

## 綜 説

## 下垂体腺腫組織における組織酸素分圧低下の生物学的意義

吉田 大蔵<sup>1</sup> 金 景成<sup>2</sup> 寺本 明<sup>3</sup><sup>1</sup>日本医科大学第二病院脳神経外科<sup>2</sup>日本医科大学付属病院脳神経外科<sup>3</sup>日本医科大学医学部大学院医学研究科神経病態解析学Biological Significance of Lowered Tissue Oxygen Pressure in Pituitary Adenomas:  
A Review ArticleDaizo Yoshida<sup>1</sup>, Kim Kyonsong<sup>2</sup>, Akira Teramoto<sup>3</sup><sup>1</sup>Department of Neurosurgery, Nippon Medical School Second Hospital<sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Nippon Medical School<sup>3</sup>Clinical Neuroscience, Nippon Medical School Graduate School of Medicine

## Abstract

Hypoxia, the disruption of oxygen homeostasis induced by low oxygen supply, is critical in the development and progression of a large number of tumors. Various solid tumors are basically in a hypoxic condition, when growth exceeds vascular supply. Under such conditions, cellular oxygen concentration redirects cellular biosynthetic pathways to promote adaptation and enable survival. Recently, a transcriptional factor called hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  has been shown to play a crucial role in the regulation of many genes involved in the hypoxia adaptive pathway, especially vascular endothelial growth factor (VEGF). Under hypoxic conditions, many tumor cells promote angiogenesis via HIF-1 $\alpha$ . Meanwhile pituitary tumors are solid tumors in which the regional oxygen saturation is lower than that of normal pituitary gland and the vasculature is usually poor. Despite expression of HIF-1 $\alpha$  was confined in pituitary adenomas, its function driving to angiogenesis, apoptotic induction, and cell invasion, even though these issues have been extended in the other malignant tumors in recent years, has not yet been discussed. We have investigated the expression of microvascular density, HIF-1 $\alpha$ , and VEGF in primary human pituitary adenomas focusing on the co-localization, and subsequently in vitro study, elucidated gene profiling regulated by HIF-1 $\alpha$ .

Our previous studies indicated that HIF-1 $\alpha$  immunoreactivity was confined to the nucleoplasm, but was present in both tumor cells and vascular endothelial cells. There was no difference in microvascular density by histotype. ACTH-producing adenomas showed the lowest level of HIF-1 $\alpha$ , whereas PRL-producing adenomas and HIF-1 $\alpha$ -positive microvessels showed the highest (  $p < 0.001$  ). There was no significant correlation in the expression levels of HIF-1 $\alpha$  mRNA and VEGF mRNA in pituitary adenomas. Both of HIF-1 $\alpha$  and VEGF proteins expressed in pituitary adenoma and they were, in part, co-localized. Transfection with specific siRNA duplexes knocked down HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein expression in hypoxia-exposed cells by approximately 80%. Microarray analysis indicated that HIF-1 $\alpha$  down-regulated caspase-10,

but up-regulated of laminin  $\beta 2$  ( 4.26 folds ) , SAP90 ( 3.34 folds ) and BNIP3 ( 3.24 folds )

Conclusively in these poorly vascularized tumors, HIF-1 $\alpha$  may not mainly regulate the VEGF expression in pituitary adenoma. In vitro studies strongly suggest that HIF 1- $\alpha$  exerts an antiapoptotic role in HP-75 in hypoxia mediated by down-regulation of caspase-10 and that hypoxia can potentially enhance the cell invasion properties of a pituitary adenoma cell line through elevated expression of laminin  $\beta$ -2. The mechanism of tumor angiogenesis and cell invasion in pituitary adenomas may differ from that in the other cancer cells.

( 日本医科大学医学会雑誌 2005; 1: 110 116 )

Key words: HP-75, hypoxia, hypoxia inducible factor, pituitary adenoma

酸素は有核細胞の成長や生存維持に必須であることは言を待たない。酸素欠乏状態は生体の死亡を意味するからである。近年正常細胞における低酸素応答の機構が肺や心臓といった臓器単位での反応とは別に分子レベルでも存在することが徐々に明らかとなってきた。例えばヒマラヤやアンデス山脈に生活する人々の血清ヘマトクリットが高値をとることは以前より知られていたが、これは血管内皮細胞の酸素センサーが血液の低酸素状態を感知することで erythropoietin (Epo) 遺伝子への転写活性が上昇することで erythropoietin 蛋白が増加し赤血球産生を促進することに由来している事が明らかとなった<sup>1</sup>。これは一般に高所順応という現象として理解されている。別な観点から酸素は、ミトコンドリア呼吸鎖における最終電子受容体として働き、酸化リン酸化による ATP の効率的な産生を可能にする役割ゆえほとんどの生物の生存に必須の分子であることが判明している<sup>2</sup>。しかし生体がいかに低酸素を含む酸素分圧の変化を感知し反応するか、具体的に言えば酸素分圧センサー分子の実態は 20 世紀を通して謎であり続けた。現代低酸素研究の milestone は疑いなく 1994 年の Semenza による転写因子 hypoxia-inducible factor1 の遺伝子単離である<sup>3</sup>。HIF-1 は低酸素に極めて特異的にかつ迅速に活性化する転写因子でありこの活性化を指標に細胞内低酸素感知機構の分子生物学が急速に発達した。いうならば高地居住や貧血、肺あるいは心疾患などが原因で体細胞が低酸素状態に曝されると低酸素関連転写因子 hypoxia inducible factor が活性化して erythropoietin や vascular endothelial growth factor (VEGF) が遺伝子レベルで発現調節がなされ、誘導産生されて組織への酸素供給を維持しようという応答機構が存在することを意味する<sup>4</sup>。

血管はすべての組織への酸素運搬経路である。と同時に生体のホメオスタシスからいわば逸脱してしまった腫瘍組織にとっても血管を通じて酸素を供給さ

れないと組織は壊死に陥ってしまう。腫瘍血管新生なくして腫瘍の増殖はありえない。およそ 20 年前より、固形腫瘍は自らが血管新生を促す因子 angiogenic factor を分泌することで血管新生を制御していると考えられ、VEGF, PDGF をはじめとする様々な因子が遺伝子および蛋白レベルで同定され、そのシグナル制御の機構について多彩な研究がなされてきた<sup>5</sup>。一方で、特にこれら tumor angiogenesis に関する遺伝子レベルの研究とは全く別個に臨床研究としておもに放射線学領域でのイメージ解析によって悪性腫瘍組織における糖や酸素代謝の解析が行われたが、いずれの固形腫瘍でも周囲の正常組織の組織酸素分圧より低値を呈していて、しかも悪性度の高い腫瘍ほど有意に低いといった発表が相次いだ<sup>6</sup>。また前述した hypoxia-inducible factor1 (HIF-1) もそれら悪性腫瘍組織に有意に高く発現していて、低酸素刺激が HIF-1 を介して腫瘍の成長に何らかの引き金になっているのではないかと示唆を与えた<sup>7</sup>。

脳神経外科領域での代表的な悪性腫瘍は glioblastoma multiforme が知られているが、Collingridge らは astrocytoma の臨床患者の解析から同様の結果を得て、やはり悪性 grade の高い腫瘍ほど酸素分圧が低値をとっていることを明らかにした<sup>8</sup>。興味深いことにこの腫瘍では悪性度の高いものほど tumor angiogenesis が亢進していて microvascular density は高く、同時に産生される VEGF や FGF らの angiogenic factor は有意に上昇している<sup>9</sup>。これら angiogenic factor が大量に分泌され vascularity が高い腫瘍組織ほど実は組織酸素分圧が低いのは一見奇異な印象を受ける。しかしながら、1 悪性度の高い腫瘍細胞(その遺伝子背景は様々検討がなされ、腫瘍によっては嫌気性代謝が亢進しているという報告があるもの)ほど腫瘍の成長や細胞の機能維持のための酸素要求や消費が正常細胞より高いかもしれない。さもなくば、2 tumor angiogenesis によって形成された血管は

破綻しやすく、または構造上不完全で腫瘍細胞への酸素運搬が必ずしも順調に行われぬ。ゆえに組織の酸素分圧が低下して低酸素状態に陥っているために HIF-1 pathway が過剰に作動して angiogenesis がおこるので vascularity が増すと考える方が現時点では適切ではないかとも考えられる。事実、astrocytoma の最も悪性型である glioblastoma multiforme (grade 4) は anaplastic astrocytoma (grade 3) とはその組織に micronecrosis を含んでいることが定的相違点であるが、HIF-1 はその中で酸素分圧が明らかに低いと考えざるをえない necrosis や腫瘍内出血に隣接した腫瘍部分にのみ核内に発現し、転写因子として活性化していることを示唆していた<sup>10</sup>。当然これら悪性度が高い glioblastoma では血管密度の高さは病理所見のみならず、臨床検査としての MRI 所見でも明白である。従って従来 tumor angiogenesis の研究は数々の angiogenic factor が分泌されるにあたっての細胞外からの制御、あるいはその factor の血管内皮細胞での receptor の解析といった観点からの研究といった色彩をおびていたが、ひとつには低酸素刺激によって惹起される細胞内 signal transduction に目を向けた研究へと徐々に変貌してきている<sup>6</sup>。また腫瘍細胞をとりまく pH 微小金属などといった今まであまり注目を受けてない微小環境の素因も未だ特定されないながらも腫瘍の angiogenesis をつかさどる細胞の signal pathway になんらかの影響を及ぼすのではないかと考察するのはごく自然な発想であろう。

一方下垂体腺腫においてもその組織酸素分圧はやはり周囲の正常前葉後葉組織と比べて著しい低値を示していることが Kristof らによって報告された<sup>11</sup>。一方で腺腫組織の microvasculature は腺腫の subtype によつての相違があるかは報告によって未だに定見を得られてはいないものの、正常前葉や後葉組織と比してその血管密度は有意に低いという点で一致している<sup>12</sup>。この点で我々は今まで発表されてきた低酸素条件下で angiogenesis が増加するといった他臓器の腫瘍細胞<sup>7</sup> とは明らかに病態が異なるのではないかと考えた。さらに上述した angiogenic factor のうち、VEGF も分泌され細胞外にでてしまうといった本来の性格のゆえか下垂体腺腫の腫瘍組織切片の免疫染色による解析も細胞内に発現した見かけの VEGF 蛋白発現量がそのまま腫瘍細胞の真の VEGF 産生量を反映しているとは必ずしも言いがたく、はっきりとした結論が得られてはいない。これらの問題の背景にはヒト由来の下垂体腺腫細胞がプラスチックに癒着しがたく、すぐに剝がれて浮かび上がってしまうことや増殖も他の悪性腫

瘍細胞株と異なり、極めて緩やかである点から fibroblast の混入が避けがたく、事実上手術で得られた組織からの単離培養細胞の樹立は極めて困難であったことが挙げられ、in vitro の研究が困難であったという点につける。これらの問題から過去の下垂体腺腫の研究といえば、ホルモン負荷によって強制的に発現させたマウス由来の下垂体腺腫細胞を使った研究が少数散見するものの、ほとんどが手術によって得られた腫瘍組織の分子病理学的手法によって論じざるを得なかった。従って他の腫瘍細胞のような in vitro での様々な cell signal transduction の研究はほとんど絶無であるといわざるをえない。最近我々はヒト下垂体腺腫細胞を American Tissue Culture Collection から入手した。これは現在唯一ヒト下垂体腺腫から樹立した細胞株であり、入手可能になったのもたかだか 2 年前であった。通常では一般的に腫瘍細胞の培養は酸素 21%、二酸化炭素 5% が生存、増殖における至適濃度ということで条件設定を行っている。しかし最初に述べたように、腫瘍組織の中でその腫瘍細胞を取り囲んだ組織酸素濃度の変化によって何らかの細胞内のシグナルや代謝の変化が起きているのではないかとこの着想を得た。それをもとに培養条件を酸素濃度を 21% に一定にするといった点に拘泥せず、21% から 1% へと変化させることでより生体の条件に近づけるのではないかと考案し、実験を行っている。

Figure に我々の最近の知見をまとめた。我々はまず最初に平成 15 年度に日本医科大学付属病院脳神経外科に入院した下垂体腺腫症例 58 例（男性 19 例、女性 38 例、平均 48.4 歳）の腺腫組織の免疫染色を行った。低酸素関連転写因子のうち HIF-1 $\alpha$  発現分布と血管密度 (CD34 による内皮細胞) の相関を確かめたが、HIF-1 $\alpha$  は腫瘍細胞と血管内皮細胞の核内に発現し、血管の分布と必ずしも相関してなく、両者の発現頻度にも有意な相関はなかったが、ACTH 産生腫瘍で最も低値、PRL 産生腫瘍で高値であった (one-way ANOVA,  $p < 0.001$ )。血管密度に各 subtype での有意差は得られなかった (one-way ANOVA,  $p = 0.7761$ ) (Fig. 1)。一方で VEGF は HIF-1 $\alpha$  の発現と正の相関はなく、二重蛍光免疫染色でも両者の個別の細胞内での co-localization は認められなかった。real-time RT-PCR でも mRNA レベルでの相関性はなかった (Fig. 2)。以上の結果から下垂体腺腫組織に有意差はあるものの、HIF-1 $\alpha$  はいずれの subtype にも発現はしているが microvasculature density と相関はなく、VEGF の制御に関連しているといった結果は見られなかった。このことは HIF-1 $\alpha$  から VEGF の pathway

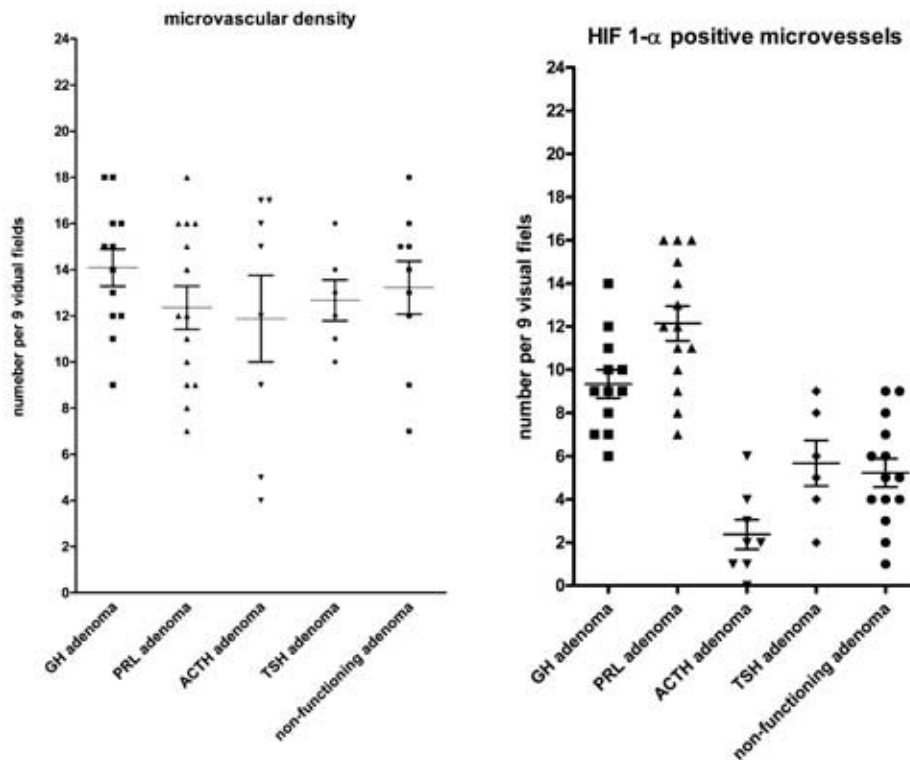


Fig. 1 Microvascular density detected by CD-34 ( New Fuchsin ) expression does not vary in the different tumor type ( one way ANOVA,  $p = 0.7761$  ) Meanwhile, expression of HIF-1 $\alpha$  positive microvessel is significantly different between the pituitary tumor type ( one way ANOVA,  $p < 0.0001$  ) ACTH producing adenomas show the lowest level of HIF-1 $\alpha$  positive microvessels mean, 2.38, SD, 1.92 ) whereas PRL producing adenomas have the highest counts mean, 12.14, SD, 2.58 )

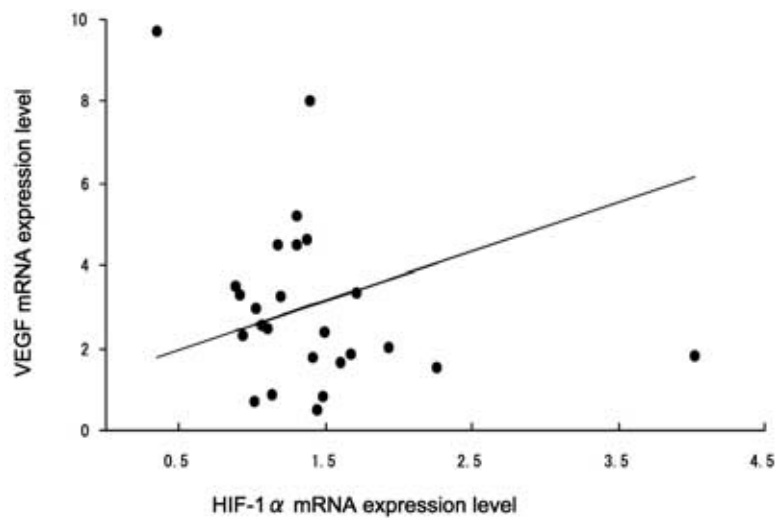


Fig. 2 Simple linear regression analysis showing that there was no significant correlation in the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF mRNA in all pituitary adenomas we examined. (  $R = 0.341$ ,  $p = 0.095$  )

の間に未知の factor が存在し、その factor が腺腫細胞において欠失、或いは down-regulate されることでたとえ低酸素状態に陥って HIF-1 $\alpha$  が活性されても

VEGF 産生に結びつかないか、もしくは低酸素状態になった際、同時に VEGF を抑制する factor が産生されるのではないかと考えられた。少なくとも悪性

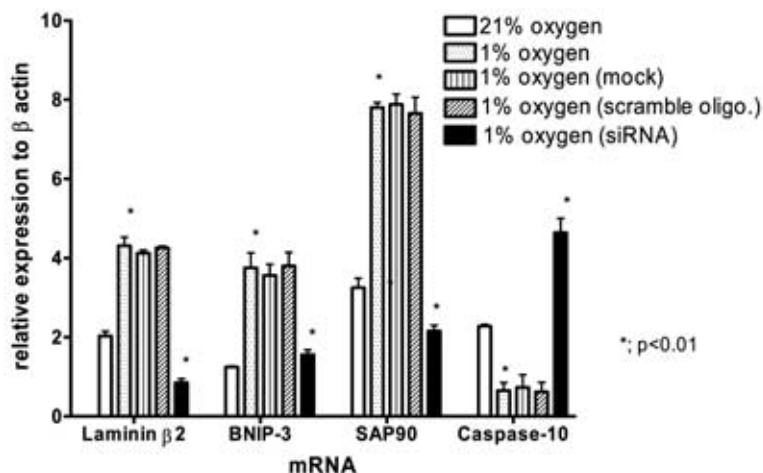


Fig. 3 Verification of the results in cDNA microarray.

Relative expressions of to human β-actin were significantly elevated after exposure to 1% oxygen for 24 hours ( laminin β2,  $p < 0.01$ ; SAP90,  $p < 0.01$ ; BNIP3,  $p < 0.01$  ) Meanwhile relative expression of caspase-10 was significantly suppressed ( $p < 0.01$  ) When HIF-1α mRNA had been interfered with siRNA targeting HIF-1α mRNA beforehand, mRNA expressions of laminin β2, SAP90, and BNIP3 were significantly suppressed after exposure to 1% oxygen for 24 hours ( laminin β2,  $p < 0.01$ ; SAP90,  $p < 0.01$ ; BNIP3,  $p < 0.01$  ) whereas that for caspase-10 was significantly elevated inversely ( $p < 0.01$  ) The cells with mock or transfected with scramble oligomer did not display any significant changes in expression of these mRNA after exposure to 1% oxygen for 24 hours.

glioma に報告されているように腫瘍組織でも培養細胞でも HIF-1α と VEGF が同一の腫瘍細胞に共存しつつ活性化して、両者の密接な関係を示唆しているといった所見はなかった。

次にヒト非機能性腺腫細胞 HP-75 を入手して、酸素濃度 21% と 1% に 24 時間培養し、実験を行ったが、あらかじめ HIF-1α をターゲットとした二重鎖 RNA ( siRNA ) で knock-down した HP-75 を用意しておいた。対照群 ( 21% 酸素で培養 ) , 1% 酸素培養群, 1% 酸素 HIF-1α knock down 群での mRNA の発現 profiling を cDNA microarray で定量解析した。結果として 1% 酸素濃度で HIF-1α の発現は増加し、同因子を通じて apoptosis 促進因子 caspase-10 を down-regulate し、同時に tumor suppressor gene のうち apoptosis inhibitor 効果が確認されている SAP90 ( 3.34 倍 ) と BNIP3 ( 3.24 倍 ) を制御していることが明らかとなった。したがってこの転写因子 HIF-1α は低酸素状態になった際下垂体腺腫細胞が apoptosis になり死亡するのを、以上の apoptosis 抑制因子を発現させ、同時に caspase-10 の発現活性を抑制することで防ぐ役割を担っていると思われる。同時に

extracellular matrix の component である laminin のうちで β2 chain は有意に up-regulate され ( 4.26 倍 ) , HIF-1α を knock-down すれば有意に発現低下が見られたことから明らかに HIF-1α の pathway の下流に存在することが示唆された ( Fig. 3 ) . あらためて酸素濃度を変化させると蛋白レベルと mRNA レベル両方ともに 1% というきわめて低酸素濃度においてのみ有意に発現が増加していた ( Fig. 4 ) . laminin のうち β2 chain は他の chain のように fibronectin に anchoring せず、collagen type IV に特異的に接着することが最近報告されているが、低酸素状態となり腺腫細胞が laminin β2 chain を発現増加し、collagen type IV がより多く発現していることが知られている basal lamina や perivascular space に対する細胞の接着が増加し、結果として細胞浸潤が増えるのではないかと、さらには perivascular space への腺腫細胞が浸潤することで微小血管の破綻からいわゆる下垂体卒中が引き起こされるのではないかとという観点は極めて単純ながらも現時点では大変魅力的な考察ではないかと考えられた。

下垂体腺腫は生物学的にも病理学的見地からも良性

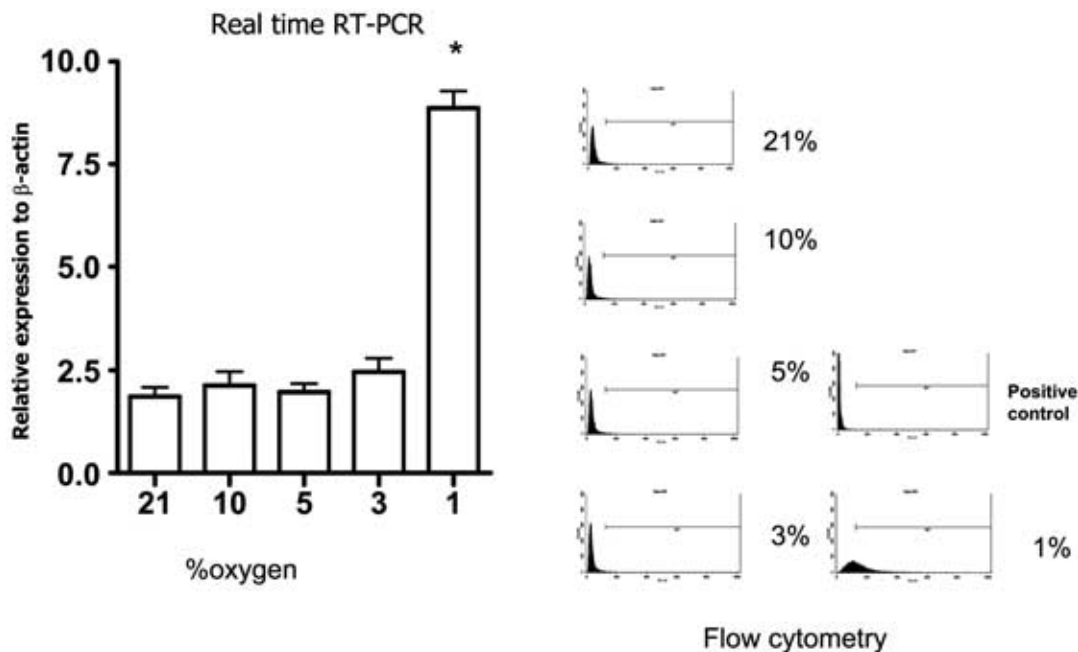


Fig. 4 The up-regulation of laminin  $\beta$ 2 under hypoxic conditions was verified by real-time RT-PCR, which revealed that cells incubated at 1% oxygen showed a significant increase in laminin  $\beta$ 2 versus those incubated under normoxic conditions. However, incubation of cells at 3, 5 or 10% oxygen did not induce significant up-regulation of laminin  $\beta$ 2. Flow cytometric analysis revealed that expression of laminin  $\beta$ 2 on the cell surface was elevated following incubation of cells under hypoxic( 1% )conditions versus normoxia and immunohistochemistry demonstrated that expression of laminin  $\beta$ 2 on the cell surface was significantly increased by incubation of cells with at 1% oxygen.

腫瘍であることは言うまでもない。事実、腫瘍細胞核細胞比は低く成長はきわめて緩徐である。悪性の指標として使われる Ki-67 index も悪性 glioma の 40 ~ 80% といった値から比べると、0.1% 前後がせいぜいであって、1% を超えるものは見当たらないといっても過言ではない<sup>13</sup>。一見境界明瞭な良性腫瘍とあれば、摘出は容易で再発は皆無と考えがちである。しかしながら実際は病理組織上あるいは頭部 MRI 所見から初診時に全体の 20 ~ 35% は正常組織あるいは隣接した海綿静脈洞へすでに浸潤していることが知られている<sup>14</sup>。いったん海綿静脈洞や視床下部へ浸潤した腫瘍組織は、外科手術においても細心の注意を怠らないと極めて重篤な神経後遺症や出血を強いられるので残さざるをえない。従って局所再発や予防するための術後療法、長期内分泌的な機能予後といった部分から臨床上也下垂体腺腫の細胞浸潤という問題は無視しえない問題を含んでいる。さらには一見病理学的に良性な腫瘍だが、临床上実は難治性な問題を包含しているという言い方にもなる。従って我々はなぜこの良性腫瘍が周辺組織に細胞浸潤を起こしてしまうのかといった素朴な疑問をいただき、なるべく腫瘍組織が成長している

生体の環境に近づけて考えようと試み、最近培養酸素濃度を変えて研究を続けている。

最後に、細胞が低酸素状態に陥るのは当然固形腫瘍においてのみではない。脳梗塞亜急性期に CT 上一時的に見られる foggy phenomenon は虚血に陥った正常脳組織の周辺での一時的に側副血管が発達することによる血流増加だと言われている。或いはモヤモヤ病の慢性期では内頸動脈の閉塞の後に、微小なモヤモヤ血管が多数出現してくる。これらは虚血によって起こる酸素供給遮断に反応する機構であり、活性化する転写因子 HIF と関連しているのだろうか。最初に述べたように生体は酸素を取り入れて消費することで生命を全うする。低酸素に対する生体の反応は生命現象の根幹である。腫瘍においてもこの低酸素に対する反応は存在することが次第に知られてきた。我々は下垂体腺腫においても細胞浸潤が見られる事実は腺腫細胞が低酸素に陥り、酸素を求めてより酸素濃度の濃い正常組織に入り込むといった控えめに考えても腫瘍細胞の根源的な運動現象に根ざしているのではないかという印象を最近の研究を通じて強く感じた。

## 文 献

- 1 . Villa JG, Lucia A, Marroyo JA, Avila C, Jimenez F, Garcia-Lopez J, Earnest CP, Cordova A: Does intermittent hypoxia increase erythropoiesis in professional cyclists during a 3-week race? *Can J Appl Physiol* 2005; 30: 61 73.
- 2 . Lolkema MP, Gervais ML, Snijckers CM, Hill RP, Giles RH, Voest EE, Ohh M: Tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain. *J Biol Chem* 2005; 280: 2542 2051.
- 3 . Semenza GL: Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8: 863 884.
- 4 . Swelam W, Ida-Yonemochi H, Maruyama S, Ohshiro K, Cheng J, Saku T: Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. *Virchows Arch* 2005; 2941: 1025 1031.
- 5 . Chen WT, Huang CJ, Wu MT, Yang SF, Su YC, Chai CY: Hypoxia-inducible Factor-1  $\alpha$  is Associated with Risk of Aggressive Behavior and Tumor Angiogenesis in Gastrointestinal Stromal Tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 207 213.
- 6 . Papp-Szabo E, Josephy PD, Coomber BL: Microenvironmental influences on mutagenesis in mammary epithelial cells. *Int J Cancer* 2005; 128: 110 114.
- 7 . Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C: Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1  $\alpha$  predicts early relapse in breast cancer: Retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer* 2005; 129: 28 32.
- 8 . Collingridge DR, Piepmeier JM, Rockwell S, Knisely JP: Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiother Oncol* 2005; 53: 127 131.
- 9 . Kaur B, Tan C, Brat DJ, Post DE, Van Meir EG: Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol* 2004; 70: 229 243.
- 10 . Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL: Expression of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 2000; 88: 2606 2618.
- 11 . Kristof RA, Aliashkevich AF, Hans V, Haun D, Meyer B, Thees C, Schramm J: The regional oxygen saturation of pituitary adenomas is lower than that of the pituitary gland: microspectrophotometric study with potential clinical implications. *Neurosurgery* 2003; 53: 880 885.
- 12 . Itoh J, Serizawa A, Kawai K, Ishii Y, Teramoto A, Osamura RY: Vascular networks and endothelial cells in the rat experimental pituitary glands and in the human pituitary adenomas. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 231 235.
- 13 . Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, Buchfelder M, Grossman AB: Diagnosis And Management Of Pituitary Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 224: 958 994.
- 14 . Muacevic A, Uhl E, Wowra B: Gamma knife radiosurgery for nonfunctioning pituitary adenomas. *Acta Neurochir Suppl* 2004; 91: 51 54.

( 受付 : 2005年 5 月 10 日 )

( 受理 : 2005年 6 月 2 日 )