pilocytic astrocytomaは49%

であり、grade 3やgrade 4が22%であったと報告されている(J Neuropathol Exp Neurol 67: 240-249, 2008)。この論文では、良好な生存率に関係した要因は10歳未満と全摘出であった。2200例のpilocytic astrocytomaを病理学的に検討した論文では、34例に退形成像がみられ(うち8例はNF1)これらの中間生存は24ヶ月であった(Am J Surg Pathol 34: 147-160, 2010)。また、NF1に伴う若年者pilocytic astrocytomaが悪性転化し亡くなったという2例報告もある(Pediatr Hematol Oncol 33: e198-201, 2011)。急な再発例では悪性転化を考えるべきと警告している。

これらの報告から考察として、NF1に伴う神経膠腫には悪性例もあることを考慮すべきことが考えられる。本例では3年間に腫瘍が生じており、病理学的な確認が必要と判断した。手術では、可能であれば全摘出が望ましいが、脳幹部の手術は容易ではなく危険性を伴う。今回用いた内視鏡による摘出は、侵襲が少なく安全な方法であった。今後も適応を限って同手術を施行したい。

D. 結論

3年の間に生じた脳幹部神経膠腫の9歳男児を報告した。通常良性の毛様細胞性星状細胞腫であるが、悪性例の報告もあり、急速に増大する場合には手術が必要である。神経内視鏡手術は低侵襲で安全な方法と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表

岸田悠吾：脳幹部pilocytic astrocytomaに対する内視鏡的摘出術. 第4回日本レクリングハウゼン病学会学術大会、2012年11月、東京

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

神経線維腫症 1 型患者の色素性病変に対する Q-Switched Nd:YAG Laser を用いたレーザートーニングの有効性に関する研究

研究分担者 中山樹一郎 福岡大学医学部皮膚科教授

研究要旨

神経線維腫症 1 型にみられるカフェオレ斑や小レックリングハウゼン斑に対する Q-Switched Nd:YAG Laser を用いたレーザートーニングの有効性を検討した。結果は小レックリングハウゼン斑の方がカフェオレ斑より改善した。その効果は顔面に顕著であった。本療法は安全性が高く、患者満足度も高い優れた方法になる可能性がある。

今福信一、佐藤典子、徳永哲夫
福岡大学医学部皮膚科

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型にみられる皮膚病変のうちカフェオレ斑や小レックリングハウゼン斑は患者の QOL 低下に大きなインパクトがある。これまで本色素斑には各種レーザー治療の効果が検討されてきたが、現在まで有効性のある確立された治療指針はない。今回肝斑に有効といわれている Q-Switched Nd:YAG Laser を用いたレーザートーニングをおこない、色素斑の改善効果を検討した。

B. 研究方法

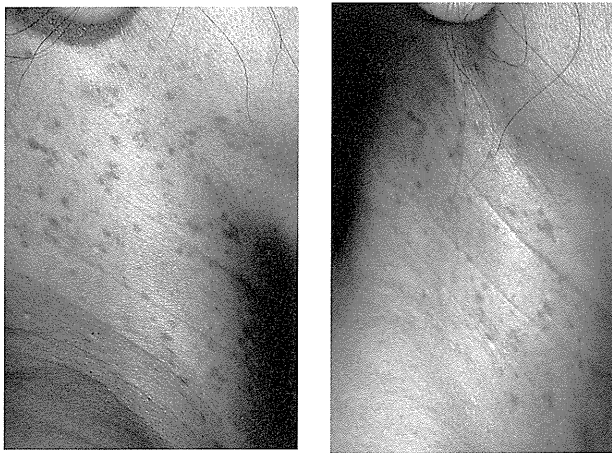
対象は同意を得た顔面・頸部・体幹にカフェオレ斑や小レックリングハウゼン斑を有する神経線維腫症 1 型（以下 NF1）の若年～中年の女性患者で、使用機器は Q-Switched Nd:YAG Laser MedLiteTMC6 (HoyaConBio Inc., USA) で、1～2 週に 1 回 2.5J/cm² 5Hz 6mm スポットで照射した。試験方法は同一患者によるハーフサイド比較試験で、半側を laser 照射のみ、対側を laser 照射+タカルシトール軟膏（活性型ビタミン D3、1 日 1～2 回塗布）とした。臨床評価は医師の主観的評価、臨床写真による評価、Crystaleye (OLYMPUS) による評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究については福岡大学病院倫理審査委員会の承認を得た。本照射の予測される効果と副作用を詳細に患者または 20 歳以下の場合は家族（親）に説明し、研究参加を本人または両親から文書で同意を得た。

C. 研究結果

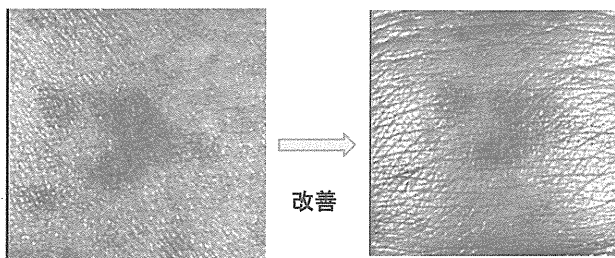
本研究に参加した患者は 9 名であった。本人の希望もきいて、照射部位を決めた。結果は照射 7～10 回後に医師 3 名で判定した。図 1a, b に 10 回照射により軽度改善した小レックリングハウゼン斑の臨床写真と crystaleye の典型的所見を示す。また図 2、3 に口囲の色素斑（色素沈着）の 7 回照射後の経過を示す。図 2 は口囲の右側に、図 3 は左側にタカルシトール軟膏を併用した。いずれも外用している側の方が良かった。体幹の色素斑より顔面の方が、またカフェオレ斑より小レックリングハウゼン斑の方が効果良であった。図 4 に体幹のやや改善と評価した症例の臨床写真 (a) と crystaleye 所見 (b) を示す。全体的には本治療はダウンタイムがなく、安全性の高いものであったが、小レックリングハウゼン斑の効果の方がよく、カフェオレ斑の黒色調の濃いものにはあまり効果がなかった。図 5 に今回参加した患者の本治療に関するアンケート結果を示す。患者の満足度、効果の実感度はいずれも高かった。



照射前 照射後

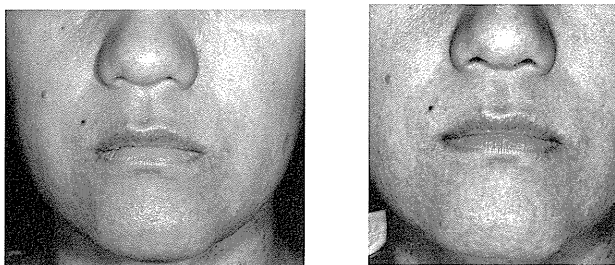
評価：改善

図 1a Case 1 10回照射



照射前 8回照射

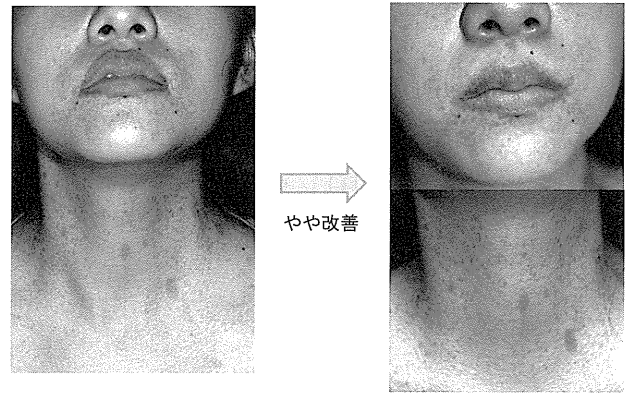
図 1b Case 1 頸部：crystaleye



照射前 7回照射

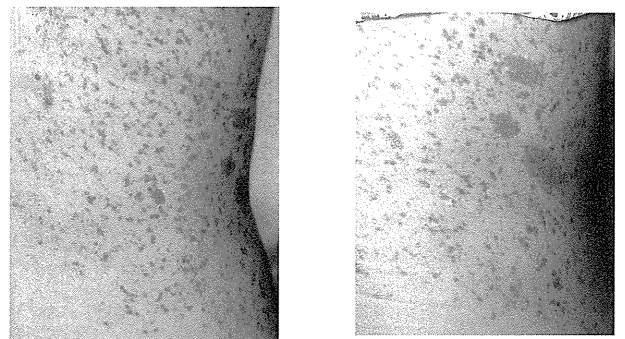
改善

図 2 Case 2 7回照射
右側：タカルシトール軟膏併用



照射前 7回照射

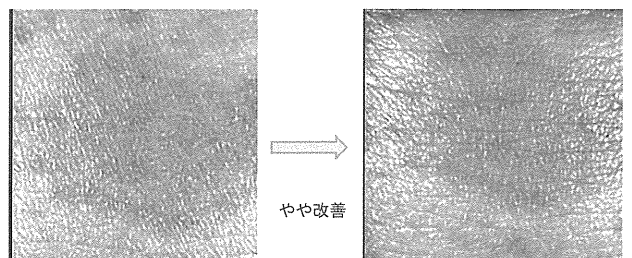
図 3 Case 6 7回照射
左側：タカルシトール軟膏併用



照射前 10回照射

評価：やや改善

図 4a Case 1 10回照射
背部：タカルシトール軟膏併用



照射前 背部 7回照射

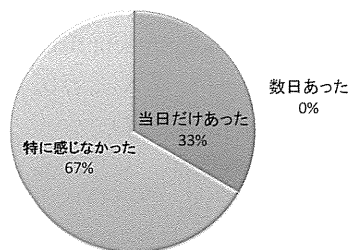
図 4b Case 1 背部：crystaleye

D. 考察

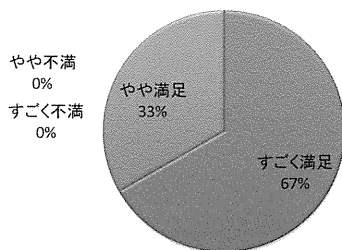
NF1患者の色素性病変、とくに顔面～頸部の色素斑が整容的に大きな悩みとなっている女性にとってはそれが直接QOLの大きな低下につながっており、有効な治療法の開発が必要である。今回肝斑に有効とされるQ-Switched Nd:YAG Laserを用いたレーザートニングを本色素性病変の治療に応用できないか検討した。結果は医師による肉眼的評価、

写真による評価、crystaleye撮影による評価のいずれも全例でやや有効～有効と判断された。また、以前より報告している活性型ビタミンD3外用の併用療法も今回統計学的なデータは得られていないが、レーザートニング単独療法より有効ではないかと評価された。今後の研究課題として1)照射後の炎症性色素沈着や再燃の有無の観察 2)褐色～黒色調の強い色素斑に対するQ-switch ruby laserと本レー

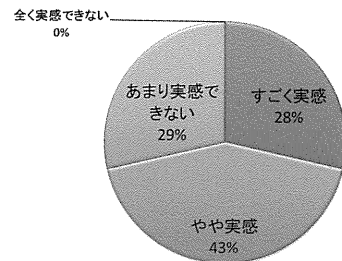
照射後の痛みはありましたか



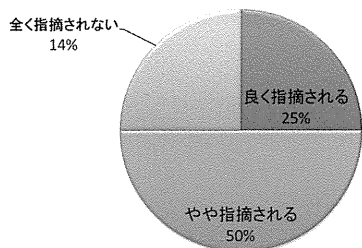
治療に満足しているか



自覚症状として効果を実感できている



周辺の人から変化を指摘される



これからも継続したいか

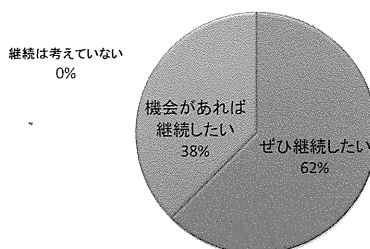


図5 結果 アンケート

ザートーニングの併用効果の検討、が挙げられる。

E. 結論

今回検討した Q-Switched Nd:YAG Laser を用いたレーザートーニングは小レックリングハウゼン斑やカフェオレ斑にダウンタイムがなく、照射後より治療効果が実感できるすぐれた方法であることが結論された。また、活性型ビタミン D3 外用療法との併用でさらに効果の期待ができることも判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐藤千江美、中山樹一郎、今福信一：神経線維腫より採取した神経線維腫細胞および肥満細胞に対するナローバンド UVB と活性型ビタミン D3 の効果について。日本レックリングハウゼン病学会雑誌 3 (1)：42-45, 2012.
- 2) 中山樹一郎、今福信一、森 竜樹、佐藤千江美：ナローバンド UVB 照射レックリングハウゼン病患者の血中ビタミン D3 濃度と臨床評価に関する研究。神経皮膚症候群に関する調査研究平成 23 年度総括・分担研究報告書：55-57, 2012.

2. 学会発表

- 1) 佐藤典子：Q-Switched Nd:YAG Laser を用いたレーザートーニング治療のこれからについて。第 75 回日本皮膚科学会東京支部学術大会ランチョンセミナー (2 月 19 日)
- 2) 中山樹一郎：Neurofibromatosis 1 と肥満細胞－活性型ビタミン D3 の効果－。第 71 回日本皮膚科学会山梨地方会イブニングセミナー (4 月 7 日)
- 3) 中山樹一郎：Neurofibromatosis における皮膚科領域の診断及び治療の現状と展望。第 30 回日本脳腫瘍病理学会シンポジウム (5/月 24-26 日)
- 4) 佐藤典子：Q スイッチ Nd:YAG レーザー MedLite C6 を使用したレーザートーニングについて。第 30 回日本美容皮膚科学会総会ランチョンセミナー (8 月 19 日)
- 5) Sato N, Nakayama J: Treatment of Lentigo Seniles Using Q-switched Ruby Laser and Q-Switched Nd:YAG Laser. The 42nd Annual ESDR Meeting (9 月 19-22 日)
- 6) 佐藤千江美、今福信一、中山樹一郎：神経線維腫より採取したシュワン細胞に対するナローバンド UVB と活性型ビタミン D3、TNF-α、TGF-β1 の効果について。第 4 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 (11 月 4 日)

7) 徳永哲夫、佐藤典子、今福信一、中山樹一郎：
神経線維腫症 1 型患者のカフェ・オ・レ斑と
小レックリング斑に対する Nd-YAG レーザー
を用いたレーザートーニングの有効性につい
て. 神経皮膚症候群に関する調査研究班平成
24 年度総会 (12 月 7 日)

3. カンファレンス等

- 1) 中山樹一郎：Effectiveness of laser-toning on ca-
fé-au-lait spots and ephelides-like pigment fleckles
in patients with neurofibromatosis 1. 福大美容医療
センターカンファレンス (10 月 8 日)
- 2) 今福信一：神経線維腫症の患者・家族の集い
について (久留米) (10 月 9 日)

神経線維腫症 1 型のびまん性神経線維腫減量術における 出血コントロールに関する研究

研究協力者 師井洋一 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野准教授

研究要旨

神経線維腫症 1 型におけるびまん性神経線維腫は悪性腫瘍（悪性末梢神経鞘腫瘍）の発生母地になる可能性あり、また整容的、機能的にも患者の QOL を著しく低下させる原因ともなり得る。そのため、積極的な切除が推奨されているが、きわめて豊富な血管と多数の肥満細胞の存在により、術中、術後の出血が大きな問題となる。我々は、周術期の出血コントロールのため、従来の集族結紮法に加え、術後の出血を軽減する目的でタイオーバー固定を併用する方法を施行し、良好な結果を得ている。びまん性神経線維腫の手術法の一選択肢となる可能性がある。

A. 研究目的

神経線維腫症 1 型（Neurofibromatosis type 1: 以下NF-1）では多数の神経線維腫（NF）が発生し、一部には境界不明瞭なびまん性神経線維腫を生じる。まれではあるが、びまん性神経線維腫または蔓状神経線維腫から悪性腫瘍（悪性末梢神経鞘腫瘍：MPNST）の発生が認められ、患者の予後を決定する重要な因子となっている。またびまん性神経線維腫は緩徐に増大し巨大化する事が多く、整容的、機能的にも患者の QOL を著しく低下させる原因ともなり得る。更に、巨大びまん性神経線維腫は容易に腫瘍内出血を生じやすく、まれに大量出血となり生命予後にも関わる問題となる。しかし、神経線維腫内には出血の原因ともなる無数の結合組織の裏打ちのない血管が増殖し、また肥満細胞も増数する。そのため、摘出術、また減量術においては、通常の止血操作では止血が困難な場合が多い。悪性化の問題や、整容的、機能的問題から早期の減量術が推奨されているにも関わらず、びまん性神経線維腫の減量術が積極的に行われない理由にもなっている。

我々は、今まで報告が多い集族結紮法を施行し、さらに腫瘍周囲を結紮した糸を用いて、閉創後に術創が圧迫されるようにタイオーバー固定を行った。

この方法による術中出血量、手術時間、術後の出血を、このタイオーバー併用集族結紮法を用いなかった減量手術の場合と後ろ向き研究として、比較・検討した。

B. 研究方法

対象とした症例は 4 例で、すべて神経線維腫症 1 型または 5 型症例であった。男女比は 1 : 3、平均年齢は 40.0 歳（18 歳、21 歳、42 歳、74 歳）であった。減量術を施行した部位は後頭部、背部、側腰部、下腿部であり、大きさは 10-20 x 5-15cm であった。詳細を表 1 に示す。術前に造影 MRI を施行し、腫瘍底部へ流入する大きな穿通血管がないことを確認した。

実際には減量するびまん性神経線維腫の皮切線を決定（図A）、マーキング後に皮切線から 2-3cm 外側を隙間なく、5 号角針で可能な限り筋膜まで深く、3-0 または 2-0 絹糸で糸をかけ強めに結紮する（図B）。腫瘍切除後は通常とおり、真皮縫合、皮膚縫合を行い、ペンローズドレインを留置する（図C）。周囲を結紮した糸を用いて術創が圧迫されるように強めにタイオーバー固定する（図D）。タイオーバー固定は術翌日に解除し、その糸も術後 2 日目までに

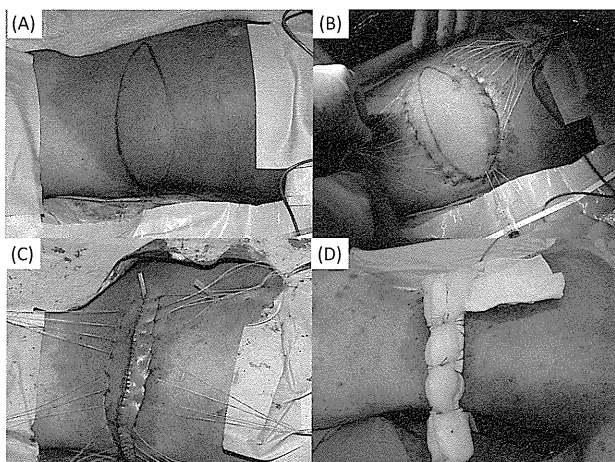
は抜糸した。ペンローズドレーンは術後2-3日に除去し、術後1週間までは入院、安静を指導した。

(倫理面への配慮)

手術時に、通常の手術同意に加え、研究目的に対する同意を文書で取得している。

C. 研究結果

結果を表に示す。タイオーバー併用集簇結紮法のあり、なしで比較すると、平均術中出血量は221g vs 128g、平均手術時間は1時間32分 vs 1時間58分であった。術後血腫に関しては発生1例 vs 2例であり、血腫出現日は術後9日 vs 術後1,3日であった。まだ症例数が少なく明らかな事は不明であるが、手術時間を短縮でき、術後の血腫形成すなわち術後出血の予防が可能である印象を受けた。しかし、術中の出血量に関しては、現在まで軽減の効果



図

は明らかではない。

D. 考察

NF-1におけるびまん性神経線維腫は、腫瘍内の拡張した異常血管や支持組織がきわめて脆弱であることから、術中、術後に多量の出血をきたすことがある。出血量を抑えるため、これまでに低血圧麻酔、術前の選択的動脈塞栓術、超音波凝固切開装置の使用、ネラトンカテーテルを用いたターニケット法、集簇結紮法など様々な方法が試され報告されている。

集簇結紮法とは皮膚科領域や脳外科領域での血管腫切除の際に腫瘍の周囲を囲むように縫合糸で結紮することで出血量を抑える方法であるが、手術終了時には抜糸するため、びまん性神経背に腫に應用すると術後出血による血腫形成を生じる事があった。我々は、集簇結紮法の際に腫瘍周囲を結紮した糸を用いて、閉創後に術創が圧迫されるようにタイオーバー固定を行った。この方法により、比較的容易に術中出血の軽減、術後血腫が予防できる可能性を示唆した。

このタイオーバー併用集簇結紮法は、その他の方法に比較しても、その簡便さ、安全性が際立っている。術前の選択的塞栓術においては、腫瘍底部に大きな流入血管が多数ある場合などは第一選択と考えられる。しかし、実際には腫瘍底部に流入血管がほとんどない場合が多く、また、重篤な合併症の可能性は比較的高いものと思われる。最近の手術器具の進歩による手術操作はより簡便になってきたが、その一つである超音波凝固切開装置は血管を温存しな

表 タイオーバー併用集簇結紮法によるびまん性神経線維腫減量術の詳細

タイオーバー併用集簇結紮法あり							
症例	*NF type	年齢/性	部位	大きさ(cm)	出血量(g)	手術時間	術後血腫 (術後日)
1	1	18/女	腰背部	20×9	288	1時間56分	なし
2	1	42/女	後頭部	10×5	85	1時間10分	なし
3	5	72/女	下腿	18×15	480	1時間28分	なし
4	1	21/男	腰部	17×11	30	1時間35分	あり (9)
タイオーバー併用集簇結紮法なし							
5	1	88/男	背部	13×10	305	1時間20分	なし
6	1	20/男	腰部	20×10	140	2時間00分	あり (1)
7	1	6/男	背部	8×7	12	1時間24分	なし
8	1	56/女	背部	17×13	76	3時間9分	あり (3)

*NF type: 神経線維腫症1型または5型

がら腫瘍を切除できるため、びまん性神経線維腫切除においても出血コントロールに有用である報告が増えている。しかし、そのためには機器を購入する必要があり、何よりこの機器を使用しての切除は長時間かかる事が大きな欠点となっている。ネラトンカテーテルを用いたターニケット法は基本的に集族結紮法と同じ方法であり、術後の止血効果は期待できない。

本研究では、手術時間を短縮でき、術後出血や血腫形成を予防できる可能性を示唆した。手術時間はすべて2時間以内に終わることができ、また術後の血腫は症例4に術後9日目というかなり遅れた時期に血腫を生じたのみであった。この血腫は軽度で、特に処置を必要とせず、自然に吸収された。一方、タイオーバー併用集族結紮法を施行しなかった症例では4例中2例に術後早期の血腫形成を生じ、それぞれ術創の開放、血腫除去術を必要とした。術中出血量に関しては、症例3が比較的多量の出血を生じている。この症例は分節型神経線維腫症(NF-5)で、下肢の神経線維腫とともに、高度の静脈還流異常を伴っており、ターニケットも用いたにもかかわらず、拡張した静脈内に残存したと考えられる血液により比較的多量の出血を生じた。その他の症例に関して、出血量は少なかった印象があり、輸血や自己血の準備は不要であった。

この方法の欠点として、絹糸の縫合固定に時間がかかる、駆血圧の調整ができない、suture markが残る可能性などがあるが、大きな問題にはなるとは考えにくい。症例4の様に術後しばらくたってからの血腫予防はできないが、術後の圧迫の継続について、どの程度まで延長できるか、今後検討すべき点である。また注意点として、結紮はびまん性神経線維腫の腫瘍内で行う様に心がける必要がある。腫瘍辺縁で切除可能であるが、術後の血腫予防にタイオーバー固定が必要で、正常組織に結紮を行う場合には、結紮は緩く行い、締め付けないように注意する必要がある。また、前述のように腫瘍底部への流

入血管の有無を確認するため、術前MRIを施行する必要がある。

E. 結論

びまん性神経線維腫の早期の減量術は悪性化の予防や患者のQOL改善に大きく寄与するが、術中術後の出血が問題であった。今回の検討により、タイオーバー併用集族結紮法は術中のみならず術後の止血効果が期待できる可能性が示唆された。簡便で、安全なこの方法ならば、あらゆる医療機関で施行が可能であり、患者数の多い神経線維腫症患者にとって有益な手術法であると考えられる。

D. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 師井洋一・高原正和・独孤 龍・中原剛士・古江増隆. 顔面に悪性末梢神経鞘腫の再発を繰り返す神経線維腫症1型の一例 日本レックリングハウゼン病学会雑誌3(1):56-59, 2012.

2. 学会発表

- 1) 中野美沙・永江航之介・工藤恭子・竹内 聡・師井洋一・古江増隆. びまん性神経線維腫の減量術における当科の工夫 日本皮膚外科学会総会・学術大会, 2012/9/1 盛岡
- 2) 中野美沙・永江航之介・三田村康貴・工藤恭子・竹内 聡・師井洋一・古江増隆. 分節型神経線維腫症のびまん性神経線維腫症の減量術. 第4回日本レックリングハウゼン病学会, 2012/11/4. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし

神経皮膚症候群に関する研究

研究分担者 大西五三男 東京大学整形外科脊椎外科専任講師

研究要旨

先天性脛骨偽関節症の偽関節部分の骨癒合・骨癒合強度評価が可能な装置の開発

A. 研究目的

神経線維腫症に合併する先天性脛骨偽関節症は、骨癒合が得にくい極めて難治性の疾患である。近年、手術法の進歩により骨癒合率は上昇しているが、偽関節部の骨幅の狭小や変形は残存するが多い。その結果、長期の創外固定器・ギプス・装具の装着が新たな課題となっている。我々は、偽関節部の骨癒合程度を非侵襲に定量評価し、手術・後療法時期の適切な判断を可能とする判定装置の開発に取り組み Echo tracking 法（ET 法）を開発した。これにより、微小荷重に対する変形を定量的に検出し、骨癒合を評価可能である。この手法を用いて先天性脛骨偽関節症の患者に対し骨癒合強度測定を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1)マトリックスプローブを用いた曲げ剛性測定精度評価

21-23 週齢、体重約 4kg で雄の日本白色家兔 56 羽を用いた。右脛骨に骨切りを行い、2mm の Gap を作製し両側式の創外固定を行った。観察期間を 4,6,8 及び 12 週とした。術後、と殺し 4 点曲げ試験を行い ET 法の曲げ剛性測定の正確性評価を行った。

力学試験（4 点曲げ試験）

試験機

Servopulser（Simadzu Co. Ltd., Tokyo, Japan）

荷重条件

・荷重制御

・Preload: 5N

・圧縮速度：0.01mm/sec

変位計測（bending Angle）

1) ET 計測用プローブ

・マトリックスプローブ

（Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan）

変位測定精度：2.6 μm

2) 高精度レーザー変位計

LJ-G 080

（KEYENCE Co. Ltd., Osaka, Japan）

変位測定精度：1 μm

これらの変位計測機を用いて、ウサギ脛骨の 4 点曲げ試験における曲げ角度（ θ ）を計測した。

曲げ剛性計測

4 点曲げ試験における曲げモーメント（M）

$M=FL/6$ (Nm)

F: 荷重 (N)

L: 両支点間距離 (m)

曲げ剛性 (S) 計測

$S=M/\theta$ (Nm/degree)

評価

マトリックスプローブとレーザー変位計を用いて算出した Bending stiffness を比較した。

結果

各々より算出した曲げ剛性の相関関係は、 $R^2=0.8955$, $p<0.001$ で ET 法は曲げ剛性を正確に評価することが可能であった。

2) 曲げ剛性と骨破断強度との相関関係の評価

(対象) 前実験で用いた日本白色家兔を対象とした。

(方法)

力学試験の方法は前実験と同様の手法を用いた。

曲げ剛性計測

4 点曲げ試験における曲げモーメント (M)

$M=FL/6$ (Nm)

F: 荷重 (N)

L: 両支点間距離 (m)

曲げ剛性 (S)計測

$S=M/\theta$ (Nm/degree)

曲げ強度

骨折荷重である最大荷重量から曲げモーメントを算出し曲げ強度とした

評価

曲げ剛性と強度の相関関係をピアソンの相関係数を算出して評価した。

結果

$r=0.862$, $P<0.05$ で曲げ剛性と強度は少なくとも骨癒合過程のリモデリング期まで相関関係を認めた。

3) 東京大学医学部附属病院における先天性脛骨偽関節患者の治療成績

東京大学医学部附属病院における治療方法およびその成績の現状を明らかにするため、本症の治療に関する長期治療成績の調査を行った。

対象

1999年以降当院を受診した先天性脛骨偽関節症患者でイリザロフ創外固定器を用いて脚延長及び変形矯正を行った10例10肢を対象とした。

方法

骨癒合率、治療後の再骨折の有無、成長に伴う偽関節癒合部の変形増悪の有無及び脚長不等の増悪の有無を評価した。

結果

骨癒合率は90%だった。9例9肢に対して矯正術後の経年的に脛骨・大腿骨そして下肢全長の健患比を評価した結果、9歳以上では明らかな脚長不等の増加は認められなかった。しかし、8歳までに1症例において脛骨の脚長不等が生じた。同様に脛骨の変形矯正後の残余変形量を経年的に評価した結果、全ての患者において足関節の外反変形及び脛骨の外反の増加を認めた。

考察

先天性脛骨偽関節症患者の術後長期経過を評価した報告はないが、今回の我々の評価結果は、手術を行う最適な年齢の評価が可能であると考えられる。しかし手術で骨癒合が得られ変形矯正を行っても、その後経年的に脛骨や足関節の変形が進行することが分かった。本症例は術後の偽関節部の再骨折が多く報告されている。変形の進行は再骨折の原因の1つと考えられ、先天性脛骨偽関節症患者は術後長期的な

経過観察が必要である。

(倫理面への配慮)

本年度は動物実験を行った。動物福祉および苦痛に対する対応は、「動物実験倫理委員会規定」に基づき「動物実験承認規定」に従って行った。

D. 健康危険情報

(分担研究報告にて記入せず)

E. 研究発表

1. 論文発表

大西五三男. 骨粗鬆症診断・治療の新展開 定量的CTを用いた有限要素法による骨強度評価. 臨床整形外科 (0557-0433) 45巻10号 Page887-892 (2010.10)

大西五三男. 脊椎・脊髄のバイオメカニクス 椎骨(椎体)の力学的特性 骨密度と椎体骨折の力学解析. 脊椎脊髄ジャーナル (0914-4412) 23巻8号 Page785-789 (2010.08)

大西五三男. 【ロコモティブシンドローム 高齢社会における運動器障害の予防】運動器医療の応用研究 有限要素法による骨粗鬆症(骨強度)評価. 治療学 (0386-8109) 44巻7号 Page778-781 (2010.07)

大西五三男. 最新用語解説 臨床(第3回)三次元有限要素法 骨粗鬆症治療 (1347-572X) 9巻2号 Page181-184 (2010.04)

大西五三男、別所雅彦、松本卓也、金子雅子、大橋 暁、今井一博、中村耕三. 骨粗鬆症における画像診断 有限要素法による骨強度評価の臨床応用 Osteoporosis Japan (0919-6307) 18巻2号 Page192-196 (2010.04)

大西五三男. 【運動と骨II】基礎 骨のバイオメカニクス(有限要素法も含めて) THE BONE (0914-7047) 24巻2号 Page143-150 (2010.04)
超音波エコートラッキング法を用いた骨癒合評価
松山順太郎、大西五三男超音波エコートラッキング法を用いた骨癒合評価. 整形外科 (0030-5901) 61巻2号 Page138 (2010.02)

Ohnishi I, Sato W, Matsuyama J: Treatment of Congenital Pseudoarthrosis of the Tibia-A Multi-Center Study in Japan- Journal of Pediatric Orthopaedics. 25 (2): 219-24, 2005 Mar-Apr.

Ohnishi I, Kurokawa T: Measurement of the tensile forces during bone lengthening. Clinical Biomechanics, 20 (4), 421-427, 2005

- S. Ohashi, I. Ohnishi, T. Kageyama: The Effect of Vascularity on the Canine Distracted Tibial Callus Consolidation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 438, 253-259, 2005
- Matsuyama J, Ohnishi I, Kageyama T, Oshida H, Suwabe T, Nakamura K: Osteogenesis and Angiogenesis in the Regenerating Bone during Transverse Distraction-Quantitative Evaluation Using a Canine Model. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 433, 243-50, 2005
- Matsuyama J, Ohnishi I, Nakamura K: Osteogenesis and Angiogenesis in the Regenerating Bone during Transverse Distraction-Quantitative Evaluation Using a Canine Model. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 433, 243-50, 2005
- Akimitsu Harada, Ryoichi Sakai, Koichi Miyasaka, Toshiki Ohtsuka, Yoshihiro Yoshikawa, Juntaro Matsuyama, Isao Ohnishi, Kozo Nakamura: A New Method for Measuring Bone Strength using Echo-Tracking, *Proceedings of the IEEE, Vancouver, Canada, October, 2006*, 13-16.
- Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Suzuki H, Harada A, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K. A new method for measurement of bone deformation by echo tracking. *Med Eng Phys* 2006;28(6): 588-95.
- Ohashi, S., Ohnishi, I., Kageyama, T., Imai, K. and Nakamura, K., 2007. Distraction osteogenesis promotes angiogenesis in the surrounding muscles. *Clin Orthop Relat Res* 454, 223-229.
- Juntaro Matsuyama, Isao Ohnishi, Ryoichi Sakai, Masahiko Bessho, Takuya Matsumoto, Koichi Miyasaka, Akimitsu Harada, Satoru Ohashi, Kozo Nakamura. A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking. *Ultrasound in Medicine and Biology* 34(5), 775-783, 2008
- CT・CAD/有限要素法解析を用いた創外固定ピン応力の検討—非対称ピンプロファイルはピンと骨の界面における応力集中を軽減する—大橋 暁、大西五三男、別所雅彦、松本卓也、松山順太郎、中村耕三 *日本創外固定・骨延長学会雑誌* 19:175 (2008)
- CT/有限要素法による大腿骨近位部の骨強度評価—検者内・検者間解析信頼性、解析再現性について—別所雅彦、大西五三男、松本卓也、金子雅子、大橋 暁、飛田健治、中村耕三 *Osteoporosis Japan* 17 巻 増刊 1号 Page200
- CT 有限要素法による大腿骨近位部の骨強度評価—年齢別骨強度値の作成と骨強度に影響する因子の解析—金子雅子、大西五三男、別所雅彦、松本卓也、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、林 直人、*Osteoporosis Japan* 17 巻 増刊 1号 Page200
- CT/有限要素法を用いた脊椎椎体の日常生活における骨強度評価—骨粗鬆症治療効果判定への応用—松本卓也、大西五三男、別所雅彦、金子雅子、大橋 暁、飛田健治、中村耕三 *Osteoporosis Japan* 17 巻 増刊 1号 Page202
- CT/有限要素法による椎体骨折リスクおよびアレンドロネート効果の評価—今井一博 (東芝病院 スポーツ整形外科)、大西五三男、山本精三、中村耕三 *Osteoporosis Japan* 17 巻 2号 Page226-229
- 松本卓也、大西五三男、別所雅彦、金子雅子、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、CT/有限要素法を用いた脊椎椎体の日常生活における骨強度評価—骨粗鬆症治療効果判定への応用—SERM: Selective Estrogen Receptor Modulator7号 Page88-89
- 別所雅彦、大西五三男、金子雅子、松本卓也、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、塩酸ラロキシフェン2年内服患者における大腿骨近位部の骨強度変化—CT/有限要素法による薬剤効果判定への応用—、SERM: Selective Estrogen Receptor Modulator7号 Page90-91
- 金子雅子、大西五三男、別所雅彦、松本卓也、大橋 暁、飛田健治、中村耕三、林 直人、CT有限要素法による大腿骨近位部の骨強度評価—骨強度基準値作成に関する予備的研究、*日本整形外科学会雑誌* 83 巻 2号 PageS182
- 今井一博、大西五三男、山本精三、中村耕三、骨強度評価法を用いた閉経後女性における椎体骨折リスクおよびアレンドロネート効果の評価、*日本整形外科学会雑誌* 83 巻 2号 PageS181
- 別所雅彦、大西五三男、松本卓也、大橋 暁、金子雅子、飛田健治、松山順太郎、中村耕三、CT非線形有限要素法を用いた大腿骨近位部と腰椎の骨強度評価について、*日本整形外科学会雑誌* 83 巻 2号 PageS181
- 大橋 暁、大西五三男、松本卓也、飛田健治、別所雅彦、松山順太郎、金子雅子、中村耕三、Universal-Bar-Link 創外固定器を用いた変形矯正における固定器設置位置・角度の誤差許容