

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成18年 3月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 生田 和良



所属機関名： 大阪大学

所属部署： 微生物病研究所 職名： 教授

〒 565-0871

所在地： 大阪府吹田市山田丘3-1

電話： 06-6879-8307

内線： 8307

1. 助成金額： 910,000 円

2. 研究テーマ

中国における重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルス持続感染状況の把握

3. 成果の概要(100字程度)

重症急性呼吸器症候群(SARS)関連コロナウイルス(CoV)のルーツは不明である。私たちは、このSARS-CoVが培養細胞(Vero E6)で持続感染することを見出した。この持続感染細胞と反応する抗体スクリーニングを行い、現在の中国人はどの程度の抗体陽性率であるのかについて検討した。その結果、内モンゴと西安市由来の検体で高率に陽性反応が認められたが、哈爾濱市由来の検体ではいずれも陰性であった。これら陽性検体は、他のヒトコロナウイルス(229E)と交叉反応している可能性があるため、実際のCoVの実体を検出する努力を現在行っている。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 生田 和良 職名： 教授

所属機関： 大阪大学 部署： 微生物病研究所

中国側研究者氏名： 張 鳳民 職名： 教授

所属機関： 哈爾濱医科大学 部署： 微生物学講座

中国における重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルス 持続感染状況の把握

研究者氏名 張 鳳民
中国研究機関 哈爾濱医科大学 微生物学講座

研究者氏名 李 桂梅、李 永剛、生田和良
日本研究機関 大阪大学 微生物病研究所 ウイルス免疫分野

要 旨

重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルス (CoV) に持続感染したVero E6細胞株を抗原として用いた蛍光抗体法により、現在の中国人におけるSARS-CoVに対する抗体保有者の割合を調査した。その結果、これまでにSARS患者が認められていた内蒙古や西安で高率に抗体陽性例が認められた (内蒙古の発熱者で32%、健常者で25%;西安の健常者で20%)。一方、SARS患者が認められていない哈爾濱においては抗体陽性例が認められなかった(0%)。今後、これら陽性例において、SARSアウトブレイクときにウイルスに曝されたが、発症しなかった場合なのか、SARS-CoVのルーツとなるような弱毒性のヒトCoVであるのか、検討が必要である。

Key Words SARS, コロナウイルス, 持続感染, Vero E6, 中国

緒 言:

2002年冬に始まった新型肺炎である重症急性呼吸器症候群 (SARS) の大流行は、世界を震撼させる大問題となった。現在においても、その原因ウイルスであるSARSコロナウイルス (SARS-CoV) の自然宿主動物の特定化ができておらず、その再流行が懸念されている。病態機序の詳細な解明、有効なワクチン・抗ウイルス薬の開発、確実に迅速な検査方法の確立など、再流行に備えて解決されなければならない重要課題が山積している。

ウイルス感染症は大きく急性感染症と持続感染症に分けられるが、SARSは、典型的な急性感染症と考えられている。急性感染症は、感染したウイルスが急激に複製することに伴う疾患であり、急性期症状が消えた後に抗ウイルス免疫応答が残り、ウイルスは体内から消失していると信じられてきた。しかし、最近の遺伝子増幅法による解析により、ごく微量に存在する体内ウイルス遺伝子についても極めて高感度に検出することが可能となり、急性感染症と考えられてきたものが、実は体内の一定部位に潜伏あるいは慢性状態で長期間持続感染していることがさまざまなウイルスについて明らかになっている。このような持続感染ウイルスは、急性期のような激しい臨床症状を示さないが、多様な慢性病態と関連していることが徐々に明らかにされつつある。

は認められなかったが、小児の方が、成人よりも高率であった。一方、これまでに SARS 患者が発生していない哈爾浜市では、50例試み、いずれも陰性であった。これら SARS-CoV 持続感染 Vero E6 細胞と反応する抗体陽性例はいずれも、SARS-CoV RNA の PCR 解析では陰性であった。

考 察：

今回、蛍光抗体法により陽性反応が認められた内蒙古および西安市の検体は、いずれも PCR 増幅することができなかった。したがって

- ① かつてのアウトブレイク時期に、不顕性に感染した結果、抗体上昇が認められているがウイルスは排除されている。
- ② SARS-CoV と血清学的交差する類似ウイルスに感染している。
- ③ SARS-CoV の持続感染が成立しているが、少なくとも血漿中にはウイルスは放出されていない状態にある。

などの可能性が考えられる。今後、今回のような蛍光抗体法で陽性反応が認められる検体で、PCR 陽性のサンプルが入手できれば、SARS-CoV との関連性を明らかにすることが可能と考えられる。

参考文献：

1. Yamate, M., Yamashita, M., Goto, T., Tsuji, S., Li, Y.-G., Warachit, J., Yunoki, M., and Ikuta, K. Establishment of Vero E6 cell clones persistently infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbes Infect.* 7, 1530-1540, 2005.
2. Yamashita, M., Li, G.-M., Yamate, M., and Ikuta, K. Susceptibility of human and rat neural cell lines to infection by SARS-coronavirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334, 79-85, 2005.

表 1. 蛍光抗体法による、中国 3 地域からの検体の持続感染 SARS-CoV に対する抗体陽性率

中国内の サンプル 入手地域	サンプル入手した ヒトの発熱の有無	蛍光抗体法による SARS-CoV 陽性率
内蒙古	+	32% (18/55)
	-	25% (1/4)
哈爾浜	-	0% (0/50)
西安	-	20% (1/5)

ところで、SARS患者の臨床サンプルや剖検サンプルを用いた解析から、レセプターとして同定されたACE2の発現が認められない末梢血単核球（PBMC）中に、発熱後3カ月を経過してもウイルスが存続していることがRT-PCR法によって示されている。また、肺に比べ、腸管の剖検観察では、非細胞傷害性にウイルス感染が認められることが報告されている。これらの報告内容は、SARS-CoVが持続感染し得ることを示唆している。事実、私たちは培養細胞系において、SARS-CoVが、急性期の激しい細胞傷害後に一部の生き残る細胞の出現を許し、持続感染を成立させることを見出した。興味深いことに、このような細胞はSARS-CoV重感染に感受性であるが、感染時の細胞傷害がほとんど現れずに持続感染を成立させる。また、レセプターであるACE2の発現は完全にdown-regulationしていた。

本研究の目的は、これまでに培養細胞レベルで確認してきたSARS-CoV持続感染成立機序と同様の現象が、中国に於ける健常者の一部の間で成立しているか否かを検証することである。SARS-CoVの持続感染機序についての情報は皆無に等しく、本研究によって得られる情報は貴重なものになる。なお、実際の調査は、中国のハルビン医科大学の張鳳民教授のグループにより行われた。

材料と方法：

1) 血液サンプル

SARS-CoVに関する疫学的研究のため、中国の3地域からの血液サンプルを入手した。哈爾濱市から健常者50名、内蒙古から発熱患者55名（小児が41名、成人が14名）及び健常者4名、西安市から健常者5名からのサンプルを用いた。これらの血液から血漿を分画した。

2) 間接蛍光抗体法

SARS-CoVに持続感染したVero E6細胞を無蛍光スライドグラスに塗末し、冷アセトンで5分間固定したものを抗原として用いた。血漿中の抗体は、100倍希釈したものを一時抗体として、2次抗体は市販のFITC結合ウサギ抗ヒトIgGを用いた。

3) SARS-CoV RNA 検出のためのPCR

血漿中RNAを用いて、プライマーとして5'-TCTTGATGGATCTGGGTAAGGC-3' (complementary to nucleotides 15857-15878 at open reading frame 1a)を用いて SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)で逆転写し、得られたcDNAは、プライマーとして5'-GAATCCTGACATCTTACGCG-3' (nucleotides 13871-13890)と5'-TGTTAGGCATGGCTCTGTCA-3' (nucleotides 15255-15236)を用いて1回目のPCR増幅を行った。2回目のPCRは、プライマーとして5'-TGCGTGATGCAGGCATTGTA-3' (nucleotides 13957-13976)と5'-CATAGCTGGATCAGCAGCAT-3' (nucleotides 14510-14491)を用いて増幅した。

結 果：

表1に示すとおり、これまでにSARS患者発生が認められた内蒙古と西安市で高率に、抗SARS-CoV抗体保有者が見つかった。内蒙古での調査では、発熱患者と健常者間では顕著な差異

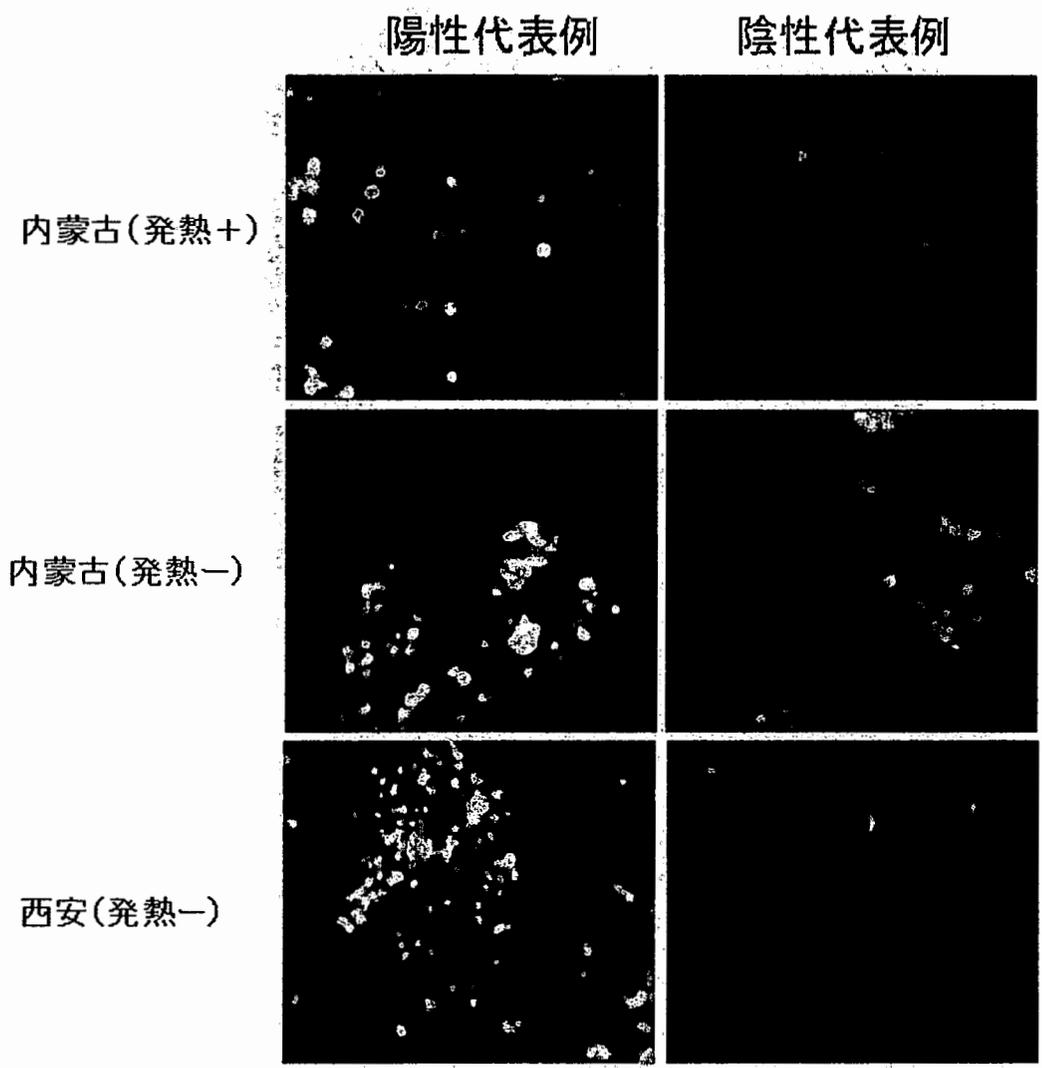


図1. 蛍光抗体法により、中国の内蒙古および西安由来の検体血漿中に認められた、持続感染SARS-CoV に対する抗体陽性例と陰性例。

作成日：2006年3月14日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金 - 調査・共同研究 - 報告書

財団法人 日 中 医 学 協 会 御 中

提出日 2006/03/10

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 萩中 淳



所属機関名： 武庫川女子大学

所属部署： 薬学部 職名： 教授

〒 663-8179

所在地： 西宮市甲子園九番町 11-68

電話： 0798-45-9949 内線：

1. 助 成 金 額 920,000 円

2. 研 究 テ ー マ

人工抗体を用いた医薬品活性体のハイスループットスクリーニング

3. 成 果 の 概 要 (100字程度)

ドメインインプリント法を用いて、医薬品の活性部位に対する分子インプリントポリマー (= 人工レセプター、人工抗体) を調製した。さらに、西安交通大学薬学部 賀 浪中教授と共同研究を行い、得られた人工抗体を中国伝承薬中の活性体のハイプットスクリーニングに適用した。

4. 研 究 組 織

日本側研究者氏名： 萩中 淳 職名： 教授

所属機関： 武庫川女子大学 部署： 薬学部

中国側研究者氏名： 賀 浪中 職名： 教授

所属機関： 西安交通大学 部署： 薬学部

人工抗体を用いた医薬品活性体のハイスループットスクリーニング

日本側研究者氏名	教授 萩中 淳
研究機関	武庫川女子大学薬学部
中国側研究者氏名	教授 賀 浪中
所属機関	西安交通大学薬学部

要 旨

分子インプリント法は、ゲスト分子と相補的に相互作用するモノマーを重合させることにより、ゲスト分子に対する鑄型を得ようとする方法である。そこで、医薬品の薬理活性部位に対する分子インプリントポリマーの調製法である、ドメインインプリント法を用いて分子インプリントポリマー (=人工抗体) を調製し、中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニングに適用するとともに質量分析装置を用いてオンラインで、活性体の構造情報を得ることを目的とした。まず、エピガロカテキンガレート [(-)-EGCg]、エピカテキンガレート [(-)-ECg] およびガロカテキンガレート [(+)-GCg] に対する人工抗体を、多段階膨潤重合法により調製した。次に、これらの分子認識能を水系の移動相を用いて評価した。その結果、2 位および 3 位が同じ立体配置を持つ (-)-EGCg および (-)-ECg をテンプレート分子を用いて調製した MIP の保持能および分子認識能は、それぞれのテンプレート分子に対して最も高く、さらに (-)-ECg あるいは (-)-EGCg に対して高い交差反応性を示した。しかし、2 位の立体配置が異なる (-)-GCg に対する、これら MIP の保持能および分子認識能は低かった。一方、(-)-GCg を用いて調製した MIP は、テンプレート分子に対して最も高い保持能および分子認識能を示したが、(-)-EGCg および (-)-ECg に対しては低かった。また、いずれの MIP も、(-)-ECg および (-)-EGCg よりガレート基が脱離したエピカテキンおよびエピガロカテキンに対して、ほとんど分子認識能を示さなかった。検討したカテキンガレート類の認識にはガレート基と 2 位の立体配置が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、西安交通大学薬学部 賀 浪中教授との共同研究の結果、(-)-EGCg に対する人工抗体を用いることにより、中国伝承薬および薬草中からの活性体のハイスループットスクリーニング、さらには質量分析装置を用いることにより活性体の構造情報を得ることができた。

Key Words 分子インプリントポリマー、人工抗体、カテキン、中国伝承薬、丹参

緒 言：

分子インプリント法は、テンプレート分子の存在下、それと相補的に相互作用するモノマーを重合させることにより、テンプレート分子に対する鑄型を得ようとする方法である (図 1)。分子インプリントポリマー (molecularly imprinted polymer、MIP) は、人工レセプター、人工抗体とも呼ばれ、目的物質の特異的認識に利用されている。しかし、従来の分子インプリント法は、塊状重合法により調製されるため、1) 鑄型構造がポリマー内部に形成され、分子認識能が発現しにくい、2) 高性能、高分離能のポリマーが得られない、3) 一般に非水系の分子認識に用いられ、水系では分子認識能が劣るなどの欠点を有していた。そこで、我々は、多段階膨潤重合法により粒子径単分散の新規 MIP を調製し、高性能、高分離能のポリマーを合成する方法を開発するとともに、水系での分子認識に適用した。その結果、この新規 MIP は、その分子認識に疎水性相互作用などに加えてイオン結合および水素結合も寄与すること、ならびに新規 MIP が種々の薬物および代謝物の水系での分子認識あるいは光学認識に適用できることがわかった。さらに、MIP 表面を親水性モノマーを用いて *in situ* で選択的に親水化することにより、生体試料の直接注入による薬物および代謝物の選択的濃縮分析に応用できることを明らかにしてきた。

一方、多段階膨潤重合法で調製された MIP は、水系での分子認識能に優れていることおよび高い群特異性を示す

ことも見出している。種々の薬物に対するレセプターは、当然のことながら、水系でその分子認識能を発現するとともに、高い群特異性を示す。そこで、医薬品の薬理活性部位に対する分子インプリントポリマー (=人工の薬物受容体、人工抗体) を調製する方法であるドメインインプリント法を用いて、水系で優れた分子認識能を発現する分子インプリントポリマーの調製を行う。そして、得られた分子インプリントポリマーのレセプター様分子認識能を利用して、医薬品活性体のハイスループットスクリーニングに適用するという本研究の着想を得た。

そこで、本研究では、1) 水溶液中で、レセプター様分子認識能を示す分子インプリントポリマー (=人工抗体) の調製法を開発する、2) 開発した調製法を薬理活性物質に対する人工抗体の調製に適用する、3) 得られた人工抗体を中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニングに適用する、4) 探索した活性体の構造情報をオンラインあるいはオフラインで得ることを目的とした。

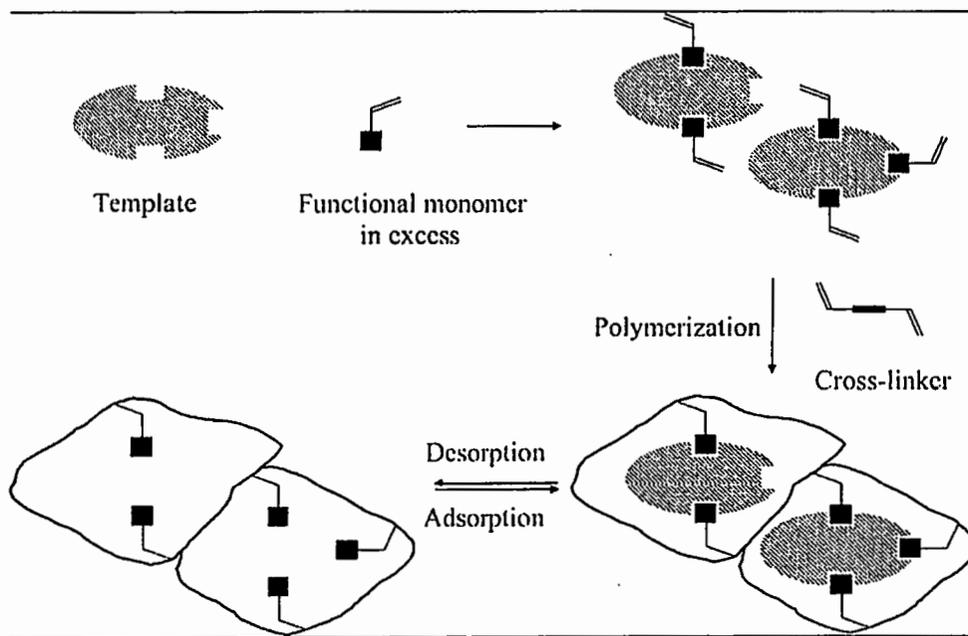


Figure 1 Concept of molecular imprinting

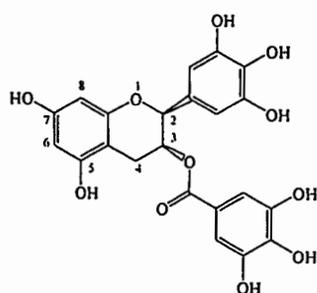
実験:

[1] カテキンに対する人工抗体の調製:

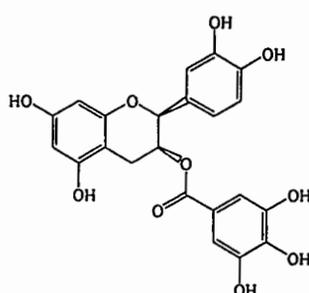
人工抗体は、粒子径の均一なポリマーを得るために、多段階膨潤重合法を用いて調製した。テンプレート分子にエピガロカテキンガレート [(-)-EGCg]、エピカテキンガレート [(-)-ECg] およびガロカテキンガレート [(+)-GCg]、機能性モノマーに4-ビニルピリジン、架橋剤にエチレングリコールジメタクリレート、希釈剤にシクロヘキサノールを用い、50℃で24時間重合した。また、比較のためにテンプレート分子を用いないで同一条件下で重合したノンインプリントポリマー (NIP) も調製した。得られたポリマーをステンレス製カラム (内径4.6 mm、長さ5 cm) にスラリー充填し、カテキン類に対する保持能および分子認識能を HPLC により評価した。移動相には、70%エタノールを用い、流速は0.5 mL/minとした。なお、分子認識能の評価には NIP との保持係数 (k) の比で定義した選択係数 ($S = k_{MIP}/k_{NIP}$) を用いた。

[2] 中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニング:

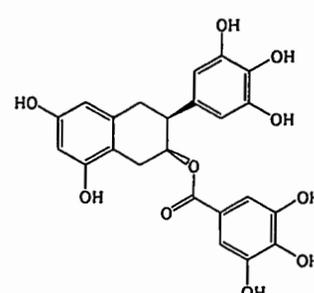
種々の中国伝承薬 (当帰、甘草、牡丹皮、元胡、蒲黄、丹参、杜仲など) を粉碎し、その0.1 g を秤量し、5 mL のメタノール加え、1時間超音波抽出した。抽出液を0.45 μmのメンブランフィルターを用いてろ過し、試料とした。試料を[(-)-EGCg]に対するMIPおよびNIPを充填したカラム (内径4.6 mm、長さ10 cm) に注入した。移動相には、80%アセトニトリルを用い、流速は1.0 mL/minとした。



(-)-Epigallocatechin gallate
[(-)-EGCg]



(-)-Epicatechin gallate
[(-)-ECg]



(-)-Gallocatechin gallate
[(-)-GCg]

結果および考察：

[1] カテキンに対する人工抗体の調製：

人工抗体 (MIP) のカテキン類に対する保持能および分子認識能を、移動相にエタノール-水混液を用いて評価した結果を表に示した。2 位および 3 位が同じ立体配置を持つ (-)-EGCg および (-)-ECg をテンプレート分子に用いて調製した MIP の保持能および分子認識能は、それぞれのテンプレート分子に対して最も高く、さらに (-)-ECg あるいは (-)-EGCg に対して高い交差反応性を示した。しかし、2 位の立体配置が異なる (-)-GCg に対する、これら MIP の保持能および分子認識能は低かった。一方、(-)-GCg を用いて調製した MIP は、テンプレート分子に対して最も高い保持能および分子認識能を示したが、(-)-EGCg および (-)-ECg に対しては低かった。また、いずれの MIP も、(-)-ECg および (-)-EGCg よりガレート基が脱離したエピカテキンおよびエピガロカテキンに対して、ほとんど分子認識能を示さなかった。検討したカテキンガレート類の認識にはガレート基と 2 位の立体配置が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

Table Retention and selectivity factors of catechin gallates on MIPs

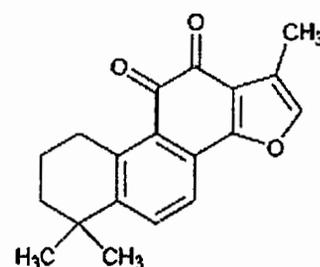
Catechin gallates	(-)-EGCg imprinted polymer		(-)-ECg imprinted polymer		(-)-GCg imprinted polymer	
	<i>k</i>	<i>S</i>	<i>k</i>	<i>S</i>	<i>k</i>	<i>S</i>
(-)-EGCg	22.8	10.8	10.9	3.98	3.81	1.35
(-)-ECg	17.2	7.04	15.1	5.02	4.00	1.37
(-)-GCg	4.49	1.83	4.21	1.37	15.2	5.34

HPLC conditions: column size, 4.6 mm i.d. × 50 mm; column temperature, 25 °C; eluent, 70 % ethanol; flow rate, 0.5 mL/min; detection, 210 nm; loaded amount, 1500 ng.

S is the selectivity factor, k_{MIP}/k_{NIP} .

[2] 中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニング：

平成18年1月11日から平成18年3月9日までの2ヶ月間、西安交通大学薬学部賀 浪中教授の研究室より張 倩倩 (修士課程2年在学中) を招き、種々の中国伝承薬 (当帰、甘草、牡丹皮、元胡、蒲黄、丹参、杜仲など) 中の活性成分の検索を(-)-EGCgに対するMIP (=人工抗体) を用いて行った。図2に、丹参の抽出液をMIPおよびNIPに注入後のクロマトグラムを示した。MIPでは、約12分に大きなピークが見られたが、NIPではこのピークは溶媒先端に溶出しているように思われる。これは、丹参中の成分の一部がMIPに選択的に保持された



Tanshinone IIA

ことによると推定した。丹参中には、Tanshinone IIA等多くの活性成分が含まれていると報告されている。現在、MIPカラムで約12分にみられたピークがTanshinone IIAによるものかどうかを質量分析装置を用いて確認中である。

このように、得られた人工抗体が中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニングに適用可能であることが明らかとなった。

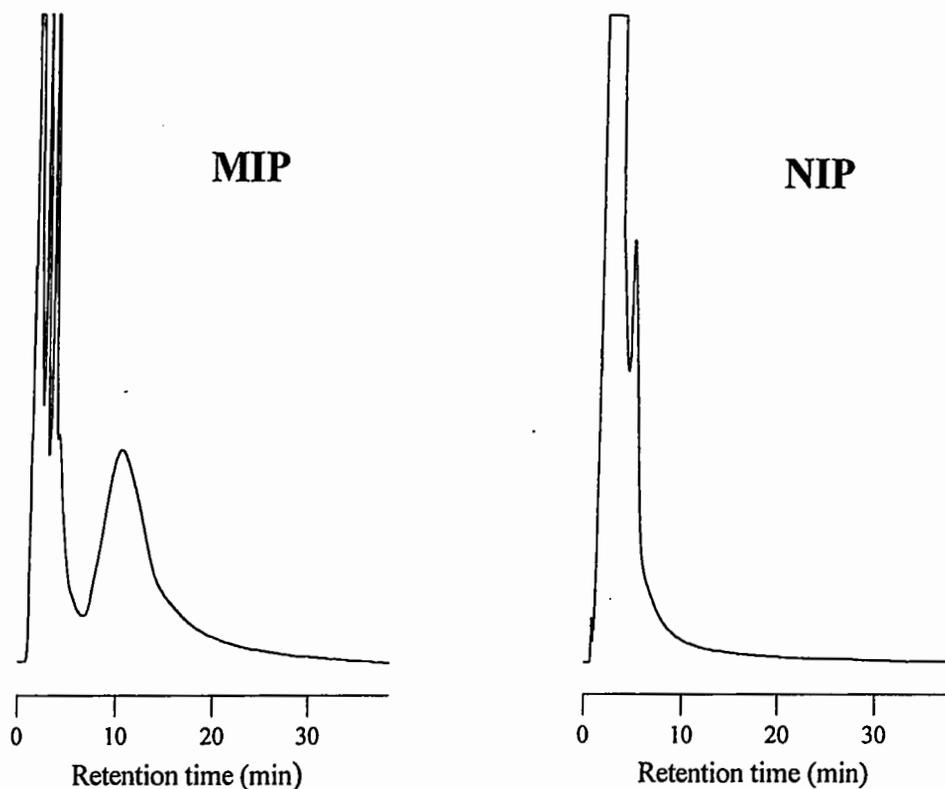


Figure 2 Separation of Danshen Root extracts on MIP and NIP

HPLC conditions: column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; column temperature, 25 °C; eluent, acetonitrile-H₂O (80/20, v/v); detection, 210 nm; flow rate, 1.0 mL/min; loaded amount, 1 μg

文献

1. Jun Haginaka: Selectivity of affinity media in solid-phase extraction of analytes, Trends Anal. Chem., 24, 407-415 (2005).
2. Masanori Nakamura, Masaki Ono, Toshiaki Nakajima, Yuji Ito, Takao Aketo and Jun Haginaka, Uniformly sized molecularly imprinted polymer for atropine and its application to the determination of atropine and scopolamine in pharmaceutical preparations containing *Scopolia* extract, J. Pharm. Biomed. Anal., 37, 232-237 (2005).

作成日 : 2006年3月3日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2006年 03月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 巨理 文夫 

所属機関名： 北海道大学大学院歯学研究科
口腔健康科学講座

所属部署： 生体理工学教室 職名： 教授
〒060-8586

所在地： 札幌市北区北13条西7丁目

電話： 011-706-4253内線： _____

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

高齢者のQOLを改善するナノバイオマテリアルの開発

3. 成果の概要(100字程度)

高齢者のQOL、とりわけ口腔環境の改善を図るため、ナノ構造の導入により新たな機能を付与した、生体にやさしい/耐摩耗性人工歯根、骨再生用スcaffolds、歯周組織再生用傾斜機能型GTR膜等の生体材料の開発を行った。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 巨理 文夫 職名： 教授

所属機関： 北海道大学大学院歯学研究科 部署： 口腔健康科学講座
生体理工学教室

中国側研究者氏名： 崔 福 職名： 教授

所属機関： 清華大学 部署： 材料科学科

高齢者のQOLを改善するナノバイオマテリアルの開発

(日本側) 所属機関	北海道大学大学院歯学研究科
研究者氏名	教授 亘理 文夫
共同研究者名	廖 素三、王 蔚、朱 禹赫
指導責任者名	教授 亘理 文夫
(中国側) 所属機関	清華大学材料科学科
研究者氏名	教授 崔 福斎 (F.Z.Cui)
共同研究者名	Y.Geng, X.Kong
指導責任者名	教授 崔 福斎

Abstracts

To improve the QOL of the aged people, especially their oral environment, the biomaterials endowed with new functions by nano-structure formation were developed such as highly biocompatible/abrasion resistant implants, scaffolds for bone regeneration and functionally graded GTR membranes.

Key Words: Nanotechnology, Biomaterial, Implant, Biocompatibility, Composite, Carbon nanotube

Introduction

Health and environments are the major problems confronted in the 21st century. Tissue regeneration and biomaterials will be two main approaches to respond to these problems and realize the quality of life (QOL). In this point the micro/nano-structured biomaterials and their composites have a large possibility for further development. Especially nanotechnology has made the most important contributions in recent years. The present study has brought together the subjects, which are important to establish the QOL of the aged people, especially their oral environment, from several aspects including implants, surface modification treatments, tissue regeneration, scaffolds, dental materials, composites and carbon nanotubes shown in the followings:

- (1) A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration (S.Liao et al.^{1,2,3,7,12})
- (2) Fabrication and properties of sintered carbon nanotubes (W.Wang et al.^{4,5,10,14})
- (3) Surface carbide formation on titanium for abrasion resistant implant material (Y.Zhu et al.^{11,13,15})
- (4) Preparation of Mineralized Fibroin Fiber (X.Kong et al.⁹)
- (5) One-step synthesis of Fe(II,III)-doped MCM-41 nano-rod (Y.Geng et al.⁸)
- (6) New Observations to Hierarchical Structure of Human Enamel from Nanoscale to Microscale (F.Z.Cui et al.⁶)

Results and Discussions

- (1) A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration (S.Liao et al.^{1,2,3,7,12})

Functional graded materials (FGM) provided us one new concept for guided tissue regeneration (GTR) membrane design with graded component and graded structure where one face of the membrane is porous thereby allowing cell growth thereon and the opposite face of the membrane is smooth, thereby inhibiting cell adhesion in

periodontal therapy. The goal of the present study was to develop a three-layered graded membrane, with one face of 8% nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/poly(lactic-co-glycolic acid) (nCHAC/PLGA) porous membrane, the opposite face of pure PLGA non-porous membrane, the middle layer of 4% nCHAC/PLGA as the transition through layer-by-layer casting method. Then the three layers were combined well with each other with flexibility and enough high mechanical strength as membrane because the three layers all contained PLGA polymer that can be easily used for practical medical application. Fig. 1. shows the schematic representation of three-layered membrane. Fig.2 is the microscopical view of the cross section (b). This high biocompatibility and osteoconductivity of this biodegraded composite membrane was enhanced by the nCHAC addition, for the same component and nano-level crystal size with natural bone tissue. The osteoblastic MC3T3-E1 cells were cultured on the three-layered composite membrane, the primary result shows the positive response compared with pure PLGA membrane.

(2) Fabrication and properties of sintered carbon nanotubes (W.Wang et al.^{4,5,10,14})

A novel bulk multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs) sintered with polycarbosilane (PCS) as a binder agent was fabricated by spark plasma sintering (SPS), and their microstructure and properties were investigated. Sintering was done with the pressure in a range 20MPa to 60MPa at 1200°C. SEM and TEM observations showed that the nano-sized tube microstructure was preserved even after sintering and tubes were adhered each other with the nano-sized nodules of SiC pyrolyzed form PCS as revealed by X-ray diffraction. The bulk density and Vickers hardness were increased and the specific surface area was reduced with the content of PCS and sintering pressure. The inflammatory reaction of CNTs/PCS material was slightly increased with PCS content in the animal experiments. Sintered CNTs with the physical and mechanical properties close to bone and biocompatibility would be suitable as implant materials.

(3) Surface carbide formation on titanium for abrasion resistant implant material (Y.Zhu et al.^{11,13,15})

Physical and mechanical properties of carbide coated Ti were investigated to examine its possible use as an abrasion resistant implant material. Carbide layer was formed on the surface of Ti by heating in the hydrocarbon atmosphere (benzene C₆H₆) at 1000-1200°C. XRD showed that the specimens were consisted of TiC and Ti. SEM showed that the surface of Ti was covered with fine-grains of 1-7µm, depending on heating conditions. Carbide layer of about 4-20µm thickness was observed on the cross section by SEM and EDS. The rate of carbide particle size and layer thickness was increased with heating temperatures. The Vickers hardness of surface carbide was more than 2000. Martens scratch test showed the smaller indentation depths for carbide coated Ti than pure Ti, which confirms its high abrasion resistance.

(4) Preparation of Mineralized Fibroin Fiber (X.Kong et al.⁹)

Fibroin gel was prepared and used to regulate the biomineralization of calcium phosphate in this paper. We obtained one kind of mineralized fibroin fiber with the length of 1-2 millimeter, which has the potential to be used to enhance the strength of tissue engineering scaffold. Scanning electron microscopy (SEM) results showed that hydroxyapatite (HA) was mainly deposited on the surface of the mineralized fiber. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) results displayed the red shifts of absorption bands of amide II and amide III (9cm⁻¹ and 5cm⁻¹, respectively), which were related to the strong chemical interaction between HA and fibroin. It was also found that HA was at low content (12.5%) and the ability of gelled fibroin to induce mineralization decreased greatly because of the formation of β-structure in gelled fibroin molecules, which showed the importance of molecules structure to biomineralization.

(5) One-step synthesis of Fe(II,III)-doped MCM-41 nano-rod (Y.Geng et al.⁸⁾)

Morphogenesis of periodic mesoporous SiO₂ material has attracted much attention, due to the important effects of morphology on their properties, such as catalysis, adsorption/separation, photochemistry, drug delivery, and so forth. Since doping transition metal (TM) in the framework of mesoporous silica is an important subject in such a wide range of field, study on the self-assembly involving morphogenesis of TM-doped mesoporous silica may be helpful for understanding the role(s) of TM on morphogenesis, and for finding a convenient route to prepare materials with complex morphology. In this paper, we described a convenient route for preparing Fe-doped periodic mesoporous silica (MCM-41) nano-rod from the diluted surfactant reaction system. The nano-rod Fe-doped MCM-41 powder was obtained through assembly from a diluted surfactant solution of high pH value (pH=12). The material was characterized by X-ray diffraction pattern (XRD), The thermogravimetric analysis (TGA), transmission electron microscopy (TEM), and the UV-Vis absorption spectrum techniques. The sample was featured with a rod-like morphology with diameter of about 150 nm, length of about 400 nm, and the aspect ratios (length/width) of about 3. It can be substantially proved that the addition of Fe ions can play a significant role on the morphology of MCM-41 from the diluted surfactant solution. This method enriches the strategy for preparing metal-doped MCM-41 of specific morphology.

(6) New Observations to Hierarchical Structure of Human Enamel from Nanoscale to Microscale (F.Z.Cui et al.⁶⁾)

Enamel refers to the outmost crest of tooth that is mostly built up of hydroxyapatite (HA) crystals in well controlled assembly manners. In the present study, human enamel distilled from the mature third molars was investigated by Atomic Force Microscope (AFM), Scanning Electron Microscope (SEM) and High Resolution Transmission Electron Microscope (HRTEM) from macroscale to nanoscale indicating the high complexity of enamel microstructure in regard to hierarchy. Based on the observations, 7 hierarchical levels of the microstructure were proposed and described with the scheme representing a complete spectrum of the organization in detail. Meanwhile, we discussed the most possible matching between the hierarchical structure of enamel and its mechanical properties at each level.

Conclusions and Acknowledgements

The present subject is related to the health and environment of all over the world, which must be discussed and developed with the international point of view and collaboration. In this point of view it was a good opportunity to have the international symposium, the 5th Asian Bioceramics Symposium (ABC2005), held on Oct. 1-3, 2005 at Hokkaido University, Sapporo, Japan (Organizing Chaiman: F.Watari). The symposium brought together the top researchers worldwide to exchange research results and address open issues in all aspects of bioceramics and their related topics. The details of the symposium can be found at the homepage (<http://www.den.hokudai.ac.jp/rikou/events/ABC/index.html>). Prof.Cui, invited speaker, and two young researchers in Tsinghua University made important contributions as well as three Chinese postdoctor and graduate students in Hokkaido University. The Proceedings, Archives of BioCeramics Research (Volume 5), were published with the compilation of 104 papers. Fig.3 is the group photograph of the whole participants in the symposium. The authors appreciate Japan-China Medical Association greatly for the financial aid of Collaboration Research Project Grant.

References (研究成果)

<学術誌/原著論文>

- 1) S.Liao, W.Wang, M.Uo, S.Ohkawa, T.Akasaka, K.Tamura, **F.Cui, F.Watari**: A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration, *Biomaterials* 26(2005), 7564-7571
- 2) S.Liao, **F.Watari**, M. Uo, S.Ohkawa, K.Tamura, W.Wang, **F.Cui** : The Preparation and Characteristics of a Carbonated Hydroxyapatite/Collagen Composite at Room Temperature', *J.Biomed.Mater.Res.B (Appl.Biomater.)* 74B (2005) 817-821
- 3) S.Liao, K.Tamura, Y.Zhu, W.Wang, M.Uo, T.Akasaka, **F.Cui, F.Watari**: Human neutrophils reaction to the biodegraded nano-hydroxyapatite/collagen and nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactic acid) composites, *J. of Biomedical Materials Research A* 76(4), 820-825, 2005
- 4) W.Wang, M.Omori, **F.Watari**, A.Yokoyama: Novel Bulk Carbon Materials for Implant by Spark Plasma Sintering: *Dental Materials Journal*, 24 (4), 478-486, 2005

<国際学会発表/プロシーディング論文>

- 5) W.Wang, A.Yokoyama, M.Omori, S.Liao, T.Akasaka, M.Uo, **F.Watari**: Fabrication and properties of sintered carbon nanotubes, *ISET05 (International Symposium on EcoTopia Science 2005)*, Aug.8-9th, 2005, Nagoya, Extended Abstracts, 649-650
- 6) **E.Z.Cui**, J.Ge : New Observations to Hierarchical Structure of Human Enamel from Nanoscale to Microscale, *Archives of BioCeramics Research Volume 5, Asian BioCeramics Symposium 2005 Sapporo, Japan*, P10-14
- 7) S.Liao, **F.Watari, F.Cui** : A Three-layered Nano-Carbonated hydroxyapatite/Collagen/PLGA Composite Membrane for Guided Tissue Regeneration, *Archives of BioCeramics Research Volume 5, Asian BioCeramics Symposium 2005 Sapporo, Japan*, P242-247
- 8) Geng Y, **Cui FZ**, Cai Q, Li HD, Yao YW : One-step synthesis of Fe(II,III)-doped MCM-41 nano-rod, *Archives of BioCeramics Research Volume 5, Asian BioCeramics Symposium 2005 Sapporo, Japan*, P306-310
- 9) X.Kong, X.Sun, Y.Zhang, **F.Cui**: Preparation of Mineralized Fibroin Fiber, *Archives of BioCeramics Research Volume 5, Asian BioCeramics Symposium 2005 Sapporo, Japan*, P311-315
- 10) W.Wang, A.Yokoyama, M.Omori, S.Liao, Y.Zhu, T.Akasaka, M.Uo, **F.Watari** : Carbon Nanotube Material for Implant Materials Prepared by Spark Plasma Sintering, *Archives of BioCeramics Research Volume 5, Asian BioCeramics Symposium 2005 Sapporo, Japan*, P302-305
- 11) Y.Zhu, M.Shimozuma, M.Uo, W.Wang, T.Akasaka, **F.Watari**: Surface carbide formation on titanium for abrasion resistant implant material, *Archives of BioCeramics Research Volume 5, Asian BioCeramics Symposium 2005 Sapporo, Japan*, P368-371

<国内学会発表/抄録>

- 12) 廖素三、**亙理文夫**、宇尾基弘、田村一央、王蔚、**崔福斎** : 新しいナノ炭酸ハイドロキシアパタイト/コラーゲンに基づいた材料の歯科応用、*歯科材料・器械* 24 (2)、平成17年度春期 第45回日本歯科理工学会学術講演会プログラムおよび講演集 (日本歯科理工学会)、Apr. 2005
平成17年度春期 第45回日本歯科理工学会学術講演会、2005/4/16・17、東京 (タワーホール船堀)
- 13) 朱禹赫、下妻光夫、横山敦郎、宇尾基弘、大川昭治、王蔚、**亙理文夫** : 炭化改質チタン生体材料特性、*歯科材料・器械* 24 (2)、同上
- 14) 王蔚、横山敦郎、廖素三、宇尾基弘、赤坂司、大川昭治、菅原敏、**亙理文夫**、大森守 : 焼結したカーボンナノチューブ固体化の生体適合性、*歯科材料・器械* 24 (2)、同上
- 15) 朱禹赫、下妻光夫、王蔚、宇尾基弘、赤坂司、菅原敏、**亙理文夫** : 炭化炭素雰囲気中で表面炭化したチタンの耐磨耗性生体材料特性、*歯科材料・器械* vol.24 No.5 Sep.2005, 292 /第46回日本歯科理工学会学術講演会プログラム (平成17年秋期・長崎、H17.9.15-16/長崎ブリックホール)

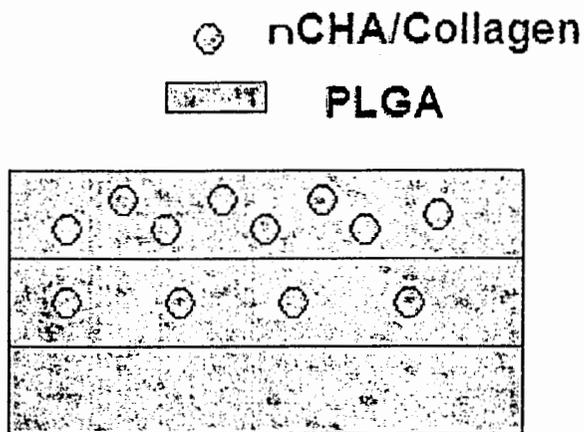


Fig. 1. Schematic representation of functionally graded GTR(Guided Tissue Regeneration) membrane



Fig. 2. Cross section of three-layered GTR membrane of nCHAC/PLGA composite with graded concentration of apatite (Thickness 0.4mm)

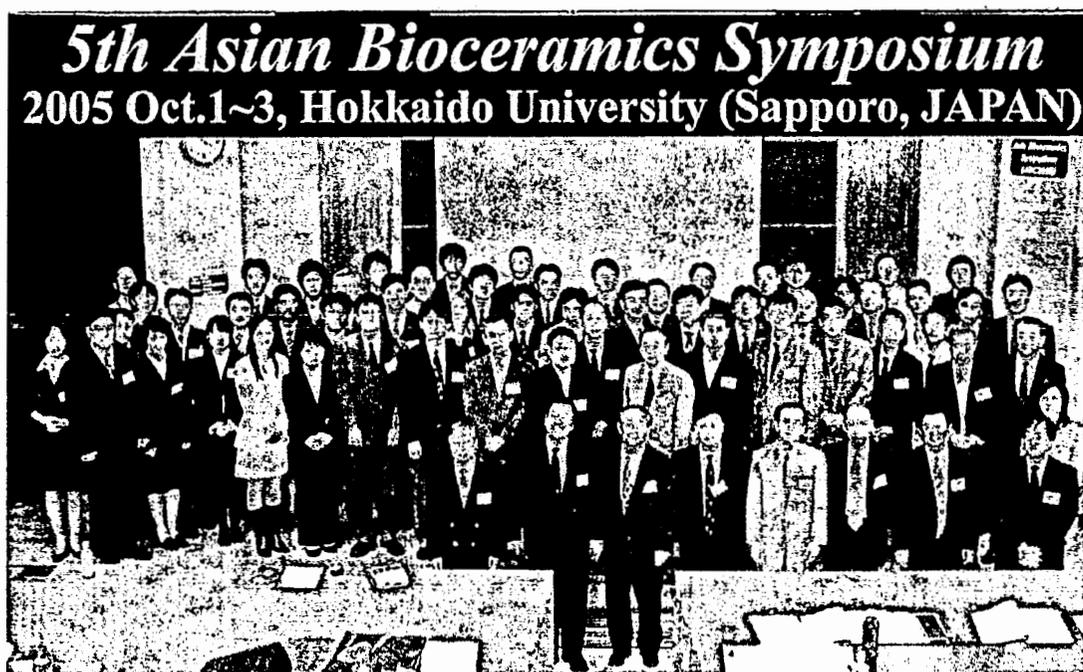


Fig.3 Group photograph of the whole participants in the ABC2005 symposium

作成日：2006年3月14日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2006年 3月 21日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 和田洋巳



所属機関名： 京都大学

所属部署： 医学研究科呼吸器外科 職名： 教授
〒 606-8507

所在地： 京都市左京区聖護院川原町54

電話： 075-751-3837 内線： 3837

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

日中移植医療調査

3. 成果の概要 (100字程度)

日中両国で肺移植をはじめとしての移植医療に関する情報を調査した。その結果を京都大学呼吸器外科主催した「日中移植医療調査シンポジウム」で発表し、お互いに理解を深め、将来移植医療の連携に良い準備になった。一方、今後の協力を進める上で、更なる情報集積などが必要であることも明らかとなり、それを進める必要性も認識された。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 和田洋巳 職名： 教授

所属機関： 京都大学 部署： 医学研究科呼吸器外科

中国側研究者氏名： 田大力 職名： 主任教授

所属機関： 中国医科大学第四附属医院 部署： 胸部外科

研究者氏名	和田洋巳
所属機関	京都大学附属病院呼吸器外科
共同研究者名	田 大力
所属機関	中国医科大学附属第四病院胸部外科

1. 要旨

先端医療である臓器移植を東アジアにおいて有効に進めるにおいては日中間の協力が望まれる。そのためには、まず、日中両国における臓器移植の現状を相互に理解することが重要である。一方、日中間に臓器移植ネットワークを構築する上では、医療システム、行政、法体系、社会的通念、歴史的背景など様々な側面における相違が解決すべき課題となる。本研究ではこれら現状、問題点の把握と理解のため、日本および中国において共同調査と分析を、特に研究者・共同研究者の専門分野である肺移植に関して行った。

Key Word 肺移植、ネットワーク、ドナー、レシピエント、臓器保存液

2. 緒言

臓器移植は代替治療のない末期臓器機能不全に対する世界的に確立した外科的治療法であるが、臓器ドナー不足、移植後臓器機能不全、拒絶反応などさまざまな問題が未解決である。中でもドナー不足は深刻である。たとえば日本でこれまで登録された移植待機患者数は心臓、肺、肝臓、膵臓、腎臓、小腸を合わせ28185人であるが、実際に移植を受けられたのは2722人と登録患者中わずか9.6%である。しかも、これらの多くは健常ドナーに負担を強いる生体移植、あるいはドナー臓器の損傷(虚血再灌流(傷害)が強く腎など一部の臓器にしか適用できない心停止移植である。この結果、最も望ましい脳死ドナーからの臓器提供は32件、それによる脳死移植手術は121例であり、上記登録者の0.4%に過ぎない。その最大の理由は、社会への周知不足や生死観その他から、我が国では脳死臓器提供に同意される方が殆どおられないことにある。さらに、脳死臓器ドナーが現れても血液型や免疫学的適合性を規定するHLAの不適合や、遠隔地からの長い搬送時間などの理由により使用できないドナー臓器も存在する。

多くの国で臓器移植が行われるヨーロッパでは、貴重なドナー臓器の最大限の活用と最適なレシピエント選択による移植成績向上のためユーロトランスプラントやスカンジアトランスプラントなどの国際臓器移植ネットワークが存在する。これらのネットワークは各国国内ネットワークとも連携を行っている。現在、アジアではこの様な国際的ネットワークは存在せず、日本では日本移植ネットワークが活動を行っている。一方、中国でも多数の臓器移植が行われているが、その詳細、ネットワークの存在や活動は未知である。日中間での国際的な移植ネットワークは、両国でのドナー臓器の有効利用、さらには移植医療の進歩、患者福祉の向上に貢献する。さらに、このような取り組みは、将来望まれる環日本海あるいは東アジアにおける移植ネットワーク構築への重要な基盤になりうる。

3. 日中移植医療調査シンポジウム

一年間に渡る両国における調査研究成果を持ち寄り、2006年3月11日、京都大学医学部研究科構内の芝蘭会館において「日中移植医療調査シンポジウム」を開催した。参加者は日本側が、和田洋巳、板東徹をはじめとする京都大学呼吸器外科医師と移植コーディネーター、大学院博士課程学生、京都大学探索医療センター中村隆之、中国側が本研究の共同研究者である中国医科大学附属第四病院胸部外科の田大力である。その他、少数ではあるが、学外の方も参加された。シンポジウムでは日本と中国における肺移植の現状について相互に演題を発表し、日中両国の現状理解と将来の展望について議論を行った。その要旨を以下に示す。

3-1. 『日本における肺移植の現況』

(発表者：京都大学呼吸器外科講師 板東徹)

非常に重症で他に代替治療法の存在しない肺疾患患者に対する肺移植は世界的に確立しているが、臓器ドナー不足や拒絶など解決すべき問題もある。1998年の日本初の生体肺移植術後、始まった日本における肺移植の現況を、主に世界と比較して行った。

【肺移植の歴史】

世界的には1983年、カナダ・トロント大学で臨床肺移植成功し、現在では年間1500例以上、総計で2000例が行われた。一方、日本では1997年、「臓器移植法」が制定され、1998年10月、最初の生体肺移植が岡山大学にて、2000年3月、最初の脳死肺移植、東北大学、大阪大学にて行われた。

【肺移植実施認定施設】

肺および心臓肺移植協議会の認定施設でのみ行われる。東北大学、京都大学、大阪大学、岡山大学の4施設に2005年5月から千葉大学、独協大学、福岡大学、長崎大学の4施設が加わり、現在、8施設が認定されている。

【肺移植の適応】

以下の条件を満たす必要がある。①最大限の内科的・外科的治療でも改善しない。②生命の危険が迫っている。③2年後の生存率が50%未満である。④肺移植によって回復が期待できる。

【適応疾患】

代表的な疾患は、原発性肺高血圧症、特発性肺線維症、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、気管支拡張症、肺リンパ脈管筋腫症などである。日本は原発性肺高血圧症と肺リンパ脈管筋腫症が多いのが特徴である。

【術式】

肺移植は、臓器提供者（ドナー）が脳死と生体の場合がある。脳死肺移植には片肺移植、両肺移植がある。一方、生体肺移植は、2名の健常なドナーより、左右の肺の一部を移植する肺葉肺移植である。1998年10月～2005年12月で脳死肺移植24例、生体肺移植49例、合計73例が行われた。脳死ドナーが極めて少ないため生体肺移植が多いことは日本の特徴である。手術数は2001年以降、年間10例前後で横ばいである。

【脳死ドナー不足】

人口100万人あたりの脳死ドナーの数は、欧米は10～20人に対して日本では0.4人に過ぎない。一方、脳死ドナーのうち、肺が移植に用いられる割合は欧米では15～30%程度だが、日本では50%と比較的高く、少ない脳死ドナー肺の有効利用に努めている。新規に年間約40人が日本臓器移植ネットワークに肺移植待機患者として登録される。しかし、年間15人程度が移植手術に至らず、待機中に亡くなられる。実際に脳死肺移植に至るのは年間5人にも満たない状況であり、現在、日本では待機患者数が増加する一方である。2006年現在で約120人が登録待機されている。

【術後成績と生活の質】

世界での肺移植の術後1、3、5年生存率はそれぞれ70、50、45%程度であるのに対して、日本では84%、79%、77%と良好である。術式別の生存率では生体肺移植、脳死両肺移植、脳死片肺移植の順に良好である。一方、移植待機患者で、移植を受けられない患者の5年生存率は30%に満たず、肺移植数増加による末期呼吸不全患者の生存率向上が期待される。肺移植術後について80%以上は呼吸困難を感じないか、軽度感じる程度であった。また、80%以上の患者はなんらかの形で社会復帰が可能であった。

【移植臓器の分配、情報管理】

日本では国の認可している唯一の組織である（社）日本臓器移植ネットワークが行う。公平公正な移植医療の実現、移植医療の普及啓発、移植希望者の登録とデータ整理などを行うため臓器移植ネットワークが存在する。24時間体制でドナー情報への対応を行う。全国8箇所に移植ネットワーク支部があり、組織は主に移植コーディネーターから構成される。現在、移植コーディネーターは認定資格ではないが、移植に関する専門的な活動や患者サポートを充実させるためコーディネーターの資格化が望まれる。

【今後の日本における課題】

深刻なドナー不足を改善するため今後、より一層の移植医療の啓蒙、心停止後臓器提供の可能性の模索や法改正など新たな取り

組みが必要と考えられる。

3-2. 『中国における肺移植の現況』

(発表者：中国医科大学附属第四病院胸部外科主任教授 田大力)

中華医学会臓器移植学会のデータを主な情報源として調査を行った。

【中国における肺移植の歴史】

1979年北京結核病研究所にて第1例目の片肺移植が行われたが、免疫抑制剤や手技的な問題から成功しなかった。1995年以降も単発的に肺移植が行われていたが、良好な成績は得られなかった。2002年以降、海外で臨床経験をもつ医師の帰国により症例数が増加し、2002年以降、34例の肺移植が行われた。移植施設は4施設で、無錫市胸科医院18例、上海肺科医院11例、大連大学附属医院3例、瀋陽陸軍医院2例であった。

【レシピエント選択基準】

虚血時間が8時間以内、ABO式血液型が一致、待機期間(長期待機患者を優先)、術式(両肺・片肺・心肺の順に優先)など世界的なレシピエント選択基準に準じて行う。さらに移植費用(約1,000万円)の支払能力も選択基準になる。従って中国では多くの患者が経済的理由から移植手術に至らないケースが多い。

【肺移植患者の原疾患】

肺炎腫17例、肺線維症7例、気管支拡張症4例、硅肺3例、アイゼンメンジャー症候群1例、肺リンパ脈管筋腫症1例、不明1例(計34例)であった。

【術後管理と手術成績】

人工呼吸管理を18~72時間、離床は術後3日目に行う。術後の在院期間は1~3ヶ月程度である。34例中29例が現在生存中で、移植後生存期間は1年以内:16人、1~2年:7人、2~3年:6人である。死亡例は5例で、多くが術後1月以内であった。死因は術後出血、急性拒絶反応、感染、肺梗塞、および、乳び胸であった。生存例を含めて、全例で急性拒絶反応を認めしたが、多くはステロイドパルス療法が奏功した。

【中国におけるドナーおよびレシピエントの管理、臓器の分配、移植希望患者の登録方法】

現在、中国には全国的な臓器移植ネットワークは存在しない。ドナー情報は各省の衛生庁、市衛生局が管理し、ドナーが発生すると衛生庁または衛生局が各移植施設へ連絡をとる。レシピエントについては各移植施設で、移植希望患者の登録、情報管理を行い、ドナー臓器申請を各省の衛生庁または市衛生局に提出する。

【今後の改善点】

中国では肺移植に約1000万円の費用自己負担が必要であるため治療費が支払えず移植を断念するケースが多い。今後、経済的負担を軽減する医療保険の適用が望ましい。また、移植後3年以上経過した患者が今後出てくるため、移植術後長期生存成績の向上のために、慢性拒絶反応の診断と対策、退院後及び外来通院指導の強化が必要である。

3-3. 『新しい臓器組織保存液 ET-Kyoto 液の開発と臨床応用』

(発表者：京都大学探索医療センター助手 中村隆之)

肺、腎臓、肝臓、心臓、脾臓、腸管などの末期機能不全患者に対する臓器移植は世界的に臨床医療として既に定着している。例えば、肺移植は全世界での年間手術数が1500例を超え、末期呼吸不全に対する唯一の治療手段としてその有用性が確立している。本邦においても1997年の脳死移植法成立後、1998年に初の生体肺移植、2000年には初の脳死肺移植が施行され、これまでの術後5年生存率は50%程度であり、これは他に有効な治療法が存在しない病態に対する治療法として、ある程度満足しうる治療成績である。しかし、急性・慢性拒絶、免疫抑制に伴う感染症、移植後臓器機能不全(primary graft failure)など、解決すべき合併症も多い。

このうち、primary graft failureは肺移植後、特に早期に発生し、術後30日以内における主たる死亡原因である。多くの場合、primary graft failureは臓器血流の途絶(虚血)と再開(再灌流)に起因する臓器傷害、すなわち虚血再灌流傷害に起因すると考えられて

いる。このため、虚血再灌流傷害を軽減する信頼性の高い臓器保存液の開発は、移植術後の臓器機能を改善し手術成績の向上をもたらす。

また、移植医療に提供される臓器の不足（ドナー不足）は深刻であり、待機リストに登録されながら移植手術を受けることなく死亡される患者も多い。このドナー臓器不足、とくに脳死ドナー不足の原因として、まず、移植医療や脳死判定に対する社会的認知が十分でないことがあげられる。同時に、肺移植においては約10時間以内という虚血時間の限界から、遠隔地に発生した脳死患者から提供される臓器（マージナルドナー）を有効利用できないこともドナー不足を助長している。すぐれた臓器保存液の開発は、マージナルドナーの利用を可能にすることで、ドナー不足の軽減にも寄与する。

このため、京都大学呼吸器外科はより信頼できる新たな臓器組織保存液ET-Kyoto液の開発を行った。ET-Kyoto液は、細胞保護作用を有する非還元性二糖類トレハロースと細胞外液型（=低カリウム濃度）電解質組成を特長とする。ET-Kyoto液は当初、肺保存液として開発され、動物実験では20時間の肺保存の成功をもたらした。この成功を受け、京都大学呼吸器外科ではこれまで既に6例の臨床肺移植にET-Kyoto液を使用している（2006年3月現在）。

さらに、近年、ET-Kyoto液の有効性は、肺のみならず、腎、肝、膵島、切断肢指などの保存において証明され、これら臓器の臨床移植手術に応用されている。

今後は、臨床症例数を増やし科学的解析を行うことでET-Kyoto液の有効性を更に立証したい。また、臨床他用途、バイオ・再生医療研究など、周辺分野でもET-Kyoto液の適応拡大、有効性の確認を行い、よりよい医療の実現に貢献したく考えている。

日中移植医療協力の観点においては、中国でもET-Kyoto液の有効性をまず実験的に確認していただき、その上で、臨床応用の可能性を検討したい。ET-Kyoto液の使用により日中両国間でのドナー臓器の移送が可能となれば、ドナー臓器の有効な利用が可能になり、日中、更には東アジア圏での移植医療の質的向上につながるものと期待される。

3-4. 『中日両国医療施設共同肺移植の可能性』

（発表者：中国医科大学附属第四病院胸部外科主任教授 田大力）

日中間での技術交流は両国の移植医療に利益をもたらすと考えられる。共同研究者である田大力は、日本語が堪能であり、所属する中国医科大学第4病院と、京都大学呼吸器外科の技術交流、情報交換の重要性を再確認した。同病院ではまだ肺移植が行われていないが、最初の数例において京都大学呼吸器外科による援助（手術手技、術後管理）を得て良好な成績を得ることは、今後、中国での肺移植医療推進のため非常に有用であると考えられた。

4. 結語

本研究では日中両国における移植医療、特に肺移植の現状に調査を行い、互いの情報交換を行った。移植に関する情報の多くが非公開な中国での現状を把握することができ、貴重な知見を得た。それと同時に日本での移植医療の現状についての情報はこれから移植医療を推進しようとする中国にとっても参考になったと考える。

同時に、移植医療先進国である欧米における医学、医療、行政、社会など各側面における情報を更に集積し、それを、日中両国において咀嚼・吸収することの重要性が認識された。

今後、日中両国における移植医療の普及と定着を目指す上で両国の現状や問題点の相互理解と情報共有するためのネットワーク構築は大きなステップになる可能性がある。今回の共同研究において確立された相互理解協力体制をもとに、このネットワークの構築実現を目指して、今後も積極的に共同研究を進める必要があると実感された。

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2006年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 藤 浩 
所属機関名： 静岡県立静岡がんセンター
所属部署： 陽子線治療科 職名： 医長
〒411-8777
所在地： 静岡県駿東郡長泉町下長窪1007
電話： 055-989-5222 内線： 6131

1. 助成金額： 700000 円

2. 研究テーマ

粒子線治療を効果的に提供するための適応基準、効率的運用に関する日中共同研究

3. 成果の概要（100字程度）

日本と中国の最新の陽子線治療施設の設備、運用状況を調査した。その結果に基づき両施設の運用効率の改善と適応拡大の方法について協議した。また両施設間の共同研究の方法についても討議した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 藤 浩 職名： 医長
静岡県立静岡がんセンター 陽子線治療科
所属機関： _____ 部署： _____
中国側研究者氏名： 黎 功 職名： 副主任
山東省腫瘤医院
所属機関： _____ 部署： 放射線治療科

粒子線治療を効果的に提供するための適応基準、効率的運用に関する日中共同研究

研究者氏名 藤 浩
日本研究機関 静岡県立静岡がんセンター 陽子線治療科
共同研究者 黎 功*、李 家敏#、陳 慶*
中国研究期間 山東省腫瘍医院*、万傑陽子治療センター#

要 旨

【背景】日本は各国に先駆けて病院併設型の粒子線治療装置を複数建設し、粒子線治療の実用化を試みてきた。その結果粒子線治療の運用効率化、適応拡大が行われてきたが、これらは重要な問題として残されている。中国でも2004年に粒子線治療が開始されたが、運用状況については知られていない。この研究では中国と日本の施設における粒子線治療実用化の状況を比較し、両施設の問題点と解決策を分析する。【方法】ほぼ同時期に稼働開始した日本（静岡がんセンター）と中国（万傑陽子治療センター）の陽子線治療施設の整備状況を調査し、比較する。日本と中国の陽子線治療の運用状況の現地調査を行う。【結果】日本の陽子線治療施設では体幹部腫瘍を主たる治療対象として整備されており、治療された症例も前立腺がん、肝臓がん、肺がんが多い。中国の陽子線治療施設は日本よりも頭部の腫瘍を治療対象として整備されており、脳腫瘍、頭頸部腫瘍の症例が多い。治療室利用時間は日本の施設よりも中国の施設の方が長い。しかし日本の施設では肝臓がん、肺がんに対して呼吸同期による高精度照射が行われているため、それらの疾患の治療時間、セットアップ時間が長い。中国の施設では体幹部の腫瘍の治療を行える治療室が1室しかないので、短時間の治療が行なわれ、1日の稼働時間を長くしている。【結論】運用効率の改善、欧米とは異なる疾患への粒子線治療の適応拡大が望まれている点では、両国の施設の問題点は共通している。しかしこれらの問題に対する対処は両施設で異なる。二つの施設の対処法の優劣を客観的に評価し、優れた技術と運用法を相互にとりこむことが両国の施設にとって有益である。

Key Words 荷電粒子線治療、陽子線治療、効率、呼吸同期照射

緒 言

近年悪性腫瘍に対する荷電粒子線による高精度の放射線治療の有効性を示す報告が相次ぎ、各国の注目を集めている¹⁻⁵⁾。荷電粒子線は体内の特定の深度で最大のエネルギーを付与するというBragg-peakといわれる特徴を持つ。Bragg-peakを利用すると腫瘍には従来よりも高い線量を投与し、周囲の正常組織の線量は低く抑えることができる。この代表的な荷電粒子線である陽子線治療が始まった1950年代から1980年代までは眼球のぶどう膜悪性黒色腫や頭蓋底の脊索腫といった比較的稀な頭部の腫瘍を対象として研究的な治療が行われてきた。1990年より米国で現地診療として行なわれるようになり、適応疾患も前立腺がんなどの体幹部の悪性腫瘍に拡大してきた⁶⁾。

我が国では、1983年よりアジア各国に先駆けて高エネルギー研究所内の加速器を利用して、荷電粒子線治療の研究が始められた。その研究成果により荷電粒子線治療の臨床的有用性が認められ、1994-2003年の間に6つの粒子線治療施設を建設され、現在粒子線治療施設の数では世界でもっとも多い。国内の6施設中5施設は病院併設の加速器を用いて、悪性腫瘍の治療を主たる目的として運用されている。我国はこれらの施設での研究開発や治療実績を通じて、荷電粒子線治療の実用化のための運用効率化、粒子線治療の適応の拡大を行ってきた^{4,5)}。

こういった粒子線治療の効率的運用、適応疾患の明確化という問題において、国内の施設は欧米の施設とは異なる状況にある。多くの欧米諸国では粒子線治療が保険適応となっており、粒子線治療に要する費用を公的

に補助する制度が確立しているため、粒子線治療患者の経済的負担が少ない。このため施設の患者収集力が高く、収益も高く、経済的理由から施設の運用効率を上げる必要性は低い。また日本人においては代表的な粒子線治療の適応疾患である眼球の悪性黒色腫や前立腺がんの有病率が、欧米人の有病率よりも低いため、日本人のがんの有病率に基づいた適応の拡大が求められている⁶⁷⁾。

2004年中国の万傑陽子治療センターに最初の陽子線治療装置が導入された。医療制度や悪性腫瘍の部位別死亡率を考慮すると、これまで日本国内の施設が進めてきた運用の効率化や治療適応の拡大してきた経験は、新たに中国で導入された施設においても有益であると思われる。また新施設として、運用や治療適応基準を変えるような、新たな試みが行なわれれば、既存の日本国内の粒子線治療施設として学ぶべきものがある。しかしこれまで日本国内の粒子線治療施設では、中国の万傑陽子治療センターの状況についての情報は得られていない。この研究では中国と日本の粒子線施設における運用の効率化と適応拡大の状況を比較し、両施設の問題点と解決策を分析して、相互の施設にとって有益な方策を検討する。

方法

国内の最新の粒子線治療施設として2003年7月に稼動開始した静岡県立静岡がんセンターと、2004年12月に中国で最初の粒子線治療施設として、稼動開始した万傑陽子治療センターの施設の整備状況を調査する。両施設において治療対象となった疾患の部位を調査する。治療の運用効率を比較するために、両施設において治療準備の作業量、1回の治療に要する時間について調査する。

結果

1) 静岡がんセンターと万傑陽子治療センターの設備

静岡がんセンターでは三菱電機製シンクロトロンから発生した陽子線を利用して治療している。110MeV・230MeVに加速された陽子線により16cmの深さの病変まで治療が可能である。治療室は回転ガントリー室2室、水平固定ポート室1室の計3室である。回転ガントリー室の治療では、臥位になった患者の様々な角度から照射できるため、体幹部と頭頸部の治療を行うことができる。水平固定ポート室では患者を座位になり頭部の照射のみが可能である。回転ガントリー室のうち1室は呼吸の相に合わせて高精度の照射を行う呼吸同期照射装置が整備されている。体幹部の大きな腫瘍の治療を効率的に行なうために多葉コリメータが装備されている。

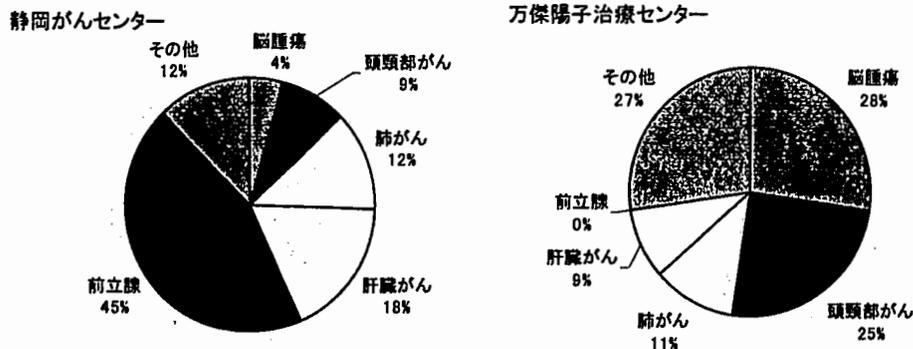
万傑陽子治療センターにはベルギーIBA社のサイクロトロンが導入されており、230MeVに加速された陽子線のエネルギーを減衰させて治療している。IBA社は米国のマサチューセッツ総合病院の北東陽子線治療センター(Northeastern Proton Therapy Center : NPTC)に陽子線治療装置を導入し、導入後もNPTCと装置の開発を続けてきたメーカーである。万傑陽子治療センターの治療装置は静岡がんセンター同様に16cm程度の深部までの病巣の治療が可能である。回転ガントリー室1室、水平固定ポート室1室の計2室で治療が行われている。呼吸同期照射装置はない。多葉コリメータはなく、すべての患者で特注コリメータを作成している。患者位置決め作業時に使う変位の計算装置として、NPTCで開発されたDIPS(Digital Image Positioning System)が採用されている。また撮影装置には高精細の画像がえられるFlat Panel Displayが採用されているなど、最新の位置決め装置が装備されている。

2) 静岡がんセンターと万傑陽子治療センターの粒子線治療の対象疾患

静岡がんセンターの治療患者では、前立腺がんの患者が45%を占めて最も多い。ついで肝臓がん(18%)、肺がん(12%)の順に続く。万傑陽子治療センターでは、脳腫瘍(28%)と頭頸部がん(25%)を合わせて53%を占めている。肺がん、肝臓がんがこれにつづいている。肝臓がんは東アジアに多く発生する疾患であるため、静岡がんセンターや万傑陽子治療センターでは、全陽子線治療症例の9-18%をしめているが、欧米ではほとんど陽子線治療の適応とならない。中国では前立腺がんは陽子線治療の対象となっていない。欧米で最も陽子線治療

の実績のあるぶどう膜黒色腫は日本や中国では治療されていない。

図 1.



3) 静岡がんセンターと万傑陽子治療センターの粒子線治療の運用

I. 治療準備作業の比較

粒子線治療では一般的なX線治療では行なわれないような特殊な準備作業が必要である。輪郭入力や照射野作成などX線治療でも行なうような準備作業であっても、より緻密な検討が必要とされる。また精密かつ大規模な加速器を用いていることから、形成された照射野の検証作業にも正確さが求められる。このため粒子線治療の準備作業には、X線治療よりも長い準備期間を要することがある。表1に両施設における準備作業の担当者と作業時間を示した。作業担当者の職種をみると万傑陽子センターでは、静岡がんセンターに比べ、物理士の役割が大きいことがわかる。また静岡がんセンターでは照射形成器具の作成や検証作業に、万傑陽子治療センターよりも長い時間が費やされていることがわかる。

表 1. 静岡がんセンターと万傑陽子治療センターの治療準備作業担当者と作業時間の比較

	輪郭入力 担当者・作業時間(分)	照射野作成 担当者・作業時間(分)	照射野形成器具作成 担当者・作業時間(分)	検証 担当者・作業時間(分)
静岡がんセンター	医師 (77.7)	医師・物理士 (97.3)	技術者 (555.6)	物理士・技術者(134)
万傑陽子治療センター	医師・物理士(60-90)	物理士 (60-600)	技術者 (30-300)	物理士 (60)

II. 治療時間の比較

静岡がんセンターと万傑陽子治療センターの治療室の利用時間を調査した結果を表2に示す。静岡がんセンターの平均治療室利用時間は18.7分と万傑陽子治療センターの28分に比べ短い。両施設の治療室利用時間の差はセットアップに要する時間(寝台に上がるまでの時間+X線写真による位置調整時間)に起因する。静岡がんセンターのセットアップ時間が9.8分であるのに対し、万傑陽子治療センターのセットアップ時間は20-25分であった。静岡がんセンターの平均照射時間は3.5分で、万傑陽子治療センターの照射時間(<1分)よりも長かった。静岡がんセンターでは1日8時間治療をしているが、万傑陽子治療センターでは1日15時間、午前0時まで治療しているということであった。静岡がんセンターにおけるX線写真による位置調整時間

と照射時間を見ると、治療する部位毎に大きく異なることがわかる。肺がんや肝臓がん症例のX線写真による位置照合時間は前立腺がんの2.5-4.5倍の時間を要していた。肺がん、肝臓がんの照射には前立腺がんの7-9.5倍の時間が費やされていた。

表 2. 静岡がんセンターと万傑陽子治療センターの治療時間の比較

	寝台に上る までの時間(分)	X線写真による 位置調整時間(分)	照射装置 待機時間(分)	照射時間(分)	治療室利用 時間合計(分)	1日の治療 時間(時間)
静岡がんセンター 全例	4.3	5.5	52	3.5	18.7	8
肺がん症例	5.4	12.6	10.9	10.4	39.4	
肝臓がん症例	6.0	7.1	5.5	7.7	26.3	
頭頸部がん症例	5.4	5.7	1.8	1.2	7.9	
前立腺がん症例	3.6	2.8	3.9	1.1	11.3	
万傑陽子治療センター	10	10-15	2-7	<1	28	14

考 察

この研究では日本と中国の陽子線治療施設において適応拡大、運用効率化が求められているにもかかわらず、異なる方策がとられていることがあきらかになった。中国における陽子線治療の適応部位は、日本の陽子線治療の適応部位と大きく異なっていた。これには二つの要因が関与していると考えられた。第1の要因は治療施設の実態ならびに導入経緯にあると考えられる。1996-2003年に日本国内に導入された粒子線治療施設は、開発当初から体幹部の腫瘍への適応拡大をみこんでいたため回転ガントリー照射室や、垂直方向の固定ポートなどの照射室を中心に整備してきた。また胸部や上腹部の治療の高精度の照射を可能にする呼吸同期照射装置も積極的に導入してきた⁸⁾。一方、米国のマサチューセッツ総合病院のNPTCでは前身のHarvard Cyclotron Laboratory時代から頭頸部腫瘍、眼球のぶどう膜黒色腫などで治療の実績を上げてきた⁹⁾。万傑陽子治療センターはNPTCに導入され、開発されてきたIBA社の陽子線治療装置を導入している。そのため位置の照合装置、治療計画装置において最も先進的な装置を有している。しかし、その一方で日本国内の粒子線治療装置に備わっている呼吸同期照射装置はNPTCの装置と同様、装備されていない。その結果、日本国内の施設では体幹部腫瘍の症例が中心となり、中国の施設で頭頸部腫瘍の症例が中心となっていると考えられる。

日本と中国の陽子線治療の適応部位が異なる第2の要因は部位別のがんの発生頻度の違いにあると思われる。日本、米国では前立腺がんによる死亡が全てのがんによる死亡の4.5-9.4%を占める¹⁰⁾。しかし中国の前立腺がんによる死亡率は欧米諸国の1/20程度といわれている⁹⁾。このため前立腺がん患者が陽子線の治療対象となることも極めて稀であると考えられる。一方欧米では治療機会の少ない肝臓がんに対する治療症例の割合は日本では18%、中国でも9%と比較的高かった。肝臓がんは東アジアで高頻度に発生するがんで、中国および日本ではがんの死亡原因の3位を占めている¹⁰⁾。万傑陽子センターの治療関係者からも肝臓がんの陽子線治療に対する強い関心がしめされたことから、今後症例数が増えることが予想される。

陽子線治療の準備作業は多くの労力を要することから、準備作業の効率は施設全体の運用効率にも大きな影響を与える。従来7週間で進んでいた治療を2週間で実施するといった短期間の治療を実施するようになると、準備作業時間が長いことが運用効率改善の障害となる。日本と中国の準備作業の時間の比較をみると、一見大きな違いはないように見える。しかし作業担当者を見ると、日本の施設に比べ中国の施設では準備作業に

おける物理士の役割が大きいことがわかる。中国の施設の物理士を中心とした体制は欧米の粒子線治療施設と似ている。中国の施設のような体制をとることで、医師の負担を減らし、それぞれの作業の担当者の専門性を高めることにつながる。その結果作業効率が高くなり、事故の発生を防ぐことになる。このような体制について日本の粒子線施設が学ぶべき点は多い。

日本と中国の治療室利用時間を比較してみると、中国の施設では1患者あたりの治療室利用時間は長い、稼働時間を長くして、多くの患者を治療しているようである。特に体幹部の腫瘍のための治療室が1室しかない状況では、稼働時間を長くするのは当然の対処といえる。今回の調査では中国の施設では、セットアップ時間が日本の施設よりも時間がかかっていた。しかし、この作業の効率は治療技師の技術の向上や患者の治療に対する理解度の向上で大幅に改善する。この調査をおこなったのは、静岡がんセンター運用開始後2年、万傑陽子治療センター運用開始後1年後であったことを考えると、今後はこのセットアップ時間の施設間の差は小さくなっていくと思われる。むしろ今後問題になると予想されるのは、静岡がんセンターの肺がん、肝臓がんの治療例におけるセットアップ時間と治療時間の長さである。これらの臓器でセットアップ時間がかかる理由は、解剖学的な位置決め指標が不明瞭であること、呼吸などにより不安定であることによる。静岡がんセンターの肺がん、肝臓がんの治療で照射時間が長くなるのは、呼吸同期照射を採用していることによる。呼吸同期照射では吸気相―呼気相の中の約5%程度の呼気相の間しか照射されない¹⁰⁾。このような照射法は、腫瘍の位置を再現させるためには理想的な方法である。しかし万傑陽子治療センターのように呼吸同期照射法を用いなくても、十分に良好な成績が得られるかもしれない。施設の運用効率の改善の視点から、呼吸同期照射の実質的な治療効果、毒性抑制効果を再評価する必要がある。

本研究では粒子線治療装置の運用効率の改善、適応拡大の方策を探るために日本、中国の最新の粒子線治療装置の施設、運用状況を調査し比較検討した。両施設の整備状況や運用方法は導入の元となった先行施設の設備や適応基準、運用方法に強く影響されており、両施設は対照的な特性を持っていた。その特性は施設の優劣を示すものではなく、それぞれの施設の特性を異なる視点から評価し、より普遍的な解決策を見出すことが重要である。

1. Suit H.: The Gray Lecture 2001: coming technical advances in radiation oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 53(4):798-809,(2002).
2. Levin WP, Kooy H, Loeffler JS, DeLaney TF.: Proton beam therapy. *Br J Cancer.* 93(8):849-54,(2005).
3. Slater JD, Rossi CJ Jr, Yonemoto LT, Bush DA, et al: Proton therapy for prostate cancer: the initial Loma Linda University experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 59(2):348-52,(2004).
4. Tsujii H, Mizoe JE, Kamada T, et al: Overview of clinical experiences on carbon ion radiotherapy at NIRS. *Radiother Oncol. Suppl 2:S41-9.*(2004).
5. Kawashima M, Furuse J, Nishio T, et al.: Phase II study of radiotherapy employing proton beam for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 23(9):1839-46, (2005).
6. American Cancer Society Surveillance Research. Estimated Cancer Deaths for Selected Cancer Sites by State, US, 2006 (<http://www.cancer.org/>)
7. 厚生労働省大臣官房統計情報部:人口動態統計
8. 稲田哲雄, 辻比呂志, 早川吉則: 呼吸位相同調陽子線照射法. *日本医学放射線学会雑誌* 52 巻 Page1161-1167(1992)
9. Gu FL, Xia TL, Kong XT.: Preliminary study of the frequency of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer in China. *Urology.* 44: 688-91,(1994).
10. He J, Gu D, Wu X, et al.: Major causes of death among men and women in China.. *N Engl J Med.* 353(11):1124-34.(2005).
11. 浅田 義弘, 沼野 真澄, 永田 晋, 川嶋 一平, 戸井 章子:肝臓癌の呼吸同期照射におけるゲートタイミングの検討. *日本放射線技術学会第 62 回総会学術大会予稿集*: p226, (2005).

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2006年3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：家森 幸男



所属機関名：循環器疾患予防国際共同研究センター

所属部署： 職名：センター長

所在地：〒606-8413

京都市左京区浄土寺下馬場町86-2

電話：075-751-8460 内線：

1. 助成金額：1,000,000円

2. 研究テーマ：

日中の伝統食、大豆・魚介類栄養素による高血圧・脳卒中のリスク軽減効果の検証

3. 成果の概要（100字程度）

中国都市部住民では、少子化政策とともに経済が発展し食生活の欧米化が急速に進んだことにより小児の肥満が増加しつつある。そこで栄養介入研究の開始にあたり、新疆自治区総合人民病院高血圧研究所長である李南方博士を日本に招聘した。研究については、まず現状を明らかにするために24時間尿を分析し、栄養のバイオマーカーを用いた結果、魚や大豆の摂取量が減少し、集団によっては食塩摂取量が増加する一方、その害を打ち消すカリウム排泄値の減少を確認した。特に学童については、日本との比較をするため、交通事情の著しい変化などにより小児肥満の増加している地域において24時間尿の分析を実施した。栄養介入研究については、日中協力によって魚介類の有効成分を含有する豆乳飲料を完成した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名：家森 幸男 職名：センター長

所属機関：循環器疾患予防国際共同研究センター 部署：

中国側研究者氏名：李 南方 職名：所長

所属機関：新疆自治区総合人民病院高血圧研究所 部署：高血圧研究所

— 日中医学協会助成事業 —

日中の伝統食、大豆・魚介類栄養素による 高血圧・脳卒中のリスク軽減効果の検証

研究者氏名 李 南方

中国所属機関 新疆自治区総合人民病院高血圧研究所

日本研究機関 循環器疾患予防国際共同研究センター

指導責任者 センター長 家森 幸男

共同研究者名 森 真理、 森 英樹、 相良 未木

要旨

研究の開始にあたり、新疆自治区総合人民病院高血圧研究所長である李南方博士を日本に招聘し、まず新疆自治区住民（ウイグル族、カザフ族、漢族）の現状を明らかにするために24時間尿を採集し、栄養のバイオマーカーを分析した。その結果、カザフ族、漢族では、ウイグル族に比べ高血圧の頻度や血圧レベルが高く、また高血圧のリスクである肥満、食塩摂取が多く、食事のバランス指標であるナトリウム/カリウム比が明らかに上昇していた。さらに、中国都市部住民では、少子化政策とともに経済が発展し食生活の欧米化が急速に進んだことにより小児の肥満が増加しつつある。特に学童については、日本との比較をするため、食環境の著しい変化により小児肥満の増加している地域において食育を実施し、食育の効果の評価には24時間尿の栄養のバイオマーカー、さらに簡易法としてスポット尿のナトリウム/カリウム比が有用であることを示した。なお、栄養介入研究については、日中協力によって魚介類の有効成分であるタウリンを含有する豆乳飲料を完成した。

Key Words 24時間尿調査、食育、ウイグル族、カザフ族、漢族

緒 言：

世界保健機構（WHO）の協力を得て、家森が提唱し、世界25ヶ国・61地域を20年をかけて実施した循環器疾患と栄養の国際共同研究 [Cardiovascular Diseases and Alimentary Comparison (CARDIAC) Study] によれば、24時間尿や血液のバイオマーカーの評価で大豆や魚介類の摂取の多い人は、少ない人に比べて、肥満・高血圧・高脂血症のリスクが低い。これらのバイオマーカーの高い地域は、低い地域に比べ、心筋梗塞の年齢調整死亡率の低いことが明らかになった（参考文献参照）。一方、WHO-CARDIAC 研究のデータでは、開発途上国においても典型的な生活習慣病である心筋梗塞のリスクは急増しつつある。そこで、遺伝的には沖縄在住の日本人と同じであるが、日本人の中で最も短命となったブラジル（カンボグランデ）在住の日本人、逆に、1980年代に世界一の長寿になったハワイの日系人（ヒロ在住沖縄出身者）さらに、ヨーロッパで心筋梗塞が多発し、最も短命となっているスコットランド人（ルイス島・スカイ島住民）、日本の高齢者（神戸市シルバーカレッジ学生、平均年齢

68歳)で、短期間(4-10週)、大豆蛋白やイソフラボン、DHAを日常食として摂取することを実施し、生活習慣病のリスクが軽減することを実証した。これまでのWHO-CARDIAC研究の結果、食環境が大きく異なるため、生活習慣病のリスクが極端に違う新疆ウイグル自治区の住民(ウイグル族、カザフ族、漢族)に協力を得て、まず24時間採尿による食塩、野菜、蛋白質摂取のバイオマーカーであるナトリウム、カリウム、尿素窒素を測定し、栄養介入研究を最も必要とする集団を選定した。具体的な栄養介入研究のために必要な試験飲料とプラセボ飲料を、これまで世界各地で実施した栄養介入研究を参考にし、この地域で不足している大豆と魚介類による栄養改善研究を実施するため容易に入手可能な日常的食品や飲料(果汁飲料)の作製に成功した。食環境の改善を通して、同地域で蔓延しつつある生活習慣病を克服するための基礎を確立する一方、この調査で漢族においては少子化政策の影響で、肥満児が都市部で急増している実態が明らかになり、日中共同で小学生に対する食育を実施し、食習慣改善と共に食育による生活習慣病予防を実施するための基礎調査をまず日本側で実施したのでその成果を報告する。

対象と方法：

① 新疆ウイグル自治区住民の生活習慣病リスク改善のための24時間尿による基礎調査

シルクロード地域在住のウイグル族は長寿で生活習慣病のリスクが低いのに比べ、同地域在住の漢族やカザフ族では高血圧が多く、脳卒中死亡が増加していることが、共同研究者、李南方新疆省総合人民病院高血圧研究所長の臨床研究により明らかになっている。砂漠のオアシスに定住するウイグル族、アルタイ山中で遊牧生活をするカザフ族、ウルムチ在住の漢族について24時間尿を採取し、栄養介入研究の基礎データを得た。対象は、新疆ウイグル自治区在住の漢族(ウルムチ：男25、女34)、ウイグル族(トルファン：男22、女21、ホーチェン：男25、女30)、カザフ族(アルタイ：男34、女34)で、いずれも46-58歳の健診参加者のうち24時間採尿に成功した者について以下の方法で尿検査を実施した。WHO-CARDIAC研究の方法に基づき、24時間尿採尿用アリコートカップを日本側から提供し、体重測定、自動血圧計による血圧測定を実施した後、24時間尿回収し、クレアチニンをまず測定し、24時間尿採取の成功者のみについて、食塩、野菜、蛋白質の採取マーカーであるナトリウム、カリウム、尿素窒素を測定した。

② 栄養介入研究による試験飲料の作製

カザフ族では、これまでの研究結果から中国本土の伝統食である豆腐などの大豆摂取はなく、新鮮な魚介類摂取も不可能で、専ら羊肉を主食の如く食し、野菜の摂取も少ない。そこで、世界比較に於いて日本人の長寿の栄養源であることが明らかになった大豆成分イソフラボンと魚介類栄養素タウリンを含む日常飲料を提供し、食環境の改善で生活習慣病のリスクが軽減しうることを証明するため、日中共同で、試験飲料を作製した。カザフ族(女性、40-60歳)60人を対象として健診結果によりそのうち40人を以下の2グループ(各群それぞれ20)に無作為に割付け、二重盲検法で2種類の飲料を1ヶ月間提供した。

③食育による栄養改善効果の実証

日中両国において近年、生活習慣の乱れやファーストフードの普及など食環境の問題が取りざたされ、食育指導が重要視されているが、その評価方法が未だない。日中共同で食育を実施し、その評価を統一するため、24時間蓄尿による栄養バイオマーカーの比較で、食育群と非食育群の児童の成績の比較を試みた。さらに中国での実施を簡便化するため栄養評価の簡易法としてスポット尿の有効性について見当を行った。まず、学校長や職員の協力の得られた兵庫県下の小学校で説明会を行い、本人と保護者の同意の得られた高学年の男女136名を対象に尿パックによる24時間蓄尿と同日の朝一番のスポット尿の採取および、食生活等のアンケート調査を行った。全尿はWHO-CARDIAC研究の方法で栄養バイオマーカー（大豆の摂取はイソフラボン、魚介類の摂取はタウリン）を分析し、食育の効果についての比較を行った。また、男女54名については、ナトリウム/カリウム比（Na/K比）の分析を行った。

結 果：

①新疆ウイグル自治区住民の生活習慣病リスク改善のための24時間尿による基礎調査

1. 高血圧の頻度は男女ともウイグル族（トルファン、ホーチエン在住）では、漢族、とりわけカザフ族に比べ有意に頻度が少なく、（図1、2）収縮期血圧、拡張期血圧の平均値もウイグル族は他族、とりわけカザフ族より有意に低かった（図3、4）。
2. 高血圧のリスク、肥満度は漢族、カザフ族に比べ、ウイグル族では有意に低かった（図5）。
3. 高血圧のリスク食塩摂取量はカザフ族が、トルファン在住ウイグル族に比べ有意に高かった（図6）。
4. 野菜摂取のバイオマーカー、カリウムは、ホーチエン在住ウイグル族で高い傾向にあった（図7）。
5. 食事摂取のバランスを示すNa/K比は、カザフ族でウイグル族よりも有意に高かった（図8）。
6. 蛋白質摂取のバイオマーカー尿素窒素はカザフ族で有意に高かった（図9）。

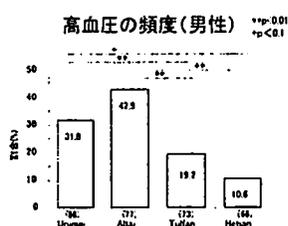


図 1

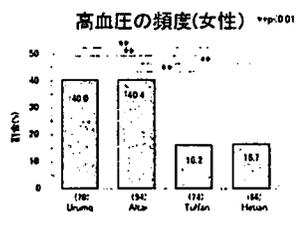


図 2

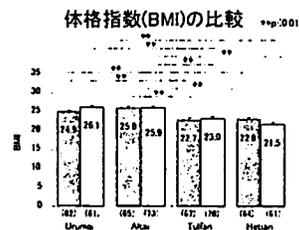


図 3

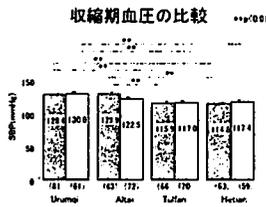


図 4

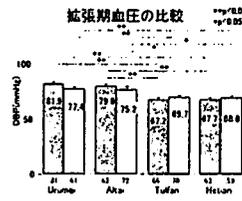


図 5

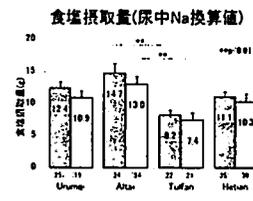


図 6

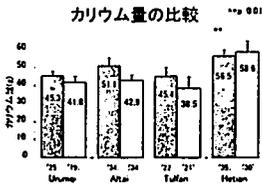


図 7

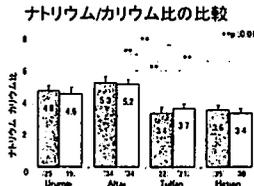


図 8

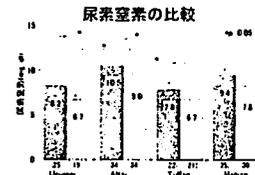


図 9

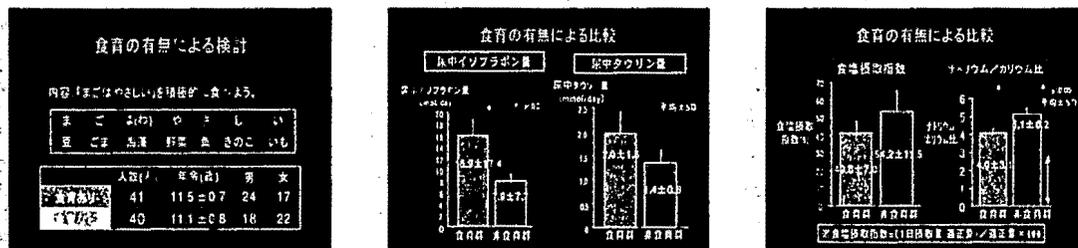
②栄養介入研究による試験飲料の作製

イソフラボンとタウリンはこれまでの WHO-CARDIAC 研究において 24 時間尿中の成分の中で心筋梗塞の年齢調整死亡率と最も高い逆相関を示すことが明らかになっているので、その結果から適切な量を算定した。下表の如く 100ml 中に大豆イソフラボン(6.384 mg) とタウリン (211 mg) を含有する飲料 200ml を 1 日 2 回飲用する。これが、現地で安全に摂取出来るよう水溶性の粉末として作製することに成功した。一方、プラセボ飲料としては試験飲料と共通の果汁飲料を用いて作製することに成功した。

試験飲料 (/100ml)		プラセボ果汁飲料 (/100ml)	
Soy powder (g)	5.32	Ascorbic acid(mg)	41.8
Isolated soy protein (g)	0.77	VB3 (mg)	1.8
Soy protein from soy powder (g)	1.862	VB6 (mg)	0.15
Soy protein from isolated soy protein (g)	0	VA (mg)	0.08
Total soy protein (g)	1.862	VE (mg)	1.52
Taurine (mg)	211	Ca	0
Additional isoflavone (mg)	0	K	0
Isoflavone from soy powder (mg)	6.384	Protein	0
Total isoflavone (mg)	6.384	Soy protein	0
Total isoflavone in final product * (mg)>=	6.384	Isoflavone	0
Fat (g)	1.5	Fat (mg)	0.76
Calcium (from isolated soy protein, mg)	1.36	Xanthic acid (mg)	22
Sodium (mg)	7		
Sugar (g)	5.11		
Beta carotene(from soy powder, mg)	18.6		
Energy (kj)	195.4	Energy (kj)	201.65

③食育による栄養改善効果の実証

食育の効果については高学年（81名）が対象であったが、食育群では尿中イソフラボンが有意に増加、タウリンは増加の傾向があり（下記図表を参照）、食塩摂取量とNa/K比では、Na/K比が食育群が有意に低い結果であった。また、低学年から高学年を含む54名の男女での24時間尿とスポット尿とのNa/K比の比較を行ったところ、有意な正の相（ $y=0.3x+1.93, R^2=0.21, p<0.001$ ）が見られた。



考 察：

①新疆ウイグル自治区住民の生活習慣病リスク改善のための24時間尿による基礎調査

この研究結果よりアルタイ在住カザフ族の高血圧の頻度は他族、とりわけウイグル族より有意に多く、その平均値も収縮期・拡張期ともにウイグル族より高かった。高血圧のリスクとしては、肥満度はカザフ族では有意に高く、食塩摂取量が多くNa/K比が有意に高く、蛋白質摂取でもウイグル族に比べて多いことから、塩茶・バター茶を飲み、強い塩味でもっぱら羊肉を食するカザフ族の食習慣が高血圧、肥満をもたらしていると考えられる。したがって、栄養改善はカザフ族で最も必要であると結論した。

②栄養介入研究による試験飲料の作製

高血圧のリスクの最も多いカザフ族は、内陸山間部に居住し羊を飼う遊牧生活のため、大豆・魚の摂取が不可能なだけに、これらの日常的摂取は、増加している生活習慣病のリスク軽減に有効であると期待される。この成果は、大豆・魚離れの日中の若者が多くなった日本や、なりつつある中国に於いて食育と食環境の改善に有効な飲料による生活習慣病のリスクの軽減に貢献すると考えられる。

③食育による栄養改善効果の実証

これまでは客観的な食育効果の評価法がなかったが、24時間蓄尿は回収が可能な場合は、食育によって大豆摂取の有意な増加が見られ、またNaとりわけNa/K比の減少が確認された。食教育の効果を見るために24時間尿摂取は継続して行うことが困難であるため、今回のスポット尿との比較の結果から、食育の効果を判断する指標として、24時間蓄尿との相関も認められた朝一番のスポット尿のNa/K比の比較がより簡易であり、今後の日中共同での食育の効果判断法として用いることを提案した。

参考文献：

1. WHO Collaborating Center on Primary Prevention of Cardiovascular Diseases, Izumo, Japan and Cardiovascular Diseases for Research Unit, WHO Geneva (eds). CARDIAC Study Protocol and Manual Operations, 1986.
2. Yamori Y., Mizushima S., Sawamura M., and Nara Y. Nutritional factors for hypertension and major cardiovascular diseases: International cooperative studies for dietary prevention. *Dtsch Med Wochenschr* 1994;15:1825-41.
3. Yamori Y., Ikeda K., Tagami M., Yamagata K., and Nara Y. Nutritional pathogenesis and prevention of stroke. *Nutrition and Brain* : J.D.Fernstrom; R.Uauy, P.Arroyo(eds), 2001;5:231-246.
4. Yamori, Y., Liu, L., Ikeda, K., Mizushima, S., Nara, Y., and Simpson, O., on behalf of the WHO Cardiovascular Diseases and Alimentary Comparison (WHO-CARDIAC) Study.: Different associations of blood pressure with 24-hour urinary sodium excretion among pre- and post-menopausal women. *J. Hypertens.* 2001;19 : 535-538,.
5. Yamori, Y., Miura, A., Taira, K.: Implications from and for food cultures for cardiovascular diseases: Japanese Food, Particularly Okinawan Diets. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 2001;10 : 144-145.
6. Liu, L., Ikeda, K., Yin, X., Yang, T., Mu, L., Zhao, H., Mizushima, S., Miki, T., Nara, Y., and Yamori, Y.: Geoethnic-sensitive and cross-culture differences of dietary patterns and blood pressure among five ethnic populations in China. *International Congress Series.* 2004;1262: 168-172.
7. Yamori, Y.: Worldwide epidemic of obesity: Hope for Japanese diets. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 2.* 2004;31:2-4.
8. Liu, L., Ikeda, K., chen, M., yin W., Mizushima, S., Miki, T., Nara, Y., and Yamori, Y.: Obesity, emerging risk in China: Trend of increasing prevalence of obesity and its association with hypertension and hypercholesterolaemia among the Chinese. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 2,* 2004; 31: 8-10.
9. Yamori Y., Marukami S., Ikeda K., and Nara Y. Fish nad lifestyle-related diseases prevention: Experimental and epidemiological evidence for anti-atherogenic portential of taurine. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 2,* 2004;20-23.
10. Mori M., Aizawa T., Tokoro M., Miki T., and Yamori Y. Soy isoflavone tablets reduce osteoporosis risk dactors and obesity in middle-aged Japanese women. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 2.* 2004;44-46.
11. Yamori Y., Liu L., Mizushima S., Ikeda K., and Nara Y. Male cardiovascular mortality and dietary markers in 25 population samples of 16 countries. *Journal of Hypertention,* 2005 (in press)

作成日：2006年3月29日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2006年 3月13日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： カネコ タケシ
金子 武嗣 

所属機関名： 京都大学

所属部署： 医学研究科 職名： 教授

所在地： 〒 606-8501 京都市左京区吉田近衛町

電話： 075-753-4331 内線： _____
kaneko@mbs.med.kyoto-u.ac.jp

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

中枢神経系の局所神経回路の解析：特に三叉神経核・脊髄の局所回路に関する研究

3. 成果の概要（100字程度）

中枢神経系をニューロンレベルからボトムアップに理解しようとするときに、決定的に欠けている情報は「局所神経回路」の詳細である。今回の研究では中国第四軍医大学李雲慶教授の解剖学教研室と協力して、中枢神経系（特に三叉神経系）の局所回路を明らかにしたいと考え、共同研究を行った。李雲慶教授は脳幹のA5領域にあるノルアドレナリン作動性ニューロンが、黒質からGABA作動性入力を受け、三叉神経運動核に投射していることを発見し、同研究室の李金蓮教授は三叉神経中脳路核に中枢性および末梢性のグルタミン酸作動性入力が入力が小胞性グルタミン酸トランスポータ1を使用していることを明らかにした。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： カネコ タケシ
金子 武嗣 職名： 教授

所属機関： 京都大学 部署： 医学研究科

中国側研究者氏名： Li Yun-Qing
李 雲慶 職名： 主任教授

所属機関： 解放軍第四軍医大学 部署： 解剖学教研室

中枢神経系の局所神経回路の解析：特に三叉神経核・脊髄の局所回路に関する研究

研究者氏名 金子武嗣
所属機関 京都大学医学研究科
共同研究者 李雲慶

要旨

中枢神経系をニューロンレベルからボトムアップに理解しようとするときに、決定的に欠けている情報は「局所神経回路」の詳細である。今回の研究では中国第四軍医大学李雲慶教授の解剖学教研室と協力して、中枢神経系（特に三叉神経系）の局所回路を明らかにしたいと考え、共同研究を行った。李雲慶教授は脳幹のA5領域にあるノルアドレナリン作動性ニューロンが、黒質からGABA作動性入力を受け、三叉神経運動核に投射していることを発見し、同研究室の李金蓮教授は三叉神経中脳路核に中枢性および末梢性のグルタミン酸作動性入力が小胞性グルタミン酸トランスポータ1を使用していることを明らかにした。

Key Words 局所神経回路, 三叉神経運動核, 三叉神経中脳路核, 小胞性グルタミン酸トランスポータ1

報告

Demonstration of GABAergic and noradrenergic neurons in the A5 region receiving GABAergic afferent fibers from the substantia nigra and projecting to the trigeminal motor nucleus in the rat

Yun-Qing Li^{1,*}, Noboru Mizuno², Takeshi Kaneko^{1,*}

(¹Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan; ²National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444-8585, Japan)

Orofacial movements, such as mastication, deglutition, suck, pronunciation, are complex functions. They are controlled by motor neurons in the brainstem, while the activities of the motor neurons in the brainstem are regulated by cerebral motor cortex through the corticobulbar tract. In recent years, it has been also found that the majority of the descending fibers in the corticobulbar tract do not terminate directly onto the motor neurons within the motor nuclei, but to the regions containing pre-motor neurons, such as lateral portion (parvicellular part) of the reticular formation in the brainstem, parabrachial nuclei, trigeminal sensory nuclei, raphe nucleus, substantia nigra (SN), etc. These regions are also called pre-motor neuron pool.

Anatomical studies have demonstrated that neurons in the lateral part of the substantia nigra (SNl) project to the reticular formation around the trigeminal motor nucleus (Vmo), especially to the region between the Vmo and dorsal and medial to the superior olive complex, this area is also called A5 region. A5 region belongs to the pontine parvicellular reticular formation and contains pre-motor neuron and is occupied by a few sparsely distributed medium to large noradrenalin (NA)-containing neurons and many small GABAergic neurons. Whether GABAergic neurons in the SNl send their descending fibers to the A5 region and GABAergic and NAergic neurons in the A5 region, in turn, project to the Vmo are still uncovered. In order to investigate the control mechanisms for the orofacial movements, in the present study, the neural tract tracing methods combined with immunohistochemical staining for GABA and dopamine beta-hydroxylase (DBH), a chemical marker for noradrenergic neurons, were used in the rat. The main results were as follows:

(1) Immunohistochemical staining for GABA and DBH revealed that: ① there were GABA-like immunoreactive (-LI) neurons in the SNI and A5 region; ② DBH-LI neurons were also seen in the A5 region, locus coeruleus (LC) and sublocus coeruleus region; ③ GABA-LI terminals were dense found in the Vmo, while DBH-LI terminals were scattered in the Vmo.

(2) After injecting tetromethyl rhodamine-dextran amine (TMR-DA) into the unilateral A5 region, a few TMR-DA retrogradely labeled neurons were observed chiefly in the ipsilateral side of the SNI. Of the TMR-DA retrogradely labeled neurons, 21.2% (68/321) of them showed GABA-like immunoreactivity.

(3) Injecting TMR-DA into the unilateral Vmo, we encountered some TMR-DA retrogradely labeled neurons principally in the ipsilateral side of the parvicellular reticular formation, trigeminal sensory nuclei, parabrachial nuclei, raphe nucleus, superior trigeminal nucleus, SN, paratrigeminal region, LC, sublocus coeruleus region, A5 region, etc. Among the TMR-DA retrogradely labeled neurons in the A5 region, 32.8% (42/128) or 16.1% (18/112) of them exhibited GABA- or DBH-like immunoreactivities, respectively.

(4) After injecting biotinylated dextranamine (BDA) into the SNI and wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) into the Vmo, respectively, the following connections were observed in the A5 region under the laser scanning confocal microscope (LSCM) and electron microscope (EM): ① BDA anterogradely labeled fibers and terminals, some of them also showed GABA-like immunoreactivity, contacted with WGA-HRP retrogradely labeled neuronal cell bodies and dendritic processes; ② BDA anterogradely labeled fibers and terminals contacted with WGA-HRP retrogradely labeled neuronal cell bodies and dendritic processes, some of the WGA-HRP labeled neurons also exhibited GABA- or DBH-like immunoreactivities; ③ BDA anterogradely labeled fibers and terminals, some of them also showed GABA-like immunoreactivity, made symmetric axo-somatic and axo-dendritic synapses with WGA-HRP retrogradely labeled neuronal cell bodies and dendritic processes; ④ BDA anterogradely labeled fibers and terminals formed symmetric or asymmetric axo-somatic and axo-dendritic synapses with WGA-HRP retrogradely labeled neuronal cell bodies and dendritic processes, some of the WGA-HRP labeled neurons also exhibited GABA- or DBH-like immunoreactivities.

(5) After iontophoretic injecting *Phaseolus vulgaris* agglutinin-L subunit (PHA-L) into the A5 region and pressure injecting WGA-HRP into the masticatory muscles, such as masseter, temporalis, etc., respectively, the following connections were observed in the Vmo under the LSCM and EM: ① PHA-L anterogradely labeled fibers and terminals, some of them also showed GABA- or DBH-like immunoreactivity, contacted with WGA-HRP retrogradely labeled neuronal cell bodies and dendritic processes; ② PHA-L anterogradely labeled fibers and terminals, some of them also showed GABA-like immunoreactivity, constituted symmetric synapses with WGA-HRP retrogradely labeled neurons; ③ PHA-L anterogradely labeled fibers and terminals, some of them also showed DBH-like immunoreactivity, made asymmetric axo-somatic and axo-dendritic synapses with WGA-HRP retrogradely labeled neuronal cell bodies and dendritic processes.

These results indicate that: ① GABAergic neurons in the SNI send descending projection fibers to the A5 region; ② GABAergic and noradrenergic neurons in the A5 region project to the Vmo; ③ GABAergic descending fibers from the SNI make symmetric or asymmetric synapses, respectively, with GABA- or NA-containing pre-motor neurons in the A5 region that send projection fibers to the motor neurons in the Vmo innervating the masticatory muscles.

Functional consideration: ① GABAergic neurons in the SNI might exert inhibitory influence upon the activities of GABAergic and noradrenergic pre-motor neurons in the A5 region through the descending projection fibers from SNI to the A5 region; ② GABAergic and noradrenergic neurons in the A5 region might exert the inhibitory and excitatory effects upon the activities of the Vmo motor neurons, respectively; ③ GABAergic descending fibers from the SNI might disinhibit the inhibitory influence of the GABAergic neurons in the A5 region upon the activities of Vmo motor neurons. These inhibitory and excitatory regulatory effects upon Vmo motor neurons might be very important for the modulatory mechanisms on the orofacial movements.

Vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) immunoreactivity in the central and peripheral endings in mesencephalic trigeminal nucleus of the rat

Jinlian Li^{1,*}, Noboru Mizuno², Takeshi Kaneko^{1,#}

¹Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan;

²National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444-8585, Japan)

The amino acid glutamate is a major excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) of mammals. In particular, sensory neurotransmission from primary afferents onto spinal or trigeminal neurons appears to be largely mediated by glutamate. Glutamate transport into synaptic vesicles is a prerequisite for the quantal release of glutamate at synapses. Recently, two vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, have been identified and shown that they can selectively accumulate glutamate and confer glutamate release properties to transfected cells or neurons. Varoqui et al. (2002) and Todd et al. (2003) reported that all low-threshold cutaneous and proprioceptive myelinated afferents fibers express VGLUT1, whereas some cutaneous afferents (which arborize in laminae III-VI) in the spinal cord also contain a low level of VGLUT2 and was associated with nociceptive afferents. Wu et al. (2004) have further been indicated that that VGLUT1 is expressed not only in the central axon terminals in the spinal cord but also in peripheral sensory endings of muscle-spindle afferents.

The mesencephalic trigeminal nucleus (Vmes) is composed of primary afferent neurons, sensory peripheral terminals of which are associated mainly with muscle spindles of the jaw-closing muscles and with periodontal mechanoreceptors of both maxillary and mandibular teeth, while the central terminals of which extend mainly the trigeminal motor neurons (Vmo) and supertrigeminal nucleus (Vsup). Though our previous studies have also showed that VGLUT1 is expressed in primary afferent neurons of the dorsal root ganglion (Li et al, 2003a) as well as in those of the trigeminal ganglion (Li et al, 2003b), however, no VGLUT1 immunoreactivity has so far been demonstrated in the cell bodies of neurons, and peripheral and central terminals of the Vmes. In order to investigate the above questions, in the present study, in situ hybridization histochemistry for VGLUT1, the tract tracing methods combined with immunofluorescence histochemical staining for VGLUT1 and cholera toxin B subunit (CTb, transganglionic transport tracer, which has been shown to be taken up selectively by these axons when injected into masseter nerves) were used in the newborn rat, young rat and adult rat. The main results were as following:

1. VGLUT1 immunoreactivity in Vmes-neuron soma was detected in newborn rats (within 24 hours after birth) throughout the whole rostrocaudal extent of the Vmes. It was more intense in 3-day-old rats, then decreased gradually. In 11-day-old rats, VGLUT1 immunoreactivity still remained, but was very weak at the caudal levels of the Vmes. No VGLUT1-immunoreactivity was detected in the Vmes of rats older than 11-day-old.

2. VGLUT1 mRNA signals were detected in all Vmes-neurons soma throughout the whole rostrocaudal extent of the Vmes of newborn, young and adult rats. The hybridization with the sense RNA probe for VGLUT1 showed no hybridization signals.

3. In the longitudinal sections of the masseter muscles of adult rats, VGLUT1-immunopositive fibers ran through the capsule of muscle-spindle to form endings of ribbon-like spirals, which appeared to encircle the equatorial region of the intrafusal muscle fibers. Some VGLUT1-immunopositive fibers also formed knob-like endings on the equatorial regions of the intrafusal muscle fibers. VGLUT1-immunoreactivity in the peripheral endings on the intrafusal muscle fibers was also detected in newborn rats; its intensity increased in older rats.

4. After injection CTb into the masseter nerve of the adult rats, the connections of CTb-labeled terminals and CTb-labeled neuronal cell bodies were observed in the Vmo and Vsup regions under the laser scanning microscope (LSCM) and electron

microscope(EM).

(1) Considerable number of CTb anterogradely labeled fibers and terminals (the central process of Vmes) were observed in the Vmo and Vsup regions after injecting CTb into the masseter nerve of the adult rats. At the same time, many of CTb retrogradely labeled neuronal cell bodies and dendrites were also found in the Vmo and Vsup regions.

(2) Under the laser scanning microscope, many terminals and varicose structures with CTb-labeled were scattered throughout the Vsup and Vmo. Varicose structures with CTb-labeled were seen frequently to be in close apposition to the CTb-labeled contours of cell bodies and dendrites, and the density of distribution of CTb-labeled varicosities on CTb-labeled contours did seem to be high. Almost all of CTb-labeled terminals showed VGLUT1-like immunoreactivity(-LI). Some colocalized terminals of VGLUT1-LI and CTb-labeling were frequently to be in close apposition to the CTb-labeled contours of cell bodies and dendrites.

(3) Under electron microscope, the following connection of the CTb-labeled terminals and CTb-labeled neuronal cell bodies or dendrites with VGLUT1-like immunoreactive terminals in the motor trigeminal nucleus (Vmo) were observed:

- ①CTb-labeled terminals containing small clear and spherical synaptic vesicles predominantly formed asymmetric synapses with the dendrites of the no-labeled neurons;
- ②VGLUT1-immunoreactive terminals containing small clear and spherical synaptic vesicles predominantly formed asymmetric synapses with the dendrites of CTb-labeled or no-labeled neurons;
- ③Some terminals of no-labeled neurons make the asymmetric or symmetric synapses with the dendrites of CTb-labeled neurons;
- ④CTb-labeled terminals predominantly formed asymmetric synapses with the dendrites or soma of the CTb-labeled Vmo neurons;
- ⑤CTb-labeled terminals showing VGLUT1-immunoreactivity (CTb/VGLUT1) coming from Vmes predominantly formed asymmetric synapses with the dendrites or soma of the CTb-labeled Vmo neurons.

The present results indicate that: ①VGLUT1 is expressed in the peripheral endings supplying intrafusal muscles of muscle-spindles of the masseter muscle in both neonatal and adult rats; ②No VGLUT1-immunoreactivity was detected in the Vmes neuronal soma in rats older than 11-day-old, although VGLUT1 mRNA signals were detected in Vmes-neurons of adult rats. These results might be attributable to slower synthesis of VGLUT1 in the soma and/or faster transport of VGLUT1 from the soma to the peripheral and central endings in Vmes-neurons of older rats; ③VGLUT1 is also expressed in the central endings of the Vmes-neurons of adult rats and mainly distributed in the motor trigeminal nucleus and supratrigeminal nucleus; ④Most of VGLUT1-positive terminals from Vmes neurons make asymmetric synapse contact with the cell bodies or dendrites of Vmo neurons innervating the masticatory muscles.

Functional considerations: ①The trigeminal proprioceptive sensory signals from the muscle-spindles of the masseter muscle might be transported to the Vmo neurons by the central terminals of the primary afferent neurons in the Vmes using excitatory glutamatergic transporters-VGLUT1; ②There are direct synapses contact between the VGLUT1-positive axonal terminals coming from the Vmes and the trigeminal motoneurons, suggesting that partly Vmo neurons might directly receive input proprioceptive sensory signals from the muscle-spindles of the masseter muscle, then produce masticatory muscles activities although there are lots of the GABAergic premotor interneurons neurons existing in the Vsup involved in the modulation of the masticatory muscles movements.

作成日：2006年3月13日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2006年 3月 9日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 森嶋康之 

所属機関名： 国立感染症研究所

所属部署： 寄生動物部 職名： 研究員
〒162-8640

所在地： 東京都新宿区戸山1-23-1

電話： 03-5285-1111 内線： 2734

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

青海省の実態にあわせたエキノコックス症感染源診断システムの構築

3. 成果の概要（100字程度）

エキノコックス症の流行地である青海省において、感染源動物の調査および制圧計画で利用可能な疫学的ツールとして糞便内抗原の検出システムを構築した。本法は感度80%、特異度98%であった。同省での活用が期待される。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 森嶋康之 職名： 研究員

所属機関： 国立感染症研究所 部署： 寄生動物部

中国側研究者氏名： 何多龍 職名： 科長

所属機関： 青海省地方病予防控制所 部署： 寄生虫病予防控制科

青海省の実態にあわせたエキノコックス症感染源診断システムの構築

研究者氏名 森嶋 康之
所属機関 国立感染症研究所寄生動物部 研究員
共同研究者名 何 多龍
所属機関 青海省地方病予防控制所
寄生虫病予防控制科 科長

要 旨

単包条虫・多包条虫の両種によるエキノコックス症が流行する青海省において、ヒトへの感染源となる終宿主動物を正確かつ効率よく検査する方法の開発を目的として糞便内抗原検出法の構築を試みた。この方法は、ニワトリ抗エキノコックス成虫虫体抗体を吸着抗体、ウサギ抗エキノコックス成虫排泄分泌抗体を一次抗体とするサンドイッチ ELISA で、代替終宿主を用いて単包条虫および多包条虫を用いた実験感染材料では感染後 3～5 日目から特異抗原を検出しはじめ、以後感染終了まで常に陽性の結果が得られた。野外材料を用いた場合の検討では感度 80%、特異度 97.5%と評価された。検査特性値の向上を図ってピオチンによる一次抗体の標識を試みたが、感度は 95.0%まで上昇したものの、むしろ特異度が 85.0%に低下した。エキノコックスに近縁な条虫類との交差反応に関し、青海省のイヌで想定される胞状条虫感染について実験感染材料を用いて検討を加えたところ、感染期間中の OD 値は非感染時と比べ高い傾向を示した。軽度感染例から得られた OD 値はカットオフ値を上回ることにはなかったが、重度感染例の OD 値は時として弱い偽陽性の結果を示した。単包条虫実験感染材料を用いて糞便内 DNA 検出法との感度比較を行ったところ、本法が DNA 検出より高い感度を持つことが示された。実際の疫学調査への適用に際し、感度および特異度をさらに向上させるとともに、現地でも使用可能な簡易キット化が望まれる。

Key Words エキノコックス, 終宿主, 診断, 糞便内抗原, 酵素標識抗体検出法

緒 言:

エキノコックス *Echinococcus* 属の条虫はテニア科に属する人獣共通寄生虫で、ヒトはイヌ科動物の腸管に寄生する成虫由来の虫卵を経口的に摂取して感染する。牧畜のさかんな青海省では、家畜間（イヌ - 有蹄類）で生活環が維持される単包条虫 *E. granulosus* が引き起こす単包性エキノコックス症が公衆衛生上重要な問題と認識されてきた。それに加え、地域によっては悪性な多包性エキノコックス症の原因である多包条虫 *E. multilocularis* も分布し、両症が同所的かつ高度に流行していることが報告されている [1]。

エキノコックス症の制圧計画の策定からその進捗状況、実施後の効果の評価に至るまで、ヒトへの感染源となるイヌの保虫率等ベースラインとなるデータを提供する疫学調査が果たす役割は大きい。そこで感染源動物を正確に検査する方法が必須のツールとなる。これまで青海省では感染源動物の検査法として剖検、試験的駆虫（アレコリンパージ）、虫卵検査などが用いられてきた。ところが、これらの方法は、多大な労力を要したり、検査者自身が感染の危険に曝露されたり、あるいは近縁な他種条虫類との鑑別が困難であったりと、それぞれ実用面における種々の欠点を抱えている。そこで本研究では、検体処理能力が高く、かつ安全な方法として、免疫学的検査法である糞便内抗原検出法に着目した。糞便内抗原は、宿主腸管内に寄生するエキノコックス成虫の分泌物あるいは代謝産物を抗原として補足するもので、感染初期からの検出が可能で、さらに腸管内に寄生する虫体の排除にともなって速やかに糞便中から消失するなど、実際の感染を正確に反映するとされ、日本国内でも近年、エキノコックス症流行地である北海道において

活用が進んでいる [2]。本研究は、この検出システムを青海省の疫学的状況に即した形態に構築し、同省のエキノコックス症制圧計画に資することを目的として実施した。

材料と方法：

1) 糞便内抗原検出の方法

宿主糞便内に排泄されるエキノコックス由来抗原の検出は、標的抗原を吸着抗体と一次抗体でトラップし、酵素標識抗体法を用いて検出する、いわゆるサンドイッチ ELISA 法によって行った。

抗体の作製に用いた抗原は、代替終宿主 [3] から回収した多包条虫成虫を用いて得た。すなわち、成虫の培養上清を排泄分泌抗原、培養終了後の成虫を虫体抗原とし、これらでニワトリおよびウサギを免疫した。免疫動物から得られた抗体は KAPTIV-GY (TECNOGEN S.C.p.A, Italy) で精製し、それぞれニワトリ抗多包条虫成虫体抗体を吸着抗体、ウサギ抗多包条虫排泄分泌抗体を一次抗体とした。

糞便検体の調整ならびに抗原の検出は森嶋 [2] にしたがって行った。カットオフ値は、日本国内のエキノコックス非流行地で飼育されるイヌの糞便 20 検体を陰性対照として使用し、被検糞便検体と同様の方法で測定して得た OD 値の平均に標準偏差の 3 倍を加えたものとした。

感度と特異度の向上を目的として抗体の標識法に関する検討を加えた。Biotin Labeling Kit-NH₂ (同仁化学) を用いて一次抗体をラベルし、通常抗体による検出との比較を行った。

2) 糞便内抗原検出法の評価

構築した糞便内抗原検出法の評価は以下の方法で行った。代替終宿主を用いて多包条虫および単包条虫の実験感染を行い (それぞれ約 10 万個と約 7 万個の原頭節を経口投与)、多包条虫は感染後 23 日目まで、単包条虫は感染後 30 日目まで経日的に糞便を採取し、感染にともなう糞便内抗原の検出状況の変化について検討した。単包条虫感染の 1 個体に対しては感染後 17 日目に条虫駆虫薬 (プラジクアンテル) を経口投与し (50 mg/kg)、駆虫にともなう糞便内抗原が受ける変化を観察した。また、この実験感染で得られた材料を用いて、最近エキノコックス感染源動物を対象に高特異度の検査法として試みられている糞便内 DNA の検出と感度の比較を行った。糞便内 DNA は QIAamp DNA Mini Stool Kit (QIAGEN GmbH, Germany) を使って抽出し、12S rRNA 領域を標的部位とするプライマーペア (P60.for および P375.rev.) を用いて検出を行った。

本法の検査特性値は、北海道産キツネおよび青海省 (海南蔵族自治州、果洛蔵族自治州) において得たイヌ糞便合計 100 検体 (陽性 20 検体・陰性 80 検体) を用いて調べた。さらに他種寄生虫との交差反応の有無をみるため、青海省のイヌで最も普通な条虫種である胞状条虫 *Taenia hydatigena* 感染例について検討した。ヒツジ由来の胞状条虫幼虫 (細頸囊尾虫 *Cysticercus tenuicollis*) をイヌ 2 頭に経口投与し (感染強度による糞便内抗原検出法の結果への影響を見る目的でそれぞれ 6 および 18 虫体を投与)、感染後 63 日目まで経日的に採集した糞便を本法により検査した。

結 果：

1) 実験感染個体における糞便内抗原の検出状況

図 1 に多包条虫 (EM1~5) ならびに単包条虫 (EG1~3) 実験感染例において検出された糞便抗原の経日的変化を示した。陰性対照 20 検体から算出されたカットオフ値 (0.192) にもとづくと、本法では多包条虫・単包条虫ともに感染後 3~5 日目までに OD 値が陽転した。その後の経過では、多包条虫感染の 1 個体 (EM5) を除き、OD 値はほぼ感染後 10~12 日目までにピークに到達後、細かな上下変動を繰り返しつつ維持された。ピーク値を見ると、多包条虫に比べ単包条虫でより高い OD 値が記録された (ただし EG3 は感染後 19 日目に斃死)。また、単包条虫感染個体 (EG2) で感染後 27 日目に実施した駆虫処理後、OD 値はその翌日には速やかに陰転した。以上、いずれの個体も実験終了時まで (駆虫処理個体では駆虫時ま

で) 糞便内抗原の検出結果は常に陽性を示し続けた。

2) 検査特性値に関する検討

北海道産キツネおよび青海省由来イヌ糞便 100 検体 (保虫率 20%) を用いて検出を行った場合の検査特性値は、感度 80.0%、特異度 97.5%、陽性予測値 88.9%、陰性予測値 95.1%であった (表 1A)。一方、一次抗体としてピオ

チン化抗体を用いた場合は、感度 95.0%、特異度 85.0%、陽性予測値 61.3%、陰性予測値 98.6%となり、非ピオチン化一次抗体を用いたときと比較して感度は向上したが特異度の低下が認められた (表 1B)。

図1. 実験感染代替終宿主における糞便内抗原の検出

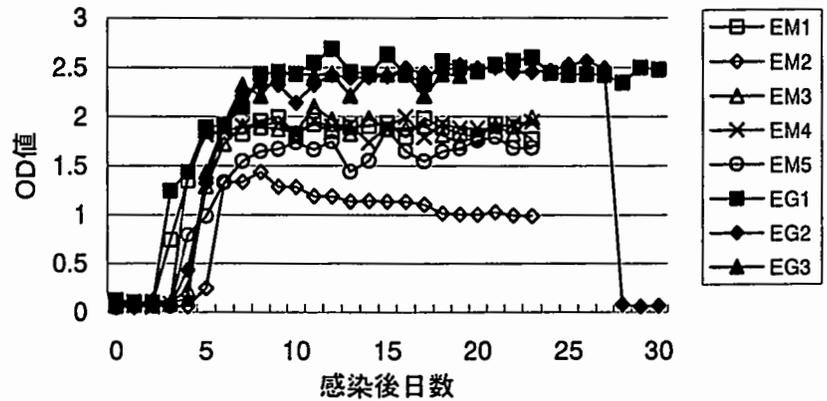


表 1. 糞便内抗原の検出による感染診断 (A. 通常抗体、B. ピオチン化抗体)

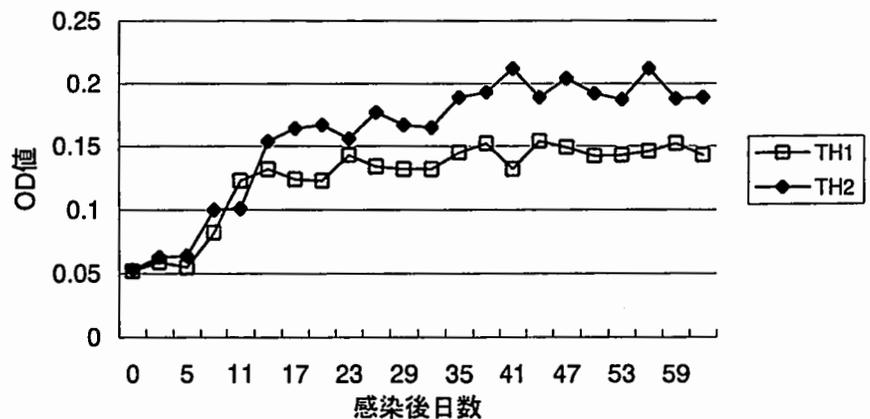
A		感染		合計
		陽性	陰性	
抗原	陽性	16	2	18
	陰性	4	78	82
合計		20	80	100

B		感染		合計
		陽性	陰性	
抗原	陽性	19	12	31
	陰性	1	68	69
合計		20	80	100

3) 近縁寄生虫感染時の糞便内抗原の検出

図 2 に胞状条虫実験感染例において検出された糞便内抗原の経日的変化を示した。感染終了時 (感染後 63 日目) に実施した剖検では、6 虫体投与個体から 5 虫体 (TH1)、18 虫体投与個体から 16 虫体 (TH2) をそれぞれ回収した。これらの糞便について実施した糞便内抗原の検出結果は、前者の OD 値は常にカットオフ値である 0.192 を下回ったものの、感染前検体のものと比べてやや高値を示した。同様の傾向は後者でも認められ、その OD 値はさらにカットオフ値近辺まで上昇し、ときとしてカットオフ値を超えて弱い陽性結果を示した (図 2)。

図2. 胞状条虫感染犬における糞便内抗原の検出



4) 糞便内 DNA 検出法との感度比較

代替終宿主を用いた実験感染例 (図 1 の EG2) について糞便内 DNA の検出を試みたところ、DNA 検出による陽転時期は本法より早く、感染翌日にはすでに検出された。しかしながら、糞便内抗原は駆虫処理を行うまで常に陽性結果を示したのに対し、糞便内 DNA は常に一定して検出されるのではなく、陽性の結果は間欠的にしか得られず、感染当日から感染後 27 日目までの感染期間を通じての感度は 26% と計算された。

考 察：

最近発表された青海省の地方病防治条例においてエキノコックス症は対象地方病 6 種のうちの一つに指定され、公衆衛生上の重要疾病であることが再確認されている。現在、青海省地方病予防控制所が行うエキノコックス症感染源動物の調査では、試験的駆虫（アレコリンパージ）、剖検ならびに虫卵検査のいずれかを実施している。これらに克服困難な欠点があることは先述のとおりで、新たな疫学調査ツールの導入が緊急の課題として挙げられてきた。本研究で構築した糞便内抗原検出法は、従来の方法を十分に代替しうる感度と特異度をもち、今後は本法を用いて疫学調査を展開することが可能となった。

しかしながら、正確な検査を行うにあたり、本法がより高い感度を備えることは言うまでもない。そこで感度の向上を企図して一次抗体の修飾を試みたが、感度は向上したものの特異度を低下させる結果となった。この原因として、アミノ基をビオチン標識したことにより抗原認識部位が修飾され、非特異的吸着が増加したことが考えられる。今後は、架橋標的を SH 基とする、あるいは別の標識法（たとえば金コロイド法）を試みるなど、抗体の標識法に関する検討を進めていく。

もう一つの問題として、本法で用いる抗体の近縁条虫種との交差反応が指摘される。有蹄類家畜を中間宿主とするテニア属の条虫は、牧畜が主要な産業の一つとなっている青海省において常に留意すべき寄生虫である。これらは被毛粗剛や感染臓器の廃棄など経済上の損失を引き起こすが、基本的には動物寄生種で、公衆衛生上問題視されることはない。しかし、単包条虫と同様の生活環をもつので調査対象群が汚染されている可能性があり、特異度の低い方法を適用したのでは検査結果が攪乱される恐れがある。今回の胞状条虫に関して行った検討では重度感染例で偽陽性が認められた。反応の程度はカットオフを「陰性対照の平均+5 倍標準偏差」と高く設定することで排除可能なレベルであったが、それにともなって真の陽性個体を偽陰性と判定する危険が生じる。カットオフ値は「誤診する確率」が低ければ低いほど理想的であるが、それは統計学上の問題でなく、対象集団固有の特性を加味した上で設定されるべきであろう。エキノコックスの終宿主となる動物を対象とした診断は、ヒトへの感染源の評価でもあり、偽陰性が少ないほど優れるといえる。しかし、青海省では上記の理由から特異度をさらに高める努力をしなければならない。今回の実験感染で得られた胞状条虫の虫体は一部を凍結保存してあるので、これを材料として作製した抗原カラムを用いて抗体の再精製を行い、非特異吸着する抗体を取り除き、特異抗体の濃度を増すことで特異度の向上を試みる予定である。

最後に、今回開発を試みた糞便内抗原検出法はマイクロプレートを用いた方法で、基本的に実験室内での実施を前提とする。青海省における調査でより有効に活用するためには、調査現場での迅速な診断を可能とする dot-ELISA 等の簡易キット化を進めることが望まれる。

参考文献：

1. 吳献洪, 何多龍, 劉巴睿, 張静宵, 馬霄, 劉培進, 劉海青, 蔡輝霞, 趙延梅, 劉玉芳, 曾誠, 胡蘭省, 王虎: 青海省人体重要寄生虫病地区分布調査, 中国寄生虫学与寄生虫病雜誌 23, 220-224 (2005).
2. 森嶋康之: 北海道における多包条虫 *Echinococcus multilocularis* の動物疫学, 北海道大学大学院獣医学研究科博士論文 (2000).
3. Kamiya M, Sato H: Complete life cycle of the canid tapeworm, *Echinococcus multilocularis*, in laboratory rodents, FASEB Journal 4, 3334-3339 (1990).

作成日：2006年3月9日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

平成18年 3月 22日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 山本 直彦 

所属機関名： 名古屋大学大学院医学系研究科

所属部署： 環境医動物学 職名： 助教授
〒 466-8550

所在地： 名古屋市昭和区鶴舞町65

電話： 052-744-2110 内線： 2110

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国農村部および都市部における薬剤耐性HIVの流行状況とAIDS治療への対策

3. 成果の概要（100字程度）

江蘇省に在住のHIVに感染した46例について解析したところ、BA, B', C, D, AEの6種類のサブタイプが同定でき、最も多いのがサブタイプCの40.48%で薬物静注者に多く、次いでサブタイプB'の38.10%で、商業的血液供給者に多かった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 山本 直彦 職名： 助教授

所属機関： 名古屋大学大学院医学系研究科 部署： 環境医動物学

中国側研究者氏名： 羊 海濤 職名： 副所長

所属機関： CDC Jiangsu Province 部署： HIV/AIDS Prevention and Control Section

中国農村部および都市部における薬剤耐性 HIV の流行状況と

AIDS 治療への対策

研究者氏名 助教授 山本 直彦
日本研究機関 名古屋大学大学院医学系研究科
共同研究者 副所長 羊 海涛
中国所属機関 江蘇省 Jiangsu Province Center
for Disease Control and Prevention

要 旨：

江蘇省に在住の HIV に感染した 46 例について、その血液よりプロウイルス DNA を採取し、HIV-1 Env 領域を PCR により増幅し、Env C2-V3 領域の塩基配列を決定し、系統樹解析によりサブタイプを解析したところ、A, B, B', C, D, AE の 6 種類のサブタイプが同定できた。そのうち最も多いのがサブタイプ C の 40.48%で、次いでサブタイプ B'の 38.10%であった。しかし、ハイリスク・グループによってサブタイプの傾向は異なり、サブタイプ C が薬物静注者に多いのに対し (86.67%)、サブタイプ B'は商業的血液供給者に多かった (91.67%)。このことは商業的血液供給者におけるサブタイプ B'は近隣の河南、湖北、安徽、山西、山東省などの内陸部地域から江蘇省に入ってきたと考えられる。また、薬物静注者におけるサブタイプ C は雲南省などタイやミャンマーの北部のいわゆるゴールデン・トライアングルの地域から流入したと考えられる。血清疫学的解析のみならず、このようにウイルス学的・分子疫学的解析をすることによって、HIV の流行パターンや伝播様式を知ることができ、こうした共同研究はサブタイプ間によって異なる薬剤耐性を念頭においた治療方針の確立や今後の予防対策および将来に向けてのワクチン開発に大いに役立つものと思われる。なお、薬剤耐性関連遺伝子 (genotype) およびその感染性 (phenotype) について現在解析中である。

Key Words HIV/AIDS、分子疫学、サブタイプ、薬剤耐性

緒 言：

深刻な流行を招いている中国東部の江蘇省の CDC と共同で、これらの地域における HIV の遺伝学的特徴および薬剤耐性ウイルスの浸淫状況を調査し、中国における将来の薬物治療などの AIDS 対策に重要な基礎的および臨床的データを提供し、総合的なエイズ予防戦略を構築する。こうした HIV の分子疫学的研究は、将来のワクチン開発を含め、ウイルス学的、免疫学的、臨床的さらに社会医学的研究の礎となるものであり、今後さらに中国との様々な研究機関との協力によって、アジア全体の流行の予防制圧に向けた共同の取り組みを一層強力に推進できることが期待される。

対象と方法：

江蘇省に在住の HIV に感染した 46 例について、その血液よりプロウイルス DNA を採取し、HIV-1 Env 領域を PCR により増幅し、Env C2-V3 領域の塩基配列を決定し、系統樹解析によりサブタイプを解析した。

結 果：

系統樹解析によりサブタイプを解析したところ、A, B, B', C, D, AE の 6 種類のサブタイプが同定できた。そのうち最も多いのがサブタイプ C の 40.48% で、次いでサブタイプ B' の 38.10% であった。しかし、ハイリスク・グループによってサブタイプの傾向は異なり、サブタイプ C が薬物静注者に多いのに対し (86.67%)、サブタイプ B' は商業的血液供給者に多かった (91.67%)。このことは商業的血液供給者におけるサブタイプ B' は近隣の河南、湖北、安徽、山西、山東省などの内陸部地域から江蘇省に入ってきたと考えられる。また、薬物静注者におけるサブタイプ C は雲南省などタイやミャンマーの北部のいわゆるゴールデン・トライアングルの地域から流入したと考えられる。

考 察：

血清疫学的解析のみならず、このようにウイルス学的・分子疫学的解析をすることによって、HIV の流行パターンや伝播様式を知ることができ、こうした共同研究はサブタイプ間によって異なる薬剤耐性を念頭においた治療方針の確立や今後の予防対策および将来に向けてのワクチン開発に大いに役立つものと思われる。なお、薬剤耐性関連遺伝子 (genotype) およびその感染性 (phenotype) について現在解析中である。

(2006年3月25日)

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成18年3月16日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 羽毛田 匡 
所属機関名： 東京医科歯科大学
所属部署： 顎関節治療部 職名： 助手
〒113-8549
所在地： 東京都文京区湯島 1-5-45
電話： 03-5803-5713 内線： _____

1. 助成金額： 820,000 円

2. 研究テーマ

顎関節症の診断と治療のための多次元評価プロトコールの有用性の検討および日中間の患者背景の比較検討

3. 成果の概要 (100字程度)

多次元評価プロトコールを用いて日中の顎関節症患者背景を比較した結果、両施設間で、症型割合、摂食困難度、疼痛強度、性格傾向、日常生活寄与因子に有意差が認められた。顎関節症の診断、治療遂行の上で、地域性、民族性に配慮して対応することの重要性が示唆された。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 羽毛田 匡 職名： 助手
所属機関： 東京医科歯科大学 部署： 顎関節治療部
中国側研究者氏名： 傅 元 職名： 教授
所属機関： 北京大学口腔医学院 部署： 放射線科

顎関節症の診断と治療のための多次元評価プロトコールの有用性の検討および

日中間の患者背景の比較検討

日本研究者氏名 羽毛田 匡
日本共同研究者名 木野孔司, 石川高行
日本研究機関 東京医科歯科大学歯学部附属病院顎関節治療部
中国研究者氏名 傅 元
中国共同研究者名 Yan-Ping Zhao, Hui-Min Chen
中国研究機関 北京大学口腔医学院放射線科顎機能異常口腔顔面痛センター

要旨

目的: 顎関節症の多因子的な病因を抽出するための多次元評価プロトコールを用い、日中の顎関節症患者背景を比較し、多次元評価プロトコールの、診断と治療への適用の有効性と問題点を検討した。 **方法:** 2003-2006年に、東京医科歯科大学歯学部附属病院顎関節治療部（以下東京）および北京大学顎機能異常口腔顔面痛センター（以下北京）に来院し、選択基準を満たした顎関節症有痛患者を対象とした。顎関節症の臨床検査および多次元評価プロトコールを用いた患者の自己評価による質問項目への回答を収集した。 **結果:** 解析の対象は、東京363名、北京72名であった。東京、北京とも女性が男性の2倍以上で、性別割合、年齢とも両施設間に有意差は認められなかった。両施設間で有意差がみられたのは、症型割合、摂食困難、初診時疼痛強度、頭痛の有無、外向的性格傾向、日常習癖のうち、不良姿勢、人間関係の緊張、歯ぎしりの自覚、起床時症状、球技スポーツ、受話器の肩ばさみであった。 **考察:** 多次元評価プロトコールの、診断、治療への適用にあたり、診査方法の較正、各国に特徴的な質問項目を付加することの必要性が示された。両施設間で有意差がみられた項目は、両国間の人種的・文化的相違を反映するものとも考えられ、顎関節症の病態を把握する上で重要な診査事項であること、また、顎関節症の診断、治療遂行の上で、グローバルスタンダードに加え、地域に適応した診査、診断項目の選択を行うことの重要性が示唆された。

Key Words

顎関節症、多次元評価プロトコール、寄与因子

結言:

日本における歯科疾患において、顎関節症はむし歯、歯周病と並んで、歯科の3大疾患ともいわれており、人口の約75%がひとつ以上の顎関節症症状を有するという疫学的データもある¹⁾。顎関節症の病因は多因子的であるとされ、咬合問題、精神的問題、生活での各種寄与因子さらには慢性化した疼痛の問題など、多くの要因が複雑に影響して症状の自覚に関与していることが報告されている。申請者が所属する東京医科歯科大学歯学部附属病院顎関節治療部（以下東京）では、大都市圏という地域性もあるが、年間2,000人を超える顎関節症患者が来院している。また、共同研究代表者の所属する北京大学顎機能異常口腔顔面痛センター（以下北京）では、年間1,500人の顎関節症患者を受け入れており、両施設とも他の世界の都市の治療施設と比較して突出して多いといえる。これら顎関節症患者の治療において、従来、関節病態や咬合要因に対する治療のみで効果のみられない患者を多く抱え、対応に苦慮する状況が間々見られた。このような背景から、東京では、症状発現とその維持、永續化に関与している寄与因子を、多面的に評価する必要性を痛感し、顎関節症患者における多次元評価プロトコールを作成するため、2000年以来、顎関節症患者を対象に調査を実施し、その結果を報告してきた^{2,3)}。多次元評価プロトコールは、評価項目として、生活障害度、摂食困難度、疼痛持続期間・変化・強度、疼痛種類、頭痛

の有無，不安および抑うつ強度，神経症のおよび外向的性格傾向，日常生活習慣・習癖・環境・異常機能因子強度を含むもので，現在までの分析で，顎関節症患者の半数以上が望ましくない口腔習癖を有すること，症状の遷延に日常生活での口腔習癖，夜間の異常機能，不安の亢進，睡眠障害等が関与していること，寄与因子相互では心理的因子が異常機能を高めること，等が統計的有意性を持って示唆された²⁾。この多次元評価プロトコルを，日中の施設における顎関節症患者の診断，治療に適用することにより，患者の寄与因子をよりの確に評価することが期待される。本研究では，東京と北京の患者背景を比較し，多次元評価プロトコルの治療への適用の有効性と問題点を検討する。

方法：

1. 対象

2003年4月1日以降2006年2月15日の間に，東京および北京に来院し，以下の選択基準を満たした顎関節症有痛患者を対象とした。

1) 取込基準：(1) 日本顎関節学会顎関節症診断基⁴⁾ および Research Diagnostic Criteria / Temporomandibular disorders (RDC/TMD)⁵⁾ に基づき，顎関節症の，咀嚼筋障害，関節包・靭帯障害，関節円板障害，変形性関節症との一次症型診断がついていること。(2) 顎関節領域ないし咀嚼筋等に1週間以上継続する疼痛を有すること。(3) 年齢12歳以上，(4) 新患ならびに他施設からの治療継続依頼患者を問わない。ただし服薬中の患者では鎮痛薬，筋弛緩薬で1週間以上，抗不安薬，抗うつ薬，抗精神薬で1ヶ月以上のWashout期間をおく。

2) 除外基準：(1) 他疾患に由来する疼痛（歯痛に注意）を有する。(2) 系統的骨・関節疾患を随伴している，(3) 年齢12歳未満，(4) 消炎鎮痛薬，抗不安薬，抗うつ薬，抗精神薬を定期的に服用している，(5) 臼歯部欠損がある（ブリッジの使用は可とするが，可撤性義歯を使用している場合は不可とする。また7の単独欠損は義歯使用の有無を問わず可とする）。

2. 測定項目

研究参加に同意した患者に対し，顎関節症の臨床検査および多次元評価プロトコルを用いた患者の自己評価による質問項目への回答を収集した。

1) 顎関節症臨床検査項目

顎関節症の臨床検査として，関節雑音，無痛・有痛開口域，疼痛の部位および強度を測定した。疼痛測定の対象部位は，左右側頭筋前部，咬筋体部，咬筋停止部，耳介下部，下顎頭外側極，下顎頭後方部の計12部位で，圧痛，運動痛について，4段階の疼痛強度（無痛，軽度，中等度，重度）にて評価した。また，パノラマX線画像により，下顎頭の形態の評価を行った。上記臨床検査項目より，日本顎関節学会診断基準に基づき，顎関節症の症型分類を行った。すなわち，I型：咀嚼筋障害，II型：関節包・靭帯障害，III型：関節円板障害，IV型：変形性関節症，V型：その他の5症型に分類した。

2) 多次元評価プロトコル評価項目

多次元評価プロトコルを用い以下の質問項目について，患者の自己評価による回答を収集した。

(1) 日常生活障害度：日常生活10項目の障害度について，5段階順序尺度スケールを用いてその支障内容，強度を測定する。

(2) 摂食困難度：「口に入らない」，「かみきれない」，「すりつぶせない」の摂取困難種類について Visual Analogue Scale (VAS) による数値尺度スケールを用いてその困難度ならびに全体としての食物摂取困難度を測定する。

(3) 疼痛強度および持続期間：疼痛の開始時期からの持続時間，強度について VAS による数値尺度スケールにより測定する。

(4) 頭痛状況：頭痛に関する簡易診断票を用いて，頭痛の部位，強度，頻度を明確化する。

(6) 不安・抑うつ：Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)により測定する。

(7) 神経症的・外向的性格傾向：Eysenck Personality Questionnaire Short form (SEPG)により傾向得点を測定する。

(8) 習慣・習癖因子：日常生活上の要因36項目について，その強度を4段階順序尺度スケールにより測定する。

3. 統計解析

東京，北京の患者群間で各測定項目に関して，比率についてはカイ二乗検定，測定値については Mann-Whitney U 検定により解析した。

結果の表中，P 値の *：Mann-Whitney U 検定，†：カイ二乗検定，NS：not significant を示す。

結果：

解析の対象となった患者は、東京 363 名、北京 72 名である。

各測定値の分布はいずれも正規性を示さなかったため、代表値は中央値 (25, 75 パーセントイル) にて表した。

1. 性, 年齢, 症型分類, 開口域 (表 1)

東京, 北京とも女性が男性の 2 倍以上であった。年齢は、東京 32 歳, 北京 33 歳であり、性別割合, 年齢とも両群間に有意差は認められなかった。

症型割合は群間差がみられ、東京ではⅢ型が 60% を占めるのに対し、北京では、Ⅱ型, Ⅳ型がそれぞれ約 30% を示していた。開口域は両群とも、ほぼ同様の値を示していた。

表 1		東京	北京	P 値
性別数 (%) (人)		女性 272 (71.8) 男性 91 (25.1)	女性 57 (79.2) 男性 15 (20.8)	NS
年齢中央値 (25,75 パーセントイル) (歳)		32 (24, 50)	33 (26, 49)	NS
症型割合 (%)	I 型	19.3	11.1	
	II 型	16.3	33.3	
	III 型	60.3	25.0	.00 †
	IV 型	3.3	30.6	
	V 型	0.8	0	
無痛開口域中央値 (25,75 パーセントイル) (mm)		32 (25, 41)	30 (25, 38)	NS
有痛開口域中央値 (25,75 パーセントイル) (mm)		38 (30, 45)	36 (30, 40)	NS

2. 日常生活障害割合 (表 2)

日常生活障害度要因のうち、選択した割合に差があったものを示す。薄い食品をすりつぶすことに困難を感じているのは、北京において東京より有意に高かった。

表 2		全く問題ない	あまり問題ない	やや困難	かなり困難	全くできない	P 値 †
薄い食品すりつぶし	東京	35.7	36.5	21.2	5.0	1.7	.007 †
困難	北京	18.1	34.7	31.9	11.1	4.2	

3. 摂食困難度 (表 3)

口入れ困難, かみきり困難, すりつぶし困難とも、両群において中程度の困難度を示したが、いずれの困難状況においても、北京で有意に高い困難 VAS 値を示した。総合的困難では、有意差はみられなかった。

表 3		東京	北京	P 値*
摂食困難度 100mmVAS 中央値 (25,75 パーセントイル)				
口入れ困難		52 (18, 75)	58 (26, 88)	.026*
かみきり困難		42 (14, 66)	49 (22, 70)	.043*
すりつぶし困難		35 (8, 64)	53 (24, 69)	.002*
食品摂取総合困難		49 (24, 65)	51 (23, 71)	NS

4. 疼痛強度, 疼痛持続期間

初診時における疼痛強度は、100mmVAS において、北京において有意に高い値を示した。疼痛持続期間中央値は、東京 5 ヶ月, 北京 2 ヶ月であったが、有意差はなかった。

表 4		日本	中国	P 値*
初診時疼痛強度 (100mmVAS) 中央値 (25,75 パーセントイル)		33 (15, 59)	52 (34, 72)	.000*
疼痛持続期間 (月) 中央値 (25,75 パーセントイル)		5 (1, 6)	2 (0, 6)	NS

5. 頭痛 (表5)

頭痛を自覚している患者は、東京で約半数、北京で62.5%であり、北京において有意に多かった。

表5	東京	北京	P値†
頭痛あり (%)	49.0	62.5	.040†

6. 不安・抑うつ (表6)

測定に使用したHADSは、スクリーニング指標として、0-7点：健常域、8-10点：疑診域、11-21点：確診域が設定されており、この指標に従えば、その割合に有意差は認められなかった。

表6		東京	北京	P値†
不安割合 (%)	健常域	60.6	56.9	NS
	疑診域	20.9	25.0	
	確診域	18.5	18.1	
抑うつ割合 (%)	健常域	82.6	71.8	NS
	疑診域	11.9	13.2	
	確診域	5.5	6.0	

7. 神経症的・外向的性格傾向得点 (表7)

神経症的性格傾向得点は有意差なし、外向的性格傾向得点は1点の違いながら、北京において有意に高かった。

表7		東京	北京	P値*
神経症的性格傾向得点中央値 (25,75パーセンタイル)		15 (11, 18)	14 (11, 17)	NS
外向的性格傾向得点中央値 (25,75パーセンタイル)		16 (14, 18)	17 (15, 19)	.018*

8. 日常生活寄与因子 (表8)

各々の質問に対して、「いいえ」、「たまに」、「しばしば」、「いつも」の4段階での回答を求めた。東京、北京の両群間で有意差がみられた項目のみ下記表に示す。このうち、東京で多いのは、不良姿勢、職場を含む人間関係の緊張、歯ぎしりの自覚、起床時症状であり、北京において多いのは、球技スポーツ、受話器の肩ばさみであった。

表8		いいえ	たまに	しばしば	いつも	P値†
1) 習慣や痛						
睡眠不足か	東京	23.1	42.1	24.2	10.5	.002†
	北京	22.2	27.8	23.6	26.4	
上下歯列接触させているか	東京	16.8	24.8	28.9	29.5	.002†
	北京	28.2	11.3	18.3	42.3	
不良姿勢を注意されるか	東京	28.2	35.4	24.0	12.4	.023†
	北京	44.9	31.9	11.6	11.6	
長時間電話・会話をするか	東京	32.0	37.0	21.8	9.1	.001†
	北京	35.2	35.2	7.0	22.5	
片かみをするか	東京	24.7	24.7	29.1	21.6	.002†
	北京	18.1	19.4	19.4	43.1	
2) スポーツ						
球技スポーツをするか	東京	74.9	17.1	6.1	1.9	.000†
	北京	55.6	27.8	6.9	9.7	

3) 職場・学校・家庭						
細かい作業をするか	東京	29.0	29.6	22.7	18.8	.001 †
	北京	22.2	19.4	18.1	40.3	
エアコンが寒いを感じるか	東京	35.8	29.7	23.9	10.6	.008 †
	北京	29.2	29.2	16.7	25.0	
応接や会議での緊張はあるか	東京	20.5	45.2	25.2	9.1	.010 †
	北京	38.9	34.7	19.4	6.9	
人間関係での緊張はあるか	東京	24.4	45.0	22.8	7.8	.000 †
	北京	51.4	34.7	11.1	2.8	
受話器のかたばさみをするか	東京	78.5	14.6	5.2	1.7	.022 †
	北京	62.0	26.8	7.0	4.2	
キーボード作業をするか	東京	28.5	21.5	18.5	31.5	.020 †
	北京	25.0	13.9	11.1	50.0	
4) 夜間ブラキシズム						
夜間に自覚することはあるか	東京	58.4	25.9	13.2	2.5	.000 †
	北京	87.5	8.3	2.8	1.4	
覚醒時に食いしばり感覚があるか	東京	62.3	24.0	11.6	2.2	.000 †
	北京	88.4	8.7	0	2.9	
起床時の開口困難・疼痛があるか	東京	40.4	31.2	18.7	9.7	.004 †
	北京	62.5	19.4	8.3	9.7	

考察：

世界的標準に近づいてきた診断基準がもたらされてきたことにより、顎関節症の分類比率や、症状、兆候について人種比較した研究が90年代以降報告されている。白色人種とアフリカ系アメリカ人の顎関節症症状について比較した研究では、両人種間には、疼痛の身体化以外では、差がみられなかった⁶⁾。一方、顎関節症の症状、徴候は、20から30代に多く発症し、高齢になるにしたがって減少する傾向にあること⁷⁾、治療を求める患者は、男女比1:3.9で、女性患者が優勢であることは世界的にもほぼ同様の傾向である。本研究における、東京、北京の対象患者群は、年齢、男女比とも有意差なくほぼ同様の傾向を示したことは、一般的な顎関節症患者集団が対象となっていることを示している。一方、顎関節症の症型割合には両群間に有意差がみられた。わが国における症型分類では、Ⅲ型が約60%とされており⁸⁾、東京での患者比率はほぼこれに一致するが、北京における分類では、Ⅲ型が少なく、Ⅱ、Ⅳ型の比率が大きい。両施設において世界的に普及しているRDC/TMD診断基準⁹⁾およびそこから細分類した症型分類を用いたが、分類のための診断基準、診査における較正が必要であることが考えられる。無痛、有痛開口域は、両施設の対象患者はほぼアジア系のモンゴロイドと考えられ、顔面骨格的に同様の傾向を持つものと予測される。

日常生活障害では、薄い食品すりつぶし困難に有意差がみられたが、項目3の摂食困難度において、口入れ困難、かみきり困難、すりつぶし困難VASで、差がみられたのと同様、東京に比べ北京の患者は、より大きな摂食困難を感じていることが示唆された。両国における食習慣、嗜好食品には、大きな違いがあると考えられる。東京における、過去の調査では、ハンバーガー、あわび、すめ、フランスパン等が、摂食困難な代表的食品として選択された⁸⁾。今回の調査では、食品目個々については調査対象とする食品の選択について両施設間での調整まで至らなかった。食品摂取に関して、北京では、東京に比べより大きく、固い食品の摂取頻度が高いのか、あるいは、食品摂取に対する要求度が高いのか、今後の検討課題として興味深い。

自覚的疼痛強度について、人種間あるいは国の間で比較した報告はみられない。初診来院時の疼痛強度VAS

は、北京において東京の1.5倍以上強いこと、また、頭痛の有病比率が北京において有意に高いことは、疼痛感受性、耐性に人種あるいは文化的背景があることをうかがわせる。

心理的状況について、顎関節症の白色人種、アフリカ系アメリカ人種間では、抑うつに差はなかったものの疼痛の身体化に差がみられた⁹⁾。東京、北京の患者間では、不安・抑うつ、神経症性格傾向に差はみられず、北京では1得点、外向的性格傾向が東京より高く、これらは、両患者群でほぼ同様の心理的状況を有していることを表していると考えられる。

多因子的であるとされる顎関節症の病因の中で、生活上の寄与因子は大きな要因と考えられ、個々の問題については報告されているものの国家間で比較した報告はない。など、多くの要因が複雑に影響して症状の自覚に関与していることが報告されている。特徴的なのは、北京において球技スポーツ実施比率が高く、スポーツ種類の回答では、ピンポン、羽毛球（バドミントン）が多く記載されており、その生活風景が伺われる。人間関係の緊張は、東京において有意に高いといえる。東京という都市環境の影響も考えられるが、緊張を感じる職場・生活環境にさらされていること、これには外向的性格傾向の低さも影響している可能性もある。夜間ブラキシズムの自覚は東京において高く、ストレス反応とも考えられているブラキシズムへの心理的因子の関与の考えられる。

本研究から、今後の課題として、診断方法の較正および、より繊細な患者背景の把握のためにプロトコールに各国の特徴的な質問項目を追加する必要性が示された。一方、東京、北京の患者群間で有意差がみられた、疼痛強度、摂食困難度、習癖は、両国間の人種・文化的相違を反映するものとも考えられ顎関節症の病態を把握する上で重要な診査事項であること、また、顎関節症の診断、治療遂行上のグローバルスタンダードに加え、地域に適応した診査、診断項目の選択を行うことの重要性が示唆された。

参考文献：

1. Lipton JA, Ship JA et al. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. J Am Dent Assoc 124: 115-121, 1993.
2. Kino K, Sugisaki M, Haketa T, Amemori Y, Ishikawa T, Shibuya T, Sato F, Amagasa T, Shibuya T, Tanabe H, Yoda T, Sakamoto I, Omura K and Miyaoka H. The comparison between pains, difficulties in function and associating factors of patients in subtypes of temporomandibular disorders. J Oral Rehabil 32: 315-325, 2005.
3. Sugisaki M, Kino K, Yoshida N, Ishikawa T, Amagasa T, Haketa T: Development of a new questionnaire to assess pain-related limitations in Japanese patients with temporomandibular disorders. Community Dent Oral Epidemiol 33: 384-95, 2005.
4. 顎関節症診断に関するガイドライン日顎会。日本顎関節学会。2001。
5. Dworkin SF, LeResche L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: Review, criteria, examinations and specifications, critique. J Craniomandib Disord 6: 301-355, 1992.
6. Plesh O, Sinisi SE, Crawford PB, Gansky SA. Diagnoses based on the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders in a biracial population of young women. J Orofac Pain 19: 65-75, 2005.
7. Levitt SR, McKinney MW. Validating the TMJ scale in a national sample of 10,000 patients: Demographic and epidemiologic characteristics. J Orofac Pain 8: 25-35, 1994.
8. 木野孔司, 杉崎正志, 羽毛田匡ら。顎関節症患者の多次元評価プロトコール作成のための予備調査結果。補綴誌 46・108 回特別号, 140, 2002。

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2006年 3月 20日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 松森 昭 

所属機関名： 京都大学大学院医学研究科

内科学専攻内科学講座

所属部署： 循環器内科学 職名： 助教授
〒606-8507

所在地： 京都市左京区聖護院川原町54

電話： 075-751-3186 内線： 3186

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国におけるC型肝炎ウイルスによる心筋症に関する調査研究

3. 成果の概要 (100字程度)

北京大学肝臓研究所により集められた肝炎症例における心筋症の発症頻度を調査する目的でC型肝炎患者200例の血清を用いて心筋障害の指標としてのNT-proBNPを測定した。

その結果、NT-proBNPは16%で高値を示し、中国におけるC型肝炎患者で心筋障害が高頻度に存在することが明らかとなった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 松森 昭 職名： 助教授

所属機関： 京都大学大学院医学研究科 部署： 内科学専攻内科学講座
循環器内科学

中国側研究者氏名： 庄 輝 職名： Professor

所属機関： Peking University Health
Science Center 部署： Microbiology

中国におけるC型肝炎ウイルスによる心筋症に関する研究調査研究

研究者氏名 松森 昭

所属 京都大学大学院医学研究科循環器内科学・助教授

共同研究者氏名 庄 輝

所属 北京大学医学部・教授

【はじめに】

原因不明の難病、心筋症の病因としてウイルス感染が重要であると考えられてきたが、最近のわれわれの研究によりC型肝炎ウイルス（HCV）が重要な病因であることが明らかになった。近年、われわれが中心となり、特発性心筋症調査研究班において心筋症におけるHCVの感染の頻度の全国調査を行ったところ、拡張型心筋症で6%、肥大型心筋症で10%がHCV抗体陽性であり、両疾患においてHCV感染の重要性が示唆された。

また、WHO/ISFCの特別委員会により心筋炎、心筋症におけるウイルス感染の意義を検討するワークショップが開かれ7ヶ国の専門家が参加し、筆者も参加したが、このワークショップで検討された心筋標本では、コクサッキー・ウイルスゲノムはほとんど検出されず、HCVが27%に検出され、HCVの重要性が国際的にも認識された。

最近、われわれは1985～1990年米国を中心に実施された心筋炎の免疫抑制療法臨床試験のため登録された症例を解析し、1355例中59例（4.4%）がHCV感染が陽性であることが明らかになり、米国のHCV感染陽性率1.8%と比し有意に頻度が高いことが明らかとなった。

さらに、脳性ナトリウム利尿ポリペプチド（BNP）や心筋トロポニンI、心筋トロポニンTはHCVによる心筋疾患の治療経過の判定や予後の推定に有用であることが明らかになりつつあり、われわれは、BNP、トロポニンTの測定により、HCV心筋疾患が容易に診断できることを明らかにした。

HCV感染は人種、地域により大きな差異があり、またウイルスゲノムの多様性とその発症頻度の関連も考えられるが未だ明らかではない。中国においてはHCV感染の頻度が高く、心筋症の病因として重要であると考えられる。北京大学微生物学 Hui Zhuang 教授は肝炎ウイルス研究の第一人者であり、HCVに関する疫学調査に実績がある。そこで、本研究では、Zhuang 教授との共同研究によりHCV感染者の血中の心筋トロポニンT、BNPを測定し、中国におけるHCVによる心筋症の発症頻度を明らかにすることを目的とした。

【方法】

2004年9月、筆者は世界心臓連盟臨床心臓病理事会理事となり、同理事会に新たに設立された心筋症・心

不全部会コーディネータに就任した。そして心筋症の国際共同研究を計画した。

中国においては B 型肝炎ウイルス、HCV 感染の頻度が高く、心筋症、心筋炎の病因として重要であると考えられた。北京大学微生物学 Hui Zhuang 教授は、中国におけるウイルス肝炎研究の第一人者であり、多くの疫学調査を行い、多数のウイルス性肝炎患者資料を保存していたため。Dr. Zhuang の保存している検体ならびに Dr. Zhuang の関連施設において今後収集される検体について心異常の有無について検討することを目的とした。HCV 抗体陽性者の血中トロポニン T, トロポニン I, NT-proBNP を測定し、HCV による心筋症の発症頻度を検討した。各結果の陽性例について心電図, 心エコー図を実施し、心異常がある例については心筋生検を実施した。血清及び心筋組織の採取は患者の同意を得た上で行った。

【結果】

北京大学肝臓研究所により集められた肝炎症例における心筋症の発症頻度を調査する目的で、C 型肝炎患者 200 例の血清を用いて心筋障害の指標としての NT-proBNP を測定した。

その結果、NT-proBNP は 16% で高値を示し、中国における C 型肝炎患者で心筋障害が高頻度に存在することが明らかとなった。

【今後の予定】

1. 各症例について血中 HCV-RNA の検出、定量、ゲノタイプを決定し、心筋生検からのプラス鎖およびマイナス HCV-RNA の検出、HCV RNA 定量、免疫組織科学的方法による心筋組織における HCV 抗原の局在の検討、In situ hybridization 法による心筋組織内 HCV-RNA の局在の検討をする。
2. HCV ウイルス塩基配列の決定患者血中あるいは心筋から得られた HCV について HVR を中心にクローニングを行い、その塩基配列を臨床像と比較検討する。また、エピトープペプチド内に入った点突然変異は MHC 結合に重要な残基や T 細胞認識に重要な残基を変える可能性もあり、また、T 細胞の認識に共存する本来のエピトープペプチドの認識を妨げるアンタゴニスト活性をもつペプチドを作る可能性もあるため、それらの点についても検討する。
3. HCV 感受性遺伝子の検索これまで我々が臨床的に経過観察している HCV 心筋症患者および対照群につき、インフォームドコンセントを得たのちに、末梢血よりゲノム DNA を抽出し、HLA タイプとの関連を検討する。また、マイクロサテライト法を用いて HCV 心筋症と関連する遺伝子を検索する。

【考察】

拡張型心筋症は予後が悪く心臓移植の対象疾患として最も重要な疾患である。これまで本症におけるウイルス感染の重要性が指摘されてきたが、研究者により結果が一定していないため、治療法の開発などに支障をきたしている。HCV 感染では高頻度に持続感染が起こることが知られ、ウイルス変異や免疫異常との関連が明らかになれば、これらの病態の解析が可能であると思われる。HCV に関する研究では我が国が進んでお

り、とくに心血管病変における HCV の役割については海外では殆ど行われていない。

本研究は、我が国において先駆的に行われている HCV 心筋症の研究を、肝炎ウイルス感染が社会的問題となっている中国との共同研究を行う点に大きな意義がある。HCV による心筋症では肝炎の合併例もあるが、肝異常を伴わないものも多い。しかし、HCV による臓器選択性に関する研究は全く行われておらず、本研究により HCV ゲノム、HLA 遺伝子との関連が明らかとなれば、HCV による臓器障害の予防・治療に役立つことが期待される。また、HCV 肝炎ではインターフェロン、リバビリンなどの抗ウイルス療法が有効であり、HCV による心筋症の早期診断法や自然歴が明らかとなれば、本症の治療への応用が可能となると思われる。

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－中国人研究者・技術者招聘－報告書

2006年 3月 11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 折戸 悦朗 
名古屋市立大学大学院
所属機関名： _____
臨床分子内科学
所属部署： _____ 職名： 講師
〒
所在地： 476-0081名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1
電話： 052-851-5511 内線： 8216

1. 助成金額： ¥750,000 円

2. 研究テーマ

日中におけるB型肝炎ウイルスgenotypeの違いとその臨床的意義の検討

3. 成果の概要（100字程度）

中国南部深せん地区のB型慢性肝疾患患者における病態とHBV genotypeとの関連について検討した。同地区では、HBV genotype B型が過半数を占め、C1型とC2型がほぼ同数を占めていた。特に肝癌患者においては、35歳以下の若年者では全例genotype B型患者で、高齢になるほどgenotype C型の割合が増加した。以上から、同地区でのB型肝炎ウイルス感染者のHBV genotypeと病態が密接に関連していることが示された。

4. 被招聘者

氏名： 袁 静 職名： 助教授

所属機関： Shenzhen East Lake Hospital 部署： 感染症部門

5. 滞在日程概要（日付、主な活動・工程等）

2006年1月14日来日、実験の計画と必要な名古屋市立大学で作成した試薬、検体の準備を行った。本人の子供さんが体調不良となり、本人の強い希望で当大学の試薬を持って2006年1月27日一旦中国に看病のためもどった。深せんのEast Lake Hospitalにおいて、現地で収集された241症例のB型慢性肝疾患患者血清を使い、当院から持っていった試薬を使ってHBV genotypeを現地で測定した。全検体の測定を終了し、2006年2月27日に再来日した。名古屋市立大学において最終段階のHBV DNA配列の決定と解析を行った。すべての実験を終了して当大学にて結果を発表し2006年3月11日帰国となった。帰国後に中国で論文の執筆の準備にはいる。

日中における B 型肝炎ウイルスジェノタイプの違いとその臨床的意義の検討

研究者氏名	袁 静
中国所属機関	深せん東湖病院
日本研究機関	名古屋市立大学大学院 臨床分子内科
指導責任者	講師 折戸 悦朗
共同研究者	溝上雅史、田中靖人

要旨

中国南部深せん地区における B 型肝炎ウイルス感染肝疾患患者における病態と HBV genotype との関連は未だに不明である。今回われわれは、同地区での B 型肝炎患者 241 症例について、各病態と HBV genotype との関連について検討を行った。この地区では HBV genotype B 型患者が過半数を占め、残りの症例のほぼ半数ずつを C1 型と C2 型が占めていることが判明した。また肝癌患者においては、年齢と genotype の分布との関係を見ると、35 歳以下では B 型が全例を占めるのに対し、高年齢になるにつれて C 型の患者が増加することが示された。C1 型と C2 型の患者の病態の違いは明らかではなかった。以上から、同地区での B 型肝炎ウイルス感染者の HBV genotype と病態が極めて密接に関連していることが示された。

Key Words B 型肝炎ウイルス感染、慢性肝疾患、HBV genotype、肝癌

緒言:

B 型肝炎ウイルスは、その遺伝子型の違いから HBV genotype A 型から H 型までに分類されている。また、これらの各 genotype は、著しい地域特異性があり、分布に大きな偏りがみられることが知られている。さらに、各 genotype によって、病態の進展度、予後、治療効果に明確な差がみられることをすでに報告している。今回中国南部の深せん地区において、B 型慢性肝疾患患者の HBV genotype を解析し、その病態変化や年齢との関係について初めて検討した。

対象と方法:

対象患者は、深せん東湖病院にて診療を受けた B 型慢性肝疾患患者 241 例である。内訳は HBe 抗原陰性の無症候性キャリア 32 例、HBe 抗原陽性の無症候性キャリア 34 例、慢性肝炎患者 73 例、肝硬変患者 68 例、肝癌患者 34 例である。HBV genotype の測定については、当院で開発した方法を用いた。すなわち HBV DNA を PCR にて増幅後各種制限酵素を用いて各 genotype に特異的な切れ方を泳同で確認した。また一部の症例については、Pre-C 領域、core promoter 領域の配列を決定し、その変異の有無を確認した。

結果:

各病態ごとの患者背景は表のごとくである。HBV genotype の分布は、genotype B 型が 157 例、C 型が 79 例であった。また genotype C 型の中でさらに subgenotype C1 型、C2 型の内訳はそれぞれ 35 例、44 例で差は見られなかった。

各疾患での男女差は、無症候性キャリアでは男女に差はないが、肝癌患者では有意に男性が多く認められた。各病態別の臨床像では、ALT や総ビリルビン値、ヒアルロン酸は病態の進展とともに有意に増加していた。

各病態別の HBV genotype の分布は、無症候性キャリアでは genotype B 型の割合が多いが、病態の進展とと

もに genotype C 型の割合が増加していた。また subgenotype である C1 型と C2 型は病態別の差は見られなかった。

特に肝癌患者において、発症年齢と HBV genotype との関係を見ると、35 歳以下の若年肝癌を見ると、前例 genotype B 型であった。しかし 36 歳以上、50 歳以上と加齢とともに genotype C 型患者の割合が増加していた。Subgenotype C1 型、C2 型の間では特に有意差はみられなかった。

考案:

中国での B 型慢性肝疾患患者において、その HBV genotype の分布は、中国北部地域では、主に HBV genotype C 型が広く分布しており、南部に行くに従って、genotype B 型の割合が増加すると報告されている。今回の検討では、中国南部深セン地区においては、HBV genotype B 型症例の割合が約 65% とかなり高くなっており、従来の報告に矛盾しない。また病態に進展に伴って HBV genotype C 型の割合が増加しており、genotype C 型の方が予後が悪いと考えられる。さらに肝癌患者において、35 歳以下の若年肝癌では 100% の症例が genotype B 型であり、加齢とともに genotype C 型の割合が増加していた。この結果は非常に興味深い。200 年に台湾の Kao らが始めて 35 歳以下の若年肝癌には HBV genotype B 型の占める割合が非常に高いことを報告し、genotype B 型が若年発症に何らかの関与があるのではないかと報告したが、その後台湾以外からの追試結果は報告されておらず、今回初めて中国南部での検討で、やはり 35 歳以下の若年肝癌に genotype B 型が関連することが確認された。また現在のところ、genotype B 型のウイルスのどの遺伝子のどの変異が発癌に関与するのかは不明であるが、core promoter 変異が多く見られることから、ウイルスの活発な増殖が何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

文献:

1. Kao JH, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118:554-9, 2000.
2. Ding X, et al. Hepatitis B Virus Genotype Distribution among Chronic Hepatitis B Virus Carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 44(1):43-7, 2001.
3. Orito E, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 34: 590-594, 2001.
4. Orito E, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B virus of genotypes B and C. *Hepatology* 33(1): 218-223, 2001.

作成日：2006年3月11日

The clinical data of HBV-genotyping (n = 241)

Yuan Jing, Shenzhen East Lake Hospital

	Asc(eAg-)	Asc(eAg+)	CHB	Cir	HCC
n	32	34	73	68	34
MF	17\15	18\16	62\11	55\13	31\3
Age:mean(Y)	30.94±9.37	24.15±6.87	34.12±7.7	46.19±12.27	49.53±12.86
Duration:mean(Y)	9.78±6.53	7.8±6.07	9.56±5.73	11.04±7.30	11.93±7.50
History of B.T	0\32	1\34	0\73	3\68	2\34
Family history (mother)	7\32	16\34	15\73	15\68	6\34
Family history (others)	7\32	8\34	20\73	22\68	10\34
History of jaundice	4\32	2\34	2\73	9\68	5\34
Alcohol history	0\32	0\34	1\73	10\68	7\34
Mother native place(NS)	4\28	5\29	6\67	8\60	4\30
Biopsy(%)	0\32	0\34	73\73	8\60	1\34
HBsAg+	32\32	34\34	73\73	68\68	34\34
HBeAg+	0\32	34\34	33\73	19\68	2\34
HBeAb+	32\32	0\34	36\73	49\68	24\34
HbCAb+	32\32	34\34	73\73	68\68	34\34
ALT:mean(IU/L)	27.8±4.4	27.4±4.2	83.81±89.25	142.82±225.39	132.31±151.63
AST:mean(IU/L)	26.2±3.3	26.1±3.5	52.41±44.38	123.5±151.6	126.4±86.75
TB:mean(UMOL/L)	13.6±2.6	13.3±2.8	17.54±7.18	52.64±70.0	74.41±101.71
Alb(g/l)	Nor	Nor	Nor	34.84±6.32	36.1±4.86
Plt(x10 ⁹ /L)	Nor	Nor	Nor	76.32±39.71	122.71±62.74
AFP(ng/ml)			Nor	8\68(↑)	339.5±468.5
HA(ng/ml)			119.5±102.5	433.8±276.9	488.2±409.7
HBV DNA(log copies/ml)	3.26±1.43	7.72±0.71	5.46±1.95	4.70±1.70	4.55±1.70
B\C	23\6	25\9	43\30	45\21	21\13
C1\C2	2\4	4\5	12\18	8\13	9\4
Can not genotype	3	0	2	0	0

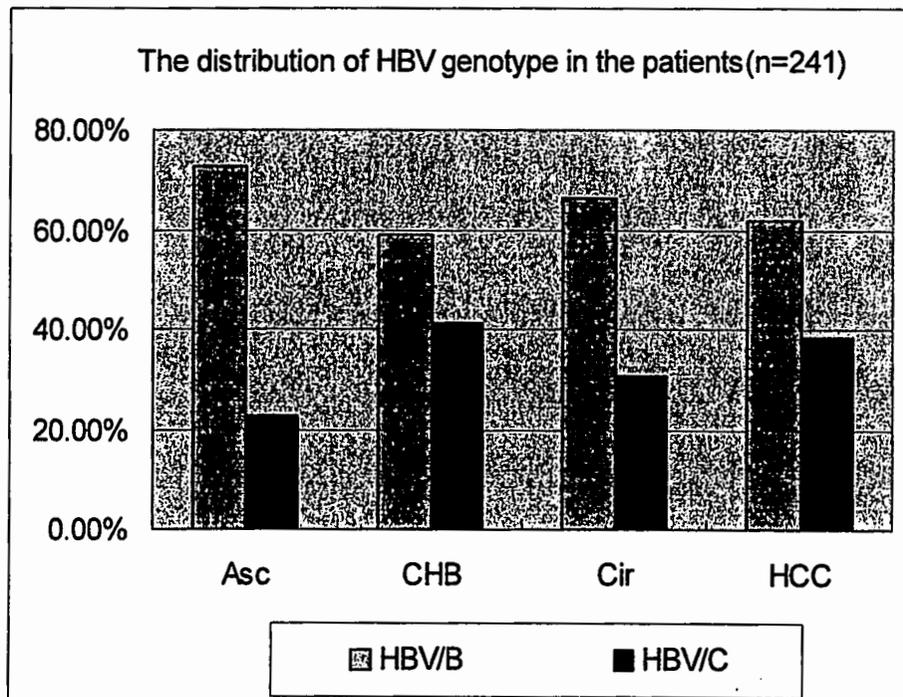
compare with the liver function:

	Asc	CHB	Cir	HCC
N	66	73	68	34
ALT(U/L)	27.6±4.3	83.81±89.25	142.82±225.39	132.31±151.63
P Value	<0.05	<0.05		>0.05
TB(umol/l)	13.4±2.7	17.54±7.18	52.64±70.0	74.41±101.71
P Value	>0.05	<0.05		>0.05
Alb(g/l)			34.84±6.32	36.1±4.86
P Value			>0.05	
HA(ng/ml)		119.5±102.5	433.8±276.9	488.2±409.7
P Value		<0.05		>0.05
Plt(x10 ⁹ /L)			76.32±39.71	122.71±62.74
P Value			<0.05	
HBVDNA(logcopies/ml)		5.46±1.95	4.70±1.70	4.55±1.70
P Value		<0.05		>0.05

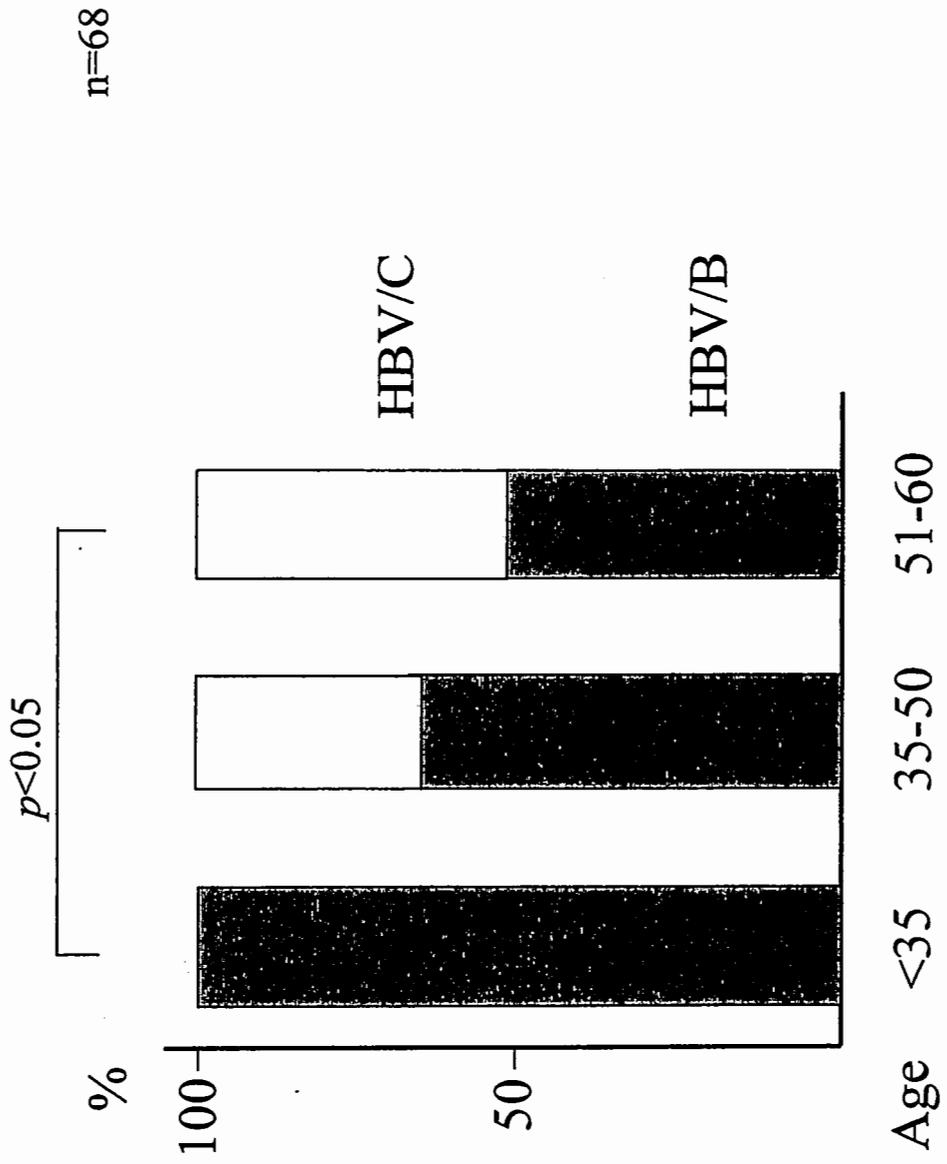
The distribution Of HBV genotype and subtype in these patients

(n=241)

	HBV/B	HBV/C	P value	HBV/C1	HBV/C2	P value	can not detect	N
Asc	48(72.7%)	15(22.7%)	NS	6(40%)	9(60%)	NS	3(4.6%)	66
CHB	43(58.9%)	30(41.1%)		12(40%)	18(60%)		0(0)	73
Cir	45(66.2%)	21(30.9%)		8(38.1%)	13(61.9%)		2(2.9%)	68
HCC	21(61.8%)	13(38.2%)		9(69.2%)	4(30.8%)		0(0)	34



Age distribution of the HCC patients in Shenzhen, China



財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金—中国人研究者・技術者招聘—報告書

2006年 3月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 裏出 良博



所属機関名： (財)大阪バイオサイエンス研究所

所属部署： 分子行動生物学部門 職名： 研究部長
〒 565-0874

所在地： 大阪府吹田市古江台6-2-4

電話： 06-6872-4851 内線： 320

1. 助成金額 750,000 円

2. 研究テーマ アデノシン受容体遺伝子欠損マウスを用いたカフェイン覚醒調節の解析

3. 成果の概要 (100字程度)

野生型マウス、アデノシンA1およびアデノシンA2A受容体遺伝子欠損マウスへの
カフェイン投与実験により、カフェインの覚醒効果は、脳内の第2の睡眠物質である
アデノシンのA2A受容体が関与することを証明した。

4. 被招聘者

氏名： Xu Xin-Hong 職名： 講師

所属機関： 中国 復旦大学上海医学院 部署： 薬理学教室

5. 滞在日程概要 (日付、主な活動・工程等)

5月 マウスの睡眠覚醒を測定する方法のトレーニング。カフェインを3つの投与量で投与した後、脳波と筋電図を記録することで、A1R KOマウスと野生型マウスのカフェインによる覚醒作用を比較し、A1アデノシン受容体の貢献度を調べる。

6月 カフェインを3つの投与量で投与した後、脳波と筋電図を記録することで、A2AR KOマウスと野生型マウスのカフェインによる覚醒作用を比較し、A2Aアデノシン受容体の貢献度を調べる。

7月、8月 自然な状態でA1R、A2ARのKOマウスの睡眠覚醒サイクルを測定し、A1RとA2ARの遺伝子欠損が及ぼす効果を明らかにする。

9月、10月 断眠による睡眠リバウンドに対するA1R、A2ARの貢献度を調べる。

11月 化学発光免疫プロット法を用いて、A1R KOマウス、A2AR KOマウスと野生型マウスにカフェインを投与した後、DARPP-32のリン酸化を測定する。そして、カフェインの情報伝達におけるアデノシン受容体サブタイプの重要性を明らかにする。

12月 結果解析および論文・報告書作成

-----日中医学協会助成事業-----

Adenosine A_{2A} receptor mediates arousal effect of caffeine in mice

研究者氏名	Xing-Hong Xu
中国所属機関	復旦大学医学部薬理
日本研究機関	大阪バイオサイエンス研究所
指導責任者	部長 裏出 良博
共同研究者名	Wei-Min Qu, 松本 直実, Zhi-Li Huang

Abstract

Caffeine is a component of tea, coffee and cola, and widely consumed in the world. Caffeine induces wakefulness and antagonizes the depressant effects of adenosine with similar affinities for A₁ receptors (A₁Rs) and A_{2A} receptors (A_{2A}Rs) at low doses in human and rodents, both of these 2 receptors have been proposed to be involved in sleep-wake regulation. However, what receptor mediated the arousal effect of caffeine remains controversial. Here we report that caffeine at dose of 15 mg kg⁻¹ increased wakefulness after an intraperitoneal injection at 9 a. m. in both A₁R wild-type and its knockout mice. In contrast, caffeine increased wakefulness only in A_{2A}R wild-type mice, but not at all in A_{2A}R knockout mice. These results clearly indicate that caffeine-induced wakefulness is mediated by adenosine A_{2A}R.

Keywords: Adenosine A₁ receptor; caffeine; knockout mice; sleep-wake regulation; DARPP-32 phosphorylation.

Introduction

Adenosine is an inhibitory neuromodulator involved in sleep-wake regulation¹. There are 4 subtypes of adenosine receptors, A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃, expressed in the central nervous system². Several lines of evidence indicate that both A₁ receptor (A₁R) and A_{2A} receptor (A_{2A}R) subtype are involved in mediating the sleep-inducing effect of adenosine³⁻⁷. Caffeine has the effect opposite to that of adenosine on sleep; i.e., it promotes wakefulness. In doses consumed by humans, it binds to A₁R and A_{2A}R with similar affinities as a receptor antagonist³. As the pharmacological tools used to determine the receptor involved show limited selectivity and/or incomplete blockade, we decided to use A₁R and A_{2A}R knockout (KO) mice to elucidate which receptor is involved in caffeine-induced wakefulness. Here, we administered caffeine to A₁R, A_{2A}R KO and wild-type (WT) mice and found that blockade of A_{2A}R of caffeine attributed to its arousal effect, with an increase in DARPP-32 (dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of relative molecular mass 32,000) at Thr 75.

Material and Methods

Mice and Chemicals. A_{2A}R and A₁R KO mice were generated by Chen's^{4,5} and Fredholm's⁶ laboratories, respectively. Male A₁R KO, A_{2A}R KO and WT mice of the inbred C57BL/6 strain, weighing 23-27 g (11-13 weeks old), were maintained at Oriental Bioservice Ltd (Kyoto, Japan) and used for the experiments. Caffeine (Sigma) was dissolved in PBS and intraperitoneally injected in mice at 9 a.m.

Electroencephalogram (EEG) and Electromyogram (EMG) Recordings. Under pentobarbital anesthesia (50 mg kg⁻¹, i.p.), mice were implanted with EEG and EMG electrodes for polysomnographic recordings as previously described^{7,8}. Baseline recordings were taken in each animal for 24 h, beginning at 8 a.m., which served as the control for the same animal. Vehicles were injected at 9 a.m. in the baseline day. On the next day, Caffeine (15 mg kg⁻¹) was injected in mice at 9 a.m. The vigilance states were automatically classified off-line by 10-s epochs into 3 stages of wake, rapid eye movement

(REM) and non-REM sleep by SLEEPSIGN, according to the standard criteria^{8,9}.

Determination of phosphoThr75-DARPP-32. Male WT and KO mice for A₁R and A_{2A}R were i.p. injected with vehicle or caffeine and killed 15 min later. The heads of the animals were immediately immersed with liquid nitrogen for six seconds. The dorsal parts of the striata rapidly (20 s) were dissected out on an ice-cold surface, sonicated in 750ml of 1% sodium dodecylsulphate and boiled for 10 min. Equal amounts of protein were separated and quantified for phospho-DARPP-32 bands as described¹⁰.

Statistical Analysis. See each figure legend. In all cases, $P < 0.05$ was taken as the level of significance.

Results and Discussion

To explore adenosine receptors involved in arousal effect induced by caffeine, firstly, we determined the effect of caffeine on sleep architecture in A₁R knockout (KO) mice during the light period, the majority of time is spent sleeping.

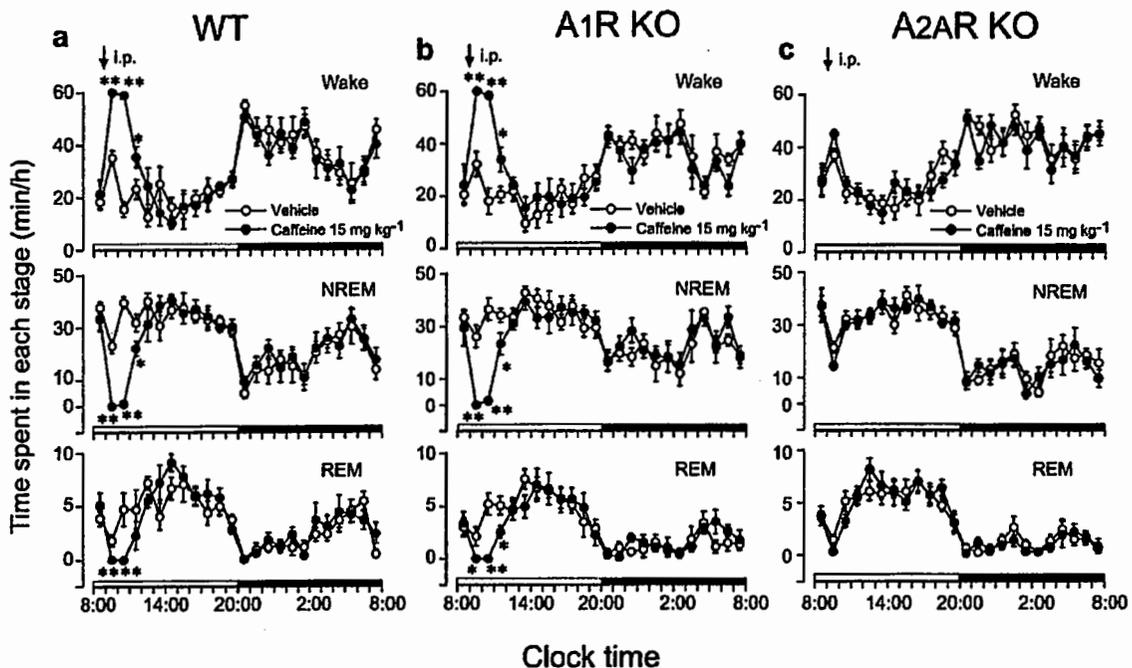


Figure 1 Time-course changes in caffeine 15 mg kg⁻¹ treatment group in WT (a), A₁R KO (b) and A_{2A}R KO (c) mice. Each circle represents the hourly mean \pm s.e.m. of wakefulness, NREM or REM sleep. Open and closed circles stand for the baseline and experimental day profiles, respectively. The arrows indicate the injection time at 9 a.m. The long horizontal open and filled bars on the x-axes indicate the 12 hr light and dark periods, respectively. Asterisk, $P < 0.05$; double asterisk, $P < 0.01$ by the paired t -test.

Under baseline conditions, the amounts and circadian profiles of sleep and wakefulness were identical between A₁R KO and wild-type (WT) mice (Fig. 1a, b), consistent with previous report¹¹. When caffeine was intraperitoneally (i.p.) given to WT mice at a dose of 15 mg kg⁻¹, which would correspond to an intake of approximately about 3-4 cups of coffee in human³, it significantly increased wakefulness during the first, second and third hour after injection by 1.7, 3.8 and 1.5 fold (Fig. 1a), respectively, when the wakefulness was compared with that of the baseline day. This enhancement of wakefulness was concomitant with decreases in NREM and REM sleep. Caffeine (15 mg kg⁻¹) decreased the NREM sleep by 100%, 97% and 31%, and reduced REM sleep by 100%, 100% and 52%, respectively, during the first, second and third hour after injection. Like WT mice, A₁R KO mice displayed similar changes in sleep-wake stages after

administration of caffeine (Fig. 1b). These data clearly indicated that adenosine A₁R is not involved in arousal effect of caffeine.

To investigate the role of A_{2A}R in the arousal effect of caffeine, we employed A_{2A}R KO mice⁴. When caffeine (15 mg kg⁻¹) was injected into the A_{2A}R KO mice, the KO mice did not exhibit any significant change in time spent in wake, NREM and REM sleep after caffeine administration (Fig. 1c). These results clearly indicate that adenosine A_{2A}R plays a crucial role in caffeine-induced wakefulness.

Since the stimulatory effects of caffeine has been reported to be associated with an increase in the state of phosphorylation of DARPP-32 (dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of relative molecular mass 32,000) at Thr 75 (Ref¹⁰). We quantified the level of the phospho-DARPP-32 after treatment with caffeine in A₁R, A_{2A}R KO mice and their WT mice to further clarify importance of adenosine receptor subtype in the signal transduction pathway of caffeine. Administration of caffeine (7.5 mg kg⁻¹) produced an increase in Thr 75 phosphorylation in A₁R KO, A₁R and A_{2A}R WT mice by 1.7-, 1.5- and 1.7-fold, respectively, but not in A_{2A}R KO mice, as compared with corresponding vehicle control (Fig. 2), suggesting that caffeine-induced increase in Thr 75 phosphorylation depends on the action on A_{2A}R. However, the roles of phosphorylation of Thr 75 of DARPP-32 in sleep-wake regulation need further investigation. We previously reported that activation of A_{2A}R induces sleep in rats^{12,13}. In striatopallidal neurons, activation of A_{2A}R stimulates the cAMP/ protein kinase A (PKA) pathway¹⁴ and blockade of A_{2A}R results in the decrease in PKA activity. It was recently demonstrated that phospho-Thr 75-DARPP-32 is an effective inhibitor of PKA¹⁵, therefore, the caffeine-induced increase in the state of phosphorylation of Thr 75 would further lower PKA activity, thereby providing a positive feedback amplification mechanism for shutting down A_{2A}R-stimulated PKA signaling pathway.

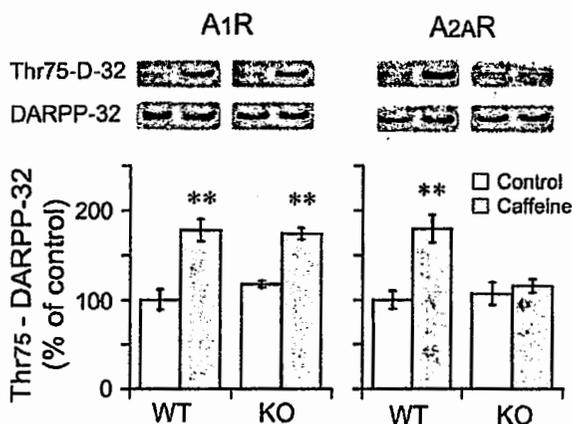


Figure 2 Effect of caffeine on DARPP-32 phosphorylation at thr 75 in WT and KO mice for A₁R and A_{2A}R. Mice were treated i.p. with caffeine (7.5 mg kg⁻¹) and decapitated 15 min after injection. The striatal levels of phospho-Thr 75-DARPP-32 were determined as described in Methods. Upper panels show representative image of immunoblot; lower panels show summary of data expressed as means \pm s.e.m. (n = 6 - 8). The amount of phosphorylated DARPP-32 is expressed as a percentage of that determined after vehicle administration. Double asterisk, P < 0.01 versus vehicle-injected WT mice, Student's t-test.

In the striatum, A_{2A}R are highly expressed postsynaptically by a large population of medium-sized spiny neurons^{16,17} and the cells expressing A_{2A}R represent about 50% of all DARPP-32-containing neurons¹⁰. These cells play a critical role in the functioning of the basal ganglia, a group of nuclei involved in the control of voluntary movements, as well as in motivational, emotional and cognitive aspects of motor behavior.

In conclusion, low doses of caffeine exhibited a striking wake-promoting effect in A₁R KO mice, but not in A_{2A}R KO mice, clearly indicating that the wake-promoting effect of caffeine requires functioning A_{2A}R.

References

1. Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., Thakkar, M., Bjorkum, A. A., Greene, R. W. & McCarley, R. W. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276, 1265-8. (1997).
2. Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. & Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 527-52 (2001).
3. Fredholm, B. B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. & Zvartau, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83-133. (1999).
4. Chen, J. F., Huang, Z., Ma, J., Zhu, J., Moratalla, R., Standaert, D., Moskowitz, M. A., Fink, J. S. & Schwarzschild, M. A. A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J. Neurosci.* 19, 9192-200 (1999).
5. Yu, L., Huang, Z., Mariani, J., Wang, Y., Moskowitz, M. & Chen, J. F. Selective inactivation or reconstitution of adenosine A_{2A} receptors in bone marrow cells reveals their significant contribution to the development of ischemic brain injury. *Nat. Med.* 10, 1081-7 (2004).
6. Johansson, B., Halldner, L., Dunwiddie, T. V., Masino, S. A., Poelchen, W., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X. J., Hardemark, A., Betsholtz, C., Herlenius, E. & Fredholm, B. B. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9407-12 (2001).
7. Mizoguchi, A., Eguchi, N., Kimura, K., Kiyohara, Y., Qu, W. M., Huang, Z. L., Mochizuki, T., Lazarus, M., Kobayashi, T., Kaneko, T., Narumiya, S., Urade, Y. & Hayaishi, O. Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11674-9 (2001).
8. Huang, Z. L., Qu, W. M., Li, W. D., Mochizuki, T., Eguchi, N., Watanabe, T., Urade, Y. & Hayaishi, O. Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9965-70 (2001).
9. Huang, Z. L., Mochizuki, T., Qu, W. M., Hong, Z. Y., Watanabe, T., Urade, Y. & Hayaishi, O. Altered sleep-wake characteristics and lack of arousal response to H₃ receptor antagonist in histamine H₁ receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 4687-92 (2006).
10. Lindskog, M., Svenningsson, P., Pozzi, L., Kim, Y., Fienberg, A. A., Bibb, J. A., Fredholm, B. B., Naim, A. C., Greengard, P. & Fisone, G. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature* 418, 774-8 (2002).
11. Stenberg, D., Litonius, E., Halldner, L., Johansson, B., Fredholm, B. B. & Porkka-Heiskanen, T. Sleep and its homeostatic regulation in mice lacking the adenosine A1 receptor. *J. Sleep Res.* 12, 283-90 (2003).
12. Satoh, S., Matsumura, H., Suzuki, F. & Hayaishi, O. Promotion of sleep mediated by the A_{2A}-adenosine receptor and possible involvement of this receptor in the sleep induced by prostaglandin D2 in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5980-4. (1996).
13. Hong, Z. Y., Huang, Z. L., Qu, W. M., Eguchi, N., Urade, Y. & Hayaishi, O. An adenosine A_{2A} receptor agonist induces sleep by increasing GABA release in the tuberomammillary nucleus to inhibit histaminergic systems in rats. *J. Neurochem.* 92, 1542-9 (2005).
14. Naim, A. C., Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A. & Greengard, P. The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 14-23 (2004).
15. Bibb, J. A., Snyder, G. L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A. A., Tsai, L. H., Kwon, Y. T., Girault, J. A., Czernik, A. J., Haganir, R. L., Hemmings, H. C., Jr., Naim, A. C. & Greengard, P. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 402, 669-71 (1999).
16. Svenningsson, P., Le Moine, C., Aubert, I., Burbard, P., Fredholm, B. B. & Bloch, B. Cellular distribution of adenosine A_{2A} receptor mRNA in the primate striatum. *J. Comp. Neurol.* 399, 229-40 (1998).
17. DeMet, E. M. & Chicz-DeMet, A. Localization of adenosine A_{2A}-receptors in rat brain with [3H]ZM-241385. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 366, 478-81 (2002).

(Mar 12, 2006)

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－日本人研究者派遣－報告書

2005 年 6 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った訪中交流について報告いたします。

添付資料： 訪中報告書

受給者氏名： 佐久間 康夫 

所属機関名： 日本医科大学

所属部署： 生理学第一講座 職名： 教授

所在地： 〒113-0086 東京都千駄本1-1-5

電話： 03-3822-2131 内線： 5356

1. 助成金額： 200,000 円

2. テーマ

脳の性差と性行動の調節

3. 成果の概要（100字程度）

①遼寧中医学院客員教授の称号を受け、年1回講演をすることを承諾。②共同研究するため、協会から頂いた20万円の助成金で実験設備を買い、寄付。③毎年日本医科大学から研究指導者を派遣。④修士課程終了者から、優秀者を選び、日本医科大学博士課程に留学を手配。

4. 招聘機関

機関名： 遼寧中医学院 代表者名： 馬 驥 職名： 院長

所在地： 中国遼寧省瀋陽市黄姑区崇山東路79号

5. 滞在日程概要（日付、主な旅程・行事等）

5月26日 成田空港から、中国・瀋陽へ

27日 遼寧中医学院学長に挨拶、大学および大学病院の見学

30日 遼寧中医学院基礎医学院訪問、生理学教研室主任教授らと会談

31日 遼寧中医学院針灸推拿学院電気生理研究室の見学および交流会

6月1日 共同研究などについて、副学長と会談。講演：「脳の性分化」

2日 瀋陽から帰国

脳の性差と性行動の調節

研究者氏名 佐久間 康夫
研究機関名 日本医科大学大学院
システム生理学分野

要旨

1. 訪問の目的：

- ① 教育方法の交流：私共の教室で行っている先進的な生理学教育、実習課程を中国側に紹介する。
- ② 研究技術の交流：我々が文部科学省特定領域「研究性分化」の助成により進めている脳の性分化の研究の成果を紹介する。
- ③ 共同研究の立案：日本医科大学と遼寧中医学院の教育・研究交流の実施計画を立案する。

2. 訪問の経緯：

遼寧中医学院助教授肖凱君は貴財団の援助により、日中笹川医学研究者制度第24期研究者として日本医科大学生理学第一講座において1年間の研究を行った後、本学大学院に入学し、2006年3月学位取得の見込みです。肖凱君はこの4年間、中国からの留学生の模範となる努力を重ね、刮目すべき研究成果を挙げました。学位取得後は助教授として在職している遼寧中医学院に戻り、現在の研究を持続する強い意志を持っております。遼寧中医学院でも巨大な研究センタービルを新築するなど、基礎医学研究の重要性を認識し、研究活動を推進する準備が進んでおり、肖君の帰国後の役割に大きな期待が寄せられています。このような経過を背景に、遼寧中医学院馬驥院長は、肖凱君の懇意により、日本における教育・研究体験を聴取する目的で小職を招聘されるに至りました。小職としても、この機会に遼寧中医学院の実情を視察することは大変意義あることと考えた次第です。

訪問の日程：

- 5月26日 成田空港から、中国・瀋陽へ
- 5月27日 午前：遼寧中医学院学長に挨拶、大学見学
午後：遼寧中医学院の大学生と大学院生に講演：「脳の性分化」
- 5月30日 午前：遼寧中医学院基礎医学院生理学教研室の先生方と会談
午後：実験の指導
- 5月31日 午前：遼寧中医学院電気生理研究室の見学（研究室現状の調査）および交流会
午後：遼寧中医学院科研処主催の交流会：「行動生理学の研究手法」

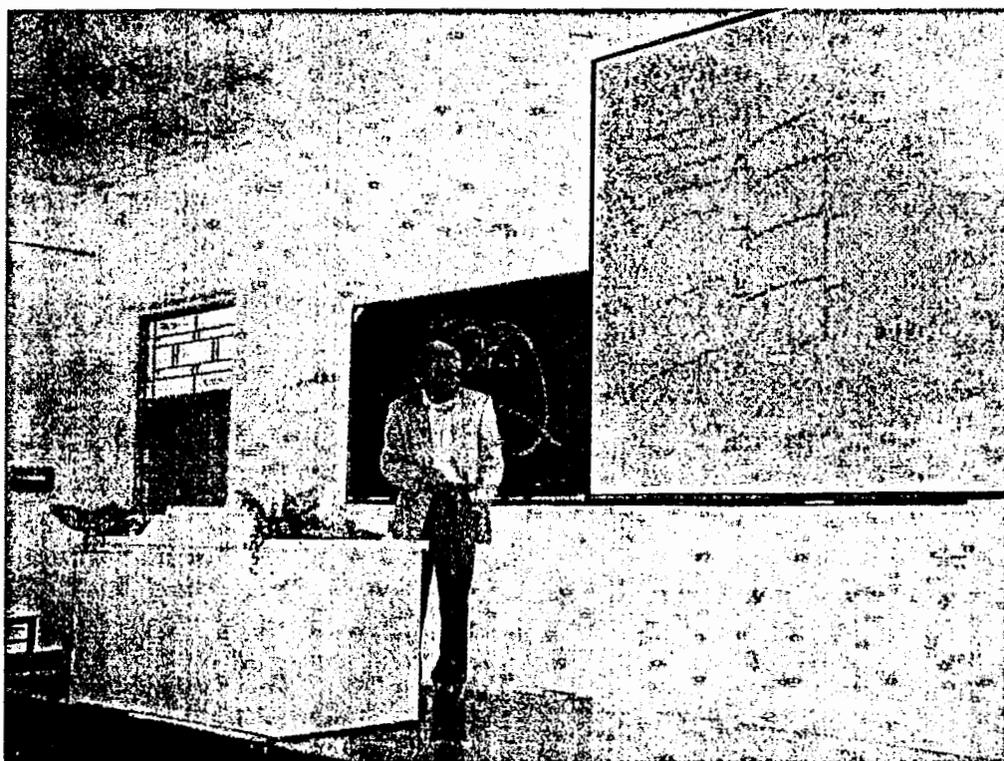
6月1日 午前：共同研究の再相談及び共同研究計画の調印

午後：遼寧中醫院長に挨拶

6月2日 瀋陽から帰国

講演内容：

訪問期間に、大学院生及び学部学生に向けて、「脳の性差と性行動の調節」という講演を行ないました。前半では、この領域における最新の研究動向を紹介し、後半では、当教室の研究成果を紹介しました。講演後、たくさんの学生からたいへん熱心な質問を受け、非常に充実した時間を過ごすことができました。中には、日本語が堪能な学生や日本への留学を志す学生もいて、中国の若い人たちの熱意を感じました。



指導の内容：

1. 大学生の生理学実験に参加させてもらい、実験中に、当教室の実習方法を紹介し、学生に具体的な実技について教授しました。
2. 電気生理学実験室の先生方と交流したうえ、新規に購入した機械の有効な利用方法および応用例などを議論しました。

訪問先の状況:

遼寧中医学院内の研究施設ならびに大学病院を見学いたしました。遼寧中医学院は、遼寧中医薬大学へと発展するためにさまざまな計画が動いております。特に、基礎研究分野においては、新しい研究センターとする核とするビルを建設しており、中国全土および全世界から人材の募集を呼びかけおり、その活力や発展の息吹を実感することができました。ところが、現在の段階において、いろいろ方面はかなり遅れているのは事実です。



今後の交流:

遼寧中医学院では、馬驥学長をはじめ、康廷国副学長、基礎医学院長の鄭洪新教授、針灸推拿学院の裴景春教授、研究処長の張立德教授、生理学教研室主任の王徳山教授、電気生理学研究室主任の鄭利岩教授など、たいへん多くの先生方と会談し、次のような合意を得ました。

- ① 遼寧中医学院客員教授の称号を受け、年1回講演をすることを承諾する。
- ② 今後、共同研究を展開させるべく、必要に応じて人的・物的サポートを行なう。
- ③ 毎年、日本医科大学から研究指導者を派遣し、教育活動を行なう。
- ④ 優秀な修士課程終了者が日本に留学できるよう、日本医科大学大学院の受け入れ体制を整える。

2005年10月6日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006年 3月 9日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 車 暁芳 
指導責任者名： 秋山 伸一 職名： 教授
所属機関名： 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療
科学専攻腫瘍学講座分子腫瘍学
〒 890-8520
所在地： 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1
電話： 099-275-5490 内線： 5490

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

survivinの成人T細胞白血病 (ATL)における発現とその意義

3. 成果の概要 (100字程度)

我々はATLにおけるアポトーシス抑制因子を調べ、survivinが高発現することが見出した。ヒ素でATL細胞を処理すると、survivin発現を低下させ、caspase 3が活性化させ、アポトーシスが誘導された。ヒ素のsurvivin発現を低下させるメカニズムはIkappaBalphaの分解を抑制することによって、NF-kappaBの核移行を抑制し、survivinの発現を低下させることを解明した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (学会名・演題)

1. 車 暁芳、鄭 春雷、古川 龍彦、原口 みさ子、住澤 知之、秋山 伸一。ヒ素によるsurvivinの発現レベル低下と ATL細胞株S1Tのアポトーシス。第9回分子標的研究会。2005年6月 京都

2. 車 暁芳、鄭 春雷、古川 龍彦、原口 みさ子、秋山 伸一。ヒ素によるsurvivinの発現レベル低下と ATL細胞株S1Tのアポトーシス。南九州腫瘍研究会第9回学術集会。2005年7月 鹿児島

3. 車 暁芳、鄭 春雷、古川 龍彦、原口 みさ子、住澤 知之、秋山 伸一。ヒ素によるsurvivinの発現レベル低下と ATL細胞のアポトーシス。第64回日本癌学会総会。2005年9月 札幌

(2) 発表した論文 無 ・ (雑誌名・題名)

Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. Blood. in press

成人T細胞白血病における survivin の過剰発現とヒ素は survivin の発現レベルを低下させ、ATL 細胞のアポトーシスを誘導する

研究者氏名	車 暁芳
中国所属機関	中国医科大学第一臨床学院血液内科 医師
日本研究機関	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科分子腫瘍
指導責任者	教授 秋山 伸一
共同研究者名	鄭 春雷、大渡 五月、武藤 昌図、 五反田 丈徳、鄭 熙澈、古川 龍彦、 池田 龍二、山本 雅達、原口 みさこ、 有馬 直道

要 旨

成人T細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia-Lymphoma, ATL) は治療抵抗性が高いため予後は悪い。ATL の薬剤耐性は P-gp、MRP1、LRP などの発現との関係が知られているが、アポトーシス抵抗性も一つの要因と考えている。新しい治療法の開発は、ATL 治療にとって重要である。我々は ATL におけるアポトーシス抑制因子を調べ、survivin が ATL 細胞に高発現することを発見した。ヒ素で ATL 細胞株 MT2 と S1T 細胞を処理すると、survivin の RNA レベルと蛋白レベルが低下したことを見出した。ヒ素は ATL 細胞株の caspase 3 を活性化させ、アポトーシスを誘導した。ヒ素の ATL 細胞の survivin 発現を低下させるメカニズムはヒ素が I κ B α の分解を抑制し、NF- κ B の核移行を抑制することによって NF- κ B の活性化を抑制することを解明した。以上の結果から、survivin は ATL 細胞に高発現して、ATL 薬剤耐性の要因であることとヒ素は ATL 細胞株の NF- κ B 活性化を抑制することによって、survivin の発現を低下させ、アポトーシスを誘導することが明らかにした。

Key Words

成人T細胞白血病 ; survivin ; ヒ素 ; アポトーシス ; NF- κ B

緒 言 :

成人T細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia-Lymphoma, ATL) は、ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (human T-cell leukemia virus type I, HTLV-I) の感染で CD4 陽性 T 細胞の腫瘍性増殖を特徴とする疾患である。HTLV-1 のコードする Tax は ATL の発症の初期段階に主要な病原因子である。Tax は、細胞の転写因子 CREB、NF- κ B および SRF などの転写因子を活性化して、細胞の増殖、transformation を促進し、悪性化を引き起こす。しかしながら、臨床では ATL 腫瘍細胞において HTLV-1 の遺伝子発現がほとんど認められていない。HTLV-1 感染から、発症するまでは何十年の潜伏期があるが、今まで ATL 発症に関して、共通な認識は多段階発癌モデルである。つまり、HTLV-1 による細胞の癌化は、Tax の細胞増殖促進機能によってイニシエイトされ、感染細胞の不死化が誘導される。それと同時に、不死化した T リンパ球の更なるプログレッションの基盤がこの過程の中で準備され、その基盤は Tax そのものの物理的な存在には非依存的に有効なものである。ATL は治療抵抗性のため、ATL の予後は極めて不良である。ATL の薬剤耐性は P-gp、MRP1、LRP などの発現との関係が知られているが、NF- κ B が恒常的に活性化するために、NF- κ B を介して転写される anti-apoptosis 因子の発現によるアポトーシス抑制も薬剤耐性に関わって

いると考えられている。新しい治療法の開発は、ATL 治療にとって重要である。我々は ATL におけるアポトーシス抑制因子を調べた上で、新しい治療法のヒ素の ATL 細胞のアポトーシス誘導のメカニズムを解明した。

研究対象と方法

1. 我々は ATL 38 症例（急性型 ATL 23、慢性型 ATL 12 とくすぶり型 ATL 3 例）と健常人 17 人の末梢血単核球から抽出した RNA を用いて、Real-time PCR 法で IAP ファミリーの Survivin、IAP-1 と XIAP の mRNA レベルを調べた。一部の ATL サンプルを用いて survivin の蛋白レベルを Western Blotting で調べた。
2. ATL 細胞株 S1T、MT2 とコントロールとしてのリンパ球白血病細胞株 Jurkat のヒ素に対する感受性を MTT Assay で測定した。
3. S1T、MT2 と Jurkat 細胞を各濃度のヒ素で処理し、Western Blot により survivin、bcl-2、PARP などの蛋白レベルを調べた。
4. S1T と Jurkat 細胞を各濃度のヒ素で処理し、RT-PCR により survivin の RNA レベルを調べた。
5. 各濃度のヒ素の存在下で、S1T、MT2 と Jurkat 細胞の増殖を 5 日間または 7 日間連続的に MTT Assay で測定した。
6. S1T、MT2 と Jurkat 細胞を各濃度のヒ素で 3 日間連続処理し、FACS で SubG1 を測定し、アポトーシスを評価した。
7. S1T と MT2 細胞をヒ素で処理し、caspase 3 の活性を microplate fluorescence reader で測定した。
8. S1T と MT2 細胞をヒ素で処理した後、細胞質と核を分画し、NF- κ B の p65 と p50、I κ Ba の蛋白レベルを Western blotting で調べた。

結果：

1. 健常人由来の T 細胞に比べ、ATL 細胞のほうが、survivin の mRNA 量は有意に高かった ($p < 0.01$)。急性型 ATL は、慢性型とくすぶり型 ATL と比べて、survivin の mRNA 量が有意に高かった ($p < 0.05$)。Performance status (PS) 3-4 の ATL は PS 1-2 の ATL より survivin の発現が高かった ($p < 0.05$)。IAP ファミリーの IAP1 と XIAP は、ATL と健常人の間で有意差が見られなかった (Fig. 1)。
2. ATL 細胞の三分の二は survivin 蛋白レベルも発現した (Fig. 2)。
3. ATL の MT2 と S1T 細胞では Survivin 蛋白レベルはヒ素の濃度と処理時間に依存して低下したが、コントロールの Jurkat 細胞では変化が見られなかった (Fig. 3A,B)。S1T 細胞の RNA レベルもヒ素の濃度と処理時間を依存して低下したが、Jurkat 細胞では変化がなかった (Fig. 3C)。
4. ATL の MT2 と S1T 細胞の増殖はヒ素の濃度と処理時間に依存して抑制されたが、Jurkat 細胞の増殖は抑制されなかった。(Fig. 4A-C)。
5. MT2 と S1T 細胞は、Jurkat 細胞と比べてヒ素に対する感受性が高かった。(Fig. 4D)。
6. MT2、S1T と Jurkat 細胞では subG1 fraction はヒ素の濃度と処理時間に依存して上昇したが、Jurkat 細胞での SubG1 fraction の増加は ATL 細胞に比べて有意に少なかった。(Fig. 5)。
7. MT2 と S1T 細胞の Caspase 3 はヒ素の濃度と処理時間に依存して活性化された。(Fig. 6)。
8. ヒ素で処理した MT2 細胞では核の NF- κ B (p65 と p50) はヒ素の濃度と処理時間に依存して低下した一方、細胞質の I κ Ba は増加した。S1T 細胞でも核の NF- κ B (p65 と p50) はヒ素に依存して低下した。(Fig. 7)。

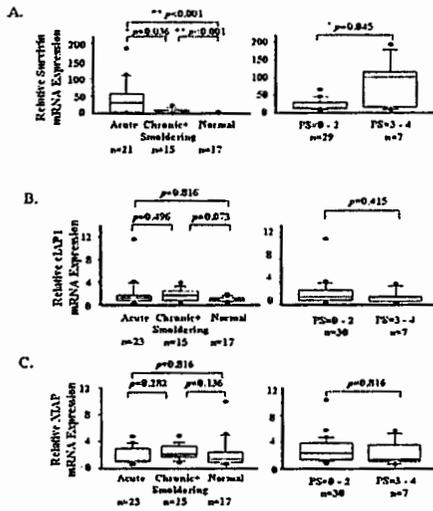


Fig. 1

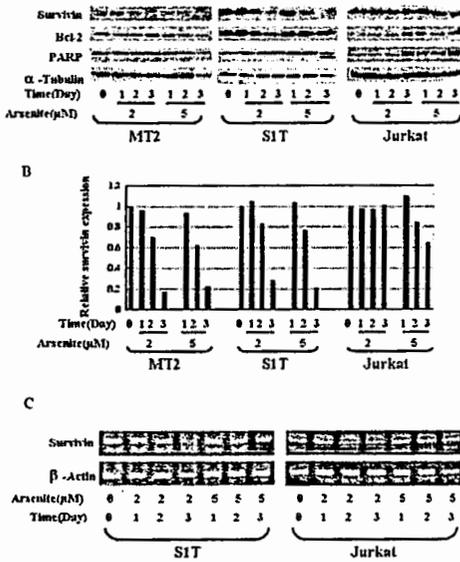


Fig. 3

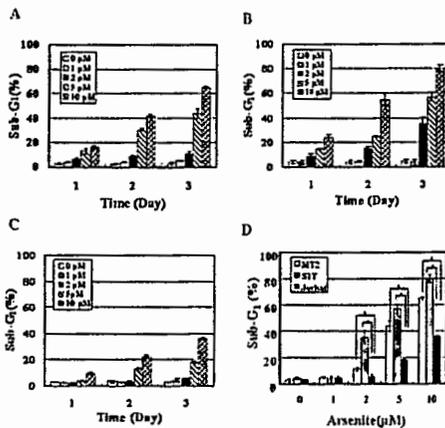


Fig. 5

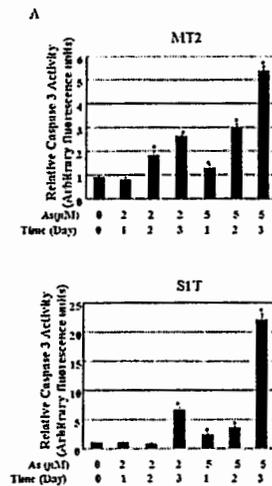


Fig. 6

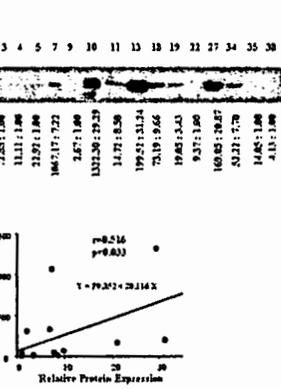


Fig. 2

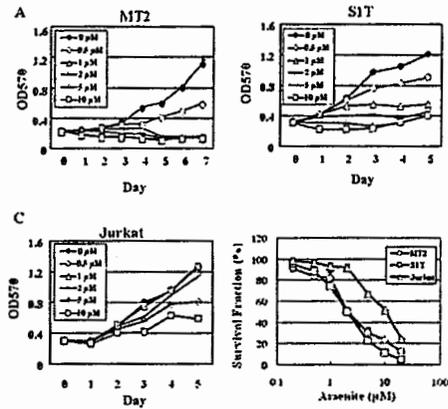


Fig. 4

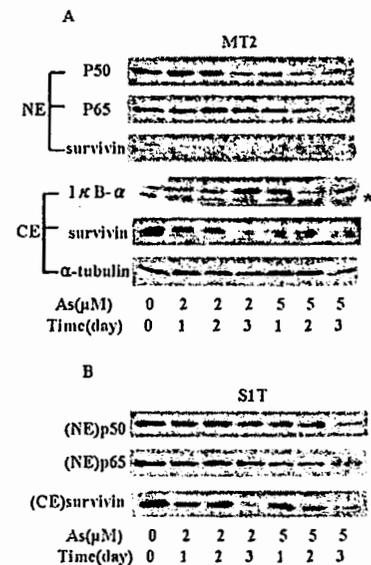


Fig. 7

考 察 :

ATL 細胞では NF- κ B は恒常的に活性化して、細胞増殖、がん化とアポトーシス抑制による薬剤耐性に重要な因子として知られている。われわれは NF- κ B によって転写されるアポトーシス抑制因子 IAP family を注目し、ATL 細胞での IAP ファミリーの発現を調べ、survivin が高発現することを発見した。Survivin は正常の場合、胎児期を除いて、ほとんどの正常細胞では見られないが、各種の癌と造血器悪性腫瘍細胞では高発現している。Survivin は、細胞分裂を調節する機能とアポトーシスを抑制する機能がある。Survivin は caspase 9、3、7 と結合することによって、これらの caspase の活性を抑制し、アポトーシスを抑制している。ヒ素は前骨髄性白血病 (APL) 治療に有効な薬として知られています。APL 以外の白血病および固形腫瘍でもヒ素は bcl-2 の発現を低下させ、NF- κ B の活性を抑制することなどによって、これらの細胞のアポトーシスも誘導できる。近年、ヒ素と IFN- α の併用が、ATL の新しい治療法として注目されている。この研究で ATL 細胞に survivin は高発現していて、ヒ素は I κ B α の分解を抑制し、NF- κ B の核移行を抑制することによって、survivin の発現を低下させ、アポトーシスを誘導することを明らかにした。

参考文献 :

1. Hinuma Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78:6476-6480.
2. Mauxion F, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:2141-2145.
3. Mulloy JC, et al. J Virol. 1998;72:8852-8860.
4. Kuwazuru Y, et al. Blood. 1990;76:2065-2071.
5. Ohno N, et al. Clin Cancer Res. 2001;7:3120-3126.
6. Ohno N, et al. Blood. 2001;98:1160-116
7. Mori N, et al. Blood. 2002;100:1828-1834.
8. Lanotte M, et al. Blood. 1991;77:1080-1086
9. Bazarbachi A, et al. Blood. 1999;93:278-283.
10. Kawakami H, et al. Int J Cancer. 2005;115:967-974.

注：本研究は、2005年7月1日「第9回がん分子標的治療研究会総会」、7月25日「南九州腫瘍研究会第9回学術集会」、9月14日「第64回日本癌学会学術総会」にてポスター発表、Blood (2006年6月) に掲載予定。

作成日：2006年3月9日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金-在留中国人研究者-報告書

年 月 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 簡 明源 ④

指導責任者名： 久保 恵嗣 職名： 教授

所属機関名： 信州大学医学部
〒390-8621

所在地： 長野県松本市旭 3-1-1

電話： 0263-37-2631 内線： 5252

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

高頻度振動人工換気法(High Frequency Oscillation)による急性肺挫傷の抑制効果

3. 成果の概要(100字程度)

HCl 吸入は肺挫傷を起す。PO₂ は有意に下降し、PCO₂ は有意に上昇し、BAL液中の細胞数と好球数、TNF-α濃度も有意に上昇した。HFo管理はCMV6および12ml/kg管理より、肺挫傷の程度は有意に抑制した。HFoはラットの虚血・再灌流に対して傷害防御に作用することが示唆された。

4. 研究業績

(1) 学会における発表

④ 無

有(学会名・演題)

(2) 発表した論文

④ 無

有(雑誌名・題名)

ラット塩酸肺水腫に対する high frequency oscillatory ventilator (HFOV)の有用性

研究者氏名 簡 明源
中国所属機関 河北医科大学第二付属医院
日本研究機関 信州大学呼吸器感染症内科
指導責任者 教授 久保恵嗣
共同研究者名 小泉知展 津島健司

要 旨

塩酸急性肺損傷における HFOV の効果を検討するため、SDラットを用いて塩酸肺損傷の実験モデルを作成、実験は、1) HFOV 群: HFO5 時間呼吸管理、2) CMV (conventional mechanical ventilator) 12 群: 一回換気量を 12ml/kg で、呼吸管理、3) CVMV 6 群: 一回換気量を 6 ml/kg で、呼吸管理した 3 群を行った。塩酸処置後 5 時間観察し、気管支肺胞洗浄(BAL)液と肺組織を採取した。BAL 液中の有核細胞数、好中球数、tumor necrosis factor(TNF- α)を測定した。血液ガス分析も各群で比較検討した。その結果より、塩酸投与後、PaO₂ は有意に低下し、HFOV はその低下を抑制した。CMV 両群に比し HFO は有意に BAL 液中の細胞数および好中球数、TNF- α の増加を抑制した。CMV 6 群の PaCO₂ は他群に比し有意に高値であった。

緒 言

胃液等の酸を吸引後に生じる肺損傷は重篤な呼吸不全をきたします。人工呼吸器管理は、急性呼吸不全患者に適応となるが、機械的人工呼吸による肺損傷 ventilator-induced lung injury (VILI) が問題になり、その機序として換気による肺胞の虚脱および伸展、また高い気道内圧などが推定されている。一方、Lower tidal volume による換気がARDSの生命予後を改善するという研究結果が報告され、肺保護を考慮した治療法が求められている。

HFOV は高頻度振動換気で、繰り返す肺胞の過膨張・再膨張や虚脱が重要な原因とされている ventilator-induced lung injury (VILI) を回避するため有用な呼吸管理法と期待されている人工呼吸器です。肺保護戦略の一つとして注目されている。今回、ラット塩酸肺水腫に対して HFO の有用性を検討した、それに、結果に基づいて HFO と従来的人工呼吸器 CMV と比べた。

動物および方法

生後 6 週の SD ラット (250-300 g) を用いた。Pentobarbital sodium 麻酔後気管切開し純酸素にて人工呼吸器管理としました。0.1 規定の塩酸 2ml/kg を経気道的に噴霧投与しました。人工呼吸器管理 5 時間です。CMV 一回換気量 12ml/kg と 6ml/kg、HFO はこのように設定した。

実験群は三群です。各群はラット 16 匹です。1) HFOV 群: HFO、2) CMV (conventional

mechanical ventilator)12 群：一回換気量を 12ml/kg で、呼吸管理、3) CVMV6 群：一回換気量を 6 ml/kg で、5 時間呼吸管理しましてから、気管支肺胞洗浄(BAL)液と肺組織を採取した。

測定項目は血液ガス分析、BAL 液中の有核細胞数、好中球数、tumor necrosis factor(TNF- α)を測定した。

結 果

1. 動脈血血液ガス分析 (Fig.1)

HC1 吸入して PO₂ は有意に下降したが、HFO 管理はこの下降有意に抑制した。CMV 6 および 12ml/kg 群では PCO₂ の上昇が有意に認められた。

2. BAL 液中の有核細胞数と好中球数 (Fig.2)

HC1 吸入は有意に総細胞数と好中球数が上昇した。HFO 管理と CMV 低換気量管理はこの上昇を抑制した。

3. BAL 液中の TNF- α 濃度 (Fig.3)

HC1 吸入で有意に上昇したが、HFO 管理群のみその上昇が抑制しました。

考 察

低容量人工呼吸管理法は肺泡の過膨張を防止し、一回換気量 10ml/kg 以上により死亡率や、炎症性サイトカインを抑制する。本研究は 6ml/kg 群は BAL 液中の細胞数、特に好中球数の増加を抑制した。ところが、PCO₂ が徐々に上昇し、五時間目の時点で非常に高値でした。PO₂ の下降も激しかった。BAL 液中の TNF- α 値の上昇の抑制は HFO 群のみでした。低容量人工呼吸管理法はラット塩酸肺損傷に対して炎症性的一部分だけで抑制した。

HFO は ARDS に対して酸素化能が改善し、炎症性サイトカインを抑制する。本研究で五時間呼吸管理して、PCO₂ は baseline より変化がなし。

塩酸肺水腫の発症進展は人工呼吸器に影響を受ける。HFOV はラットの塩酸肺水腫に対して傷害防御に作用することが示唆された。

作成日：2005 年 12 月 2 日

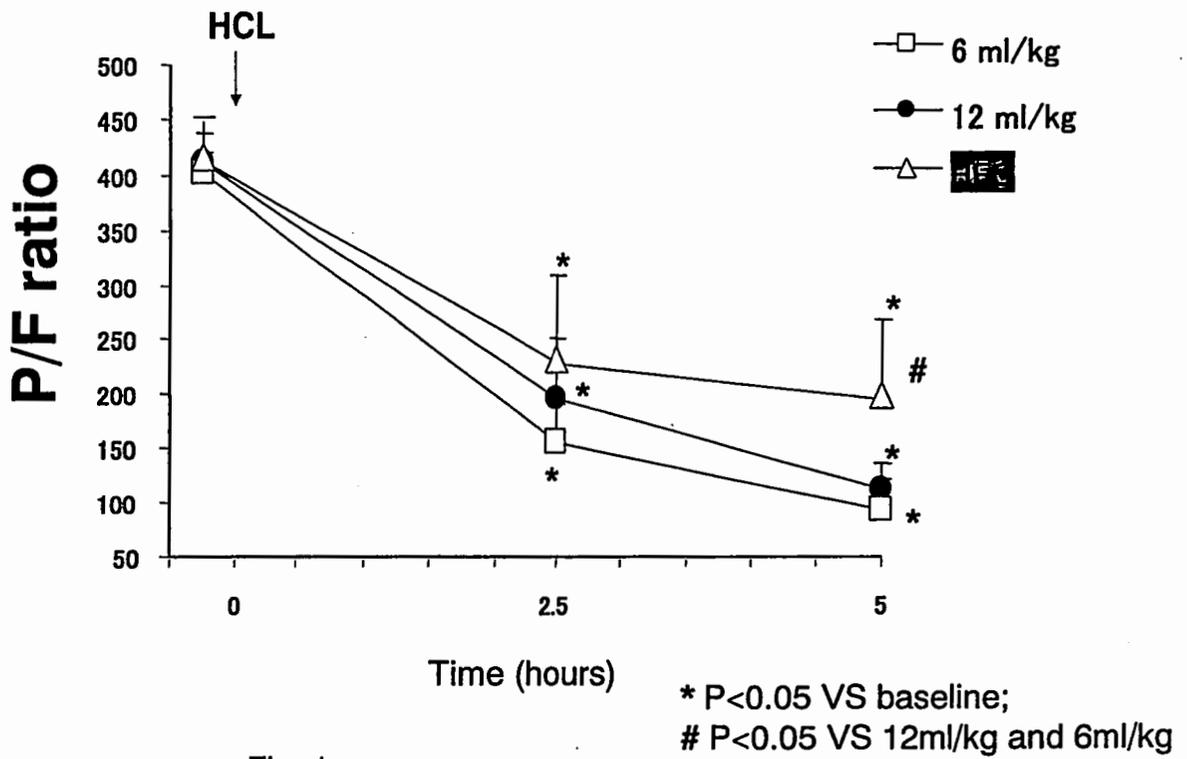


Fig. 1

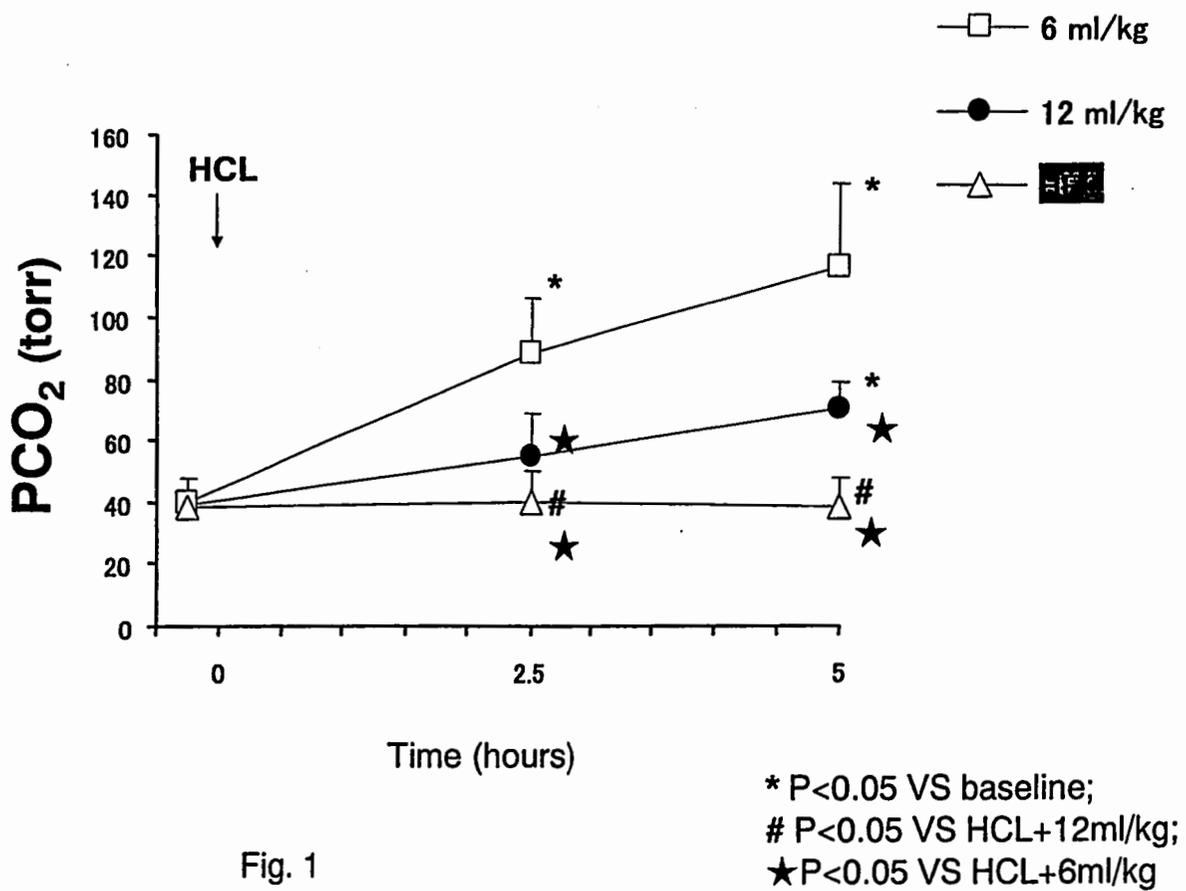


Fig. 1

Nuclear cell counts and neutrophils in BALF

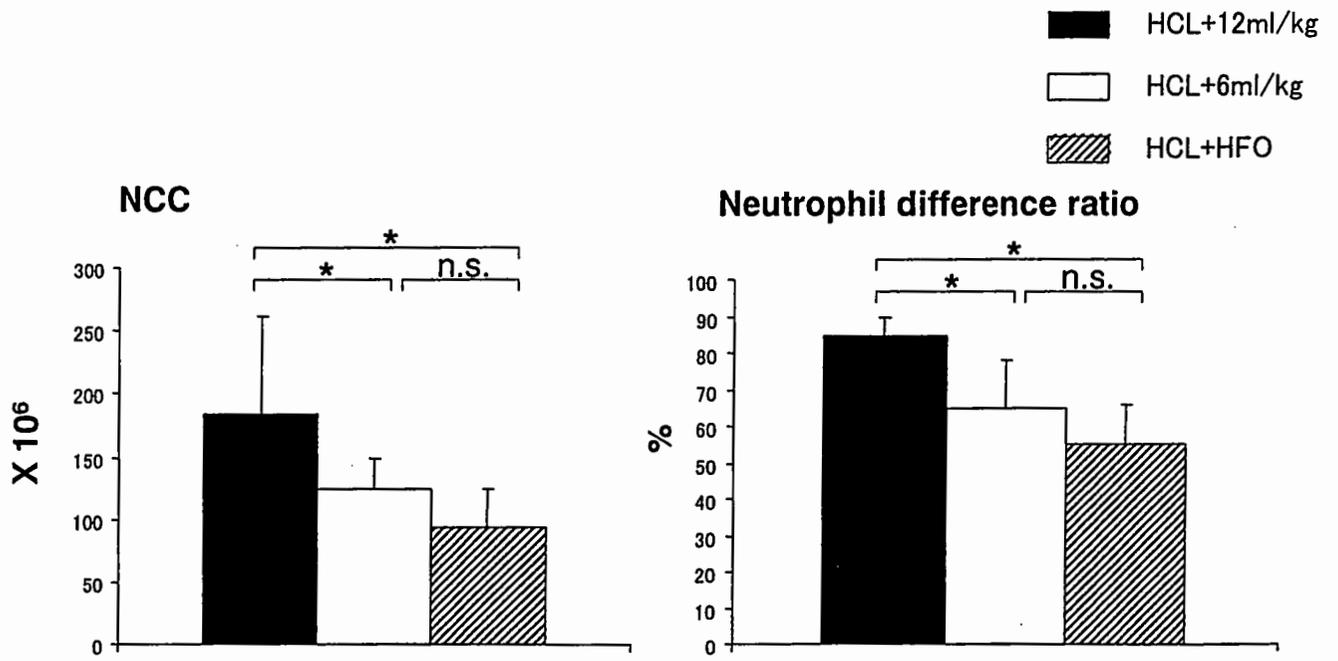


Fig. 2

TNF- α concentration in BALF

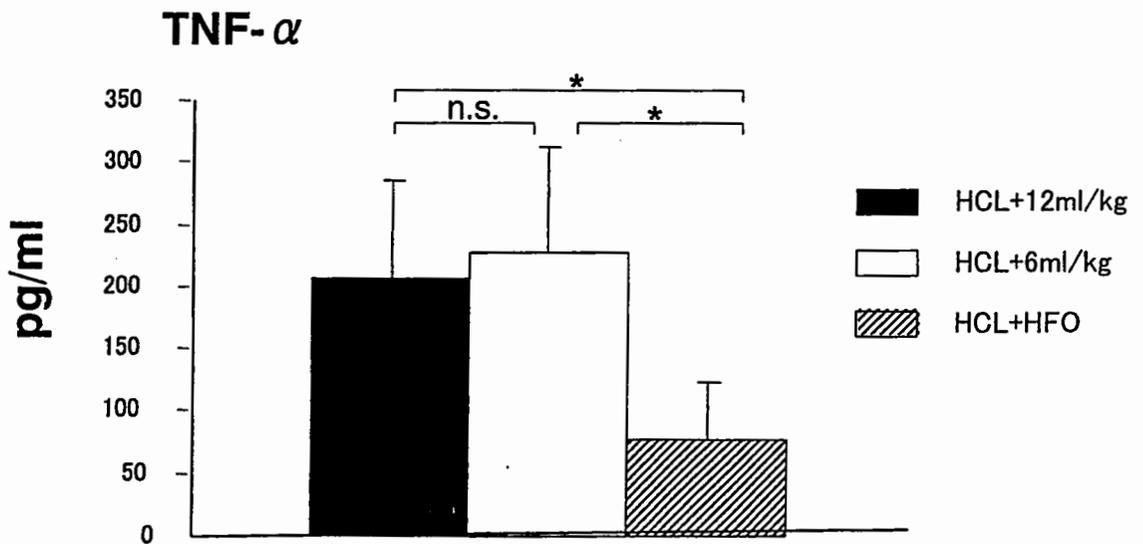


Fig. 3

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金-在留中国人研究者-報告書

2006年 2月 26日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 馮起国  印

指導責任者名： 稲葉 裕 職名： 教授
順天堂大学大学院医学研究科疫学環境医学

所属機関名： _____
〒 113-8421

所在地： 東京都文京区本郷2-1-1

電話： 03-5802-1047 内線： 3532

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

運動負荷によるストレス蛋白質発現の変化に関する疫学・環境医学的研究

3. 成果の概要（100字程度）

中医学におけるストレス蛋白質の疫学的研究をまとめた上、ラット「足三里」ツボに針灸、中薬の投与、極限水泳の運動により、臓器筋肉HSP72発現に及ぼす影響を検討した。成果①HSP72はラットの大脳前頭葉、肝臓、脾臓及び下腿骨格筋では広く発現された。②針刺激は灸刺激と中薬より、HSP72への誘導が著しい。③針灸と中薬がストレスと運動系統の疾患を治療するメカニズムはHSP発現に影響を及ぼすことに関わると考えられる。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

第70回日本民族衛生学会総会 2005年11月18日口演 東京池袋明日館
「漢方医学における熱ショック蛋白質の研究」 民族衛生第71巻付録 74～75ページ

順天堂大学医学部衛生学教室抄読会 2005年12月3日口演 順天堂大学5号館3F会議室
「健常ラットのHSP発現に対する刺針、艾灸と漢方薬の影響」

(2) 発表した論文 (無) ・ (有) (雑誌名・題名)

運動負荷によるストレス蛋白質発現の変化に関する疫学・環境医学的研究

研究者氏名 馮 起国
中国所属機関 遼寧中医学学院
日本研究機関 順天堂大学大学院医学研究科
指導責任者 教授 稲葉 裕

要 旨

本研究では、インターネットによる文献検索を行い、中医学におけるストレス蛋白質の疫学的研究を検討したうえで、ラットの「足三里」ツボに対する針刺、艾灸及び四君子湯の経口投与、極限水泳運動などにより、その全血乳酸値、臓器と骨格筋のHSP72発現に施した影響を観察した。針刺、艾灸と中薬療法が、いずれも中医学範疇に属し、数千年の歴史にわたって、人々に利用されている。その治療効果のメカニズムについて、明らかにならないところがまだまだ多いようである。本研究の目的は、細胞分子生物学レベルから「蛋白質の一生と伴っているシャペロンとして細胞内の手厚い総合社会保障システムを営む」と言われるストレス蛋白質(熱ショック蛋白質)を主な指標として、針刺、艾灸と中薬療法による治療メカニズムとストレス蛋白質との相関性を検討することである。結果としては、①健常ラットでは、HSP72の誘導が心臓左室筋、大脳前頭葉、肝臓左葉及び骨格筋に発現された；②運動群ラットの全血乳酸が倍以上増え、運動により、大脳前頭葉と脾臓と肝臓左葉のHSP72の誘導発現が増強されたが、心臓のほうがはっきり誘導されない。骨格筋に対して、ただヒラメ筋のHSP72の誘導発現が増強されたが、前脛骨筋と足底筋のほうがやや下がった；③針刺により、心臓のほかの臓器と足底筋のHSP72の誘導発現が強くなった；④艾灸により、大脳前頭葉と肝臓左葉及び前脛骨筋の誘導が強くなった；⑤漢方四君子湯には、大脳前頭葉のHSP72が多く誘導されたが、艾灸漢方群は、前脛骨筋からの誘導が一番強くなった。上述のように、針刺も艾灸も中薬四君子湯もいずれもHSP72を異なる程度に誘導でき、臨床において、三者はストレスによる疾患及び運動疾患に対して優れた治療効果を果たすメカニズムの一つとしては、HSP発現に影響を及ぼすことが関係していると考えられる。

Key Words ストレス蛋白質, ラット, 運動負荷, 針刺, 艾灸, 漢方薬

緒 言:

人体細胞の中では、通常ポリペプチド鎖開始複合体を介して蛋白質の合成誘導が活発に行われている。一方、細胞が発熱(熱ショック)状態に曝されると、その蛋白質の合成誘導はほぼ完全に抑制される。細胞内の蛋白質は一般的に熱に弱く、熱ショック環境下では固有の立体構造が変化し、生理機能が低下したことになる。このような熱変性した蛋白質がそのまま放置されると、互いに凝集塊を形成し、細胞は危機的状態を呈する。熱ショック環境下で、通常蛋白質の合成誘導が抑制されるとともに、顕著に合成が誘導されてくる蛋白質群がある。即ち、熱ショック蛋白質(heat shock proteins; HSP)と呼ばれ、分子量(kDa)によりHSP70やHSP90など十数種類が報告された⁽¹⁾。

HSPの発現は、熱以外のストレス、例えば、有害な重金属・放射線・代謝阻害物質・虚血・酸化ストレス・運動・グルコース飢餓・pHの低下などによっても誘導されることが明らかにされた。ゆえに現在では広くストレスタンパク質(stress proteins; SP)と呼ばれている。HSPの多くはストレスに対する細胞の応答として発現するばかりでなく、実は非ストレス下においても構成的に発現していて、細胞の分化、増殖、生存、機能など様々な細胞の営みに必須の蛋白質であることが判明してきている⁽²⁾。

伝統的な中医学理論を科学化するため、現代科学の理論と方法により実証される必要がある。本研究は、EBM(エビデンス)を基準として分子生物学の方法と技術を利用して健常ラットに対して針刺、艾灸、四君子湯(漢方薬の煎じ剤)及び運動負荷を与えて、その全血乳酸と骨格筋・心臓・肝臓・脾臓・大脳などの組織HSP72の発現に及ぼす影響という観点から、針刺、艾灸と四君子湯の効能メカニズムを解明することを目的とする。

対象と方法：

「対象」wistar ラット♀(メスは体重の変わる幅が小さい)、生後6週齢、各群n=6、開始時の体重122.46±16.86g。

本実験は、日本生理学会の制定された『生理学領域における動物実験に関する基本的指針』を守って行った。

「方法」1、実験群分けと操作

対照群—①健常群—なにも処理しない。

②固定群—ラット固定器による固定10min。

処理群—①艾灸群—ラット固定器による固定10min+後肢両側の足三里に長生灸2壮、2ml食塩水の経口投与。

②漢方群—ラット固定10min, 2ml四君子湯の経口投与。

③艾灸漢方群—ラット固定10min, 後肢両側の足三里に艾灸+2ml四君子湯の経口投与。

④運動負荷群—運動負荷(1w)—1日目はトレッドミルによる運動負荷：300r/25~30min。

2日目から7日目まで、32~35℃の温水プールで水泳負荷30min。

⑤針刺群—ラット固定器による固定10min+後肢両側の足三里に針刺、2ml食塩水の経口投与。

2、四君子湯の精製

①処方：人蔘+白朮+茯苓各9g+甘草6g=33g、1日2回の服用量/大人

②経口投与：2ml

③精製：生薬99g=人蔘・白朮・茯苓各27g、甘草18gを取って、浸泡・水煎・濾過・濃縮して100%濃度の煎じ液100mlを精製して、冷却後4℃冷蔵。

3、採血とサンプリング(組織の摘出)

実験8日目にネプタール麻酔注射液(大日本製薬株式会社出品)を0.2ml腹腔注射する。胸腔と腹腔を広げて腹腔の下大静脈から1.0~3.0mlぐらい採血するし、心臓・肝臓左葉・脾臓・大脳及び前脛骨筋・ヒラメ筋・足底筋・長趾伸筋を取って重さを計った後、液体窒素にて瞬間凍結して-84℃保存。

4、測定

①乳酸の測定—BIOSEN5040 乳酸測定装置を用いて固定化酵素法により測定する。

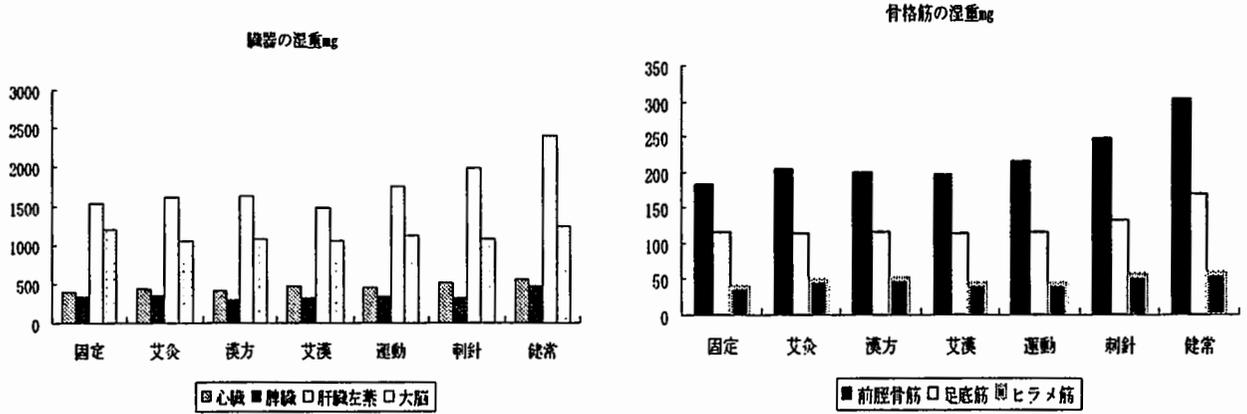
②HSP72 の測定—サンプルのホモジネート(homogenate)後、日立分光光度計(HITACHI u-2000 specerophotometer)により、蛋白質の総濃度を測定する。さらに BIO RAD Power/pac 200 により電気泳動、転写、免疫染色、脱イオン水の洗浄後、できたメンブレンをスキャンして NIH image ソフトにより HSP72 の発現量を評価した。

5、統計処理

データはすべて平均値 means±SD で示す。群間における有意差の検定には、SPSS of windows11.01J により処理され、有意水準は P<0.05 を設定する。

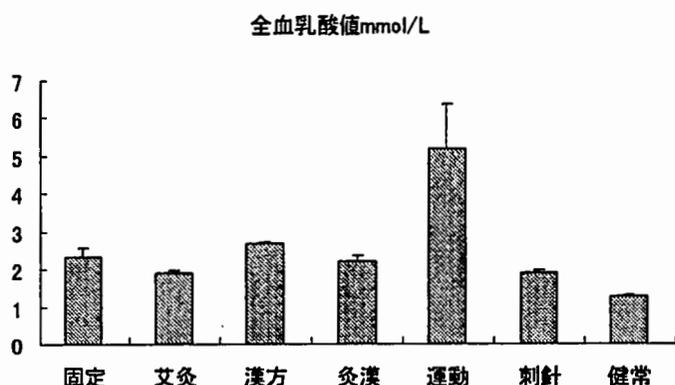
結果：

1、臓器と骨格筋の湿重



上図のように、一週間の実験期間では、臓器と骨格筋の湿重はわりあい安定している。健常ラットだけ、ちょっと重くなる。

2、全血乳酸値

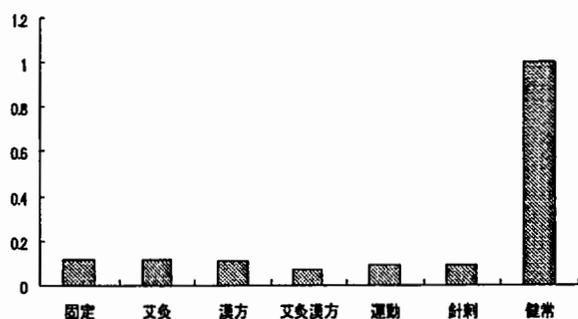


健常群(1.27±0.035)と比べて、他の群がすべて上がったが、運動群(5.2±1.17)が一番高くなり、他の群と有意差がある(運動群 or その他 P<0.05)。

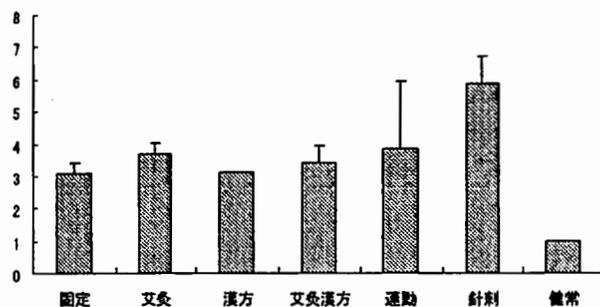
3、HSP72 に対する誘導発現

3.1 臓器における HSP72 の発現

心臓左室筋のHSP72発現

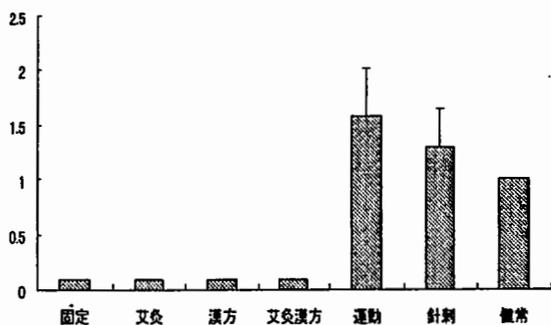


肝臓左葉のHSP72発現

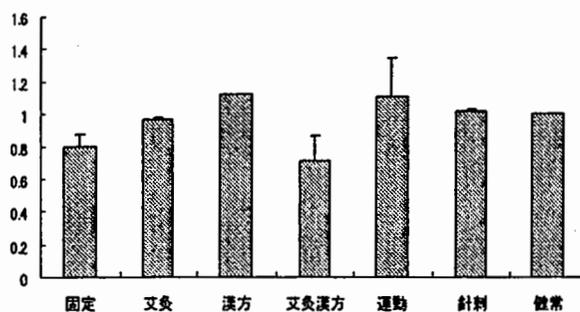


心臓では、健常群のほかにも、殆ど誘導されなかった。逆に肝臓では、どっちでも強く誘導され、中で刺針のほうが一番著しい(刺針 or その他 P<0.05, 刺針 or 健常 P<0.01)。

脾臓のHSP72発現

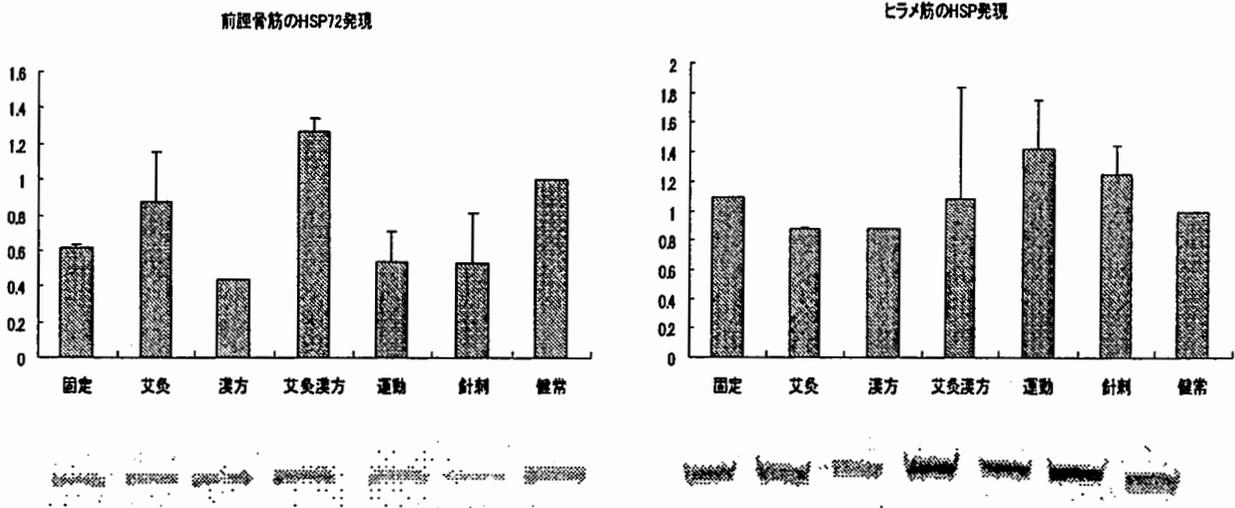


大脳前葉のHSP72発現

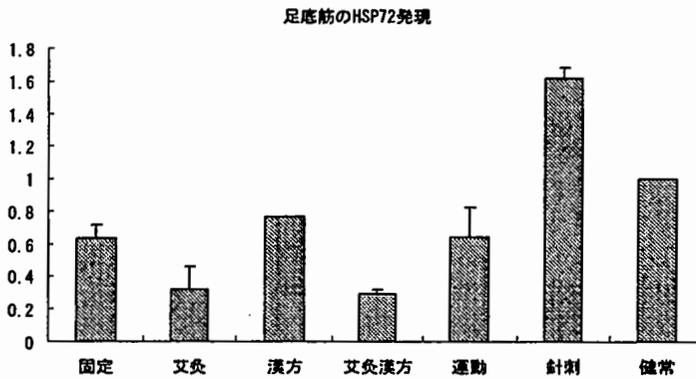


脾臓では、電気泳動を3回繰り返したが、ただ運動群と刺針群と健常群が発現されたが、ほかはされなかった。運動群と刺針群が発現増強である。大脳なら、各群も誘導されたが、健常群と有意差はない。

3.2 骨格筋における HSP72 の発現



前脛骨筋では、艾灸漢方群のほかに健常群より誘導が弱いと考えられる。ヒラメ筋では、運動群と針刺群の誘導が結構強く発現されたが、艾灸群はちょっと弱い誘導であった。



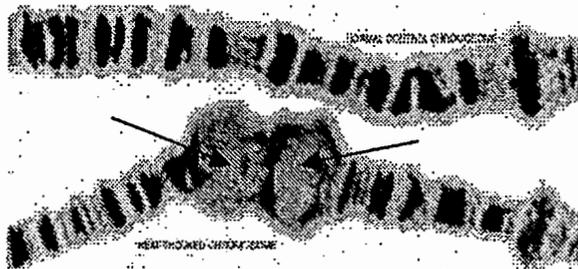
足底筋では、針刺群が他の各群と有意差がある($P < 0.05, 0.01$)。ほかは健常群より弱い、その中で、艾灸群と艾灸漢方群がほぼ一致で、もっとも誘導が弱いである。

考 察:

1、ストレス蛋白質

1.1 熱ショック応答の発現

Ritossa は、ショウジョウバエの幼虫(その唾液腺組織)を通常培養温度(25 °C)から高温(30°C)に短時間(30分間)さらすと、唾液腺多糸染色体の幾つかの特定部位に膨らんだ構造(パフ、puff, この区域の遺伝子転写が増強)が新たに誘導されることを観察し、1962年に報告した(下の図の矢印)⁽³⁾。このパフの生成は一過的で、温度が下がると消失した。一方、通常温度で存在したパフは、このような「熱ショック」により観察されなくなった。



(Ritossa, *Experientia* 1962)

1.2、ヒートショックプロテイン (Heat Shock Protein: HSP)

HSPとは熱ストレス(通常より3~5°C上がるとか、或いは40°C以上)によって細胞内に誘導される蛋白質。1974年に Tissieres が熱ショックによりショウジョウバエの染色体内に遺伝子の転写が増強され、6種の新しい特異的タンパク質(HSP)が合成されることを報告した⁽⁴⁾。その他のストレス(重金属、放射線、代謝阻害物質、虚血、酸化ストレス、グルコースとアミノ酸の飢餓、PH低下、運動など)によっても誘導されるため、ストレスタンパク質(stress proteins; SP)とも呼ばれ、細胞レベルでのホメオスタシスを維持する働きを持つ。

1.3、HSP70の役割

I. 分子シャペロン Chaperone—Pelham が1986年に提出した分子シャペロン理論により、HSP70が蛋白合成や高次構造の形成の品質管理、膜の通過と輸送、活性の制御と維持、また蛋白質分解過程などにおいて、蛋白質の正しい畳み込みを介助する⁽⁶⁾。

II. 防御—ストレスによる蛋白質の凝集を抑制できる。

III. 修復—ストレスによる蛋白質の損傷を修復できる。

IV. ストレス耐性と交差耐性

「ストレス耐性とは」—あらかじめ非致死的な熱ストレスを加えること(プレコンディショニング)によってHSPが増大した細胞では、その後に与えられる致死的な熱ストレスに対してその細胞の傷害の程度が小さくなる。

「交差耐性とは」—あるストレスに対する抵抗性を獲得すると、他のストレスに対しても同様に抵抗性が高まる性質である。短時間に一過性的心筋虚血が心筋梗塞に予防するのみでなく、脳梗塞にも予防作用を現わす⁽⁵⁾。

2、中医学におけるストレス蛋白質の疫学的研究

近年来、熱ショック蛋白質(HSP)が「分子シャペロン」として、人体生命の機能単位であるタンパク質の一生において、重大な品質管理の役目を果たしているため、世界では研究ブームになっている。

2.1、中薬療法 広州中医薬大学の王洪琦氏は、白虎湯と黄連解毒湯を投与して熱ショックラットの肝臓、肺臓組織HSP発現の増加を誘導でき、細胞の耐性を高めることにより細胞の損傷が避けられる結果である(広州中医薬大学学报)。武漢市中医医院の崔金濤氏は、三七五参湯を投与して心筋虚血損傷に対する拮抗作用とHSP70発現が正比例に関係していると報告した(中国心血管病研究雑誌)。北京中医薬大学の郭順根氏は、活血化瘀類の補肝中薬を投与して肝障害ラットの肝臓HSP70の発現が増大して、肝障害も一定な程度で回復したと報告した(中国組織化学と細胞化学雑誌)。武警湖北総隊医院の李長軍氏は、健脾益気中薬を消化性潰瘍患者さんに投与してヘリコバクターピロリ菌を取り除いたほかに、HSP60の発現も増える効果があると報告した(中国臨床医学)。謝建軍氏は、砂地ネズミに脳虚血再灌流して48h後、HSP70の発現が顕著に増強して、補陽還五湯を投与してHSP70の転写を明らかに抑制した他に、その翻訳も軽度により下げることにより、脳虚血損傷後の神経機能を保護すると報告した(中西医结合心脑血管病雑誌)。日本中部大学の戴研氏は、シャペロン誘導剤としての芍薬などの漢方薬によるHSP誘導を研究した(日本ハイパーサーミ学会誌19、20巻)。日本東京大学の富井明望氏は黄芩、紅花、烏薬を常法で抽出して飲料水として動脈硬化モデルマウスに自由に摂取させ、HSP60を免疫することにより血管内皮に産生され、動脈硬化を促進する作用を持つ抗HSP60抗体の産生を拮抗する効果が漢方生薬特に烏薬によって抑制され、動脈硬化の進行を抑制したと考えられる(日本未病システム学会雑誌8巻2号)。日本順天堂大学 JinGuang-Bi氏はヒト活性化T細胞を使って233種類の漢方薬について、HSP70発現量のスクリーニングを行い、1.5倍以上の増加傾向が濃度依存性から認められた生薬は、紅花・山茱萸・山査子・瞿麦・甘遂・黄芩・香鼓であった。そのうち、いくつかの生薬もHSPの発現量をコントロールできる活性があることは証明され、HSP系の関与する様々な疾患の治療などに応用できる可能性が示された(和漢医薬学雑誌19巻6号)。日本横浜市立大学の関口由紀氏は、前立腺肥大症患者における八味地黄丸の抗HSP60抗体への影響を研究した(日本東洋医学雑誌49巻6号)。

2.2、針灸療法

湖南中医学院の彭艶氏ら及び北京中医薬大学の李曉泓氏は、針灸で人体のツボを刺激して、針灸ストレス状態になって一定量のHSP70発現が誘導されて、人体の抵抗能力と免疫力が強められ、疾患の予防と治療に重要な役

に立つと考えた(中華実用中西医雑誌、上海針灸雑誌)。天津中医学院の馬岩璠氏は、「醒腦開竅針刺法」を使って実験性脳梗塞ラットの梗塞区皮質、線条体及び海馬の HSP 発現を増強して、通常の針刺法より脳虚血後の細胞への保護作用が優れていると示された(中国針灸)。重慶市第 1 人民医院の王渝蓉氏は、電気針でラット両側の「合谷」穴を打ち、局所性脳虚血 3h、再灌流 3h と 6h の HSP70 発現を仮手術群より顕著に増加したのは、脳虚血再灌流による損傷を回復するメカニズムであると考えた(重慶医科大学学報)。天津中医学院の樊小農氏は、内頸動脈に自体血栓を注射してラットの多発性梗塞性痴呆(MID)モデルを作成して、大脳皮質と海馬、線条体、間脳などの部位の細胞死亡が見られて、針刺群で人中と内関、風池などのツボに刺して、その部位の細胞死亡がコントロール群より顕著に低くなったし、HSP70mRNA の発現もコントロール群より顕著に高くなったと報告した(中国中医基礎医学雑誌)。上海第二医科大学の王祥瑞氏は、電気針で心臓手術を受ける患者 28 例の心筋細胞 HSP70mRNA の発現をコントロールより大いに増加したと報告した(中国針灸)。河南医科大学の王一菱氏は、針刺が無菌パラフィン油を注射したマウス腹腔マクロファージの HSP 70、iNOS(誘導性一酸化窒素)及びその iNOSmRNA の発現を顕著に高めたと報告した(解剖学報)。日本では、Kobayashi, K. がラット腰の筋肉に灸刺激し、筋肉内温度は 15 分の間 40℃に保たれた。ラットは深麻酔をうけて殺され、刺激の 3h と 24h 後に、筋組織は直ちに切除された。蛋白質は刺激されたラットと制御ラットの均質にされて遠心分離機で分離された組織から引き抜かれた。蛋白質の二次元のゲル電気泳動は、実施された。70,000、85,000(hsp 85)と 100,000(hsp 100)の分子量による hsp は、灸によって刺激の 3 時間後に殺されるラットで見つけられた。蛋白像は分析され、hsp の比率は得られた。施灸と分子シャペロン機能の発生、細胞内輸送の活性化、局所炎症におけるサイトカイン・HSP・酵素ラジカル(遊離基)との関連性などが示唆される⁽⁷⁾。

上述のように、漢方薬は解熱、抗心筋虚血、抗動脈硬化、抗脳虚血、抗潰瘍、補肝などの様々な薬理作用を持ち、針灸療法も鎮痛麻酔、安静安神、抗菌抗炎症、抗アレルギー、免疫力増加などの多種作用を持ち、その作用のメカニズムの一つとしては、細胞 HSP の発現に影響を及ぼすものである。

まとめ：

- 1、臨床において、漢方薬療法と針灸療法はストレス損害に対して優れた効果を果たしたことが明らかになった。それ効果を果たすメカニズムの一つとしては、HSP の発現に影響を及ぼすことに密接に関わっていると考えられる。
- 2、運動と比べて、針刺、艾灸、中薬四君子湯により、臓器と骨格筋の HSP72 の誘導発現が著しく増強されてないであるが、艾灸により大脳前葉と肝臓左葉及び前脛骨筋の誘導が強くされた。漢方四君子湯により大脳前葉の HSP7 が多く誘導されたが、艾灸と漢方の合わせる群は、前脛骨筋からの誘導が一番強くなった。
- 3、異なる病理状態により、HSP 発現が増強したり減弱したりすることから言えば、中薬療法も針灸療法も両方向の良性調節作用がありそうである。

参考文献：

1. 内藤久士：細胞レベルでのストレス応答—ストレスタンパク質の発現と機能，体力科学 vol153, 455～460(2004)
2. Sorger PK. et al： Nature vol329, 81～84(1987)
3. F. Ritossa：Experientia vol18, 571～573(1962)
4. Pelham HRB： Cell vol46, 959(1986)
5. 内藤 久士： 身体活動とストレス蛋白質 日本臨床 vol58 (増刊号), 97～101 (2000)
6. 馮 起国： 熱ショック蛋白 医学綜述 vol4, 468～469 (1998)
7. Kobayashi, K： Induction of Heat-Shock Protein(hsp)by moxibustion Am. J. Chin. Med. vol23, 3～4(1995)

注：本研究は、2005 年 11 月 18 日『第 70 回日本民族衛生学会総会』にて口演発表

『民族衛生』(2005 年 11 月 vol 71 巻付録)に掲載

2005 年 12 月 3 日『順天堂大学医学部衛生学教室抄読会』にて口演発表

作成日：2006 年 2 月 28 日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006年 03月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者名：李 荣



指導責任者名：濱田 洋文 職名：教授

所属機関名：札幌医科大学分子医学研究部門
〒060-8556

所在地：札幌市中央区南1条西17丁目

電話：0116112111 内線：2542

1. 助成金額：600000 円

2. 研究テーマ

がんの標的化治療

3. 成果の概要（100字程度）

ras特異的なVAI変異型アデノウイルスは、その作製を終え、現在、東北大学の外科（砂村ら）並びに東大医科研外科（佐々木ら）との共同研究が始まり、進展が期待されます。また、李さんが作製したZ33シリーズのアデノウイルスAx3CAUP-FZ33をErbB2抗体と併用した場合の卵巣癌に対する効果は、すばらしいものになりました。従来ほとんど遺伝子導入できなかったヒト卵巣癌細胞に対し、ほとんど100%の遺伝子導入を達成し、従来に比して5FUの治療効果を200倍高めることに成功しました。今論文を求めています。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有（学会名・演題）

(2) 発表した論文 無 ・ 有（雑誌名・題名）

抗ErbB2抗体による卵巣癌及び乳がんに対して変異型アデノウイルス adv-FZ33の標的化治療の検討

研究者氏名 李 栄
中国所属機関 中国吉林省腫瘍病院婦瘤科
日本研究機関 日本国札幌医科大学分子医学研究部門
指導 責任者 教授 濱田洋文
共同研究者名 中村公則

要旨

がんの遺伝子治療を考える場合に最も大切になってくるのが、がんの標的化、すなわち腫瘍細胞だけを周囲の正常細胞とどうやって区別するかという課題である。腫瘍だけを見つけて、追っかけて遺伝子導入できるシステムを作ることができれば、標的化が達成できる。標的に対して選択性の高い強い結合を獲得するために、どのようなリガンドないしモチーフを工夫するかが今後の研究の焦点となる。われわれが作製したZ33シリーズのアデノウイルス Ax3CAUP-FZ33をErbB2抗体と併用した場合の卵巣癌に対する効果は、素晴らしいものになりました。従来ほとんど遺伝子導入できなかったヒト卵巣癌細胞に対し、ほとんど80%以上の遺伝子導入を達成し、従来に比して5FUの治療効果を100倍高めることに成功しました。

Key Words 卵巣癌 乳癌 遺伝子 標的化治療

緒言

腫瘍だけに遺伝子導入できる特異性をベクターに付与する方法としては、二つの方法がある。ひとつは、ベクター表面抗原と結合する抗体と標的腫瘍細胞の表面抗原を認識する抗体を融合した2価の scFv 抗体分子 (bispecific single chain variable region antibody fragment) などを用いてベクターの表面と腫瘍表面を架橋する方法である。もうひとつの方法として、ウイルスベクターなどでは、ゲノムのエンベロープやキャプシドをコードする部分を遺伝子工学的に改変して腫瘍だけに感染する特異性を付与する方法がある。私たちは、標的細胞に対して高い特異性を持ち、しかも高効率で遺伝子を導入・発現させることが可能な、標的化アデノウイルスベクターの開発を目指している。現在、アデノウイルスなどでは、受容体(ヒト5型アデノウイルスの受容体であれば CAR, coxsackievirus adenovirus receptor) やインテグリンなどと結合しないキャプシド変異型を遺伝子工学的に容易に作成できるようになっている。私たちは、ファイバー変異型アデノウイルス adv-FZ33 シリーズとEGF受容体ファミリーの一種であるErbB2を標的分子として利用することで、癌細胞に選択的で効果的な遺伝子デリバリー療法の開発を試みました。

方法と材料

私たちは、ファーバー改変型アデノウイルス-FZ33 シリーズとEGF受容体 family の一種である ErbB2 を標的分子として利用することで、癌細胞に選択的で効果的な遺伝子デリバリー療法の開発を試みました。Immunoglobulin Fc ドメインに結合する ProteinA の Z33 ペプチドモチーフを Ad5 ファーバーHI loop に組み込んで Adv-FZ33 ファーバー改変型アデノウイルスシリーズを作成した。(figure1)

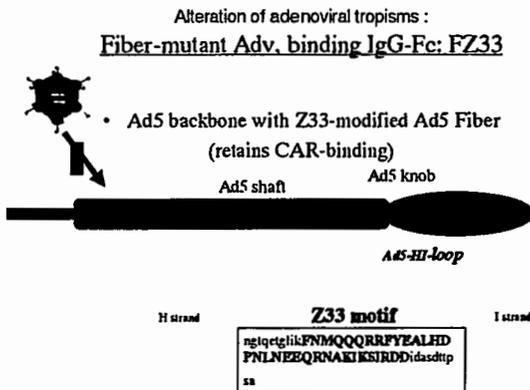


figure1 ☆ Z33 motif (consist of 33 amino acid) derived from sequence of Protein A that specifically bind IgG

遺伝子 marker として LacZ, EGFP, 治療遺伝子として UPRT になります。

ErbB2 は卵巣癌、乳がんの約30%で過剰発現し、FZ33 アデノウイルスと抗 ErbB2 抗体を架橋させることで、卵巣癌細胞株 SKOV3, RMG1、乳がん細胞株である SKBR3 を使って遺伝子導入効率を (EGFP は FACS で、LacZ は chemiluminescent β -Gal reporter gene assay にて) 評価した。5FU での治療効果は In vitro で SKOV3 に 5FU をその active form である FUMP に効率的に変換する UPRTase 遺伝子を発現し、FZ33 アデノウイルスに抗 ErbB2 抗体を着付け後120時間後、WST-1にて評価した。

結果

まず、最初に各腫がん細胞の ErbB2 発現をフローサイトメトリーで評価しました。使用した抗体は Ser4 で、使用した細胞株は卵巣癌である SKOV3, RMG1, 乳癌細胞である SKBR3 です。(figure2)

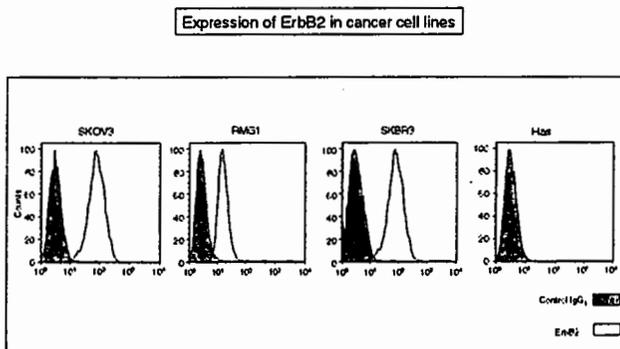


figure2. Has 細胞以外 SKOV3, RMG1, BR3において ErbB2 の発現は陽性を認めました。

つぎは、マーカー遺伝子にEGFPをコードしたZ33アデノウイルスと抗ErbB2 抗体を付着させて、各種細胞に感染させて遺伝子効率をフローサイトメトリーで評価しました。SKOV3 ではウイルス量 100vp/cellでコントロールと比較して約 30 倍、1000vp/cellで約 18 倍の遺伝子導入効率の増強が見られた。(figure3)

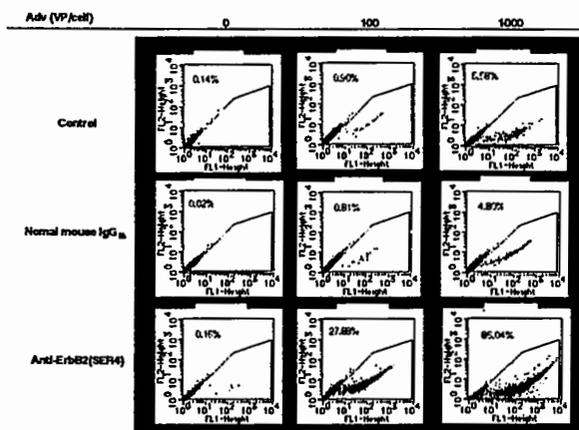


figure3. SKOV3細胞において抗ErbB2抗体による導入効率

RMG1でも同様に100vp/cellでは約10倍、1000vp/cellで約5倍の遺伝子導入効率の増強が見られた。(figure4)

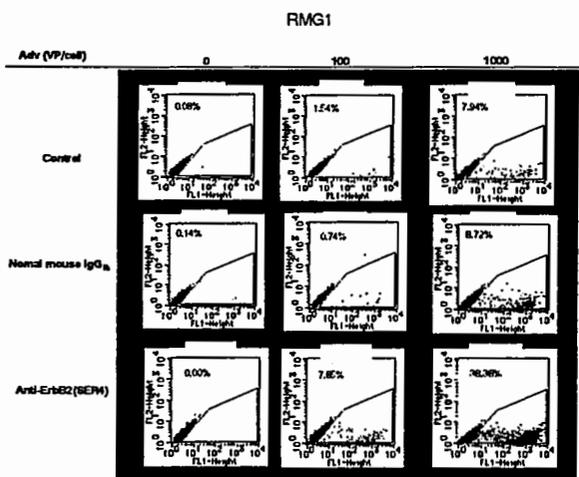


figure4. RMG1細胞において抗ErbB2抗体による導入効率

SKBR3でも同様に100vp/cellでは約10倍、1000vp/cellで約4倍の遺伝子導入効率の増強が見られた。(figure5)

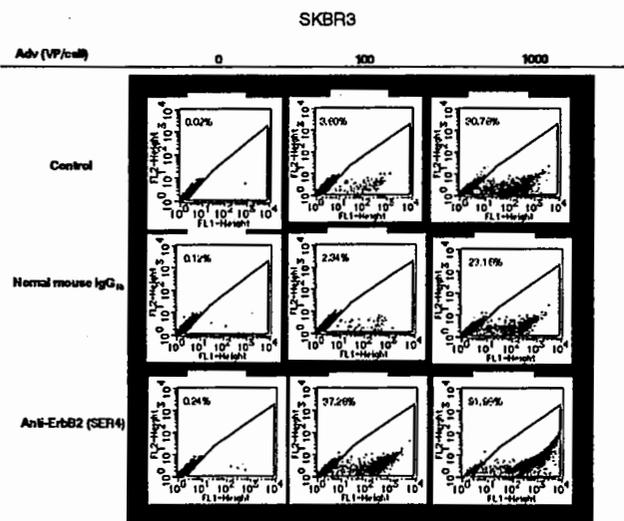


figure5 SKBR3細胞において抗ErbB2抗体による導入効率

一方、ErbB2陰性細胞Hasでは、遺伝子導入効率の上昇はまったく見られませんでした。(figure6)

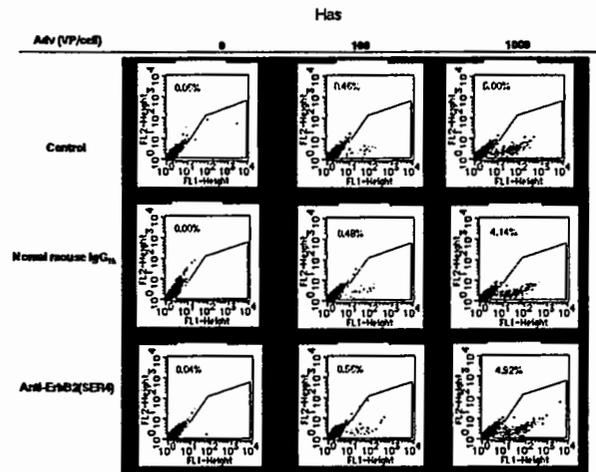


figure6.Has細胞において抗ErbB2抗体による導入効率

次に、in vitroでSKOV3に5-FUをそのactive formであるFUMPIに効率的な変換するUPRTase i 遺伝子を発現する、Z33 アデノウイルスに抗体 ErbB2 抗体を付着後、感染した。5-FU(0.01um-100um)処理した。120 時間後WST-1にて生細胞数を測定しました。(figure7)

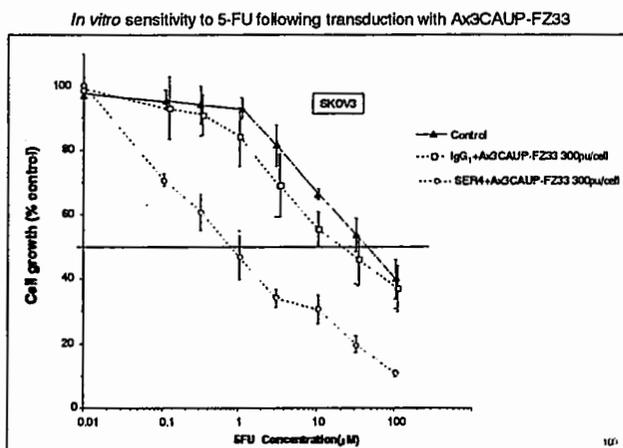


figure7. 5-FU の治療効果

結果、5-FU の毒性をIC50 で100倍増強することが可能でがん細胞の5-FU 耐性を克服できる新しい治療法となりました。

研究結論

実験の結果ですが、遺伝子導入効率は virus 量が 100vp/cell で SKOV3、RMG1、SkBR は ErbB2 陰性細胞 Has と比べて約30倍、10倍、10倍の増強を認めました。5FUの毒性をIC50で100倍増強することが可能で、がん細胞の5FU耐性を克服できる新しい治療法となった。以上の実験の結果により、もともとアデノウイルス受容体 CAR の発現が低い膵がん、前立腺がん、メラノーマなどの腫瘍細胞は、これらのがん細胞に選択的に遺伝子導入できるような標的化の候補分子を探している。これらの知見をもとにして、今後さらに、ウイルス外被に修飾を施すことによって、目的とする細胞に選択的に遺伝子導入できる安全性の高い治療ベクターを作製してゆきたい。

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2006年 03月 10日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 李 予 昕



指導責任者名： 福田 昇 職名： 助教授

所属機関名： 日本大学医学部

〒173-0031

所在地： 東京都板橋区大谷口上町30-1

電話： 03-3972-8111 内線： 2717

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

心筋幹細胞寿命延長による心不全の保存的再生医療

3. 成果の概要（100字程度）

1 心筋細胞分離方法の確立： Langendorff法 心臓灌流、単純心筋細胞分離

2 心筋幹細胞の同定：免疫染色方法で幹細胞マーカーの発現

3 心筋幹細胞の機能：心筋幹細胞は年齢とともに数は少なくなる

4 スタチンの心不全モデルマウスでの心筋幹細胞寿命への作用：実行中

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有（学会名・演題）

(2) 発表した論文 無 ・ 有（雑誌名・題名）

心筋幹細胞寿命延長による心不全の保存的再生医療

研究者氏名 李 予昕

中国所属機関 阜外心血管病医院超音波科

日本研究機関 日本大学医学部循環器内科

指導責任者 助教授 福田 昇

Abstract

Cardiac myocytes have been traditionally regarded as terminally differentiated cells that adapt to increased work and compensate for disease exclusively through hypertrophy. However, in the past few years, compelling evidence has accumulated to suggest that the heart tissue has regenerative potential. Discovery the cardiac stem cell certainly opens new opportunities for myocardial repairing, and conservative medicine to prolong life span of cardiac stem cell will be useful as new regenerative medicine for chronic heart failure. Present study examined effects of statin on senescence and function of cardiac stem cell in mice heart failure models. Wild type and Adrenomedullin knockout C57BL/6 male mice at 6 weeks age were used. Heart failure model was made by 12 weeks continuous high-salt diet. Five mg/kg/day atorvastatin was continuously oral administrated in both wild type and knockout mice. Cardiac stem cells were identified by immunofluorescence, fluorescence activated cell sorting (FACS) and real time PCR. Cardiac stem cell function was estimated with oxidative stress, cellular senescence and tolemere related proteins. Although percentage was very low, cardiac stem cells were identified by immunofluorescence with anti C-Kit antibody. The number and function of cardiac stem cell decreased as the mice age increased.

Background

Implantation of bone marrow (BM)-derived stem cells or other stem cells will be useful to improved failure organs which can not be improved present medicines. Implantation of mesenchymal stem cells into myocardium has recently been tried to improve the cardiac function in patients with severe heart failure, which transiently improved the impaired cardiac function. However, since the heart failure is a chronic disease, the transient improvement of cardiac function does not sufficiently prolong the life span in patients with the chronic heart failure.

Cardiac myocytes have been traditionally regarded as terminally differentiated cells that adapt to increased work and compensate for disease exclusively through hypertrophy. However, in the past few years, compelling evidence has accumulated to suggest that the heart tissue has regenerative potential. The adult heart has been confirmed to contain undifferentiated cells with the characteristics of cardiac stem cells. These cells have been isolated and expanded from adult heart (human, mice, rats) [1,2]. Characteristics of the cardiac stem cells are self-renewing, clonogenic, and multipotent. They differentiate three cell types: myocytes, smooth muscle, and endothelial vascular cells. Moreover, when injected into an ischemic heart, a population of these cells or the clonal progeny of one of them reconstitute a well-differentiated myocardial wall that encompasses up to 70% of the left ventricle. Discovery the cardiac stem cells certainly opens new opportunities for myocardial repairing.

Stem cells that exist to attach the niche in bone marrow are derived to peripheral blood after separation from the niche and act to repair the tissue damage. Stem cells are easily damaged with oxidative stress that shorten their cell cycle as the stem cell senescence. Cardiac stem cells show different life span in wild-type mice and insulin-like growth factor-1 transgenic homozygous mice [3].

Thus conservative medicine to prolong life span of cardiac stem cell will be useful as new regenerative medicine for chronic heart failure.

Methods

Animal

C57BL/6 male mice at 6 weeks age (AM^{+/+}, wild type) and Adrenomedullin knockout C57BL/6 male mice at 6 weeks age (AM^{+/-}) were used in the present study.

Heart failure model and statin administration

Heart failure model was made by 12 weeks continuous high-salt diet (8%) and confirmed by echocardiography. Five mg/kg/day atorvastatin was continuously oral administrated in both wild type and knockout mice.

Cardiac myocyte isolation

A heart of adult mouse was enzymatically dissociated into a single cell suspension as described previously [4,5]. Briefly, hearts were attached to a Langendorff perfusion system and perfused with 0mmol/L Ca²⁺ solution consisting of (mmol/L) 126 NaCl, 4.4 KCl, 1.0 MgCl₂, 13 NaOH, 24 HEPES, 2.5 g/L taurine, 0.65 g/L creatine monophosphate, 0.55 g/L sodium pyruvate, 0.14g/L NaH₂PO₄, and 2 g/L glucose. Then the hearts were subsequently digested with 100μmol/L Ca²⁺ solution and washed with 100μmol/L Ca²⁺ solution without the enzymes. Both ventricles were excised, minced and shaken gently in 100μmol/L Ca²⁺ solution. The cell suspension was filtered though a fine metallic tea filter and isolated myocytes were kept in 1mmol/L Ca²⁺ solution at room temperature, and were used within 6h after the isolation procedure.

Cardiac stem cell identification

Cardiac stem cells were identified by immunofluorescence, fluorescence activated cell sorting (FACS) and real time PCR. Cardiac stem cells were marked by anti-C-Kit antibody, anti-Scr-1 antibody and anti-Isl-1 antibody.

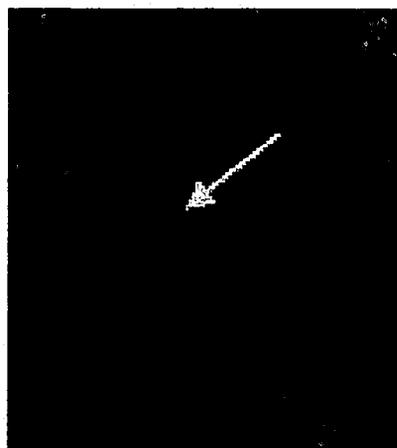
Estimate cardiac stem cell function

Oxidative stress was estimated with immunohistochemistry by anti 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) monoclonal antibody. Cellular senescence was estimated with p21Cip1, p27Kip1 and tolemere related proteins: TERT, phospho-Akt and total Akt.

Results

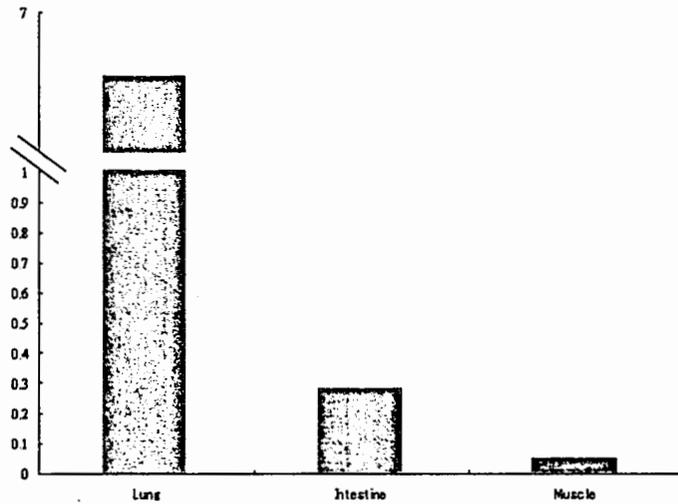
Cardiac stem cell identification

Cardiac stem cells were found by immunofluorescence with anti C-Kit antibody. The percentage of cardiac stem cell was very low, the nucleus of the cardiac stem cells were smaller than the nucleus of general cardiomyocytes (Figure 1).

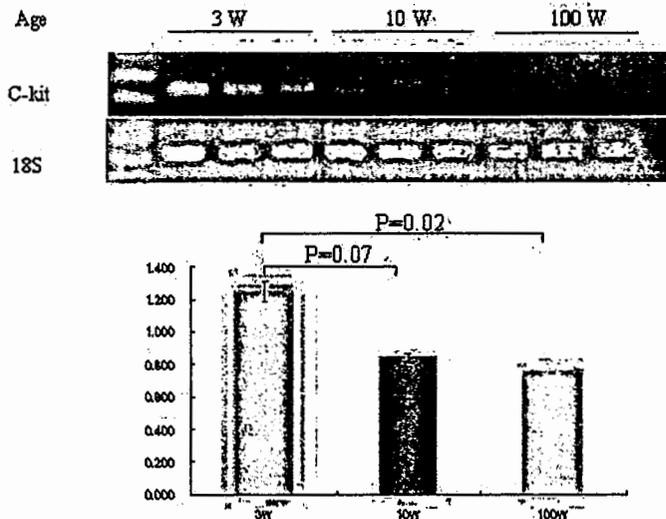


Cardiac stem cell function

Variant number of stem cells was identified in different tissues or organs. We measured C-Kit expression in lung, intestine and cardiomyocyte with real time RT-PCR in same mouse and found the C-Kit expression in lung was most and the expression in cardiomyocyte was least (Figure 2).



We measured C-Kit expression in cardiomyocyte with different age by real time RT-PCR. As representing in Figure 3, the expression of C-Kit decreased along with age increasing.



Discussion

Implantation of mesenchymal stem cells into myocardium has recently been tried to improve the cardiac function in patient with heart failure, which transiently improved the impaired cardiac function. However, since the heart failure is a chronic disease, the transient improvement of cardiac function is not enough to normalize the life span in patients with the chronic heart failure.

Cardiac stem cells were discovered to support myocardial regeneration [1,6,7]. They are self-renewing, clonogenic, and multipotent, giving rise to a minimum of three differentiated cell types: myocytes, smooth muscle, and endothelial vascular cells. Conservative medicine to prolong life span of cardiac stem cell will be therefore one of useful regenerative medicine for chronic heart failure.

From the preliminary results in the present study, we identified cardiac stem cells in adult mice heart. The cardiac stem cells percentage was very low. This result agreed with previous studies which proved the frequency of cardiac stem cell was $1\sim 30 / 10^4$ cardiomyocytes [1,4,8-10]. The nucleus of the cardiac stem cells was smaller than the nucleus of general cardiomyocytes. The number and function of cardiac stem cells decreased along with age increasing.

This study is in the process, we did not get the last results yet.

Reference

1. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-776.
2. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A: Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95:911-921.
3. Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, Zias E, Walsh K, Rosenzweig A, Sussman MA, Urbanek K, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A: Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* 2004;94:514-524.
4. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I: Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004;279:11384-11391.
5. Yao A, Kohmoto O, Oyama T, Sugishita Y, Shimizu T, Harada K, Matsui H, Komuro I, Nagai R, Matsuo H, Serizawa T, Maruyama T, Takahashi T: Characteristic effects of alpha1-beta1,2-adrenergic blocking agent, carvedilol, on $[Ca^{2+}]_i$ in ventricular myocytes compared with those of timolol and atenolol. *Circ J* 2003;67:83-90.
6. Perez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Munoz-Chapuli R, Wessels A: Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol* 2002;247:307-326.
7. Wessels A, Perez-Pomares JM: The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as

- cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;276:43-57.
8. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR: Postnatal *Isl1*⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005;433:647-653.
 9. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, Torella D, Tang XL, Rezazadeh A, Kajstura J, Leri A, Hunt G, Varma J, Prabhu SD, Anversa P, Bolli R: Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3766-3771.
 10. Limana F, Urbanek K, Chimenti S, Quaini F, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Izumo S, Anversa P: *bcl-2* overexpression promotes myocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6257-6262.

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006年 3月 8日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 時 海波



指導責任者名： 小宗 静男 職名： 教授

所属機関名： 九州大学医学系学府耳鼻咽喉科教室
〒812-8582

所在地： 福岡市東区馬出3-1-1

電話： 092-642-5668 内線： _____

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

音情報入力と聴覚回路形成機序との関連の解明

3. 成果の概要（100字程度）

正常ラットの聴覚発生時期は、外側上オリーブ核(LSO)神経細胞におけるGABAからグリシンへのスイッチングの時期と重る。本研究は聴覚発生前（生後6日齢）ラット側頭骨内の蝸牛を破壊する。生後13-15日齢で、パッチクランプ法を用い、LSO細胞へ入力する抑制性シナプス後膜電流の種類を調べ、神経伝達物質放出のスイッチング現象は正常時期より遅れることを判明した。音刺激が聴覚回路の成熟に重要であることが示唆された。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (学会名・演題)

第15回日本耳科学学会

外側上オリーブ核でのピリルビンによる神経伝達物質放出効率増加の機序

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

音情報入力と聴覚回路形成との関連の解明

研究者氏名	時海波
中国所属機関	南京医科大学附属病院耳鼻咽喉科
日本研究機関	九州大学医学部耳鼻咽喉科
指導責任者	教授 小宗静男
共同研究者	賀数 康弘, 柴田修明

要旨

発達期における各種感覚入力によって関連する中枢神経回路が改変されるとの多くの報告がある。幼若期ラットの脳幹の橋に位置する下側上オリーブ核 (LSO) 細胞はγアミノ酪酸 (GABA) を受けており、成熟に伴ってグリシン性入力へとスイッチする。さらに興味深いことに正常ラットの聴覚発生時期は生後11-12日齢であり、LSO 神経細胞におけるGABAからグリシンへのスイッチングの時期と重なる。外界からの情報入力は聴神経回路網の発達形成に深く関与し、このスイッチングの現象の引き金となっている可能性が高いと思われる。本研究は聴覚発生前 (生後6日齢) ラット側頭骨内の蝸牛を開放し、リンパ液を枯渇させ、内耳を破壊する。生後13-15日で、Whole-Cell Patch Clamp 法を用い、LSO 細胞へ入力する抑制性シナプス後膜電流の種類を調べ、シナプス伝達のGABAからグリシンへのスイッチング変化に対する音入力による制御を検討した。これらの結果から音刺激が受けなければ、LSO 神経細胞の発達におけるGABAからグリシンへのスイッチング現象は正常時期より遅れることを判明した。抑制性神経伝達の発達変化に対して、同時期の入力回路活動が重要であり、音刺激が聴覚回路の成熟に重要であることが示唆された。

Key Words 聴覚回路、音入力、発達、Whole-Cell Patch Clamp、シナプス後膜電流

緒言：

発達期における各種感覚入力によって関連する中枢神経回路が改変されるとの多くの報告がある (Rittenhouse et al.、1999; Di Cristo et al.、2001)。また抑制性回路に関しても感覚入力の遮断によって正常発達が阻害されることが近年報告され始めた。抑制性神経伝達の発達に関しては近年、多くの新知見があり、例えば視覚や聴覚のシステムでは感覚入力遮断は抑制性神経回路機能の正常発達を阻害する (Kapfer et al.、2002)。

外側上オリーブ核 (LSO) は左右耳からの音入力と同じ細胞に統合される最初の聴覚中枢であり、左右の耳に入力する音の強度差を検出している (Koyano et al.、1996)。幼若期ラット LSO 細胞はγアミノ酪酸 (GABA) を受けており、成熟に伴ってグリシン性入力へとスイッチする。このスイッチングの時期は正常ラットの聴覚発生時期と重なる。ラットやスナネズミが聴覚獲得するこの時期の前後に LSO において多くの形態および機能変化がおこる。生後2週間に、LSO では大規模なシナプスの再構築が形態と機能両方の変化として起こる。一方、生後1週目での蝸牛破壊は抑制性シナプスにおける軸索と樹状突起の形態的再編成を阻害する (Sanes et al.、1992)。幼若スナネズミにおける対側蝸牛破壊は生体におけるストリキニーネ慢性投与と同様に、抑制性入力シナプスおよび LSO 樹状突起の形態の正常発達を阻害する (Sanes et al.、1992)。本研究で聴覚回路形成過程への音情報

入力の影響を解明するため、ラットの LSO 神経細胞で音刺激の有無によりシナプス伝達の GABA からグリシンへのスイッチング現象を検討した。

対象と方法：

内耳破壊

SDラットで生後 6 日齢に両側の内耳破壊を行った。ラットはジエチルエーテルにて麻酔し、耳介後部を切開した。手術顕微鏡下に中耳腔を開放し蝸牛の骨壁を同定した。蝸牛は耳科手術用針を用いて注意深く破壊した。一方、対照モデルは耳介後部切開のみのラットを用いた。創部を縫合した後、動物は完全に麻酔から覚めるまで温熱板の上で加温し、その後ケージに戻して 15 日齢まで飼育した (図 1)。

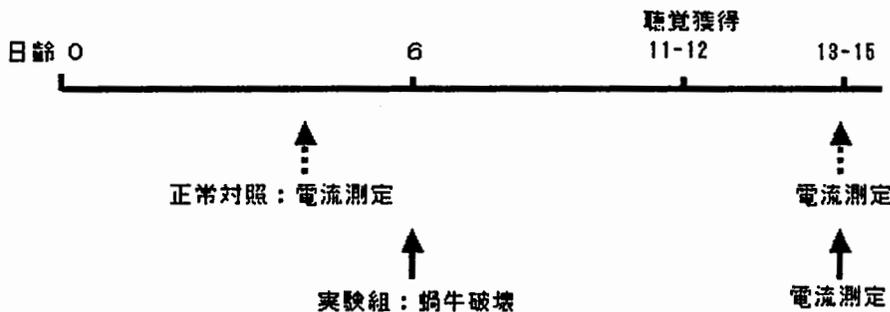


図 1 内耳破壊動物による実験。

LSO 神経細胞の脳薄切片および急性単離標本の作製

中枢神経細胞の急性単離は以前の記述のとおり行った (Nabekura et al., 1996)。ラットをエーテル麻酔下に断頭し、脳を摘出して氷温の人工脳脊髄液 (ACSF 液：後述) で冷却した。ビプラトーム (VT1000、Leica、Germany) を用いて脳薄切片 (厚さ 400 マイクロメートル) を作製した。脳薄切片は ACSF 液にて室温で 1 時間静置後、培養用プラスチック皿に移した。先端を細らせたガラス電極を顕微鏡下で LSO 核表面上に接触させ、水平振動を加え、機械的に細胞を単離した。単離した LSO 細胞は 10 分ほどでプラスチック皿の底部に付着し、その後直ちに電気生理学的実験に使用した。

溶液

脳薄切片作成と電流記録に以下の組成の外液を用いた。ACSF 液 (mM：脳薄切片用)、NaCl 124、KCl 5、 KH_2PO_4 1.2、 MgSO_4 1.3、 CaCl_2 2.4、glucose 10、 NaHCO_3 24、pH 7.45、95% O_2 -5% CO_2 で飽和。電流記録には標準外液 (mM)、NaCl 150、KCl 5、 MgCl_2 1、 CaCl_2 2、glucose 10、HEPES 10、Tris-base にて pH 7.4 に調整したものに 3×10^{-7} M tetrodotoxin (TTX) と 10^{-5} M LaCl_3 を加えて用いた。ホールセルパッチ記録法の記録電極内液の組成 (mM) は CsCl 92、Cs methanesulfonate 50、TEA-Cl 5、EGTA 2、ATP-Mg 4、HEPES Tris-base にて pH 7.4 に調整した。

電気生理学的測定

すべての電気生理学的記録は Whole-Cell Patch Clamp 記録法にて行った。電流の測定にはパッチクランプ用アンプ (CEZ-2300、Nihon kohden, Japna) を用い、1kHz 以下の電気信号のみをオシロスコープ、ペンレコーダーとデジタルテープレコーダーで記録した。記録用電極は外径 1.5mm のガラス管 (G-1.5、ナリシゲ、Japan) から微小電極作製機 (PB-7、ナリシゲ、Japan) で作製した。電極抵抗は 4 - 8M Ω を使用した。各薬物を含む標準外液の投与には Y チューブ法を使用した。本方法により 1 個のニューロン周囲の細

胞外液を20ミリ秒以内に新しい細胞外液と完全に置換した (Nabekura et al. 1993)。

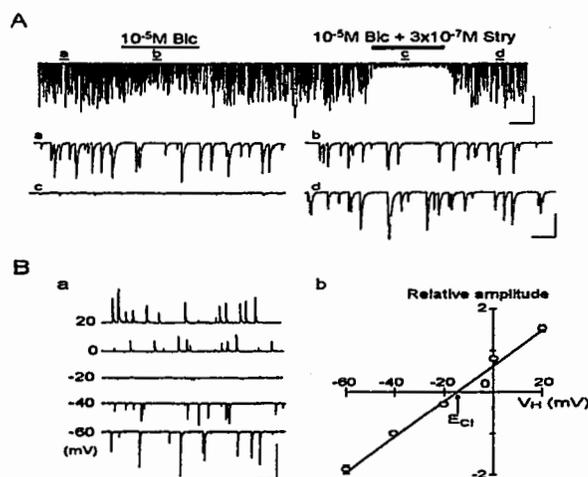
結果：

LSO 神経細胞で記録できたシナプス後膜電流の属性

Whole-Cell Patch Clamp 電氣的記録を行った。この方法を用いると、異なる膜電位において電流の大きさを測定し、応答の平衡電位が Cl^- の平衡電位 (E_{Cl}) とほぼ一致することを確認した (右図)。

GABA受容体の blocker である

bicuculline とグリシン受容体である strychnine を細胞へかけてみると、電流が全消失した。これらの結果から記録できた電流はGABAとグリシン受容体を介した抑制性シナプス後膜電流であることを判明した。

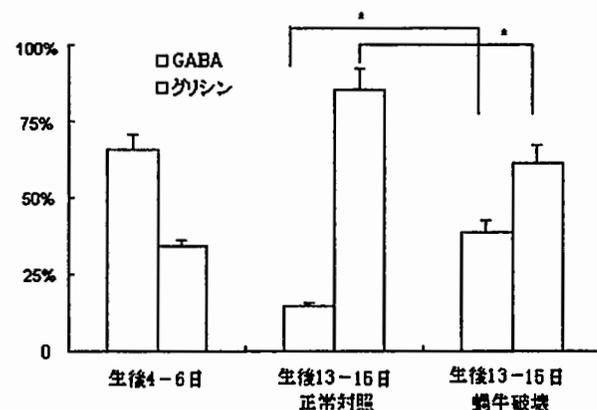


蝸牛破壊におけるスイッチング現象の延滞

生後 4-6 日齢と 13-15 日齢のラットから急性単離した LSO 細胞に適用し、各細胞においてGABAとグリシン成分の割合を調べることにより、生後 4-6 日齢の LSO 神経細胞ではGABA成分が平均で65.7%を占め、グリシン成分が34.8%を占めることがわかった (n=5)。

13-15 日齢では、GABA成分が平均で14.9%を占め、グリシン成分が84.5%を占めることがわかった (n=7) (右図)。

一方、6 日齢で蝸牛を破壊し、13-15 日齢まで飼育したラットから単離した LSO 細胞においてGABAとグリシン成分の割合を調べることにより、GABA成分が平均で38.7%を占め、グリシン成分が61.3%を占めることがわかった (n=9)。これらの結果から、音刺激が缺如におけるラット LSO 神経細胞においてGABAからグリシンへのスイッチング現象は延滞されることがわかった。



考察：

LSO は同側耳からの音入力を同側蝸牛神経核より直接グルタミン酸作動性入力として受け、同側耳から対側蝸牛神経核-台形体内側核 (MNTB) を介して GABA/グリシン作動性入力を受けている (Kotak et al., 1998)。この構築によって、LSO 細胞は左右耳からの音入力と同じ細胞に統合される最初の聴覚中枢であり、左右の耳に入力する音の強度差を検出している (Sanes et al., 1992; Koyano et al., 1996)。LSO はγアミノ酪酸 (GABA) を受けており、成熟に伴ってグリシン性入力へとスイッチする。さらに興味深いことに正常ラットの聴覚発生時期は生後 11-12 日齢であり、LSO 神経細胞における GABA からグリシンへのスイッチングの時期と重なる。このスイッチングの現象の引き金となっている可能性が高

いと思われる。

生後1週目における蝸牛破壊はLSO神経細胞自体と抑制性入力線維の形態学的変化をもたらす (Sanes et al., 1992)。幼若スナネズミにおける対側蝸牛破壊は生体におけるストリキニーネ慢性投与と同様に、抑制性入力シナプスおよびLSO樹状突起の形態の正常発達を阻害する。また、LSO細胞はクロライドイオン濃度調節機構の聴覚入力依存性発達変化する。同側・対側両方からの音入力にLSOの調節機構の成熟に重要であり、LSO神経細胞を興奮させるという共通の能力を反映していることがもっとも考えられる。

本研究は聴覚発生前(生後6日齢)ラット側頭骨内の蝸牛を開放し、内耳を破壊する。今回の結果から音刺激が受けなければ、LSO神経細胞の発達におけるGABAからグリシンへのスイッチング現象は正常時期より遅れることを判明した。抑制性神経伝達の発達変化に対して、同時期の入力回路活動が重要であり、音刺激が聴覚回路の成熟に重要であることが示唆された。本研究ではLSOでの一つの決定的な生理的変化、すなわちGABAからグリシンへのスイッチング現象が聴覚入力に依存していることを示した。このスイッチングは聴覚発達に必要であることを示した。外界からの情報入力は聴神経回路網の発達形成に深く関与し、抑制性神経伝達の発達変化に対して、同時期の入力回路活動が重要であり、音刺激が聴覚回路の成熟に重要であることが示唆された。

参考文献：

- 1 Rittenhouse, C.D., Shouval, H.Z., Paradiso, M.A. and Bear, M.F., 1999. Monocular deprivation induces homosynaptic long-term depression in visual cortex. *Nature*. 397, 347-350.
- 2 Di Cristo, G., Berardi, N., Cancedda, L., Pizzorusso, T., Putignano, E., Ratto, G.M. and Maffei, L., 2001. Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science*. 292, 2337-2340.
- 3 Kapfer, C., Seidl, A.H., Schweizer, H. and Grothe, B., 2002. Experience-dependent refinement of inhibitory inputs to auditory coincidence-detector neurons. *Nat Neurosci*. 5, 247-253.
- 4 Koyano, K. and Ohmori, H., 1996. Cellular approach to auditory signal transmission. *Jpn J Physiol*. 46, 289-310.
- 5 Sanes, D.H., Markowitz, S., Bernstein, J. and Wardlow, J., 1992. The influence of inhibitory afferents on the development of postsynaptic dendritic arbors. *J Comp Neurol*. 321, 637-644.
- 6 Nabekura, J., Omura, T. and Akaike, N., 1996. Alpha 2 adrenoceptor potentiates glycine receptor-mediated taurine response through protein kinase A in rat substantia nigra neurons. *J Neurophysiol*. 76, 2447-2454.
- 7 Kotak, V.C., Korada, S., Schwartz, I.R. and Sanes, D.H., 1998. A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci*. 18, 4646-4655.

注：本研究は、2005年10月20-22日「第15回日本耳科学学会総会」にて口演発表した。

作成日：2006年3月9日

対照ラット



蝸牛が破壊したラット

単離LSO神経細胞

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2006年 3月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 陳 銳



指導責任者名： 五十嵐 薫 職名： 教授

所属機関名： 東北大学歯科研究科

〒 980-8575

所在地： 宮城県仙台市青葉区星陵町4-1

電話： 022-717-8375

内線： 8375

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

歯周組織へ局所的OPG遺伝子導入による歯周病による骨破壊の阻止

3. 成果の概要 (100字程度)

7週齢Wistar系雄性ラットの上顎第一臼歯口蓋側歯周組織へLPS局所注入と局所的OPG遺伝子導入を2日毎に行った。歯周組織へのLPS局所注入は、破骨細胞数を増加させ、重篤な歯槽骨吸収を惹起した。また、同部位で歯根膜細胞や骨芽細胞にRANKLの発現増強が認められた。局所的なOPG遺伝子導入は、歯周組織におけるOPGタンパクの発現を増強し、LPSにより惹起された破骨細胞形成と歯槽骨吸収を有意に抑制した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (学会名・演題)

第64回日本矯正歯科学会大会 (2005.10.)

歯周組織への局所的OPG遺伝子導入は、LPSによる歯槽骨吸収を抑制する

(2) 発表した論文 無 ・ (雑誌名・題名)

Journal of dental research (will be submitted)

Local OPG-gene transfer to Periodontal Tissue Inhibits Alveolar Bone Resorption

歯周組織への局所的 Osteoprotegerin 遺伝子導入は、LPS 誘導性歯槽骨吸収を抑制する

研究者氏名 陳銳
中国所属機関 中国華中科技大学同济医学院附属同济医院
日本研究機関 東北大学歯科学研究科
指導責任者 教授 五十嵐 薫
共同研究者名 菅崎弘幸, 千葉美麗

要旨

Previously, we discovered that local OPG-gene transfer to periodontal tissue inhibited RANKL-mediated osteoclastogenesis and inhibited experimental tooth movement. We hypothesized that local OPG-gene transfer to the periodontium would neutralized the RANKL activity induced by LPS injection, thereby inhibiting osteoclastogenesis and diminishing alveolar bone resorption in the experimental periodontal disease. Seven-week-old male Wistar rats were received LPS or PBS injection in palatal gingiva of the upper first molars on both sides. The inactivated HVJ envelop vector containing a mouse OPG expression plasmid [pcDNA3.1(+)-mOPG] or mock-vector was injected periodically into the palatal periodontal tissue of upper first molars. LPS injection induced severe periodontal bone resorption. Local OPG-gene transfer induced OPG production, and osteoclastogenesis was inhibited. Local OPG-gene transfer significantly diminished alveolar bone resorption. In this study, we report that OPG-gene transfer to periodontal tissue inhibited osteoclastogenesis in LPS-mediated experimental periodontal disease and inhibited experimental alveolar bone resorption.

Key Words gene transfer, osteoprotegerin (OPG), alveolar bone, periodontal disease, osteoclastogenesis

精言:

Recently, with the materials improving, adult orthodontic patients are increasing. In these patients, morbidity rate of periodontal tissues is high, and alveolar bone resorption can often be seen. Since orthodontic tooth movement under progressive periodontitis causes striking bone destruction, control of alveolar bone resorption induced by periodontal disease becomes quite important for orthodontists (Cardaropoli et al., 2001; Frank and Long, 2002). Alveolar bone resorption in periodontitis is due to excess osteoclastic activity, leading to an imbalance in bone remodeling which favors resorption (Bezerra et al., 2000; Crotti et al., 2003; William et al., 2003). It has been reported that osteoclastogenesis is primarily activated by the receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand (RANKL) and inhibited by osteoprotegerin (OPG) (Simonet et al., 1997; Udagawa et al., 1999; Yasuda et al., 1999). And then, periodontal ligament (PDL) cells, which exist between teeth and alveolar bone, regulate osteoclastogenesis through RANKL stimulation and OPG inhibition, so as to affect processes such as periodontitis and orthodontic tooth movement (Kanzaki et al., 2001). Furthermore, we have reported that OPG-gene transfer to periodontal tissue inhibit RANKL mediated osteoclastogenesis and inhibited experimental tooth movement (Kanzaki et al., 2004). Combining this information, we hypothesized that local OPG induction in the periodontal tissue might neutralize RANKL-upregulation induced by periodontitis, and thereby inhibit osteoclastogenesis and diminish alveolar bone resorption.

To test this hypothesis, we used experimental periodontal disease induced by recurrent lipopolysaccharide (LPS) injection in rats with or without local OPG-gene transfer by means of a hemagglutinating virus of Japan (HVJ; Sendai virus) envelope vector gene delivery system.

対象と方法:

Foundation of experimental periodontal disease

Sixteen seven-week-old male Wistar rats with an average weight of 167 g were used in this study. Purified lipopolysaccharide from *E. coli* (Sigma chemical, St. Louis, MO, USA) was injected directly into the gingival adjacent to both of first molars (10 µg/site) every two days (Miyachi, 2001; Ramamurthy, 2002).

In vivo Gene transfer

For *in vivo* transfection, we used an HVJ-envelope-vector Kit (GenomONE, Ishihara-sangyo kaisha Ltd., Osaka, Japan), according to the manufacturers instructions®. Administration of the HVJ-envelope-vector containing pcDNA-mOPG to the animals was started on the initial day of LPS injection. On the contralateral side, 5 µl of mock vector was injected into the correspond area as the control.

Tissue preparation

After the scarifice and fixation by perfusion of the experimental animals, the upper jaws, including the molars, were dissected and further fixed overnight, then decalcified with 10% ethylenediamine-tetraacetic acid in 0.01M PBS (PH7.4) for 9 wks at 4°C, dehydrated, and embedded in paraffin. 8 µm serial frontal sections were prepared.

Observation of the periodontal tissues

Periodontal bone resorption on the palatal surface of the maxillary molars was observed with HE staining. TRAP staining and Immunohistochemical Analysis for RANKL and OPG were performed.

Statistics

A Student's paired *t* test was used for comparison of bone loss between the left and right side within each group. The other data were analyzed for statistical differences by Kruskal-Wallis analysis, followed by a Bonferroni-type multiple comparison (Tukey type). Differences with $P < 0.05$ were considered significant. The values are expressed as the means \pm standard deviation (SD).

結果:

Animal status

The LPS injection and local administration of the HVJ-envelope-vector containing pcDNA-mOPG did not affect the growth of the animals (Fig. 1). In addition, local gene transfer did not affect the bone mineral density (BMD) of tibiae (Fig. 2).

Periodontal status of experimental animals

LPS injection induced the RANKL expression in the periodontal tissue. Local OPG-gene transfer induced OPG upregulation in periodontal tissue, especially in the fibroblast cell of the periodontium.

Local OPG-gene transfer reduced osteoclastogenesis in periodontal tissue

The number of osteoclasts was increased by LPS injection (from 4 ± 1 cells to 15 ± 2 cells) ($P < 0.01$), and local OPG-gene transfer inhibited the osteoclast induction stimulated by the LPS injection (from 15 ± 2 cells to 7 ± 2 cells) ($P < 0.05$). When OPG-gene transfer was performed on the both two sides (group 3), there was no significant difference in the number of osteoclasts between side with LPS injection (7 ± 2 cells) and the side without LPS injection (3 ± 1 cells) ($P > 0.01$) (Fig. 3).

Local OPG-gene transfer significantly diminished bone resorption

Length from cemento-enamel junction (CEJ) to the alveolar ridge (AR), longer value means the severer alveolar bone resorption, were measured. Compared to the control side (473.3 ± 38.7 µm), repetitive LPS injection showed larger value (588.3 ± 27.9 µm) ($P < 0.01$) (Figure 4). Local OPG-gene transfer (522.9 ± 16.7 µm) significantly inhibited bone resorption compared to the LPS injected side (610.0 ± 98.4 µm) ($P < 0.05$) (Figure 4).

考察:

Numerous reports have described the pharmacological control of alveolar bone resorption induced in periodontitis some of them focused on regulating of osteoclasts. (Bezerra et al., 2000; Di Paola et al., 2005; Lohinai et al., 2003) However, because

these drugs are rapidly flushed by blood circulation, daily systemic administration or daily injection is needed. Osteoprotegerin (OPG) is a potent inhibitor of osteoclast differentiation and activation (Doran et al., 2004; Simonet et al., 1997). OPG-gene transfer or OPG administration have been confirmed to be a feasible and effective therapeutic candidate to treat or prevent bone loss in osteoclast-dependent skeletal disorders, such as osteolysis and arthritis (Doran et al., 2004; Lubberts et al., 2003; Yang et al., 2002). However, Effects of OPG-gene transfer on bone loss in periodontitis have been seldom reported. Inhibition of RANKL function with the decoy receptor OPG diminished alveolar bone destruction and reduced the number of periodontal osteoclasts after microbial challenge (Teng et al., 2000, Valverde et al., 2004). However, injections of OPG protein did not completely block alveolar bone destruction. The reason was considered to be related with some other proinflammatory cytokines (e.g., IL-1 and TNF- α). In this study, we used local OPG-gene transfer instead of OPG administration. Local gene transfer has two advantages (Blesing and Kerr, 1996): First, it can maintain a locally effective concentration and prolonged protein expression, regardless of blood circulation. Second, protein expression occurs at the local site, so that systemic effects are avoided. Since viral gene transfer vectors such as adenoviral and herpes viral vectors have been proven to have problems, especially in immunogenicity and cytotoxicity, hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome method was chosen for the OPG-gene transfer (Kaneda et al., 2002).

We were able to induce local OPG expression in the periodontal tissue without any systemic effects (Fig. 1d, 1f). Local OPG-gene transfer significantly reduced the numbers of osteoclasts at the periodontium caused by LPS injection (Fig. 3e). Thus, OPG-gene transfer almost completely inhibited the induction of osteoclastogenesis. It proved the high efficiency of transfection performed in this study. There was a little increasing of osteoclasts on the sides of LPS injection and OPG-gene transfer compared to the control sides. It must be considered some other cytokines regulating the RANKL/OPG balance, similar to the consideration in the study of OPG protein administration inhibiting the periodontal bone resorption, as described above (Valverde et al., 2004); alternatively, osteoclastogenesis induced by LPS injection independent of RANKL/RANK/OPG regulatory axis, such as directly stimulating the osteoclasts to be activated (Daly et al., 1980; Tiranathanagul et al., 2004; Wang and Ohura, 2002).

Enforced OPG expression diminished the alveolar bone resorption induced by LPS injection almost completely (Figure 4). The result is consistent with the researches of controlling bone resorption in the other skeletal disorders by OPG-gene transfer (Doran et al., 2004; Yang et al., 2002).

Osteoclastogenesis in response to periodontal disease appears to be regulated primarily through RANKL signaling in the cells of periodontal tissues, such as fibroblasts, osteoblasts, activated T cells. In this study, we demonstrated that OPG-gene transfer to the periodontal tissue inhibited RANKL-related osteoclastogenesis induced by LPS injection, and inhibited experimental alveolar bone resorption without eliciting any systemic effects. In conclusion, the present results suggest that OPG-gene transfer to periodontal tissue may be useful for the prevention of bone resorption in patients with periodontal diseases.

参考文献:

- Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, et al. (2000). *J Periodontol* 71:1009-1014.
- Blesing CH, Kerr DJ (1996). *J Drug Target* 3:341-347.
- Cardaropoli D, Re S, Corrente G, Abundo R (2001). *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 120:671-675.
- Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. (2003). *J Periodontal Res* 38: 380-387.
- Daly CG, Seymour GJ, Kieser JB (1980). *J Oral Pathol* 9:1-15.
- Di Paola R, Mazzon E, Rotondo F, Dattola F, Britti D, De Majo M, et al. (2005) *Eur J Pharmacol* 516:151-157.
- Doran PM, Turner RT, Chen D, Facteau SM, Ludvigson JM, Khosla S, et al. (2004). *Exp Hematol* 32:351-359.
- Frank CA, Long M (2002). *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 121:639-649.

Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, Yamamoto S, Ikegami H, Suzuki N, et al. (2002). *Mol Ther* 6: 219-226.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H (2001). *J Dent Res* 80: 887-891.

Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H (2004). *J Dent Res* 83:920-925.

Kawai T, Eisen-lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA (2000). *J Immunol* 164:2102-2109.

Kessler M (1976). *Am J Orthod* 70:154-162.

Lohinai Z, Mabley JG, Feher E, Marton A, Komjati K, Szabo C (2003). *J Dent Res* 82:987-992.

Lubberts E, van den Berselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. (2003). *J Immunol* 170:2655-2662.

Miyaushi M, Sato S, Kitagawa S, Hiraoka M, Kudo Y, Ogawa I, et al. (2001). *Histochem cell Biol* 116:57-62

Ramamurthy NS, Xu J-W, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, et al. (2002). *J Periodont Res* 37:1-7.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. (1997). *cell* 89:309-319.

Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, et al. (2000). *J Clin Invest* 106:R59-67.

Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Pavasant P (2004). *Periodontol* 75:1647-1654.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, et al. (1999). *Bone* 25:517-523.

Valverde P, Kawai T, Taubman MA (2004). *J Bone Miner Res* 19:155-164.

Wang PL, Ohura K (2002). *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 132-142.

William J. Boyle, W. Scott Simonet, David L. Lacey (2003). *Nature* 423: 337-342.

Yang SY, Mayton L, Wu B, Goater JJ, Schwarz EM, Wooley PH (2002). *Arthritis Rheum* 46:2514-2523.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. (1999). *Bone* 25:109-113.

Fig.1

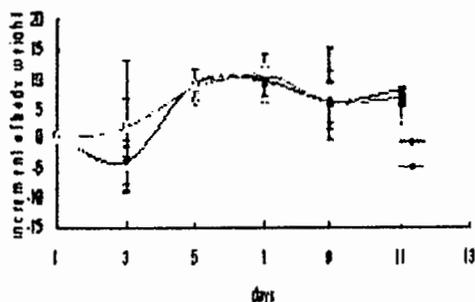


Fig.2

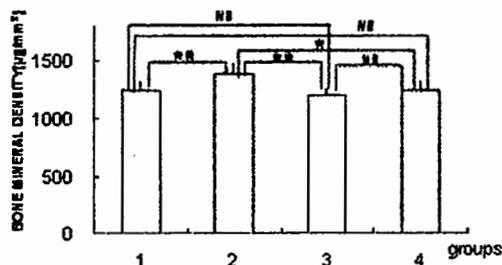


Fig.3

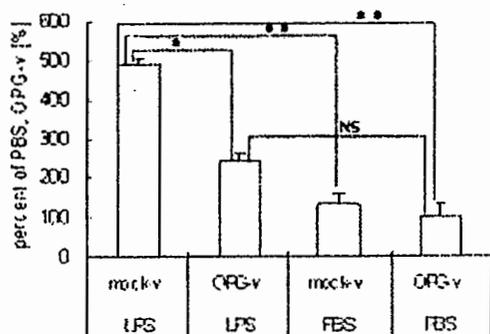
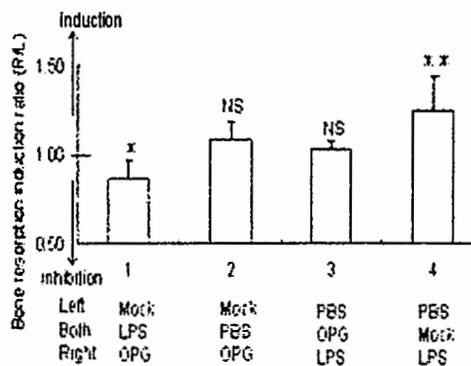


Fig.4



注:本研究は、2005年10月 第64回日本矯正歯科学会大会にてPOST発表。

作成日:2006/03/01

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006年 3月 2日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 商 維昊



指導責任者名： 鎌田 徹 職名： 教授

所属機関名： 信州大学医学部

〒 390-8621

所在地： 長野県松本市旭3-1-1

電話： 0263-372603

内線： 5182

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

Ras・ヒト発癌過程における活性酸素産生遺伝子Nox1の役割の研究

3. 成果の概要（100字程度）

Nox1によって産生されるROSの標的蛋白候補の一つ、小胞体蛋白ERp57の機能を解析した結果、ERp57は、Nox1と physical相互作用をし、細胞内で共局存在する事を見出した。このことからERp57は Nox1レドックスシグナリングを媒介することが考えられる。又、Nox1ファミリーの Nox4は、AKT-ASK1シグナルを介して、肺癌細胞の生存に寄与することが判明した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有（学会名・演題）

2005第64回癌学会

1. Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signaling regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells

2. Downregulation of Rho by NADPH oxidase 1 is required for EGF-and Ras- induced actin depolymerization

2005 第78回日本生化学会

1. The superoxide generating oxidase Nox4 confers anti-apoptosis activity to pancreatic cancer cells via the AKT-ASK1 kinase signaling

2 Nox1-dependent redox regulation exerts an integral role in actin cytoskeleton organization of Ras-transformed cells by controlling Rho signaling

(2) 発表した論文 無 ・ 有（雑誌名・題名）

(Anal Biochem. 2005 Jul 15;342(2):348-51.)

Development of a direct and sensitive detection method for DNA-binding proteins based on electrophoretic mobility shift assay and iodoacetamide derivative labeling.

(Oncogene 2006 in press)

Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signaling regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC- 1 cells

Ras. ヒト発癌過程における活性酸素産生遺伝子 Nox1 の役割の研究

研究者氏名	商維昊
中国所属機関	北京病院麻酔科
日本研究機関	信州大学医学部 分子細胞生化学講座
指導者氏名	教授 鎌田徹
共同研究者氏名	安達喜文 古田秀一 陳薇 満下淳地 広瀬国孝

Summary

Cellular target proteins for superoxide-generating oxidase Nox1, that may play a mediating role in Ras oncogene transformation and in some types of human cancers, have been analyzed. An endoplasmic reticulum protein Erp57 was identified to be oxidized by Nox1-generated ROS and interact with Nox1 proteins. This implicates Erp57 as a downstream effector for Nox1 redox signaling involved in tumor progression. In another experiment, we found that Nox4-produced ROS activate AKT-ASK1 kinase cascade and thereby lead to cell survival signaling in pancreatic cancer cells, indicating that Nox4 may in part confer pancreatic cancer cells resistance against apoptosis.

Key words

NADPH oxidase, Reactive Oxygen Species, Erp57, apoptosis, cancer

Background

Generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) has been implicated in immortalization, invasion, and metastasis during the multistep cancer development, but its exact molecular mechanism has not been fully elucidated. Superoxide generated by the NADPH oxidase (Nox) family has recently been recognized as important signaling molecules in cellular processes (Lambeth, 2004). They share common structural similarities with six transmembrane domains and the cytoplasmic domain that comprises NADPH- and FAD-binding sites. Among them, Nox1 is unique in that it is involved in mitogenic regulation (Suh et al., 1999). We therefore initiated study on the functional role of Nox1 in carcinogenesis by utilizing Ras oncogene transformation as a model system. We found that Ras oncogene upregulates the expression of Nox1 via the MAP kinase kinase (MAPKK)-MAP kinase (MAPK) dependent pathway, and that

small interference RNA (SiRNA) targeting Nox1 blocks the Ras transformation phenotypes including anchorage-independent growth, morphological changes, and tumorigenicity (Mitsushita et al.,2004).The finding suggests that ROS generation by Ras-induced Nox1 is functionally required for Ras transformation.

Furthermore, the increased expression of Nox4, another member of the Nox family, was detectable in human pancreatic cancer cell line and inhibition of the Nox4 activity by Nox4 RNAi caused apoptosis of colon cancer cells, suggesting that Nox4 generated ROS are indispensable for cell survival of pancreatic cancer cells. Thus, our study provides a new concept that Nox-generated ROS, unlike a conventional view of genotoxicity of ROS, are important signaling molecules in cell transformation process.

Material and Method

1. Detection of physical association of Erp57 with Nox1

Human (h) Nox1 cDNA and c-myc-tagged Erp57 cDNA were subcloned into pcDNA3.0 and pcDNA3.1, respectively. Erp57 was cotransfected into COS1 cells with Nox1 and its regulators p41 and p51. Cell lysates were subjected to coimmunoprecipitation study by using anti-c-myc-antibodies and anti-hNox1 antibodies.

2. Immunocytochemistry

Human colon cancer CACO-2 cells transfected with hNox1 expression plasmids, fixed and permeabilized. Indirect immunostaining was performed with anti-hNox1 antibodies and anti-Erp57 antibodies, followed by staining with FITC-or Rhodamine-conjugated antibodies. The stained cells were observed under a Zeiss confocal microscope.

3. Analysis of AKT and ASK1 activities.

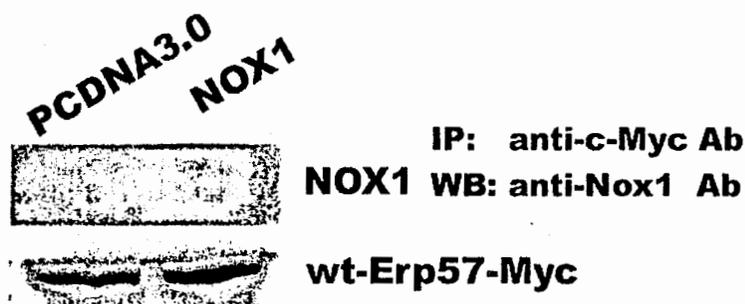
Pancreatic cancer PANC-1 cells were incubated with a NADPH oxidase inhibitor or transfected with psilencer vector carrying scrambled RNAi or Nox4 RNAi-1 and -2, and cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-phospho-AKT antibodies and anti-phospho-ASK1 antibodies. In the control experiment, PANC-1 cells were transfected with pcDNA3.0 wt-AKT1 or AKT1Lys179Ala and cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-phospho-AKT and anti-phospho-ASK1 antibodies.

Results

Specific aim 1: Identification of cellular target proteins for Nox1-generated ROS

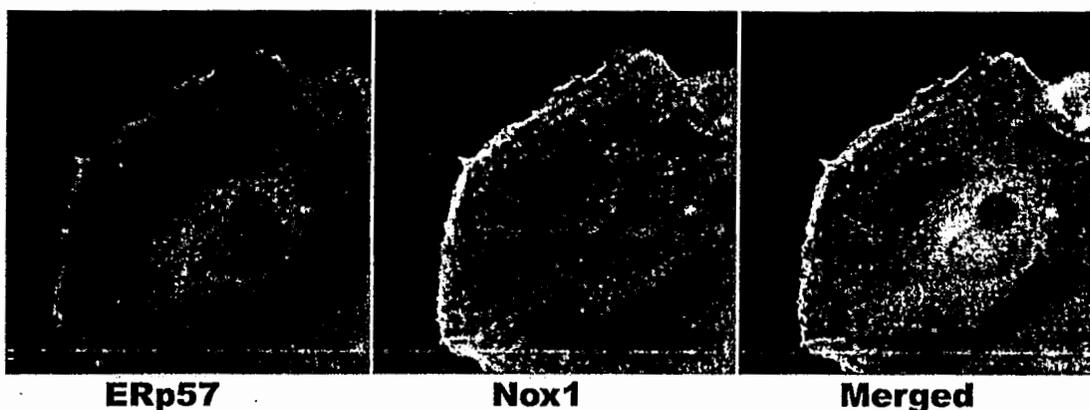
Because we previously identified an endoplasmic reticulum protein Erp57 as one of proteins oxidized by Nox1-generated ROS, we examined whether Erp57 interacts with Nox1. To this end, COS1 cells were transfected with Nox1 together with c-myc-tagged Erp57. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-c-myc-antibodies and the immunoprecipitates were probed with anti-c-Myc antibodies. The data show that Erp57 and Nox1 were coimmunoprecipitated, suggesting the binding of Erp57 to Nox1 (figure.1).

Figure.1 Coimmunoprecipitation of Nox1 with wt-Erp57



To further assess the Nox1-Erp57 interaction, CACO2 cells were double-stained with mouse anti-Nox1-antibodies and rabbit anti-Erp57 antibodies. As shown in Figure.2,

Figure2 Colocalization of ERp57 with Nox1 on the Caco2 cell surface



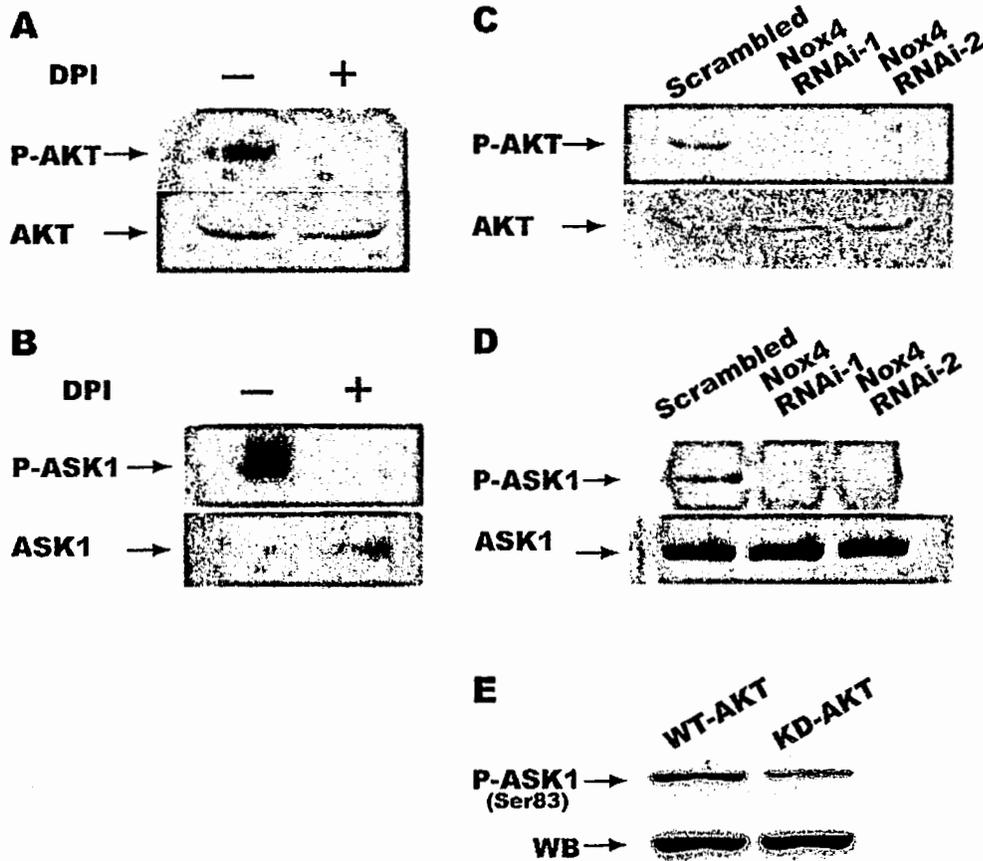
Erp57 was colocalized with Nox1 at the plasma membrane sites and the majority of Erp57, which is localized at ER, was not colocalized with Nox1. The data support the results obtained with above binding studies.

Specific aim 2: The dissection of Nox4-generated cell survival signaling pathway in Pancreatic cancer cells

Akt (protein Kinase B) is one of the crucial regulators of cell survival function in response to growth factor stimulation, and its genetic alteration is linked to progression of several human cancers. AKT is activated upon phosphorylation, which in turn inhibits apoptosis-inducing proteins by phosphorylating these proteins, resulting in promotion of cell survival. Conversely, conversion of the phosphorylated AKT to its dephosphorylated form is associated with induction of apoptosis. Previously we demonstrated that depletion of ROS by DPI, a Nox inhibitor treatment or introduction of small interference RNA (siRNA) for Nox4 induces apoptosis of PANC-1 cells. To investigate whether AKT is involved in cell death of PANC-1 cells caused by DPI treatment or siNox4 RNAs transfection, we examined the phosphorylation state of AKT under these experimental conditions. PANC-1 cells were incubated with DPI, cell lysates were prepared and the phosphorylation level of AKT was analyzed by immunoblotting with

anti-phospho-AKT (Thr308) antibodies. While AKT was found to be phosphorylated in untreated cells, addition of DPI markedly decreased its phosphorylation level (Figure 3).

Figure.3 DPI and siNox4RNAs inhibit AKT and ASK1 phosphorylation



DPI treatment did not affect the expression of AKT proteins. The results suggest that DPI attenuated AKT signaling during induction of apoptosis. Because recent findings suggest that ASK1, a key player in stress-responsive apoptosis, is one of the protein substrates for AKT, this raises the possibility that DPI-induced suppression of phosphorylation of AKT inhibits AKT-dependent phosphorylation of ASK1 on Ser-83. To test this possibility, lysates prepared from DPI-loaded PANC-1 cells were subjected to immunoblotting with antibodies to phospho-ASK1 antibodies, which specifically recognize ASK1 phosphorylated on Ser-83. PANC-1 cells exhibited a significant level of phosphorylation of ASK1, but this phosphorylation was clearly blocked by inhibition of cells with DPI (Figure 3), suggesting the involvement of DPI-inhibitable Nox-like enzyme in downregulation of an AKT-ASK1 signaling cascade. In fact, silencing of the endogenous Nox4 activity by Nox4 RNAi-1 and -2 reduced phosphorylation of AKT and hence phosphorylation of ASK1 on Ser-83, as shown in Figure 3. If ASK1 is a substrate for AKT, disruption of the AKT kinase activity should interfere with phosphorylation of ASK1. The overexpression of the kinase defective AKT mutant, AKT1Lys179Ala, yielded a significant reduction in ASK1 phosphorylation, as expected (Figure 3)

Discussion

Our studies indicate that Nox1 binds to an endoplasmic reticulum (ER) protein Erp57 and subsequently oxidize it. Erp57 is considered to play a role as oxidoreductase, disulfide isomerase, and molecular chaperone. Especially, Erp57 has been proposed to participate in correct protein folding at ER site through isomerase activity. However, not all of the Erp57 is confined to the area of ER and some of them are detectable at plasma membrane. In fact, our immunocytochemical study also revealed the membrane localization of Erp57 and importantly its association with Nox1. Thus, Erp57 could be a direct acceptor for Nox1-generated ROS that transmits redox-signaling to downstream molecules. It remains to be determined whether thiols of cysteine residues contained in Erp57 thioredoxin domains are oxidized by Nox1-generated ROS. Also, it remains to be elucidated whether the biochemical link of Nox1-Erp57 is required for Ras oncogene transformation and some of transformation phenotypes of human cancer cells.

Vaquero et al. (2004) initiated the study on the protective function of Nox4 against cell killing in pancreatic cells, but the signaling mechanism by which Nox4-generated ROS control cell survival was not fully elucidated in their study. Our study reveals that abrogation of Nox4-generated ROS induced inhibition of phosphorylation of AKT and subsequent suppression of AKT-mediated phosphorylation of ASK1 on Ser-83, and that the AKT phosphorylation-defective ASK1 Ser83Ala mutant alone can substitute for DPI and siNox3RNAi in apoptosis induction. Because phosphorylation of AKT on Thr-103 activates its kinase activity and the activated AKT decreases the ASK1 kinase activity through phosphorylation of ASK1 on Ser-83. It is most likely that inhibition of AKT phosphorylation by DPI and siNox4RNAs reduced its kinase activity, which in turn blocked AKT-catalyzed phosphorylation of ASK1, resulting in ASK1-mediated cell death. We therefore propose that Nox4-dependent cell survival signaling is mediated by the AKT-ASK1 kinase cascade and that antagonizing this signaling pathway by DPI or siNox4RNAs results in activation of apoptosis.

References

- Lambeth JD. (2004) *Nat Re Immunol* 4:181-189
- Suh Y-A, Arnold RS, Lasseque B, Shi J, Xu X, Sorescu D. et al. (1999) *Nature* 401:79-82.
- Mitsushita J, Lambeth JD, Kamata T. (2004) *Cancer Res* 64:3580-3585
- Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukousky I, Gukovskaya AS. (2004) *J. Biol. Chem* 279: 34643-34654

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金 -在留中国人研究者- 報告書

財団法人 日 中 医 学 協 会 御 中

提出日 2006年2月20日

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 周 歆 

指導責任者名： 渡辺 知保 職名： 教授

所属機関名： 東京大学大学院医学系研究科
〒 113-0033

所 在 地： 東京都文京区本郷7-3-1

電話： 03-5841-3531 内線： 23531

1. 助 成 金 額 : 600,000 円

2. 研 究 テ ー マ 中国・洞庭湖地域の小児にみられる成長遅延と要因の解明

3. 成 果 の 概 要 (100字程度)

中国・洞庭湖地域の学童274名を対象として、成長に関する縦断的調査を4年間にわたって行い、成長の個人差を明らかにするとともに、こうした個人差と寄生虫・栄養状態・居住条件との関連を見いだした。

4. 研 究 業 績

(1) 学会における発表

無

・ 有 (学会名・演題)

(2) 発表した論文

無

・ 有 (雑誌名・題名)

中国・洞庭湖地域の小児にみられる成長遅滞とその要因の解明

研究者氏名	周 歆
中国所属機関	中南大学湘雅医学院
日本研究機関	東京大学大学院医学系研究科
指導責任者	教授 渡辺 知保

Abstract

To examine growth pattern of rural Chinese schoolchildren and clarify the related impact factors on growth pattern, a longitudinal study of 274 schoolchildren (138 boys and 136 girls) aged 10–12 years in the rural Dongting Lake region in south China were conducted for 4 years (2001–2005). For all participants, anthropometric measurements (height, weight, mid-upper arm circumference, and skinfold thickness at triceps, biceps, and subscapular) were conducted; eggs of parasites (*Schistosoma japonicum*, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura*) in the collected stool samples were counted by Kato-Katz thick smear technique; long-term dietary intake was assessed with a semiquantitative food frequency questionnaire. Based on the Chinese references established by Chinese National Survey on Students Constitution and Health in 2000, growth status of individual child was classified into adequate (Z score ≥ 0), moderately inadequate ($-1 \leq Z$ score < 0) and severely inadequate (Z score < -1) status. Change in the WAZ (weight-for-age Z score) between 2001 and 2005 was used to judge whether each participant maintained or changed growth status within a 4-year period. The results demonstrated that compared with the Chinese references the target schoolchildren as a whole were growth retardation. After the 4-year follow-up, about one third of the participants experienced change in growth statuses with significant differences of change in the Z scores among different growth patterns. Multiple stepwise regression analysis indicated that energy and protein intakes and improvement of schistosomiasis were positively related with change in the Z scores; infection of *T. trichiura* and school dormitory residence were inversely related with change in the Z scores. In conclusion, this longitudinal study revealed *intra*-population variation of adolescent growth pattern with marked differences of change in the Z scores within only 4-year duration and the differences were related with the environmental factors examined.

Key Words longitudinal study, growth retardation, impact factors, rural Chinese schoolchildren

Introduction:

Any environmental stress, such as helminth infection and malnutrition, may reduce the maximal potential of bone, muscle, and fat tissue responses to hormonal action determining adolescent growth, with considerable *intra*-population variations.⁽¹⁾ To date, there have been a paucity of longitudinal data addressing how environmental factors affect *intra*-population differences in adolescent growth pattern.

Our previous research has revealed the simultaneous impacts of inadequate intakes of protein and energy and chronic schistosomiasis infection on retarded growth of preadolescents in the rural Dongting Lake region.^(2,3) However, it has not been known whether such growth deficits subsequently affect adolescent growth.

Based on a 4-year longitudinal study in rural Chinese schoolchildren, the objectives of this paper were 1) to assess adolescent growth patterns, 2) to clarify impacts of dietary intakes, parasitic infections and other ecological or environmental factors on adolescent growth patterns.

Subjects and Methods:

The participants were 445 students (227 boys and 218 girls) of grades 5 and 6 in 5 primary schools in the Dongting Lake region, who were 10–12 years old at the baseline survey in 2001. Among them, 274 children (138 boys and 136 girls) had participated in all anthropometric measurements (6 times), parasitological examinations (4 times) and dietary surveys (3 times) during 2001–2005. By the end of survey period, all of them became middle school students. Some of them stayed at the school dormitories in weekdays due to long distance from their villages. For all participants, anthropometric measurements were conducted height, weight, mid-upper arm circumference, and skinfold thickness at triceps, biceps, and subscapular, following the standard methods;⁽⁴⁾ parasitological examinations were detected eggs of *Schistosoma japonicum*, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* in the collected stool samples by Kato-Katz thick smear technique;⁽⁵⁾ long-term dietary intake was assessed with a semiquantitative food frequency questionnaire developed by our previous study.⁽³⁾

In the data analyses, Z scores of height-for-age (HAZ), weight-for-age (WAZ) and BMI-for-age (BMIZ) were calculated based on the Chinese references established by Chinese National Survey on Students Constitution and Health in 2000.⁽⁶⁾ Growth status of individual child was classified into adequate (Z score ≥ 0), moderately inadequate ($-1 \leq Z$ score < 0) and severely inadequate (Z score < -1) status. Change in the Z scores between the baseline and the last survey was used to judge whether each participant maintained or changed growth status, and then all children were divided into the 5 groups each representing different growth patterns, so called 5 growth-pattern groups: i) Trac-Ade group, adequate at the both surveys, i.e. tracking adequate status, ii) Trac-Mod group, moderately inadequate at the both surveys, i.e. tracking moderate status, iii) Trac-Sev group, severely inadequate at the both surveys; i.e. tracking severe status, iv) Move up group, changed to a better status; v) Move down group, changed to a worse status.

Results:

1) Baseline characteristics

The target children's characteristics at the baseline survey by sex and age are presented in Table 1. Mean energy intake/RDA was 82.4% for boys and 78.3% for girls, being considerably lower than the Chinese RDA. There were significantly lower energy/RDA and %protein in girls than in boys when all ages were pooled ($P < 0.05$). Regarding parasitic infections, 5.1% of boys and 11.0% of girls were infected with *S. japonicum*, and rate was significantly higher in 12 years than in other ages for either sex ($P < 0.05$ for any). The prevalence rate of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* was, respectively, 34.8% for boys and 27.8% for girls, and 14.5% for boys and 18.4% for girls, without significant sex differences.

2) Change in growth status

For the target children as a whole, on the basis of the Chinese references the mean HAZ, WAZ and BMIZ was -0.69 , -0.55 and -0.33 , respectively; and all mean Z scores of the target children by age had negative values, reflecting the fact that the participants were retarded in height, weight and BMI, compared to the Chinese references.

Table 1 Baseline characteristics of the target children by sex and age

Age (years)	N	Anthropometry						Dietary intake						Parasitic infections					
		Height (cm)		Weight (kg)		BMI (kg/m ²)		Energy/RDA (%)		% protein (%)		%fat (%)		<i>Schistosoma japonicum</i>		<i>Ascaris lumbricoides</i>		<i>Trichuris trichiura</i>	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean*	SD	Mean*	SD	Mean	SD	n ^a	%	n ^a	%	n ^a	%
Boys																			
10	38	132.3	5.9	27.9	3.9	15.9	1.4	82.1	19.3	12.0	2.2	11.4	3.3	1	2.6	12	31.6	3	7.9
11	71	136.6	6.2	30.1	3.7	16.1	1.4	81.7	16.6	11.8	2.4	10.6	3.5	2	2.8	29	40.8	14	19.7
12	29	142.2	5.2	32.9	3.5	16.3	1.3	84.6	15.8	12.3	2.1	9.8	2.5	4	13.8	7	24.1	3	10.3
All	138	136.6	6.2	30.1	4.1	16.1	1.4	82.4	17.2	12.0	2.3	10.6	3.3	7	5.1	48	34.8	20	14.5
Girls																			
10	25	132.4	8.5	27.1	5.3	15.3	1.6	76.4	16.8	11.3	2.1	9.6	3.2	3	12.0	9	36.0	6	24.0
11	65	138.5	6.0	30.7	4.3	15.9	1.5	78.5	15.8	11.6	1.9	10.4	3.2	3	4.6	12	18.5	8	12.3
12	46	142.9	5.2	33.4	4.0	16.3	1.4	78.9	17.9	11.2	2.1	9.5	3.7	9	19.6	19	41.3	11	23.9
All	136	138.9	7.2	30.9	4.9	15.9	1.6	78.3	16.6	11.4	2.1	10.0	3.4	15	11.0	40	27.8	25	18.4

^aNumber of the participants infected with either parasite.

*Significant difference between boys and girls in all ages pooled ($P < 0.05$).

Since change in the Z scores between HAZ and WAZ, between WAZ and BMIZ were significantly correlated ($P < 0.01$ for both), for comparisons of the 5 growth-pattern groups, only WAZ-based groups were analyzed as representing other indicators.

On the basis of the changes in WAZ from the baseline to the last survey, about one third of the participants experienced change in growth status. Among them, 20.3% of boys and 23.5% of girls changed to a better status; 15.2% of boys and 18.4% of girls changed to a worse status with significant change in Z scores. 64.5% of boys and 58.1% of girls kept tracking either one of the 3 statuses. In addition, differences of change in the Z scores among the 5 growth-pattern groups were significant, on which Move up and Trac-Ade groups showed the largest and second largest ΔZ scores, while Move down group showed the smallest.

3) Dietary intakes and parasite infections

Since Pearson's correlation coefficients between any pair of the 3 dietary data for each of the 3 dietary indicators, i.e. energy/RDA (energy intake relative to Chinese recommended dietary allowance), %protein and %fat (contributions of protein or fat to energy), were significant ($P < 0.01$), the 3 dietary data were averaged for analyses. For any dietary intake indicator for either sex, the 5 growth-pattern groups were ranked as Trac-Ade, Move up, Trac-Mod, Move down and Trac-Seve in the decreasing order.

The overall prevalence rate of the 3 parasites decreased at the follow-up. For schistosomiasis, 71% of infected children were infected at the baseline; there was no schistosomiasis infected person in Move up group for either sex at the follow-up although 17.9% (5/28) in boys and 34.4% (11/32) in girls were infected at the baseline. All of children reinfected with *A. lumbricoides* and *T. trichiura* were in Move down and Trac-Sev groups.

All change in the Z scores of dormitory students were negative values and were significantly lower than those of non-dormitory children ($P < 0.001$ for all).

4) Determinants of change in the Z scores over time

Multiple stepwise regression analyses demonstrated that energy and protein intakes, improvement of schistosomiasis were positively related with changes in Z scores, while dormitory residence and *T. trichiura* infection inversely affected changes in Z scores over time.

Table 2 Impact factors on change in the Z scores over time

Dependent factors	Significant independent variables	Beta	P	Adjusted R ²
ΔHAZ	Dormitory residence ^a	-0.21	< 0.001	0.36
	Energy/RDA	0.11	0.041	
ΔWAZ	Dormitory residence	-0.25	< 0.001	0.47
	Energy/RDA	0.21	< 0.001	
	Sex (boy = 0, girl = 1)	0.13	0.006	
	%protein	0.11	0.041	
	<i>T. trichiura</i> ^b	-0.10	0.045	
	<i>S. japonicum</i> ^c	0.09	0.047	
ΔBMIZ	Sex	0.23	< 0.001	0.42
	Dormitory residence	-0.17	< 0.001	
	Energy/RDA	0.13	0.011	
	<i>T. trichiura</i>	-0.08	0.049	

^aVariable of dormitory residence was categorized into "no = 0" and "yes = 1".

^bEach variable of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* was categorized into 4: "0", uninfected, "1", infected one time, "2", infected 2 times, "3", infected 3 times.

^cVariable of *S. japonicum* was categorized into "uninfected = 0" and "infected = 1".

Discussion:

This study offered a new insight into dynamics of growth pattern from preadolescence to adolescence in a rural population of developing country. By examining change in growth status for the rural Chinese schoolchildren, the results demonstrated marked intra-population variation of growth pattern during adolescence.

Compared with Chinese references, the target children as a whole were retarded in growth, represented by lower HAZ, WAZ and BMIZ by age. It is interesting that about one third of the participants experienced changes in the 3 growth status with significant change in Z scores within only 4-year duration.

Regarding nutritional factors which may influence growth patterns, this study suggested that adequacy of energy intake played primary roles in determining change in the Z scores, while no effect of %fat and less effect of %protein might be attributed to small variation in the intake of animal foods.⁽³⁾

As for the effects of parasite infection, prevention and treatment effects of schistosomiasis were revealed in this longitudinal study, represented by decrease in prevalence rate and improvement in growth status. The similar treatment effect of *S. japonicum* on growth has been proved not only in the author's previous study⁽²⁾ but also in a study for Filipino children.⁽⁷⁾ The effects of repeated infection of *T. trichiura* on growth were considered to be decreased food intake and/or increased nutrient losses, both of should increase risk of chronic nutrition deprivation.⁽⁸⁾ This consideration accorded with the fact that all the target children that were reinfected with *T. trichiura* belonged to Trac-Sev or Move down groups.

School dormitory living associated with poor diet, unsatisfactory sanitation, unsafe water supply, and the students ignoring health behavior, might result in malnutrition and helminth infection, and consequently, degraded growth.

In conclusion, the target schoolchildren as a whole were retarded in growth, compared with the Chinese references. Intra-population variation in adolescent growth pattern with marked differences of change in Z scores were revealed by longitudinal anthropometric measurements for the 4-year period. Such variations were primarily attributed to energy and protein intakes, improvement of schistosomiasis and *T. trichiura* infection, and school dormitory residence. As a health program in Chinese rural areas, improvement of living condition of school dormitory, adolescent health education including health behaviors and nutrition, and regular screening and treatment of parasites are suggested.

References:

1. McGarvey ST, Aligui G, Daniel BD, Peters P, Olveda R and Olds GR (1992) Child growth and schistosomiasis japonica in northeastern Leyte, the Philippines: cross-sectional results. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46: 571–581.
2. Zhou H, He YK and Ohtsuka R (2005a) Sex differences in the malnourished status of Chinese children due to schistosomiasis infections and inadequate dietary intake. *Environmental Sciences*, 12: 145–153.
3. Zhou H, Ohtsuka R, He YK, Yuan LP, Yamauchi T and Sleight AC (2005b) Impact of parasitic infections and dietary intake on child growth in the schistosomiasis-endemic Dongting Lake region, China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 534–539.
4. Weiner JS and Lourie JA (1981) *Practical Human Biology*. Academic Press, London.
5. Katz N, Chaves A and Pellegrino J (1972) A single device for quantitative thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto Medicina Tropica de Sao Paulo*, 14: 394–400.
6. Group of Students Constitution and Health (2002) *Report on the Physical Fitness and Health Surveillance of Chinese School Students*. Advanced Education Press House, Beijing. (in Chinese)
7. McGarvey ST, Aligui G, Graham KK, Peters P, Olds GR and Olveda R (1996) Schistosomiasis japonica and childhood nutritional status in northeastern Leyte, the Philippines: a randomized trial of praziquantel versus placebo. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 498–502.
8. Stephenson LS, Holland CV and Cooper ES (2000) The public health significance of *Trichuris trichiura*. *Parasitology*, 121: S73–S95.

作成日：2006年2月20日



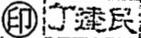
財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

平成18年 3月 10日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 丁 建民 

指導責任者名： 小松 弘和 職名： 助手

所属機関名： 名古屋市立大学臨床分子内科
〒467-8601

所在地： 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1

電話： (052)851-5511 内線： 8216

1. 助成金額： 500,000 円

2. 研究テーマ

家族血小板増多症の発症原因である血小板増加因子ター c-Mpl 遺伝子変異の自律性活化機序の解明

3. 成果の概要 (100字程度)

家族性血小板増多症の原因遺伝子変異として同定したc-mpl遺伝子の膜貫通領域のAsn505の機能を解析した。その結果、変異基であるアスパラギンの持つ強い極性により誘導される水素結合により、リガンドなしでも二量体形成を獲得することで、血小板増多の細胞内シグナルが活性化されることを証明し得た。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

第67回日本血液学会 WS-17-2 「Asn505変異を有するc-mplはTPO非依存性にホモダイマーを形成する」 2005年9月17日～19日

(2) 発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・題名)

Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. Blood. 2004 Jun 1;103(11):4198-200.

家族血小板増多症の発症原因である血小板増加因子レセプター c-mpl 遺伝子変異の自律性活性化機序の解明

研究者氏名 丁 建民
日本研究機関 名古屋市立大学医学研究科
臨床分子内科学
指導責任者 助手 小松 弘和

要旨

我が国でも数家系しか報告のない貴重な家族性血小板血症を見出し、その病因を分子生物学的に明らかにすべく、血小板産生に関わる既知の分子の変異の有無をスクリーニングした結果、血小板増多因子トロンボポエチン (TPO) のレセプターである c-mpl 遺伝子内膜貫通ドメインにアミノ酸置換を伴う Ser505Asn 変異を見出した。本活性化変異候補 Asn505 が機能的に直接に FET 患者の血小板増多を惹起しているかどうかを明らかにするために、本変異アレルを含む c-mpl cDNA を BAF/3 細胞へ発現導入し、本来もつ BAF/3 細胞のサイトカイン (IL3) 依存性増殖が非依存性となること、細胞内シグナルである ERK1/2 と STAT5 がサイトカイン (IL3) 非依存性に磷酸化されていることを見出し、本変異 Asn505 は細胞内シグナル活性化をひきおこし細胞の自律性増殖を惹起していることを示し、本 FET 発症の責任遺伝子異常である事を証明した。

次に Asn505 変異の機能解明として、c-mpl レセプターの自律性の多量体 (二量体) 形成能の実験を進め、cross linking 法を用いて検討した結果、変異体では ligand 非存在下でも多量体 (二量体) 形成し、細胞増殖、そして細胞内シグナル活性化を誘導していることを明らかにした。また、変異部位を様々な塩基に置換した変異体を作成し、二量体形成能、細胞内シグナル活性化について検討したところ、Asn を含めて極性の強いアミノ酸残基を有する変異体において二量体形成とシグナル活性化が確認できた。以上より、Asn505 は、アミノ酸残基として有するその強い極性に伴う水素結合力により二量体を形成し、細胞内シグナルを活性化し、巨核球増生、そして血小板増多症を成立させていることを示すことができた。

Key Words: Essential thrombocythemia, c-mpl, mutation, homodimerization, polarity

緒言

本態性血小板血症 (Essential thrombocythemia; ET) は一般に孤発例を指し、家族内発症例は家族性血小板血症 (Familial ET, FET) として呼ばれている。FET は世界的にみても極めてまれな疾患であるが、臨床所見、合併症を含めた予後は ET と共通している点が多く、その原因遺伝子を始めとする分子生物学的解明は ET の解明に大きく寄与する可能性が高い。本研究では、当大学病院で発見した FET の病因である c-mpl 遺伝子の Asn505 変異に関してその機能について分子生物学的に解明し、ET、さらには骨髓増殖症候群の解明に寄与することを目的とする。

対象と方法

説明と同意のもと、当大学病院で経験した FET 患者の末梢血リンパ球を用いて遺伝子 DNA 変異解析を行った。見出した遺伝子変異の機能解析として変異体発現 BAF/3 細胞を作製し、細胞増殖への影響を MTT アッセイにて解析、さらに細胞内シグナル活性化の有無を ERK1/2 と STAT5 分子のリン酸化誘導能をウエスタン法によって評価した。また、その二量体形成能をクロスリンキング法により評価した。さらに、変異部位を様々な塩基に置換し、二量体形成、細胞増殖能、シグナル活性化の評価を行った。

結果及び考察

血小板産生に関わる分子の変異解析の結果、血小板産生因子トロンボポエチンの受容体であるc-mpl遺伝子の膜貫通領域に血小板増多患者8例全例に特異的な変異(Ser⁵⁰⁵→Asn⁵⁰⁵)を見出した。本変異Asn⁵⁰⁵では強制発現させることでBAF/3細胞株が、サイトカイン(IL3)非依存性に増殖できることを確認できた。さらに、c-mplの細胞内シグナル経路が自律性に活性化しているかどうかを明らかにするためその主要経路であるERK1/2とSTAT5の磷酸化を調べたところ、ERK1/2とSTAT5ともにサイトカイン(IL3)非依存性に磷酸化されていることを見出した。同時に、患者血小板自体も血小板増多因子(トロンボポエチン)の刺激なしでERK1/2、STAT5はリン酸化されていることを確認した。これらの結果より、本c-mpl変異Asn⁵⁰⁵は細胞内シグナル活性化と細胞の自律性増殖を惹起し、本FET発症の責任遺伝子異常である事を初めて証明した。

また、c-mpl変異(Asn505)の細胞増殖シグナルの活性化機構として、サイトカイン(IL3)非依存性にc-mpl分子の二量体が形成され、細胞内シグナルが活性化されることが示された。さらに、この二量体形成は細胞外ドメインの欠失体においても誘導され、細胞外ドメインのジスルフィド結合の関与を否定し得た(Figure 1)。

次に、Asn505の変異部位に様々な塩基置換体を作成し、二量体形成能、細胞内シグナル活性、細胞増殖能を調べた。その結果、Asnの他、Asp, Gln, Glu等の強い極性を持つアミノ酸置換体のみに二量体形成、細胞内シグナル活性、細胞生存能の亢進が確認できた。極性の強いアミノ酸残基は強い水素結合能を有しており、その水素結合能により変異部位間に結合力がもたらされc-mpl分子の二量体が形成されることで細胞内シグナルの活性化、そして細胞増殖へとつながり、本FETの発症につながる機構が明らかにされた(Figure 2)。

このようにFET発症ヒトモデルの構築とその分子生物学的機構が解明できたことで、細胞増殖因子に関わる受容体の病的変異がもたらす機能的特徴の解明、さらには、ET含めた骨髄増殖症候群の分子解明に寄与したものと考えられる。

Fig. 1

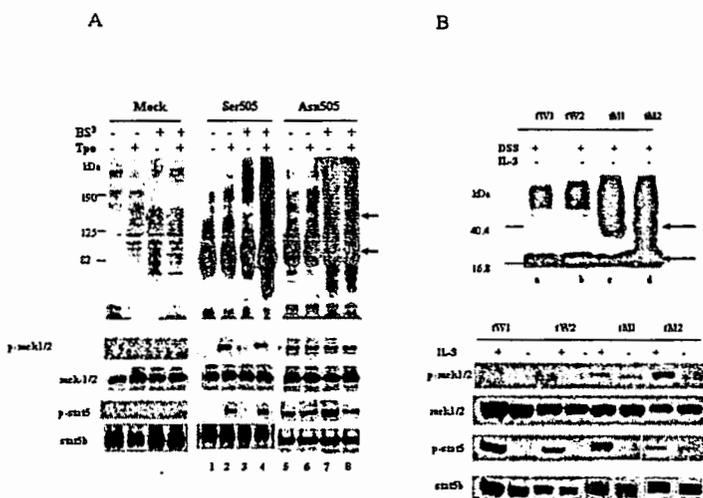


Figure 1. Asn505 drives autohomodimerization and activates the downstream signals. (A) Upper: dimmer detection of SDS-PAGE with crosslinking and immunoblotting. IL-3 starved transfectant Ba/F3 cells were separated into 2 aliquots, stimulated with or without 100ng/ml hTpo (Diacclone Research, France) for 2 hours at 4 °C. Cells were washed with ice-cold PBS containing 100uM Na₃VO₄, sub-separated into 2 aliquots, incubated with or without 50mM cross-linker BS³/PBS (Pierce, IL) for

another 2 hours at 4°C. Reactions were quenched by 1M Tris.HCL. Cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 25 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate), supplemented with the proteinase inhibitors cocktail (complete mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), insoluble substance was removed by centrifuge 14000g for 10 minutes, lysates were kept at -80 °C. Arrows indicate c-Mpl monomer (~82kDa) and dimer (~164kDa) respectively. Lower: signal phosphorylation of mek1/2 and stat5. (B) Truncate c-Mpl protein (tSer505 and tAsn505) deleted the extracellular domain. Upper: Auto-homodimer induced by tAsn505. lysate making was same as A except omitted the Tpo stimulation. Arrows show the monomer (20kDa) and dimer (40kDa). Lower: auto-phosphorylation of mek1/2 and stat5. 10% WEHI as a source of IL-3, stimulated the factor-starved transfectants for 90 min as a positive control.

Fig. 2

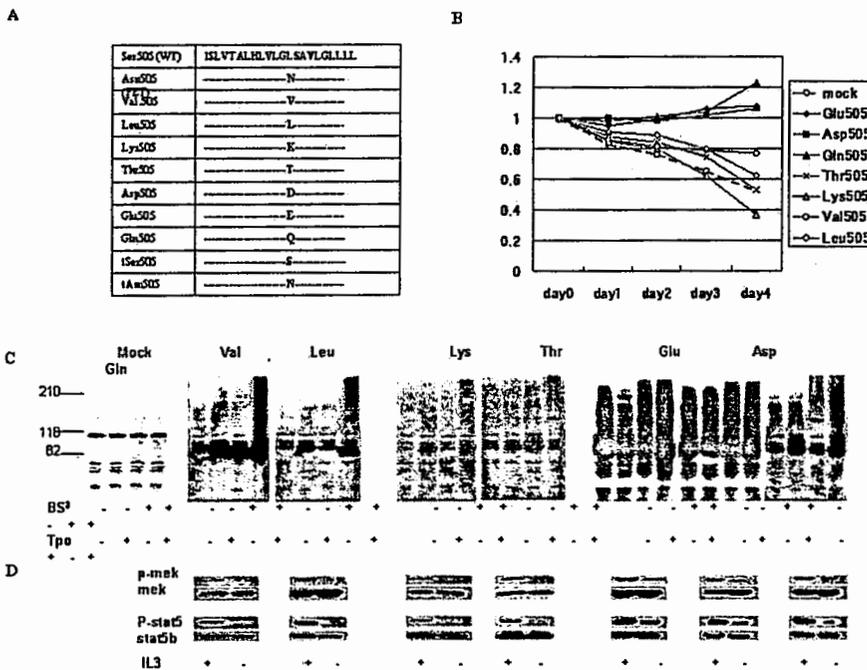


Figure 2. Results of 505 mutants of c-Mpl TM domain. (A) Peptide sequences in c-mpl TM domain. The solid letters show the residues in position 505 of c-Mpl. (B) Survival trait (MTT) assay of the 505 mutants. PBS(-) washed c-mpl505 Ba/F3 cells were resuspended in RPMI medium containing 10% FBS, 5×10^4 cells in 100ul medium were located in 96 well plate, Thiazolyl Blue tetrazolium Bromide (Sigma, MO) assays were used to evaluate relative viable cell value everyday (same experiment repeated at least 3 times). (C) Dimmerization trait of non-polar residues (Val, Leu), 1-polar residues (Thr, Lys) and 2-polar residues (Glu, Asp, and Gln). Lysates making were as Figure 1A. Arrows showed the monomer (~82kDa) or dimer (~164kDa) of the c-Mpl. (D) The phosphorylation of mek1/2 and stat5 of 505 mutants in c-mpl. IL-3 (+) as positive control.

参考文献

1. Heldin C. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995;80:213-223.
2. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103:4198-42007.
3. Smith SO, Smith CS, Bormann BJ. Strong hydrogen bonding interactions involving a buried glutamic acid in the transmembrane sequence of the neu/erbB-2 receptor. *Nat Struct Biol*. 1996;3:252-258.
4. Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J*. 1996;15:520-527.
5. Forbes LV, Gale RE, Pizzey A, Pouwels K, Nathwani A, Linch DC. An activating mutation in the transmembrane domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2002;21:5981-5989.
6. Jenkins BJ, D'Andrea R, Gonda TJ. Activating point mutations in the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors suggest the involvement of beta subunit dimerization and cell type-specific molecules in signalling. *Embo J*. 1995;14:4276-4287.
7. Kuwashansky K and Drachman JG. The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene*. 2002;21:3359-3367.
8. Kitayama H, Kanakura Y, Juritsu t. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*. 1995;85:790-798.
9. Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. Polar residues drive association of poly-leucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2250-2255.
10. Kubatzky KF, Ruan W, Gurezka R, et al. Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol*. 2001;11:110-115.
11. Zhou FX, Cocco MJ, Russ WP. Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Bio*. 2000;7:91-94.
12. Sabath DF, Kaushansky K, Broudy VC. Deletion of the extracellular membrane-distal cytokine receptor homology module of Mpl results in constitutive cell growth and loss of thrombopoietin binding. *Blood*. 1999;94:365-367.
13. D'Andrea RJ, Barry SC, moretti PA. Extracellular truncations of h beta c, the common signaling subunit for interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and IL-5, lead to ligand-independent activation.
14. Alexander WS, Metcalf D, Dunn AR. Point mutations within a dimer interface homology domain of c-Mpl induce constitutive receptor activity and tumorigenicity. *Embo J*. 1995;14:5569-5578.
15. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*. 1999;283:987-990.
16. Remy I, Wilson LA and Michnick SW. erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*. 1999;283:990-992
17. Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, Nam H, Henis YI, Lodish HF. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4379-4384.
18. Vos de AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: Crystal structure of the complex. *Science*. 1992;255:306-312
19. Choma C, Gratkowski H, Lear JD, DeGrado WF. Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol*. 2000;7:161-166.
20. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. A mutation data matrix for transmembrane proteins. *FEBS Lett*. 1994;339:269-275.
22. Partridge AW, Therien AG, Deber CM. Missense mutations in transmembrane domains of proteins: phenotypic propensity of polar residues for human disease. *Proteins*. 2004;54:648-65

注：本研究は、2005年9月18日日本血液学会口演発表
作成日：2006年2月28日

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金 在留中国人研究者一 報告書

財団法人 日中医学協会 御中

提出日 2005.3.14

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 宋 京海



指導責任者名： 伊藤 壽記 職名： 教授

所属機関名： 大阪大学大学院医学系研究科第一外科E1
〒 565-0871

所在地： 大阪府吹田市山田丘2-2

電話： 06-6879-3153 内線： 3153

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ Effect of FTY720 on donor and recipient T cells in the tolerant rats to GVHD after small bowel transplantation

3. 成果の概要 (100字程度)

FTY720 altered lymphocytes recirculation and prevented donor-derived T cell into the target organs, resulting in prolong the recipient survival in the acute GVHD of small bowel transplantation(SBTx). And also, FTY720 induced lengthy tolerance of GVHD in SBTx. The possibility is continually through mediating the donor and recipient T cell subpopulation and associated with down-regulated Th1 and Th2 immune response.

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

第106回日本外科学会定期学術集会 東京 2006・3・29-31

PS-024-5 A lengthy effect of FTY720 during graft-versus-host disease in the small bowel transplantation.

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

—日中医学協会助成事業—

小腸移植におけるGVHDの寛容期に対するFTY720の効果

研究者 氏名 宋 京海
中国所属機関 中国 衛生部北京病院普通外科
日本研究機関 大阪大学医学系研究科第一外科
指導責任者 教授 伊藤壽記
共同研究者名 松田宙 西田俊朗 松田暉

ABSTRACT

In the small bowel transplantation (SBTx), graft-versus-host disease (GVHD) of mediated by donor-derived T cells recognizing host major histocompatibility complex (MHC) alloantigen is an important immunological event influencing the life in the experimental and clinical situation. Donor T cells are crucial for target organ injury in GVHD. Our previous study determined that FTY720 altered lymphocytes recirculation and prevented donor-derived T cell into the target organs, resulting in prolong the recipient survival in the acute GVHD of small bowel transplantation. In this study we further report a long-term effect of FTY720 on the tolerant recipient of GVHD following SBTx. Heterotopic total SBTx was performed from Wistar-Furth (WF) rat to (WF x ACI) F1 rats. Recipients was administered by a low dose FTY720 (0.5 mg/kg/day) for 14 days after SBTx. The subset and subpopulation of donor and recipient derived T cells and the expression of cytokine production were evaluated. On POD150 the donor-derived CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulation were retained in the low level and almost were similar to the level of POD14 in the target tissues of host. However, the recipient derived T cells were increased from the acute phase to long-term phase of GVHD in peripheral blood. In contrast, the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulation in mesenteric lymph nodes and Peyer's patch were recovered in a low level on POD150. The production of Th1 cytokine (IFN- γ , IL-2) and Th2 cytokine (IL-4, IL-10) were significantly lower level in the chronic phase of GVHD in target tissues by FTY720 treatment. FTY720 induced lengthy tolerance of GVHD of SBTx. That possibility is continually through mediating the donor and recipient T cell subpopulation and associated with down-regulated Th1 and Th2 immune response.

Key word: Small bowel transplantation, GVHD, FTY720, donor-derived T cells, IFN- γ .

Introduction The donor-specific tolerance induction has the potential to render the host susceptible to GVHD because of an unopposed reaction of the graft against the host [1]. Previous studies have determined donor T cells are crucial for the development of GVHD [2]. It is seem to very important to understand lymphocytes trafficking in the target organ for the immune responds of recipients. The unique mechanism of FTY720 associated with altered lymphocytes recirculation has been determined [3, 4,]. During GVHD of SBTx, FTY720 caused a significantly prevention in the subpopulation of donor-derived CD4⁺ and CD8⁺ T cell into the target organs and prolong the survival of recipients. However, the long-term influence and results had not been investigated. To address this question, we examined the migration of donor and recipient T cells, the pathological changes and cytokine production of GVHD on the mesenteric lymph nodes (MLN), Peyer's patch (PP) and lamina propria (LP) of host intestinal in the different phase, using the parent-into-F1 model of GVHD in SBTx. The patterns of migration of both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell were recorded and evaluated in relation to acute and tolerance phase of GVHD.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

Heterotopic SBT in rat was performed by interposing the graft using the cuff technique, as previously described [5]. Male

Wistar–Furth (WF) rats were used donors, and male F₁ (WF x ACI) hybrid rats were used recipients. The protocol comprised three groups: (1) the syngeneic group (group 1, n=6); (2) untreated GVHD control group (group 2, n=8); (3) F1 recipient rats were treated orally with 0.5mg/kg FTY720 by way of gastric tube daily from days 0 to 13 after SBTx (group 3, n=8). FTY was donated by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) as dry powder.

Lymphocytes Isolation and Flow Cytometry

Lymphocytes were isolated from MLN, PP, and LP of host and PB. PB was spun on density separation medium (Ficoll–Paque Plus, Uppsala, Sweden). PP and LP lymphocytes were prepared by an enzymatic dissociation method, using collagenase as described [6]. FITC–conjugated anti–rat RT1A^{ab} (C3) were purchased from Pharmingen (San Diego, CA), PE–conjugated anti–rat CD4 (W3/25), CD8 (OX-8), were obtained from Serotec (Oxford, UK). The stained cells were analyzed using FACScan and Cell quest software (Becton Dickinson, CA).

Cytokine Production in Culture Supernatants

MLN, PP and LP lymphocytes were culture for 48 hr in 24well plates that had been coated with carbonate buffer (pH 9.6) containing 10 μg/ml mouse anti–rat CD3 mAb (clone 1F4; Serocet, Oxford, UK). Supernatants from culture plates were assayed for interleukin (IL)–2, IL–4, IL–10 and interferon (IFN)–γ by solid phase sandwich enzyme–linked immunosorbent assays (ELISA) kit (Biosource International, Camarillo, CA).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SD; Group mean values were compared by two–tailed Student's t–test. A value of P < 0.05 was considered significant.

RESULTS

FTY 720 Reduces Target Organ Injuries Caused by GVHD

The recipients survival rate were significant prolonged over 150 days by FTY720–treatment in a low dose (0.5mg/kg) and progressive gained the body weight, in contrast, the GVHD control recipients resulted in weight loss and death. In POD14 and POD150, FTY 720 treated group inhabited histopathology changes in the small bowel, such as surface erosion, villous blunting, and cellular infiltration in the lamina propria the architecture remained intact.

Effect of FTY720 on Donor and Recipient Derived T Cells

On the tolerant recipients of GVHD (POD150 group), the donor–derived CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulation were retained in the low level in MLN, PP and PB of host. But in LP, the increase tendency was observed compare with POD14. Very interestingly in PB, the percentage of recipient–derived CD4⁺ and CD8⁺ were significantly decreased in acute phase and steadily increased in the tolerant phase of GVHD compared with GVHD control group (Fig 1A). In contrast, in MLN and PP of recipient, the subpopulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell was from a steady increase to decrease in this two phase of GVHD. (Fig 1 C, D). However, in LP of host, the subpopulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell of were reduced gradually from acute phase to the tolerant phase in the FTY–treatment group. (Fig1B).

Effect of FTY720 on Cytokine Production in Target Tissue

Further analyzed cytokine level on POD150 (Figure 2), we found the production of cytokine were generality reduced in MLN, PP and LP of recipient, and almost the same as the level of naive rats. The IFN–γ level in all site (P<0.01) and the IL–2 level in PP and LP (P<0.05) were obviously lower than untreated GVHD recipient. Th2–type cytokine analysis show the IL–4 level in PP (P<0.05), MLN (P<0.01) and IL–10 level in PP and MLN (P<0.01).

DISCUSSION

Small bowel transplantation had limited success presumably because the immunogenicity of graft elicits such a vigorous response that a more intense regimen of immunosuppression is required. Our previously experiment has shown FTY720 in

a low dose (0.5 mg/kg) treatment for 14 days inhibited the acute GVHD immune response and prolonged the survival of recipients over 100 days. In the tolerant recipient, the lasting effect also is shown in POD150, the donor-derived CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulation were retained in the low level in MLN, PP and PB of host. However, the changes of recipient-derived T cells were differently. In the tolerant recipients, the percentage of recipient-derived CD4⁺ and CD8⁺ were increased in PB compared with the acute phase. In contrast, in MLN and PP of recipient, the subpopulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell was from a steady increase to decrease compared with untreated group. Our results suggest that the effect of homing donor-derived T lymphocytes into the secondary lymph tissues were possible ongoing by FTY720 treatment, but failed on the recipient-derived T cells in the long-term phase. Further investigation found that the Th1 cytokine (IFN- γ , IL-2) and Th2-type cytokine (IL-4, IL-10) production level were obviously lower in MLN, PP and LP of recipient than untreated GVHD recipient, and different with the acute phase that only inhibited the Th1 cytokine production. Thus, FTY720 induced lengthy tolerance of GVHD in rat SBTx model, by steadily redistributed the donor and recipient CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulation and progressively inhibited Th1 and Th2 immune response. These results may possibly offer some help for evaluate the GVHD of solid organ transplantation.

REFERENCES

1. Morrissey NJ, Blom D, Ryan CK, et al. Tolerance induction permits the development of graft-versus-host disease: donor-mediated attack following small bowel transplantation in mixed chimeras. *Transpl Immunol* 1999; 7:19-25
2. Kataoka Y, Iwasaki T, Kuroiwa T, Seto Y, Iwata N, Hashimoto N, et al. The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease. *Immunology* 2001;103(3):310-318
3. Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J Immunol* 1998;160(10):5037-5044
4. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, et al. The Immune Modulator FTY720 Targets Sphingosine 1-Phosphate Receptors. *J Biol Chem* 2002; 227:21453-21457
5. Kobayashi E, Kamada N, Enosawa S, Toyama N, Delriviere L, Goto S, et al. Comparison of potentiality to induce graft-vs.-host reaction with small bowel, pancreas/spleen, and liver transplantation in the rat. *Clin Exp Immunol* 1993;92(2):527-531
6. Davies MD, Parrott DM. Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut* 1981;22(6):481-4

注：本研究は、2006年3月29日 第106回日本外科学会定期学術集会にてポスタ発表。

作成日：2006年3月10日

Figure 1

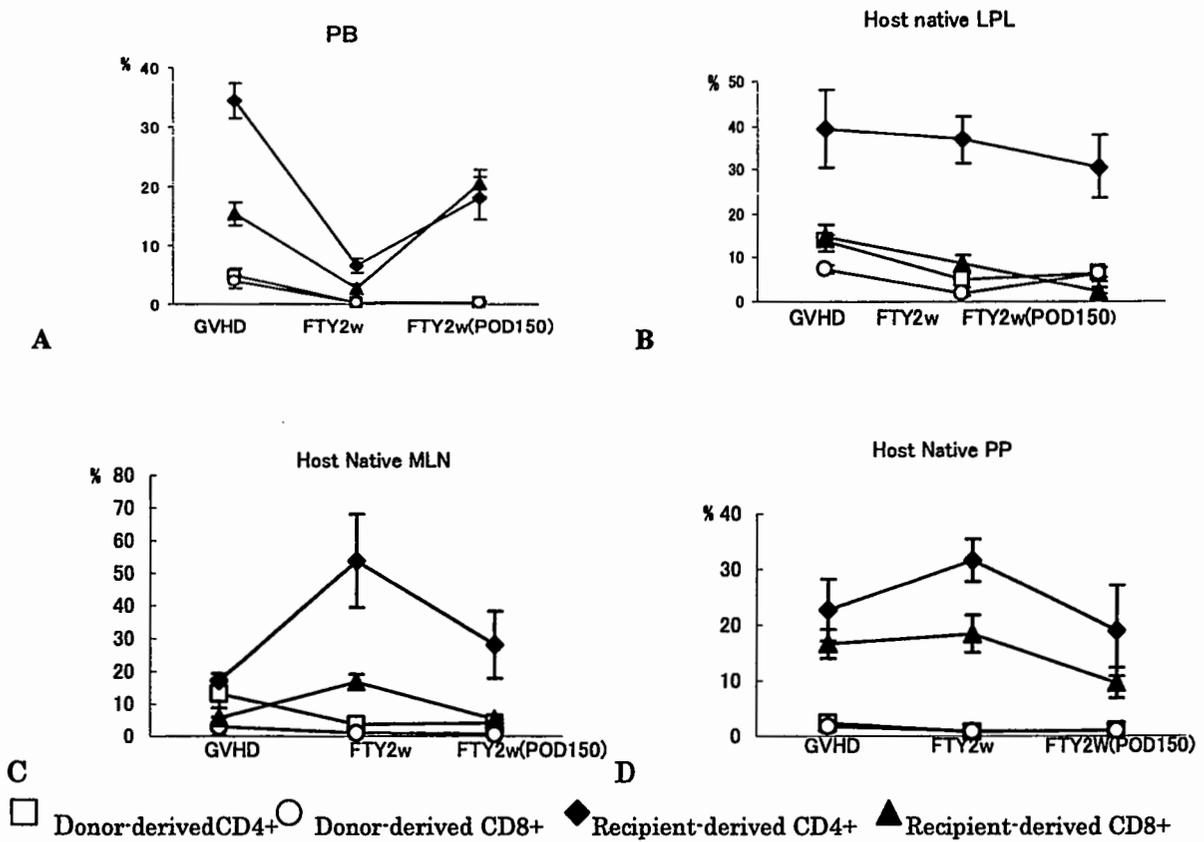
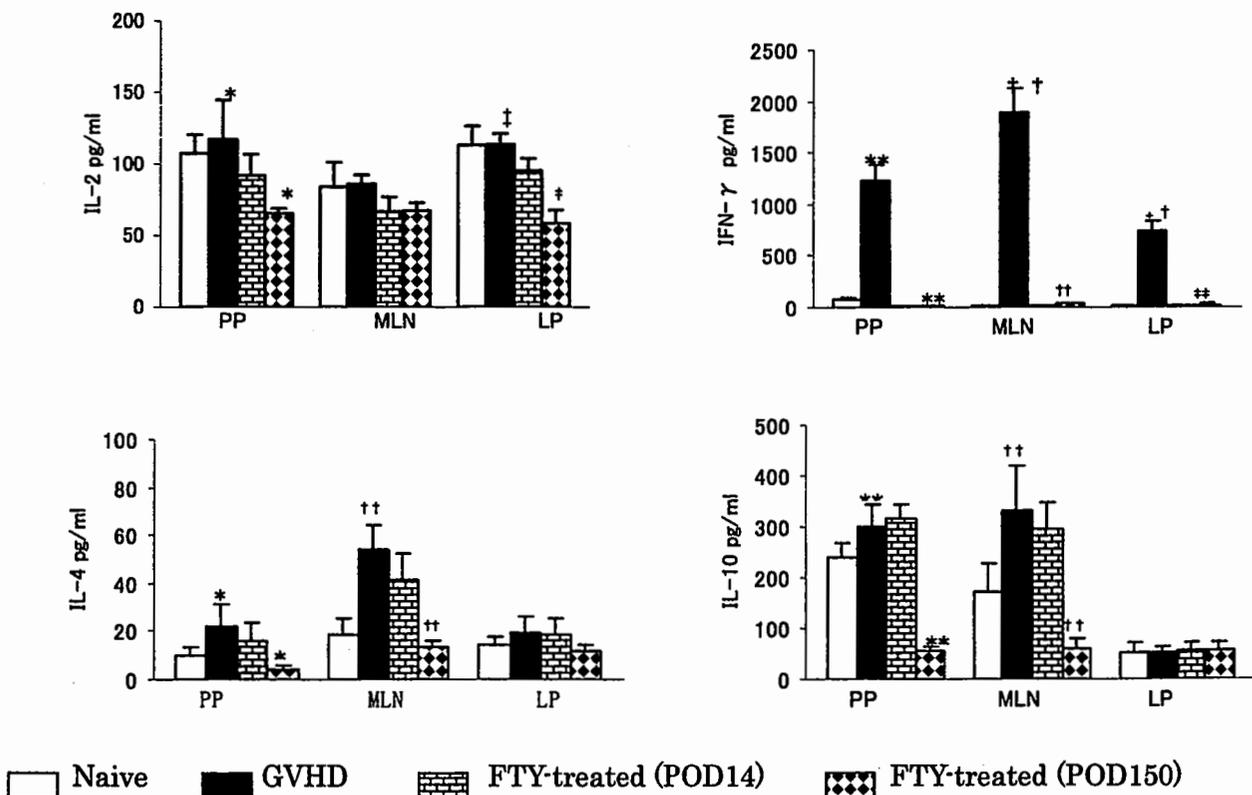


Figure 2



財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2006年 3月 13日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 胡 秀英



指導責任者名： 石垣 和子 職名： 教授

所属機関名： 千葉大学大学院看護学研究科
〒 260-8672

所在地： 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

電話： 043-226-2445(直通) 内線： _____

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

中国帰国者の高齢期の健康維持増進を目指すヘルスケアシステムの構築に関する基礎研究

3. 成果の概要 (100字程度)

研究Ⅰでは、帰国十年以上の中国帰国者1世（孤児及び配偶者）を対象者として、それらの心身的健康問題とその関連要因を明らかにした。

研究Ⅱでは、対象者の心身的健康問題に対して、文化背景を考慮した介入プログラムを作成し、Randomized Controlled Trialのデザインで検証した。その結果、対照群より介入群で大きな効果が観察され、文化を考慮した介入プログラムは帰国者の心身的健康を向上させる有効な方法であることが示唆され。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

① 「第64回日本公衆衛生学会」にてポスター発表(2005年9月16日)；演題：中国帰国者高齢期の健康維持・増進を目指す看護援助に関する研究Ⅰ—健康実態調査から—

② 「The 9th East Asian Forum of Nursing Scholars (Bangkok,Thailand)」にて口演発表する予定 (2006年3月30日)；演題：The effects of a cultural health promotion program for Japanese returnees from China: A randomized controlled trial

(2) 発表した論文 無 ・ (雑誌名・題名)

① 「日本公衆衛生雑誌」に投稿中(2006年3月)；題名：異文化適応における中国帰国者1世の心身的健康状態とその関連要因—帰国十年以上の中国残留孤児とその配偶者を対象者として—

中国帰国者の向老期・高齢期の健康維持増進を目指すヘルスケアシステムの構築

に関する基礎研究：研究 I—帰国者の心身的健康問題とその関連要因

研究者氏名	胡 秀英
中国所属機関	四川大学医学部看護学科
日本研究機関	千葉大学大学院看護学研究科
指導責任者	教授 石垣 和子
共同研究者名	助教授 山本則子

要旨

「目的」帰国十年以上の中国帰国者 1 世（孤児及び配偶者）を対象者として、それらの心身的健康問題とその関連要因を明らかにすることを目的とした。「方法」99 人の対象者に質問紙調査を行った。質問項目は主に精神的健康（GHQ12）、主観的健康評価、老研式活動能力、要介護複合的リスク、人口学的特徴、日本語のコミュニケーション能力、ウェルネス行動、日本の医療保健福祉サービスへの認知・アクセス等を設定した。また、身体機能の定量的評価を加えた。分析には主に精神的健康を目的変数としてロジスティック回帰モデルを用いて進めた。「結果」対象者の心身的健康状態については精神的健康が最も悪い。精神的問題が疑われる（GHQ12 ≥ 4 点）人は 72（72.7%）であった。ロジスティック回帰分析の結果、精神的健康の低さ（GHQ12 ≥ 4 点）と関連が見られたのは、健康度自己評価（ $R0.001$ ）の低さ、健康に対する不安認知（ $R0.01$ ）、医療保健福祉情報を提供してくれる人がいない（ $R0.01$ ）、若い人に自分から話しかけることがない（ $P=0.03$ ）、言葉の障害（ $R0.01$ ）の 5 項目であった。「結論」異文化といえる日本社会に適応の努力を重ねつつある中国帰国者 1 世は、大きな精神的健康問題が存在し、その健康維持・増進においては、言語、生活モード、医療保健福祉サービスへのアクセス、社会的役割の形成などの文化的要素も含めた大きな課題が複合的に絡み合った状況にある様子が判明された。文化背景を考慮したヘルスケア（culturally sensitive care）を提供する切迫した必要性が考えられた。

Key words：中国帰国者 1 世、精神的健康（GHQ12）、健康度自己評価、言葉の障害、医療保健福祉サービス

I 緒 言

中国帰国者 1 世（中国残留孤児及びその配偶者）が異文化社会とも言える日本社会に定着適応の努力を重ねつつ、高齢期を目前にしている。

中国残留孤児とは第二次世界大戦の末期、中国東北部に居留していた日本人は混乱の中で親や兄弟と別れ別れになってしまい、中国人養父母に引き取られ、身元も知らないまま育った者を指す言葉である。また、生活の手段を得るため中国人の妻になるなどして中国にとどまった婦人等いわゆる中国残留婦人もいった。中国残留孤児と中国残留婦人を中国残留邦人と総称している。終戦後 38 年あまりを経過した 1984 年に日本政府はようやく残留邦人の帰国対策への取り組みを開始した。これらの中国残留邦人は日本に帰国したら、中国帰国者と呼ばれる¹⁾。帰国者総数は、平成 17 年現在、残留孤児本人 9,121 人、家族を含め 20,150 人を数えている²⁾。

中国帰国者 1 世は、40 年ぐらいに中国で中国人のように生活していた。彼らは日本人のルーツとアイデンティティを持っているけれども、日本語は話せず、日本の社会、文化なども全く知らない。帰国と言っても、実質的には家族と一緒に異文化に移住しているといえる。しかし、他の移住と異なり、強い日本人のアイデンティティを持っているものの、文化的面がもちろん、経済的にも一般の日本人と予想外の大きな格差が生じている。それに、予備知識も与えられることなく、移住してくるとい実態が積み重ねられ、一層適応困難な状況にある⁴⁾。

1980 年代の後半から 1990 年代の前半の間に、帰国初期・中間期の中国帰国者の日本社会への適応状況に関する先行研究によれば、中国残留孤児およびその配偶者を含め、帰国を契機にして有病率は増大し、自信を喪失し、強度に追い詰められた心理状態になり、なかなか日本社会に適応できない状態にある。また、帰国後からサポート源が増加しないこと、他者への自己開示がうまくなされておらず、関係の親密化が不十分であり、いわば「日本化」が遅々としていることを明らかとなった^{1, 3, 4, 5, 6)}。これらの先行研究は中国帰国者の移住期における精神保健面でのサポート体制が重要な課題であることが提言されたが、それが活かされた支援体制の確立のよう

な研究・報告などがその後に見当たらなかった。また、今日まで中国帰国者が抱える特異な社会的事情や異文化的な価値観を考慮した、適切な保健・医療・看護サービスを整えようとする議論はほとんどなされていなかったのが現状である。さらに、2005年度の「中国帰国者生活実態調査の結果」報告によれば、帰国者の平均年齢は、孤児61.5歳、婦人等は70.0歳、全体平均では66.2歳となり、高齢化が進んでいることが明らかとなった⁷⁾。帰国者の高齢期への適応や健康維持・増進は切迫した課題と言えよう。

現在、帰国10年以上を経て、高齢化が進んでいる帰国者1世は適応状況と心身健康状態がどのようになっているか、その高齢期における健康維持・増進への阻害要因は何か？帰国者はどんな健康意識や行動を持っているのか？保健医療福祉サービスや看護援助についてどのように求められているか？について検討した先行研究が見当たらない。このような帰国者1世の健康実態とヘルスケアのニーズを明らかにし、その改善策を考えることにより、実質的に中国帰国者の高齢期のQOLを高めることに繋がり、異文化における高齢者の健康増進を目指すヘルスケアのあり方や異文化ケアシステムの構築に助言できると考える。

これらの背景を踏まえて、中国文化を身につけた中国帰国者1世を対象者として、異文化といえる日本社会において高齢期にどのように健康維持・増進していくのか、また日本側としてそれらの帰国者に対するどのような理解のもとにどのような支援・援助を提供していくべきかを明らかにするために、筆者は「異文化適応における高齢期の健康維持・増進を目指すヘルスケアシステムの構築に関する研究」を行っている。

本研究は以上の研究の一部であり、帰国10年以上の中国帰国者1世（孤児及び配偶者）を対象者として、その心身的健康状態とその関連要因を詳細に把握し、異文化を考慮した改善策を探ることを目的とした。

II 研究方法

1. 調査対象者及びその倫理的配慮

1) 対象者と分析データの選定手順:本研究の対象者は、関東圏A県内に在住している中国帰国者1世（孤児とその配偶者）99人である。対象者の選定手順について、筆者が中国帰国者の入院・通院時の通訳ボランティア活動をしたきっかけで、中国帰国者のことを知り、関東圏A県の中国帰国者家族を支援する会と連携を取った。その会には、本研究の目的、方法などを説明し、同意を得た上で、その会に属する120人の中国帰国者1世を呼びかけた。そして、2005年4月に、その会の年に数回の集会にて、帰国者に対して、中国語と日本語で本研究の目的、調査方法などについて口頭と書面で詳細に説明し、同意を得た者102人を対象者とした。対象者の都合に合わせて、調査の場所と時間を設定した。その後、文化背景を配慮して、中国語で調査項目の文言を吟味し、帰国者の心理に詳しい人にプレテストを行った。プレテストでは、調査項目は本人の健康状態や健康行動、医療保健福祉サービスへの認知とアクセスなどに関連する項目に関心が高く、身体機能の測定も入れて、いままでやったことがない新鮮な項目だったので、体に負担があまりなく楽しくできたとの意見があった。調査は対象者に大きな負担にならないことを確認した。そして、2005年7月に本調査を行った。得たデータについて、帰国したばかりの2人と1945年前帰国した1人を除外し、99人のデータを分析データとした。

2) 倫理的配慮:対象者は中国帰国者である特殊な事情により、説明も調査も文言を吟味して中国語で行った。対象者には、研究趣旨、参加が任意であること、匿名性の保持、途中でやめても不利益が生じないことなどを口頭と文書で説明した。調査時、対象者に対して身体的・心理的苦痛や危険性を与えないように配慮した。分析には氏名を用いず匿名性を保持した。本研究は千葉大学看護学部倫理審査委員会で承認を得た。

2. 調査方法

1) 調査票の作成:先行研究^{1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23)}と関係資料を参考に、中国帰国者の心身的健康状態とその関連要因として、心身的健康状況（精神的健康GHQ12、主観的健康評価—健康度自己評価・生活満足度・健康に対する不安、老研式活動能力、要介護複合的リスク）、人口学的特徴、日本語のコミュニケーション能力、ウェルネス行動、日本の医療保健福祉サービスの認知度とアクセスの大項目を設定し調査票を作成した。また、身体機能の定量的評価を加えた。調査票の言語について、精神的健康（GHQ12）の既存中国語版⁸⁾の他に、日本語版の調査全項目について、筆者が文化背景を配慮して文言を吟味し、中国語に翻訳した。そして、中国版の翻訳文が原文の意味内容を反映しているか検討し、日本語を母国語とする専門家2人が中国語から日本語へback translationを行い、中国版の翻訳文を修正した。また、医学・看護学専門の留学生3人と対象者としての帰国者1世3人により、調査プレテストを行い、調査票の中国版の妥当性と調査票の質の向上に努めた。

2) 調査方法：調査質問紙には簡単に答えを選択できる工夫をした。質問紙調査時には、中国帰国者の教育水準などの特殊な事情を考慮し、筆者は調査質問紙を中国語で一つ一つ設問を読み上げ、対象者は一斉に答えを書いてもらった。回答が難しいと感じる対象者に対して、中国語ができる10人の調査員がフォローするように配置した。身体機能の定量的測定については、中国語と日本語ともを話せる調査員は身体測定の専門家による訓練を受けてから、対象者99人について、1対1の測定を行なった。

3. データ分析

上述の調査によって収集されたデータについて、単純集計と記述統計により、対象者の全体的な心身的健康状態を把握した。また、対象者を孤児・配偶者に分けての精神的健康問題 (GHQ12 \geq 4点) の割合を検討したところ、孤児78.5%、孤児の配偶者61.8% (χ^2 値=3.14, $P=0.08$) で、かつGHQ12の下位項目ごとにも、有意差がなかった。先行研究でも、長年残留孤児と一緒に生活してきた孤児の配偶者は心身的健康状態については孤児と似ていると指摘している¹⁾。従って、本研究では孤児とその配偶者一緒に分析を進めた。

主眼問題になっている精神的健康 (GHQ12) のデータをカットオフ値よりGHQ12<4点の者とGHQ12 \geq 4点の者に分けて、諸項目に対して、連続量には平均値の差の検定 (t 検定) を、離散量には χ^2 検定を用いて有意確率を求めた。統計学的な有意水準は5%に設定した。

ロジスティック回帰分析の予備的解析として、Cochran Mantel-Haenszel の傾向性検定もしくはFisherの直接確率検定を用いた単変量解析を行った。5%水準で有意な関連がみられた変数をロジスティック回帰モデルに投入する候補変数とし、変数減少法による説明変数選択を行った。その際、候補変数間のSpearmanの相関関係数は0.3以下であり、多重共線性はないものと判断した。検定はすべて両側検定とし、ロジスティック回帰分析の結果の解釈に当たっては、 $p<0.05$ を関連ありとした。

III 結 果

1. 対象者の特徴と心身的健康の実態

対象者99人の構成について、残留孤児65人 (65.7%)、その中に男性32人 (69.6%)、女性33人 (62.3%)；孤児の配偶者について34人 (34.3%)、その中に男性14人 (30.4%)、女性20人 (37.7%)であった。平均年齢は63.9 \pm 4.2歳 (55~76歳)であった。平均帰国時間は14.2 \pm 4.5年間 (10~26年)であった。言葉の障害人の割合は96.0%であった。

精神的健康 (GHQ12) について：GHQ法¹⁾によりGHQ12の平均値は6.32 \pm 3.47点となり、日本の一般的地域在住高齢者のGHQ12平均値²⁾ (3.20)より倍に高く、在日中国人の平均値²⁾ (5.60 \pm 2.20点)より高くなっている。精神的問題が疑われる (GHQ12 \geq 4点)人は72 (72.7%)であった。その中に、孤児の平均値は6.65 \pm 3.40点、精神的問題が疑われる人は51 ((78.5%)であり、その配偶者の平均値は5.71 \pm 3.56点、精神的問題が疑われる人は21 (61.8%)であり、有意差がなかった。GHQ12の下位項目ごとにもみたところ、孤児とその配偶者には有意差が見られなかった。

精神的健康群 (GHQ12<4点) と精神的不健康群を分けて、対象者の属性と精神的健康との関連をみたところ (単変量解析)、表1に示した通り、対象者の年齢のみ有意な関連をみられた ($P<0.01$)。即ち、高齢者予備群 (55-65

表1 属性及び精神的健康に関する単変量解析の結果 (n=99)

項 目	人 (%)	GHQ-12 「人 (%)」		χ^2 値	p
		GHQ<4 群	GHQ \geq 4 点群		
アイデンティティ	孤児	65 (65.7)	14 (51.9)	3.138	0.077
	配偶者	34 (34.3)	21 (29.2)		
性	男	46 (46.5)	16 (59.3)	2.443	0.118
	女	53 (53.5)	42 (58.3)		
年齢	55-64 歳	63 (63.6)	11 (40.7)	8.410	0.004
	65-76 歳	36 (36.4)	16 (59.3)		
帰国期間	10-19 年	92 (92.9)	26 (96.3)	0.641	0.424
	20-26 年	7 (7.1)	1 (3.7)		

歳)は高齢者群より精神的健康が悪い。また、年齢との関連要因をみたところ、老後の生活に対する不安 (χ^2 値=9.22, $P<0.01$)、日本社会に溶け込まない (χ^2 値=5.41, $P=0.02$)、日本語で意思疎通できない (χ^2 値=7.295,

R<0.001)) が強い関連をみられた。

2. 精神的健康 GHQ12 の関連要因 (単変量解析)

表 2 回答分布及び精神的健康に関する単変量解析の結果 (n=99)

項 目	人 (%)	GHQ-12 「人 (%)」		χ ² 値	p	
		GHQ<4 群	GHQ≥4 点群			
日本語能力 (意思疎通)	できない	95 (96.0)	24 (88.9)	71 (98.6)	4.787	0.029 *
主観的評価						
健康度自己評価	健康でない	63 (63.6)	6 (22.2)	57 (79.2)	27.516	0.000 **
健康に対する不安	不安	84 (84.8)	17 (63.0)	67 (93.1)	13.832	0.000 **
生活満足度	不満足	42 (73.7)	6 (46.2)	36 (81.8)	6.583	0.000 **
生活不満足の主な理由(有意な関連項目のみ)						
老後生活の不安	はい	94 (94.9)	22 (81.5)	72 (100.0)	14.043	0.000 **
病気に対する不安	はい	96 (97.0)	24 (88.9)	72 (100.0)	8.250	0.004 **
医療福祉保健情報がない	はい	96 (97.0)	24 (88.9)	72 (100.0)	8.250	0.004 **
老研式活動能力指標						
手段的自立 (IADL)	自立でない	29 (29.3)	6 (22.2)	23 (31.9)	0.896	0.344
知的能動性	自立でない	71 (72.4)	15 (55.6)	56 (78.9)	5.328	0.021 *
社会的役割	自立でない	82 (82.8)	18 (66.7)	64 (88.9)	6.818	0.009 **
TMIG Index 全体的自立	自立でない	61 (61.6)	11 (40.7)	50 (69.4)	6.841	0.009 **
要介護リスク(有意な関連項目のみ)						
転倒恐怖感	あり	69 (69.9)	13 (48.1)	56 (77.8)	8.162	0.004 **
外出を控える	あり	44 (44.4)	7 (25.9)	35 (51.4)	5.156	0.023 *
医療保健制度とサービスに対する認知						
国民健康保険制度	知らない	44 (44.4)	8 (29.6)	36 (50.0)	3.300	0.069
老人医療制度	知らない	94 (94.9)	23 (85.2)	71 (98.6)	7.381	0.007 **
介護保険制度	知らない	92 (92.9)	22 (81.5)	70 (97.2)	7.405	0.007 **
健康問題相談の窓口(保健所等)	知らない	96 (97.0)	27 (100.0)	69 (95.8)	1.160	0.281
保健福祉サービス	知らない	99 (100.0)	27 (100.0)	72 (100.0)	—	—
帰国者への援護策						
初期の援護策	知らない	36 (36.4)	14 (51.9)	50 (69.4)	2.983	0.084
帰国3年以降の継続支援策	知らない	97 (98.0)	27 (100.0)	70 (97.2)	0.765	0.382
帰国者に対する新たな支援策	知らない	99 (100.0)	27 (100.0)	72 (100.0)	—	—
サポートネット(有意な関連項目のみ)						
医療保健福祉情報を提供する人	いない	82 (82.8)	18 (66.7)	64 (88.9)	6.818	0.009 **
日本語の通訳を頼める人	いない	83 (83.8)	19 (70.4)	64 (88.9)	4.970	0.026 *
ウェルネス行動(有意な関連項目のみ)						
身体的行動						
運動している	いいえ	46 (46.5)	7 (25.9)	39 (54.2)	6.296	0.012 *
精神・社会的健康行動						
若々しく、おしゃれを忘れない	いいえ	60 (60.6)	12 (44.4)	48 (66.7)	4.062	0.044 *
明るい気持ちで生活する	いいえ	37 (37.4)	3 (11.1)	34 (47.2)	10.940	0.001 **
自分の考えを表現する	いいえ	64 (64.6)	13 (48.1)	51 (70.8)	4.421	0.035 *

* P<0.05; **P<0.01

表 2 に示した通り、離散量の項目として分析した結果、精神的健康 (GHQ12) と関連がみられた項目は、言葉

の障害 ($P=0.03$) ; 健康度自己評価 ($R0.001$)、健康に対する不安認知 ($R0.001$)、生活満足度 ($R0.001$)、老後生活に対する不安認知 ($R0.001$)、病気に対する不安認知 ($R0.01$)、医療福祉保健情報がない ($R0.01$) ; 老研式活動能力指標 ($R0.01$) とその下位項目の知的能動性 ($P=0.02$) と社会的役割 ($R0.01$)、若い人に自分から話しかけることがない ($P=0.03$) ; 要介護リスクの中の転倒恐怖感 ($R0.01$) と外出を控える ($P=0.02$) ; ウェルネス行動の中の常に運動をしている ($P=0.01$) という身体的行動、若々しくおしゃれを忘れない ($P=0.04$)・明るい気持ちで生活する ($P=0.001$) と自分の考えを表現する ($P=0.04$) という精神・社会的行動 ; 医療保健福祉制度とサービスに対する認知の中の老人医療制度に対する認知 ($R0.01$)、介護保険制度に対する認知 ($R0.01$) ; サポートネットの医療保健福祉情報を提供する人がいるか ($R0.01$) と、日本語の通訳を頼める人がいるか ($P=0.03$) であった。

連続量の項目として分析した結果、身体機能は精神的健康 (GHQ12) との関連が見られなかった。対象者の身体的機能はある程度に保っている。

3. 精神的健康 (GHQ12) の関連要因 (ロジステック回帰分析)

単変量解析で有意な関連がみられた変数 20 項目を候補変数として、候補変数間の Spearman の相関係数は 0.3 以下である 8 項目を採用し、変数減少法によるロジステック回帰分析を行った結果、精神的健康 (GHQ12) と関連が見られた項目は、健康度自己評価 ($R0.001$)、健康に対する不安認知 ($R0.01$)、医療保健福祉情報を提供してくれる人がいない ($R0.01$)、若い人に自分から話しかけることがない ($P=0.03$)、言葉の障害 ($R0.01$) 5 項目であった (表 3)。

表 3 精神的健康(GHQ12)に関するロジステック分析結果(n=99)

説明変数	カテゴリー	オッズ比	95%信頼区間	P 値
健康度自己評価	0=不健康, 1=健康	0.07	0.02~0.27	0.000
健康に対する不安認知	0=なし, 1=あり	12.40	2.25~68.59	0.004
医療保健福祉情報を提供してくれる人	0=なし, 1=あり	0.12	0.03~0.55	0.007
若い人に自分から話しかけることがある	0=いいえ, 1=はい	0.22	0.60~0.84	0.026
言葉の障害(日本語で意思疎通できない)	0=はい, 1=いいえ	3.14	1.08~9.17	0.036

※ 目的変数は GHQ12 で、得点(0=GHQ12<4, 1=GHQ12≥4)

IV 考 察

移住が言葉、生活様式、価値観、社会習慣の違う外国の社会文化への移動であるから、このような文化をこえた移住は精神的ストレスをもたらし、それによって精神障害が引き起こされると想定される⁴⁾。異文化への適応は容易ではない。移住 10 年後から 20 年後の間は適応の最終期—安定期と言われている。この時期には移住者が移住した社会の一員となったと感じ、故国からの心理的な乳離れがおこるとは一般的である³⁾。しかし、本研究で明らかになったのは、中国帰国者 1 世は帰国 (「移住」) して 10 年以上経っても日本語で意思疎通ができず、精神的健康度 (GHQ12) が低く、健康度自己評価が悪く、老研式活動能力指標の下位項目の知的能動性・社会役割が低く、日本の医療保健福祉サービスに対する認知が低く、アクセスができていない状況であった。また、本研究の対象者の 97.0% (96 人) は「日本社会に溶け込まない」と答えていた。これらのことから、帰国者 1 世はまだ適応の最終期—安定期に入っていないと言えよ。また、中国帰国者 1 世の日本社会への適応困難の深いレベルまでの原因を探るために、インタビューなどのような質的研究を追加する必要があると考える。

中国帰国者が日本社会にどのように定着・自立を果たしていくかを継続的に観察した江畑らの報告 (1992、1996) によれば、帰国者に「身体化」、「強迫症状」、「恐怖症状」などが観察された¹⁾。Westermeyer ら²⁰⁾ がベトナム難民のアメリカに適応する過程で観察された症状と類似した傾向を指摘している。Ying ら³⁰⁾ はアメリカにおける高齢の中国移住者はうつ障害へのハイリスク者となっていると示している。Ren ら³¹⁾ のボストンに住んでいる 219 人の中国高齢者の健康状態を分析した調査によれば、身体的な健康状態はアメリカ人に比べて同等あるいは優れる傾向を示すが、精神的健康状態は悪いことを強調している。本研究では、精神的健康度を評価する指標として GHQ12 を用いた調査により、帰国者 1 世の精神的健康度は身体機能とは関連性がなく、精神的健康の悪い群 (GHQ≥4 点) でも身体機能は比較的高い水準を維持していることから、帰国十年以上を経た帰国者には身体的問題より精神的問題が著しいであることが確認された。従って、本研究は精神的問題を主眼 (目的変数) として分析を進めてきた。

Blazer ら³³⁾ は抑うつ状態については年齢とともに強まると報告がみられ、また、川本ら²⁵⁾ や杉澤ら³⁴⁾ は精神的健康度については年齢とともに悪化する傾向があった報告も見られた。一方で、Smith³⁵⁾ らや Helmchen³⁶⁾ らは精神的健康の指標は加齢の影響を受けにくいと報告し、その理由として緩衝要因や精神的健康を維持する適応機序の関与を指摘している。本研究では、対象者の属性と精神的健康との関連をみたところ、高齢者予備群 (<65歳) は高齢者群 (≥65歳) より精神的健康が悪い傾向がみられた。その原因として、老後の生活に対する不安、日本社会に溶け込まない、日本語で意思疎通できない三つの要素が強く関連していた。これは、これまでの二つの傾向とも違って、対象者の特有な背景にあると考えられる。高齢者予備群は日本人の家族と離れた時にはすべて5歳以下で、日本について何の記憶もなく、中国人の養父母に丸ごと中国人のように育てられてきて、深く身につけたのは中国文化であった。彼らは日本語、日本の文化、日本の社会などについての知識はほぼゼロのまま、日本に帰国してきた。また、小田ら³⁷⁾ の研究によれば、今までの帰国者支援体制にみた適応問題の中、中国帰国者を取り巻く組織が帰国者の為を思う善意から日本社会への同化を促し、「適応」指導のもとに中国的なものを否定し、主流的な支配的な日本文化や言語への同化要請がなされ、一元的文化や単一の価値観を押し付けようとする指導のあり方を強く見られた³⁷⁾。これらの指導に対して帰国者は感謝しつつも、日本社会に適応することは必須条件であり、思う善意一日も早く40年以上身につけた中国的なものを拭き去り、日本文化・習慣に従い、「日本人化」という暗黙の要請のもとに大きな精神的圧力を強く感じていた³⁷⁾。本研究の自由記載にも帰国者により似たような感想があった。これらの社会背景と特異性が、中国帰国者には日本社会の冷淡さを感じ、疎外感を強め、感情の深いレベルにおける所属感やアイデンティティの疑問が再び起こされ、日常生活でのストレスがなかなか解消できなく、精神的健康の阻害要因となる^{1, 37)} という悪循環になっている可能性と考える。このような帰国者の高齢者予備群に対して文化背景を考慮したヘルスケアが切迫した課題であろう。

江畑ら (1996)¹⁾ は帰国3年後の精神的健康と心理的な適応に関連する要因について分析したところ、就労状況、職業、収入源、受診歴、里帰りの有無の5項目であることを見出し、Nicassio ら³⁸⁾ がアメリカに住む東南アジア難民の調査結果や Mavreas ら⁴⁰⁾ がロンドンに住むギリシャ難民の調査結果と同様であることを報告している。Abbott ら⁴¹⁾ の研究は、過去1年間の既往歴や健康度自己評価の低さ、医療機関への訪問回数はいづれも症状と強く関連することが明らかになった。本研究では、対象者は60代に入り、退職 (あるいは元々は職業がない) しており、就労・職業・収入源についてはほぼ同じ状況にある。その上で、ロジスティック回帰モデルを用いて分析した結果、精神的健康度の関連要因として有意差がみられた項目は、健康度自己評価、健康に対する不安認知、医療保健福祉情報を提供してくれる人がいない、若い人に自分から話しかけることがない、言葉の障害の5項目であった。

健康度自己評価は、身体的側面、精神的側面、社会的側面を総合化した指標であると指摘されている^{42, 43)}。健康度自己評価が健康との関連について、Rakowski ら⁴³⁾ は3つの仮説を提唱している。第一は、健康度自己評価が低いことは、神経システムが刺激され、免疫システムが弱められ、感染などへの感受性は高められる精神神経免疫学的な仮説である；第二は、健康度自己評価が低いことは、身体機能の低下の前段階と認知されていること；第三、健康度自己評価が低い人は健康維持・増進活動を積極的に行わない仮説である。健康度自己評価の低さは帰国者の精神的健康を深く影響したと言えよ。

Lazarus⁴⁴⁾ らはストレスの認知と心理的安寧や精神的健康度と強く関連していることを強調している。森本ら⁴⁵⁾ は患者の病気や生活に関する不安認知が高いほど、精神的健康度が低下することを明らかになった。不安認知は、人があるイベントで遭遇する心理面の諸課題に対する心配の程度をストレスに対する認知評価として位置づけたものである。本研究の対象者の健康に対する不安認知や老後の生活に対する不安認知などは、異文化といえる日本社会に不適應や日本語での意思疎通ができないという言葉の障害で、若い人に話しかけないというコミュニケーション能力の低下、医療保健福祉サービスへのアクセスの難しさ、不確定な未来に対する自信のなさなどで生じる心配がその精神的健康に大きな影響を及ぼしていると推察される。

Lazarus ら⁴⁴⁾ によれば、自己評価の高さや社会的なサポートの多さは、ストレスを受けた後にポジティブな健康をもたらすとの研究結果が得られている。出村ら⁴⁶⁾ はソーシャルサポートは精神的ストレスの緩和と軽減に効果があると指摘している。Abbott⁴⁷⁾ らは中国系の移民において保健サービスの利用の低さは精神的障害と強く関連していると報告している。藤田ら⁴⁸⁾ はインフォーマルなサポート (例えば家族や親戚のかかわり) よりフォーマルなサポート (例えば専門職のかかわり) を受けた対象者のほうは精神的健康度が高い傾向を示している。本研究では、言葉の障害で医療保健福祉情報を得るのは難しく、医療保健福祉情報を提供してくれる人

がないことで、医療保健福祉サービスへのアクセスが極めて困難となり、対象者が一層に不安を感じ、その精神的健康に大きな影響を与えたと推測される。また、谷垣ら²¹⁾は健康自己評価が高い人と不安を感じていない人は自己効力感が高いという結果を明らかになった。これらのことから、対象者の背景を考慮し、専門職による情報提供や対象者の自己効力感を高める専門的な介入方法は中国帰国者の不安認知を克服し、健康度自己評価を高め、心身的健康状態を改善することができると考えられる。

ニュージーランドに住んでいるアジア移民のヘルスケアニーズに関する調査によれば、共通の苦情は一般診療や個別健康管理のコストが高いこと、健康管理システムの理解や情報の不足、言語や文化的な障害であることを強調している。また、ヘルスサービスに接した者は非常に少なく、その知識も初歩的なものである⁴¹⁾。本研究では、言葉の障害と文化の壁で、帰国者は日本の医療保健福祉サービスに対する理解不足、そしてアクセスができていない状況であったことが先行研究に類似している。本研究の対象者は非常に低い心身健康状態にあるが、ヘルスケアを求めるには不相応な困難を経験していることに特に関心を寄せたい。これらの確認された数多くの心身健康の危険因子は、健康維持・増進プログラムに対する介入のポイントを提案するものであると考える。

移住者の適応に対して、文化的側面は強い影響を与えている。Abbott⁴⁷⁾らの研究では、高い同化的（新文化的）適応指向とうつ症状の低率と強い関連性をみられたが、対象者の大多数は非常に強い固有文化（中国文化）的適応指向を持っていて、同化的モードを持っているのは少ないことが明らかになった。Williams⁴⁹⁾らは移住者の適応について、固有文化のアイデンティティと生き方を維持している人は、新しい生活モードの習得と新文化への適応に対して、他の人よりポジティブな経験になると指摘している。Leininger³⁸⁾らは精神保健の視点からいえば、移住者は自身の伝統文化になんらかの誇りもつことが望ましい。しかし、新しい文化の利点と有用性を認識することによって均衡のとれた文化受容も重要であると強調している。本研究では、対象者の心身的健康とその関連要因を考察したところ、文化的背景は重要であることが示された。いかに固有文化を維持するかといかに受け入れ社会に適応していくかとのあいだに適切なバランスが必要である。このような文化ケアの視点は中国帰国者のこれからのケアシステム、或いは在日外国移住者に対する異文化ケアシステムの構築に最も重要な考慮すべきものであると示唆された。

V 結 語

本研究では、異文化といえる日本社会に適応の努力をしつつある中国帰国者1世における心身的健康状態とその関連要因を調査し、以下の点が明らかになった。

中国帰国者1世は、帰国して10年以上経っても日本語で意思疎通ができず、日本社会への適応水準は低く、心身的健康状態が悪く、日本の医療保健福祉サービスへの理解が不足、アクセスができていない状況であった。特に、対象者の7割が精神的健康GHQ12で4点以上であり、精神的問題が疑われていることが示された。精神的健康に関連がみられた要因は、健康度自己評価、健康に対する不安認知、医療保健福祉情報を提供してくれる人がいない、若い人に自分から話しかけることがない、言葉の障害5項目であった。

以上より、中国帰国者あるいは在日外国移住者の健康維持・増進においては、言語、生活モード、医療保健福祉サービスへのアクセス、社会的役割の形成などの文化的要素も含めた大きな課題が複合的に絡み合った状況にある様子が判明された。クライアントの身近な存在であるべき医療保健福祉にかかわる医療従事者は、これらの健康状態を改善するための多様な役割を担う必要性のあることが示唆された。これらの知見に基づいて、筆者らは文化を考慮した介入プログラム（culturally sensitive care program）を実施中である。

参考文献 (1~49 略)

注：①本研究Ⅰの一部は、2005年9月16日「第64回日本公衆衛生学会」にてポスター発表、2006年3月に「日本公衆衛生雑誌」に投稿中。

②研究Ⅱ(The effects of a cultural health promotion program for Japanese returnees from China: A randomized controlled trial)は、「The 9th East Asian Forum of Nursing Scholars (Bangkok, Thailand)」にて口演発表する予定(2006年3月30日)。

作成日：2006年3月13日