

下状態によって発症するという報告を始め、様々な推測がなされている。しかしながら、対象が1000 g未満の超低出生体重児であり、十分な内分泌学的検討はなされておらず、その病態は未だ不明である。本研究では、検体が微量で測定できるRIA法を用いることで、超低出生体重児のホルモン値のreference valueを作成し、本病態の解明につなげることを目標とした。

【対象・方法】2006年7月までで、上述の循環不全を呈した児3例（各々、在胎期間23週5日出生体重554 g、在胎期間26週3日出生体重936 g、在胎期間24週0日出生体重546 g）、循環不全には陥らなかった超低出生体重児7例、極低出生体重児3例の計13例（在胎 27 ± 2.8 週、出生体重 860 ± 314 g）を研究対象とした。これらの症例で血清・尿中電解質、尿量、体重、血圧を測定する一方、血清ACTH、血清コルチゾル、血清アルドステロン測定を行った。血清ホルモンは朝7時に同一検者が踵部採血で採取し、 -20°C で保存後RIA法にて測定した。

【結果】在胎期間の短い症例の急性期では尿中Na排泄が増えており、血清Naを維持するためにNa総投与量を増量する必要があった。アルドステロン値はこれまでの正期産新生児の報告に比して高い傾向にあった。しかし尿中Na排泄とアルドステロンを同時に測定し得た症例が少なく、両者の間に相関を見いだすことは困難であった。

循環不全に陥らなかった10症例では、血清コルチゾル値は、これまでの早産児の報告と比して、むしろ高値を示していた。血清ACTHは5~12 pg/mlを示していた。

循環不全を呈した例においても血清コルチゾルの低下は見られなかったが非発症例に比して低下しており、血清ACTHも低値を示していた。

【考察】今回の検討では、循環不全を呈した児においてACTHの上昇が少なく、下垂体の機能不全が背景にあることが推測された。

これまでのホルモン値の報告は在胎週数の経過した早産児を対象としており、今後も症例を追加し超早産児のreference valueを作成の上、さらに検討を続ける必要がある。

hMLH1メチル化陽性大腸癌高危険群拾い上げ診断マーカーの開発に関する研究

外科学一般外科学部門助手 宮倉 安幸

（目的）ミスマッチ修復遺伝子のひとつであるhMLH1プロモーター領域のメチル化は非遺伝性マイクロサテライト不安定性陽性（MSI）大腸発癌に密接な関係を有している。我々は以前にhMLH1プロモーター領域のメチル化をプロモーター広範に解析することによりメチル化プロファイルを作成し大腸発癌への関与を明らかにした（Gastroenterology 2001；Genes Chromosome Cancer 2003）。その結果では、メチル化プロファイルはプロモーター全域にメチル化を認めhMLH1遺伝子機能を消失しMSI陽性を引き起こす全メチル化（全大腸癌中10%）と、プロモーター上流に限局、遺伝子機能に影響を及ぼさない部分メチル化（全大腸癌中30%）に分類可能であった。さらに全メチル化の3割では、正常粘膜にも部分メチル化を有しており、部分メチル化は早期発癌イベントでイニシエーションの役割をもち、一部は全メチル化へと進むと考えられた。今回、hMLH1プロモーター領域内の一塩基置換（SNP：rhMLH1-93（A/G））に着目し、メチル化発生への関与を明らかにしhMLH1メチル化陽性大腸癌高危険群の拾い上げマーカーへの可能性について検討した。

（方法）①日本人（当院外科手術症例）およびカナダ人大腸癌検体（カナダマギール大学外科手術症例）におけるrhMLH1-93（A/G）の解析はPCR-SSCP法およびdirect sequence法にて、メチル化の解析はBisulfite PCR-SSCPおよびMethylation specific-PCR法にて解析を行った②Gel shift assay法によりrhMLH1-93（A/G）のアレルの違いによる転写因子や蛋白の結合の違いの解析を行った。③rhMLH1-93を含む近傍のSNPの解析はPCR-SSCP法にて行いハプロタイプを決定しメチル化への関与について解析を行った。

（結果）①日本人およびカナダ人初発大腸癌切除検体におけるrhMLH1-93（A/G）とメチル化の解析では、日本人大腸癌210例（J群）とカナダ人大腸癌149例（K群）でのメチル化の頻度は

J群28.8%(60/210), K群23.5%(35/149)と同様の頻度であった。rhMLH1-93 (A/G) の遺伝子型頻度はJ群 A/A: 26%(n=54), A/G: 51%(n=108), G/G: 23%(n=48), K群 A/A: 18%(n=27), A/G: 24%(n=36), G/G: 58%(n=86)と人種により大きく異なっていたが、それぞれ正常人での頻度とは類似していた。一方メチル化と rhMLH1-93 (A/G) の関係は、メチル化はJ群 A/A: 44%(24/54), A/G: 24%(26/108), G/G: 21%(10/48), K群では A/A で: 33%(9/27), A/G: 33%(12/36), G/G で: 16%(14/86)に認められ、人種に関わらず rhMLH1-93 (A/G) との密接な関係を認めた (J群 $p=0.007$, K群 $p=0.053$)。特に A-アレルを有する大腸癌は G-アレルを有する大腸癌に比較してメチル化の頻度が有意に高率であった (J群: 34% vs 23%, $p=0.007$, K群: 33% vs 19%, $p=0.008$)。

② rhMLH1-93 (A/G) のアレルの違いによるメチル化発生について、gel shift assay を行い転写因子や蛋白の結合の違いを解析した。その結果メチル化の頻度が低い G アレルを有するオリゴでのみ転写因子の結合を認め、この転写因子はメチル化の結合を阻害する可能性が考えられた。転写因子の候補としては AP4, MyoD などが考えられるが現在さらに解析中である。

③ rhMLH1-93近傍の2箇所の SNP によるハプロタイプとメチル化の頻度との解析を行った。その結果、rhMLH1-93近傍2箇所それぞれの SNP 単独では hMLH1プロモーター領域のメチル化の頻度に影響を及ぼさないが、rhMLH1-93を含む3箇所のハプロタイプとメチル化の解析では、rhMLH1-93の A を含むハプロタイプではメチル化の頻度が有意に高い結果であった。

(結語) hMLH1プロモーター領域内の rhMLH1-93 (A/G) はメチル化発生に影響を与える重要な因子のひとつであると考えられた。現在メチル化発生への関与をさらに明らかにするために、MSI 陽性大腸癌の前癌病変と考えられている鋸歯状ポリープ (serrated adenoma) や hyperplastic polyp などにおいても解析を継続し、hMLH1メチル化陽性大腸癌高危険群の拾い上げマーカーへの可能性について検討中であ

る。

リン酸化を介した哺乳動物精子の受精能獲得調節メカニズムの解明

産科婦人科助手 鈴木 達也

【背景】不妊症に占める原因のうち男性側の責任は約50%近くに存在する。中でも造精機能障害が90%以上を占め、このうち原因不明の特発性造精機能障害が60%である。これらの特発性造成機能障害(無精子症を除く)は精子の運動性・受精能力が障害され低下している病態であり、主として薬物療法が行われるが一般的にその有効性は低く、人工授精や体外受精に移行することが多い。低下した精子の運動性・受精能力を改善する治療法を開発するためには、運動性・受精能力を獲得するメカニズムを明らかにする必要がある。精子の運動性・受精能力の獲得は、 Ca^{2+} や cAMP, A キナーゼによるタンパク質リン酸化によって調節されていることが示されている。従って、これらリン酸化タンパク質を解析するとともにそれらを調節する酵素を検索することにより、精子の運動性・受精能力を改善する治療法を開発できる可能性があると考えた。

【目的】精子受精能獲得(超活性化)に関与するタンパク質のリン酸化・脱リン酸化を引き起こすキナーゼ・フォスファターゼを検索することにより、精子の受精能獲得を調節するリン酸化経路を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】ヒトでは通常、運動開始前精子(精巣精子又は精巣上体精子)を採取することは困難であり、今回は超活性化による運動パターン変化が著明であるハムスターを実験動物として用いた。ハムスター精巣上体尾部より精子を採取し、modified Tyrode's albumin lactate pyruvate (m-TALP) 培養液を用いて超活性化を誘起した。その上で位相差顕微鏡下に精子の運動率ならびに超活性化率の変化を解析した。さらにプロテインフォスファターゼ (PP) 阻害剤(オキサ酸(10nM, 0.1nM)・カリキュリン A (2nM, 0.5nM)) を添加し、精子の運