



第6回

感覚器シンポジウム

感覚器研究のフロンティア



「血液が動脈を流って全身に行きわたるのは、わがイギリスのテムズ川が海に注ぎこむごとく確かです。……海における水の動きのごとく、絶えず流入と流出があり血管の中で動き続けているに違いありません」
ウィリアム・ハーヴェイ 1578-1657

- 主催 / 東京医療センター臨床研究(感覚器)センター
- 日時 / 平成23年 3月4日(金) 13:00~17:30
- 会場 / 東京医療センター・外来診療棟3階 大会議室

記録集 No.5

特別講演 I

脳微小循環の in vivo での観察 —各病態の白血球血小板動態と正常時の脳血流調節—

- 石川 眞実 (自治医科大学附属さいたま医療センター 脳神経外科学 准教授)

特別講演 II

ヒト終脳外套域での構築形成

- 平田 幸男 (慶応義塾大学医学部解剖学教室)

一般講演 I 視覚研究

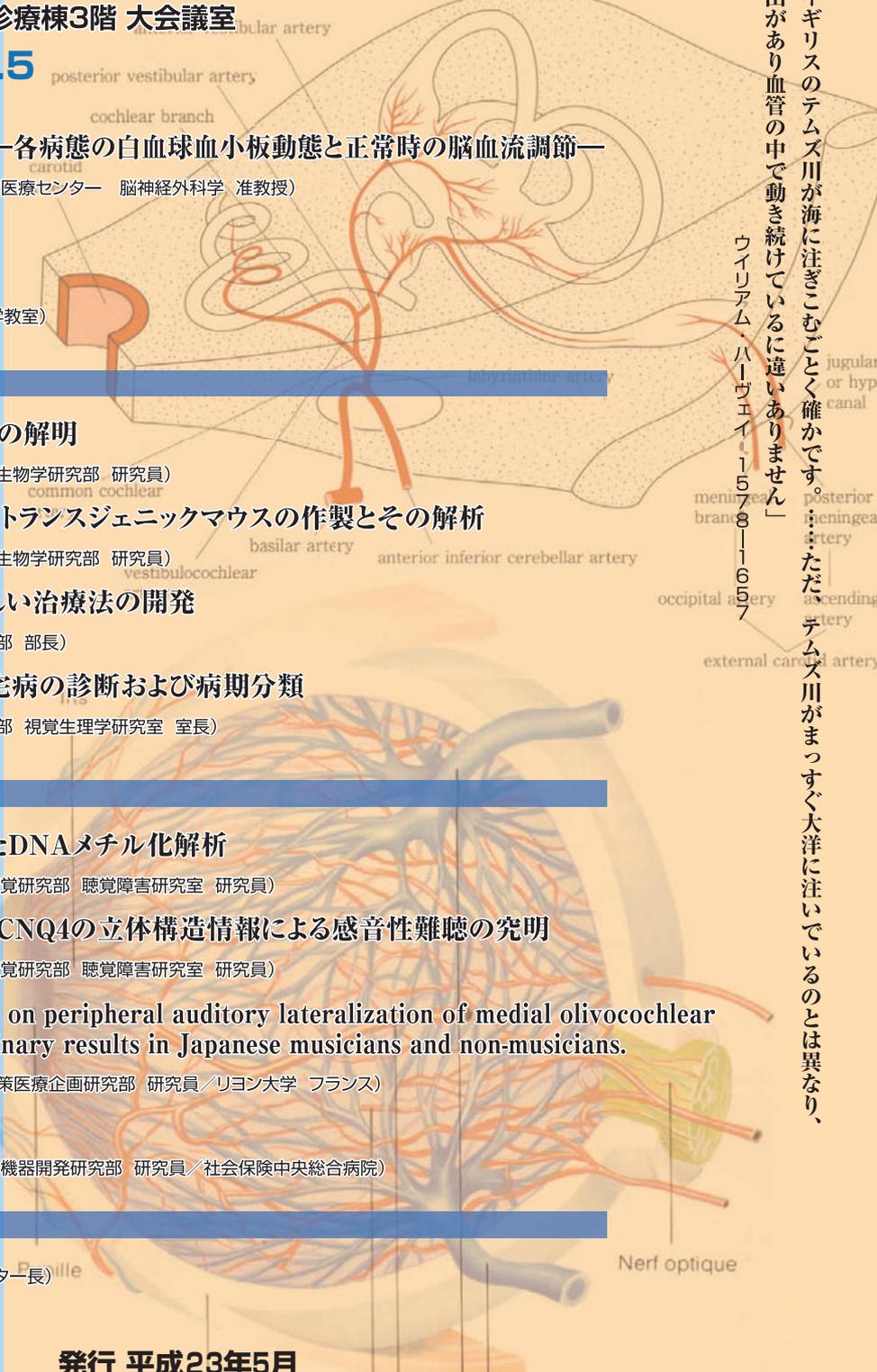
1. オカルト黄斑変性症原因遺伝子の解明
 - 赤堀 正和 (感覚器センター 分子細胞生物学研究部 研究員)
2. 緑内障遺伝子OPTN, WDR36 トランスジェニックマウスの作製とその解析
 - 池 在龍 (感覚器センター 分子細胞生物学研究部 研究員)
3. 角膜内皮機能不全に対する新しい治療法の開発
 - 山田 昌和 (感覚器センター 視覚研究部 部長)
4. 光干渉断層計(OCT)による三宅病の診断および病期分類
 - 角田 和繁 (感覚器センター 視覚研究部 視覚生理学研究室 室長)

一般講演 II 聴覚研究他

1. 加齢性難聴動物モデルを用いたDNAメチル化解析
 - 務台 英樹 (感覚器センター 聴覚・平衡覚研究部 聴覚障害研究室 研究員)
2. 難聴関連蛋白質OPA1およびKCNQ4の立体構造情報による感音性難聴の究明
 - 難波 一徳 (感覚器センター 聴覚・平衡覚研究部 聴覚障害研究室 研究員)
3. Musical and linguistic influence on peripheral auditory lateralization of medial olivocochlear efferent system activity: preliminary results in Japanese musicians and non-musicians.
 - Perrot Xavier (感覚器センター 政策医療企画研究部 研究員/リヨン大学 フランス)
4. 口腔乾燥の客観的評価法
 - 石本 晋一 (感覚器センター 人工臓器・機器開発研究部 研究員/社会保険中央総合病院)

あとがき

- 加我 君孝 (感覚器センター 名誉センター長)



第6回感覚器シンポジウム記録集 No.5

平成23年3月4日(金) 13:00～17:30

於：東京医療センター・外来診療棟3階 大会議室

『感覚器研究のフロンティア』

特別講演 I

『脳微小循環の in vivo での観察

- 各病態の白血球血小板動態と正常時の脳血流調節— …………… 3
石川 眞実 / 自治医科大学附属さいたま医療センター 脳神経外科学 准教授

特別講演 II

- 『ヒト終脳外套域での構築形成』 …………… 14
平田 幸男 / 慶応義塾大学医学部解剖学教室

一般講演 I

[視覚研究]

1. オカルト黄斑変性症原因遺伝子の解明…………… 21
赤堀 正和 / 感覚器センター 分子細胞生物学研究部 研究員
2. 緑内障遺伝子 OPTN, WDR36 トランスジェニックマウスの作製とその解析 …… 25
池 在龍 / 感覚器センター 分子細胞生物学研究部 研究員
3. 角膜内皮機能不全に対する新しい治療法の開発…………… 29
山田 昌和 / 感覚器センター 視覚研究部 部長
4. 光干渉断層計(OCT)による三宅病の診断および病期分類 …………… 34
角田 和繁 / 感覚器センター 視覚研究部 視覚生理学研究室 室長

一般講演 II

[聴覚研究他]

1. 加齢性難聴動物モデルを用いた DNA メチル化解析 …………… 38
務台 英樹 / 感覚器センター 聴覚・平衡覚研究部 聴覚障害研究室 研究員
2. 難聴関連蛋白質 OPA1 および KCNQ4 の
立体構造情報による感音性難聴の究明…………… 42
難波 一徳 / 感覚器センター 聴覚・平衡覚研究部 聴覚障害研究室 研究員
3. Musical and linguistic influence on peripheral auditory lateralization
of medial olivocochlear efferent system activity:
preliminary results in Japanese musicians and non-musicians. …………… 48
Perrot Xavier¹⁾²⁾ / 感覚器センター 政策医療企画研究部 研究員¹⁾ / リヨン大学 フランス²⁾
加我 君孝¹⁾
4. 口腔乾燥の客観評的価法…………… 50
石本 晋一 / 感覚器センター 人工臓器・機器開発研究部 研究員
/ 社会保険中央総合病院

- あとがき 第6回感覚器シンポジウムを開催して…………… 56
加我 君孝 / 感覚器センター 名誉センター長

脳微小循環の in vivo での観察

—各病態の白血球血小板動態と正常時の脳血流調節—

自治医科大学附属さいたま医療センター 脳神経外科学 准教授

石川 眞実

私は、慶應大学医学部を卒業し、脳神経外科を専攻してからずっと臨床をやってきました。アメリカに留学したときはアメリカの脳外科手術を数回見学して、それ以外は研究だけをしていましたが、基本的には脳外科の臨床をやりながら実験を行ってきました。脳外科で行ってきました実験は、動物に全身麻酔をして手術をして生きたままで vivo (生体) で観察することですが、マウスやラットを用いて臨床の手術よりも細かい操作が必要となる脳神経外科らしい実験だと思います。脳外科的な脳外科だからこそできる実験を行なうことは、脳外科で行なう研究の役割のひとつであるとも考えています。今日の講演では、臨床と研究の両方を念頭に置きながら発表したいと思います。

【臨床研究として】

慶應大学にいたときは電気生理をやっていたのですが、実験では脊髄誘発電位の不应期の研究を行なって学位もとりました。臨床の電気生理は、顔面けいれんという病気の患者さんの顔面筋 F 波を中心に研究しました。顔面けいれんは、顔面の半分がけいれんする病気です。顔面神経は、顔面に出てから枝分れますが、神経を電気刺激すると、その神経の支配筋で筋電図が記録されます。顔面けいれんの患者さんでは、刺激された顔面神経の支配筋ではない別の顔面筋からも記録される異常筋反応があります。一方、顔面神経を刺激して刺激のインパルスが顔面神経核へ逆行してまた戻ってくる F 波という波があり、ちょうど私が大学にいた頃に、現在、救急部にいる並木 (淳) 先生が顔面筋 F 波の研究をしていて教えていただきました。顔面筋 F 波は顔面けいれんの人では亢進しており、F 波が経由する顔面神経核の興奮性亢進が原因と考えられました。顔面けいれんの異常電位と F 波を同時に記録してみると両

者の相関関係が非常に強いことがわかり (図 1)、顔面けいれんの異常電位が顔面神経核の興奮性亢進に関与するものであるという裏づけのデータとなりました。関連病院の出張から大学に戻ってチーフ出張までの間、臨床研究では、顔面けいれんの患者さんが来たら異常電位をひたすらとっていました。1人30分から約1時間かかりましたが、偶然得られたこの結果は、インパクトファクターでは、2点台ですが、Journal of Neurological Science という雑誌に掲載させていただきました。この論文はコンピューターで調べる限りでは、現在まで約30件の論文に参考文献として引用されています。また、顔面けいれんの筋電図検査をしていますと、検査中に顔面けいれんが始まり、筋電図の base line がゆれてしまうことがあります。この base line のゆれに F 波が隠れると F 波が記録できなくなってしまうので、ゆれが落ち着くまで待たなければなりません。この時、電気刺激後 100ms くらいの間だけ、このゆれが消失する時間があることを発見しました。いろいろ調べてみると、四肢でも末梢神経を刺激してから随意収縮による base line のゆれが消失する時間があることがわかりました。これは silent period と呼ばれ、末梢神経では教科書的に言われていますが、それは、レンショウ抑制など脊髄にしかないメカニズムで説明されており、顔面筋に silent period はないものと考えられていました。そのため顔面筋の silent period を記録したという私の論文は投稿した雑誌に様々な理由で reject されました。結局、5つめに投稿した Journal of Clinical Neurophysiology という雑誌に掲載され、臨床脳波という雑誌には総説を書かせていただきました (図 2)。顔面けいれんの F 波の研究の発展や顔面筋 silent period の発見は、偶然得られた結果が、小さいことですが新しい発見につながって論文にすることができた例です。臨床でも当たり前の検査を当たり前に続けてゆく中

でも、いつもと違うことがあれば、新しい発見につながるものだと考えて、小さなことでも“あれっ”と思ったことは心にとめておくようになっています。

【脳微小循環における白血球接着現象の 低体温による抑制】

慶應大学時代はそんなことをやっておりましたが、専門医をとって関連病院へ出て国立埼玉病院へ異動した時に、消化器内科の関塚永一先生に、「微小循環をやろう」と言われて始めたのが脳微小循環の研究のはじめで、それは医学部卒業後10年目の年でした。私は脳外科医だったので、脳の微小循環を始めましたが、1990年代当時は白血球動態の観察が盛んで、脳虚血再灌流（かんりゅう）後の白血球の接着現象が低体温により抑制されるという研究を行い（図3, 4）、当時低体温療法がテレビでもよく紹介されており、雑誌「Stroke」に掲載してもらいました。図4に示しましたように、中大脳動脈閉塞モデルで白血球接着数が、30分、1時間、2時間、3時間と増加し、低体温で抑制されるという論文です。

【脳微小循環における血小板の接着 脳虚血再灌流モデル】

今日は脳微小循環における血小板接着について中心にお話いたしますが、血小板の接着に関する研究は留学してから始めた実験です。白血球の接着現象は炎症反応のひとつですが、血小板も血栓形成だけではなく、炎症に関与すると言われるようになりました。図5に炎症に関与する白血球や血小板の放出物質をまとめました。外傷や脳梗塞もそうですが、炎症が起こり、さらにその炎症が悪化して状態も悪くなることを臨床でも経験します。それは、白血球が関与していると実験で言われていましたが、その白血球動態に関連して血小板がどう動くかを実験しました。血小板は、本来は血栓形成、止血に関係しますが、図5に示しましたCD40Lを放出するとか、最近では、Rantesというケモカインを出して炎症に関係してくると言われるようになってきています。

血小板そのものが血栓形成で止血以外の炎症に関与しているという研究です。血小板は白血球のように接着することを報告している論文を個条書きにしました（図6）。最初は、腸間膜で血小板をローリン

グすることが報告され、続いて、小腸、網膜、肝臓で報告されて、私が留学中に脳で観察しました。脳でも、白血球だけではなくて血小板もローリング・接着を起こします。それは、出血や血管の損傷がなくても、炎症で血小板のローリングや接着が起こっているのを観察しました。図7は、模式図ですが、接着分子としては、PセレクトインとPSGL-1の結合が主な部分を占め、白血球と血小板が接着するところにも関与しますし、白血球がローリングする部分にも関与します。血小板が直接血管内皮にも接着しますが、その時もPセレクトインが関与していると考えられています。図8に実験方法の概略、図9に実験模式図を示しました。

脳表にcranial windowを作成し脳表を観察します。血小板、白血球を観察する場合は骨を削って硬膜は切らずに観察できますが、脳表に薬をsuperfusionするときには、硬膜を切開してcranial window内を人工髄液で満たします。私の実験モデルは脳虚血再灌流モデルが主体になりますが、留学中には高脂血症モデルのマウスを作りました。アンジオテンシンIIモデルや、最近では、くも膜下出血モデルを用いて血小板の観察をしています。

これは、留学中の画像ですが、図10が白血球、図11は血小板。帰国後に、血小板をCFSEで緑に、白血球をRhodamine 6Gで赤く染めるようにしました（図12）。雑誌Neurosurgeryの2009年3月号に掲載されたインターネット版で、くも膜下出血後の白血球動態の動画が見れるようになっていましたので、お時間のある方はご参照ください。血小板は、1匹のマウスから脱血して血小板をCFSEで蛍光染色して1匹のマウスの血小板数の約1/10を注入します。図10～12に示しますように、白血球の接着とともに、血小板も細静脈内で、白血球や血管内皮にローリング、接着が観察されました。最初の論文の脳虚血モデルでは、両側総頸動脈の閉塞モデルですが、虚血時間を1時間にして、再灌流4時間で血小板の接着が観察されることがわかりました（図13）。

中大脳動脈閉塞モデルによる局所脳虚血再灌流モデルでも、血小板の接着を観察し、血小板接着に関わる接着分子として、P-selectinが関与し、GPIIb/IIIaの直接関与が少ないことがわかりました。接着分子の抗体を用いた実験から、GPIIb/IIIaは、血小板凝集に関与し、ローリングや接着の中心はP-selectinと考えられます（図14）。

【脳微小循環における血小板の接着 高脂血症モデル】

私がアメリカへ留学していた2000年頃は、脳梗塞の危険因子として高脂血症は、糖尿病や高血圧程強く言われておりませんでした。「心臓には高脂血症はよくない」とずっと言われていました。そのため、心臓に比べると脳と高脂血症の論文は、少なかったわけですが、高脂血症食を2週間与えたマウスでは、脳表で白血球や血小板が多数、ローリングし接着していることがわかりました。また、血小板は、別固体のマウスからとり出して蛍光染色し、もう1回注入するので、高脂血症マウスの血小板を染色して正常マウスや高脂血症マウスに注入したり、正常マウスの血小板を正常マウスや高脂血症マウスに注入するなど、4種類のパターンができます。それによると、高脂血症は、血小板への影響よりも血管内皮への影響の方が強いこともわかりました(図15)。さらに、高脂血症にさらに虚血を加えて観察してみますと、当然、高脂血症食のマウスに虚血を加えることで、白血球、血小板の接着する炎症反応が一番強いことがわかりました(図16)。これらの結果は、活性酸素や接着分子の解析結果も加えて *Circulation Research* という雑誌に掲載していただきました。アメリカではノックアウトマウスも日本に比べてすぐに使用できます。そうすると論文の格が一ランク上がって、このように *Circulation Research* などにも掲載されるわけです。

【脳微小循環における血小板の接着 CD40-CD40L signaling】

私の留学中の最後の実験ですが、接着分子としてCD40-CD40 リガンドの signaling が炎症に関係しているという研究です。CD40は、TNF receptor family に属する膜蛋白で、Bリンパ球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、血管内皮細胞、神経細胞などに発現しています。CD40Lは、TNF family に属する膜蛋白で、活性化Tリンパ球、血小板、NK細胞、mast cell、好塩基球、マクロファージ、血管内皮細胞、平滑筋細胞などに発現しています。また、可溶性CD40Lは、活性化血小板から放出される炎症調節蛋白のひとつであると考えられています。こういった背景のもと、脳虚血再灌流モデルを用いて実験いたしました。図17をみていただ

きますと、CD40やCD40Lのノックアウトマウスからの血小板を脳梗塞の正常マウスに注入しますと、白血球はその固体のものを観察するので、図F、G、Hのようによく接着しますが、ノックアウトの血小板は、図Bに比べて図CやDでは接着しないことがわかります。これをグラフにまとめたものが図18です。脳梗塞後の炎症反応のひとつ白血球接着には、CD40やCD40Lが強く関与していることがわかりました。炎症を代表する現象である血管透過性もこの実験系で観察してみますと、図19に示しましたように、脳梗塞で静脈周囲に蛍光色素がもれやすくなり、ノックアウトマウスでは、それがもれにくくなります。図19の下にグラフでまとめられています。これだけ炎症に関与していますと、脳梗塞の体積そのものにも影響します。ノックアウトマウスでは脳梗塞体積も減少することがわかりました(図20)。これらのCD40、CD40Lに関する結果は、*Circulation* に掲載していただきました。

血小板に関する研究で、アンジオテンシンの関与、くも膜下出血モデルでの研究を留学から帰って行ないましたので、ご説明いたします。

【脳微小循環における血小板の接着 Angiotensin II type 1 receptor】

アンジオテンシンは、臨床的に、動脈硬化、糖尿病、高脂血症などのいろんなところに関係していて、臨床的にはAngiotensin II type 1 receptorの阻害薬、よくARBと言われる薬が、降圧剤として非常によく使用されております。脳梗塞のリスクファクターに強く関与しているとして関心の高いアンジオテンシンの実験をおこないました。まず考えたのは、アンジオテンシンの腹腔内投与です。腹腔内投与によって、腸間膜で白血球が接着することは2004年に論文があります(Alvarez et al., *Blood* 2004)。腹腔内投与で腹腔内の腸間膜を観察するので、炎症が起こり白血球や血小板が接着するのは当たり前だとも思われます。脳は、体のなかでは腹腔とは遠く離れており、接着するのかどうかと思いましたが、実際にその論文と同様にやってみますと、アンジオテンシンを腹腔内投与してから24時間後には、白血球と血小板が接着することがわかりました。図21, 22はグラフですが、腹腔内投与の濃度を変えて観察しました。この研究からが帰国後の研究となり、血小板を緑に白血球を赤くそめて同時に観察するよ

うにいたしました(図12)。アンギオテンシンの腹腔内投与後4時間では観察されず、24時間で著明な変化があり、アンギオテンシンの投与した量に依存的に接着血球数は増え、アンギオテンシンの脳表灌流では接着しないことから、血管内から血管内皮にアンギオテンシンが関与することが予想されました。両側総頸動脈閉塞による脳虚血再灌流モデルで接着した白血球や血小板は、ARBやNADPH oxidase阻害薬で、有意に抑制され(図23, 24)、Angiotensin II type 1 receptorの重要性とその機序に活性酸素が関与していることを示唆いたしました。

次に、DHRは蛍光色素で、活性酸素と反応して蛍光を発し、蛍光強度により活性酸素の量を定量するというin vivoでの実験手法があります。その結果が図25です。アンギオテンシンの腹腔内投与では脳表の活性酸素の上昇まで有意に捉えることはできませんでしたが、脳虚血で上昇した活性酸素はARBにより抑制されることがわかりました。この実験でアンギオテンシンを腹腔内投与して得られる結果は、アンギオテンシンが関与する高血圧、高脂血症、糖尿病など脳梗塞のリスクファクターといわれている病態に関与し、また、脳梗塞後の炎症にも直接関与することを、in vivoの実験系で証明いたしました。これらは、Am J Physiol Heart Circ Physiol. 292: H2306-H2315, 2007に掲載していただきました。私は、アメリカルイジアナ州立大学シュリーブポート校のDr. Grangerのもとに留学いたしました。私の後、後輩の現在済生会中央病院脳神経外科に勤務している寺尾先生が留学してくれました。彼のキメラマウスを使用した実験で、脳梗塞後の血球接着には血小板内にあるRantesというケモカインが重要であるという結果がでました。血小板が炎症に関与するというin vivoでの証明です(Terao, S. et al. Stroke 2008; 39: 2560-2570)。

【脳微小循環における血小板の接着 くも膜下出血モデル】

私は脳神経外科医であり、次に、くも膜下出血のモデルでの、自治医大に異動してからの研究結果を説明いたします。くも膜下出血は非常に多彩な病気であり、発症後の脳浮腫などよく話題になる話ですが、発症後の炎症はとても重要です。まずくも膜下出血のCTを二つ並べましたが(図26)、白いところがすべてくも膜下出血による血腫です。この患者

さんは、1人は、手術して意識もよくなって食事もして元気に退院しました。もう1人は、植物状態で話もできないし、手術できずに寝たきりの状態です。最初のCTでは患者さんの状態は判断できません。実際にはそれだけの臨床的な差があります。なぜそれほど差があるのでしょうか。その理由の一つに、くも膜下出血後の急性炎症の関与が考えられます。そういう臨床現場での状況を背景として、くも膜下出血のモデル、中大脳動脈の閉塞を作るときに使用する糸を強くすすめてくも膜下出血を起こすモデルですが、これでもくも膜下出血を作成した後に脳表を観察しました。このときの動画が、先ほども申し上げましたように、雑誌Neurosurgeryのインターネット版でみることができます。モデルでも臨床の実際のくも膜下出血でも、くも膜下出血は頭蓋底部で出血しますが、脳表を観察すると白血球、血小板が著明に接着していました(図27, 28, 29)。観察場所は脳表なので、当然出血部位と観察部位の中間にあたる脳でも炎症が起こっていると考えられます。たくさん血球が接着し、かなりの炎症です。実際に、くも膜下出血になったあとに非常に具合が悪い患者さんは、炎症が起こることによって、脳内には出血しないくも膜下出血ではありますが、神経機能が落ちて臨床状態もわるくなってしまうことが予想されるわけです。この動画の一部は、雑誌Neurosurgeryの2009年3月号の表紙にもなりました。くも膜下出血のモデルの説明ですが、くも膜下出血後に時間がたってくると炎症が進んで、白血球、血小板の接着の数が増えてきます。くも膜下出血の左右の脳表を見ましたが、白血球、血小板の左右差はありませんでした。このことから、くも膜下出血後は脳全体で血球接着の炎症反応が観察されます。くも膜下出血は、糸で貫いて動脈出血させる方法と、それ以外に昔から行なわれている大槽に血液を注入する方法があります。大槽に血液を注入する方法では、白血球、血小板が付く炎症はほとんど観察されません。これは、ゆっくり血液を注入する大槽モデルなので、出血したときには脳圧が亢進しないと考えられます。急激な脳圧亢進が、血球の接着に関与すると予想しています。この論文がでて1年後経過したころに、アメリカのペンシルベニアの脳外科のSherman先生から、「2006年にくも膜下出血の患者さんの病理解剖でも脳内血管に血小板がいっぱいくっついていてのを観察しました。あなたの研究にはたいへん興味があります。」という

メールもいただきました (Neurosurgery. 59(4): 781-788, October 2006)。

【脳血流調節について臨床で学ぶこと】

最後は、正常時の脳血流の話をしてします。正常時は、脳循環がどのように調節されているかは、意外とわかっていません。図 30 はもやもや病の患者さんの MR アンギオグラフィと脳血流 SPECT 検査 (図 31) の結果です。もやもや病は、血管が閉塞してしまう病気で、図 30 の上の画像では両側の中大脳動脈が描出されておられません。ここに血管がありません。

手術治療は、皮膚の血管 (浅側頭動脈) を脳表の血管に吻合して、血流が低下して脳梗塞になりやすいところへの血流を増加させる手術です。図 32 は脳血流のスペクトですが、左の正常時の脳血流は緑色で示されていますが、ダイヤモックスを使用して血管を拡張させると中央の断面図のように赤色の部分が増えて血流が増えてきます。このときの脳血流増加率が一番右の断面像ですが、0% 以下の黒い部分や 10% 以下の青い部分が広範囲に広がっています。この脳血流増加率 10% 以下が手術の適応と言われている、増加率が少ないということは血管が拡張しにくい状態です。太い血管が閉塞すると脳血流が低下して脳梗塞になってしまうので、脳梗塞にならないように細動脈が拡張してなんとか脳梗塞にならないように脳血流を増加させていると考えられます。拡張した細動脈は拡張の限界があり、検査時にダイヤモックスで血管を拡張させようとしてももはや血管は拡張できず脳血流は増加できません。これが脳循環予備能が低下している状態で、脳血行再建術の適応があることとなります。皮膚の血管を脳表の表面に吻合し別の経路から血流が増加されて余裕がでてくれば、脳表細動脈が拡張する必要性は低下して少しずつ収縮してきます。そういう状態になって脳血流 SPECT 検査を行えば、ダイヤモックスで血管が拡張して脳血流増加率が上がってくるわけです。術後の脳血流 SPECT 検査の一番右の断面像は、黒い部分が減り脳血流増加率が著明に改善していることがわかります。

【脳微小循環における CO の役割】

こういった術前後の脳血流予備能の変化は、もやもや病の患者さんだけではなく、動脈硬化によって

内頸動脈が閉塞した患者さんにも同様のことが言えます。つまり、脳血流が低下して脳梗塞になりそうな時に、脳の細動脈は拡張してなんとか脳梗塞にならないようにする力をもっていると考えられます。この拡張する力が脳循環予備能を示していることになるわけですが、この脳循環予備能をもっているためには、脳血管はある意味で収縮した状態に保たれていることが良いと考えられます。では、そのメカニズムはどうなっているのでしょうか。ここで、一酸化炭素 (CO) の話をします。CO の研究は、今の医学部長の末松誠先生が肝臓で随分前にされています。私が CO の実験を始めたのは留学する前で、2000 年より前になります。CO は、Heme が、Heme oxygenase によって分解されて作られますが、脳は構成型の Heme oxygenase が多いといわれています。また、くも膜下出血や脳虚血などでは、Heme oxygenase が誘導されると言われています。Heme oxygenase が多ければ CO の産生も多いことが予想されますが、CO の脳血管に対する作用は全くわかっていません。そのときに考えたのは、Heme oxygenase を抑制する Zn プロトポルフィリン (ZnPP) を脳表に灌流して CO 産生を低下させ、脳血管を観察することでした。CO は、NO 同様に cGMP を増加させるので、NO と同じように脳血管を拡張させると予想されました。しかし、実際に得られた結果は、「Zn プロトポルフィリンの脳表灌流により脳細動脈は著明に拡張する。」という予想と正反対の結果でした。図 32 に、2005 年 Circulation Research に掲載された図を示します。著明に拡張した血管と Zn プロトポルフィリンの濃度依存的に血管が拡張することを示しています。なぜ、CO が減少したのに脳血管は拡張したのでしょうか。CO は、ヘム酵素のヘムに結合して酵素反応を阻害する可能性があり、ヘム酵素の一つである NO 合成酵素を抑制して、NO を減少させる作用があると仮定しました。まず行なったのは、Zn プロトポルフィリンと NO 合成酵素の阻害薬 L-NAME を同時に脳表灌流し、Zn プロトポルフィリン単独の脳表灌流による細動脈拡張反応と比較しました。L-NAME を同時に脳表灌流すると Zn プロトポルフィリン単独に比べてその拡張効果は抑制されたことから、Zn プロトポルフィリンによる血管拡張作用は NO を介した反応である可能性が示唆されました (図 33)。また、外因性の CO を加えて Zn プロトポルフィリンを脳表灌流しても同様に血管拡張反応は抑制されることから、

Znプロトポルフィリンの脳表灌流による細動脈拡張反応は、CO産生をブロックした結果であることが確認されました。

次に、COによりNO産生の抑制効果を実際に確認する方法として、NOと反応して蛍光を発するDAF-2を用いた実験を行ないました。Znプロトポルフィリンの脳表灌流と同様の実験系で、DAF-2も脳表灌流することによりNOの量に応じて血管壁と血管外の蛍光強度の増大が観察されました。結果は図34に示すとおりで、Znプロトポルフィリンの脳表灌流により、NOの蛍光強度は増大し、それは、COやL-NAMEにより抑制されました。

【COの臨床的役割の予想】

COの研究の前にお話した、脳血流SPECTの話では、脳循環予備能が重要であることを説明いたしました。動脈硬化などの様々な理由から仮に脳主幹動脈が閉塞すると、体の反応として脳梗塞にならないように、脳表の血管は拡張して、様々な吻合血管を介して減少してしまった脳血流を増大しようとします。こういった細動脈を中心とした血管拡張により脳梗塞にならないよう自然に努力されています。このとき、細動脈の血管拡張能力には限界がありますので、できるだけ大きな拡張能力を示すためには、正常の状態では脳動脈が収縮状態に保たれている必要がでてきます。こういったことを背景に、COの実験結果を考え合わせますと、脳血管の収縮状態を保つためにある程度のCOが必要で、COはNO合成酵素などのヘム酵素を抑制してNOをはじめとする血管拡張物質の産生を抑えて、いざというときのために脳循環予備能を保っている。NO以外の血管拡張物質の関与や、どのようにCOがはずれて血管拡張するかなどのメカニズムについては今後の大きな課題となります。今回お話ししたかったことは、COによって正常状態の血管が収縮状態に保たれていて、動脈硬化などにより、脳虚血になる状態が作られたときに、脳血管は拡張することによって、脳梗塞にならないように体が脳を守っているであろうということです。

脳循環予備能を大きく保つために、COが実際に重要な役割を果たしているか。脳梗塞やくも膜下出血のときには誘導型のheme oxygenaseが増加して

COが増える可能性があります。それが、臨床で実際にどのような意味があるのか。くも膜下出血後の脳血管れん縮の時期には、COが増加してheme酵素を抑制して血管拡張物質を抑制し、脳血管を収縮させている可能性があります。それが、脳血管れん縮のメカニズムと関連があるかどうか。など、今後、臨床の場でのCOを役割を追究してゆきたいと考えております。

実際に臨床の場で患者さんを診ていると、脳梗塞になっていないのに脳神経症状が見られたり、脳血管再建術施行後のhyperperfusionの状態で脳神経症状が見られることがあります。そのメカニズムは不明です。また、functional MRIでの脳血管拡張のメカニズムについても不明なことが多いのも現状です。こういった身近なところにある臨床の不思議に向かって、研究をすすめてゆきたいと考えております。

私は、卒後3年目の研修を済生会宇都宮病院で行ないましたが、当時の脳神経外科医長の村瀬先生には、「よく患者を診ろ、患者を診ろ」という指導を受けたことをよく覚えております。その良く診ろということばは、なぜか実験の結果が出たときにはいつも思い出され、いつもゼロの状態から結果を考える習慣ができました。実験結果をどう考えるかは重要で、その判断が重要な発見を見落としてしまうことさえあります。周りの意見や前情報などに惑わされずに、自分の頭で考え何が起きているのかを冷静に判断することは大切です。脳神経外科手術では、手術中に突然起こった出来事や手術してはじめてわかったことを冷静に考えて術中にどういう手術にすべきかを判断しなければならないこともあります。

今まで慶應大学の多くの先生方から学んだことを礎として、慶應大学の仲間、自治医大の仲間、多くの志を共にする仲間とともに、協力して目標をめざしてゆきたいと考えております。今回は貴重は発表の場をいただきました加我君孝先生、司会をしていただきました藤井正人先生、講演を聴いていただいた諸先生方、ありがとうございました。これからも臨床の発展とともに歩む研究を続けてゆきたいと考えており、今後ともよろしくお願い申し上げます。

図1 顔面けいれんのF波とAMRの持続時間は、相関関係があり、AMRも顔面神経核由来の反応と考えられる。

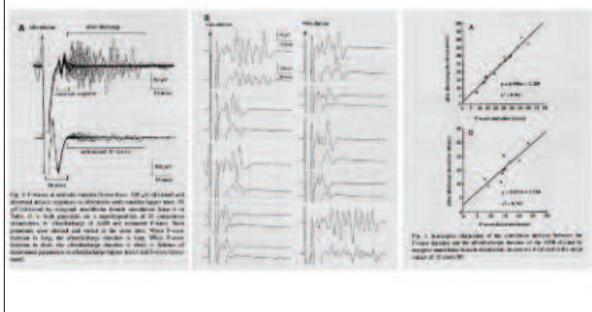


図2

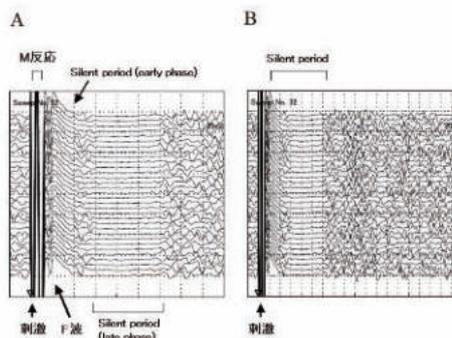


図3 Adhering leukocytes recorded with the SIT camera in venules

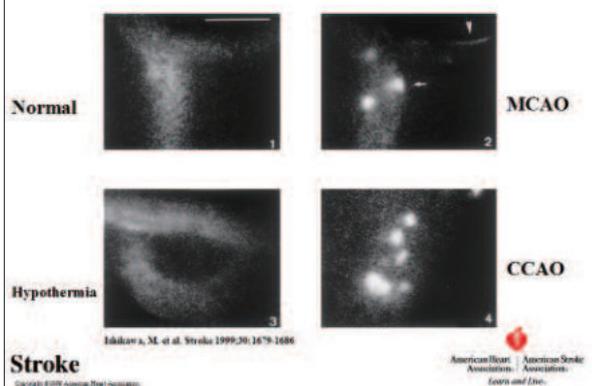


図4 Leukocytes adhering to the venular endothelium in all 4 groups

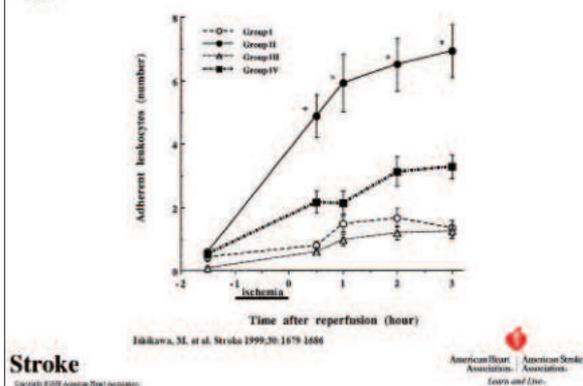


図5 炎症・微小循環に關する白血球・血小板の放出物質など

- Leukocytes:
 - 蛋白融解酵素(エラスターゼ、プロテアーゼ)
 - 活性酸素(NADPH oxydase, MPO)
 - PAF
 - 血栓形成, permeability
 - capillary plugging (血流低下、変形能減少)
- Platelets:
 - sCD40L(CD154)、Rantes
 - 血栓形成
 - Cyclooxygenase---Thromboxane A2
 - Lipoxygenase---12-HETE
 - Alpha-granule---PDGF, EGF, TGF-β,

図6 血小板接着現象を観察した論文

- Platelet rolling in mesenteric venules (Frenette PS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA:92:7459-7454,1995)
- Platelet rolling and adhesion after I/R in the small intestine. (Massberg P. et al., Blood:92:507-515;1998)
- Retina after I/R (Nishijima K et al., Invest Ophthalmol Vis Sci:42:2102-2109,2001)
- Liver (Khandoga A et al., Transplantation:74:681-688,2002)
- Brain after I/R (Ishikawa M et al., Stroke:34:1777-1782,2003)

図7 Platelet-leukocyte-endothelial cell interactions

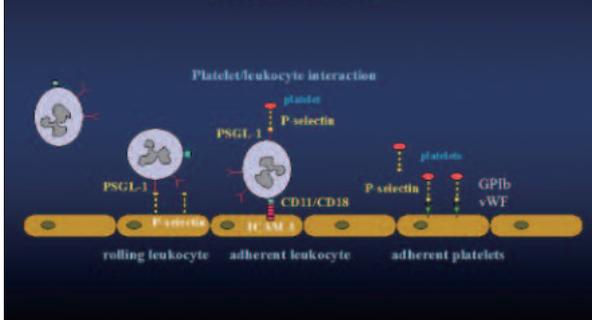
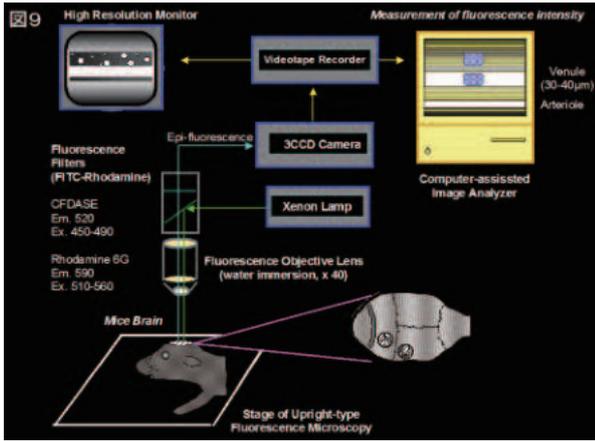


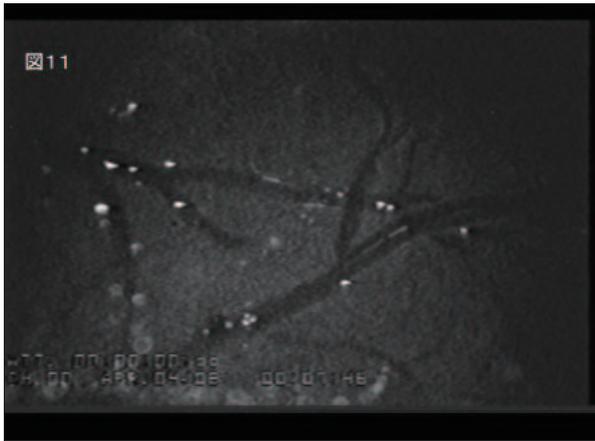
図8 方法

- Animals: C57black/6
- Anesthetic: alpha-chloralose and urethane, i.p.
- Tracheotomy was performed using PE90 and breathing was controlled by a respirator.
- Femoral artery was cannulated with PE10 to monitor blood pressure continuously and to analyze blood gas after observation.
- Rectal temperature was maintained by overhead lamp between 36.5 and 37.5 °C.
- A craniotomy was made at the frontal or parietal bone.
- Brain surface was observed without cutting dura matter.
- Platelets were labeled with CFSE in vitro and injected for 5 minutes.
- Leukocytes were labeled with intravenous injection of rhodamine 6G and observed 5 min after injection of CFSE-labeled platelets.
- Platelets and leukocytes were observed with fluorescence intravital vidcomicroscopy (3CCD camera), using a FITC-Rhodamine filter.

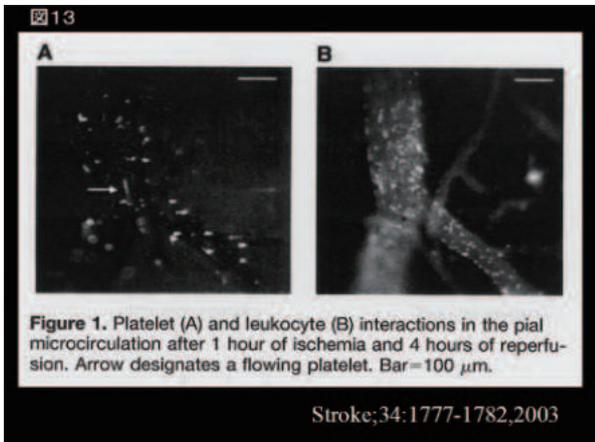
9



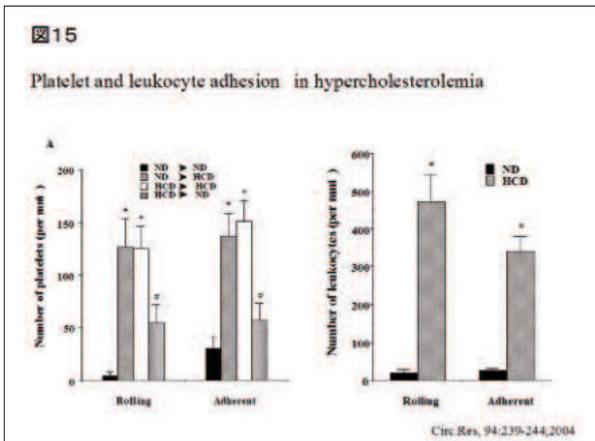
11



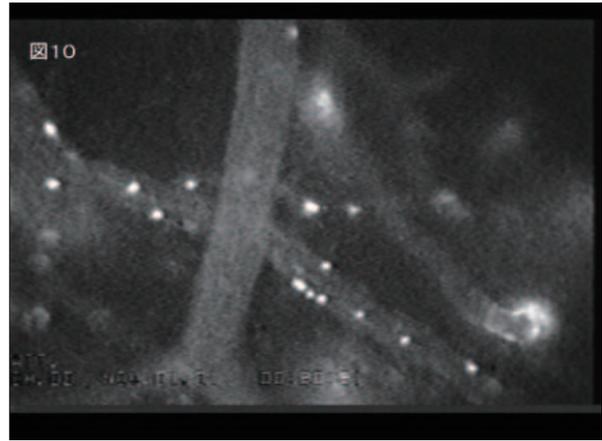
13



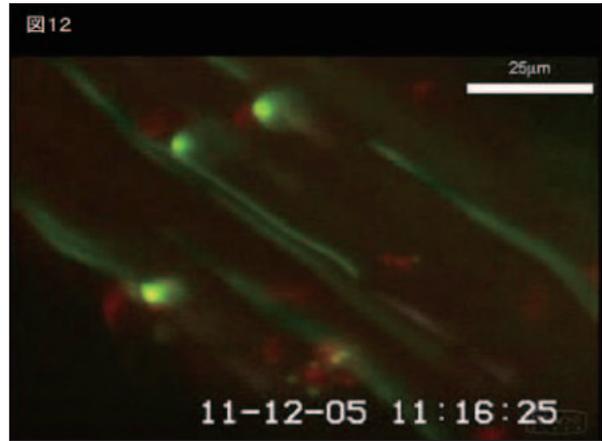
15



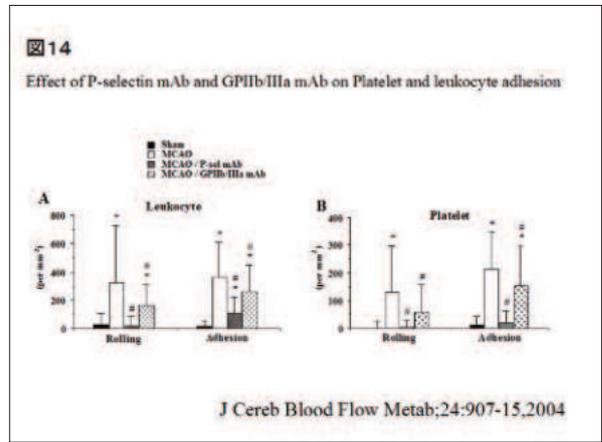
10



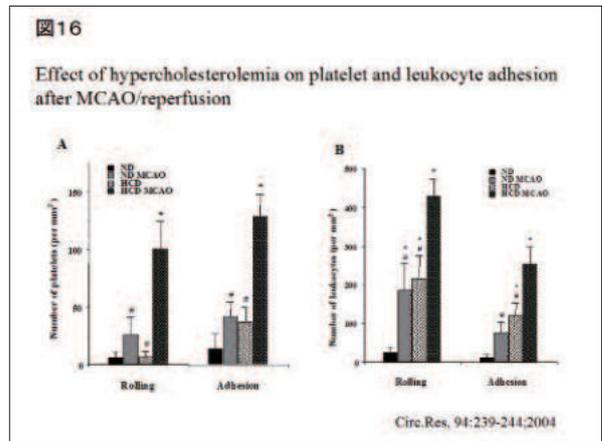
12

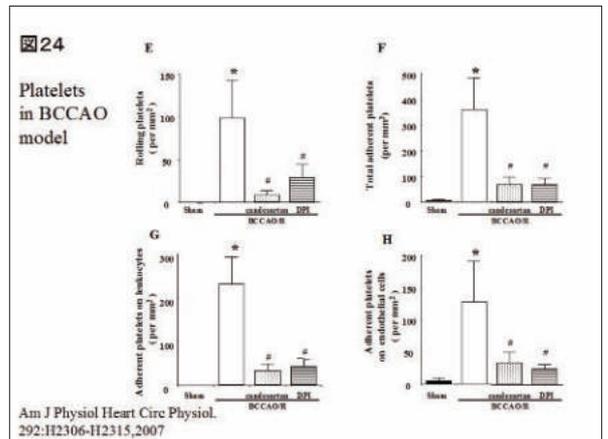
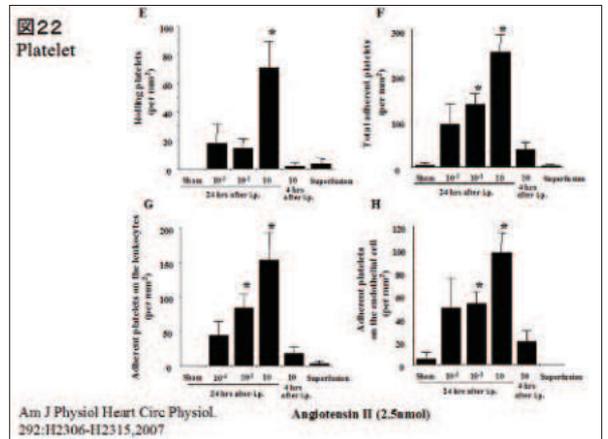
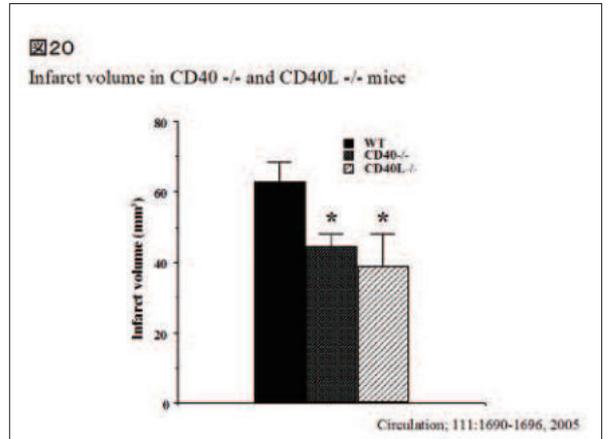
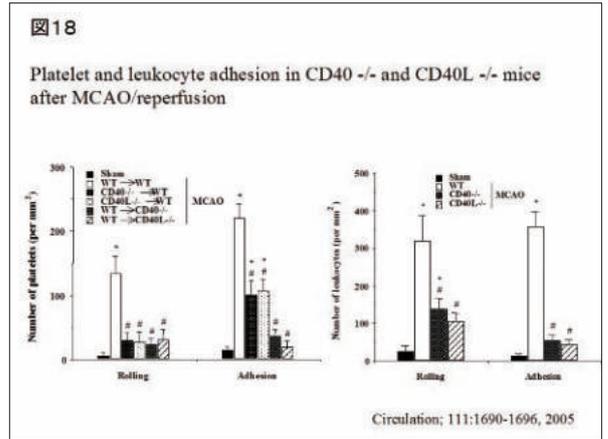
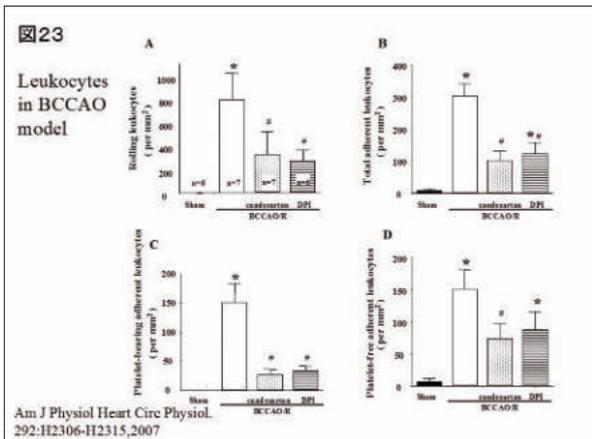
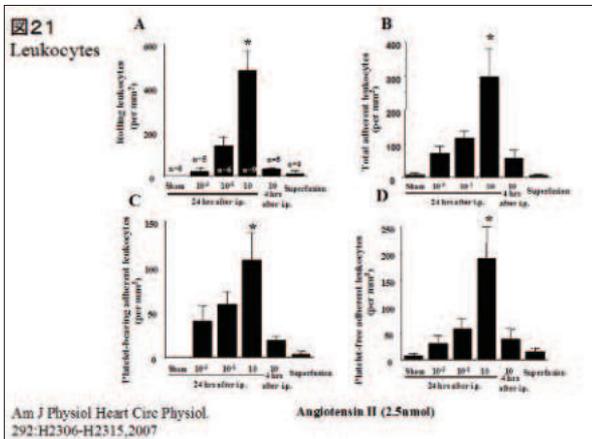
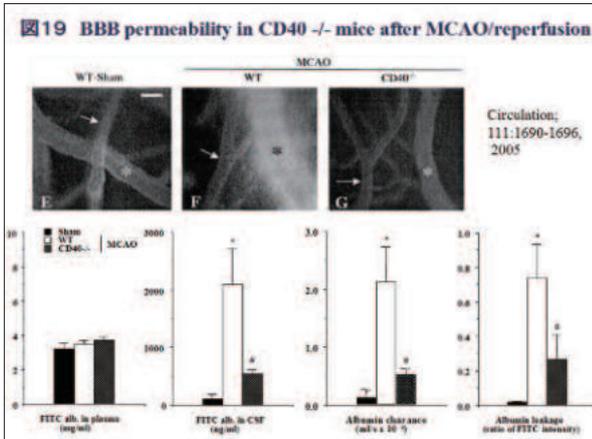
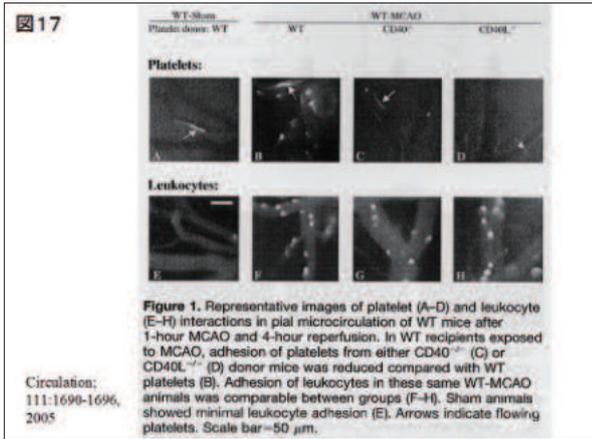


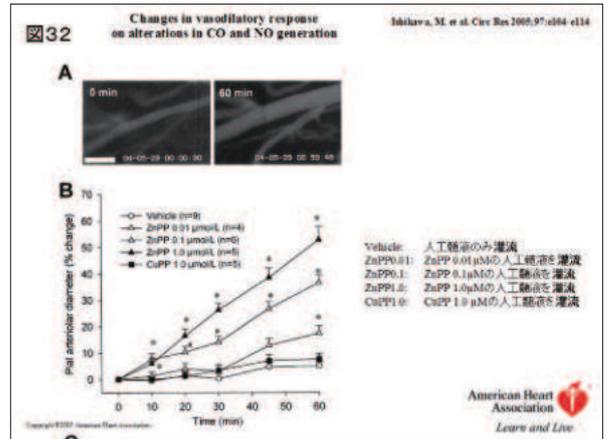
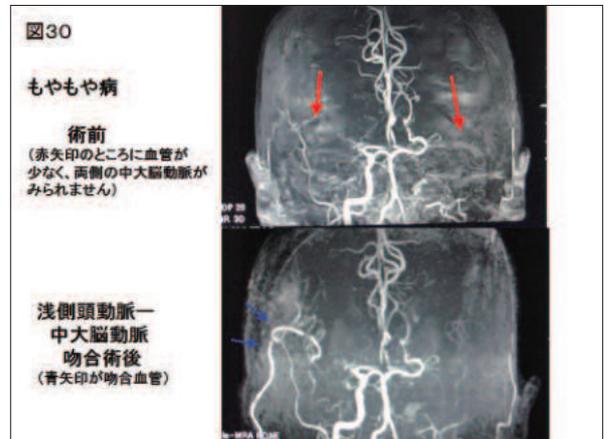
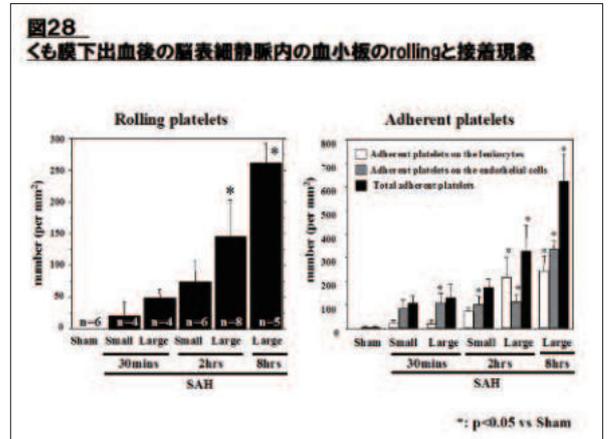
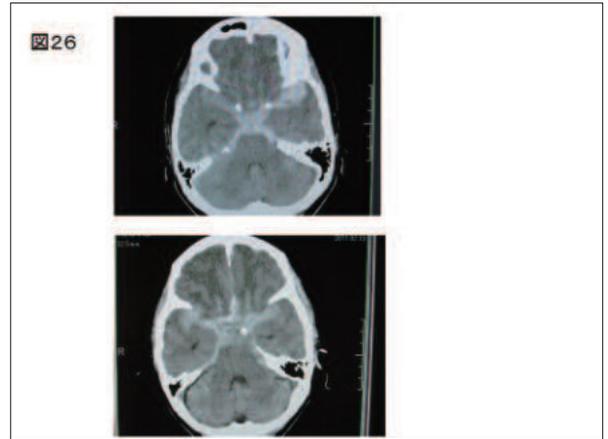
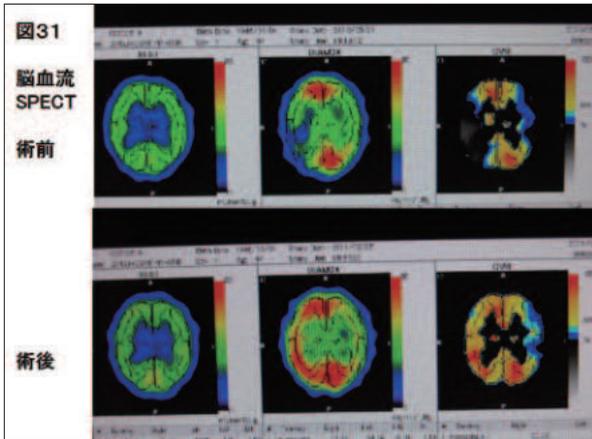
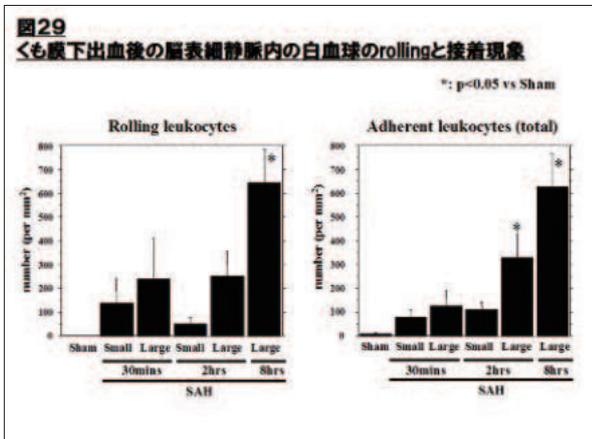
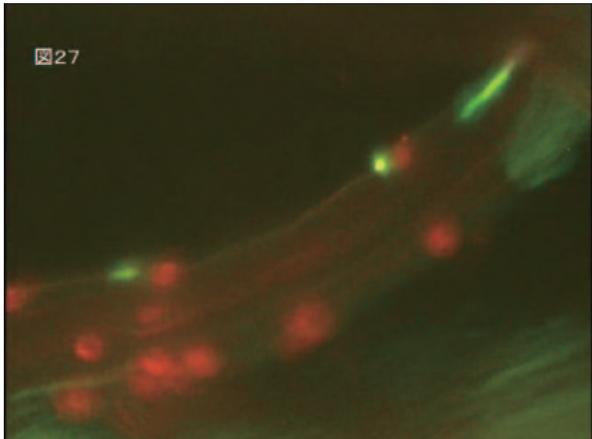
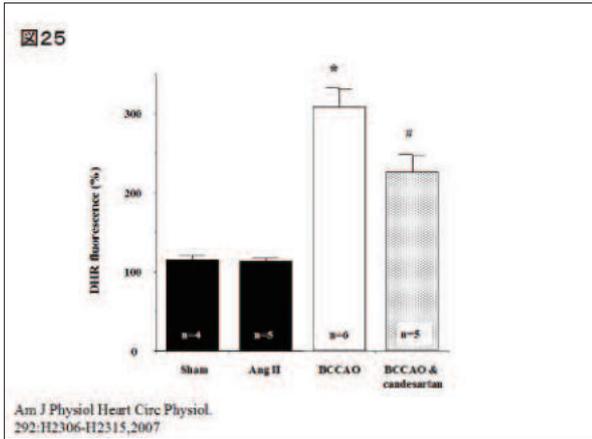
14

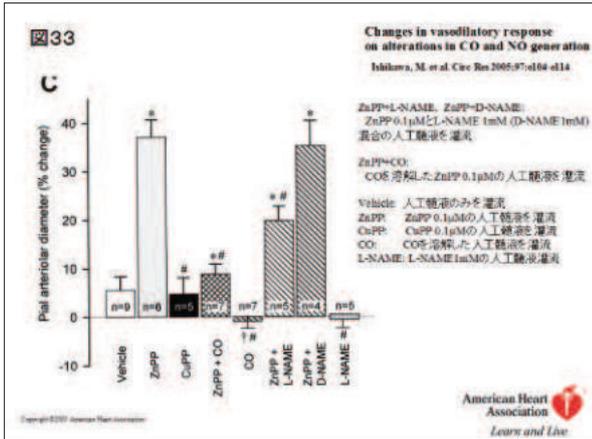


16



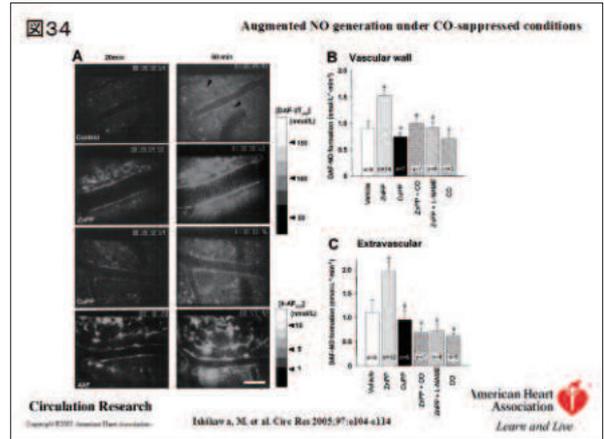






acknowledgement

独立行政法人 国立病院機構 埼玉病院	内科 関塚 永一 先生 脳外科 山口 剛之 先生
慶應義塾大学 理工学部物理情報工学科	南谷 晴之 先生 中瀬 浩康 先生
Louisiana State University Health Sciences Center Molecular and Cellular Physiology	Dr. D Neil Granger 寺岡 聡 先生 永井 聡 先生
自治医科大学 脳神経外科	藤辺 美寿 先生
自治医科大学付属 さいたま医療センター 脳神経外科	草野 元 先生 加持香菜 先生 田中祐一 先生
慶応義塾大学医学部 医化学教室	梶村真弓 先生 末根 誠 先生



ヒト終脳外套域での構築形成

慶應義塾大学医学部解剖学教室

平田 幸男

「構築」というのは、(脳について言えば) 脳の中身が、どのような形、構造で出来上がっているか、ということ。構築形成というのは、そのような構造が、ヒトや動物が、系統発生的に、そして個体発生の過程で、どのように出来てきたのか、を考えてみる。ということ。す。

形態学と生理学：かたちから生物の体を見る、と言うことを、ゲータは「形態学 Morphologie」と名付けたということですが、大事なことは、あくまで「見る」ことから出発することが、形態学であると私は考えております。生物を見る場合に、形よりも、ある形や構造を持った生物や、それを作り上げている部分の働き(機能)や、動きの理解が重要であるという立場をとる、生理学や、病態生理学、さらにほとんどの臨床医学では、形態学に加えて時間的な要素、ないしパラメータが大事な問題です。形態学と、生理学ないし機能学との関係で、2つの見方があります。1つは、形態(構築ないし構築像)が違っている部分(臓器や器官の部分)は、その働きや機能も、互いに異なっているという考え方です。もう一つの考え方は、構造の違いは、必ずしも機能や働きの違いと対応するとは限らない、というのです。このことは、あとで大脳皮質の構築像を、特に言語中枢とされている部位(Brocaのarea)と対応させたいという研究者にとっては重要です。(後述)

形態学、とくに比較形態学における時間：いろいろな動物の脳の構築を、もしくは、同一の動物でも発生の時間を追って比較するという時には、「形態学」であっても「時間」のパラメータ、ないし時間的分解能は大事です。対象とする動物や、その部分が、どのような時間的経過で、いま私の目の前に置かれているのか、ということ。演者は、これまで、おもにヒトの脳を対象として形態学的に観察してきておりますが、ヒトと比較するために、実験動物としてよく使われている種に加えて、脳の内容を見る

機会が少ない動物の場合は、動物園などで死んだ動物を解剖させて頂いて、頭の中を調べます。ヒトの対象とする時や、いろいろな動物の場合を含めて、重要なことは、それぞれの例が、どのような状況で死に至り、観察者の目の前に置かれるまでに、どのような条件下で、どれくらいの時間が経っているのかということ。この条件が、このあと標本が顕微鏡下で観察できるまでの組織学的処理の結果の判定に大きく関わってきます。すなわち、時間的条件が、形態学的な分解能に大きな影響を与えます。言い換えると、組織保存の状態で、どんな形態学的パラメータで脳を比較できるのかが決まってきます。組織学的処理までの死後時間によって、比較形態学が対象と出来るものは、たとえば骨のそれであれば、物理的条件が許せば、地質学的な時間のオーダーでも、(特に化石になっていれば、なおのこと)比較対照が可能ですが、脳のように体の中で、最も死後変化が早い臓器では、刻々と、電子顕微鏡レベルの形態要素から、組織化学的比較対象、光線顕微鏡レベルの細胞学、組織学で扱えるもの、脳で言えば、有髄繊維、神経細胞核周部、細胞核、核小体の順で、比較の対象から外れていきます。比較を定量的なレベルで行おうとすると、それを可能にする死後時間はどんどん短くなります。このように、生理学的観察と比べて時間的な条件が厳しくないときとされてきた形態学の場合でも、実際は、とくに定量的な比較形態学を目指すときは、形態学的パラメータの選択は、重要な問題です。

細胞構築図を描く(パンダの例)：本日は、脳の比較形態学的観察のなかで、これまで数多く行われてきた大脳皮質の細胞構築地図(マップ)が、どのように描けるのかを、上野動物園で1979年に亡くなったジャイアントパンダのランランについて行ったことを、例として紹介します。

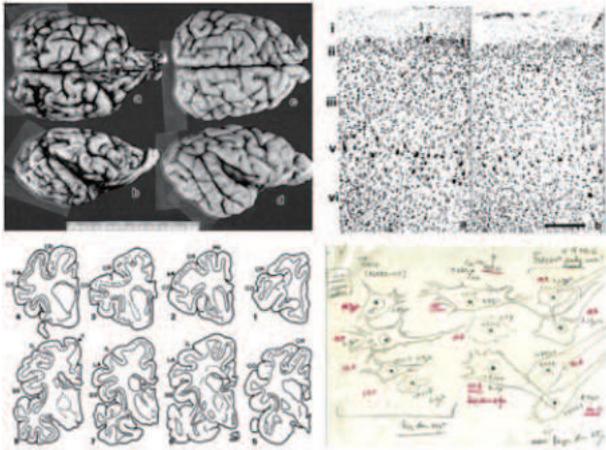


図1

これは、取り出したパンダの脳です(図1 左上 a, 左下 b, 右上 c, 右下 d)。比較するために、ツキノワグマの脳を用いました。(図1aの右半) 両方の脳の中にある神経細胞が、どのように配置されているかを調べるためには顕微鏡で調べるためには、薄く10~40 μ ほどに切る(薄切)必要があり、そのため脳をコロジオンなどの薬品で固め(包埋)ます。固まった脳を端から端まで、全部薄切します(連続切片の作成)。一枚一枚の切片が、脳のどの部位を切ったものか直ぐ分かるためと、観察した構造や部分の立体座標が分かるように(通し番号を書き込むなどして)連続切片の切った順番が分かるようにしてから、切片を適当な色素で染色するなど新たな形態学的指標を加えます。細胞構築というのは神経細胞の核周部にあるニッスル物質を対象にするものですから、切片をチオニンとか、クレッシル紫などの色素で染めます。このようにして出来た連続染色切片を顕微鏡で観察し、ある特徴的な形態学的指標を示す大脳皮質が、立体的にどのようにそれぞれの動物の脳内に存在しているかを示すことが出来ます。ここでは大脳皮質の第4層という層に、顆粒細胞という小型の細胞がほとんど無く、一方、第5層には大変大型の巨大錐体細胞が数個ずつグループを作っている、という特長を持つ皮質(無顆粒性巨大錐体細胞皮質もしくはBrodmannの第4野といいます。)が、どのように広がっているかを、外側脳表面、背側、腹側の表面に投影して見ることも出来ます(図2 左:第4野の広がりを腹側表面(上)、背側面(中)、右外側(下)に、各切片毎に書き込む。中央のカラムはパンダの、右のそれは、ツキノワグマ第4野の広がりを示している)。

以上の作業は、以前は大変な手間と時間の要る仕

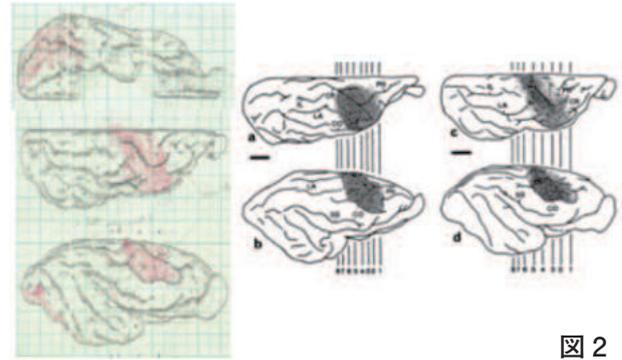


図2

事でしたが、今は連続薄切と染色以外は、コンピュータを使って比較的容易に地図が描けるようになりました。このようにして空間的分布が分かった第4野が、パンダとツキノワグマとでは、広がり、周囲の溝との関係がいささか違っております。この違いが、繊維連絡の違いと関係があるのかとか、この部位が関係している運動神経細胞の数や、生理学的指標の違いによるのか、などの問題には、ここでは立ち入りません。

ところで、上で述べた第4野をヒトで調べた報告のうち、高名な研究者(Campbell 1905, Brodmann 1909, Sarkissov et al. 1955, Baileyと von Bonin 1951, von Economoと Koskinas 1925, Braak 1980)によるものを図3にしめました。

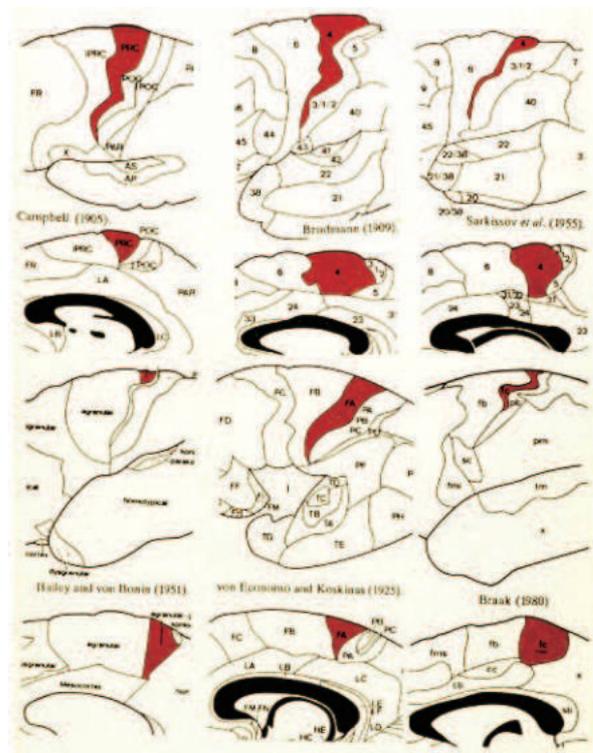


図3

それぞれは、大脳の外側面(報告者名の上)と、正中矢状断面(報告者名の下)で、赤く塗ったところが、第4野です。一見してその一や広がりが報告

によってかなり違いがあることが分かると思います。対象としたのは、いずれも成人男性ということなのですが、この違いは、調べた例の間の個人差を示しているのか、報告者間に第4野の判定基準が違うためなのか、残念ながらわかりません。第4野の形態学的判定基準は、他のほとんどの皮質野に比べると大変わかりやすく、異論がすくないのですが、それは第4野の中心部分の話であって、判定基準では、隣の皮質野(特に第6野)と第4野とが、どのように移行するのかが、明瞭に述べられてはいないのです。この移行部(私は、構築勾配と表現していますが)のどこで皮質野間の境界線を書くのかが、問題の発端であったと考えます。一般的にいうと、新皮質に属する皮質野については、ほとんどの皮質地図で、皮質野間の境界として、「線」が引いてありますが、実際には線として表現してよい境界は極めて限られています。17野とされる後頭葉の第一次視覚皮質と、それに接する18野との間だけは、異論が無さそうです。

とくに前連合皮質とされている部位では、ブローマンの番号付きの皮質野間の境界、さらには、言語野とされているブローカの領域内に、さらにはこれに接する下前頭回内の皮質野との間に引かれている「線」は、様々な異論があります。このため、皮質野間を線で区切るのを否定して、グラデーションのある色分けで表現する試みもありますが、すっきりと線を引きたい方々が今のところ優勢です。

顕微鏡観察による定性的な所見だけでは、納得できる「線」は描けないと、定量的な観察を提唱しているグループもいます。肉眼解剖学で下前頭回 inferior frontal gyrus とされている場所には、ブローマンの脳地図で44野、45野と番号がついていますが、機能的にブローカの(言語)領野とされています。この皮質部分が、形態学的に、もしくは細胞構築学的に、その広がりや、隣の領野との境界を定義づけられるのか、とくに定量的なパラメータを使って可能なのであろうか、が論じられる一方、形態学的な(構築的な)違いがあれば機能も当然異なると主張する神経生理学者の意見(というか信念)が討議に開陳されたりもします。ここでは、定量的細胞構築で、問題となっている領野を定義できるといふ報告(Amunts K, Zilles K. 2006)を読んでみますと、詳細は省きますが、彼らが提言しているパラメータ「灰白レベル係数」(gray level index GLI)とは、一定(皮質)体積中の神経細胞核周部の体積

の比の事で、この数値が皮質の各層で違うので、皮質を脳表面に直角な短冊に分け、この係数の分布の様子の違いから、たとえば44野と45野との境界は明瞭に引くことが出来ると言うのです。ところで、彼らが、GLIを求める方法を調べてみると、ツアイス社の粒子サイズ分析器を使っているのですが、この機械では、神経細胞の核周部の大きさを、モニター上で、核周部周辺のニューロピルの照度のレベルをマニュアルで動かして、核周部だけを残すと言うことをやっています。この方法は、核周部の染色状態が良好で、周りのニューロピルとはっきり識別できる標本でのみ、ほぼ一定の核周部体積比を求めることが可能であって、一般的な染色状態では、ほとんど不可能なのです。と言うわけで、私は彼らの述べているところをそのまま諒とする訳にはいきません。一方、最近彼等は、いくつかの受容物質のリガンドの化学構築を発表しています(Amunts K Zilles, et al. 2010)。これによると、今取り上げている皮質部位では、各リガンドの分布は、皮質の層毎に、接線方向の広がりや、それぞれの広がりやの境界は、細胞構築による44野と45野の境界とはかなりずれているのです。なお、彼等が使っている方法(免疫組織化学)は、ヒト成人の脳を対象にしていますが、新鮮な、組織保存の状態がとてもよい例で行っているもので、この条件を、比較対象とすべき動物例に求めることは大変困難で、普通では望むべくもありません。

上に述べたように、これまで大脳皮質の構築について、従来、ごく当たり前のように細胞構築による地図が基本であるかのように受け取られて来たようですが、その際の形態学的パラメータである、ニッスル染色で判断する神経細胞の核周部なるものが、特に定量的に扱おうとすると、その定義、とくに大きさ(核周部の大きさ \equiv 神経細胞の大きさ、という曖昧な了解)が関わるいくつかの係数(灰白レベル係数など)には、十分注意する必要があることを指摘しておきたいと思います。

ここで、組織学レベルの構築学から、少し目を離して、肉眼レベルの脳の構築像を見てみます。脳の内部の構築は、古くから灰白質、白質という肉眼的な指標を使って、区分けがなされています。これまで書かれてきた、そして良く使われている教科書のほとんどでは、ヒトの脊髄の内景について、脊髄の横断面の写真や、スケッチで、白っぽくみえる(描かれている)部分を白質と、そして灰色、ないし暗

くなっている部分を灰白質と名付けられています(図4)。きょうここで話を聞いておられる方の多くは医師であって、医学生の際に、必ず解剖学実習を経験されていることと存じますが、皆様にお聞きしたいのですが、実習の際に脊髓の横断面は、ここに挙げた教科書の図の様に、見えたでしょうか？実際には、教科書の図のようには決して見えず、脊髓の

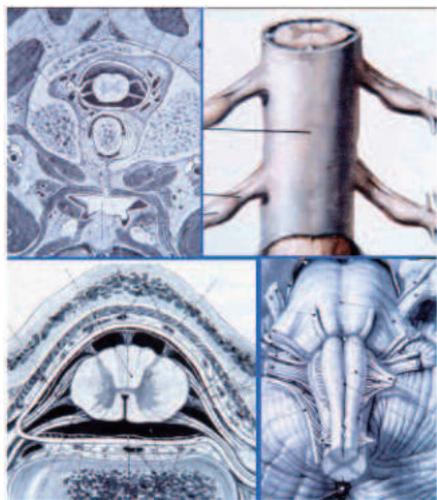


図4

横断面では、中央部分の、灰白質と説明がついている部位が、白っぽく見え、この「灰白質」を取り囲んでいる「白質」と引き出し線で記されていた部分は、灰色ないし薄茶色に見えたことと思います。教科書での色分けとは、逆であったと思いますが、この図に疑問をお持ちにならなかったですか？

脊髓は、横断面を写真で見ますと、図での描き方と全く違って、白っぽい灰白質を、灰色の白質が囲んでいます。切断面を、徐々に脊髓の長軸方向に近づけ、縦断するようにすると、明暗の区分けは逆転し、灰色ないし褐色の「灰白質」を、白い白質が取り囲んでいる様に見えます(図5上：前額断

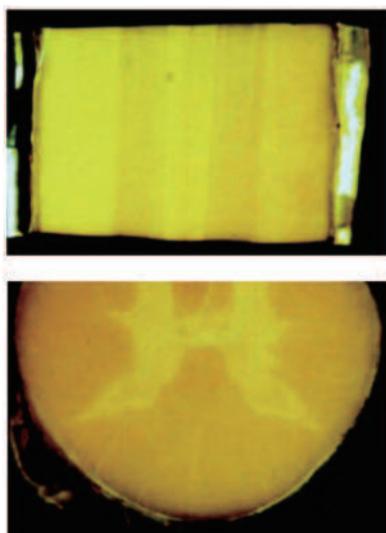


図5

面＝脊髓の長軸と平行な断面を、中軸と平行な波動方向を持つ偏光で照明して撮影。下：横断面＝脊髓の長軸と直交する断面)。

じつは、脊髓と同様に、有髄繊維の束(白質)と灰白質が隣り合っているところでは、どの方向で切断するかによって、白質と灰白質の見え方は大きく違うのです(図6 A：带状回、B、B'、C：脳梁。A、B、C：は前額断面。A'、B'は、A、BをCから離断し、紙面の上下軸の周りに左90°回転してから撮影した)。

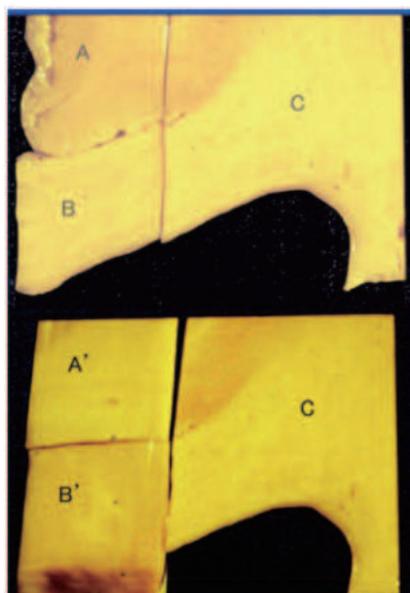


図6

結論的に言うと、有髄繊維束の走る方向に平行な切断面では(図6 A' 带状回の带状束を含めた白質、B、C) 白質は“白く”見えますが、繊維束を横断するように切った面では(A、B')、白くなく、灰色もしくは茶褐色に見えるのです。なぜこのような光学的現象が起きるのか、有髄繊維を細いガラス棒で擬して、光の振動面を限定した偏光で照明してモデル実験を行った結果、照明光の偏光面が、細桿の束の方向と平行していると、細桿束からの反射光、透過光のいずれも強く、反対に直交に近くなると、ずっと反射、透過のいずれの光も弱くなります(図7 左半：ガラス棒の表面からの反射光と、棒の中に入り、屈折-反射-屈折を経てきた光路。右半は実際の観察写真。下の枠はガラス棒の直径)。

面偏光、界面偏光と光学的に呼ばれている現象と密接な関係で説明できますが、この場合(かつて髄鞘の複屈折性が白質の白さの背景であると説明されていたことと違い)、有髄繊維の髄鞘が存在が、白さの原因でないことは、胎児の将来白質になる部分だが、まだ髄鞘が出来ていない所も、上記の照明条

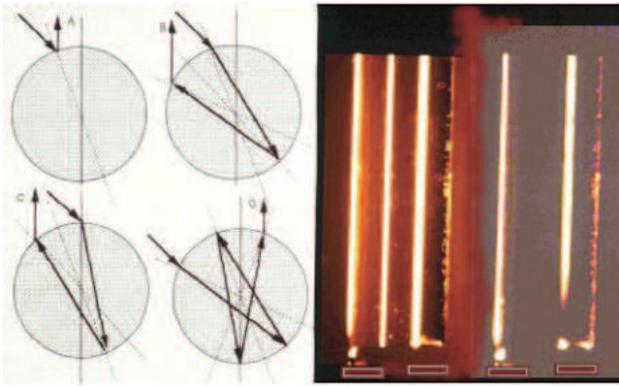


図 7

件で明るく光ることからもわかります。結局、媒体に比して屈折率の高い物質が小桿構造を作り、それらが束をつくって平行に存在しているところでは、この面と平行な振動面を持つ偏光に照明されると、面偏光、界面偏光によって明るく見えるということです。(この現象は、小桿構造(神経線維)の間に存在する水分子の拡散方向性、もしくは同質性に基に画像を作る拡散テンソール画像と、相通ずる所があります。) 実験的には、in vitro ではありますが、脳の断面をいろいろな角度での偏光で照明することによって、これまでは、あまりうかがい知ることが出来なかった白質の構築像を知ることが出来ます。図 8 では、ヒトの後頭葉の全額断面を、角度を変えた偏光で(落射)照明することで明らかになった、

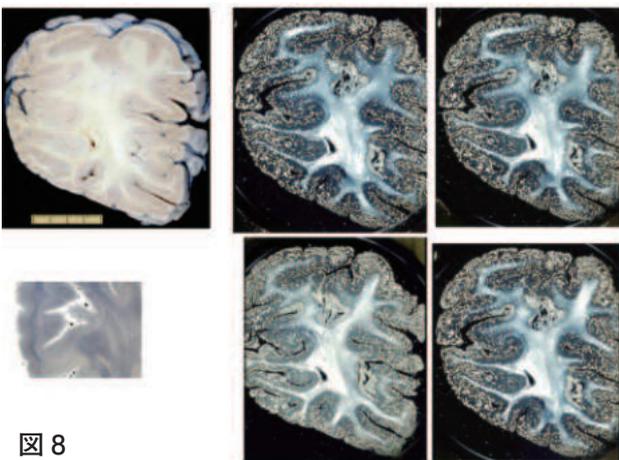


図 8

側脳室後角周囲の様々な繊維束が観察できることを示しました。

さて、ここで再び、組織学レベルの構築の話に戻りますが、いずれの構築でも、脳を構成している、最も容易に同定できる形態は神経細胞です。この細胞の「大きさ」が問題となることが多いのですが、神経細胞の「大きさ」はどこを、どう計ったらよいのでしょうか? じつは、神経細胞というのは、大き

さを測る良い物差しが、なかなか見つかりません。そのため古くから、大、中、小という一見曖昧な区別が用いられてきました。もう少し曖昧でない表現を求めて、数字で表せないかと、様々な試みがなされました。しかし、細胞構築の対象である、ニッスル染色標本で、大事なパラメータである、神経細胞の核周部の大きさをどこで測れるのかが、決められないのです。核周部に存在するニッスル物質は必ずしも核周部全体の内に均一に分布してはおらず、この物質の広がり核周部のそれを表現してはいたのです。ニッスル物質が存在しない核周部の部分と、これを取り囲んでいる、周りのニューロピルとの境界は、光学顕微鏡では、判定が大変困難です。この境界を極めて高いコントラストで明らかにするのは、ゴルジ法で渡銀された神経細胞ですが、この方法で染められた神経細胞は、ニッスル染色で表出される神経細胞に比べて極端に少なく、ニッスル像による構築を知るのには適していませんし、こんどは、核周部とそれから伸びている樹状突起との境界を示すことも困難です。と言うわけで、ニッスル小体を対象にしては、神経細胞の大きさを求めるのは容易なことではありません。今もって、大、中、小の表現が現役である理由の1つです。神経細胞の大きさを表す他の形態学的指標としては、核の大きさ、軸索の長さ、太さ、核小体の大きさ、などがあります。ここでは、私がこれまで多く試みてきて、いろいろなメリットがあると考えている、核小体計測 nucleolometry を紹介します(図 9 ヒト灰白質の神経細胞と核小体 上: 脊髄前角 下左: 視床背内側核 下右: 外側膝状態 第 1 層(大細胞性))。

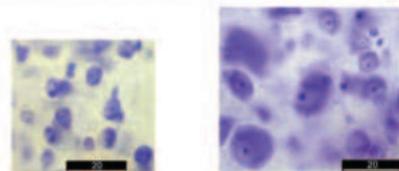
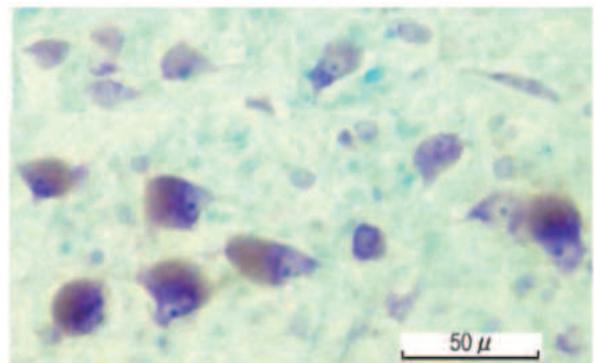


図 9

核小体の形態学的特徴：神経細胞の核小体は、かなり劣悪な組織保存状態の標本でも、

1. 周りの明るい核質とのコントラストが充分高く染まります。
2. 従ってサイズの計測が容易(自動計測も可能)
3. 形がほぼ球形で、大きさが直径もしくは投影面積で、再現性高く計測できる。
4. 大きさ(径2~5 μ m)が、切片の厚さ(10~40 μ m)に比べて十分に小さいので、切片の切断面によって対象が切られている可能性を考慮した補正がほとんど必要ではありません。

これまで神経細胞を特徴付ける、明るい核質の中に高いコントラストで見える、という定性的に観察されていた核小体も、その大きさを計測してみると、大脳皮質以外にも、様々な、灰白質で意外な内容を示してくれることが分かりました。a. 大きさの量的表現の1つとしての可能性で、様々な動物の間の比較構築研究(例えば、小脳のプルキニエ細胞の大きさが(図10)、動物の体重や脳重と対応して変化する

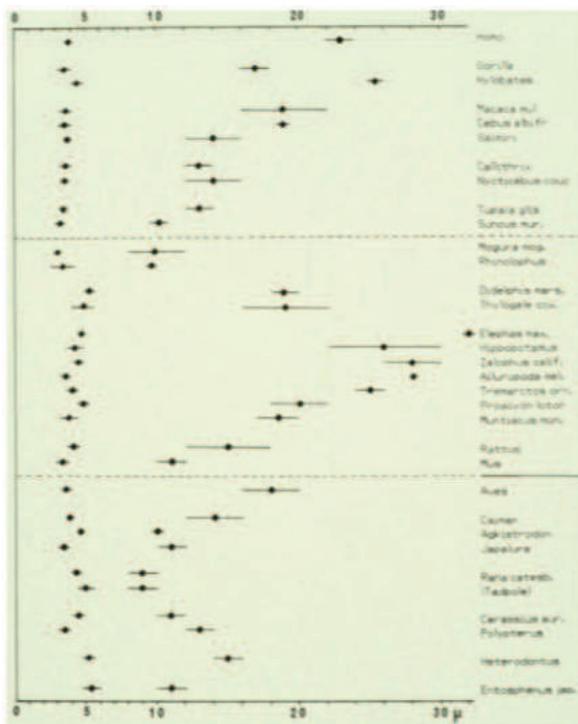


図 10

るが、顆粒細胞のそれは、小脳を持っている(円口類からヒトまで)動物の間で、ほとんど変化を示さないこと、また、b. 視床核では(図11 横軸はいずれも核小体の大きさ(直径または投影面積)、左のカラムの上半：ネコとラッテの、LGM：外側膝状体核、VA/VL：視床腹側核、MD：視床背内側核、

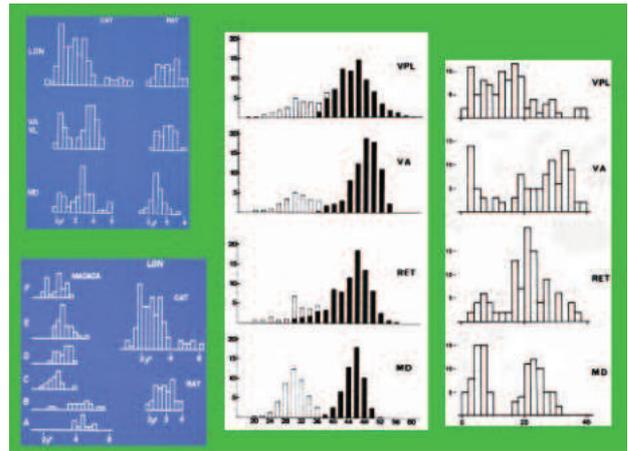


図 11

左カラムの下半：マカクザル(macaca)、ネコ(cat)、ラッテ(rat)の外側膝状体核。マカクザルのA-F：膝状体核の各層。右カラム：ヒト視床核のVPL, VA, RET, MDの神経細胞の核小体サイズの分布。中央のカラム：Hopfらの、「細胞体の大きさ」によるヒト視床の細胞の分布図)。

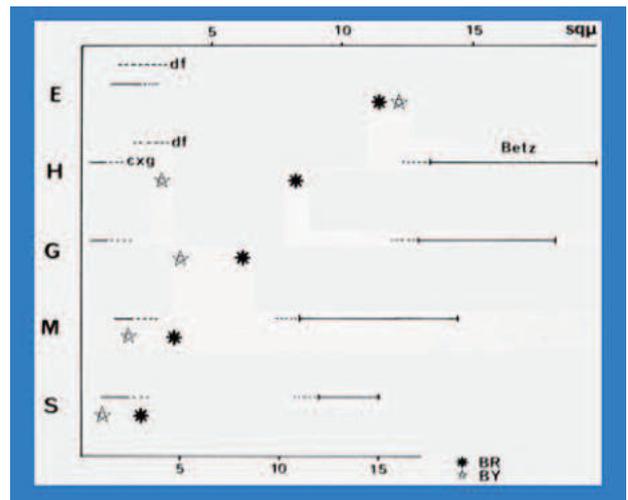


図 12

図12 横軸に核小体の投影面積を示す。Betz：第4野5層の巨大神経細胞、BR. BY：脳重、体重、d：海馬歯状回の顆粒際基、E：アフリカ象、H：ヒト、G：ゴリラ、M：マカクザル、S：リスザル。

核小体の大きさで、投射細胞と、いわゆるマイクロニューロン(局所回路ニューロン)が明瞭に区別でき、両者の数の割合が各神経核の間で違っており、この値で、神経核をグループ分け出来ることなどが出来ます(平田07参照)。核小体の大きさが、神経細胞の軸索の長さに対応するとの報告がありますが、神経細胞の、そのほかの、どんな形態学的ないし機能的指標と関連があるかはまだ充分明らかではありません。

以上、脳の構築について、これまであまり疑問もなく用いられてきた細胞構築にしても、これまでの記載を、先見に煩わされる事なしに観察してみると、様々な問題点が浮かび上がってくることや、さらに、肉眼レベルでも、ごくごく当たり前とされてきた、白質、灰白質という構築常識が、改めて問い直すことによって、新たな解釈と説明が可能であることに言及しました。

さいごの部分では、脳の構築所見の重要な形態学的パラメータと考えられてきた「神経細胞の大きさ」の定義が、以外に脆かったことを説明した後で、新しい神経細胞のサイズとして、核小体の大きさの計測を提案し、それによってどのような比較構築の結果が得られるかを、簡単に披瀝しました。これらは、今までの見方を、少し視点を変えたり、やや異なった光学的方法の適用を試みた結果ですが、近年の分子生物学、遺伝学の方法論の採用によって、これまで神経科学の領域でドグマとして受けとめられたものの内、いくつかは、ドグマとしての改廃、さらには新しいドグマの提案がなされつつあります。

さらには構築の発生、成り立ちに関しては、生後さらには成人においても、新しい神経細胞が生まれ、神経回路に組み込まれることも確認されるようになったこと、神経細胞の系譜と、膠細胞のそれが広く重なり合い、とくに細胞発生の時点に立ち戻ると、両細胞の概念そのものが、揺れてきているし、脳を

構成する細胞の、最終存在地点までの細胞移動に、様々な経路をとり、移動の仕方の多彩さも明らかにされつつあります。この方面の展開は、なかなか余談を許さないような激動の最中にあると言えます。このような神経科学の激動の流れの中において、少し立ち止まって、これまでごくごく当たり前のよう受けとめられてきたことを見直してみることも、意味のあることではないかとおもい、お話しさせていただきました。

ご静聴を感謝し、今回の機会を与えてくださった加我名誉センター長にお礼申し上げます。

参 考

- 1) Amunts K, Zilles K. 2006 A multimodal analysis of structure and function in Broca's region. In Grodzinsky e Amunts '06 ed Oxf Univ Press 17-29
- 2) Amunts K Zilles, et al. 2010 Braoca's region. Novel organiza' principles e multiple receptor mapping PLoS Biol8
- 3) 平田幸男, 船戸和弥 2009 動物からヒトへの脳の進化—比較神経組織学からの管見」Brain Med. 21 121
- 4) 平田幸男 2010 「大脳白質の線維構築」 Clin Neurosci 27 1221-1224

視覚研究

1. オカルト黄斑変性症原因遺伝子の解明

感覚器センター 分子細胞生物学研究部 研究員

赤 堀 正 和

1989年に三宅養三教授により発見されたオカルト黄斑変性症（OMD）は、網膜中心部の機能が徐々に低下し次第に視力が低下する疾患だが、いまだ発症原因は解明されておらず治療法も開発されていない。そこで本研究では、家族性 OMD の連鎖解析による原因遺伝子の同定をおこなった。

常染色体優性遺伝と考えられる国内の罹患者 12 名、健常者 6 名を含む 5 世代、罹患者 4 名、健常者 5 名を含む 3 世代の 2 家系から末梢血を採取しゲノム DNA を精製した。Affymetrix 社の SNP array 6.0 を用いて SNP タイピングし、連鎖解析プログラム Allegro によりパラメトリック解析をおこなったところ、8p 22-23 の領域がマキシマム LOD スコア 3.77 を示した。8 番染色体のこの候補領域にある 128 遺伝子のうち後眼部に発現が認められる 22 遺伝子からまず 4 遺伝子について Exon 解析をおこなった。その結果、全ての疾患で *RPILI* 遺

伝子の第 2 Exon にミスセンス変異 (c.362C>T) を見出した。次に 2 家系の家族性 OMD の罹患者について *RPILI* 遺伝子の解析をおこなったところ、一方の家系の罹患者からは同様に c.362C>T を、他方の家系の罹患者からは新たに第 3 Exon にミスセンス変異 (c.3107T>C) を見出した。このようにまったく異なる多くの OMD 家系から変異が見つかったことから、*RPILI* が遺伝性 OMD の原因遺伝子のひとつであることが明らかとなった。また、マウスでは *RPILI* は視細胞桿体のみ局在することが報告されているが、マームセットの網膜切片を用いた免疫染色法をおこなったところ視細胞桿体に加え錐体にも存在することが示された。今回本疾患の原因遺伝子を同定したことにより、今後、発症機序の解析および治療法の開発が進むことが期待される。また、通常の検査では診断が難しい本疾患の診断に *RPILI* 遺伝子の解析が役立つものと考えられる。

オカルト黄斑変性症 原因遺伝子の解明

国立病院機構東京医療センター-感覚器センター
分子細胞生物学研究部
赤堀 正和

オカルト黄斑ジストロフィー (OMD)

両眼性にゆっくりと進行する黄斑部機能の低下がおり、常染色体優性遺伝の他、孤発例の報告も多い

- 1) 検眼鏡的所見、フルオレセイン蛍光眼底造影は末期まで正常
- 2) 全視野ERGは正常
- 3) 黄斑部局所ERG、多局所ERGにて黄斑部機能の低下を証明

OMD家系

発症、非発症は、黄斑部局所ERGあるいは多局所ERGによる黄斑部機能の低下の有無で最終判定。30才以下の非発症者は対象とせず。

Family 1 (佐渡島)

Family 2 (愛知県)

	発症者	非発症者
Family 1	12	6
Family 2	4	5

連鎖解析(linkage analysis)

ある疾患の原因遺伝子が染色体上のどの領域に存在するかを解析する手法

疾患の原因遺伝子の近傍に位置するマーカーは、家系内では疾患と共に遺伝する(連鎖している)ことを利用する

連鎖解析(linkage analysis)

一般的な家系図 遺伝的伝達関係を重視した家系図

フェノタイプの流れ マーカーAの流れ マーカーBの流れ

SNPを利用した 多点連鎖解析の流れ

SNP 6.0 arrayによる100万SNPのGenotyping

SNP HITLinkによるSNPの選別、加工

約3万SNPによるmulti-point linkage analysis

SNP HiTLink

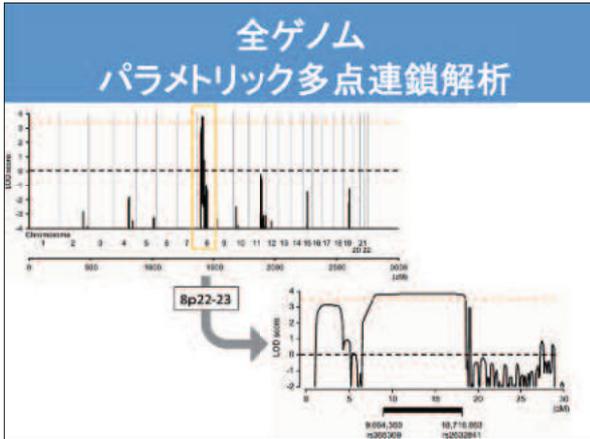
- 1) SNPの選別
 - ・タイピングエラーの排除
Hardy-Weinberg p value > f 0.001
call rate = 1.0
maximum confidence score > 0.02
 - ・情報量の多いSNPの選択
minor allele frequency ≠ 0 (in controls)
 - ・SNP間距離の設定
80-120kb 間隔 ゲノム上の数
- 2) 家系情報、SNPのジェノタイプ情報を連鎖解析ソフトウェアに適した形に自動整形

Allegro: パラメトリック多点連鎖解析

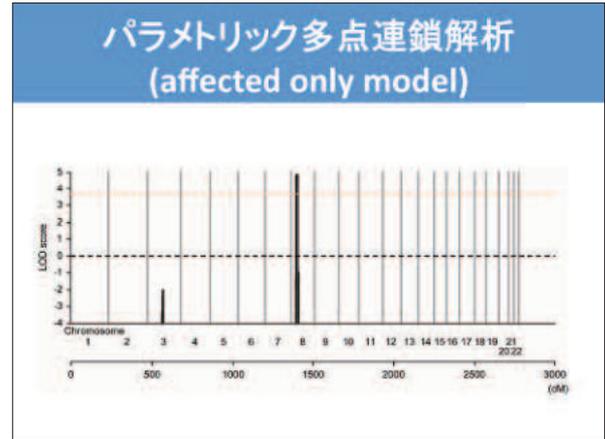
Family 1 (佐渡島)

Family 2 (愛知県)

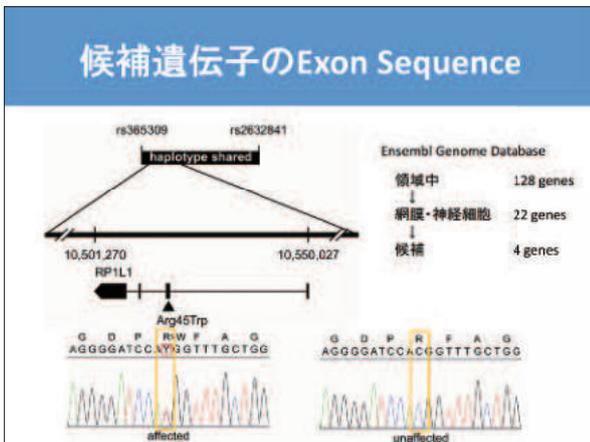
Allegro Parameter-setting
autosomal-dominant model
 * age-dependent penetrance
 0-20 0.19
 21-40 0.55
 41- 0.91
 * disease frequency
 0.000001



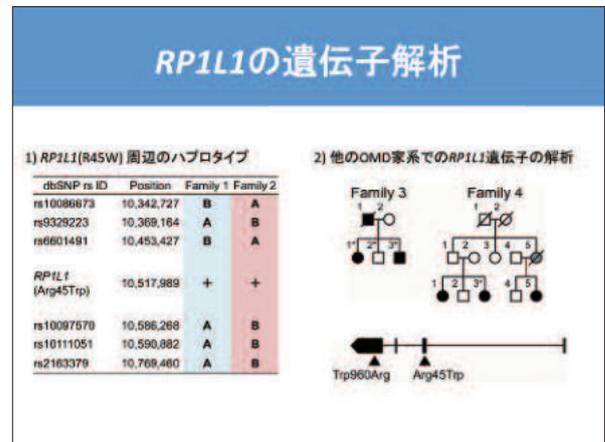
11



12



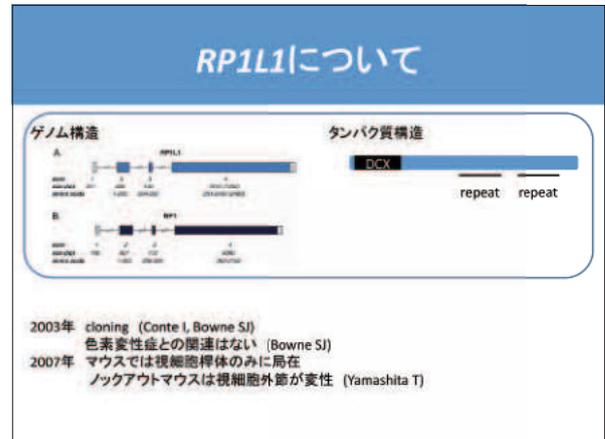
13



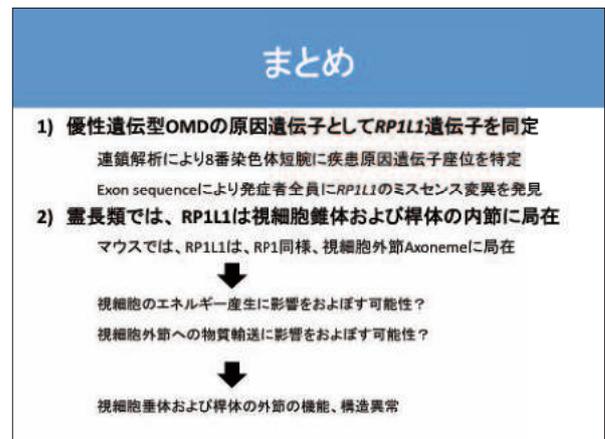
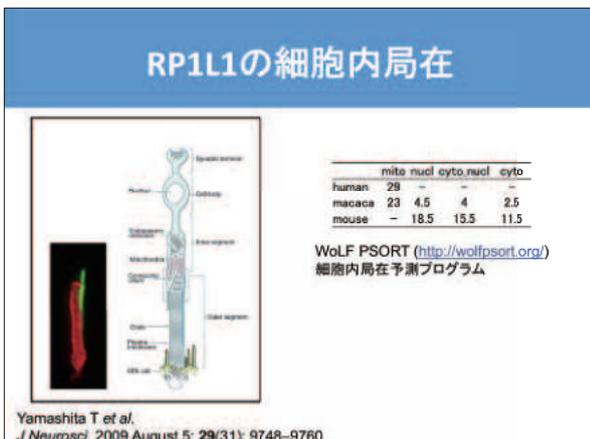
14



15



16



視覚研究

2. 緑内障遺伝子 OPTN、WDR36 トランスジェニックマウスの作製とその解析

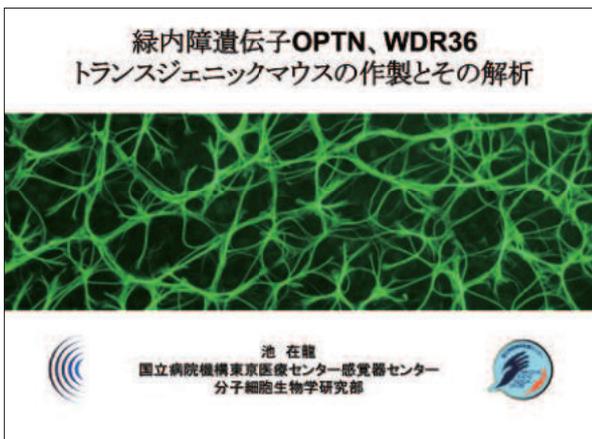
感覚器センター 分子細胞生物学研究部 研究員

池 在 龍

緑内障は世界中に少なくとも 800 万人の患者がいると推定され、日本でも中途失明の原因として第一位である。緑内障は網膜神経節細胞の委縮によって発症するが、その詳細なメカニズムについては分かっていない。これまでに緑内障と関連する 24 の遺伝子座が報告され、その中からミオシリン (MYOC)、チトクロオム P4501B1 (CYP1B1)、オプチニューリン (OPTN)、そして WDR36 の 4 遺伝子が同定されている。我々はこの中でも OPTN と WDR36 に着目し、トランスジェニックマウスを作製して、その表現型を解析した。OPTN に関しては野生型 (Wt) に加えて、患者に観察される遺伝子変異 (E50K, H486R)、2 つのロイシンジッパー (1st LZDel, 2nd LZDel) を欠損させた合計 5 つのコンストラクト、WDR36 については野生型 (Wt)、変異型 (D606G, Del605-607, Del601-640) の 4 つのコンストラクトをそれぞれチキン・アクチン・プロモーターによって全身で強制発現するトランスジェニックマウスが作製された。これらのトランスジェニックマウスを観察した結果、OPTN E50K お

よび WDR36 Del605-607 変異体マウスにおいて、顕著な周辺網膜の菲薄化が観察された。菲薄化はほぼ網膜全層におよび、神経節細胞とこれに接続するアマクリン細胞や双極細胞の委縮やシナプスの破綻が観察された。神経節細胞死に伴い、視神経乳頭の陥凹も認められた。眼圧の変化は観察されなかった。OPTN E50K マウスでは、生後 20 ヶ月後に網膜および神経節細胞層や神経乳頭周辺の血管網におけるアストロサイトの活性化が観察された。E50K による発症メカニズムの一つとして、OPTN-Rab8 の分子間相互作用に機能しないことが観察された。また、WDR36 Del605-607 マウスの神経節細胞は軸索の伸長が著しく抑制されることが観察された。また、コンピューター・シミュレーションによって、変異体 WDR36 のタンパク構造の不安定化が示唆された。本研究から緑内障の早期診断には周辺網膜の観察がきわめて有効と考えられ、作製されたマウスは新しい視神経保護薬の開発などに利用できると期待される。

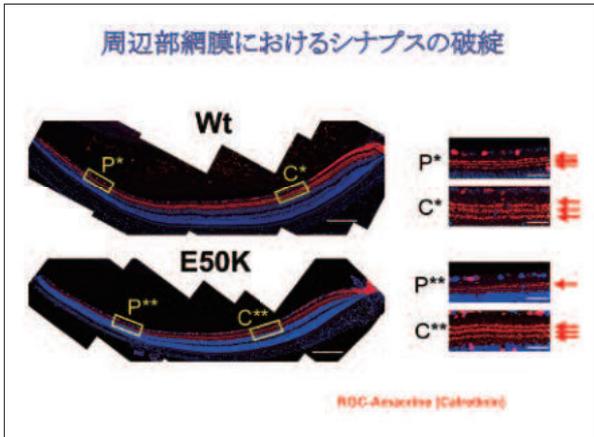
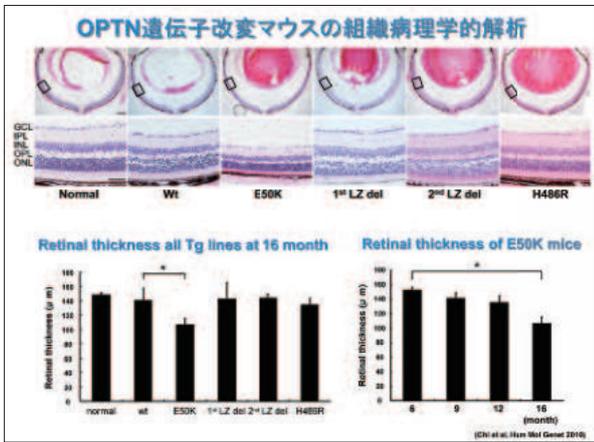
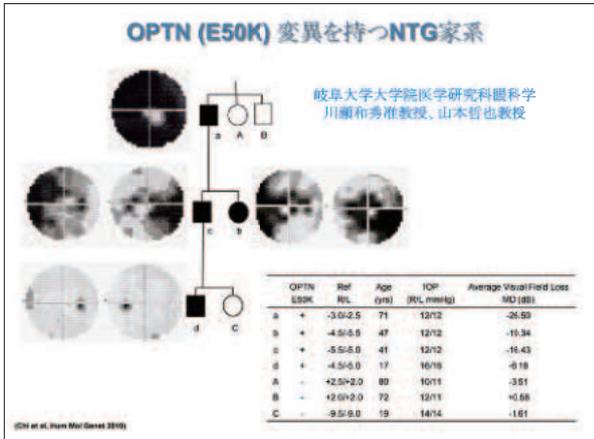
1



2



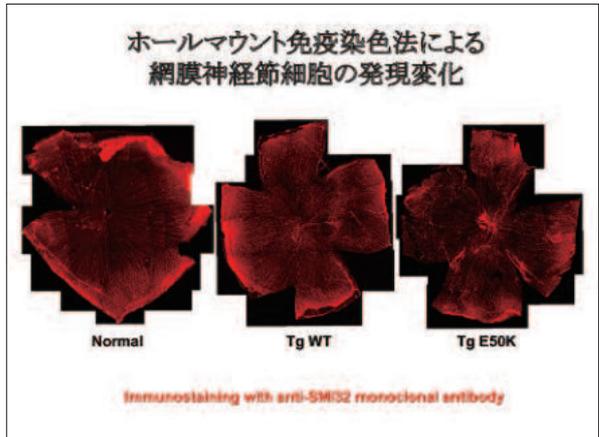
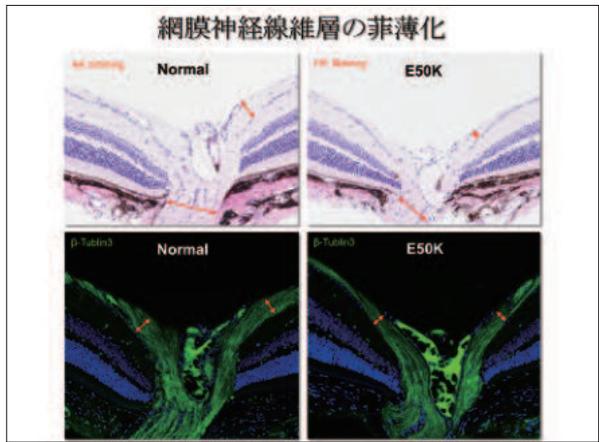
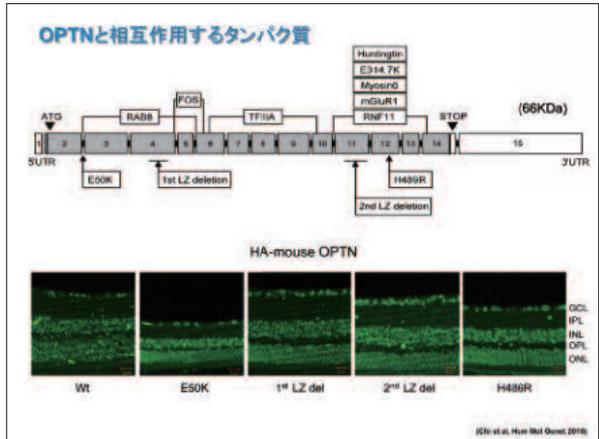
Optineurin (OPTN)

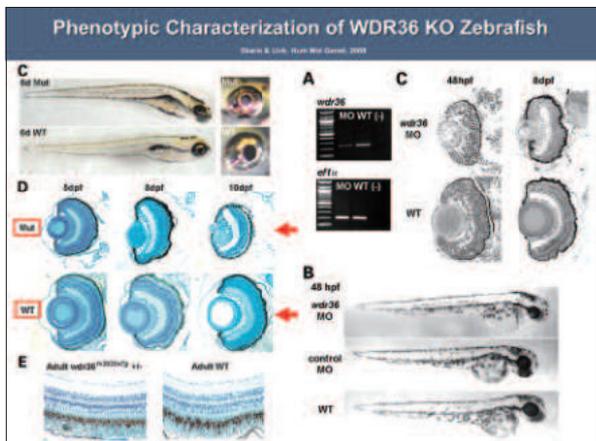
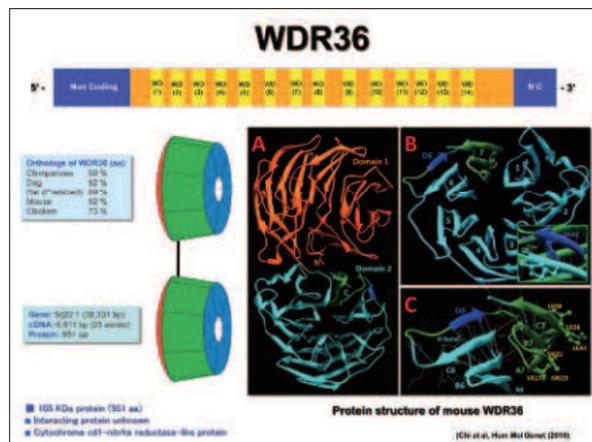
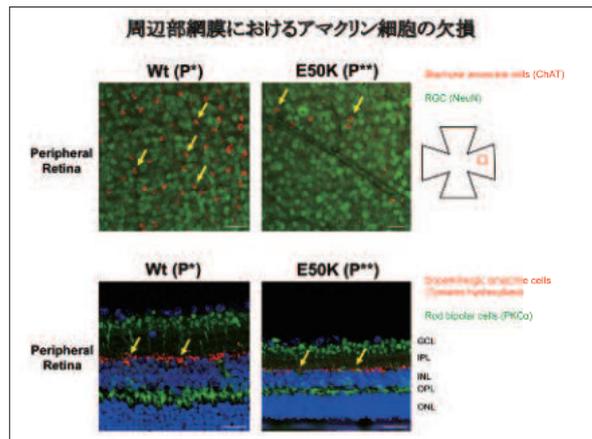
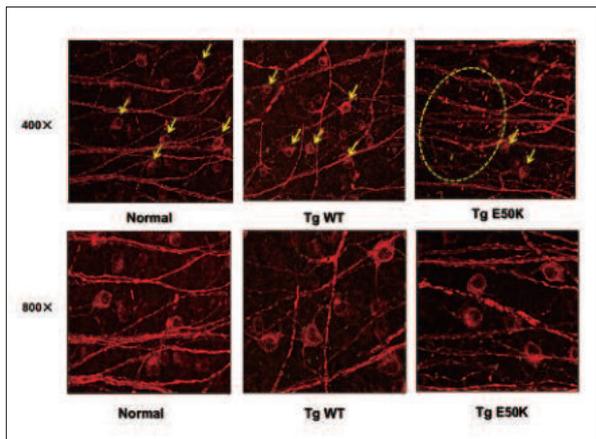


現在まで報告されたOPTN遺伝子変異体

Publishing Group	Nature of the identified DNA alterations reported as: Disease-causing mutation
Rezale et al.	P16A, E50K, K66R, E92V, H228Y, 2-bp Insertion, A466S, R545Q
Aung et al.	E50K (Glutamic acid > Lysine)
Funayama et al.	H26D
Fuse et al.	H26D, R545Q
Leung et al.	E103D, H486R (Histidine > Arginine)
Willoughby et al.	H486R
Weisschuh et al.	A336G, A377T
Yao, et al.	V161M, I407T
Hauser et al.	E50K

Sarafrazi
Mechanisms of the glaucoma
Humana Press
2008



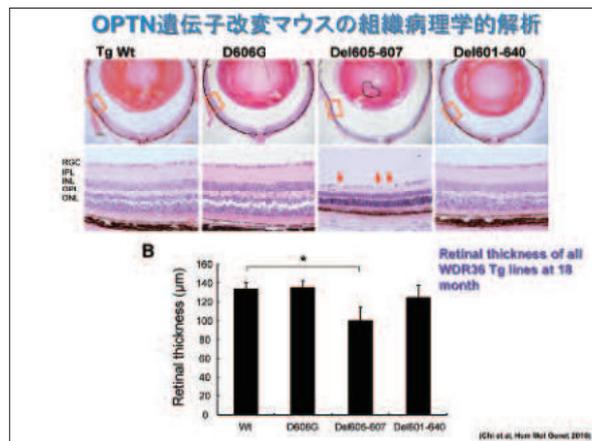
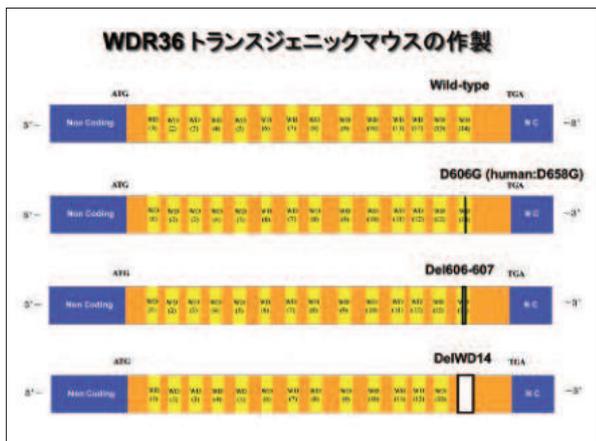


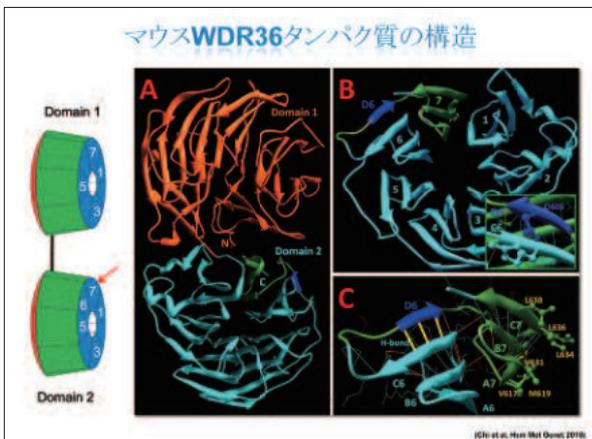
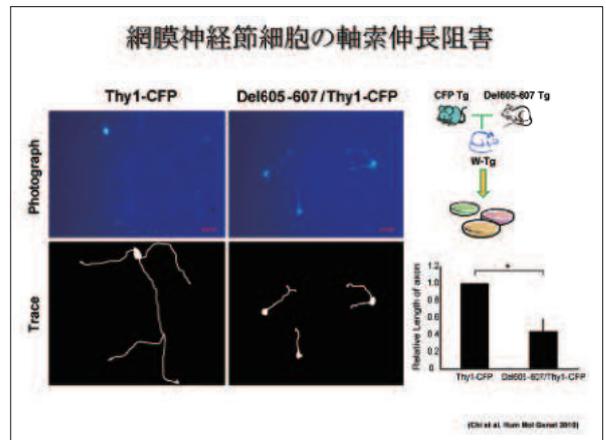
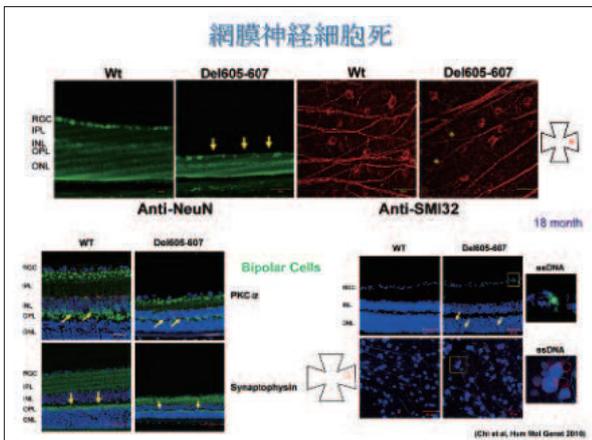
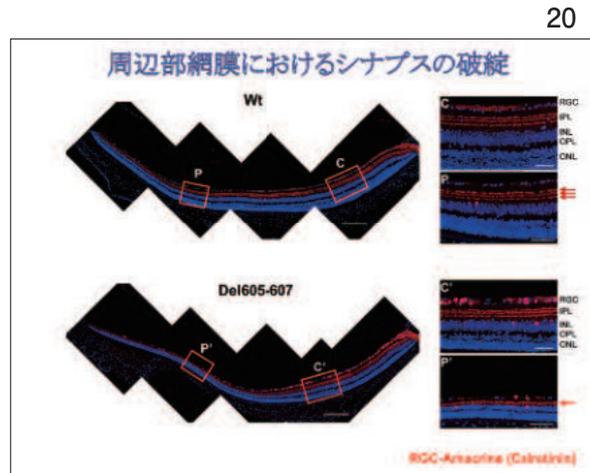
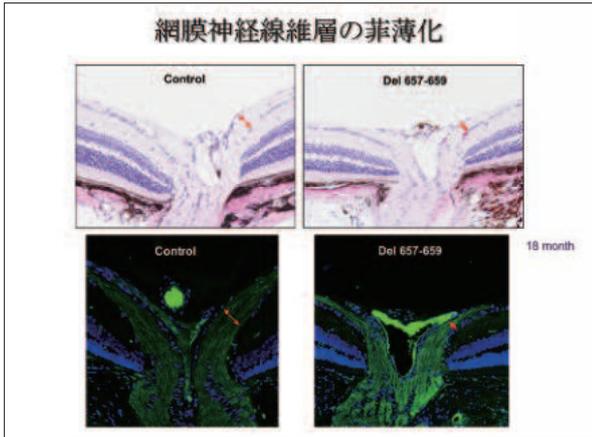
Distribution of 28 Coding Mutant Variants Identified in the WDR36 Gene

Type of mutation	Study 1 (23)	Study 2 (144)	Study 3 (146)	Study 4 (145)	Total	% in normal	% in Normal
27 predicted disease-causing mutations							
P217	-	-	-	1709	1709	0.53	0.00
T268	-	-	-	1338	1338	0.31	0.00
Y290	-	-	-	1099	1099	0.32	0.00
D124N	-	-	-	891	891	0.33	0.00
R244T	-	-	-	892	892	0.33	0.00
E292I	-	-	-	892	892	0.33	0.00
N331T	-	-	-	899	899	0.33	0.00
A355S	-	-	-	1118	1118	0.85	0.00
N555S	1/130	1/290	-	1/118	3/537	0.47	0.00
D614V	-	-	-	1529	1529	0.78	0.00
T659A	-	-	-	1508	1508	0.52	0.00
H411R	-	-	-	1092	1092	0.33	0.00
H411L	-	-	-	1909	1909	0.52	0.00
A440T	2/130	3/290	1/118	5/509	10/537	1.29	0.00
G470Y	-	-	-	1174	1174	0.60	0.00
R529Q	1/130	1/290	1/118	3/509	6/537	0.55	0.00
R609V	-	-	-	3/118	3/118	2.54	0.00
S628T	-	-	-	694	694	0.34	0.00
G651R	-	-	-	1287	1287	0.33	0.00
Sum of all predicted disease-causing mutations					11,23		0.00
3 Potential disease-responsibility mutations							
L23P	-	-	-	1/118	1/509	2.80	1.19
D33E	-	-	-	1/118	1/509	5.73	1.74
A163V	4/130	3/290	-	5/509	10/537	1.86	0.72
H213P	6/130	1/290	-	2/118	7/509	6.65	2.28
D658G	1/130	1/290	-	2/118	3/509	6.54	1.49
Sum of all potential disease-responsibility mutations					10.32		5.70
4 Synonymous variations reported in PCAG subjects only							
T100I	-	-	-	1/118	1/118	0.85	0.00
R439R	-	-	-	1/118	1/118	0.32	0.00
L465L	-	-	-	1/118	1/118	0.85	0.00
R514R	-	-	-	1/118	1/118	0.34	0.00
Sum of all synonymous variations					4		2.36

D658G [Aspartic acid = Glycine]

Surferaz: Mechanisms of the genome. Humana Press 2008





今まで報告されている緑内障マウスモデル

	Myocilin	Optineurin	WDR36	DBA/2J	GLAST +
モデルタイプ	Y437H	E50K	Del605-607	Angle closure	Glutamate transporter deficient
IOP	Normal	Normal	Normal	Elevated	Normal
網膜病	RGC, Astrocyte	All cell layer	All cell layer	All cell layer	All cell layer?
網膜変性	Peripheral	Peripheral	Peripheral	Peripheral to central	Peripheral?
文献	Sorabara Y et al. J Neurosci. 2006	Chi et al. Hum Mol Genet. 2010	Chi et al. Hum Mol Genet. 2010	John BM et al. IOVS. 1966	Harata T et al. JCI. 2007

まとめ

1. 正常眼圧緑内障遺伝子OPTNの変異を元に、トランスジェニックマウスを作製した。
2. OPTNのE50K マウスでは 正常眼圧緑内障の表現型を示した。
3. Del605-607トランスジェニックマウスは正常眼圧緑内障の表現型を示した。
4. 初代培養では網膜神経節細胞の軸索の伸長が障害された。
5. コンピューターによる分子モデリングの解析で、三つの水素結合の欠損によりタンパク質のプロベラ構造が破壊されることで表現型が現れるものと証明された。

視覚研究

3. 角膜内皮機能不全に対する新しい治療法の開発

感覚器センター 視覚研究部 部長

山田 昌和

要 旨

角膜内皮機能不全は角膜疾患のなかで最も失明に至る頻度が高く、角膜移植を待機する患者の過半数を占める疾患である。角膜内皮機能不全に対する新しい治療法として、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の開発について検討した。

角膜内皮機能不全の薬物療法では、角膜内皮細胞のポンプ機能の担い手である Na-K ATPase の活性に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングを行い、デキサメサゾンとインスリンが Na-K ATPase 活性を亢進させることを見いだした。ステロイドによる Na-K ATPase 活性化は酵素蛋白合成による Na-K ATPase の発現量増加を介すると考えられた。一方、インスリンによる角膜内皮の Na-K ATPase 活性化は PKC を介し、Na-K ATPase の α サブユニットの脱リン酸化によることが示されその作用は cyclooxygenase 阻害剤のインドメサシンを添加することにより増強された。Na-K ATPase の活性制御には異なる複数の経路が存在していると考えられ、デキ

サメサゾンとインスリン、インドメサシンの組み合わせによって角膜内皮機能不全を薬物で治療できる可能性があると考えられた。

培養角膜移植による手術治療の開発のため、ヒト角膜内皮細胞の培養技術の確立に関する研究を行った。網膜芽細胞腫の摘出眼球より得られたヒト角膜内皮細胞に、組換えレトロウィルスを用い、不死化遺伝子 HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1 を単独あるいは種々の組み合わせで導入し、ヒト角膜内皮細胞株を作製した。このヒト角膜内皮細胞株は角膜内皮としての性質、機能を保持していることから、今後の角膜内皮研究や培養角膜移植の細胞源になる可能性があると考えられた。

薬物療法と培養角膜内皮細胞移植ともに臨床応用にはまだ検討の余地が多いが、角膜内皮機能不全症例のうち、軽症例は薬物療法による機能維持を目指し、重症例は培養角膜内皮細胞移植による手術によって治療することを実現させたいと考えている。

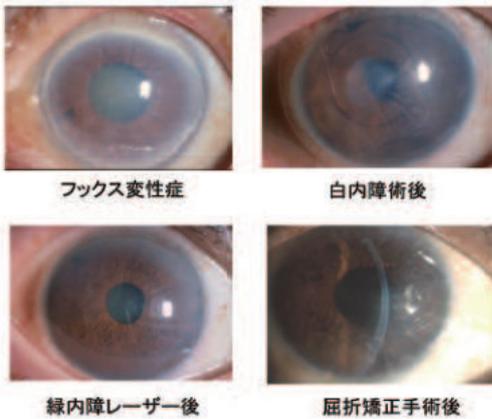
角膜内皮機能不全に対する 新しい治療法の開発

国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター・視覚研究部
山田昌和 羽藤 晋
成育医療センター・眼科
横井 匡 東 範行

National Institute of Sensory Organs

角膜内皮細胞

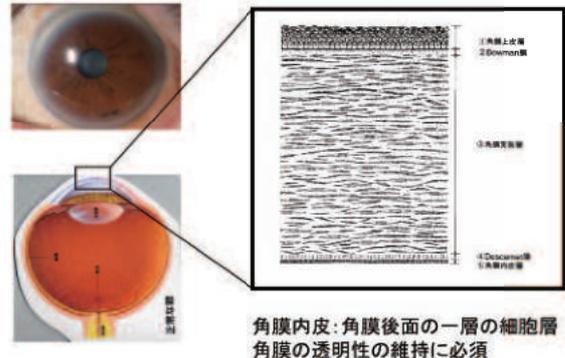
- 内皮細胞はヒトでは生後に増殖しない
- 加齢とともに内皮細胞は減少する
- 外傷、内眼手術、コンタクトレンズなど侵襲によって内皮細胞は減少する
- 細胞減少が限度を越すと実際に浮腫が生じ、角膜の透明性が喪失してしまう
 - 内皮機能不全(水疱性角膜症)の発症



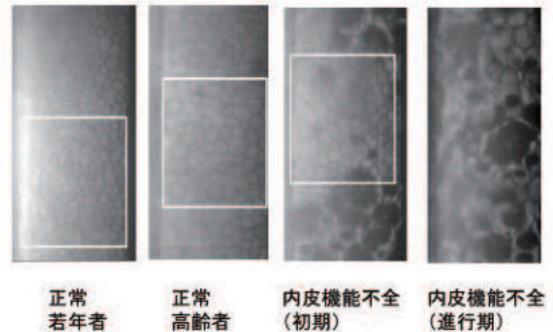
角膜内皮機能不全に対する 新しい治療法の開発

- ・薬物治療の開発
 - ポンプ機能 (Na-K ATPase) の活性制御
 - 薬物治療による角膜透明性の維持
- ・培養角膜内皮移植の開発
 - ヒト角膜内皮細胞培養技術の確立
 - 1人のドナーから複数の移植片を作成

角膜の構造と角膜内皮



角膜内皮細胞の加齢変化と病的変化



角膜内皮機能不全の治療の現状

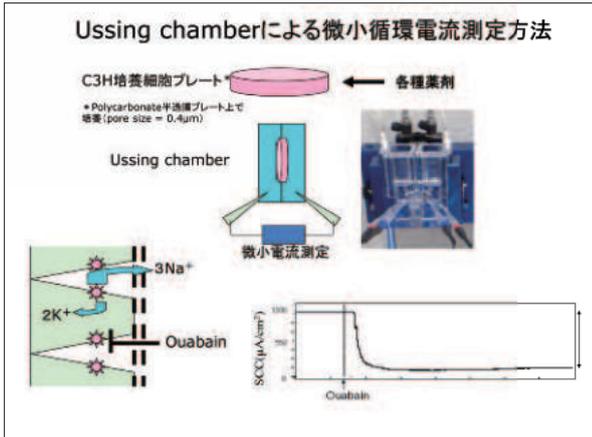
治療は角膜移植しかない
 ○待機患者の30-50%が角膜内皮機能不全
 ○角膜移植の最大の適応疾患

内皮機能不全に対する角膜移植の移植片生存率
 ○術後1年で85%, 術後5年で65-70%程度
 ○移植片混濁例には再移植の必要

角膜移植の待機期間は本邦では平均2年
 ○6000名の待機患者
 ○国内ドナーは1500眼/年程度

角膜内皮機能不全の薬物治療の開発 実験方法

- ・マウス(C3H)由来の培養角膜内皮細胞を使用
- ・角膜内皮細胞Na-K ATPase酵素活性の測定
 - 培養液中にATPを加え, Na-K ATPaseにより生成される無機リン酸量を定量
- ・角膜内皮細胞Na-K ATPaseポンプ機能の測定
 - Ussing chamberを用いた微小循環電流の測定によるポンプ機能の評価
- ・酵素活性とポンプ機能の2つの面から角膜内皮機能を評価



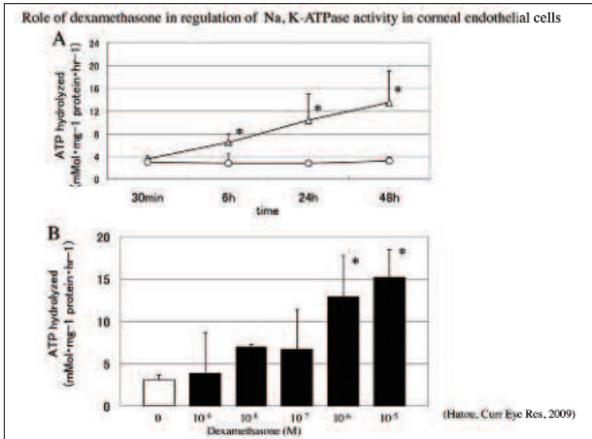
11

角膜内皮機能不全の薬物治療の開発 Na-K ATPase活性に関する薬剤

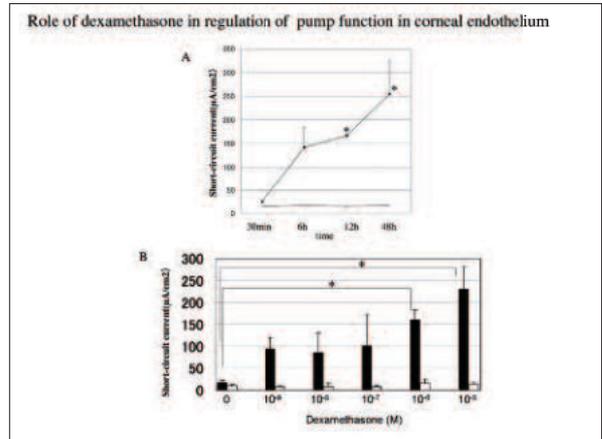
活性を上昇？ ステロイド 甲状腺ホルモン インスリン IGF-1 グルタミン酸 サブスタンスP	活性を抑制？ アセチルコリン ドーパミン ATP, UTP プロスタグランジン 12(R)-HETE phorbol ester
---	--

細胞種や条件により異なる結果が報告
角膜内皮では検討されていなかった

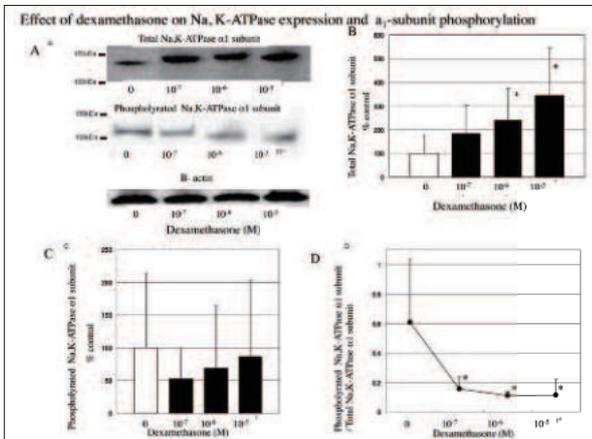
12



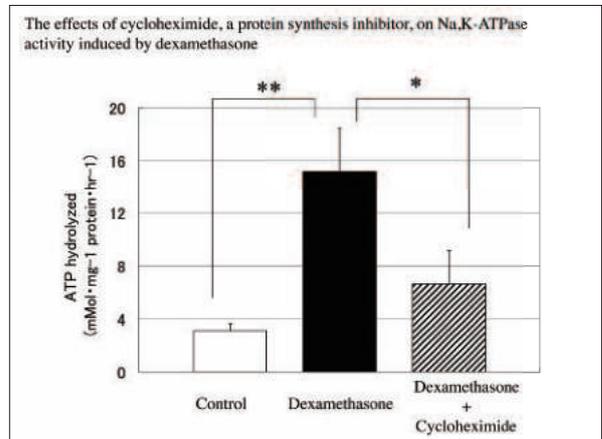
13



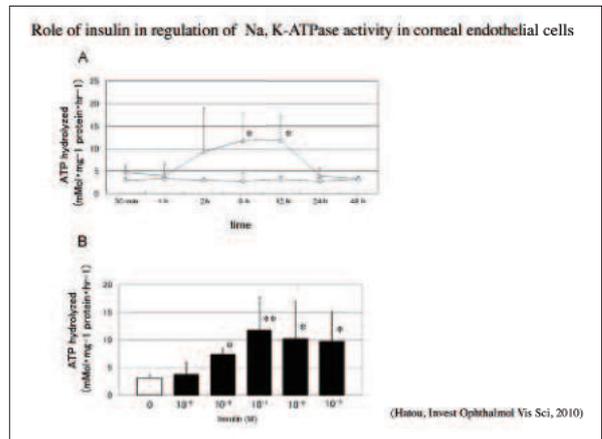
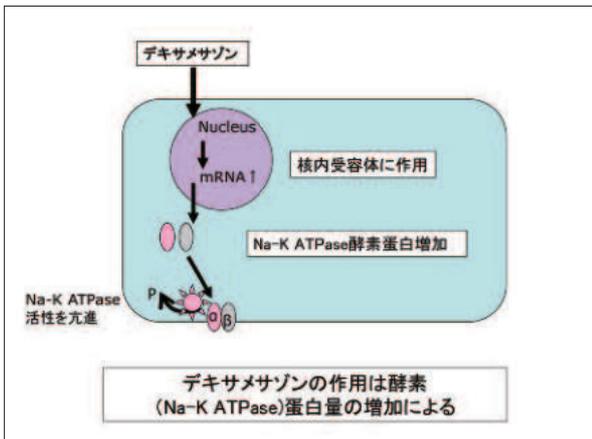
14

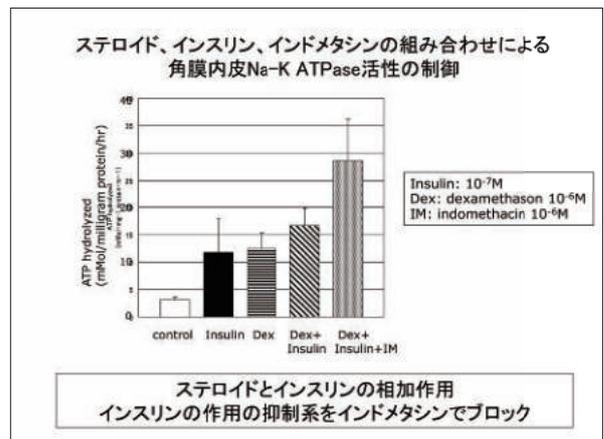
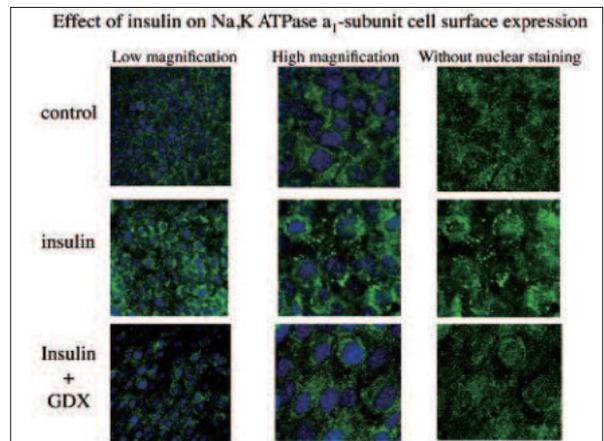
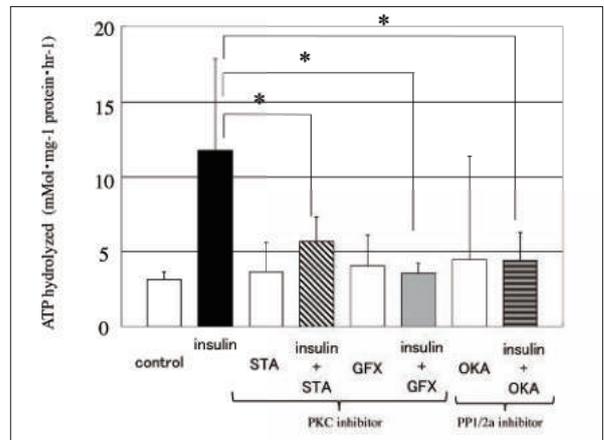
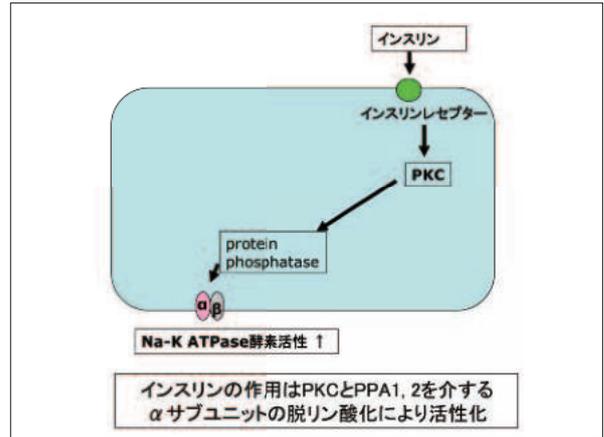
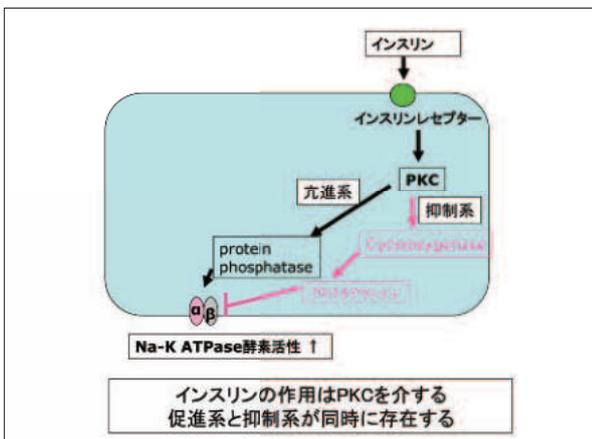
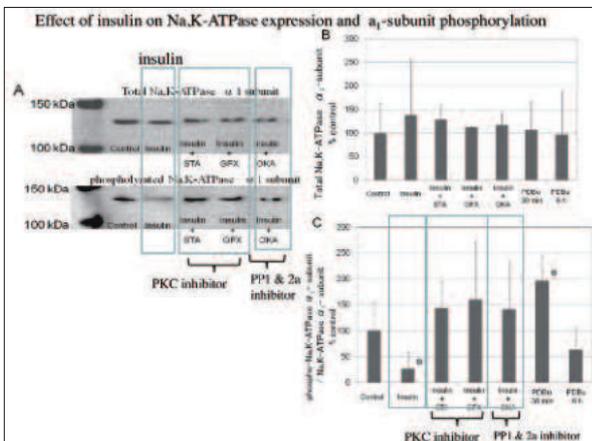
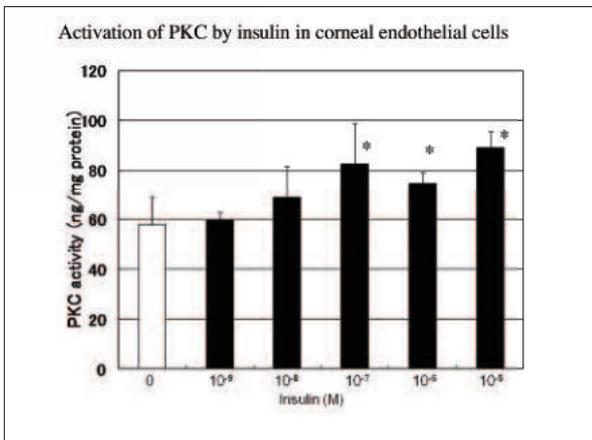
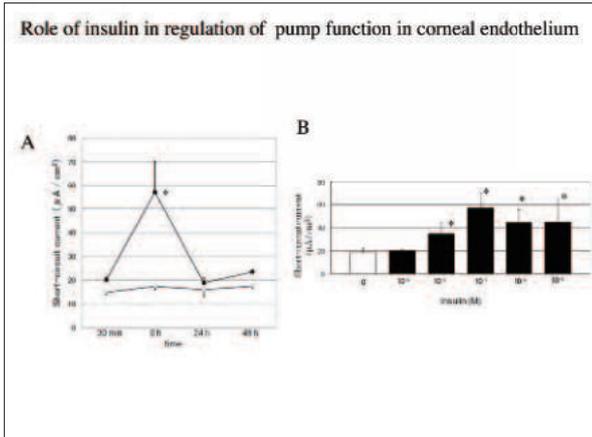


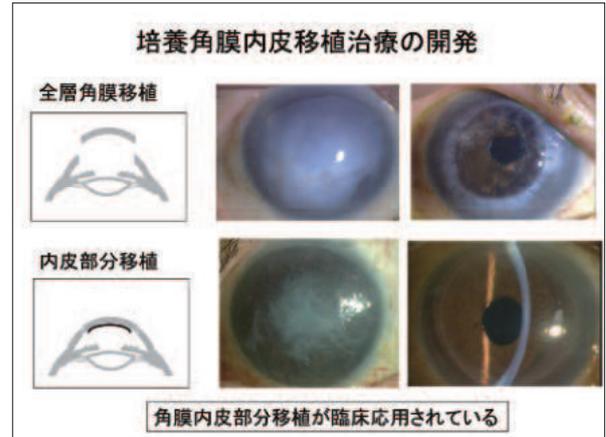
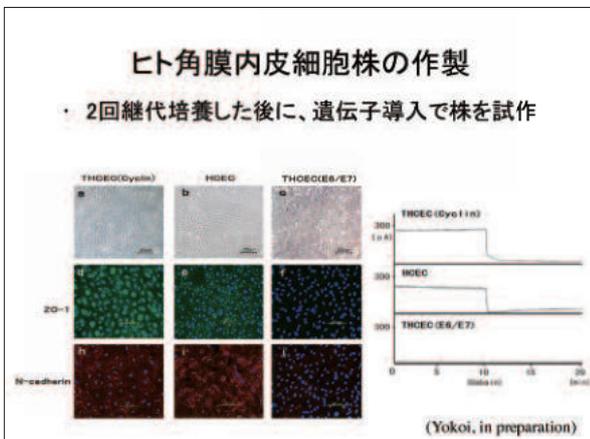
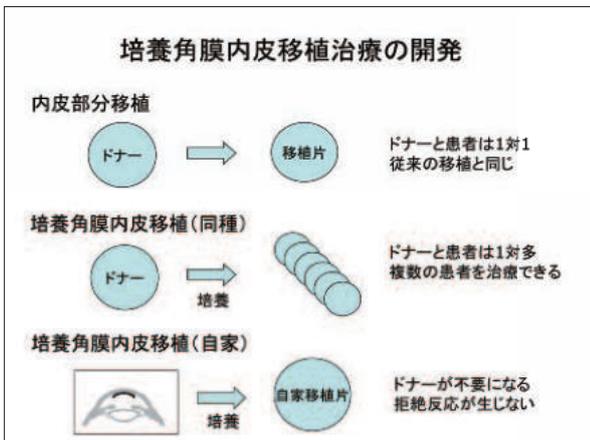
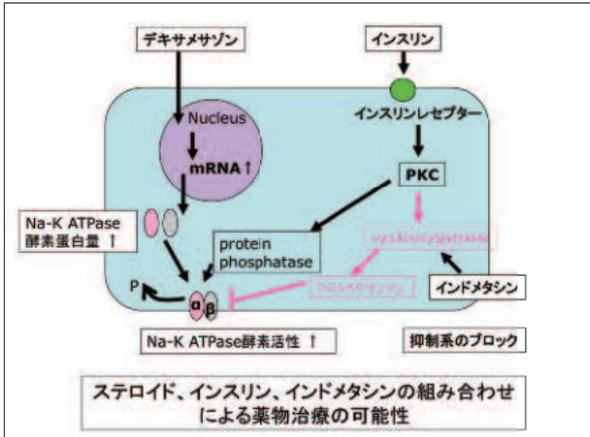
15



16







- ### 培養角膜内皮移植治療の開発
- ・ ヒト角膜内皮培養技術の開発
 - ヒト角膜内皮は培養しにくく、継代が困難
 - ・ 培養方法の工夫
 - コラーゲンゲル培養皿の使用
 - 乳幼児角膜の利用
 - ・ 乳幼児摘出眼球(網膜芽細胞腫など)の利用
 - 遺伝子導入による内皮細胞株の樹立

- ### 角膜内皮機能不全に対する新しい治療法の開発
- ・ 薬物治療の開発
 - ポンプ機能 (Na-K ATPase) の活性制御
 - ステロイド、インスリン、インドメタシンの併用
 - 投与方法、in vivoでの効果の検討
 - ・ 培養角膜内皮移植の開発
 - ヒト角膜内皮培養技術の確立
 - ヒト角膜内皮細胞株の作製
 - 角膜内皮の生理学的、薬理学的研究への応用
 - 角膜内皮移植の細胞ソースとしての可能性の検討

視覚研究

4. 光干渉断層計 (OCT) による三宅病の診断および病期分類

感覚器センター 視覚研究部 視覚生理学研究室 室長

角 田 和 繁

<背 景>

オカルト黄斑ジストロフィーとは黄斑部網膜の機能のみが低下し、両眼の視力がゆっくりと低下していく遺伝性疾患である。昨年 9 月、本疾患の発症に RP1L1 遺伝子の変異が関与していることが感覚器センターの研究チームによって明らかにされ、本疾患は発見者の名前にちなんで「三宅病」と呼ばれるようになった。

2007 年より東京医療センターおよび新潟大学にて行われている三宅病の疾患家系調査においては、通常の眼科ルーチン検査に加えて網膜電気生理学的検査（網膜電図；ERG）、網膜画像解析（光干渉断層計；OCT）を含めた他覚的検査が詳細に行われ、本疾患の新たな臨床的特徴が明らかにされた。

<対象および方法>

三宅病家系の患者 14 名のうち、フーリエドメイン OCT (Carl Zeiss および Topcon) によって網膜構造を詳細に観察することのできた 11 名 21 眼 (男性 4 名、女性 7 名。20-83 歳)。各患者の発症経過と、自覚的検査および ERG、OCT の測定結果を比較検討した。

<結 果>

三宅病で発症初期に見られる異常は中心窩付近における Cone Outer Segment Tip (COST) ラインの消失であり、これは自覚的に異常を感じていない sub-clinical な三宅病でも見られる所見であった (第 I 期)。さらに進行すると視細胞内節外節接合部 (IS/OS) ラインの不明瞭化が見られた (第 II 期)。発症から数十年を経て IS/OS ラインは分断あるいは消失するが、中心窩における IS/OS ラインのドーム状隆起 (foveal bulge) は比較的長く温存されていた (第 III 期)。末期においては外顆粒層が菲薄化し、黄斑部の網膜厚が減少していた。これらの所見は他の黄斑ジストロフィーには見られない、三宅病に特徴的なものであった。

<結 論>

これまで、本疾患は視覚電気生理の専門家による詳細な ERG 計測によってのみ診断が可能とされていた。一方、OCT は非接触、非侵襲の画像診断法であり、これまで黄斑部局所 ERG や多局所 ERG がなければ不可能だった三宅病の診断が、一般眼科医にとっても可能となりうる道が開かれた。

感覚器シンポジウム 平成23年3月4日

光干渉断層計(OCT)による三宅病の病期分類

東京医療センター臨床研究センター (感覚器センター) 視覚生理学研究室 角田和繁

1989年、三宅らが「眼底所見の正常な家族性の黄斑ジストロフィー」3例を紹介
→「オカルト黄斑ジストロフィー」と命名

Hereditary Macular Dystrophy Without Visible Fundus Abnormality

Yasu Miyake, M.D., Kazuo Iribikawa, M.D., Yoshihiko Shiose, M.D., and Yoshikatsu Kawase

We found an unusual form of macular dystrophy in three patients from two generations of the same family. The fundi of these patients appeared normal by ophthalmoscopy and fluorescein angiography, even in an older patient and in patients with poor visual acuity. Results of full-field electroretinograms were also normal in both cone and rod components. Focal macular electroretinograms were severely affected, however, indicating retinal impairment in the macular region. Results of Y-tilt laser photometry were consistent with electrophysiologic findings. Since the condition

Since the condition was progressive, we believe this disease is a type of hereditary macular dystrophy without visible fundus abnormality.

Patients and Methods

In addition to routine examination, these patients and two family members from two generations of the same family (Fig. 1) underwent fundus photography, fluorescein angiography, autoradiation testing, visual field studies,

American Journal of Ophthalmology, September 1989

オカルト黄斑ジストロフィー原因遺伝子の解明
→「三宅病」と命名

REPORT

Dominant Mutations in RP11 Are Responsible for Occult Macular Dystrophy

Mitsunori Akahori,¹ Kazumichi Shimizu,² Yasu Miyake,² Yoko Fukuda,² Chiyuki Ichimaru,² Shoji Tsukui,² Hiromichi Ueno,² Ietsuhisa Hatake,² Makoto Nishimura,² Hiroo Ohno,² Takashi Babauchi,² Rara Okamoto,² Yoshitaka Takaki,² and Takashi Inatani²

Occult macular dystrophy (OMD) is an inherited macular dystrophy characterized by progressive loss of macular function but normal ophthalmoscopic appearance. Typical OMD is characterized by a central cone dysfunction leading to a focal visual evoked potential abnormality, normal electroretinography, and normal full-field electroretinogram (ERG) for the resolution of the focal macular ERG and modified ERG as compared to the 100-Hz flicker ERG. In this study, we identified the 12b gene for the linkage region. The mutations were found in the first three candidate positions mapped (100, 101, 102). Homozygous mutation in these OMD families and sequencing in a normal control in some of the 9b variants. Immunoblot analysis in the rod and cone photoreceptors supporting a role of RP11. Identification of RP11 mutations as causative in some photoreceptor functions in the cone and the rod.

OMD is an autosomal form of inherited macular dystrophy due to the progressive decrease of visual acuity due to

Akahori, et al. Am. J. Hum. Genet., September 2010

三宅病 (Miyake's disease)

- 1) 両眼性にゆっくりと進行する黄斑部機能の低下 (視力低下、中心比較暗点、羞明)
- 2) 検眼鏡的所見、フルオレセイン蛍光眼底造影は正常
- 3) 全視野網膜電図(ERG)は正常
- 4) 黄斑部局所ERG、多局所ERGにて黄斑部機能の低下を証明
- 5) 常染色体優性遺伝の原因はRP11変異。その他、孤発例の報告も多い。

ハンフリー自動視野計(中心10°)

三宅病 (50才女性、RP11変異あり)

三宅病 (50才女性、RP11変異あり)
矯正視力: 右 0.15、左 1.2

眼底写真

フルオレセイン 蛍光眼底造影

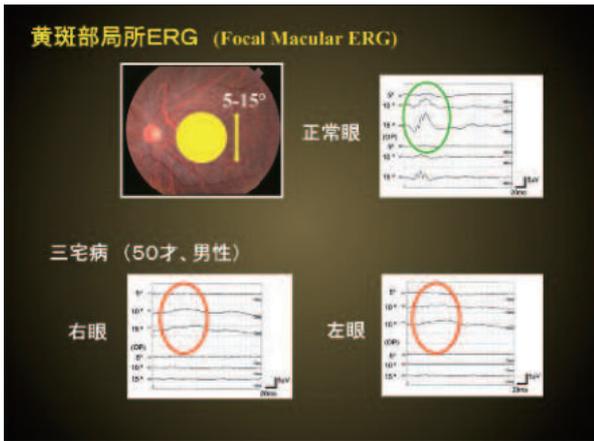
全視野網膜電図 (Full-field ERG)

三宅病 (50才女性、RP11変異あり)

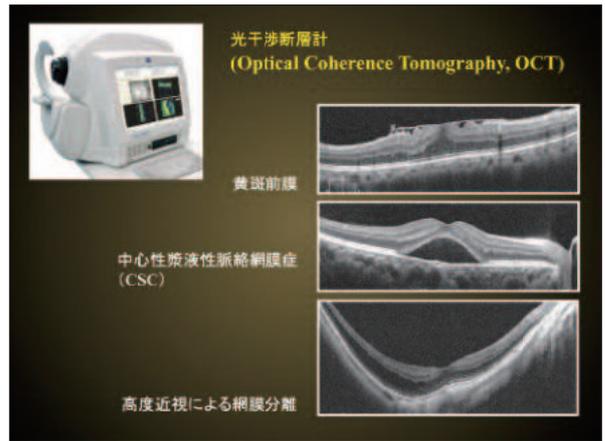
Rod Combined rod-cone Cone 30 Hz-Flicker

多局所網膜電図 (VERIS)

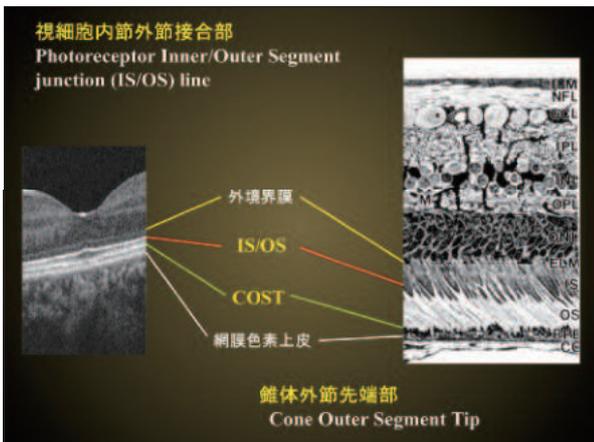
三宅病 (50才女性、RP11変異あり)



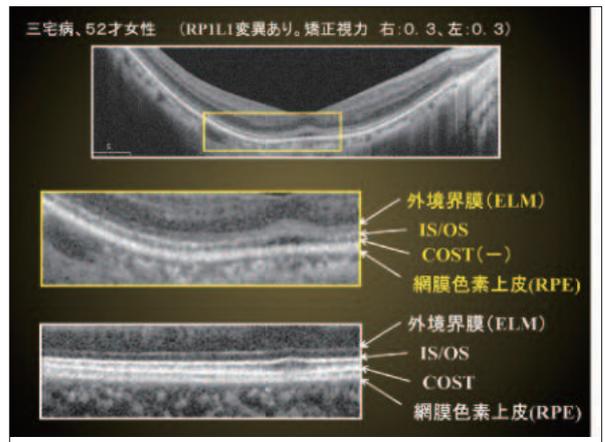
11



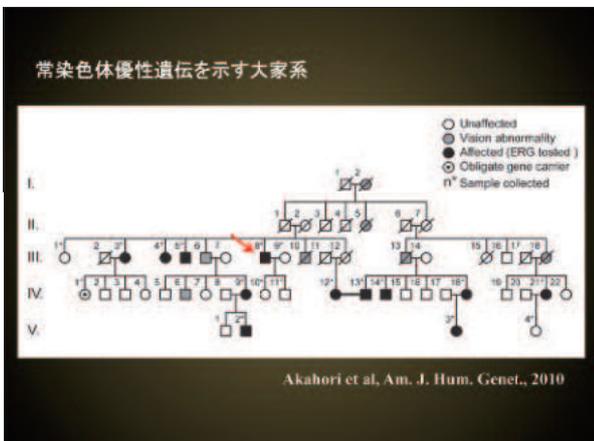
12



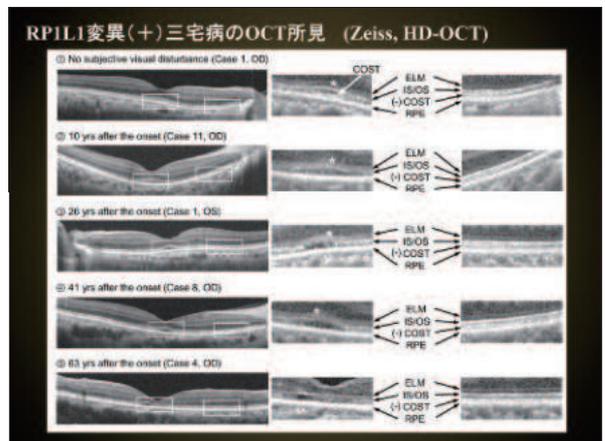
13



14



15



16

RPILI変異(+三宅病)のOCT所見

患者番号	年齢	矯正視力	眼底特徴 (L)	眼底特徴 (R)	黄斑部OCTの反応低下	OCTラインの消失	IS/OCTラインの消失・不明瞭化	IS/OCTラインの消失・消失	Foveal Dipoleの消失	中心窩動脈の硬化・網膜厚(μm)増大
1	45.0	1.0								-0.00
2	45.1	1.2								-0.00
3	45.2	1.2								-0.00
4	45.3	1.0								-0.00
5	45.4	0.8								-0.00
6	45.5	0.8								-0.00
7	45.6	0.8								-0.00
8	45.7	0.8								-0.00
9	45.8	0.8								-0.00
10	45.9	0.8								-0.00
11	46.0	0.8								-0.00
12	46.1	0.8								-0.00
13	46.2	0.8								-0.00
14	46.3	0.8								-0.00
15	46.4	0.8								-0.00
16	46.5	0.8								-0.00
17	46.6	0.8								-0.00
18	46.7	0.8								-0.00
19	46.8	0.8								-0.00
20	46.9	0.8								-0.00
21	47.0	0.8								-0.00
22	47.1	0.8								-0.00
23	47.2	0.8								-0.00
24	47.3	0.8								-0.00
25	47.4	0.8								-0.00
26	47.5	0.8								-0.00
27	47.6	0.8								-0.00
28	47.7	0.8								-0.00
29	47.8	0.8								-0.00
30	47.9	0.8								-0.00
31	48.0	0.8								-0.00
32	48.1	0.8								-0.00
33	48.2	0.8								-0.00
34	48.3	0.8								-0.00
35	48.4	0.8								-0.00
36	48.5	0.8								-0.00
37	48.6	0.8								-0.00
38	48.7	0.8								-0.00
39	48.8	0.8								-0.00
40	48.9	0.8								-0.00
41	49.0	0.8								-0.00
42	49.1	0.8								-0.00
43	49.2	0.8								-0.00
44	49.3	0.8								-0.00
45	49.4	0.8								-0.00
46	49.5	0.8								-0.00
47	49.6	0.8								-0.00
48	49.7	0.8								-0.00
49	49.8	0.8								-0.00
50	49.9	0.8								-0.00
51	50.0	0.8								-0.00
52	50.1	0.8								-0.00
53	50.2	0.8								-0.00
54	50.3	0.8								-0.00
55	50.4	0.8								-0.00
56	50.5	0.8								-0.00
57	50.6	0.8								-0.00
58	50.7	0.8								-0.00
59	50.8	0.8								-0.00
60	50.9	0.8								-0.00
61	51.0	0.8								-0.00
62	51.1	0.8								-0.00
63	51.2	0.8								-0.00
64	51.3	0.8								-0.00
65	51.4	0.8								-0.00
66	51.5	0.8								-0.00
67	51.6	0.8								-0.00
68	51.7	0.8								-0.00
69	51.8	0.8								-0.00
70	51.9	0.8								-0.00
71	52.0	0.8								-0.00
72	52.1	0.8								-0.00
73	52.2	0.8								-0.00
74	52.3	0.8								-0.00
75	52.4	0.8								-0.00
76	52.5	0.8								-0.00
77	52.6	0.8								-0.00
78	52.7	0.8								-0.00
79	52.8	0.8								-0.00
80	52.9	0.8								-0.00
81	53.0	0.8								-0.00
82	53.1	0.8								-0.00
83	53.2	0.8								-0.00
84	53.3	0.8								-0.00
85	53.4	0.8								-0.00
86	53.5	0.8								-0.00
87	53.6	0.8								-0.00
88	53.7	0.8								-0.00
89	53.8	0.8								-0.00
90	53.9	0.8								-0.00
91	54.0	0.8								-0.00
92	54.1	0.8								-0.00
93	54.2	0.8								-0.00
94	54.3	0.8								-0.00
95	54.4	0.8								-0.00
96	54.5	0.8								-0.00
97	54.6	0.8								-0.00
98	54.7	0.8								-0.00
99	54.8	0.8								-0.00
100	54.9	0.8								-0.00

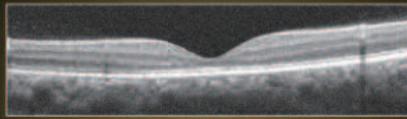
OCT所見をもとにしたRPILI変異(+三宅病)の病期分類

病期	自覚症状	黄斑部ERGの反応低下	中心窩付近のOCT所見				
			COSTラインの消失	IS/OCTラインの消失・不明瞭化	IS/OCTラインの消失・消失	Foveal Dipoleの消失	黄斑部網膜厚(μm)減少
0	-	-	-	-	-	-	-
I	-	+	+	-	-	-	不明
II	+	+	+	+	-	-	~20 20~40 +
III	+	+	+	+	+	+	40~ +

<OCT所見による三宅病の病期分類>

- * RP1L1変異を有する三宅病について、OCTおよびERGの所見をもとに病期分類を試みた。
- * 第0期は未発症の状態である。
- * 第1期は自覚症状がなく、局所ERGおよびCOSTラインの消失によってOMDと診断可能な、発症初期の状態である。
- * 第2期は自覚症状があり、COSTラインの消失に加えて、IS/OSラインの膨潤化が見られる、進行期の状態である。
- * 第3期は中心窩のIS/OSラインが分断、消失して網膜厚が菲薄化する、進行の停止した末期の状態である。
- * 自覚症状が出現する以前から視細胞構造が傷害されていることは、RP1L1が視細胞の構造維持に重要なタンパク質であることによって裏付けられる。

<眼底所見が正常なジストロフィー>

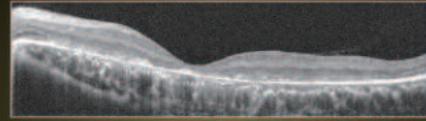


KCNV2 錐体ジストロフィー、15才男性

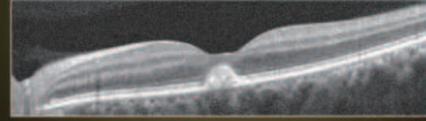


周辺部錐体ジストロフィー、19才男性

<黄斑ジストロフィーのOCT所見>



スターガルト病



BEST病

- * RP1L1変異をもつ三宅病のOCT所見は特異的。他の黄斑ジストロフィーと容易に区別可能。
- * 今後は網膜電気生理学の専門医でなくても、OCTによる三宅病のスクリーニングが可能となるかも知れない。

聴覚研究 他

1. 加齢性難聴動物モデルを用いた DNA メチル化解析

感覚器センター 聴覚・平衡覚研究部 聴覚障害研究室 研究員

務台英樹

65歳以上で3分の1の人が患う加齢性難聴をはじめ、内耳疾患の病態は完全に解明されたとは言い難い。エピジェネティック制御機構は、DNA・ヒストン分子修飾などを介し、長期から永続的な遺伝子発現量調節や細胞の機能維持に強く関わる。エピジェネティック制御機構は老化、生活習慣などの環境因子により影響を受けることが知られる。一方、加齢性難聴は生活習慣が関連することが疫学的に知られている。発表者は、生後発達期の聴覚上皮における DNA メチル化修飾変化について報告してきた(2009 *Develop Neurobiol* 69: 913-930 など)。今回は制御機構の主要な酵素である DNA メチル化酵素の聴覚上皮での発現を確認し、その結果を踏まえ、加齢性難聴モデル動物の聴覚上皮におけるメチル化領域の同定を試みた。

ラット、マウスの聴力が発現期および成熟期の動物より蝸牛凍結切片を作成し、DNA メチル化酵素

Dnmt 3a および 3b の蛍光免疫染色を行なった。生後発達期に Dnmt 3a の発現がコルチ器において一過性上昇し、成熟個体では消失することと、Dnmt 3b が発達期以降、成熟個体コルチ器でも発現維持されることが明らかとなった。Dnmt 3a と 3b の時期特異的発現は、両酵素に固有の役割が存在することを示唆する。

また、過去の報告と聴力維持に重要な遺伝子転写調節領域の塩基配列を参考に、加齢性難聴モデル DBA/2J マウスの聴覚上皮でのメチル化レベルを検討したところ、聴力低下にともない DNA メチル化レベルおよび遺伝子発現レベルが変化する遺伝子領域を複数同定し、これを *DMahl* (differentially methylated in age-related hearing loss) と名付けた。本結果は、DNA メチル化修飾を主要経路とするエピジェネティック制御機構が聴覚発達と聴力維持の双方に関与することを示唆する。

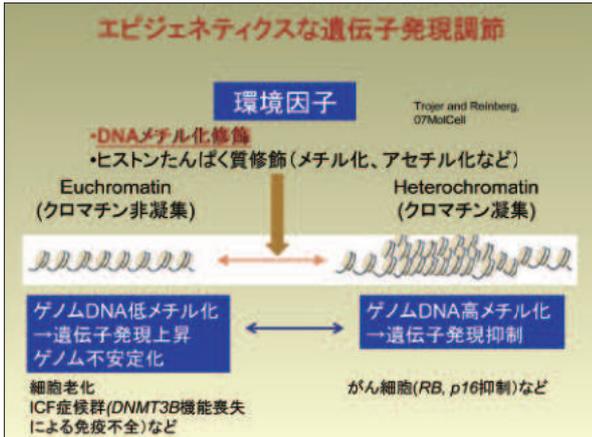
1



2



3

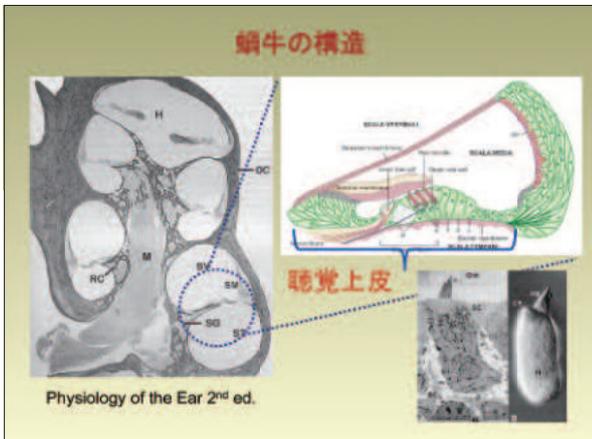


5

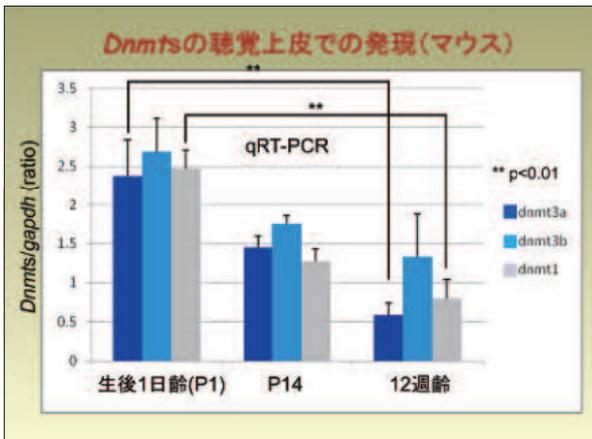
研究課題

- 1 聴覚発達・維持にエピジェネティック制御機構は関連しているのか？
→ DNAメチル化酵素の発現様式の解析
- 2 聴力維持にエピジェネティック制御機構は関連しているのか？
→ 加齢性難聴モデル動物聴覚上皮のメチル化解析

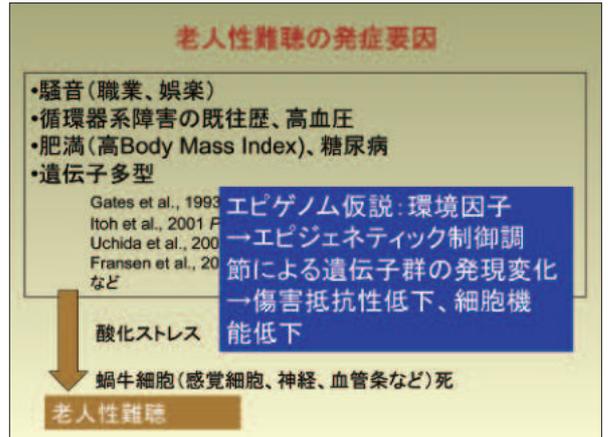
7



9



4



6

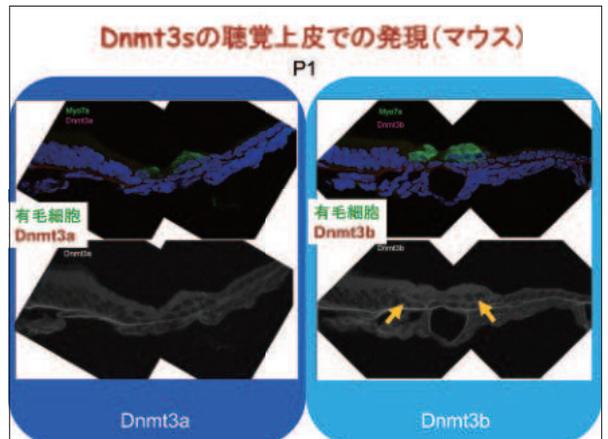


8

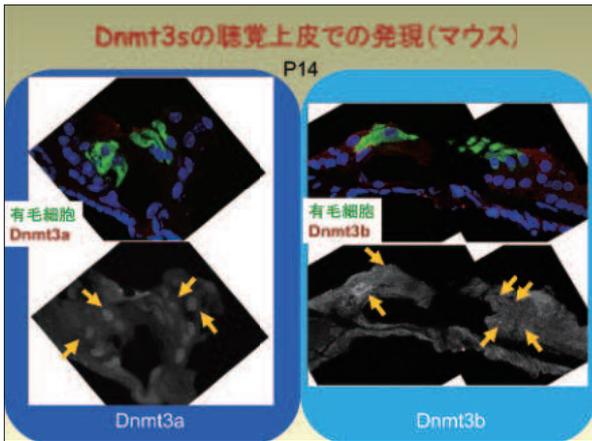
DNAメチル化酵素(Dnmt)について

	Knマウス、疾患との関連	分子(酵素)機能
Dnmt1	胎生致死	メチル化維持
Dnmt2		iRNA(Asp)メチル化
Dnmt3a	離乳期致死、精子形成不全	新規メチル化
Dnmt3b	胎生致死、ICF症候群	新規メチル化
Dnmt3l	不妊、精子形成不全	酵素活性なし

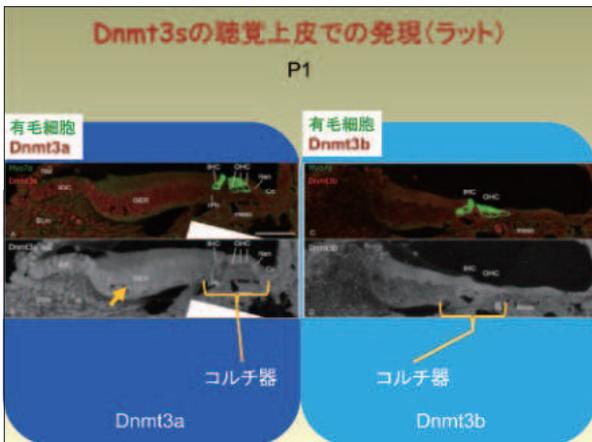
10



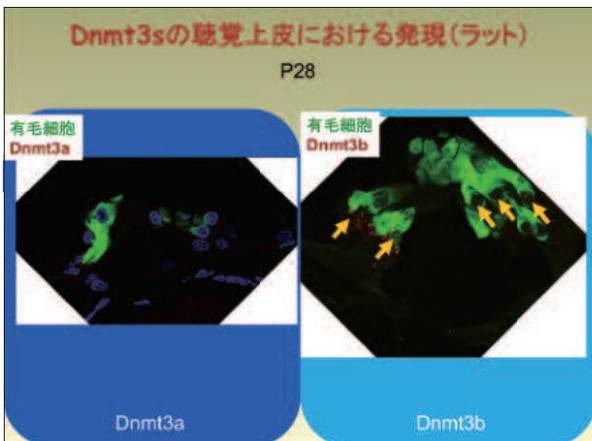
11



13



15

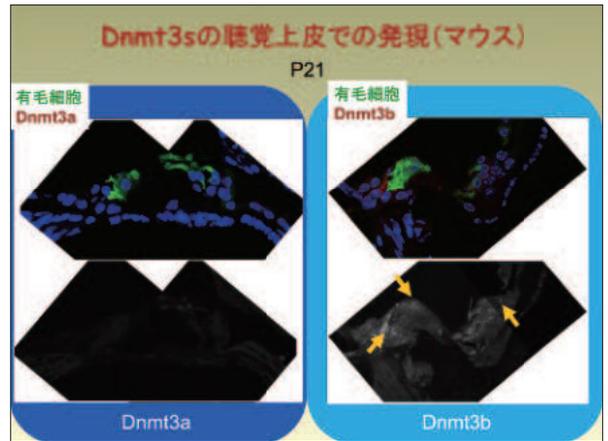


17

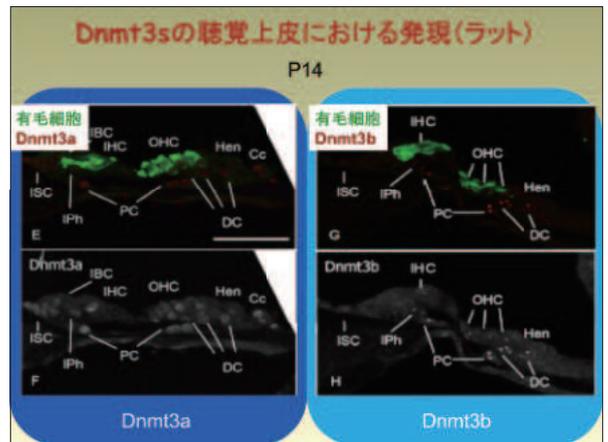
研究課題

- 1 聴覚発達・維持にエピジェネティック制御機構は関連しているのか？
→DNAメチル化酵素の発現様式の解析
- 2 聴力維持にエピジェネティック制御機構は関連しているのか？
→加齢性難聴モデル動物でのメチル化解析

12



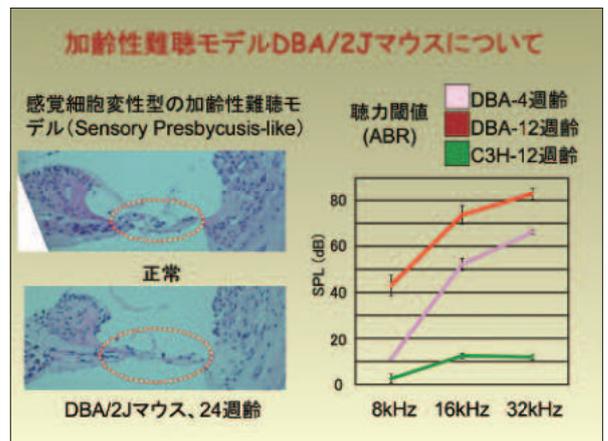
14

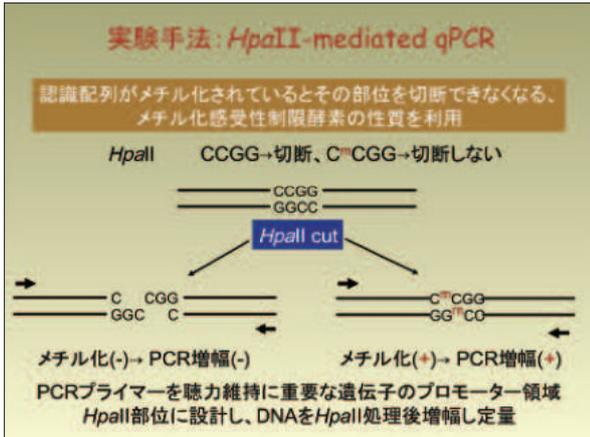


16

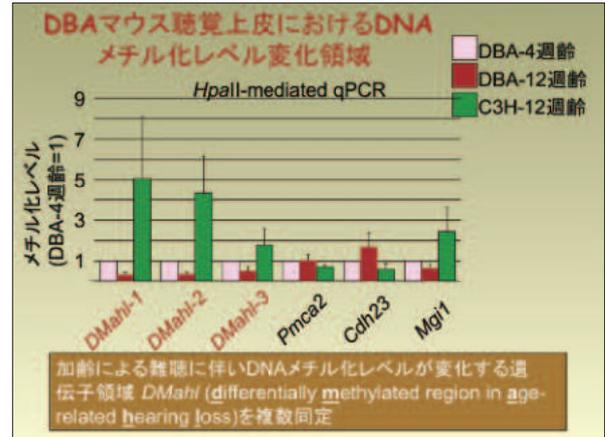


18

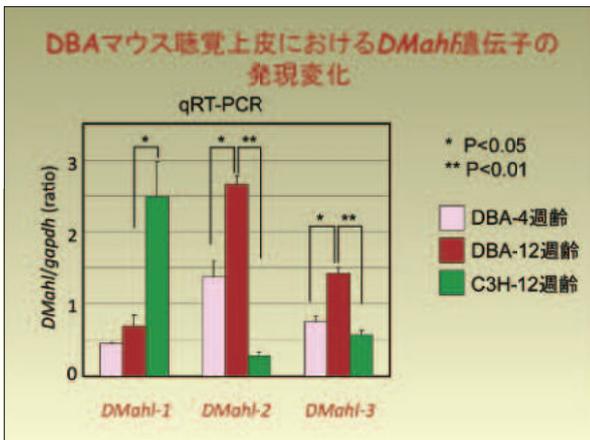




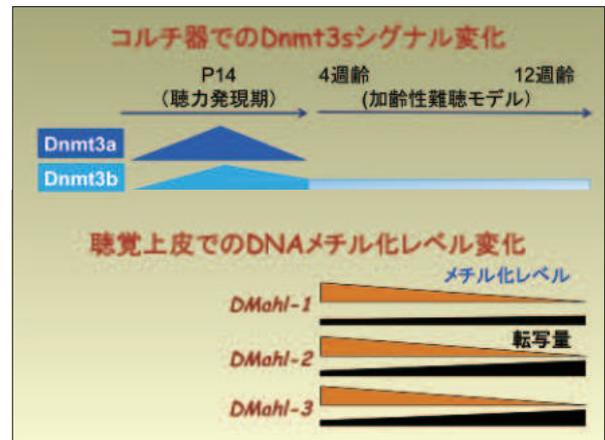
21



22



23



24



25

まとめ

1. DNAメチル化酵素*Dnmt3a*と*Dnmt3b*は発達中・成熟個体の聴覚上皮で、それぞれ固有の機能があると予想された。
2. 加齢性の聴力低下に伴いDNAメチル化および遺伝子発現量に変化する遺伝子領域、*DMahl*が複数個所同定された。
3. エピジェネティック制御機構の聴覚発達・維持に対する関与が示唆された。

謝辞

東京医療センター 聴覚平衡覚研究部の皆様

中川進
松永達雄
藤井正人

聴覚研究 他

2. 難聴関連蛋白質 OPA1 および KCNQ4 の立体構造情報による感音性難聴の究明

感覚器センター 聴覚・平衡覚研究部 聴覚障害研究室 研究員

難波 一徳

【はじめに】

音を脳に伝えるために重要な内耳には、数百の遺伝子産物、つまり蛋白質が働いていると考えられており、一つでも異常があると、難聴になりうる。20種類のアミノ酸は、それぞれ化学構造が異なる。つまり異なるアミノ酸変異により、正常な蛋白質の構造が変化し機能異常が生じる。

OPA1 蛋白質は神経変性疾患および I 型優性遺伝型視神経萎縮症 (Optic Atrophy Type I) の原因として同定されたミトコンドリア内膜の GTPase であり、OPA1 遺伝子産物である。ミトコンドリアは分裂融合により ATP 産生効率を上げるが、OPA1 は融合をコントロールする分子である。本研究室で遺伝子解析により、OPA1 の病的変異 (R445H) が認められた。また、KCNQ4 遺伝子は優性遺伝型 DFNA2 の原因遺伝子であり、蝸牛の有毛細胞が脱分極した後、内リンパより有毛細胞に流入したカリウムイオン (K⁺) を排出させるのに重要なチャンネル蛋白質を形成する。本研究室で病的変異 (Y270H) が見つかっている。本発表では、これら 2 つの難聴遺伝子を例に、蛋白質立体構造の予測モデルを提示し、原子レベルでの点変異による蛋白質の機能障害の機序を解説する。

【方 法】

それぞれの遺伝子の計算機による動力学演算処理により、OPA1 蛋白質および、KCNQ4 チャンネルのそれぞれ正常型と変異型の予測構造モデルを提示し、比較を行った。

【結 果】

予測構造によれば、OPA1 遺伝子の R445H 変異は、全体構造の安定性を低下させ、間接的に GTPase 活性部位の構造のひずみが誘発される。GTPase 活性の低下による OPA1 蛋白質の機能低下は、聴神経内のミトコンドリアの ATP 産生を阻害し、難聴を発症させたと考えられた。

また、KCNQ4 の新規変異 Y270H は、KCNQ4 チャンネルの K⁺ の通り道を形成する構造部位に存在し、異常な静電力により K⁺ の透過を妨げ、難聴の引き起こしたことが示唆された。

【結 語】

この 2 種類の蛋白質における病的な変異の特徴として、それぞれの蛋白質の機能維持に重要な部位に存在し、アミノ酸の静電的性質が変化することにより立体構造に影響し、機能を阻害するということが解明された。

1

第六回感覚器シンポジウム 2011年3月4日

**難聴関連蛋白質OPA1およびKCNQ4の
立体構造情報による感音性難聴の究明**

東京医療センター臨床研究センター
聴覚平衡感覚研究部聴覚障害研究室

難波一徳

2

研究の背景

3

生物の体を構成する細胞は、遺伝子産物である
蛋白質という無数の部品により構築されている

ヒトの全遺伝子(蛋白質) : 約 25,000種類

難聴の原因となるヒトの遺伝子 : **数百種類**

↓

これらの蛋白質が変異を起こす事により蛋白質の
機能不全が生じ、難聴を引き起こすと考えられる

この蛋白質の機能不全を知るためには?

4

蛋白質の立体構造情報

↓

正常な蛋白質と異常な蛋白質の立体構造の比較

↓

その差異が解析される事により機能不全の原因が解る

↓

**構造情報をターゲットに
治療薬分子の設計が可能となる**

5

蛋白質の構造の方法

X線結晶解析 クライオ電子顕微鏡

NMR

6

蛋白質の立体構造の研究とはどのように進められているか

X線結晶解析 NMR クライオ電子顕微鏡

↓ ↓ ↓

蛋白質の精製

↓ ↓ ↓

結晶化 蛋白質のNMR測定
50~100回程 二次元結晶

↓ ↓ ↓

構造情報を計算機で処理し、構造を決定する

一つの蛋白質の構造解析は、平均2.5年かかる
ヒトの膜蛋白質は10年くらい!!

7

現在構造決定されている蛋白質の種類
(Protein Data Bank_2011年3月3日現在)

全生物種 (全登録) 71,516 個

ヒト (全登録) 20,053 個

構造解析されているヒト蛋白質のほとんどが可溶性蛋白質

構造解析されたヒト膜蛋白質: **たった12個**

ヒトの膜蛋白質は30% (約7000個)と見積もられている

**薬のターゲットになりやすいのは膜蛋白質しかし
膜蛋白質の構造解析はとても難しい**

8

構造解析をせずに計算機を使って
目的蛋白質のモデリングをすることが可能

既に決定している類似蛋白質の
鑄型となる構造が必要である

↓

アミノ酸配列が30%以上のホモロジーが必要となる

コンピューターにより予測した蛋白質構造なので、
実験による証明が必要

難聴遺伝子で構造解析されている蛋白質(全10種類)

本研究室で担当している難聴関連蛋白質

m brain tubby protein	Oct and Sox2	Cx26, Cx30, Cx30.1, Cx30.3
USH1_C.G		Cx31.1, TECTA, WFS1-DFNA6, COL4A5,
h Thyroid hormone receptor		OTOF, COCH, OPA1
h phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1		SLC26A4, EYA1, TMPRESS3, KCNQ4,
Protein tyrosine phosphatase (PTPN11)	NOG	CDH23, MITF, NOG,
CDH23		DFNA5, GJA1, Pejvakin, EDN3,
Cx26	Otoferlin C2a	EDNRB, Sox10, MYO7A, COL11A2,

候群性難聴遺伝子の例

Optic Atrophy type 1 (OPA1)

OPA1[Optic Atrophy Type1]蛋白質

- 1) Dynaminファミリー[GTPase]の一遺伝子である
- 2) 神経変性疾患・I型優性視神経萎縮症の原因遺伝子として同定された
- 3) ミトコンドリア内膜の電位依存的に、ミトコンドリアの融合に重要な役割をする

ミトコンドリアは分裂・融合を行い、その品質を管理している。この分裂・融合が行われないとATP生産効率が低下する。

OPA1

ミトコンドリアの融合をコントロールする遺伝子がOPA1である

本研究室で見つかったOPA1変異の一つ (R445H)

Mizutani et al, 2010, J Neurol Sci

歪成分耳音響放射 外有毛細胞は正常

聴性脳幹反応聴力検査 脳に信号が行かない

研究手順

- 1) OPA1は、既知の立体構造がない為、アミノ酸配列から予測構造のモデリングを行う必要があった。
- 2) R445H領域を含むOPA1の領域と既知構造とのアミノ酸配列のホモロジーサーチ(PDB Sum)を行った。
- 3) その結果、既に結晶構造が決定されているRat Dynaminが、最適な鋳型蛋白質として候補に挙げられた。
- 4) 高い構造ホモロジーを示した領域(つまり、GTPase触媒領域)のみで、計算プログラムによる分子モデリングを行った。
- 5) 得られた正常OPA1とR445H変異型の構造の比較を行った。

OPA1の変異とその立体構造について

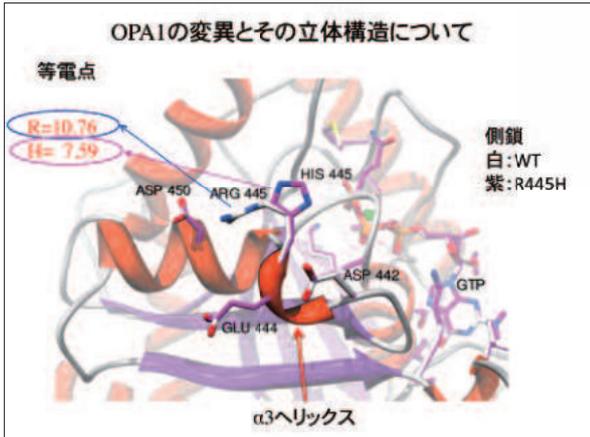
アミノ酸配列のホモロジーが高い蛋白質(既知構造)を選択

OPA1	Sequence	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	420	440	460	480	500
Rat.GTPase	Sequence	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	420	440	460	480	500
G. dyssymbium	Sequence	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	420	440	460	480	500

Rat Dynamin1のX線結晶構造のアミノ酸配列32%相同性あり
これを鋳型として、OPA1の構造をコンピュータにより計算

OPA1 wild typeとR445H変異体の構造重ね合わせ

シアン=wild type
マゼンダ=R445H

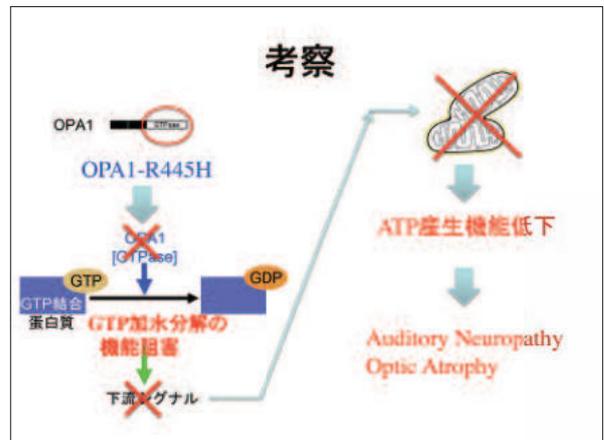
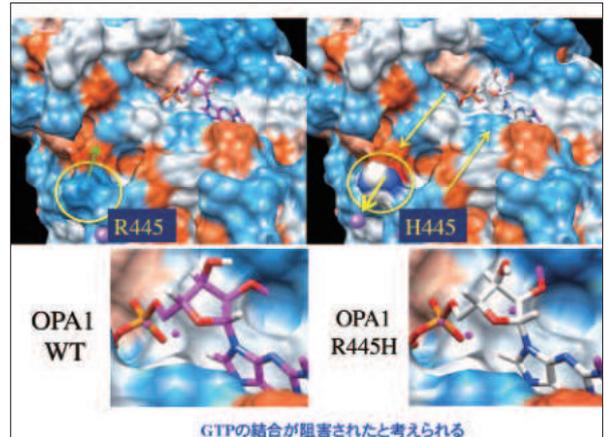
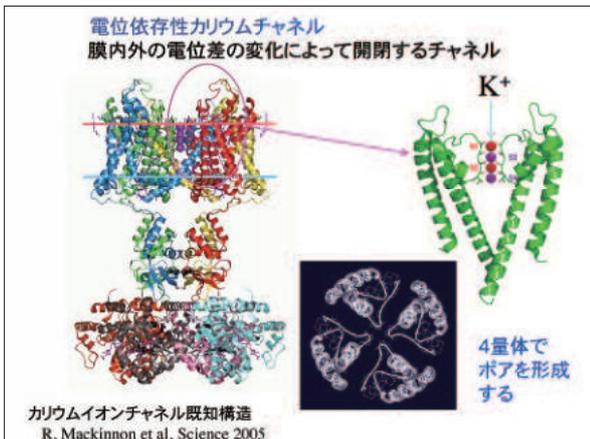


結果

- 1) OPA1のアルギニン445がヒスチジンに変異されることにより、その部分の電気的チャージの変化が生じた。
- 2) R445部位の静電的チャージが変化することにより、GTPの結合機能が変化したと考えられた。
- 3) その結果、OPA1のGTPase活性の低下が生じたことが示唆された。

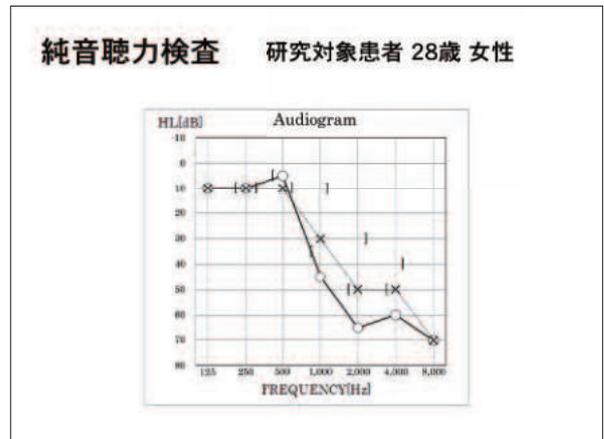
非症候群性難聴の例

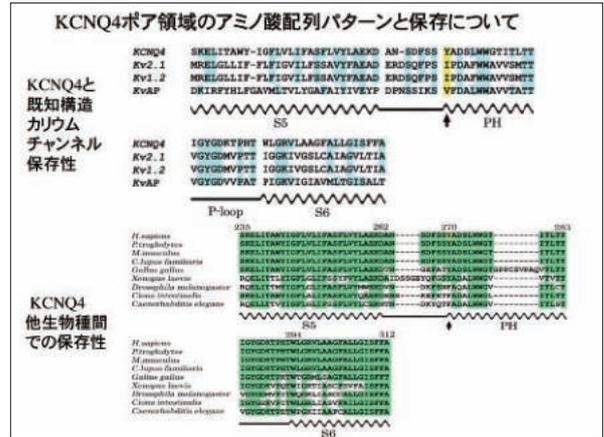
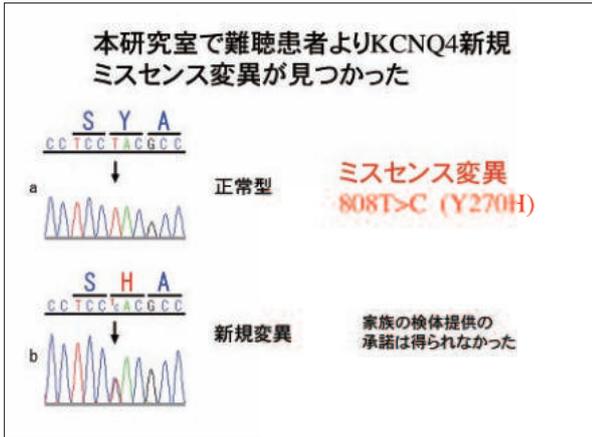
膜電位依存性カリウムチャンネル
(KCNQ4)



KCNQ4とは

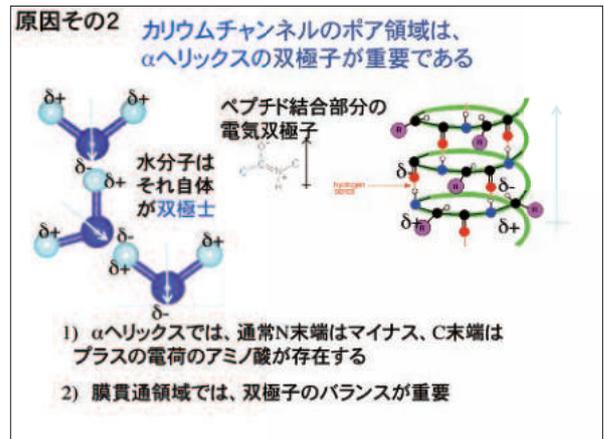
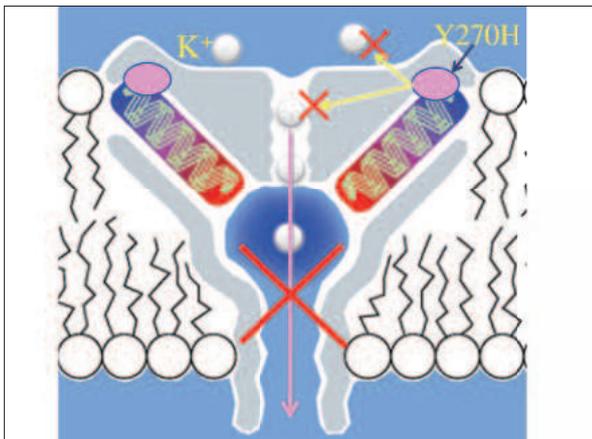
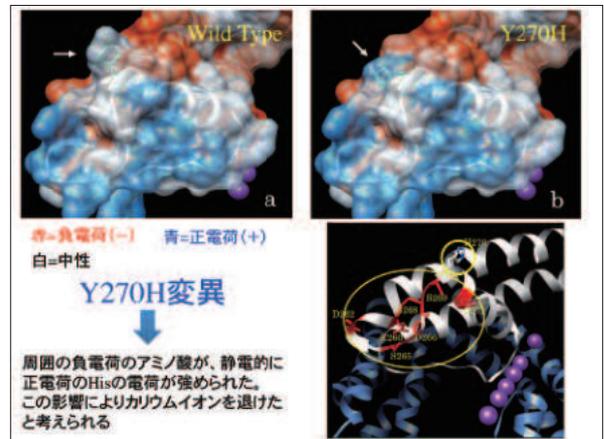
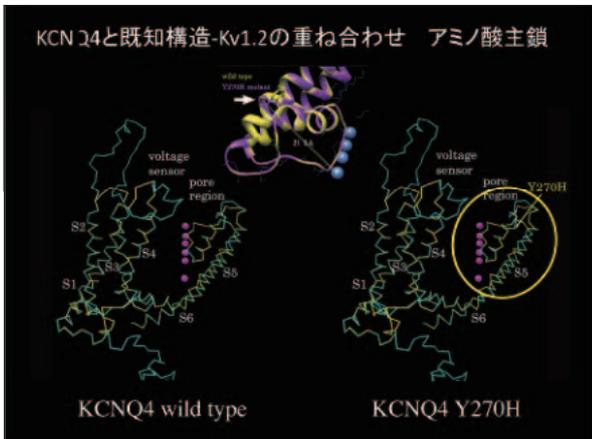
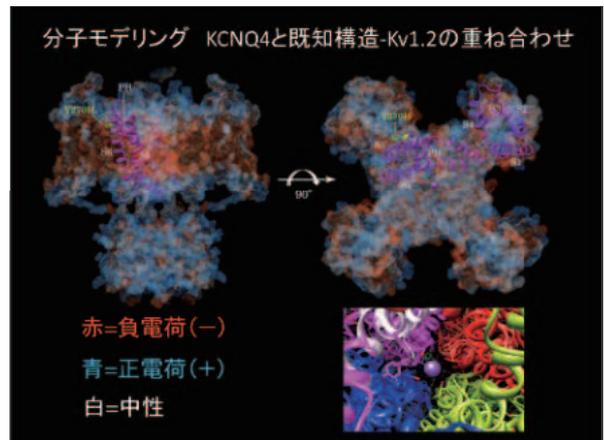
1. 優性遺伝型DFNA2の原因遺伝子である
2. その遺伝子産物は4量体を形成し、一つの機能単位としてのカリウムチャンネルを形成する
3. 特に内毛細胞に局在することから、内毛細胞に流入したカリウムイオン(K⁺)を排出するのに重要と考えられている

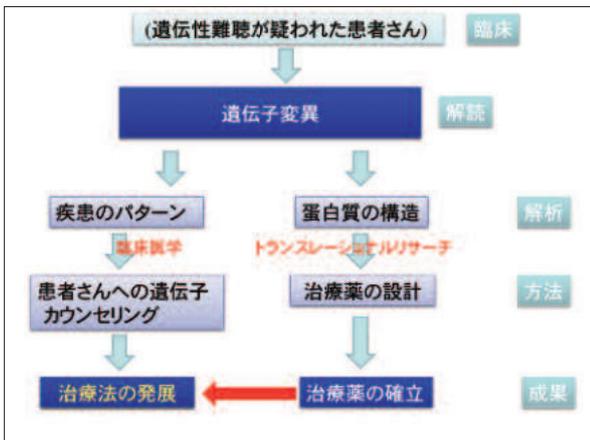
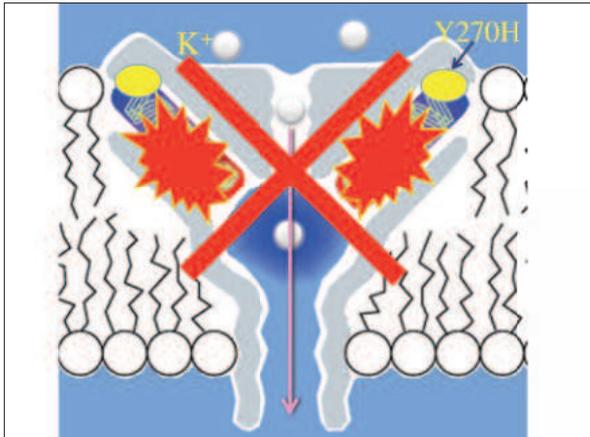




研究手順

- 1) KCNQ4は、既知の立体構造がないので、アミノ酸配列から予測構造のモデリングを行う必要があった。
- 2) Y270領域を含むKCNQ4の領域と既知構造とのアミノ酸配列のホモロジーサーチ(PDB Sum)を行った。
- 3) その結果、既に結晶構造が決定されているカリウムチャンネル(Kv1.2-2.1)が、最適の鋳型蛋白質として候補に挙げられた。
- 4) 高いホモロジーを示した領域(つまり、KCNQ4ポア領域)のみで、計算プログラムによる分子モデリングを行った。
- 5) 得られた正常KCNQ4とY270H変異KCNQ4の構造の比較を行った。





結果

- 1, Y270Hにより、 α ヘリックスの双極性が破壊され、その結果、ポア領域の構造が破壊された可能性が考えられる
- 2, Y270Hの静電的变化によりカリウムイオンの流入が妨げられたと考えられる

謝辞

東京医療センター感覚器センター

加我君孝

聴覚平衡覚研究部

藤井正人

松永達雄

日本大学文理学部生命物理学科

金子寛生

聴覚研究 他

3. Musical and linguistic influence on peripheral auditory lateralization of medial olivocochlear efferent system activity: preliminary results in Japanese musicians and non-musicians.

感覚器センター 政策医療企画研究部¹⁾ 研究員／リヨン大学 フランス²⁾

Perrot Xavier¹⁾²⁾ 加我君孝¹⁾

*National Institute of Sensory Organs & Tokyo Medical Center-NHO, Tokyo – JAPAN
Lyon 1 University & Lyon Neuroscience Research Center, Lyon – FRANCE*

In the organ of Corti, active cochlear micro-mechanisms, originating in somatic electromotility of outer hair cells, contribute to the auditory sensitivity and the frequency selectivity of the normal inner ear. Besides, these active mechanisms generate acoustic vibrations as a by-product, called otoacoustic emissions (OAEs), and are inhibited by the medial olivocochlear efferent system (MOCES), a central neural pathway originating in the brainstem and projecting directly onto the cochlea.

In humans, the modulatory activity of the MOCES can be non-invasively assessed by means of the contralateral attenuation of OAEs: a noise applied to one ear activates the efferent system and leads in turn to a decrease in amplitude of OAEs recorded in the other ear. Using this acoustico-neurophysiological procedure, previous experiments carrying out in France showed:

- (i) a right-ear predominance of efferent system activity in normal hearing right-handers, representing a peripheral auditory lateralization of MOCES;
- (ii) a stronger efferent system activity in both ears of professional musicians, potentially related to musical training and brain plasticity phenomena, through an increased in corticofugal modulation of MOCES by auditory

cortex.

In addition, some findings have suggested cultural and linguistic influences on auditory perception. Notably, Japanese subjects, due to peculiarities of their written and oral languages, may have a different brain organization for auditory processing than Western subjects.

However, to date, issues about cross-cultural / cross-linguistic differences of hearing and music experience-dependent plasticity have scarcely ever been assessed.

From this perspective, we have designed an experimental study in order to assess MOCES activity and lateralization in Japanese musicians and non-musicians.

The two main objectives of our study were:

- (i) to evaluate musical training influence on peripheral auditory system functioning, through comparison between Japanese musicians and non-musicians;
- (ii) to test for cross-cultural / cross-linguistic differences, through comparison between Japanese subjects and previous findings in French musicians and non-musicians.

We have assessed contralateral attenuation of OAEs bilaterally, in Japanese professional classical musicians (consisting of three subgroups of string players, flutists and pianists) and in Japanese non-musicians (consisting of two

groups of former amateur musicians and true non-musicians).

Preliminary analysis suggests an influence of musical training as well as cultural/linguistic factors on peripheral auditory lateralization of efferent system activity, potentially related to difference in brain auditory organization.

This research has been carried out in the research lab-

oratory of Pr KAGA Kimitaka (National Institute of Sensory Organs & Tokyo Medical Center), within the framework of the Postdoctoral Fellowship Program for Foreign Researchers of the Japan Society for the Promotion of Science.

Financial support has been provided by a Grant-in-Aid for Scientific Research from JSPS and by a Scholarship for International Researcher from the Society for Promotion of International Oto-Rhino-Laryngology.

聴覚研究 他

4. 口腔乾燥の客観的評価法

感覚器センター 人工臓器・機器開発研究部 研究員／社会保険中央総合病院

石 本 晋 一

食するときには人は目で楽しみ、においで楽しむ。そして口に入れた後は触感や味覚で味わう。そのため口腔の役割は単純に物を食するだけでなく味覚や触感などを感じ、食を楽しむために非常に重要である。その味覚や舌の触感などが正常に機能するためには常に口腔粘膜や舌の表面が湿潤されている必要がある。

最近、口腔乾燥を訴える患者が増加している。その原因は加齢による唾液腺の萎縮、薬物による副作用などで唾液分泌低下をきたすばかりでなく、鼻副鼻腔疾患や睡眠時無呼吸症による口呼吸、さらには食生活の変化などさまざまな要因が挙げられる。そして口腔内の乾燥状態が長く続くと口腔粘膜の萎縮が起り、口腔粘膜疾患を発症する可能性がある。さらに口腔内の乾燥は、口腔・咽頭の異物感、知覚過敏、疼痛、嚥下障害、味覚異常、構音障害の原因となるばかりでなく口腔内から咽頭、喉頭、気管にわたる上気道の感染症を誘発することが知られている。

いままで口腔粘膜の水分量を測定するには間接的に咀嚼時の唾液量を測定する方法がとられてきた。しかしながら口腔内の状態は口呼吸や鼻閉などの状態も関係するため単純に唾液量だけで評価することは難しい。また口腔乾燥は安静時の口腔粘膜の水分量によるため安静時の口腔粘膜の水分量を正確に評価する必要がある。

われわれは皮膚湿度計の改良型である口腔水分計 Mucus (株ライフ) の開発に一部たずさわった。その水分計は口腔や舌粘膜に含まれる水分量に依存する静電容量を計測するものである。そして測定した静電容量を数値化して表示する機器で、客観的に水分量を測定する機器である。この機器を用いて動物実験を行い機器の有用性を検証し、臨床応用して健康人、唾液分泌低下のあるシェーグレン症候群患者を対象に口腔内の粘膜の水分量を測定して検討したので報告する。

口腔乾燥の客観的な評価法 口腔水分計

感覚器センター人工臓器開発部門研究生
社会保険中央総合病院耳鼻咽喉科
石本晋一

平成27年11月4日・第6回口腔乾燥症シンポジウム

口腔乾燥症とは？

- 唾液分泌低下
- 過剰な口腔粘膜水分の蒸発により**口腔内の乾燥**が生じること。

様々な疾患・薬の副作用などで生じてQOLが低下するため最近注目されてきている。
原因が検索され治療薬が開発・発売されている。
(サラジェン・エボザックなど)

平成27年11月4日・第6回口腔乾燥症シンポジウム

口腔乾燥を訴える患者の増加

現在800万人(3000万人)ともいわれている。

高齢者
27.7%は常に口腔乾燥感を自覚。軽度も自覚者を含めると56.7%

65歳未満の若年層
常時乾燥感自覚者が10.5%。軽度を含めると35.1%

年代(人数)	口呼吸乾燥 (%)	軽々・少し乾燥 (%)
全群(1418)	18.6	38.1
65歳未満	13.3	21.7
65歳以上	23.8	34.4

平成13年度の厚生労働省・長寿科学総合研究事業

平成27年11月4日・第6回口腔乾燥症シンポジウム

口腔乾燥症の症状とは？

- 口の中がネバネバする
- 口の中が乾燥する
- 水分がないと食べ物を飲み込めない
- 会話が行にくい
- 舌が乾いて痛む(ヒリヒリする)
- 菌周病が進み、虫歯がよくできる
- 乾いた食品が噛みにくい
- 口臭が強くなった
- 味が分かりにくい

平成27年11月4日・第6回口腔乾燥症シンポジウム

唾液の分泌

1日唾液分泌量: 1-1.5ℓ
唾液分泌速度(正常): 10ml/10分以上

①各唾液腺における分泌

1) 安静時唾液
顎下腺=65%、耳下腺=23%、舌下腺=4%、小唾液腺=8%

2) 刺激唾液
耳下腺の分泌量が増大し、50%以上になる。

②分泌量の神経支配
交感神経、副交感神経の二重支配を受ける。

平成27年11月4日・第6回口腔乾燥症シンポジウム

口腔乾燥症の原因

・加齢・薬の副作用・様々な疾患が誘引

・口腔乾燥が誘因になる疾患

- 誤嚥性肺炎
- 上気道感染
- 味覚障害

平成27年11月4日・第6回口腔乾燥症シンポジウム

現在の検査法

- 口腔内の視診
- 唾液量の測定
- 刺激時の唾液検査法
 - ガムテスト
10分間ガムを噛んで唾液の分泌量を測定する。(10ml/10分>)
 - Saxon test
ガーゼを口腔内に入れ2分間、120回咀嚼後ガーゼの重量測定。(2g2分>)
- 安静時の唾液検査法
 - 試験紙方法(改良型shirmerテスト、小唾液腺試験紙)

その他: 耳下腺シンチ^{99m}TC、アンケート(自覚的)など

平成27年11月4日・第6回口腔乾燥症シンポジウム

視診

- 粘調な唾液
- 泡沫状の唾液
- 乾燥した舌

0度(正常): 乾燥なし(1~3度の所見がなく、正常範囲と思われる)
1度(軽度): 唾液の粘性が見られる。
2度(中程度): 唾液中の小さい唾液の泡が舌の上に見られる。
3度(重度): 舌粘膜が乾燥している。(ほとんど唾液が認められない)

平成27年11月4日・第6回口腔乾燥症シンポジウム

口腔水分計の開発

- 従来の検査法では口腔内の保湿(水分)の状態を直接的に検査しているわけではない。水分量に関与する唾液量、唾液分泌量を測定している。
- ↓ ↓
- 唾液量の低下がなくても鼻閉や口呼吸で口腔粘膜の水分量は低下していることがある。
- 口腔内の粘膜の湿度状態を直接的・客観的に測定する必要がある。
- 非侵襲的で簡単に測定できる機器が必要である。

平成23年3月4日・第68回感電研シンポジウム

口腔水分計Mucusとその開発



株式会社 ライフ

平成23年3月4日・第68回感電研シンポジウム

測定方法



舌の測定法

頬粘膜の測定法

口唇の測定法

口腔水分計の利点

- 口腔粘膜表面の水分を測定しているわけではない
→ 水分摂取や舐めたことによる影響がでにくい
- 電流が流れない
→ 痛みが無い
ペースメーカー患者にも使用可
- 持ち運びが簡便
→ ベットサイドでも測定可能
- 短時間に測定できる(2-5秒)
→ 患者への負担が少ない

平成23年3月4日・第68回感電研シンポジウム

MucusⅢの開発

- 従来の口腔水分計(Mucus)の改良(2段階にわたって改良)
↓ ↓
- 機器としての有効性(埼玉医大、東京電気大学)
- 動物実験による有効性の検証
- さまざまな口腔乾燥を訴える疾患での検討
- 新しい口腔水分計(MucusⅢ)での基準値の決定(科学的に信頼の於る)
↓ ↓
- 医療機器としての申請(平成22年6月認可済)

平成23年3月4日・第68回感電研シンポジウム

【口腔水分計の測定原理】

粘膜上皮に含まれる水分を静電容量として計測するセンサーを用いて口腔粘膜の水分量を評価するものです。使用時は、感染予防の観点から先端部のセンサーを専用のセンサーカバーで覆った状態で測定します。

口腔内の水分量を測定するため、コンデンサーの原理を応用しました。
口腔内粘膜の水分量は次の式で計算できます。

$$C = \frac{\epsilon (\text{Epsilon}) \times S}{d} \quad (\text{F})$$

C = 静電容量
ε = 誘電率
S = センサー表面の大きさ(一定)
d = 電極間の距離(一定)



「S値」と「d値」は一定なので、「C値」は「ε値」によって決まります。センサーを舌や粘膜にあてたとき、「ε値」は水分量によって変化し、一般に水分量が多いほど「ε値」が「C値」は大きく、少なれば小さくなります。

平成23年3月4日・第68回感電研シンポジウム

口腔水分計(従来のMucus)

従来の口腔水分計(肌水分計改良)

⇒ 使用してみると

- 数値が安定しない。
- 従来の基準値はあてにならない。

⇒ しかし改良すれば

口腔乾燥症の診断には有用な機器である。

正常	30~
境界	29~30
やや乾燥	27~29
中程度乾燥	25~27
高度乾燥	25~

株式会社

平成23年3月4日・第68回感電研シンポジウム

口腔水分計(MucusⅢ)の評価

- 動物実験
- 健常人に用いた際の臨床的な評価
- 病的な疾患での臨床的な評価
- 疾患の治療効果の判定の評価

平成23年3月4日・第68回感電研シンポジウム

健常人に用いた際の臨床的な評価

- 社会保険中央総合病院の倫理委員会で認可を受けて職員・学生・患者でボランティアを募り以下の3点に関して検索した。
 - I アンケート(VASを一部変更したもの)
 - II 口腔水分計(頬部、舌、口唇)
 - III シルマーテスト(舌)

アンケート&既往歴

- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 1. 口の中が乾く。カラカラする | 1: ない | 2: 時々 | 3: 時々 | 4: 時々 | 5: 時々 | 6: 時々 | 7: 時々 | 8: 時々 | 9: 時々 | 10: 時々 | 11: 時々 | 12: 時々 | 13: 時々 | 14: 時々 | 15: 時々 | 16: 時々 | 17: 時々 | 18: 時々 | 19: 時々 | 20: 時々 | 21: 時々 | 22: 時々 | 23: 時々 | 24: 時々 | 25: 時々 | 26: 時々 | 27: 時々 | 28: 時々 | 29: 時々 | 30: 時々 | 31: 時々 | 32: 時々 | 33: 時々 | 34: 時々 | 35: 時々 | 36: 時々 | 37: 時々 | 38: 時々 | 39: 時々 | 40: 時々 | 41: 時々 | 42: 時々 | 43: 時々 | 44: 時々 | 45: 時々 | 46: 時々 | 47: 時々 | 48: 時々 | 49: 時々 | 50: 時々 | 51: 時々 | 52: 時々 | 53: 時々 | 54: 時々 | 55: 時々 | 56: 時々 | 57: 時々 | 58: 時々 | 59: 時々 | 60: 時々 | 61: 時々 | 62: 時々 | 63: 時々 | 64: 時々 | 65: 時々 | 66: 時々 | 67: 時々 | 68: 時々 | 69: 時々 | 70: 時々 | 71: 時々 | 72: 時々 | 73: 時々 | 74: 時々 | 75: 時々 | 76: 時々 | 77: 時々 | 78: 時々 | 79: 時々 | 80: 時々 | 81: 時々 | 82: 時々 | 83: 時々 | 84: 時々 | 85: 時々 | 86: 時々 | 87: 時々 | 88: 時々 | 89: 時々 | 90: 時々 | 91: 時々 | 92: 時々 | 93: 時々 | 94: 時々 | 95: 時々 | 96: 時々 | 97: 時々 | 98: 時々 | 99: 時々 | 100: 時々 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|

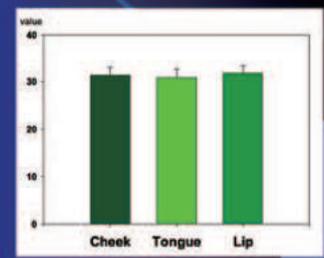
- 1: 既往症(糖尿病、高血圧、喘息、膠原病など)
- 2: 耳鼻咽喉科疾患の有無 (慢性鼻炎、アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎など)
- 3: 睡眠時無呼吸の有無
- 4: いびきの有無
- 5: 喫煙歴:
- 6: 飲酒歴
- 7: 常用薬の有無: ある なし 商品名:
- 8: 虫歯・義歯の有無: 1: あり 2: なし

臨床的な評価

- 対象: 165名(18~73歳: 平均32.9±14.7歳)
(男性: 女性=33: 132)
- 施行検査
 - 1) アンケート
点数化して平均(2.0<)以上の症例は除外
 - 2) 口腔水分計(頬粘膜、舌、口唇)
頬粘膜、舌、口唇を5回測定して平均を検索
 - 3) シルマーテスト

口腔水分計の結果

- 1) アンケートのスコア
1.4±0.3
(Mean±SD)
- 2) 口腔水分計
頬部: 31.3±1.7
舌: 30.9±1.8
口唇: 31.8±1.6
- 3) シルマーテスト
3.3±2.1mm
(Mean±SD)



健常人用いた際の臨床的な評価

- 健常人で頬粘膜、舌、口唇の3点において Mucus III で測定して安定した測定結果を得られた。
- 健常人では頬粘膜、舌、口唇の3点でほぼ同様な結果(数値)を得られた。
- 健常人でアンケートの結果も安定した結果を得られた。

病的な疾患での臨床的な評価

- シェーグレン症候群症例の検討
(東京医療センター膠原病内科と共同研究)
- 対象はシェーグレン症候群に罹患の17症例
 - 1: 口腔乾燥が強い症例(アンケート>2)
 - 2: SSA/SSB(+), ガムテスト(10ml/10分<)
 - 3: 耳下腺シンチで唾液の明らかな低下
 - 4: 小唾液腺の病理標本でリンパ球の浸潤(+)
 - 5: 内服・外用薬での治療(-)

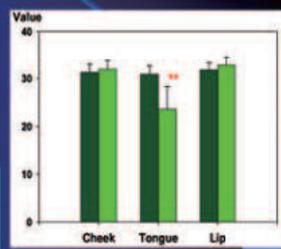
シェーグレン症候群症例の検討

アンケート

SJS症例	2.8±0.2
健常人	1.4±0.3

Mucus III

	頬粘膜	舌	口唇
SJS症例	32.0±1.8	23.6±4.7	32.9±1.7
健常人	31.7±1.7	30.9±1.8	31.8±1.6



** p<0.001

考察

- SJSの症例で口腔水分計を用いて頬粘膜、舌、口唇の水分量を検証したところ舌のみ有意な低下が認められた。
- ↓ ↓
- 粘膜下の小唾液腺の影響も無視できない。
- 水分計による口腔内の水分量の検証には舌が適当である。
(その後他施設でも同様な結果)

疾患の治療効果の判定の評価

- 口腔乾燥を主訴に受診した症例での検討
 - 1: 内服薬の治療効果
 - 2: 外用薬 & 内服薬の治療効果
- アンケート & Mucus III での治療効果の検証

平成29年10月4日・第66回感愛研シンポジウム

口腔乾燥症の処置

- ① 水分補給
- ② 薬剤の副作用の除去・軽減
- ③ 唾液分泌を改善する薬剤の使用
- ④ 人工唾液
- ⑤ 生活習慣や体質の改善
- ⑥ 口呼吸への対応

平成29年10月4日・第66回感愛研シンポジウム

治療薬

- サラジェン (M受容体作動薬)
- エポザック (M受容体作動薬)
- サリグレン (M受容体作動薬)
- パロチン (唾液腺ホルモン)
- 漢方薬: 白虎加人参湯・麦門冬湯など
- 他 (セファランチンなど)

平成29年10月4日・第66回感愛研シンポジウム

治療薬Ⅱ (外用薬)



人工唾液



ヒアルロン酸・グリセリン含有

平成29年10月4日・第66回感愛研シンポジウム

症例 1: 70才 女性

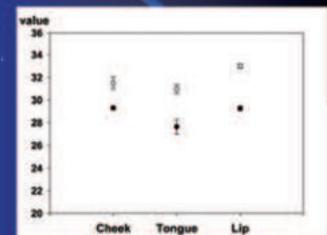
- 主訴: 1) 口が渴いで食物がのどにへばりつく。
2) 味覚がしなくて食欲がわからない。
- 現病歴: 7年前から口腔乾燥感、体重10kg↓
- 既往歴: 高血圧 逆流性食道炎
- 局所所見: 口腔内乾燥 義歯あり
- 治療: パロチン内服

平成29年10月4日・第66回感愛研シンポジウム

症例1の治療前後の評価

パロチン6錠/3で2ヶ月
治療唾液分泌が亢進
食事が取れるようになった。
(BW 4kg↑)

- アンケート点数
- 治療前: 平均2.3
- 治療後: 平均1.3



平成29年10月4日・第66回感愛研シンポジウム

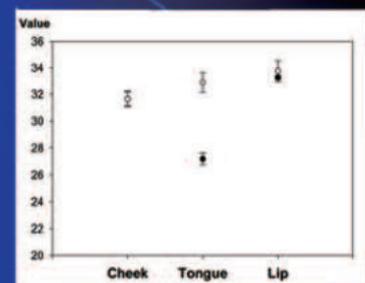
症例 2: 84歳 女性

- 主訴: 口腔乾燥
- 現病歴: 1年半前から口腔乾燥
- 既往: 16年前ネフローゼ症候群
鼻炎で抗ヒ剤 (アレロック) 内服中
- 嗜好: 喫煙歴なし
- 局所所見: 口腔乾燥 義歯あり
- 治療: パロチン内服 サリベート口腔内散布

平成29年10月4日・第66回感愛研シンポジウム

症例2の治療前後の評価

- アンケート点数
- 治療前: 平均2.1
- 治療後: 平均1.5



平成29年10月4日・第66回感愛研シンポジウム

考 察

2症例で口腔乾燥症に対する治療前後にアンケートと口腔水分計Mucus IIIによる計測を実施した結果、自覚的および計測値共に改善した。

→口腔水分計Mucus IIIは口腔乾燥症に対する治療の他覚的評価法として有用である。
→VASに基づいたアンケートも有効であった。

平成27年10月4日：第6回感覚器シンポジウム

Mucusの留意点

- 舌苔が付着している症例では正確に測定できないことがある。
- 専用のセンサーカバーを使用しないと正確に測定できない。
- 機器が暑いところ、寒いところでは暫く測定値が安定しないことがある。
- センサーを舌に当てる角度で測定値が安定しないことがある。

平成27年10月4日：第6回感覚器シンポジウム

医療機器としての水分計 (Mucus)

- 平成22年6月に医療機器として認可。
- 埼玉医大(歯科口腔外科)を中心とした治験
- 10月から販売。



測定：舌表面で測定する。
3回の平均値で評価
基準値：

レベル	数値
正常	30.0以上
乾燥傾向	29-29.9
軽度乾燥	27-28.9
中等度乾燥	25-27.9
重症	24.9以下

平成27年10月4日：第6回感覚器シンポジウム

第6回 感覚器シンポジウムを開催して

第6回を迎え、ますます研究内容が高度化しているのがよくわかるシンポジウムでした。このシンポジウムを継続する意義を下記にまとめます。

- ① 招待研究者の特別講演により新しい知識を得る
- ② 臨床研究センターの研究者の発表により、研究の新たな動向を知る
- ③ ①、②を通じて病院内および対外的に発信をする
- ④ 国立病院機構では発信活動を推進している。それは臨床研究ポイントにインセンティブなポイントを割り当てているのでシンポジウムの企画と実行は重要である。
- ⑤ シンポジウム後の懇親会は、忘年会と共に年2回しかない感覚器センターの研究員の交流会として大切である

私がセンター長として赴任してから合計5回のシンポジウムを行い、そのたびに講演の内容を記録集としてまとめて残してきました。私が企画して開催するのは今回が最後となります。これまでの4年間支援していただいた東京医療センター・松本純夫病院長並びに臨床研究(感覚器)センターの皆さんに感謝を申し上げます。

平成23年3月22日

感覚器センター 名誉センター長
加 我 君 孝

第6回臨床研究(感覚器)センター
感覚器シンポジウム
東京医療センター 臨床研究(感覚器)センター 記録集 No.5
監修 加我君孝

発行／平成23年(2011年)5月31日
発行人／加我君孝
発行所／独立行政法人 国立病院機構 東京医療センター
臨床研究(感覚器)センター

〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1
TEL: 03-3411-0111(代表)
FAX: 03-3411-0185
E-mail: //kimikaga-ky@umin.ac.jp
kaga@kankakuki.go.jp

印刷所／株式会社 学術社



東京医療センターの4月
桜とカナリア諸島原産のヤシの大きな木



第6回感覚器シンポジウムに参加した臨床研究センターのメンバー