

## 第7回石綿研究会

日時：2000年10月14日 13時00分～18時45分

場所：生産性国際交流センター（神奈川県三浦郡葉山町）

- 1 世話人挨拶 三浦溥太郎（横須賀共済病院）
- 2 研究発表会
  - I 石綿曝露 座長：岸本卓巳（岡山労災病院） 13時05分～14時05分
    - (1) 「石綿工場従業員における臨床所見の計時的検討－非喫煙石綿工場従業員を対象とした20年間の経過観察」 田村猛夏（国立療養所西奈良病院内科）ら
    - (2) 「胸膜肥厚斑を有する肺癌の1切除例：その石綿小体および石綿繊維分析」 平岡武典（国立宮崎病院）ら
    - (3) 「1970、1990年代の一般の肺がん症例における肺内アスベスト沈着量：A preliminary report」 石川雄一（癌研究会癌研究所病理部）ら
    - (4) 「石綿曝露レベルの石綿小体による判定」 神山宣彦（労働省産業医学総合研究所）
  - II 学会報告・治療薬 座長：中野孝司（兵庫医科大 第三内科） 14時05分～14時35分
    - (5) 「会議報告『国際アスベスト会議：過去・現在・未来』ブラジル・オサスコ市、2000年9月」 名取雄司（横須賀中央静療所）
    - (6) 「ヒト癌性胸水による塩酸イリノテカン(CPT-11)のSN-38への代謝に関する検討」 三宅光富（兵庫医科大第三内科）ら
  - III 特別講演 座長：井内康輝（広島大医学部 第二病理） 14時40分～15時40分  
”Experience of French Mesothelioma Panel”  
Francios Galateau-Salle, M.D. (Mesopath Grope CHU Caen, France)
  - IV 中皮腫（疫学・病理・臨床） 座長：木村雄二（青梅市総合病院 病理） 16時～17時
    - (7) 「日本における中皮腫の疫学：現状と問題点」 森永謙二（大阪府立成人病センター調査部）
    - (8) 「胸膜悪性中皮腫か反応性過形成か（症例）」 北川正信（北陸中央病院病理）
    - (9) 「胸膜プラーク陽性症例における中皮細胞異型についての検討」 高部和彦（土浦協同病院内科）ら
    - (10) 「10年以上生存している悪性胸膜中皮腫の1例」 野寺博志（横須賀共済病院内科）ら
  - V. 中皮腫（化療・分子生物学） 座長：三浦溥太郎（横須賀共済病院） 17時45分～18時30分
    - (11) 「悪性胸膜中皮腫に対するIrinotecan(CPT-11)+Doxorubicin(DOX)療法のpilot phase II study」 井上康（兵庫医科大第三内科）ら
    - (12) 「悪性中皮腫細胞の運動能におけるヒアルロン酸とCD44の関与」 石田啓（広島大医学部第二病理）ら
    - (13) 「悪性中皮腫における自殺遺伝子の腫瘍特異的発現を目的としたkeratin19プロモーターとcalretininプロモーターの応用」 稲瀬直彦（東京医科歯科大医学部呼吸器科）ら
- 3 総会 18時30分～18時45分
- 4 懇親会（於：湘南国際村センター） 19時00分～21時00分

## 第7回石綿研究会

### 1. 石綿工場従業員における臨床所見の経時的検討—非喫煙石綿工場従業員を対象とした20年間の経過観察

○田村猛夏、宮崎隆治（国立療養所西奈良病院）、岡本行功、徳山猛、米田尚弘、春日宏友、成田亘啓（奈良医科大第二内科）、長澄人（済生会吹田病院）

〔目的〕非喫煙石綿工場従業員における臨床所見の変化を検討すること。

〔対象と方法〕1975年および20年後に健診を受け、1975年における胸部X線所見が0型であった24名の非喫煙石綿工場従業員を対象とした。これらの対象は、引き続き同じ工場で勤務を続けた。

これらの対象において、胸部X線、呼吸機能および肺音などの変化を検討した。

〔結果〕20年後には、8名が進展を示した。20年後には、進展群では%VCは88.2%、V25/Htは0.42となった。非進展群では、%VCは104.6%、V25/Htは0.62であった。進展群において有意に低かった。

進展群では、1975年の時点での肺音陽性の占める割合は62.5%であった。非進展群では、12.5%であった。進展群において、有意に多くなっていた。

〔結語〕石綿肺の進展の結果、%VCやV25/Htが低下した。肺音陽性は、石綿肺の進展と関連していた。

### 2. An operated case of lung cancer with pleural plaques: its asbestos body and fiber analysis(胸膜肥厚斑を有する肺癌の1切除例:その石綿小体および石綿繊維分析)

○ Takesuke Hiraoka, Akira Watanabe, Yasuhiro Usuma(Natinal Miyazaki Hospital), Noribiko Kohyama (National Institute of Industrial Health, Ministry of Labor)

A 79 year-old man with peural plaques, who had worked in the boiler room of battle cruiser for about one year at 26 years old, was pointed out another new shadow in right upper field on X-ray at the health screening. Because, he had been pointed out the abnormality of left upper field before 6 years ago. Then his chest CT had exhibited pleural plaque on left chest wall, but no more investigation about a view of occupatinal history.

In this time he received the broncho-fiber scope examination, and the cytological class IV cells was detected in his lung tissue materials. Then he soon received the right upper lobectomy.

When operation, the calcified pleural plaques existed adjoins the right chest wall. Clinical diagnosis was adenocarcinoma T1NoMo.

The analysis of lung tissue expect lesion of carcinoma showed asbestos body of 33,348 fiber/g (dry lung tissue) and amosite is most as a kind of fibers, then crocidolite came tremolite and chrysotile in that order.

### 3. 1970、1990年代の一般の肺癌症例における肺内アスベスト沈着量:A preliminary report

○石川雄一、野村起美恵（癌研究会癌研究所病理部）、神山宣彦、高田礼子（労働省産業医学総合研究所）

〔はじめに〕アスベスト（AB）曝露で最も良く知られている癌は悪性中皮腫である。しかし、職業的にABに曝されていた集団に最も多く発生した腫瘍は肺癌であった、という疫学報告もある。我々は、一般人の肺癌発生にもABが関与しているのではないかとという仮説の下に、癌研究所に保存されている1950、1970、1990年代の肺癌患者の肺組織中におけるAB量を測定し、肺癌の組織型、遺伝子変化、喫煙の状況などとどのように関連しているかという研究を開始した。今回は、1970、1990年代の肺癌患者の肺組織中におけるAB量を測定

したので、preliminaryな結果であるが報告する。

〔材料と方法〕1970年代、90年代に癌研付属病院で肺癌のために肺の切除を受けた患者のうち、今回は腺癌に限定し、できるだけ各分化度（高、中、低の3分化度）が同数となるよう、70年代52例(M:F=22:30)、90年代60例(M:F=30:30)を選択した。AB沈着量の測定は、産医研で以前より用いている低温灰化法と光顕によるAB小体の計測によった。

〔結果と考察〕今回は、これまでに測定を終了した70年代47例(M:F=21:26)、90年代17例(M:F=5:12)の結果を記す。AB小体数（本/乾燥重量(g)）の平均値は、70年代1842(n=47)、90年代234(n=17)であり、有意に70年代の方が高かった。我々がこれまで職業性曝露の指標としていたAB小体数1,000以上の症例は、70年代ではそれぞれ21/47(=45%)、90年代では2/17(=12%)であった。腺癌の分化度と吸入性発癌物質との関連では、喫煙指数と腺癌の分化度との有意な相関が知られており、低分化ほど喫煙との関連が強い。しかし、ABに関する今回の検討では、分化度とAB沈着量とは有意な相関は見られなかった。

#### 4. 石綿曝露レベルの石綿小体による判定

○神山宣彦（労働省産業医学総合研究所）

〔目的〕病理診断や労災認定等でアスベスト曝露の有無や曝露レベルの厳密な評価が求められる。その厳密な評価は、肺組織を用いた分析電顕によって石綿繊維の種類、量及びサイズ分布などを計測して行われている。しかし、こうした分析電顕による評価方法は、試料作製や電顕操作および繊維の分析などが難しく、誰でもが出来る方法とはならず普及が遅れている。そのため、一般には光学顕微鏡で肺組織中の石綿小体（AB）を計数する方法で石綿曝露の有無を確認しているのが現状である。本研究は、その方法の定量性を高めるように改良して職業性曝露と非職業性曝露の区分レベルを推定したので「石綿曝露レベル評価法」として報告する。

〔試料〕検索した組織試料は、大阪中皮腫研究会で検討した肺組織ブロックがある中皮腫例、石綿職歴の無い肺癌例（熊本南病院）、石綿肺癌例（岡山労災病院）、一般の肺癌例（癌研）、および石綿曝露の疑いで各地の病院から産医研に依頼された症例などである。

〔方法〕光学顕微鏡で肺組織中のABを計数する方法で比較的普及しているSmithの方法を、演者は次の様に改良した。(1)ホルマリン固定された肺組織、腫瘍部、プラーク部、横隔膜等の組織試料約1-2gを取り、数mm角に細切する（パラフィンブロックも可能）。(2)湿重量と乾燥重量（110℃で数時間乾燥）を精秤、記録。(3)50mlポリ製遠沈管に入れ組織消化液〔20%次亜塩素酸ソーダ+5%KOH+表面活性剤：クリーン99K-200®、クリーンケミカル（株）〕を30ml加え、60℃で数時間放置。(4)3,000rpm30分間遠沈する（残留物が多い場合は（3）の処理をもう一度行う）。(5)蒸留水を30ml加え良く攪拌し（超音波洗浄機を用いる）遠沈（3,000rpm30分間）する。この操作を3回繰り返す。(6)3回洗浄後、50mlガラス試料瓶に試料懸濁液を50mlに定容化する。(7)60ml試料懸濁液から精密ピペットで1-5ml程度を50mlコニカルビーカーに分取する。(8)蒸留水で20-50mlに希釈してセルロースエステル・メンブランフィルター上にろ過。(9)半切した試料メンブランフィルターをフィルター試料面をガラス面に向けて載せ、アセトン蒸気で固定し、トリアセチンを2-3滴滴下し、カバーガラスを載せる。(10)位相差顕微鏡（400x）でABを200本以上とその視野数を計数する。計数したABが200本に達しない場合は、フィルター試料面全てを計数。(11)AB濃度（1g乾燥試料重量当たりの）を計算する。

〔結果〕位相差顕微鏡で計数したABは、(1)中皮腫症例の場合検出下限値の20AB/g(dry lung)以下から $3 \times 10^5$ AB/g(dry lung)にわたる広い範囲にあった。(2)熊本南病院の例は、旧石綿鉱山付近の住民と遠く離れた地域の住民などの肺癌例で横成されており、多くは1,000AB/g(dry lung)以下であったが、中にはそれ以上の場合もあった。(3)癌研の一般の

肺癌例の多くは1,000AB/g(dry lung)以下であったが、中には5,000AB/g(dry lung)以上の場合もあった。これは職業曝露があったものと推定される。(4) 石綿肺癌例は、1,000AB/g(dry lung)以上あった。(5) 石綿肺の場合は $3 \times 10^6$ AB/g(dry lung)以上に達する例があった。

(6) 石綿職歴が不明で臨床病的に石綿曝露が窺われる症例の多くは、1,000AB/g(dry lung)以上あった。しかし、中には1,000AB/g(dry lung)以下の場合もあった。

分析電顕による検索でABの多くは角閃石系石綿（アモサイト、クロシドライト）を核とすることが確認されるので、クリソタイル曝露の評価にはこのABによる方法は使えないと考えられる。

〔結論〕本評価法で、職業曝露例と非職業曝露例は、肺組織中の石綿濃度の1,000AB/g(dry lung)を区分レベルとして大略判定できる。すなわち、

- <1,000AB/g(dry lung) : 一般人レベル
- 1,000-5,000AB/g(dry lung) : 職業曝露が疑われるレベル
- >6,000AB/g(dry lung) : 職業曝露があったと推定できる

なお、中皮腫例で1,000AB/g(dry lung)以下のケースにクリソタイル曝露のみの可能性が考えられる。発表では、幾つかの症例について石綿曝露評価結果を具体的に報告する。

## 5. 会議報告:国際アスベスト会議:過去、現在 &未来(2000年9月7-20日 ブラジルオサスコ市)

○名取雄司(横須賀中央診療所)

国際アスベスト会議:過去現在&未来が2000年9月17-20日、ブラジルオサスコ市で開催された。全体会議では「予防」「社会的行動」「補償」「社会医学的側面」「将来」が報告され議論された。3つのワークショップは「責任と補償」「疫学公衆衛生及び社会学的調査研究」「アスベスト関連疾患」であった。3つのラウンドテーブルは、「開発途上国でのアスベスト禁止にむけた戦略」「アスベスト被災者の訴え」「労働組合とアスベスト」であった。被災者や支援のABC、労働組合、行政、臨床医師、疫学者等約300名が世界30数ヶ国から参加した。会議の内容と意義に関して報告する。

## 6. ヒト胸水による塩酸イリノテカン(CPT-11)のSN-38への代謝に関する検討

○三宅光富、中野孝司、井土康、飯田慎一郎、外村篤志、戸川直樹、波田寿一(兵庫医科大学第三内科)

〔はじめに〕topoisomerase 1阻害剤であるCPT-11は肝細胞、腸粘膜上皮、血漿に存在するcarboxyl esteraseによって活性代謝産物であるSN-38に変換され強い抗腫瘍活性を発揮する。しかし、临床上、しばしば経験する胸水での本酵素の存存は不明である。そこで我々はCPT-11のヒト胸水によるSN-38への代謝に関して検討した。

〔対象および方法〕癌性胸水10例(肺腺癌4例、悪性胸膜中皮腫6例、心不全1例)を用いた。胸水採取後直ちにCPT-11 400  $\mu$ g/mlを加え十分な攪拌の後、37°C恒温槽において自動攪拌しながら0.25、0.5、1、2、4、6、12、24時間後のCPT-11とSN-38の濃度を測定した。また、胸水細胞成分を遠心分離除去した胸水、患者血漿および患者血清にCPT-11をそれぞれ400  $\mu$ g/ml、40  $\mu$ g/ml、4  $\mu$ g/ml、0.4  $\mu$ g/ml加えた後、同様にCPT-11とSN-38の濃度を経時的に測定した。

〔結果〕1) ヒト胸水中でCPT-11は、active metaboliteであるSN-38に変換した。2) SN-38への変換は0.25時間後に認められ、12-24時間後に著増した。3) ヒト胸水1個はcarboxyl esteraseが存在し、CPT-11は活性代謝産物であるSN-38に変換されると考えられる。

## 7. 日本における中皮腫の疫学:現状と問題点

○森永謙二 (大阪府立成人病センター調査部)

厚生省の人口動態死亡統計によると、ICD9による統計が開始された1979年の胸膜原発悪性腫瘍の死亡数は男40、女22の計62であったが、1994年には男196、女60の計256と、4倍に増加していた。1995年からはICD10による統計が開始され、1995年の胸膜中皮腫による死亡数は男201、女74の計275、1998年では男283、女78の計361であった。

死亡診断書における中皮腫の診断精度には問題があるものの、過去16年間 (1979-94) に4倍もの増加をみたことは、診断精度が向上したことだけでは到底説明のできない増加であり、我が国でも胸膜中皮腫が1980年代後半から1990年代前半にかけて急増していると判断して良いものと思われる。我が国での石綿による中皮腫の職業癌としての累積認定件数は1984年以降1997年まで120件であるが、これらの認定件数も1989年には10例、1992年には12例と年間10例を超えることもあり、この頃より急増していることが伺われる。

当時、中皮腫の診断精度には問題があることが指摘されていたことから、大阪では1981年に大阪中皮腫パネルを組織し、1996年末までに171例の症例を検討している。1995年までの成績は佐々木ら (1999) が報告している。

ところで、高橋ら (1999) は、日本の人口当たりの石綿消費量 (1974年の輸入量) に比べて、中皮腫の死亡が他のヨーロッパ諸国に比べて著しく低いことを指摘しているが、中皮腫の潜伏期間が30-50年であることを考えると、1995年の中皮腫死亡数500に対して最も石綿輸入量の多かった1974年の36万トンの数字を用いることは間違いで、潜伏期間を35年として1960年の7.7万トンの数字を用いれば、人口100万対石綿消費量は3.1kg/capita/yrではなく、0.68kg/capita/yrであり、 $y = 6.08x + 0.55$  から計算される4.68/million/yrは、1995年の4.74/million/yr (500/105.42) に良く一致する。

日本の中皮腫の死亡率が1980年代まで低かったのは30-40年前の日本での消費量が低かったからに過ぎない。戦後の石綿はGHQの許可のもとに輸入されており、1963年秋に石綿製品が自由化されて以降、急激に石綿輸入量が増加し、ほとんどが建材等に使用されるようになり、1974年に最も多い石綿が輸入された。

重要なのは、欧米の人口当たりの石綿消費量と中皮腫死亡率の経験から日本の中皮腫の死亡数の増加を予測し、今後の石綿による被害を防止する資料として活用することであろう。

最も石綿輸入量が多かった1970年代の平均値30万トンを用いて予測すると、2005-2015年の日本での中皮腫による年間死亡数1750人になると推測される。この数字は、1997年の日本での中皮腫死亡数 (570) のちょうど3倍に相当する。この数字は上記の計算式を用いたあくまで概算でしかなく、より精密な予測数を今後推定するつもりである。

(参考文献)

- 1) 森永謙二 (2000) 粉じんと呼吸器がん. 日本職業災害医学会誌48 (5)、印刷中
- 2) 佐々木正道、北川正信、森永謙二 (1999) びまん型悪性中皮腫の病理—大阪中皮腫パネル117例の検討. 病理と臨床17: 1111-1117
- 3) Takahashi K, Husskonen MS, Tossavainen A, Higashi T, Okubo T, Rantanen J(1999)Eco-logical relationship between mesothelioma incidence/mortality and asbestos consumption in ten western countries and Japan. J Occup Health 41:8-11

## 8. 胸膜悪性中皮腫か反応性過形成か—胸膜鏡下生検症例

○北川正信 (公立学校共済組合北陸中央病院 病理)

[症例] 70歳男、元家屋解体業

[主訴] 胸水貯留

[既往歴] 塵肺症 (X線上第1型)

[現病歴] 平成9年9月より病態不明の胸水にて仙台厚生病院内科に入院中（胸水細胞診陰性）、縦隔リンパ節腫大のため外科へ生検依頼（平成12年4月17日）、胸水中ヒアルロン酸 26,900ng/ml。

平成12年5月16日、胸腔鏡下生検。左肺：86,810、壁側胸膜：大動脈上部・ポート縁、リンパ節：#、9、10。生検後ピシバニール散布と胸膜面擦過で癒着を促し、以後胸水貯留なし。但し、リンパ節腫脹増大あり（平成12年9月末現在）。

## 9. 胸膜プラーク陽性症例における中皮細胞異型についての検討

○高部和彦（土浦協同病院）、赤羽久昌、石渡仁深、三浦溥太郎（横須賀共済病院）

悪性胸膜中皮腫の症例では約80%に石綿曝露が認められると言われているが、中皮細胞の異型を石綿曝露例において詳細に検討した報告はほとんどない。我々は、剖検時に胸膜プラークを認める症例の壁側胸膜を切除し、その中皮細胞異型について検討した。

対象は、48例（男性47例、女性1例、平均年齢76歳）で、30例（62.5%）に職業性石綿曝露を認めた。壁側胸膜は、切除後ホルマリン固定を行い、10mm厚さの全割標本を作成した。また、肺組織、胸膜プラークは次亜塩素酸ナトリウムで溶解し、光顕により石綿小体数を算定した。

中皮細胞異型とその頻度は、cuboidal morphology（98%）、多核化（31%）、多層化（52%）、乳頭状増殖（58%）、結合組織への中皮細胞浸潤（31%）、及びプラーク内への中皮細胞浸潤（41%）であった。

プラーク内に石綿小体を認める例では、認めない例と比較し、プラーク内への中皮細胞浸潤の頻度が有意に高かった（70% vs 30%、 $p=0.008$ ）。しかし、肺内石綿小体の高値（ $>100/g$ ）はいずれの中皮細胞異型とも関連を認めなかった。

以上の結果から、プラーク内への中皮細胞浸潤と胸腔内石綿角荷との関連が示唆され、中皮腫の発生を考える上で重要な所見と考えられた。

## 10. 10年以上生存している悪性胸膜中皮腫の1例

○野寺博志、小林美和、宮本優美、玉岡明洋、大河内稔、中山杜人、三浦溥太郎（横須賀共済病院内科）、諸星隆夫（同胸部外科）、赤羽久昌（同病理）、相田真介（防衛医科大検査科病理）、木村雄二（青梅市立総合病院病理）

症例は76歳、女性。1987年9月に右胸痛、労作時息切れを生じ当院受診。胸部X線写真上、右胸水を認め、胸腔穿刺と全身検索が行われ、原発巣不明の悪性胸水と診断された。全身化学療法1回、胸膜癒着術が7回行われたが、右胸水は再貯留を繰り返した。1992年10月、胸腔鏡が行われたが、癒着のため十分な所見がえられなかった。同年12月、胸水のcell blockより上皮型悪性胸膜中皮腫と診断された。その後さらに3回の癒着術が行われたが、1997年11月以後は無治療で、現在外来にて経過観察中である。

## 11. 悪性胸膜中皮腫に対するIrinotecan(CPT-11)+Doxorubicin(DOX)療法のpilot phase II study

○井上康、中野孝司、松岡弘高、飯田慎一郎、外村篤志、三宅光富、戸川直樹、波田寿一（兵庫医科大第三内科）

[はじめに] 悪性胸膜中皮腫（MPM）に対する外科治療には限界があり、化学療法または放射線療法が予後を改善する治療手段となる。併用化学療法のうち CPT11 + CDDP は MPM に対して 26.7%の奏効率を有し、比較的有効な組み合わせである。Topo- I 阻害剤である DOX は従来より MPM に対する単剤で有効な薬剤であると考えられている。MPM に対する本臨床試験の目的は、この DOX と MPM に対する有効性が In vitro の系で示されて

いる CPT-11 との併用療法の奏効率、毒性等を知ることである。

〔対象及び方法〕対象は病理学的に診断が確定し、PSO-2、75 歳以下、測定または評価可能病変のある悪性胸膜中皮腫 17 例（上皮型 11 例、二相性 5 例、肉腫型 1 例）である。IMIG 分類は I 期 3 例、III 期 5 例、IV 期 9 例である。CPT-11 (60mg/m<sup>2</sup>, day 1 and 8) + DOX (40mg/m<sup>2</sup>, day 2 and followed by a 1-week rest) を 2 クール以上経静脈投与した。判定基準には CALGB の用いる “regression” を判定カテゴリーに加え評価した。

〔結果及び結論〕CRI、PR6 であり奏効率 41.2%、regression 3 overall RR 58.8%であった。治療関連死はなく、grade 3 の白血球減少は 29.4%、grade 2 の下痢 23.5%、grade 3 の肺毒性は 11.8%であった。CPT-11 + DOX は MPM に対し有用な治療法と考えられる。

## 12. 悪性中皮腫細胞の運動能におけるヒアルロン酸とCD44の関与

○石田啓、金子真弓、武島幸男、井内康輝（広島大医学部第二病理）

悪性中皮腫の特徴としては、高度のヒアルロン酸産生があるが、分子量数1,000kDaの二糖の重合体であるヒアルロン酸は、諸臓器に広く存在する代表的細胞外基質の一つで、細胞増殖や細胞運動能への関与など様々な生物活性を示すことが知られている。種々の癌腫において、その浸潤部では高濃度のヒアルロン酸が認められており、癌細胞の浸潤への関与も明らかにされつつあり、その機序としては、ヒアルロン酸に対する代表的なレセプターであるCD44との関連が注目されている。CD44は悪性中皮腫を含む種々の腫瘍細胞に分布する多機能性の膜通過型糖質白であり、その細胞内ドメインがankyrinやEMR complexを介して細胞骨格を形成するactinに結合して細胞運動を制御すると考えられている。

中皮腫細胞におけるヒアルロン酸産生の生物学的意義に関する知見は未だ少なく、特に細胞運動能に及ぼす影響に関しては報告がみられない。

そこで我々は、悪性中皮腫の浸潤性性格がヒアルロン酸とCD44の相互作用による細胞運動能の制御によるか否かを確かめる目的で研究をおこなった。

方法としては、悪性胸膜中皮腫の細胞株（HMMME）を用い、外来性にヒアルロン酸を投与することによってCD44を介したヒアルロン酸の運動能への影響を調べた。HMMME細胞はヒアルロン酸産生能を有しているため、正確なヒアルロン酸の影響を調べるために、細胞はあらかじめ4-Methylumbelliferoneで前処置し、細胞自身によるヒアルロン酸産生を抑制した。細胞運動能の評価はwound assayで行った。すなわち、ディッシュ内で密にシート状に増殖した培養細胞をチップの先で引っかくことによりcell free areaをつくり、12時間の間にどれだけの細胞がそのcell free areaを埋めたかを画像解析装置を用いて測定した。そして、培地の中に1mg/mlの濃度ヒアルロン酸を加えた場合と、ヒアルロン酸を入れない場合とで比較した。さらに、ヒアルロン酸のCD44に及ぼす影響をみるためにflow cytometryによりCD44の発現レベルを測定した。また、CD44とアクチンフィラメントの細胞内での局在を知る目的で、これらの重染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

Wound assayの結果、ヒアルロン酸加の培地中では、約24%の運動能の上昇が認められ、これはCD44のblocking抗体によって抑制された。さらに、flow cytometry解析により、1mg/mlのヒアルロン酸を加えて12時間培養することにより、CD44の発現レベルを示す蛍光強度は、ヒアルロン酸を入れない対象の約9倍にも増強された。また、共焦点顕微鏡ではCD44は主として運動先端のフィロポディア（仮足）部の細胞膜に発現し、細胞骨格のアクチンフィラメントの先端部と共存していることがうかがわれた。

以上の結果から、HMMME細胞においてヒアルロン酸はCD44と関連して、細胞運動能を制御することが示唆された。

### 13. 悪性中皮腫における自殺遺伝子の腫瘍特異的発現を目的としたkeratin19プロモーターとcalretininプロモーターの応用

○稲瀬直彦、石波庸夫、吉澤靖之（東京医科歯科大医学部呼吸器科）

〔背景〕自殺遺伝子であるherpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) 遺伝子を細胞内に導入し、プロドラッグであるganciclovir (GCV) を投与する遺伝子治療が種々の悪性腫瘍に対して試みられてきた。この場合、導入したHSV-TK遺伝子を腫瘍特異的に発現させることが重要であるが、転写レベルでの遺伝子発現の制御を目的に、いくつかの腫瘍特異的プロモーターが応用されてきた。悪性中皮腫は特異的な腫瘍マーカーに乏しいが、keratin19 (CYFRA) とcalretininの発現が報告されてきた。

〔目的〕keratin19プロモーターとcalretininプロモーターを用いて、悪性中皮腫細胞に導入された自殺遺伝子を特異的に発現させることを目的とした。

〔方法〕ヒト悪性中皮腫細胞株 (H28、H2052、211H) とヒト子宮頸部癌細胞株 (HeLa) を培養した。keratin19とcalretininの発現はノザンプロット法とRT-PCR法により確認した。エンハンサー配列を連結したkeratin19プロモーターとcalretininプロモーターをルシフェラーゼ用レポーターベクターにそれぞれ組み込み (pK19-LUC、pCAL-LUC)、細胞に導入後ルシフェラーゼ活性を測定した。それぞれのプロモーターの下流にHSV-TK遺伝子を連結した発現ベクター (pK19-TKとpCAL-TK) を作製し、細胞株に導入後GCVを加え培養し、MTS assayにより抗腫瘍効果を判定した。またヌードマウスの皮下にpK19-TKを導入したH2052細胞を移植し、8日目よりGCVの腹腔内投与を2週間行い、5週間皮下腫瘍径を計測した。

〔結果〕keratin19およびcalretininは、H2052細胞において強い発現を認めた。pK19-LUCとpCAL-LUCは、H2052細胞にそれぞれ導入された後、強いルシフェラーゼ活性を示した。またpK19-TKおよびpCAL-TKの導入により、H2052細胞はGCVに対する感受性の増強を示した。

〔結論〕keratin19プロモーターおよびcalretininプロモーターは、悪性中皮腫において腫瘍特異的プロモーターとして応用できる可能性が示唆された。