

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2008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： 蓋 若琰



所属機関名： 東京大学大学院医学系研究科

所属部署： 国際保健計画学 職名： 大学院生

〒113-0033

所在地： 東京都文京区本郷7-3-1

電話： 03-5840-3675

内線： 23675

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

新型インフルエンザに関する中国農村部住民の住環境と予防意識の調査

3. 成果の概要 (100字程度)

本研究は鳥インフルエンザの現実的な危険にさらされている中国の農村地域を山東省、またこれまで鳥インフルエンザが爆発された安徽省と内モンゴル自治区からアプローチした。住民の住環境と予防意識に関する現地調査を通して、日常生活における感染された家禽への暴露及び衛生教育の実施状況を評価した。

発表論文等

・ GAI R, XU L, TANG W, KUROIWA C. KAP of poultry handling and living environment of rural residents in China. 第23回日本国際保健医療学会・東日本地方会. 東京, 2008年3月.

・ 研究結果に基づいた論文が近いうちにPublic Health又はEmerging Infectious Diseasesに投稿する予定である。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 蓋 若琰 職名： 大学院生

所属機関： 東京大学大学院医学系研究科 部署： 国際保健計画学教室

中国側研究者氏名： 徐 稷中 職名： 教授

所属機関： 中国山東大学公衆衛生学院 部署： 社会医学と衛生管理研究所

新型インフルエンザに関する中国農村部住民の住環境と予防意識の調査

代表研究者 蓋 若琰 (GAI Ruoyan)

所属機関 東京大学大学院医学系研究科・大学院生

中国側共同研究者 徐凌中 (XU Lingzhong)

所属機関 山東大学公衆衛生学院・教授

Abstract

In China, most human cases of avian influenza were rural residents and were reported with a contact or an intake of sick poultries, suggesting rural residents have relevant risks to be exposed to the fatal virus. In this study, we investigated the living environment in rural areas and rural residents' knowledge, attitude and practices regarding poultry handling and avian influenza in Shandong Province, Anhui Province and Inner Mongolia Autonomous Region, and thus provide evidence on the risks of exposure to sick poultries and on the effect of health education for rural residents.

Key words: China, rural resident, avian influenza, living environment, health education

Introduction

According to the situation assessment by WHO, all the prerequisites for the start of a human influenza pandemic have been met save one: the establishment of efficient human-to-human transmission (1). The possibility that the virus will mutate into a new form communicable among humans increases as the geographical range of the infection expands and the number of people both near the disease and who have contracted the disease increases. Since 2003, outbreaks of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus with sporadic transmission from birds to human worldwide have raised a considerable concern of the potential pandemic. In China, like other Asian countries such as Indonesia, Thailand, and Cambodia, most reported patients and victims were rural residents and had an experience to contact to poultries, suggesting rural residents have relevant risks to be exposed to the fatal virus. Many studies confirmed H5N1 infection has been associated with exposure to infected poultries (2-5). On the other hands, until now, there was no systematic study to understood knowledge and practices of rural residents regarding poultry handling and the infection precaution, and the performance of local surveillance system and the effect of health education and interventions such as vaccination to poultries. All those kinds of information are urgently needed for the policymaker to prepare the potential pandemic. The objective of this study is to assess living environment in rural areas and rural residents' knowledge, attitude and practices regarding poultry handling and avian influenza.

Methods

This is a cross-sectional study during September 2007 to January 2008 in Shandong Province, Anhui Province, and Inner Mongolia Autonomous Region, thinking of a geographical diversity and feasibility. In the later two regions avian influenza and human infection cases ever occurred before. The target population was rural residents aged 18 and above. It was selected by multi-stage sampling. First, we randomly selected 1 district from the each region. 3 counties were selected from each district and then 1 village from each counties. In the selected 9 villages, we interviewed all residents, totally

1379 participants (Table 1), by using a semi-structured questionnaire designed to collect information on their demographic characteristics, living environment, practice of poultry handling, frequency of going to poultry market, attitude to the potential pandemic, knowledge on avian influenza and disease prevention. Besides, officers from primary healthcare settings and the local Health Agency were interviewed to understand policies and interventions including surveillance, vaccination to poultries and economic compensation during the outbreak.

Table 1 Demographic characteristic of participants

Demographic characteristic	n=1379 (%)	
Age	47.3 (\pm 17.6)	
Location	Shandong	399 (28.9)
	Anhui	491 (35.6)
Gender	Inner Mongolia	489 (35.5)
	Male	662 (48.0)
Marriage status	Female	717 (52.0)
	Single	180 (13.1)
Education	Married	1199 (86.9)
	Middle school and below	1258 (91.2)
Occupation	Above middle school	121 (8.8)
	Peasant	1027 (74.5)
Annual income of household (RMB)	Others	352 (25.5)
	Less than 5000	224 (16.2)
	5000~10000	486 (35.2)
	10000~15000	227 (16.5)
	15000~20000	187 (13.6)
Joint of community-based medical insurance	20000~25000	65 (4.7)
	More than 25000	190 (13.8)
Poultry feeder	Yes	1322 (95.9)
	No	57 (4.1)
Poultry feeder	Yes	312 (22.6)
	No	1067 (77.4)

Results

1) Living environment

The living environment of those surveyed rural residents was summarized in Table 2. Half of participants have a contact to wild bird (often and occasionally see). Nearly 50% have a semi-closed or opened yard, which poultries can pass in and out. From the interview, we found there were participants bringing a dead wild bird to home and make it for food when they found it outside. 51.8% keep poultries in their households. Among them, some had a special fowl-house and others didn't. Instead, in those households, poultries were bred in common living room, an extra room or the toilet. We also observed that in most households even those with a special fowl-house, poultry dung can be often seen in the yard, living room, toilet, and kitchen. From the interview, there were 30 of total 714 participants reporting the death of poultries during the past two weeks. When their poultries died, most participants

took them into burring or burying while others took inappropriate handling measures such as throw-out or in-take. In terms of the sanitary condition, 57.5% of participants dumped wastes at near-by of the house or everywhere, rather than at an appointed place. 9.9% didn't have water supply in the household. As much as 86.3% still use a latrine, rather than a flashing toilet. 67.9% prepared raw poultries and cooked food at the same chopping broad. According to the self-report of those participants, the vaccination rate of poultries bred in their households was 100%. The average frequency of going to poultry market was 19 days / time.

Table 2 Living environment

Living environment		n=1379 (%)
Contact to wild bird	Often see	426 (30.9)
	Occasionally see	388 (28.1)
	Never see	565 (50.0)
Type of yard	Yard circled with wall	714 (51.8)
	Yard semi-closed	182 (13.2)
	Yard opened	450 (32.6)
	Others	33 (2.4)
Frequency of house cleaning	Every week	677 (49.1)
	Every month	289 (21.0)
	Half of year	248 (18.0)
	One year	162 (11.7)
Waste dumping to an appointed place	No cleaning	3 (0.2)
	Yes	586 (42.5)
	No	793 (57.5)
Water supply	Yes	1242 (90.1)
	No	137 (9.9)
Type of toilet	Flashing toilet	189 (13.7)
	Latrine	1190 (86.3)
Separated chopping broad	Yes	443 (32.1)
	No	936 (67.9)
Poultry keeping in household	Yes	714 (51.8)
	No	665 (48.2)

2) Knowledge on avian influenza and disease prevention

Regarding rural residents' knowledge on avian influenza and disease prevention, we designed 15 questions based on an education guideline for human infection prevention (6) and allotted 1 point for the correct answer. The range score was therefore from 0 to 15. In this study, the minimum, mean, maximum score was 0, 4.5, and 11, respectively. As showed in Table 3, we compared the mean of the scores among different groups by statistical tests on SPSS 13.0.

We found that the residents from Shandong Province had better understanding of knowledge related to avian influenza and disease prevention than other 2 regions, which can be attributed to the effect of health education activities, as we understood from the interview of the local officers. Moreover, those with lower level of education, peasant, and those with annual income lower than 5000 RMB (approximately 75000 Japanese Yen) tended to have worse scores. Among factors significantly associated

with participants' performance of the question answer were also separated chopping broad for food preparing, treatment of influenza, vaccination, interest of related information, eating habit, and attitude to the potential pandemic. The main source of related knowledge and information was TV and internet. Approximately half of participants showed relevant interest and concern towards the potential pandemic.

Table 3 Factors associated with residents' knowledge on avian influenza and disease prevention

Factors		Mean	<i>P</i>
Location ^a	Shandong Province	4.86 (4.60-5.12)	***
	Anhui Province	4.38 (4.17-4.58)	
	Inner Mongolia Autonomous Region	4.18 (3.98-4.38)	
Education ^b	Above middle school	5.68 (±2.524)	***
	Middle school and below	4.33 (±2.375)	
Occupation ^b	Peasant	4.24 (±2.328)	***
	Others	5.06 (±2.573)	
Annual income of household (RMB) ^a	Less than 5000	3.17 (2.90-3.44)	***
	5000~10000	4.38 (4.19-4.58)	
	10000~15000	4.81 (4.50-5.13)	
	15000~20000	4.74 (4.40-5.09)	
	20000~25000	4.08 (3.46-4.70)	
Separated chopping broad ^b	More than 25000	5.51 (5.14-5.88)	
	Yes	4.93 (±2.37)	***
Treatment of influenza ^a	No	4.22 (±2.408)	
	See doctor	4.73 (4.56-4.91)	***
	Self-medicine	4.16 (3.97-4.35)	
	No treatment	4.07 (3.47-4.67)	
Vaccination of immune globulin ^a	Others	1.44 (0.77-2.12)	
	Yes	8.00 (5.10-10.90)	**
	No	4.44 (4.31-4.56)	
Interest of related information ^a	Don't remember	4.71 (1.85-7.58)	
	Very interest	5.54 (5.18-5.90)	***
	Interest	4.94 (4.75-5.13)	
	Not interest	3.62 (3.44-3.79)	
Change of eating habit ^a	Not at all	3.15 (2.86-3.44)	***
	Reducing intake of poultries	4.79 (4.54-5.04)	
	Careful whether the poultries are boiled	4.78 (4.18-5.37)	
	Don't eat poultries	4.72 (4.55-4.89)	
Eating of raw poultry ^a	Never	4.50 (4.37-4.63)	**
	Occasionally	3.82 (3.17-4.48)	
	Often	2.10 (0.61-3.59)	
Cleaning egg shell ^a	Yes	4.72 (4.56-4.88)	***
	No	3.57 (3.31-3.84)	
	Depending on	4.54 (4.22-4.87)	

Attitude to the potential pandemic ^a	Already taking action	5.81	(5.43-6.19)	***
	Be aware but not taking action yet	4.76	(4.56-4.97)	
	Not aware or not necessary	3.90	(3.73-4.06)	

a: by One-way ANOVA test; b: by *t* test

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

Discussion

This study identified the frequent and inevitable contact between rural residents and poultries in living environment of rural residents. The sanitary conditions, especially waste dumping, toilet, and water supply need to be improved. There still remain some unsafe and inappropriate practices on poultries handling such as food preparing and treatment of dead poultries. We found that level of rural residents' knowledge on avian influenza and disease prevention in general was relevantly low and regional difference, health behaviors and attitude aspects associated with it, suggesting health education for rural residents urgently need to be improved in future.

Figures



(1)



(2)

(1) Dead poultries threw-out.

(2) Inside and outside of the house and the yard were open to poultries.

References

1. The World Health Organization. "Responding to the Avian Influenza Pandemic Threat: Recommended Strategic Actions 2005". Available at <http://www.who.int/en/>
2. Mounts AW, Kwong H, Izurieta H, et al. Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997. *J Infect Dis.* 1999; 180:505-508.
3. Thorson A, Petzold M, Nguyen T, et al. Is exposure to sick or dead poultry associated with flulike illness? A population-based study from a rural area in Vietnam with outbreaks of highly pathogenic avian influenza. *Arch Intern Med.* 2006;166: 119-123.
4. Webster RG. Wet markets: a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? *Lancet.* 2004; 363: 234-236.
5. Ly S, Kerkhove M, Holl D, et al. Interaction between humans and poultry, rural Cambodia. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 130-132.
6. Available at: <http://www.moh.gov.cn/newshtml/10970.htm>

注：本研究は、2007年3月16日『日本国際医療保健学会東日本地方会』にて口演発表予定。

作成日：2008年3月14日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金-調査・共同研究-報告書

2008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： 李 天成 
所属機関名： 国立感染症研究所
所属部署： ウイルス第二部 職名： 主任研究官
〒 208-0011
所在地： 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
電話： 042-561-0771 内線： 357

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国における HEV の感染状況調査

3. 成果の概要 (100字程度)

中国広東省の健常人血清 3864 検体、非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者の急性期血清 51 検体、および同じ地域のブタ糞便材料 80 検体を対象に HEV IgG, IgM および HE VRNA を調査した。健常人の IgG 抗体保有率は 5.6%であった。原因不明急性肝炎患者における E 型肝炎発生率が 30%であり、HEV が原因不明急性肝炎の重要な原因ウイルスであることが判明した。ヒト由来 HEV と同じ地域のブタから分離した HEV の塩基配列は極めて類似していたことから、ブタが HEV の重要な宿主であることが推測された。

※発表論文等

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 李天成 職名： 主任研究官
所属機関： 国立感染症研究所 部署： ウイルス第二部
中国側研究者氏名： 柯 昌文 職名： 所長
所属機関： 中国広東省疾病予防コントロールセンター 部署： 微生物検査所

-日中医学協会助成事業-
中国における HEV の感染状況調査

研究者氏名	李 天成
所属機関	国立感染症研究所ウイルス第二部
中国側共同研究代表者	柯 昌文 方 苓
所属機関	中国広東省疾病予防コントロールセンター

要旨

中国広東省の健康人血清 3864 検体、非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者の急性期血清 51 検体、および同じ地域の養豚場から月齢の異なるブタ糞便材料 80 検体を採取し、HEV IgG, IgM および HE VRNA を調査した。広東省における健康人の IgG 抗体保有率は 5.6%であった。一方、原因不明急性肝炎患者から IgM 抗体が 17 検体(30%)検出され、E 型肝炎ウイルスが原因不明急性肝炎の重要な原因ウイルスであることが明らかになった。患者から分離した HEV と同じ地域のブタから分離した HEV の塩基配列は極めて類似していたことから、ブタが HEV の重要な宿主であることが推測された。

Key Words: E 型肝炎, Hepatitis E virus, Virus-like particles (VLP), ワクチン

緒言

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス(Hepatitis E virus, HEV)の感染によって引き起こされる急性肝炎である。E 型肝炎は糞口経路によって伝播し、東南アジアでは常時流行を繰り返している¹⁾。E 型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に 20%に達するという報告もある²⁾。現在、HEV はへペウイルス科に分類され、唯一の属であるへペウイルス属を形成している³⁾。1991 年、Tam らによって HEV 遺伝子の全配列が解明された⁴⁾。以来、多くの株が解析され、HEV には少なくとも 4 つの遺伝子型 (Genotype) が存在することが明らかになっている。

HEV のゲノムは約 7.2Kb のプラス一本鎖 RNA で、約 7,200 塩基である。HEV の遺伝子上には 3 つのオープンリーディングフレーム (ORF1, ORF3 および ORF2) が 5' 末端から一部重複しながら配列している。ORF1 は非構造蛋白をコードする。ORF2 は 72 kDa の構造蛋白をコードする領域である。ORF3 はウイルスの複製に必須ではあるが機能はいまだ不明の蛋白をコードする。

1997 年アメリカで初めて豚からヒト HEV と似たウイルスが分離された⁵⁾。その後、アメリカや日本などの先進各国で E 型肝炎流行地域への海外渡航歴のない急性 E 肝炎患者が発見された。また、豚から分離したウイルスはサルにも感染することが明らかになった。特にごく最近、日本では加熱不十分なブタの内臓、野生のシカ肉、イノシシの肝臓を喫食し、E 型肝炎を発症した例が報告されるようになった^{6,7)}。その中には死亡例もあった。上述のことから、E 型肝炎は人獣共通感染症であることも示唆されている。

中国は HEV の流行地域であり、大きな養豚国でもある。アメリカ、台湾、日本でのブタの感染状況から中国のブタも HEV に感染されていると推測される。豚の HEV の感染状況を把握することは中国の食品衛生及び国民健康に非常に重要である。アメリカ、日本では 3 型および 4 型遺伝子 (G3 および G4) を持つ HEV が分離される。一方、中国はこれらとは異なり、主に 1 型 (G1) HEV によって引き起こされてきたが、これまでの実験結果からは、G1 HEV はブタに感染しないことが明らかになっている。さらに散发例の中に G4 HEV がしばしば報告され、今までの流行と異なり、新たな感染源が存在することも考えられる。

本研究では中国広東省を拠点にして健康人抗体保有率、非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者およびブタの HEV の感染状況を調査し、この地域の HEV 流行状況を把握するとともに、E 型肝炎におけるブタの役割を調査した。

材料と方法

血清および糞便

健康人血清: 中国広東省に住む健康人の血清 3864 検体を用いた。内訳は男性が 2170 人、女性が 1694 人である。また、都会生活者は 930 人、農村生活者は 2934 人、年齢分布は 1-65 歳である。

急性肝炎患者血清および糞便: 非 A 非 B 非 C 型の原因不明急性肝炎患者 51 人の急性期血清と糞便を広東省の各病院か

ら採取した。BPSで10%糞便乳剤を作製し、血清とともに-20°Cに保存してHEV-IgG、IgM および HEV-RNA の検査のために用いた。

ブタ糞便材料：羅湖地域の養豚場から二ヶ月、三ヶ月、四ヶ月、五ヶ月齢のブタの糞便をそれぞれ20検体採取した。10%糞便乳剤を作製し、-20°Cに保存してHEV-RNA の検査に用いた。

ELISA 法による抗 HEV IgG および IgM 抗体の検出

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製したE型肝炎ウイルス様中空粒子(HEV VLPs) (1 µg/ml) を96-well のマイクロプレートの各ウェルに加え、4°Cで一晩コーティングした。使用時に150 µl の5% スキムミルク入り PBS-T を加え、37°Cで2時間ブロッキングを行ったあと、PBS-T で3回洗浄した。その後、血清を1% スキムミルク入り PBS-T で200倍に希釈し、100 µl を各ウェルに加え、37°Cで一時間反応させた。PBS-T で3回洗浄して、1% スキムミルク入り PBS-T で希釈した抗ヒトIgG F(ab')₂-HRP あるいは抗ヒトIgM(5Fcu)-HRP を100 µl 各ウェルに加え、37°Cで1時間反応させた。同じ洗浄条件で3回洗浄したあと、100 µl のOPD 発色試薬を各ウェルに加え、室温で遮光して30分間反応させた。50 µl の4N 硫酸を各ウェルに加えて反応を停止し、492 nm でOD 値を測定した。

判定基準：IgG も IgM も OD 値が0.15 以上のときを陽性とした。この基準は抗HEV-IgG、IgM 抗体陰性である検体の平均OD 値プラス3SD で算出した。

HEV構造蛋白遺伝子の増幅

RNA抽出：RNAzolを用いて血清あるいは糞便からRNAを抽出し、20 µl の滅菌蒸留水に溶かして-20°Cに凍結保存した。

cDNAの合成：抽出RNAを5 µl 加え、さらに9 µl の滅菌蒸留水と1 µl のプライマーHEV-R2を加え、99°Cで1分間加熱する。その後、速やか急冷する。1 µl のRNase inhibitor、2 µl Reverse transcriptase buffer、1 µl の25mM dNTPs および1 µl のAvian Myeloblastosis Virus由来逆転写酵素を加えて全量を20 µl とし、42°Cで2時間反応後、使用まで-20°Cで保存する。

PCR：cDNAを鋳型として、センスプライマーHEV-F1：5'-TAYCGHAAYCAAGGHTGGCG-3' およびアンチセンスプライマーHEV-R2：5'-TGYTGGTTRTCRTARTCTCG-3' を用いて以下の条件下で1st PCRを行った。95°Cで30秒間熱変性、55°Cで30秒分間アニーリングおよび72°Cで45秒間、伸長の各反応を35回繰り返した後、72°Cで7分間の伸長反応を行った。Nested PCRは1st PCR産物を鋳型にして、センスプライマーHEV-F2：5'-GGBGTBGCNGAGGAGGAGGC-3' およびNested PCRアンチセンスプライマーHEV-R1：5'-CGACGAAATYAATTCTGTCG-3' を用いて、同じ条件で反応した。反応産物を2%アガロースゲルで電気泳動後、増幅したDNA断片(378bp)を確認した。陽性サンプルのRT-PCR産物を精製して、塩基配列を解析し、増幅される領域の塩基配列に基づき遺伝子系統解析することによって遺伝子型を同定した。

結果

広東省におけるHEV抗体保有率

健康人3844人の血清を用いてHEV抗体検査の結果、215人がHEV抗体陽性であり、抗体の保有率は5.6%であった。その中、男性、女性の抗体保有率はそれぞれ5.7%と5.4%であり、両者に有意な差はなかった(P<0.05)。また、都会生活者と農村生活者の抗体保有率はそれぞれ6.7%、5.2%であり、この場合も有意な差は認められなかった(P<0.05)。年齢別の抗体保有率は5歳以下：2.2%、6-10歳：3.1%、11-20歳：3.4%、21-30歳：8.1%、31-40歳：9.5%、41-50歳：13.2%、51歳以上：17.2%であり、年齢の増加とともに抗体保有率が上がる傾向が明らかに示された(図1)。

急性肝炎患者におけるE型肝炎の検出状況

非A非B非C型の原因不明急性肝炎患者51人の急性期血清を用い、HEV IgG と IgM 抗体を検査した。その結果、17検体はHEV IgG と IgM がともに陽性であった。つまり、この17人の患者はE型肝炎であると診断できる。したがって広東省での非A非B非C型の原因不明急性肝炎におけるE型肝炎の検出率は30%であった。さらに急性期患者血清あるいは糞便を用いてRT-PCR法でHEV RNA を調べた。その中患者血清6検体、患者糞便3検体からHEV RNA が検出された。遺伝子型はいずれもG4であった。各株間のホモロジーは82.0-92.3%であった。この結果、広東省ではHEVが非A非B非C型原因不明急性肝炎の重要な原因ウイルスであることが明らかになった。

ブタにおけるHEV保有状況

広東省羅湖地域の養豚場から集めた80検体のブタ糞便からRNAを抽出し、HEV特異的なプライマーを用いてRT-PCR法でHEV遺伝子の増幅をした。その結果、ブタ糞便5検体からHEV RNA を検出した。内訳は3ヶ月齢のブタからの3例、5ヶ月齢のブタからの2例であった。塩基配列解析の結果、検出したHEVは全てG4であった。各株間のホモロジーは94.37-99.40%であった。

人由来 HEV とブタ由来 HEV の比較

急性 E 型肝炎患者由来 HEV とブタ由来 HEV について遺伝子系統解析法を用いて比較した。図 2 に示したように急性 E 型肝炎患者から分離した 9 株の HEV は 4 クラスターに分類された。人由来 HEV 株 China-GZ-227、China-GZ-243、China-GZ-230 はそれぞれ異なるクラスターに、China-GZ-26、China-GZ-28、China-GZ-29、China-GZ-44、China-GZ-67 および China-GZ-892 は同じクラスターに分類された。また、広東省の養豚場のブタから分離した HEV 株 (China-GZ-308-Swine、China-GZ-314-Swine、China-GZ-339-Swine、China-GZ-501-Swine、China-GZ-502-Swine) もすべてこのクラスターに分類された。患者分離株 China-GZ-227、China-GZ-243、China-GZ-230 はブタから分離株とのホモロジーは 85% 以下にとどまり、この 3 例の感染源はこの地域のブタ由来ではないことが推測される。一方、ブタ分離株のクラスターにおけるウイルス株間のホモロジーが 93.2-99.4% であり、特にブタ分離株 China-314-Swine と患者分離株 China-26 のホモロジーは高く、98.8% にも上った。ブタが保有している HEV はヒトに急性 E 型肝炎を引き起こすウイルスと極めて似ているが明らかになった。以上の結果は広東省の患者から分離した HEV が同じ G4 に属しているにもかかわらず、遺伝子が多様であること示し、異なる感染源が存在することが示唆された。さらにブタからヒト由来 HEV 株ときわめて類似するウイルスが分離されることから、ブタ由来 HEV とヒトの急性 E 型肝炎が密接に関連していることが示された。

考察

HEV はアジアにおける流行性肝炎の最も重要な病因ウイルスである。伝播は糞口経路によるが、大部分は水系感染である。1955 年ニューデリーで、共通感染源による E 型肝炎が流行したが、これは糞便で汚染された飲用上水が原因であった。この流行では黄疸性肝炎と診断された症例だけでも 29,000 人に及んだ。これに似た水系感染流行が中国新疆自治区でも報告されている⁹⁾。近年中国の衛環境は改善されて、都会では大規模な流行はほとんど報告されたことがない。ただし、散発例の報告がしばしばあり、広東省でも近年 E 型肝炎症例が増加する傾向があった。その原因を究明するうえで E 型肝炎感染源明らかにする必要がある。

我々は HEV の構造蛋白を組換えバキュロウイルスを用いて HEV の中空ウイルス様粒子 (VLP) を作製することを世界に先駆けて成功した⁹⁾。この VLP の構造を解析し、特にその表面構造がネイティブな感染性粒子と同一の免疫原性を有していることを示した。VLP を用いて高感度の抗体検出 ELISA 系を確立し、高感度かつ大量に簡便に血中抗体の検査を可能にした¹⁰⁾。この抗体検査系を用いて広東省に生活する健常人 3864 人の血中 HEV-IgG 抗体を調べた結果、抗体の保有率は 5.6% であり、日本における抗体保有率はほとんど同じであった。年齢別抗体保有率を見ても、年齢の増加に伴い抗体保有率が高くなる傾向が見られた。20 歳以下の健常人の抗体保有率は低く、HEV に感染するリスクが高いと考えられる。

これまでに感度と特性ともに優れる診断キットがないため、非 A 非 B 非 C 型急性肝炎は原因不明肝炎と診断されたことが多い。今回我々開発した ELISA 法を用い、51 例の非 A 非 B 非 C 型急性肝炎を調べた結果、17 人の急性肝炎患者から特異的に HEV IgG と IgM が同時に検出された。HEV IgM の検出は急性 E 型肝炎の有効な根拠であるため、この方法は急性 E 型肝炎の臨床診断に非常に有用である。また、非 A 非 B 非 C 型急性肝炎には急性 E 型肝炎が 30% 占めたことから、HEV が中国では急性肝炎の重要な原因ウイルスであると考えられた。急性 E 型肝炎に有効な対策として、迅速な且つ正確な診断が必要であり、E 型肝炎を予防するには E 型肝炎ワクチンの開発も急務である。また、9 人の HEV IgM 陽性患者の血清あるいは便材料から HEV RNA が分離された。遺伝子系統解析の結果、9 株の遺伝子型はすべて G4 であった。同じ広東省の養豚場から分離したブタ HEV と高い相同性を持ち、ブタが保有するウイルスは人にも感染することが強く示唆された。つまり、今回の研究結果からも E 型肝炎が人畜共通感染症であることが示唆された。

これまでに中国で大流行を引き起こした HEV は G1 であったし、散発例でも G1 が多かった。しかし、今回散発例から検出した HEV とブタから分離した HEV は全部 G4 であった。また、日本で検出された中国からの輸入感例も主に G4 であった。これらの結果は中国における散発例の急性 E 型肝炎を引き起こすウイルスの遺伝子型が G4 に変わってきたとも考えられる。G1 と G4 HEV の大きな違いとして、宿主の違いが挙げられる。G1 はヒトにしか感染しないのに対して、G4 はヒトにもブタにも感染する。G4 HEV 肝炎の増加はブタ由来 HEV と関連する可能性が高い。今後も、さらに多くの臨床検体およびブタ糞便を採取して検討する必要がある。

参考文献

- 1) Jameel S, et al.: Enteric non-A, non-B hepatitis: epidemics, animal transmission, and hepatitis E virus detection by the polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 1992;37(4):263-270.

- 2) Khuroo MS, et al: Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am. J. Med.* 1981;70:252-255.
- 3) Emerson SU, et al: *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV.* London: Elsevier/Academic Press. 853-857.
- 4) Tam AW, et al: Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185(1):120-131.
- 5) Meng XJ, et al: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:9860-9865.
- 6) Tei S , et al: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362(9381):371-373.
- 7) T-C Li, et al.: Zoonotic foodborne transmission of Hepatitis E virus. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1958-60.
- 8) Purcell RH: 1996. Hepatitis E virus, p. 2831-2843. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 9) T-C, Li., et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol.* 1997;71:7207-7213.
- 10) T-C Li, et al: An empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J Med Virol* 2000;62:327-333.

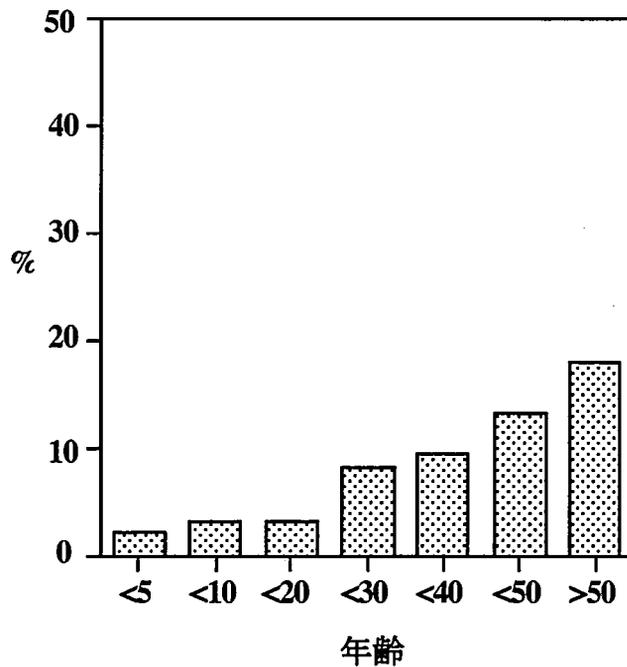


図1：各年齢層における抗体保有率

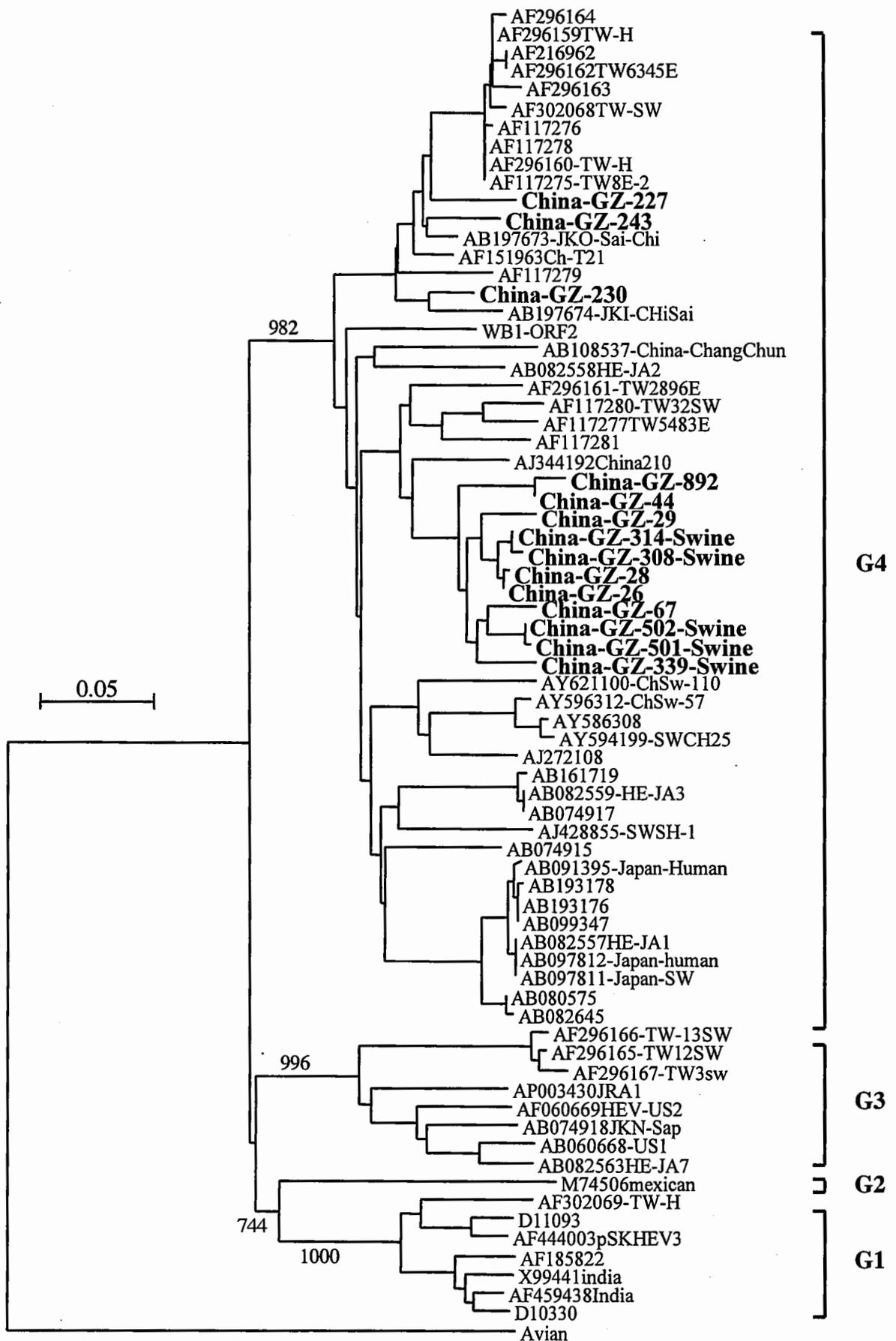


図 2 : HEVの系統樹 ORF2の一部塩基配列 (338bp) に基づく系統樹。

作成日 : 2008年3月10日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2008年 2月 28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： 馬 寧 

所属機関名： 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

所属部署： 発生発達医学講座 機能解剖学分野 職名： 准教授

所在地： 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町3-1-8-15

電話： 088-633-7052 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国南部のEBウイルス関連上咽頭癌発症におけるiNOS依存性DNA損傷との関係

3. 成果の概要 (100字程度)

Epstein-Barr ウイルス (EBV) 感染は上咽頭癌やリンパ腫の重要な原因であり、中国東南部などで発生頻度が高い。本研究では、中国東南部の上咽頭癌患者の組織標本を用いて、8-ニトログアニン生成およびその分子機構について解析した。8-ニトログアニンの染色性は、EBV 感染のない咽頭炎、EBV 感染を伴う咽頭炎、上咽頭癌の順に強くなり、統計学的に有意な差を認めた。以上の結果から、EBV 感染により炎症細胞より咽頭上皮における iNOS 発現を誘導してニトロ化 DNA 損傷を起こし、発がんをもたらすと考えられる。

※発表論文等

Ma N, Kwanishi M, Hiraku Y, Murata M, Huang GW, Huang YJ, Luo DZ, Mo WG, Fukui Y, Kawanishi S.

Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGRF expression.

International Journal of Cancer. 2008 in press.

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 馬 寧 職名： 准教授

所属機関： 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 部署： 発生発達医学講座・機能解剖学分野

中国側研究者氏名： 黄 光武 職名： 教授

所属機関： 广西医科大学附属第一病院 部署： 耳鼻咽喉科

中国南部の EB ウイルス関連上咽頭癌発症における iNOS 依存性 DNA 損傷との関係

日本側研究者代表 馬 寧

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
発生発達医学講座・機能解剖学分野 准教授

中国側研究者代表 黄光武

広西医科大学耳鼻咽喉科 教授

要旨

Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染は上咽頭癌やリンパ腫の重要な原因であり、上咽頭癌は中国東南部などで発生頻度が高い。感染・炎症関連発がんにおいては、炎症細胞および上皮細胞などから生成される活性酸素・窒素種による DNA 損傷が重要な役割を果たすと考えられる。8-ニトログアニンとは、活性窒素種により生成される変異誘発性ニトロ化核酸塩基である。本研究では、中国東南部の上咽頭癌患者の組織標本を用いて、8-ニトログアニン生成およびその分子機構について解析した。広西医科大学附属病院を受診した上咽頭炎患者および上咽頭癌患者の生検・手術標本を得て免疫組織化学染色を行い、8-ニトログアニンおよび酸化 DNA 損傷の指標である 8-oxodG の生成部位を解析した。8-ニトログアニン生成は上咽頭癌の腫瘍細胞および EBV 感染を伴う咽頭炎患者の粘膜上皮で強く観察されたが、EBV 感染を有しない咽頭炎患者の粘膜上皮では染色性は弱かった。8-ニトログアニンの染色性は、EBV 感染のない咽頭炎、EBV 感染を伴う咽頭炎、上咽頭癌の順に強くなり、統計学的に有意な差を認めた。8-oxodG、iNOS についても同様の傾向を認めた。以上の結果から、EBV 感染に炎症細胞より iNOS 発現を誘導してニトロ化 DNA 損傷を起こし、発がんをもたらすと考えられる。本研究で、8-ニトログアニン生成が EBV 感染による炎症から発がんに至る過程で有意に増加することを示した点は非常に意義深い。8-ニトログアニンは種々の感染・炎症関連発がんのリスクを早期に評価する有効なバイオマーカーになりうると期待される。

Key Words

Epstein-Barr ウイルス、上咽頭癌、8-ニトログアニン、DNA 損傷、発癌

緒言

一般的に、慢性感染症が発がんに関与していることが推定されている。しかし、炎症による発がんの分子機構は未だ明らかでない。EB ウイルスはバーキットリンパ腫、上咽頭癌との関連から、ヒトがんウイルス 1 号として注目を浴びた。EB ウイルスはすべての人種に広く蔓延しており、大部分のヒトは成人に達するまでに EB ウイルスの感染を受け、終生保持し続けることが明らかになっている。中国南方地域においては、EB ウイルスの感染率が極めて高く、同時に上咽頭癌の発生率が異常に高いことが知られている。この地方では、上咽頭癌の発生率は 25-50/100,000 に達し、40-50 歳の男性に多発する^{1,2}。全癌の第四位が上咽頭癌である。疫学的に、EB ウイルスの感染と上咽頭癌の発生率の密接な関与が示唆されている³。また、上咽頭癌が中国人に多いことから、遺伝的素因の上にウイルス発癌が加わっている可能性がある。EB ウイルスだけで腫瘍化できるのか、細胞遺伝子の異常がむしろ重要ではないのか、といったことに関しては多くの研究が行われたが、現在まだ不明である。

ウイルス感染症においては、iNOS の誘導が認められ、過剰に産生される NO はスーパーオキシナイトラ

イトなど活性酸化窒素種に変換されることにより、酸化・ニトロ化ストレスのメディエータとして機能し、細胞傷害や組織障害をもたらすことが報告されている。この NO と活性酸素によって生じる過酸化亜硝酸 (NO₂) によって、DNA や RNA がニトロ化され、核酸塩基である 8-ニトログアニンが生成される。また、活性酸素によって誘導される 8-oxodG は、酸化的な DNA 損傷のマーカーであると考えられる。よって、iNOS と 8-ニトログアニンおよび 8-oxodG の発現を調べることは、炎症関連の発癌において重要であると考えられる^{4,5,6,7}。EB ウイルスの感染による上咽頭癌は、ウイルス感染による発がん機構の分子疫学的研究のモデルとして適していると考えられる。そこで本研究では、上咽頭癌の粘膜上皮でも上記のようなことが起こっているのではないかと推測し、きわめて高感度で特異性の高い抗 8-ニトログアニン抗体を用いた免疫組織化学染色によって、上咽頭癌患者の上咽頭粘膜組織における 8-ニトログアニンの局在を観察し、EB ウイルス慢性感染における細胞損傷の iNOS 依存性、さらには EB ウイルス感染による上咽頭癌発症の分子機構を明らかにすることを目的とする。

対象と方法

中国南方地域病院（広西医科大学附属病院）耳鼻咽喉科の入院および外来患者の上咽頭癌と慢性上咽頭炎患者の咽頭粘膜組織病理標本を使用した。咽頭粘膜組織病理標本は 4% フォルマリンで固定し、パラフィンで包埋した厚さ 6 μm の切片。これらの患者のうち、上咽頭癌患者は 19 人(男 10 例、女 9 例、44.7 ± 7.9 歳)。慢性上咽頭炎の患者は、7 人(男 5 例、女 2 例、46.0 ± 13.7 歳)であった。すべての患者において、EB ウイルス抗体が 1:40 以上検出され、EB ウイルスの感染を確認した。また、EB ウイルス小分子 RNA (EBV encoded small RNA, EBER) を標的とした in situ hybridization 法 (DAKO 製 EBER ISH detection kit)を用いて患者咽頭粘膜組織においてウイルスの存在が検索された。対照として、EB ウイルス抗体陰性の慢性上咽頭炎の患者は 6 人(男 6 例、42.3 ± 7.3 歳)を使用した。この研究は中国広西医科大学倫理委員会にて承認された。

8-ニトログアニンに対する抗体の作成

8-ニトログアノシンと結合させるキャリア蛋白として、牛血清アルブミンの代わりにウサギにとって抗原性のないウサギ血清アルブミンを使用し、これにアルデヒドを介して結合させた 8-ニトログアノシン-RSA 複合物を反復注射したウサギから、血液を採取し抗血清を得る。そして、8-ニトログアノシンを結合させた affinity カラムを用意し、抗血清中に含まれる 8-ニトログアニン抗体を吸着させる。カラムに吸着した 8-ニトログアニン抗体を elution buffer で溶出して、分光光度計で吸光値を測定した。この精製抗体の特異性を Dot-immunobinding assay で検討したところ特異性が高いことが確認された⁸。抗 8-oxodG (8-ヒドロキシデオキシグアノシン)モノクローナル抗体は日本老化制御研究所製品を使用した。抗 iNOS (inducible nitric oxide synthase) モノクローナル抗体は Sigma Chemical 社製品を使用した。

組織化学染色: EB ウイルス感染による上咽頭粘膜組織の病理変化について調べるためにヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。

免疫蛍光二重染色法: 厚さ 6 μm の切片の脱パラフィン親水処理を行った後、抗 8-ニトログアニン抗体と抗 8-oxodG モノクローナル抗体或いは抗 iNOS モノクローナル抗体を 48 時間反応させた。二次抗体として goat anti-rabbit IgG Alexa 594 in PBS と goat anti-mouse IgG Alexa 488 in PBS を加え反応させた。これを共焦点レーザー顕微鏡で観察し、撮影した。また、各標本の染色陽性細胞数は 2 人の解剖病理学者により採点し、(-) 陰性 ; (+) 25%以下の陽性細胞数 ; (++) 25-50%陽性細胞数 ; (+++) 50-75%陽性細胞数 ; (++++) 75%以上の陽性細胞数。医学統計法は chi-square test を用い、P<0.05 は統計的有意な差を認められる。

結果

上咽頭癌における病理組織所見

上咽頭癌標本の HE 染色においては、粘膜固有層に腫瘍細胞が上皮性の構造を残しながら増殖し、また

炎症細胞の浸潤が認められる。分泌腺の周囲にも腫瘍細胞と炎症細胞の浸潤が認められる。腫瘍細胞は、大量の異型性の強い細胞からなり、リンパ球に混じって、びまん性に増生像がみられる。

上咽頭癌における 8-ニトログアニンと 8-oxodG および iNOS の局在

上咽頭癌の患者の標本において、8-ニトログアニンと 8-oxodG の蛍光二重染色を行った。腫瘍細胞と浸潤している炎症細胞に 8-ニトログアニンと 8-oxodG の強い免疫反応が観察された。粘膜層においては、粘膜上皮に 8-ニトログアニンの存在が認められ、特に基底層において強い免疫反応が観察された。8-ニトログアニンと iNOS の蛍光二重染色では、上咽頭癌細胞に 8-ニトログアニンと iNOS の発現がみられ、これらが共存していることが確認された。粘膜下層の大量な炎症細胞には強い 8-ニトログアニンの免疫反応が観察された。上咽頭癌の咽頭腺では、咽頭腺の周辺に大量な炎症細胞の浸潤があり、8-ニトログアニンと 8-oxodG の強い免疫反応が観察された(Fig.1)。EB ウイルスに感染した炎症細胞においても強い免疫反応が認められ、他方、EB ウイルスに感染していない炎症細胞では、8-ニトログアニンと 8-oxodG の発現が弱く、両者を比較するとその差は明らかであった。8-ニトログアニンの染色性は、EBV 感染のない咽頭炎、EBV 感染を伴う咽頭炎、上咽頭癌の順に強くなり、統計学的に有意な差を認めた。8-oxodG、iNOS についても同様の傾向を認めた(Table 1)。

考察

本研究では EB ウイルスに感染された上咽頭癌患者の 8-ニトログアニンの発現を明らかにした。上咽頭癌の標本では、8-ニトログアニンと 8-oxodG は同じ細胞の中に存在しているということが確認された。8-oxodG は主に DNA の中で産生され、8-ニトログアニンは DNA と RNA の両方において産生される。一方、iNOS は、上咽頭癌の癌細胞と炎症細胞に見られ、8-ニトログアニンと共存していることが証明された。このことから、上咽頭癌細胞と炎症細胞において、iNOS が NO 産生の供給源になっていると考えられる。

一酸化窒素合成酵素である NOS には、3つのアイソザイムが存在し、内皮細胞由来の内皮型 NOS (eNOS)、非アドレナリン非コリン性ニューロン由来の神経型 NOS (nNOS)、マクロファージやグリア細胞由来の誘導型 NOS (iNOS)に分類されている。Jayasurya 氏は⁹、上咽頭癌組織が EB ウイルスに感染されている状態では、炎症細胞と腫瘍細胞に iNOS の局在が認められることを確認し、NO の供給源になっているという可能性を示唆した。さらに、iNOS の発現がアポトーシス細胞の発現と高い相関関係があることを証明した。細胞が炎症を起こすと、iNOS が誘導され、NO が産生される。この NO と活性酸素によって生じる過酸化亜硫酸 (ONOO⁻) によって、DNA や RNA のグアニン塩基がニトロ化されることで、8-ニトログアニンが生成され、この化学修飾を受けた核酸塩基は、細胞分裂によって遺伝子を複製する際に脱プリン部位を生成する。この脱プリン部位は DNA 複製時に A と対合しやすいため、翻訳の間違いを引き起こし、本来 G-C の対であった部分が、分裂とともに T-A の対に置き換えられた遺伝子の突然変異を引き起こすと言われている¹⁰。このことにより、細胞は遺伝子突然変異またはアポトーシスに至る。

H.pylori 感染では除菌により、C 型肝炎ではインターフェロン治療により、8-ニトログアニンの産生が抑制されることも明らかにした^{11, 12}。これらの結果は、8-ニトログアニンが、発癌が起こる前に炎症関連発癌リスクを評価できる新しい指標として、発癌の予防に応用し得ることを示している。さらに 8-ニトログアニンは炎症関連疾患の治療効果の判定にも応用できると考える。様々な感染による炎症を介して、細胞の遺伝子損傷をもたらし、発癌を起こす分子機構を今後さらに解析することにより、炎症関連発癌の有効な予防法および治療法の開発につながることを期待される¹³。

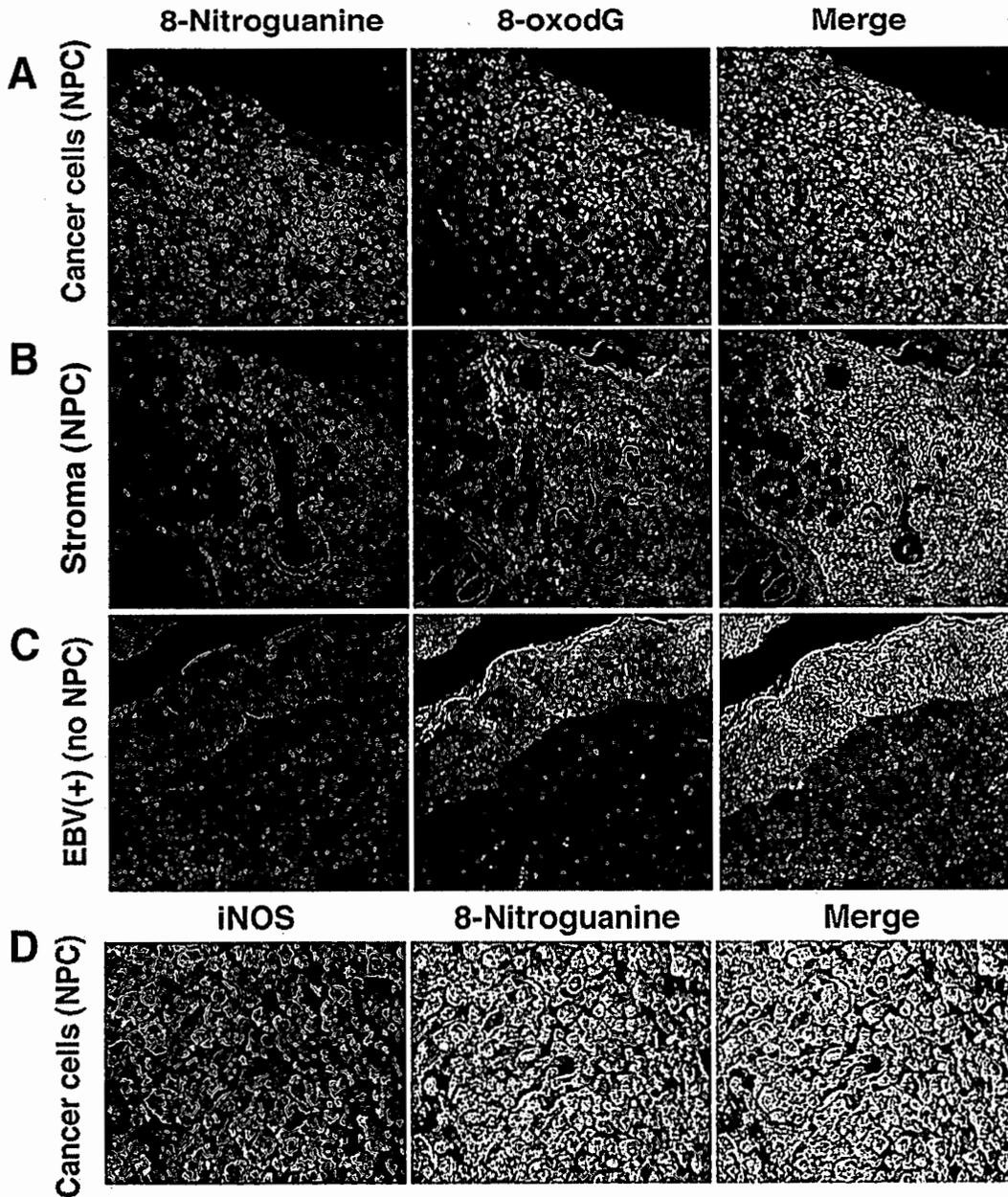


Fig1(A-C): 8-ニトログアニンと 8-oxodG の蛍光二重染色である。咽頭粘膜において免疫反応が起きていることがわかる。特に基底層には強い免疫反応が観察された。上咽頭癌細胞において、強い 8-ニトログアニンと 8-oxodG の免疫反応が観察された。粘膜下層では、大量な炎症細胞に強い 8-ニトログアニンの免疫反応が観察された。咽頭腺の周辺に大量の炎症細胞の浸潤があり、それらの細胞には 8-ニトログアニンと 8-oxodG の強い免疫反応が観察された。腺細胞の核には、8-ニトログアニンの発現を認めた。上咽頭の炎症において EBV(+) の炎症細胞は 8-ニトログアニン、8-oxodG 共に、強い免疫反応が見られた。

Fig1(D): 8-ニトログアニンと iNOS の蛍光二重染色である。上咽頭癌細胞では 8-ニトログアニンと iNOS の発現を観察された。

Table 1. Immunoreactivity grading of nitrate and oxidative DNA damage and the expression of iNOS among NPC and nasopharyngitis patients

8-Nitroguanine			
Immuno-re activity grading	EB(-)	EB(+)	EB(+) NP C
-	6	0	0
+	0	1	1
++	0	2	1
+++	0	4	6
++++	0	0	11
P	Overall : 0.00000*		
	0.00464*		
	0.00005*		
	0.04874*		

8-oxodG			
Immuno-re activity grading	EB(-)	EB(+)	EB(+) NP C
-	6	0	0
+	0	0	1
++	0	7	3
+++	0	0	15
++++	0	0	0
P	Overall : 0.00000*		
	0.00231*		
	0.00002*		
	0.00047*		

iNOS			
Immuno-re activity grading	EB(-)	EB(+)	EB(+) NP C
-	5	0	1
+	1	0	2
++	0	7	0
+++	0	0	16
++++	0	0	0
P	Overall : 0.00000*		
	0.0015*		
	0.00023*		
	0.00001*		
	0.00464*		
	0.00214*		
0.00812*			

参考文献

1. Jeannel D, Bouvier G, Huber A. Nasopharyngeal carcinoma: an epidemiological approach to carcinogenesis. *Cancer Surv.* 1999;33:125-55.
2. McDermott AL, Dutt SN, Watkinson JC. The aetiology of nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 2001;26:82-92.
3. IARC Working Group. Epstein-Barr virus IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 70 Lyon: IARC Press, 1997:47-373.
4. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, Hussain SP, Roth RB, Zhou X, Mechanic LE, Zurer I, Rotter V et al. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J. Clin. Invest.* 2003;112:1887-94.
5. Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I et al. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100:143-8.
6. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003;3:276-85

7. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. Arch. Biochem. Biophys. 2003;417:3-11.
8. Pinlaor S, Hiraku Y, Ma N, Yongvanit P, Semba R, Oikawa S, Murata M, Sripa B, Sithithaworn P, Kawanishi S. Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. Nitric Oxide 2004;11:175-83.
9. Jayasurya A, Dheen ST, Yap WM, Tan NG, Ng YK, Bay BH. Inducible nitric oxide synthase and bcl-2 expression in nasopharyngeal cancer: correlation with outcome of patients after radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003 Jul 1;56(3):837-45.
10. Lorb LA, Preston BD. Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. Annu Rev Genet 1986; 20:201-30.
11. Ma N, Adachi Y, Hiraku Y, Horiki N, Horiike S, Imoto I, Pinlaor S, Murata M, Semba R, Kawanishi S. Accumulation of 8-nitroguanine in human gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection. Biochem Biophys Res Commun 2004;319:506-10.
12. Horiike S, Kawanishi S, Kaito M, Ma N, Tanaka H, Fujita N, Iwasa M, Kobayashi Y, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Wang J, Adachi Y. Accumulation of 8-nitroguanine in the liver of patients with chronic hepatitis C. J Hepatol 2005;43:403-10.
13. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory disease in relation to inflammation-related carcinogenesis. Biol Chem 2006;387:365-72.

注： 本研究は、2008年 《International Journal of Cancer》に掲載予定。

作成日： 2008年2月20日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2008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： 大槻 勝紀 
所属機関名： 大阪医科大学
所属部署： 医学部・解剖学教室 職名： 教授
〒 569-8686
所在地： 大阪府高槻市大学町2-7
電話： 072-684-6411 内線： _____

1. 助成金額： _____ 1,000,000 円

2. 研究テーマ

—日中医学協会助成事業— **磁気温熱により誘導される抗腫瘍免疫に関する研究**

3. 成果の概要 (100字程度)

移植乳癌の持つラットに、局所的に免疫アジュバントを投与した後、温熱療法を実施した。
移植巣を有意に縮小させただけでなく、消失させた症例も観察された。温熱により変性・壊死が誘導され、
分解・吸収された腫瘍細胞の成分は抗原として免疫系を刺激し、腫瘍に対する免疫反応が引き起こされた。

※発表論文等

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 大槻 勝紀 職名： 教授

所属機関： 大阪医科大学 部署： 医学部・解剖学教室

中国側研究者氏名： 唐 勁天 職名： 副所長

所属機関： 清華大学 部署： 工程物理系医学物理・工程研究所

磁気温熱により誘導される抗腫瘍免疫に関する研究

日本研究機関名	大阪医科大学解剖学教室
研究者氏名	大槻 勝紀
中国所属機関	清華大学医学工学研究所
共同研究者名	唐 劲天
研究者氏名	郝 丽莉

Antitumor immunology induced by the magnetic induced hyperthermia

Abstract

The present study was carried to test effectiveness and mechanisms in treatment of mammary cancer using our magnetic induction hyperthermia system (MIHS). We found out that the thermotherapy at 50~55 °C by using MIHS is effective to inhibit the growth of mammary cancer. Furthermore, infiltration of the cancers by a large number CD4+ and CD8+ T cells indicates that there are various antitumor immunological responses. Such effects, however, were attenuated when immunoadjuvant was locally administered before thermotherapy. Such a combination of hyperthermia and immunoadjuvant resulted in not only the decrease in volume, but also the disappearance of cancers.

Key Words: Hyperthermia, magnetism, cancer, immunology, mammary

Introduction

Hyperthermia, as one of the procedures for treatment of malignant tumor, can directly kill the tumor cells, or at least inhibit their growth^{1,2}. Results *in vivo* in recent years have shown that the tumor-killing effects are related to the activation of various antitumor immunological responses³. It is considered that the components derived from the degeneration and necrosis of tumor cells induced by hyperthermia can be absorbed by the organisms⁴. These components in return can act as antigens that activate immunological system, which results in various antitumor effects. Those researches, however, are mostly focused on the conventional thermotherapy of which the temperature is about 43 °C,

combined with biotherapy, chemotherapy, or radiotherapy⁵. The present research was aimed to find out the ideal conditions between antitumor immunological responses and hyperthermia induced by magnetic irradiation.

Materials and Methods

The experiments were carried out in Wistar rats of 180~220 grams in body weight. The mammary carcinoma bearing rats were prepared by inoculation of 0.2 ml of Walker-256 cells (2×10^6 /ml), a cell line derived from the same lineage of Wistar rats in order to avoid immunological rejection. The cancer-bearing rats were divided into six groups (Table 1). In 7 days after the inoculation, two thermo-seeds that generate heat in magnetic field were implanted into the cancer on the right flank. To attenuate immunological response, immunoadjuvant was injected into the cancers of both flanks. The animals were irradiated in 3 days after the implantation. The cancer volumes were measured every 3 days. All tissue samples were collected in 14 days after the irradiation, observed morphologically and immunohistochemically.

Table 1 Groups and experiments of cancer-bearing rats

Days		1st	7th	8th	10th
Experiments		Inoculation	Thermo-seeds	Immuno-adjutant	Irradiation
G1 [#]	R*	Yes	Yes	No	No
	L	Yes	No		
G2	R	Yes	Yes	No	42~46 °C, 30 min
	L	Yes	No		
G3	R	Yes	Yes	No	50~55 °C, 30 min
	L	Yes	No		
G4	R	Yes	Yes	Yes	42~46 °C, 30 min
	L	Yes	No		
G5	R	Yes	Yes	Yes	50~55 °C, 30 min
	L	Yes	No		
G6	R	Yes	No	Yes	No
	L	Yes	No		

*: R, right; L, left. #: 6 rats were divided into each group.

Results

Measurement of temperature within and around the cancers showed that the present methods can raise the temperature in the cancers as expected (Table 2). The

volumes of cancers treated with the higher temperature (group G1) were smaller than the controls (Table 3), although not significantly. The results indicate that magnetic induction hyperthermia system MIHS can generate hyperthermia enough for the present study. To attenuate the therapeutic effects while suppressing the damages to normal tissues around the cancers, immunoadjuvant was injected on both flanks before the irradiation in order to facilitate immunological response. It was found that the cancers were completely disappeared in 3 rats of group G5 (Table 3). In addition, the average volume of group G5 was significantly smaller than the other groups. The upper results indicate that the present system is suitable for treatment of the mammary cancer.

In group G5 rats treated with hyperthermia plus immunoadjuvant, the cancers on both flanks were infiltrated by a large amount of macrophages and lymphocytes. In addition, a relative clear margin could be observed between normal and malignant tissues. Results

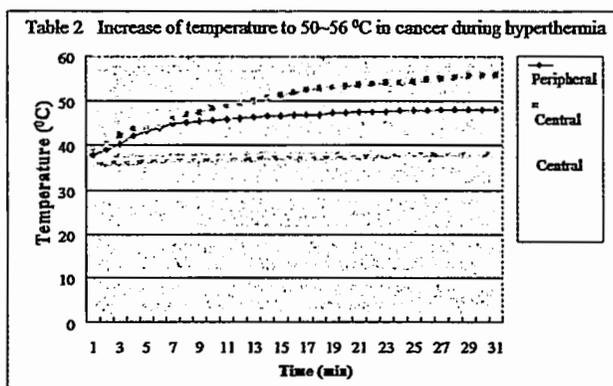


Table 3 Changes of cancer volumes on the right flank before and after hyperthermia

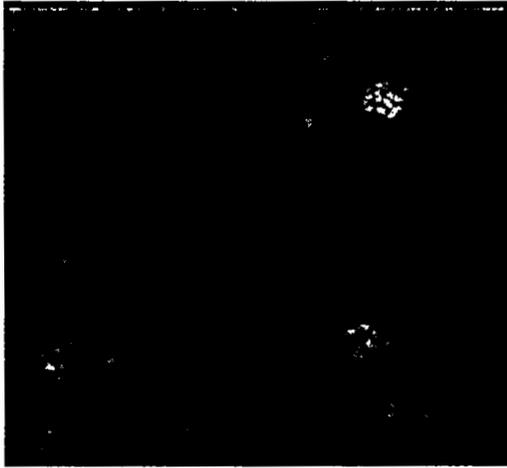
Groups	Number of rats	Averages of cancer volumes		
		Days after inoculation		Rate of final changes (%)
		10th Day	24th Day	
G1	6	2.75 ±1.23	3.07 ±0.76	11.6
G2	6	2.44 ±1.01	2.35 ±0.89	- 3.6
G3	6	2.83 ±0.66	2.34 ±0.49	- 17.3
G4	6	2.23 ±0.53	2.03 ±0.47	- 8.9
G5	6	2.86 ±0.34	1.87 ±0.33*	- 34.6
G6	6	2.62 ±0.76	3.03 ±0.75	25.6

Table 4 Changes of cancer volumes on the left flank before and after hyperthermia

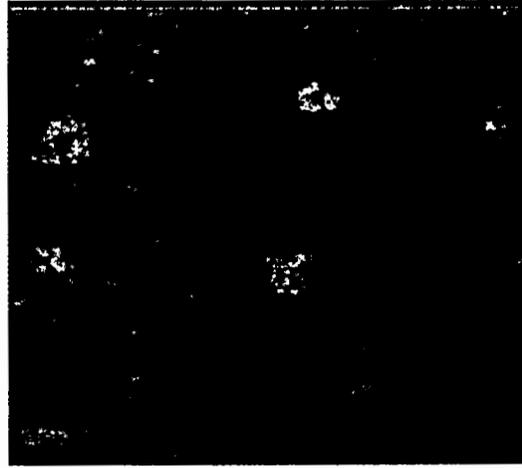
Groups	Number of rats	Averages of cancer volumes		
		Days after inoculation		Rate of final changes (%)
		10th Day	24th Day	
G1	6	1.60 ±0.43	1.81 ±0.39	13.0
G2	6	1.53 ±0.48	1.52 ±0.42	- 0.6
G3	6	1.79 ±0.61	1.56 ±0.55	- 12.8
G4	6	1.43 ±0.41	1.42 ±0.32	- 0.6
G5	6	1.67 ±0.33	0.67 ±0.76 *	- 60.1
G6	6	1.76 ±0.3	2.09 ±0.63	18.0

Table 5 The number of CD4⁺ T cell & CD8⁺ T cell in each group (cells/HPF ± s)

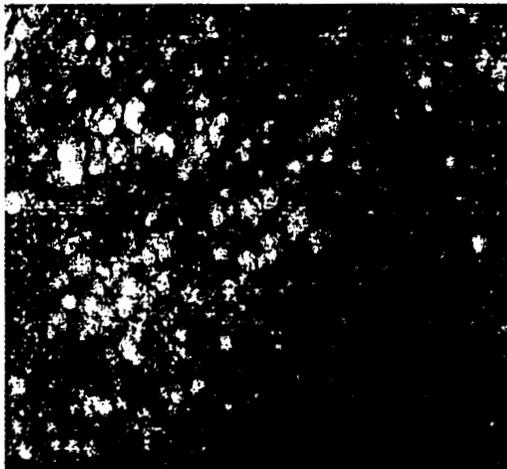
Groups	Number of rats	CD4 ⁺ T cell	CD8 ⁺ T cell
G1	6	1.43 ±0.65	1.57 ±0.88
G2	6	7.92 ±1.98	8.42 ±2.47
G3	6	8.51 ±2.06	10.31 ±2.23
G4	6	9.01 ±1.22	6.91 ±1.09
G5	6	16.52 ±1.26	19.18 ±2.31
G6	6	2.32 ±0.81	3.17 ±0.47



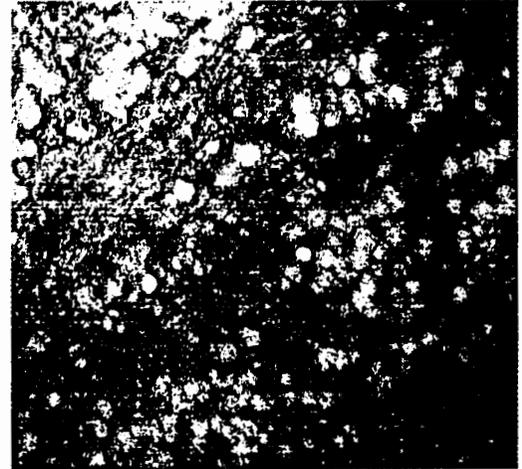
Control group G1 (x400)



Immuno-adjuvant alone group G6 (x400)



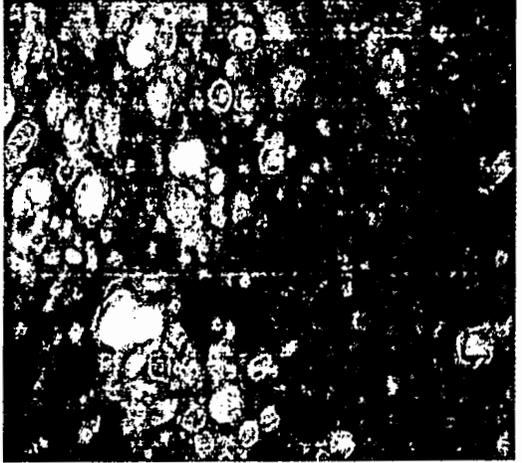
42~46 °C heating alone group G2 (x100)



50~55 °C heating alone group G3 (x100)

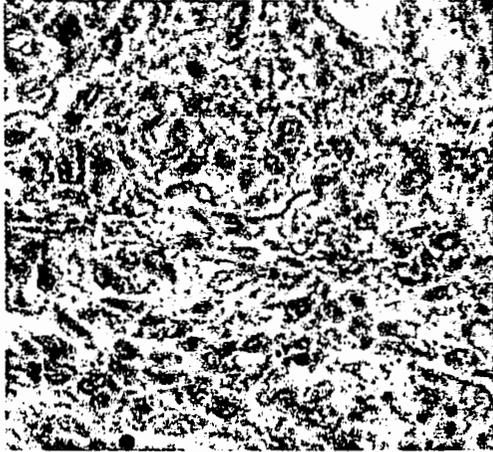


42~46 °C plus immuno-adjuvant group G4 (x400)

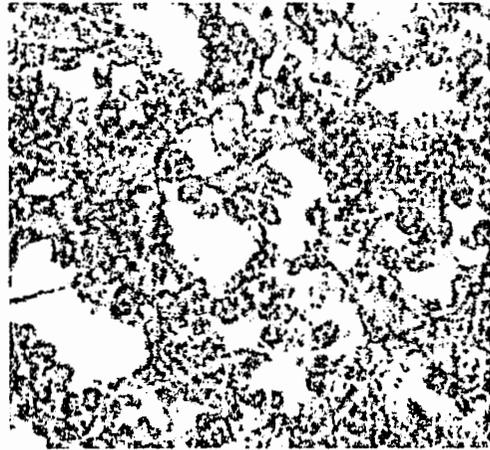


50~55 °C plus immuno-adjuvant group G5 (x400)

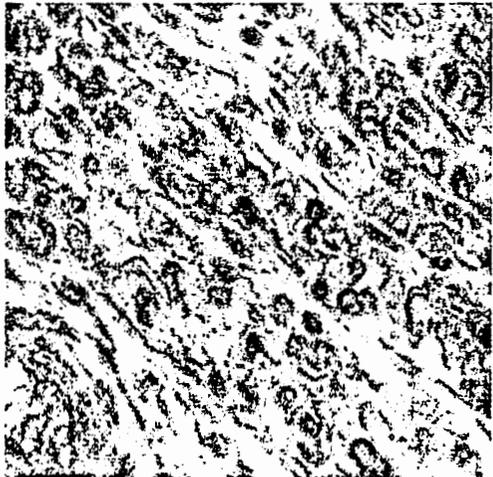
Fig. 1 Identification of CD4+ T cells following hyperthermia



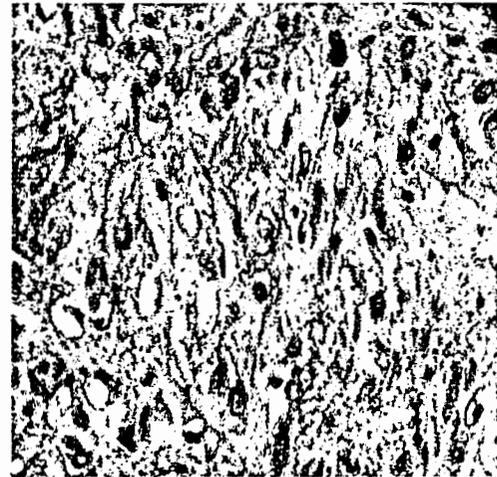
Control group G1



Immunoadjuvant alone group G6



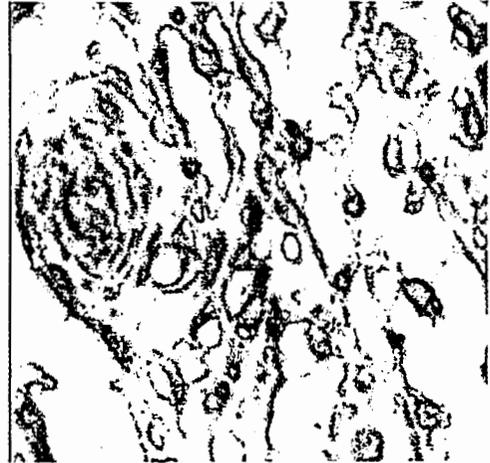
42~46 °C heating alone group G2



50~55 °C heating alone group G3



42-46 °C plus immunoadjuvant group G4



50~55°C plus immunoadjuvant group G5

Fig. 2 Identification of CD8+ T cells following hyperthermia (x300)

from the immunological examinations showed that while there were only few CD4+ T cells in controls (Fig. 1), their numbers were significantly increased in the treated groups, especially groups G5 (Table 5). A similar tendency was also observed in the expression of CD8+ T cells (Fig. 2, Table 5). It is important to note that although the thermo-seeds were not implanted on the left flank, the average volume of cancers in group G5 was still significantly decreased. It is suggested that the immunological responses induced by hyperthermia can influence the cancers on the other part of the body.

Discussions

It is generally recognized that hyperthermia can kill the cancer cells directly, accompanied by induction of various immunological responses. The direct proofs are the inhibition of growth and disappearance of the tumor³. In our experiment, we found out that the thermotherapy at 50~55 °C by using the magnetic induction hyperthermia system (MIHS) is effective to inhibit the growth of mammary cancer. Furthermore, infiltration of the cancers by a large number of CD4+ and CD8+ T cells indicates that there are various antitumor immunological responses. Such effects, however, were attenuated when immunoadjuvant was locally administered before thermotherapy. Such a combination of hyperthermia and immunoadjuvant resulted in not only the decrease in volume, but also the disappearance of cancers. Further studies are necessary to improve the efficiency of our system and clarify the immunological mechanisms involved.

References

- 1 Deger S, Boehmer D, Turk I, et al. Interstitial hyperthermia using self-regulating thermoseeds combined with conformal radiation therapy. *European Urology*, 2002, 42:147-153.
2. Tucker RD, Platz CE, Huidobro C, et al. Interstitial thermal therapy in patients with localized prostate cancer :histologic analysis. *Urology*, 2002, 60:166.
3. 胡润磊, 刘 轩, 唐劲天等, 肿瘤局部热疗与抗肿瘤免疫. *中国免疫学杂志*, 2006, 22:684-686.
- 4 Park BH, Koo BS, Kim YK, et al. The induction of hyperthermia in rabbit liver by means of duplex stainless steel thermoseeds. *Korean Journal of Radiology*, 2002, 3:98-104.
- 5 Steeves RA, Murray TG, Moros EG, et al. Concurrent ferromagnetic hyperthermia and 125I brachytherapy in a rabbit choroidal melanoma model. *Int J Hyperthermia*, 1992, 8:443-449.

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008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： 森永 謙二 
所属機関名： (独)労働安全衛生総合研究所
所属部署： 健康障害予防研究グループ 職名： 部長
〒 214-8585
所在地： 川崎市多摩区長尾6-21-1
電話： 044-865-6111 内線： 316

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者のコホート調査

3. 成果の概要 (100字程度)

浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者（クリソタイル曝露）の健康診断の結果、552人中石綿肺の有所見は43人（8.9%）、胸膜病変有所見者は144人（32.0%）であった。過去2年間（2005-2006）に石綿作業の盛んであった6つの鎮の住民の死亡者2966人の死因解析を行い、女の肺がんの標準化死亡割合SPMRは石綿の低濃度群 0.51、中濃度曝露群 1.23、高濃度曝露群 1.49(95%CI: 1.04-2.07)で、量－反応関係が認められた。

※発表論文等

第16回石綿・中皮腫研究会（2008.10.25 山口）発表予定

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 森永 謙二 職名： 部長
所属機関： (独)労働安全衛生総合研究所 部署： 健康障害予防研究グループ
中国側研究者氏名： 張 幸 職名： 院長・所長
所属機関： 浙江省医学科学院 部署： 衛生学研究所

浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者のコホート調査

研究者氏名 森永 謙二
研究機関 (独) 労働安全衛生総合研究所
健康障害予防研究グループ部長
共同研究者 張 幸
研究機関 浙江省医学科学院
衛生学研究所 部長

要旨

浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者(クリソタイル曝露)の健康状況を把握するために、健康診断及び疫学調査を行った。健康診断の結果、552名中石綿肺(1型以上)の有所見は43人(8.88%)、胸膜病変(胸膜プラーク及、びまん性胸膜肥厚)の有所見者は144人(32.00%)であった。

過去2年間(2005-2006)石綿作業の盛んであった慈溪市の6つの鎮での死亡者2966人の死因及び石綿曝露歴を調査し、以下の結果が得られた。男性は石綿の低曝露群で、肺がん、呼吸系疾患の標準化死亡割合SPMR(期待値は同観察期間の慈溪市の死亡統計より算出)がそれぞれ1.10、1.33(95%CI 信頼区間: 1.10-1.60)、中及び高濃度曝露群でそれぞれ0.85、1.88(同: 1.27-2.68)で、呼吸系疾患が有意に高かった。女性は低曝露群の肺がん、呼吸系疾患のSPMRはそれぞれ0.51、1.69(同: 0.89-2.89)、中曝露群のそれらのSPMRはそれぞれ1.23(同: 0.88-1.69)、1.44(同: 1.03-1.96)、高曝露群のSPMRはそれぞれ1.49(同: 1.04-2.07)、1.64(99%CI: 1.17-2.24)であり、量-反応関係が認められた。石綿曝露なし群の各主要死因別SPMRは男の結腸・直腸等がん、女の食道がんでは有意に低かったが、それ以外ではほぼ1に等しく、死因精度に慈溪市と対象とした6つの鎮と大差がないことを示唆する。

以上のデータは、長期にわたってクリソタイルに曝露すると喫煙経験のほとんどない女性については石綿曝露量が多いほど肺がんのリスクが高くなる結果が得られた。

Key Words クリソタイル, 肺がん, 疫学調査, 石綿肺, 胸膜病変

目的

浙江省寧波近辺では石綿加工業は1958年から始まり、70年代~80年代は石綿生産加工の最盛期であった。原料のほとんどはクリソタイルで、四川省、青海省などの国内からとカナダな

ど国外からも輸入していた。90年代から経済発展様式の変化により、石綿の製品加工及び生産企業は相次いで廃業した。1997年に、過去に石綿工場に従事し、または家庭内で石綿紡織作業に従事していた住民を対象に、石綿作業歴、喫煙歴をアンケート調査すると共に、一部の対象者については胸部レントゲン検査を行い、石綿肺及び胸膜プラーク有所見者の有無を調べた結果では、女性795人中、石綿肺有所見者2人(0.25%)、胸膜プラーク有所見者10人(1.26%)であった。女性の喫煙率は1.7%であった。

石綿曝露の影響は曝露開始より20年以上の潜伏期間を経て、石綿肺、胸膜プラーク、びまん性胸膜肥厚、肺がん、中皮腫が発症することが知られている。また10年前に比べて、中国でも石綿による健康被害への関心が高まりつつある。

当初の計画では、10年前のアンケート対象者のコホート調査を実施する予定で、まず住民の協力を得ることを目的に、希望者を対象に胸部レントゲン、血液検査等の健康診断を実施することとし、あわせて生死の状況を調べることにした。しかし、健康診断を実施する段階で、10年前のアンケート対象者全員を追跡することは困難であることが判明したため、慈溪市のなかでも、家庭内での石綿作業が盛んであり、石綿工場があった6つの鎮の住民の死亡者の死因と、遺族への聞き取りで石綿曝露の有無を調べ、石綿曝露者の死因解析を行うことにした。

研究対象及び方法

1. 健康診断

慈溪市の3社の元石綿工場の従業員で、38-89歳の567名を研究対象とした。健康診断をする前にアンケート調査を行い、それぞれ元石綿作業従業員の個人情報、職業歴、疾患既往歴、生活習慣(喫煙と飲酒)などを含む基本情報を収集した。健康診断の項目は血圧、内科、心電図、超音波、尿検査、血液検査、胸部X線写真、肺機能検査などを含む。胸部X線写真の読影は5名の塵肺症専門家が《中国塵肺症診断標準GBZ70-2002》に従って診断した。

受診者総数は男性107人、女性460人で、40-49歳42人(7.4%)、50-59歳129人(22.8%)、60-69歳242人(42.7%)、70-79歳126人(22.2%)、80-89歳25人(4.4%)であった。勤続年数は10年以下30人(5.3%)、10-19年101人(17.8%)、20-29年169人(29.8%)、30年以上259人(45.7%)。職種は手紡織が多く、247人(43.6%)であった。研究対象の中10人は胸部X線写真を撮らず、6人はアンケート調査を受けていないため、有効研究対象者数は552人である。

2. 死因調査

慈溪市の2005年～2006年の全死亡者のうち、死亡年齢は30-79歳で、居住地が匡堰、観海衛（鳴鶴）、橋頭、逍林、周巷（小安を含む）、宗漢の6つの鎮の者は2966人であった。これらの死亡者の家庭を訪問し、統一調査カードにもとづいて、職業歴、疾患既往歴、吸煙歴、周辺の石綿工場の有無などを調査した。職歴による、石綿曝露程度は、a) 石綿曝露なし群、b) 低曝露群、c) 中曝露群、d) 高曝露群とした。石綿曝露程度の定義は以下の通りである。

- a) 曝露なし：本人或いは親族が石綿に曝露する仕事に従事することがない、居住地の周りも石綿扱い工場がない。
- b) 低曝露：本人が石綿に曝露する仕事に従事する時間が一年未満である、或いは親族が石綿曝露の仕事に従事する、或いは石綿工場の隣に住む。
- c) 中曝露：本人が石綿曝露の仕事に従事する時間が10年以下である。
- d) 高曝露：本人が石綿曝露の仕事に従事する時間が10年以上である。

死因の分類はWHO 国際分類 ICD-10 を用いた。主要死因別の期待値は2005-2006年の《慈溪市居住民病傷死亡登記データ》を用いた。すべてのデータはSPSS 13.0 統計プログラムで分析を行った。標準化死亡割合SPMRの95%信頼区間(CI: Confidence Interval)の計算は、British Medical Journal のCIA(Confidence Interval Analysis)を用いた。

結果

1. 石綿肺、胸膜病変（胸膜プラーク、びまん性胸膜肥厚）の有所率

今回の健康診断で石綿肺有所見は43例(8.88%)であった。その内訳はI期24名(5.33%)、II期10名(2.22%)、III期6名(1.33%)であった(表1)。

表1 石綿肺の発病状況

期別	有所見者数(男)	%	有所見者数(女)	%
0	91	89.2	367	81.6
0+	8	7.8	43	9.6
I	3	2.9	24	5.3
II	0	0	10	2.2
III	0	0	6	1.3
合計	102	100	450	100

胸膜プラークの有所見者は144例(32.00%)であった(表2)。

表 2 胸膜病変の発病状況

胸膜病変	男	%	女	%
なし	70	68.63	306	68.00
あり	32	31.37	144	32.00
計	102	100	450	100

肺機能検査を実施した 552 名中、軽度障害 201 (36.4%)、中等度障害 88 (15.9%)、重度障害 23 (4.2%) であった。

2. 元石綿曝露死亡者の死因調査

慈溪市のなかの匡堰、観海衛 (鳴鶴)、橋頭、逍林、周巷 (小安を含む)、宗漢の 6 つの鎮の死亡者で、2005 年～2006 年の全死亡者のうち、死亡年齢が 30-79 歳のものは 3078 人であった。2966 人 (男 1821, 女 1145)、であった。これら死亡者のうち石綿曝露のなかったものは 1603 人 (男 1066, 女 537)、石綿曝露歴があったものは 1363 人 (男 755, 女 608) であった。職業歴不明 112 人は以下の解析の対象からは除外した。

曝露歴の程度は、男では低濃度曝露群 577 人 (全対象者の 31.7%) が最も多く、次いで中程度曝露群 94 人 (同 5.2%)、高濃度曝露群 17 人 (同 0.9%) であったのに対し、女では低濃度曝露群 42 人 (全対象者の 3.7%)、中程度曝露群 297 人 (同 25.9%)、高濃度曝露群 224 人 (同 19.6%) で、中及び高濃度群に多かった (表 3)。

表 3 調査対象の石綿被曝分量分布

性別	石綿曝露歴	頻度	%
男性	なし	1066	58.5
	低濃度曝露群	577	31.7
	中濃度曝露群	94	5.26
	高濃度曝露群	17	0.9
	計	1821	100.0
女性	なし	537	46.9
	低濃度曝露群	42	3.7
	中濃度曝露群	297	25.9
	高濃度曝露群	224	19.6
	計濃度曝露群	1145	100.0

石綿曝露群では男性の主要死因の SPMR のなかで、呼吸系疾患が 1.26 (95%CI) と有意に高か

表4 石綿曝露の有無別主要死因別SPMR

性別	疾病分類	6つの鎮(全死因)				石綿曝露なし				石綿曝露あり			
		死亡総数	SPMR	95%CI	死亡総数	SPMR	95%CI	死亡総数	SPMR	95%CI	死亡総数	SPMR	95%CI
男性	肺がん	437	0.99	0.90-1.09	156	0.99	0.83-1.15	281	0.99	0.88-1.12			
	呼吸系疾患	451	1.19	1.08-1.31	140	1.06	0.89-1.26	311	1.26	1.12-1.41			
	肝がん	459	1.02	0.92-1.11	174	1.03	0.88-1.19	285	1.01	1.89-1.13			
	胃がん	234	1.05	0.91-1.19	91	1.14	0.91-1.40	143	0.99	0.83-1.17			
	食道がん	86	1.00	0.80-1.24	31	1.00	0.67-1.42	55	1.00	0.75-1.30			
	結腸、直腸等のがん	26	0.71	0.46-1.04	6	0.46	0.17-1.01	20	0.84	0.51-1.30			
	その他悪性腫瘍	153	0.89	0.75-1.05	53	0.85	0.63-1.11	100	0.92	0.74-1.12			
	循環器系疾患	579	0.97	0.89-1.05	218	1.02	0.89-1.17	361	0.94	0.84-1.04			
	その他非腫瘍性疾病	506	0.93	0.85-1.01	197	0.95	0.82-1.09	309	0.92	0.81-1.03			
	肺がん	268	1.22	1.08-1.38	59	1.12	0.85-1.45	209	1.25	1.09-1.43			
	呼吸系疾患	417	1.16	1.5-1.28	68	0.77	0.59-0.97	349	1.29	1.16-1.43			
	肝がん	180	1.05	0.90-1.22	53	1.22	0.91-1.59	127	1.00	0.83-1.19			
	胃がん	127	1.05	0.87-1.25	31	1.05	0.71-1.49	96	1.05	0.84-1.28			
	食道がん	10	0.37	0.17-0.68	3	0.47	0.09-1.38	7	0.34	0.13-0.69			
結腸、直腸等のがん	32	0.89	0.60-1.26	9	1.00	0.45-1.89	23	0.85	0.54-1.28				
その他悪性腫瘍	235	0.96	0.84-1.09	62	0.97	0.74-1.24	173	0.96	0.81-1.11				
循環器系疾患	510	0.88	0.80-0.96	138	0.98	0.82-1.16	372	0.85	0.76-0.94				
その他非腫瘍性疾病	379	0.95	0.85-1.05	114	1.11	0.91-1.33	265	0.89	0.78-1.00				

期待値は2005-2006 慈溪市の死亡統計より算出

表5 石綿曝露程度別の主要死因別SPMR

性別	疾病分類	低濃度				中濃度				高濃度				中+高濃度			
		死亡 総数	SPMR	95%CI	死亡 総数	SPMR	95%CI										
男性	肺がん	95	1.06	0.86-1.30	10	0.67	0.32-1.23	5	1.91	0.62-4.45	15	0.85	0.47-1.41				
	呼吸系疾患	111	1.33	1.10-1.60	23	1.79	1.13-2.69	7	2.23	0.89-4.59	30	1.88	1.27-2.68				
	肝がん	87	1.06	0.84-1.31	11	0.80	0.40-1.44	1	0.52	0.01-2.90	12	0.77	0.39-1.34				
	胃がん	38	0.83	0.58-1.14	6	0.79	0.28-1.72	1	0.72	0.01-4.01	7	0.78	0.31-1.60				
	食道がん	10	0.58	0.28-1.07	7	2.38	0.95-4.91	0	0	0-8.02	7	2.06	0.82-4.24				
	結腸、直腸等のがん	8	1.06	0.45-2.08	3	2.29	0.47-6.69	0	0	0-14.2	3	1.91	0.39-5.58				
	その他悪性腫瘍	25	0.75	0.48-1.11	11	2.02	1.01-3.61	0	0	0-4.10	11	1.73	0.65-3.10				
	循環器系疾病	113	0.91	0.75-1.10	14	0.70	0.38-1.18	1	0.25	0-1.38	15	0.63	0.35-1.03				
	その他疾病	90	0.95	0.76-1.17	9	0.59	0.26-1.11	2	0.89	0.06-3.21	11	0.63	0.31-1.12				
	肺がん	2	0.51	0.06-1.83	39	1.23	0.87-1.69	35	1.49	1.04-2.07	74	1.34	1.05-1.68				
女性	呼吸系疾患	13	1.69	0.89-2.89	68	1.44	1.12-1.83	66	1.64	1.27-2.09	34	1.53	1.28-1.82				
	肝がん	2	0.69	0.08-2.50	22	0.90	0.56-1.36	14	0.87	0.47-1.46	36	0.89	0.62-1.23				
	胃がん	3	1.40	0.27-3.91	19	1.12	0.67-1.75	12	0.93	0.48-1.62	31	1.04	0.70-1.47				
	食道がん	0	0.00	0-6.47	1	0.25	0-1.41	1	0.34	0-1.90	2	0.29	0.03-1.05				
	結腸、直腸等のがん	0	0.00	0-5.35	5	1.01	0.32-2.35	2	0.55	0.06-1.98	7	0.81	0.32-1.68				
	その他悪性腫瘍	5	1.23	0.40-2.87	34	0.98	0.68-1.37	19	0.87	0.52-1.36	53	0.94	0.70-1.23				
	循環器系疾病	12	1.03	0.53-1.80	61	0.77	0.59-0.99	50	0.78	0.58-1.03	111	0.78	0.64-0.93				
	その他疾病	5	0.60	0.19-1.41	48	0.88	0.64-1.17	25	0.64	0.41-0.94	73	0.78	0.61-0.98				

期待値は2005-2006 慈溪市の死亡統計より算出

ったが、肺がんは0.99で高くなかった(表4)。他方、女性のSPMRで有意に高かったのは肺がんの1.25(95%CI)、呼吸系疾患の1.29(95%CI)であった。曝露程度別にみると、男性の呼吸系疾患のSPMRは低濃度曝露群1.33(同1.10-1.60)、中濃度曝露群1.79(同1.13-2.69)、高濃度曝露群2.23(同0.89-4.59)と曝露濃度が高くなるにつれてSPMRも大きくなり、いずれも有意に高かった、肺がんでは同様の傾向は観察されなかった(表4)。他方、女性では肺がんのSPMRは、低濃度曝露群0.51、中濃度曝露群1.23(同0.87-1.69)、高濃度曝露群1.49(同1.04-2.07)と曝露濃度が高くなるにつれてSPMRも大きくなり、高濃度曝露群では有意に高かったが、呼吸系疾患では同様の傾向は観察されなかった(表5)。

結論

1. 1970年代に石綿作業が盛んであった慈溪市の元石綿工場従業員を対象とした健康診断での石綿肺(1型以上)の有所見者は男性2.9%、女性8.9%、胸膜プラークやびまん性胸膜肥厚の胸膜病変の有所見率は男性31.4%、女性32.0%であった。
2. 慈溪市のなかの匡堰、観海衛(鳴鶴)、橋頭、逍林、周巷(小安を含む)、宗漢の6つの鎮では1970年代に、クリソタイル(温石綿)の原石を手紡績でほぐしたり、石綿紡織に従事する者が大勢いた。2005-2006年の2年間の6つの鎮の全死亡者の死因及び石綿曝露歴及び石綿曝露の程度等を調べ、同観察期間の慈溪市全体の死亡統計を用いて、これら6つの鎮の住民の標準化死亡割合を調べた結果、女性の肺がんでは石綿曝露濃度が高群ほど高くなる、量-反応関係が観察され、とくに石綿高濃度曝露群ではSPMR1.29(95%CI:1.12-1.41)と有意の過剰死亡が観察された。これら対象者のほとんどは非喫煙者であることを考慮すると、クリソタイルの曝露単独でも(喫煙との相乗効果がなくとも)肺がんのリスクが高まることを示すと考えられる。

参考文献

- 孫統達、施南峰、他：農村石綿加工業危害分析及び制御。中国職業医学 1997、15(3)：164-166。
- 森永謙二、張幸：浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者の健康影響調査 1998、13(3)：14
- 孫統達、朱勝軍：石綿と接触した粉塵量と石綿肺発病の分量反応関係の研究。中国工業医学雑誌 2001、14(3)：148-149。

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2008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： 加藤智啓 

所属機関名： 聖マリアンナ医科大学

所属部署： 大学院 医学研究科 疾患プロテオーム・分子病治療学 職名： 教授

所在地： 〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1

電話： 044-977-8111 内線： 3522

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

ペプチドミクスを用いた膠原病病態関連ペプチドの日中患者間相違性の解析

3. 成果の概要 (100字程度)

本研究では、強皮症など自己免疫疾患において、質量分析等の新技術を使って血清中の小ペプチドを対象に疾患関連分子の探索を試み確立した。強皮症特異的ペプチドの検出解析を行い、またペプチドプロファイルが日中で一部異なる可能性を示した。現在検出ペプチドの同定を行っている。

※発表論文等

未 (追加実験後半年後を目途に投稿予定)。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 加藤 智啓 職名： 教授

所属機関： 聖マリアンナ医科大学 部署： 大学院 医学研究科 疾患プロテオーム・分子病治療学

中国側研究者氏名： 向 陽 職名： 教授

所属機関： 湖北民族学院医学院附属医院 部署： リウマチ科

ペプチドミクスを用いた膠原病病態関連 ペプチドの日中患者間相違性の解析

研究者氏名 加藤 智啓
日本研究機関 聖マリアンナ医科大学 教授
共同研究者氏名 向 陽
中国研究機関 湖北民族学院医学院附属医院
教授/副院長/風湿病研究所主任

要 旨

強皮症、全身性エリテマトーデスなどいわゆる膠原病すなわち全身性自己免疫疾患の多くは、厚生労働省の特定疾患にも指定されているなどの難治性疾患である。原因不明で早期診断指標や根本的治療法は確立されていない。そのため、診断や治療の手がかりとなりえる小ペプチドの探索する手段を確立し、実際に応用することを試みた。具体的には、血清中に多数存在するアミノ酸残基数が数十以下のペプチドの中で特に分子量 5kD 程度以下のペプチドを対象として、疎水結合あるいはイオン結合などを利用し、血清中からペプチドを分離精製した。さらに質量分析によりイオン化したペプチドを質量と共に直接検出を行った。強皮症を中心に検出解析を行なった結果、強皮症特異的なペプチドの検出が可能であることが判明した。さらに、その一部はアミノ酸配列も同定可能であった。さらに中国における強皮症患者血清を検討したところ、ペプチドプロファイルに若干の違いが認められた。現在、そのペプチド配列の同定を試みている。今後、症例数を増やしての検討と、その病態的意義の検討が必要である。技術的側面からみると、これまでは検出の困難さから血清小ペプチドは疾患関連疾患の探索となりうることはほとんどなく、その探索手法を格段に進ませることができたと言える。

Key Words ペプチドミクス、質量分析、膠原病、強皮症、ペプチド

緒 言：

強皮症、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎あるいは関節リウマチといった全身性自己免疫疾患、いわゆる膠原病は原因不明の疾患である。多くは厚生労働省の特定疾患にも指定されているなど、一般に難治性かつ予後不良である。病因解明と治療法および早期診断法の確立が社会的要請である。このような背景は中国でも同様であり、我々はこれまで中国より多くの研究員を受け入れ、共同でこの課題に取り組んできた。膠原病は全身性自己免疫疾患であり、その特徴として自己成分に対する抗体である自己抗体の産生と自己反応性T細胞の存在を伴うことから、それらの検出と解析を中心に研究を行ってきた（参考文献 1-6, 7, 8, 15）。これら一連の成果は主に候補分子を設定しての研究〈候補分子アプローチ〉によるものである。

これに対して、近年、特定候補分子を設定せずに、疾患関連分子を網羅的に探索し、対象を絞っていく〈網羅的アプローチ〉が急速に進歩を遂げた。疾患感受性などを評価する遺伝子レベルの一塩基多型解析、疾患で発現されている mRNA を検出解析するいわゆる DNA アレイ、そして、疾患で増減あるいは修飾を受ける蛋白質を解析するプロテオミクスである。病因不詳の疾患の解明を目指した研究には、従来の候補分子的アプローチに加えて、特定の分子を設定しないで疾患関連分子を検索していく方法、すなわち仮説フリーの網羅的アプローチも必要かつ有効となる。そこで、我々は、これまで自己抗原など蛋白質を中心に研究を進めてきたことから、上記の全身性自己免疫疾患にこのプロテオミ

クスを応用することを計画した。そして、本研究の申請者/共同研究者を中心にこれを進め、関節リウマチと変形性関節症における自己抗原の探索や全身性血管炎、関節リウマチにおけるシトルリン化抗体の探索など多くの成果を挙げてきた（参考文献 7, 8, 11-14, 16）。

さらに最近になり、蛋白質が分解してできる小ペプチドを対象とした網羅的スクリーニング法が出現した。いわゆるペプチドミクスである。本研究において、申請者/共同研究者はこのペプチドミクスの手法確立を目指し、自己免疫疾患患者中の血清中のペプチドを検索同定する方法を開発した。そして、これにより、全身性自己免疫疾患の病態解明や早期診断に有用なペプチドを得ることを目的とし、さらには同一全身性自己免疫疾患における日中両国での相異性の有無を検討することを目的とした。具体的には、分子量 5kD 程度以下のペプチドは、アミノ酸残基数で 40 強までのペプチドに相当する。これらは、血清中の蛋白質において、アルブミンや免疫グロブリンなど主要な蛋白質を除いた残り 1% 程度のいわゆる deep proteome と呼ばれる部分のさらに一部であり、量的にも微量である。これまでの蛋白質解析手法では、分子量が小さすぎること、微量であることから、検索の対象にならなかった分子群である。我々は疎水性担体などを用いてそれらペプチドを濃縮精製、質量分析によるペプチドの直接的検出を行うことでこの難点を克服した。

対象と方法：

1) 血清ペプチドの分離精製

強皮症と含む自己免疫性疾患患者血清各約 5 μ l から、小ペプチドを直接的に疎水性結合、金属アフィニティー、あるいはイオン結合を利用して、担体付き磁気ビーズに吸着させた。これを洗浄後、結合した小ペプチドを、アセトニトリルを用いて抽出した。蛋白質同定用の分離としては約 150 μ l の血清から分子量別フィルターにより高分子を取り除いた後、前述と同様のペプチドの分離精製を行い同様の方法でペプチドを比較的大量に分離精製した。

2) ペプチドのイオン化と質量測定

上記精製ペプチドを、 α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid などのマトリックスと混合し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization-Time of Flight、MALDI-TOF/TOF) 型質量分析器 (UltraFlex、Bruker社) を用いて、シングルMSモードで、その試料中に含まれる小ペプチドの検出と質量の測定を同時に行った。各試料中で検出されたイオン化ペプチドプロファイルは、ClinProt プログラムを用いたバイオインフォマティクスにより解析し、疾患に特異的なイオン化ペプチドピークを抽出した。

3) ペプチドのアミノ酸配列の同定と合成

これら検出した疾患特異的なペプチドのアミノ酸配列を同定するために、別途大量精製したペプチドを上記質量分析器の Collision-Induced Dissociation (CID) 機能を用いて de novo アミノ酸配列決定を行った。

4) その他

本研究計画は聖マリアンナ医科大学および湖北民族学院医学院附属医院の生命倫理委員会の承認を得ている。

結果：

検定した強皮症患者血清では 5 μ l の血清から MALDI-TOF 型質量分析により 100 個以上のイオン化ペプチドピークが検出された。また、全身性血管炎、全身性エリテマトーデスなど他の自己免疫疾患においても多くのイオン化ペプチドピークが出現しており、この方法によるペプチド分離精製が自己免疫疾患におけるペプチドの網羅的解析に有用であることが判明した。

さらに、強皮症に特異的と考えられるペプチドも検出され、疾患関連ペプチドの検索にも有用な

ことが判明した。

日中間の強皮症患者血清中のペプチドプロファイルの比較では、図1に日本人患者（J）と中国患者（C）との比較の例を示した。図1においては、主要ペプチドピークのうち、同色で示したペプチドピークは両国の患者で認められ、分子量が極めて近いことから同一のペプチドと推定された。他のペプチドピークは必ずしも一致しなかった。MALDI-TOF/TOF型質量分析器を用いたペプチド同定では、日本人患者で高頻度、高強度で認められたペプチドピークのひとつである質量1864のペプチドが補体第3成分のf断片であるペプチドからカルボキシル末端のアルギニン残基が離脱したペプチド（SSKITHRIHWESASLL）であることが判明した（図2）。また、さらにカルボキシル末端のアミノ酸残基が様々に欠如した派生ペプチド群が検出された、そのほか、補体第4成分の断片でかつメチル化されたペプチドなどが含まれていた。興味深いことには、メチル化されていない同配列の補体第4成分の断片には強皮症特異性はなく、側鎖修飾の違いが疾患特異性に貢献していることが判明した。日本人患者と中国人患者で共通に認められるペプチドピーク（図中矢印）のペプチド配列の決定を現在試みているが、いまだ同定に至っていない。そのペプチドのアミノ酸残基配列の同定を行っている。

図1 日中強皮症患者血清中ペプチド検出と比較

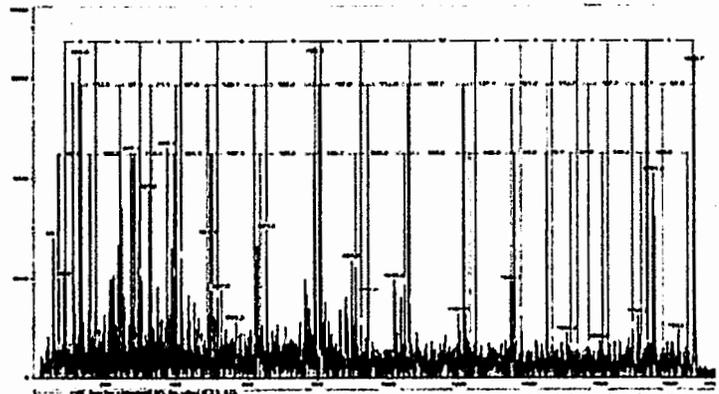
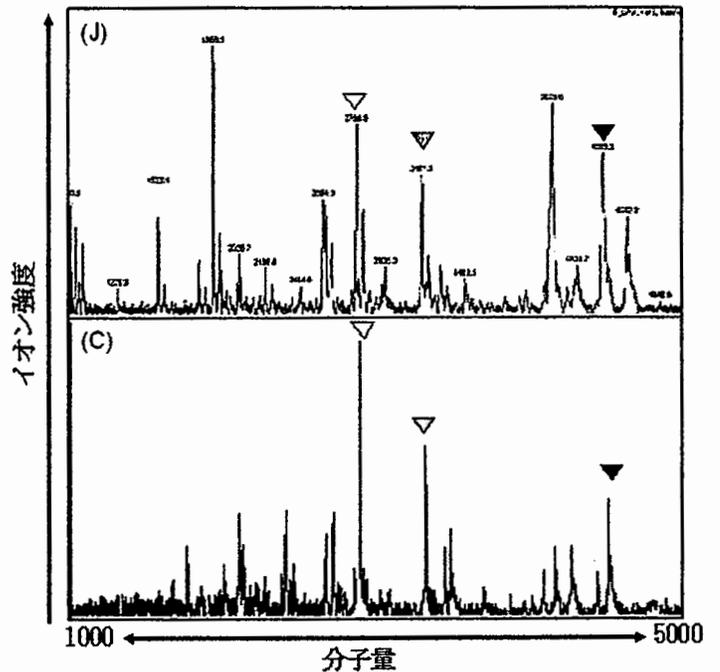


図2 質量1864ペプチドのアミノ酸配列同定

考察：

本研究は、申請者と共同研究者とで連続と続けてきた疾患プロテオミクス・ペプチドミクス研究のひとつである。近年、血清中のペプチドは、例えば脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide, BNP) などのように病態マーカーとして優れているものが臨床でも使用されるようになり、脚光を浴びている。しかしながら、蛋白質が分解してできるペプチドがどの程度疾患特異性があり、また病態に関与しているかなど、ほとんどわかっていなかった。今回の検索で、少なくとも強皮症を中心とする自己免疫疾患では、疾患に特異性の高いペプチドが検出されることが判明した。すなわち疾患関連ペプチドを検索することは、全身性自己免疫疾患の病因解明による新規治療法の開発と、診断あるいは治療モニタリングなど臨床経過把握に役立つ可能性が大きいと言える。さらに日中間では同じ強皮症患者でも血清ペプチドプロファイルに違いがある可能性が示された。両方で検出されるペプチドは強皮症の共通病態経路によるものと考えられ、一方、日中患者の一方のみで認められるペプチドピークもあり、環境因子

遺伝的素因の違いを反映している可能性も考えられる。今後、そうしたペプチド配列の同定をいっそう進め、合成ペプチドの使用などにより、その病態的意義を探っていく必要がある。

参考文献：

1. Tong JK, Masuko-Hongo K, Nishioka K, Kato T, Sugata F, Akaogi J, Iino S. *J. Clin. Microbiol. (lett)* 1998;36:2797-9
2. Wang M, Keino H, Matsumoto I, Kurokawa M, Kato T, Nishioka K, Sumida T. *J Rheumatol.* 2000;27:311-8.
3. Yu X, Matsui T, Otsuka M, Sekine T, Yamamoto K, Nishioka K, Kato T. *J. Immunol.* 2001;166:1360-1369
4. Yuan G-H, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T, Nishioka K. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1056-70.
5. Yuan GH, Masuko-Hongo, Kato T, Nishioka K. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 602-11.
6. Yao Z, Kurokawa MS, Masuko-hongo K, Tsuruha J, Sakata M, Nakamura H, Nishioka K, Kato T. *Ann Rheum Dis.* 2004 Mar;63(3):252-8.
7. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, and Kato T. *Arthritis & Rheum* 2004; 50 1511-1521.
8. Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K. *Curr Opinion Rheumatol* 2004;16:604-608
9. Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Noshioka K. *J Bio Chem* 2004; 279: 37939-37950.
10. Du H, Masuko-Hongo K, Xiang Y, Boa CD, Wang XD, Chen SL, Kato T, Nishioka K. *Rheumatol Int.* 2005 26(1):35-41.
11. Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, and Kato T. *J Immunol* 2006 :176: 3196-3204
12. Xiang Y, Kato T. *Lupus* 2006;7:431-435
13. Xiang Y, Kato T. *Curr. Opn. Orthopaedics* (in press)
14. Xiang Y, Masuko K, Sekine T, Nakamura H, Yudoh K, Nishioka K, Kato T. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;11:1163-1173
15. Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K. *Arthritis Rheum* 2006;54:818-831
16. Matsuo K, Xiang Y, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Noyori K, Nishioka K, Saito T, Kato T. *Arthritis Res* 2006;27(8):R175
17. Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, Shimada K, Tbhma S, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Nishioka K, Kato T. *Arthritis Rheum* 2007;6:2018-2030

作成日：2008年 3月14日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2008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

受給者氏名： 姚 建 
所属機関名： 山梨大学医学部
所属部署： 医学部・分子情報伝達学講座 職名： 准教授
所在地： 山梨県中央市下河東1110
電話： 055-273-8074 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

薬物性腎障害におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの役割

3. 成果の概要 (100字程度)

薬物性腎組織傷害とその修復には、様々なメディエーターや接着分子を介した複雑な細胞間相互作用が寄与することが知られている。今回、我々は培養細胞モデルにおいて、aminoglycosidesが引き起こした腎尿細管細胞毒性におけるギャップ結合の役割について検討した。研究の結果から、ギャップ結合がaminoglycosidesによる腎尿細管上皮細胞傷害において極めて重要な役割を担うということが初めて示唆された。

※発表論文等

1. 姚 建、北村 正敬: Connexin43、腎と透析 (特集: これだけは知っておきたい分子腎臓学) . 63(4), 11-14, 2007 (review)
2. Yao J, Zhu Y, Morioka T, Oite T, Kitamura M: Pathophysiological roles of gap junction in glomerular mesangial cells. J Membr Biol 217:123-130, 2007
3. Yao J, Zhu Y, Sun W, Sawada N, Hiramatsu N, Takeda M, and Kitamura M: Irsogladine maleate potentiates the effects of nitric oxide on activation of cAMP signaling pathways and suppression of mesangial cell mitogenesis. Br J Pharmacol 151:457-466, 2007
4. Wan Yi-gang, Sun W, Zhang J, Li N, Ruan J, Wang Y, Shimizu F: Nephritic model induced by anti-Thy-1 monoclonal antibody and its application to study on Chinese materia medica. China Journal of Chinese Materia Medica 32(6):461-465, 2007

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 姚 建 職名： 准教授
所属機関： 山梨大学 部署： 医学部・分子情報伝達学講座
中国側研究者氏名： 万毅剛 職名： 副主任醫師
所属機関： 南京大学医学院 部署： 鼓楼病院・漢方医学科

薬物性腎傷害におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの役割—

日本側研究代表者	姚 建
日 本 研 究 機 関	山梨大学医学部准教授
中国側研究代表者	万毅剛
中 国 研 究 機 関	南京大学医学院副教授

要旨：

薬物性腎組織傷害とその修復には、様々なメディエーターや接着分子を介した複雑な細胞間相互作用が寄与することが知られている。しかし、隣接する腎細胞でシグナル分子の直接的な遣り取りを司るギャップ結合の役割は、まだ十分に解明されていない。今回、我々は培養細胞モデルにおいて、aminoglycosidesが引き起こした腎尿細管細胞毒性におけるギャップ結合の役割について検討した。2種類の腎尿細管上皮細胞株、NRK52EおよびLLC-PK1は、全く異なるギャップ結合の機能を有していた。NRK52E細胞にはギャップ結合構成蛋白であるconnexin43 (Cx43)が高発現し、正常な細胞間コミュニケーションが認められた。他方、LLC-PK1細胞では、Cx43が発現しておらず、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションが認められなかった。Aminoglycoside系の抗生物質G418およびhygromycinによる細胞傷害は、LLC-PK1細胞に比して、正常なギャップ結合能を持つNRK52E細胞では、より高度に引き起された。この現象は、ギャップ結合阻害によって有意に抑制された。LLC-PK1細胞にCx43を強制発現させると、薬剤による細胞傷害が増強した。以上の結果から、ギャップ結合がaminoglycosidesによる腎尿細管上皮細胞傷害において極めて重要な役割を担うということが示唆された。

Key Words 薬物性腎傷害, ギャップ結合, 細胞間コミュニケーション, 尿細管上皮細胞, コネクシン43

緒言：

薬剤の代謝、排泄、再吸収には腎臓が重要な役割を担っている。治療薬として利用されている薬剤の幾つかは、三大薬物性臓器障害のひとつである腎障害を引き起す事が知られている。特に、抗生物質投与による急性尿細管壊死は薬物死亡者数の4分の1に相当する。近年、欧米をはじめとする世界各国で使用される“アリストロキア酸含有中医薬”が、腎不全や癌を引き起すことから社会問題となっているが、その作用機序は十分に解明されてはならず、有効な治療方法も制限されている。

薬物性腎組織障害とその修復には、様々なメディエーターや接着分子を介した複雑な細胞間相互作用が寄与することが知られている。しかし、隣接する細胞間でシグナル分子の直接的な遣り取りを司るギャップ結合の腎組織障害における役割は、まだ十分に解明されていない。ギャップ結合は細胞間結合様式の一つであり、細胞膜に形成されることで、細胞間シグナル伝達に直接関与している。ギャップ結合を構成する半チャンネルをコネクソンといい、コネクソンはコネキシン蛋白によって構成されている。ギャップ結合の機能としては分子量 1.2kDa 以下の細胞内シグナル伝達物質を隣接する細胞へ直接輸送することが可能で、細胞の分化・増殖を制御し、ホメオスタシスを維持している[1-3]。最近、腫瘍細胞において、コネキシン蛋白の発現減少ならびにギャップ結合の機能低下が、薬剤耐性獲得に寄与することが報告された[4]。さらに、腫瘍細胞において発現が低下したコネキシン分子を遺伝子導入することで、人為的にギャップ結合を形成させ、一部の細胞に抗癌剤を投与するのみで、その効果を腫瘍細胞集団全体に行き渡らせるという新しい治療戦略、bystander Effect (傍観者効果)が注目されてきている[5]。これらの事実から、薬剤投与

による細胞死においてギャップ結合が重要な役割を担うことが示唆され、薬物性腎尿細管傷害においてもギャップ結合が関与している可能性は高い。そこで、本研究では腎障害を引き起こす薬物がギャップ結合を通じて、広範囲に細胞傷害を及ぼすとの仮説を立て、薬物による急性尿細管壊死発症におけるギャップ結合の果たす役割を培養細胞モデルで検討した。

方法：

1) 細胞培養

ラット腎尿細管上皮細胞株NRK52E細胞(以下NRK細胞)およびブタ腎尿細管上皮細胞株LLC-PK1は、5% fetal bovine serum (FBS)を含むD-MEM/F-12培地を用いて培養した。

2) ギャップ結合機能の測定 (Dye transfer assay)

腎尿細管上皮細胞を培養し、マイクロインジェクションした蛍光色素 (Lucifer Yellow) の隣接細胞への拡散により、機能的ギャップ結合の有無を評価した[6]。

3) 細胞傷害の測定

薬剤投与による細胞傷害はCell Counting Kit-8(同仁化学)を用いて評価した。細胞内脱水素酵素により生成される、水溶性ホルマザンの450 nmの吸光度を直接測定することにより、生細胞数を測定した。

4) Western blotting 法

培養細胞の蛋白を抽出し、SDS・PAGEにて分離し、PVDF membraneへ転写した後、一次、二次抗体を反応させ、化学発光法を用いて検出した[6]。

5) 免疫蛍光染色

培養細胞におけるコネクシン43 (Cx43)の局在を蛍光抗体法により検索した[6]。

6) LLC-PK1へのCx43遺伝子の導入

LLC-PK1細胞にリポフェクションにてCx43遺伝子を導入し、G418選択によりCx43発現細胞株を制作した。

結果：

1) 尿細管細胞におけるギャップ結合構成蛋白の発現と機能

Dye transfer assayにより、NRK細胞、LLC-PK1細胞における機能的なギャップ結合の有無を検討した。1つのNRK細胞およびLLC-PK1細胞に蛍光色素Lucifer Yellow (LY)を注入し蛍光色素の周囲の細胞への拡散を観察した。(図1A)。また、ギャップ結合構成蛋白であるCx43がNRK細胞において存在することを、蛍光抗体法を用いて明らかにした。他方、もう一つの腎尿細管由来の細胞であるLLC-PK1細胞では、Cx43は存在せず、機能的なギャップ結合も認められなかった。

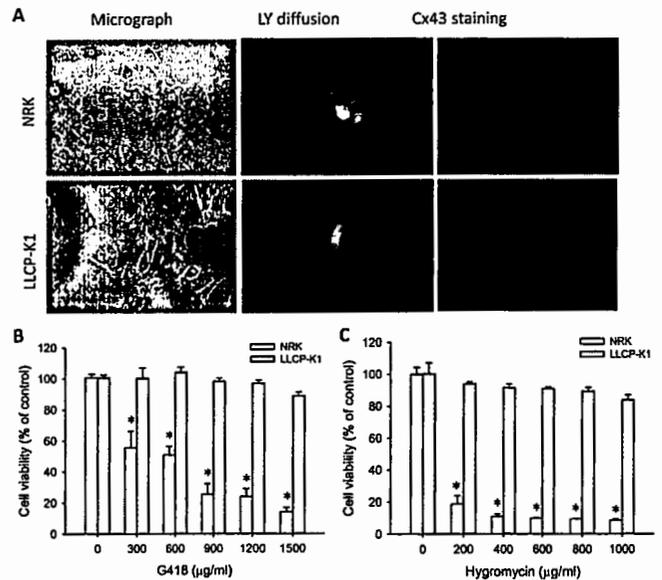


Figure 1. Differences between NRK and LLC-PK1 cells in gap junctional intercellular communication and in response to drug-induced lethality. (A) Micrographic analysis of dye coupled cells and immunofluorescent staining of Cx43. NRK and LLC-PK1 cells were confluent cultured. Lucifer Yellow (LY) was pressure-injected into a single cell (arrow). Diffusion of LY into adjacent cells was recorded. Magnification, X320. Expression of Cx43 was evaluated by staining the cells with an anti-Cx43 antibody. Magnification, X400. (B and C) NRK or LLC-PK1 cells in confluent culture in 96-well plates were exposed to various concentrations of G418 or hygromycin for 48 h. The cell viability was evaluated by cell counting kit. Data are expressed as percentage of living cells against the untreated control. *P<0.01 versus LLC-PK1 cells treated with respective G418 and untreated control.

2) 尿細管細胞に対する抗生物質の毒性作用

培養腎尿細管上皮細胞に細胞毒性を誘導する抗生物質 G418 および hygromycin を添加し、48 時間後、Cell Counting Kit-8 を用い、生細胞数を測定した。図 1 B に示すように、NRK 細胞において、G418 および hygromycin の濃度依存的に生細胞数が減少した。しかし、LLC-PK1 細胞は、NRK 細胞において顕著な傷害を引き起す濃度の G418 ならびに hygromycin を添加した場合においても、有意な生細胞数の低下は認められなかった。これらの結果から、NRK 細胞と LLC-PK1 細胞の特徴的な性質の違いである Cx43 の発現、すなわち機能的ギャップ結合の有無が薬剤による細胞傷害に関与する可能性を考え、さらに検討を行なう事とした。

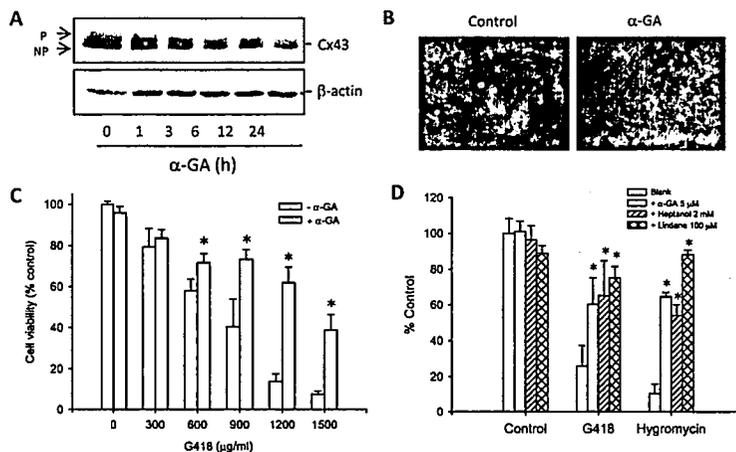


Figure 2. Implication of gap junction (GJ) in propagation and amplification of drug-elicited cytotoxicity. (A and B) Decreased expression of Cx43 by α -GA. (A) NRK cells were treated with α -GA (5 μ M) for the indicated times and cell proteins were extracted and subjected to Western blot analysis by using an anti-Cx43 antibody. Equal loading of protein per lane was verified by reprobing the blot with an anti- α -actin antibody. (B) NRK cells were exposed to α -GA (5 μ M) for 24 h. The cellular expression of Cx43 was evaluated by immunofluorescent staining. Magnification, X200. (C) Attenuation of drug-elicited cytotoxicity in NRK cells by α -GA. NRK cells in confluent culture were exposed to various concentrations of G418 with or without α -GA (5 μ M) for 48 h. (D) Different GJ inhibitors on G418-elicited cytotoxicity. NRK cells were exposed to 1200 μ g/ml G418 or 200 μ g/ml hygromycin in the presence or absence of α -GA (5 μ M), heptanol (2 mM) or lindane (100 μ M) for 48 h. The cytotoxicity was evaluated by using cell counting kit. Data are expressed as percentage of survival cells against untreated control.

3) ギャップ結合機能の阻害による細胞毒性反応の抑制

薬物による細胞毒性におけるギャップ結合の機能を調べるため、ギャップ結合阻害剤 18 α -glycyrrhetic acid (α -GA) を NRK 細胞に添加し、細胞の変化を観察した。はじめに α -GA のギャップ結合阻害能を確認するため、 α -GA 処理を行ったところ、NRK 細胞の細胞間コミュニケーションが速やかに阻害され、色素の拡散が有意に抑制された (data not shown)。次に 24 時間 α -GA 処理後、NRK 細胞におけるコネクシン 43 の発現レベルが顕著に抑制されることを細胞染色および western blot 法を用いて明らかにした (図 2 A, B)。また、 α -GA 存在下では、G418 による細胞毒性が有意に抑制された。他のギャップ結合阻害剤を用いても同様の結果が得られた (図 2 C, D)。

4) LLC-PK1 細胞における Cx43 遺伝子導入による薬物反応性の変化

Aminoglycoside に起因する細胞傷害において、ギャップ結合の機能をさらに検討するため、ギャップ結合を欠損する LLC-PK1 細胞に Cx43 を遺伝子導入し、薬物毒性に対する細胞反応の変化を観察した。Cx43 を遺伝子導入した LLC-PK1 細胞では細胞を白く縁取る Cx43 fusion 蛋白の局在が見られた (図 3 A)。また Cx43 を導入した細胞を hygromycin で刺激すると、control 細胞に比べ、高い

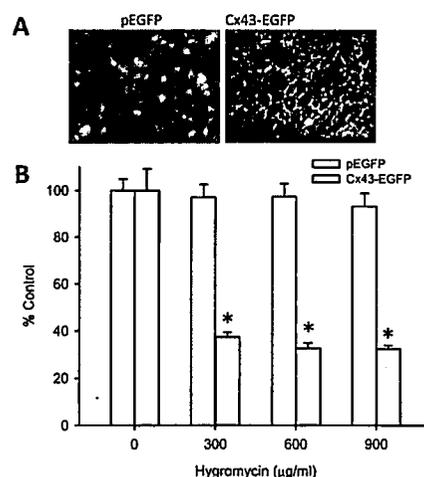


Figure 3. Permanent transfection of LLC-PK1 cells with wild-type Cx43 on hygromycin-elicited cytotoxicity. LLC-PK1 cells were transfected with a vector encoding GFP protein (pEGFP) or Cx43 (Cx43-EGFP) and clones expressing high level of GFP and Cx43 was selected (A), and analyzed for cell response to hygromycin (B). The expression of GFP and Cx43 was shown in A. Note the liner distribution of Cx43-GFP at the regions of cell-to-cell contacts. Magnification, X400. *P<0.01 versus respective control.

細胞傷害性を示した(図3B)。以上の結果から、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションは抗生物質による腎上皮細胞傷害に深く関与することが示唆された。

5) アリストロキア酸誘導尿細管細胞死におけるギャップ結合の役割

中医薬に含まれるアリストロキア酸は尿細管細胞死を引き起こすことが知られている。この尿細管細胞死におけるギャップ結合の役割を明らかにするため、先の実験と同様にギャップ結合阻害剤処理、Cx43の遺伝子導入実験を行い、アリストロキア酸に対する反応の変化を観察した。ギャップ結合阻害剤a-GA処理では、NRK細胞において、アリストロキア酸の毒性反応に対する有意な変化は認められなかった。同様にLLC-PK1細胞にCx43を遺伝子導入しても、アリストロキア酸による細胞毒性反応は対照群との差が見られなかった (data not shown)。

考察：

我々は、腎臓の近位尿細管上皮細胞由来NRK-52EとLLC-PK1細胞株を用いて、細胞傷害におけるギャップ結合の関与を検討した。ギャップ結合を介する細胞間コミュニケーションが密な細胞では、aminoglycosideによる細胞傷害がより顕著であった。また、ギャップ結合の機能を阻害することで、aminoglycosideによる細胞毒性が抑制された。以上の結果から、ギャップ結合は抗生物質による細胞傷害に深く関与していることが初めて示唆された。

薬物性腎傷害におけるギャップ結合の作用機構は未だ解明されていないが、いくつかの可能性が考えられる。1) 腎傷害を起こす薬物の分子量は1.2 kDa以下であることが多く、ギャップ結合を介して細胞間を広範囲に拡散することが可能。2) ギャップ結合を介したbystander effectによって、細胞傷害性シグナルを隣接する細胞に伝達することが可能。また、ギャップ結合蛋白の発現は薬物耐性蛋白(multidrug resistant protein, MRD)との間に逆相関関係が最近報告され[7]、薬物耐性蛋白に対する調節作用も可能。ギャップ結合の機能を阻害すると、細胞間に薬物及び薬物傷害関連因子の拡散が抑えられ、その結果、細胞が薬物に対する耐性を高め、薬物による傷害が抑えられる。今回の実験で、なぜ漢方薬に含まれるアリストロキア酸による尿細管の細胞死ではギャップ結合による影響が観察されなかったのかは不明である。しかしこのことは、aminoglycosideにより引き起こされる尿細管傷害とアリストロキア酸によるものでは作用機序が異なることを示唆している。今後、この異なる作用機序についてさらに検討する必要がある。また、in vivo動物モデルを用いた薬物性腎傷害におけるギャップ結合の役割も検討したい。最後に、薬物性腎傷害の発症、進展および修復においてギャップ結合が果たす役割を解明することで、薬物性腎傷害に対する新規治療法の提案ならびに治療戦略の確立が可能であると考えている。

参考文献：

- [1] Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC: Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83 (4):1359-400 (2003).
- [2] Yao J, Zhu Y, Morioka T, Oite T, Kitamura M: Pathophysiological Roles of Gap Junction in Glomerular Mesangial cells. *J Membr Biol* 217 (1-3):123-30 (2007).
- [3] Kumar NM, Gilula NB: The gap junction communication channel. *Cell* 84 (3):381-8 (1996).
- [4] Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML: Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1719 (1-2):125-45 (2005).
- [5] Little JB: Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutat Res* 597 (1-2):113-8 (2006).

- [6] Yao J, Hiramatsu N, Zhu Y, Morioka T, Takeda M, Oite T, Kitamura M: Nitric oxide-mediated regulation of connexin43 expression and gap junctional intercellular communication in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 16 (1):58-67 (2005).
- [7] Sato H, Senba H, Virgona N, Fukumoto K, Ishida T, Hagiwara H, Negishi E, Ueno K, Yamasaki H, Yano T: Connexin 32 potentiates vinblastine-induced cytotoxicity in renal cell carcinoma cells. *Mol Carcinog* 46 (3):215-24 (2007).

注： 本研究は、2007年12月14日「第30回日本分子生物学会」にて口演発表。

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008 年 3 月 12 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： 辻 浩一郎 
所属機関名： 東京大学
所属部署： 医科学研究所 職名： 准教授
〒 108-8639
所在地： 東京都港区白金台 4-6-1
電話： 03-5449-5397 内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

新規抗体を用いたヒトES細胞から血液細胞への分化の解析

3. 成果の概要 (100字程度)

ヒトES細胞を、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、種々の血液細胞を産生する造血前駆細胞に分化誘導できた。今後ヒトES細胞から血液細胞への分化機構を種々の新規抗体を用いて解析することにより、再生医療への応用が期待される。

※発表論文等

Ma F, Tsuji K, et al: Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells.

Int J Hematol 85:371-379, 2007.

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 辻 浩一郎 職名： 准教授
所属機関： 東京大学 部署： 医科学研究所
中国側研究者氏名： 張 学 光 職名： 副校長・教授
所属機関： 中国 蘇州大学 部署： 医学生物技術研究所

新規抗体を用いたヒト ES 細胞から血液細胞への分化の解析

研究者氏名 辻 浩一郎
日本所属機関 東京大学 准教授
中国研究機関 蘇州大学
共同研究者名 張 学光、馬 峰

要 旨

ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) を、マウス胎仔肝から樹立したストローマ細胞と共培養することにより、赤血球系前駆細胞、骨髄球系前駆細胞、さらには、複数の血液細胞に分化可能な多能性造血前駆細胞に分化誘導できた。これらの造血前駆細胞から分化誘導された赤血球の一部には、脱核した成熟赤血球も認められ、酸素運搬能を有する成人型ヘモグロビンを合成していた。今後これらのヒト ES 細胞から血液細胞への様々な分化段階にある細胞を、種々の新規抗体を用いて解析することにより、その分化機構が解明されれば、輸血医療をはじめとする様々な再生医療への応用が期待される。

Key Words ヒト ES 細胞, 造血前駆細胞, ストローマ細胞, 再生医療

緒 言:

生物が本来保持している再生能力を医療に応用する再生医療は、21 世紀の医療として、大きな期待を集めている。特に、全ての組織細胞に分化可能な能力を保持しつつ、半永久的に増殖可能なヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) は、再生医療のための有力な細胞資源として注目されている (参考文献 1)。

血液細胞療法の分野においても、もしヒト ES 細胞から効率良く造血幹細胞や大量の成熟血球 (赤血球、好中球、血小板) を分化誘導することが可能となれば、現在造血幹細胞移植医療や輸血医療において問題となっている多くの案件を解決することができる。特に、輸血赤血球は HLA に係らず使用できるため、必ずしも多数のヒト ES 細胞を用意する必要がなく、その過程でクローン胚が作製される危険性もない。したがって、倫理的に十分に考慮された条件下でのヒト ES 細胞の使用が可能となった現在、ヒト ES 細胞から輸血用赤血球を産生することは、実現可能な人工血液の産生法と考えられる。

これまでのところ、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導については、ストローマ細胞を用いた培養法、胚様体を用いた培養法などが報告されているが、いずれの方法においても、その血液細胞への分化誘導効率も低く、また、分化誘導された血液細胞が、実際に臨床応用可能な機能を有しているかについても明らかにされていない。

我々は、従来の分化誘導法において、ヒト ES 細胞の血液細胞への分化誘導が非効率的であった理由として、胎生期を起源とする ES 細胞から血液細胞への分化には、胎生期の特定の時期に、特定の部位で特異的に機能する分子による刺激が重要であるためと推測した。従って、ヒト ES 細胞から血液細胞への効率的な分化誘導のためには、胎生期の造血環境を再現することが重要であり、そのような胎生期造血機構を基盤とする、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導法の開発が可能ではないかと考えた。そこで、ヒト ES 細胞を用いた研究計画「ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から造血細胞への分化誘導法の開発」を文部科学省特定胚及びヒト ES 細胞研究専門委員会に申請し、平成 14 年 12 月 20 日に同

委員会の承認を受けて、本研究を開始した。

ヒトの胎生期造血については、ヒト胎児を研究することが倫理的に困難であるため、必ずしも十分に解明されているわけではない。しかし、ヒトと同じ哺乳類であるマウスにおいては、マウス胎仔の二次造血は、胎仔肝において爆発的に増幅されることが知られている（参考文献2）。一方、マウス由来ストローマ細胞の多くがヒト造血をも支持することが報告されていたことより、我々は、胎生15～16日マウス胎仔の胎仔肝よりストローマ細胞を樹立し、ヒトES細胞との共培養を試みた。

方 法：

1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の培養

胎生15～16日のマウス胎仔肝から分離された細胞を付着培養し、ストローマ細胞の樹立を試みた。

2. ヒトES細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養

ヒトES細胞を、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養し、産生されてきた細胞を、形態学的観察、フローサイトメトリー、RT-PCR法、interleukin (IL)-3、エリスロポエチン、トロンボポエチン、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)、SCF (stem cell factor)を用いた血液コロニー形成法により、継時的に解析した。

3. ヒトES細胞由来赤血球におけるヘモグロビンの解析

マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により分化誘導されたヒトES細胞のコロニー培養し、形成された赤血球系コロニーや混合コロニーに含まれる赤血球系細胞のヘモグロビンを、免疫染色により解析した。

結 果：

1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の培養

胎生15～16日のマウス胎仔の胎仔肝から分離された細胞を付着培養することにより、ストローマ細胞を樹立することができた。

2. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養によるヒトES細胞の血液細胞への分化

(1) 形態学的観察

ヒトES細胞は、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養すると、培養5日目頃より分化を開始し、培養10日目頃には、ヒトES細胞コロニー中に未分化な小型円形細胞が出現した。その後、培養15日目頃まで、これらの細胞は増殖し続けた。

(2) RT-PCRによる検討

培養13日目には、未分化なES細胞のマーカであるOct4、未熟な中胚葉系細胞のマーカであるBrachuryの発現は消失した。

(3) フローサイトメトリーによる検討

CD34+細胞は、培養5日目頃から共培養中に出現し、培養16～17日目頃まで増加し続けた。培養14日目のCD34+細胞の一部は、CD45やc-Kitを共発現していた。

(4) コロニー形成法による検討

共培養された細胞を血液コロニー形成法で継時的に観察すると、血液コロニー形成細胞は、培養10日目頃に初めて出現した。その数は次第に増加し、培養14～16日目には最大となった。観察されたコロニー形成細胞は多様で、赤血球コロニー、顆粒球・マクロファージコロニー、種々の血液細胞を含む混合コロニーなど、様々な血液細胞コロニーが認められた。これらのコロニーからは、赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの種々の血液細胞が産生された。産生された赤血球の中には、脱核した成

熟赤血球も認められた。

以上の結果は、ヒト ES 細胞は、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、赤血球系前駆細胞、骨髄球系前駆細胞、さらには、複数の血液細胞に分化可能な多能性造血前駆細胞に分化誘導され、これらの造血前駆細胞からは種々の血液細胞が産生されたことを示している。

3. ヒト ES 細胞由来赤血球における成人型ヘモグロビンの合成

上記の方法により形成された赤血球コロニーに含まれるヒト ES 細胞由来赤血球のほとんどが、胎児型ヘモグロビン (HbF) を保持していたが、同時に、成人型ヘモグロビン (HbA) も保持していた。また、これらのヘモグロビンは、酸素結合能を有していることも確認された。

考 察:

現代医学の著しい進歩にもかかわらず、輸血医療は現在の医療においても不可欠な補助療法であり、その供給は今日もなお多くのドナーの善意に依存している。そのため、輸血用血液の供給量の絶対的不足が社会問題となって久しいが、これに加えて、現在の輸血用血液は不特定多数のドナーから採取されるため、種々の感染症の危険性等、その安全性についても大きな問題となっている。そのため、充分量の安全な輸血製剤の確保が社会的に強く求められている。

我々は、こうした問題を解決するために、新たな輸血用赤血球の供給源として、全ての組織細胞に分化可能な能力を保持しつつ、半永久的に増殖可能なヒト ES 細胞に注目した。我々は、ヒト ES 細胞から血液細胞への効率的な分化誘導のためには、胎生期の造血環境を再現することが重要であり、そのような胎生期造血機構を基盤とする、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導法を開発したいと考えた。

ヒトを含む哺乳類の胎生期造血においては、生物の一生を担うことになる二次造血は、胎児肝において、劇的に増幅する。このことは、未分化な造血細胞は、胎児肝という造血環境で、著明に分化・増殖することを示している。また、従来より、マウスストローマ細胞の多くは、ヒト造血細胞にも作用することが知られている。そこで、マウス胎仔肝から樹立されたストローマ細胞との共培養系により、ヒト ES 細胞を効率的に血液細胞に分化・増殖することを試みた。

その結果、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、ヒト ES 細胞から多数の赤血球系前駆細胞、骨髄球系前駆細胞、多能性造血前駆細胞が産生された。これらの前駆細胞から分化誘導された赤血球の中には、脱核した成熟赤血球も含まれており、一部は酸素運搬能を有する成人型ヘモグロビンを有していた。このことは、本研究において、ヒト ES 細胞から分化誘導された成熟赤血球が、輸血用血液として、使用可能であることを示唆している。

今後は、これらの赤血球を完全に成熟赤血球にまで分化誘導する方法を確立したいと考えている。さらに、本培養系において産生される好中球についても、輸血用血液として使用可能な機能を有しているか否かを検討していく予定である。もし、これらの好中球が、遊走能、貪食能、殺菌能を有していることが確認されれば、これまで、重症感染症に対する有用性が認められながら、ドナー確保が困難なために実施されてこなかった好中球輸血が可能となる。

一方、種々の血液、悪性疾患に対する根治的治療法である造血幹細胞移植療法においては、その技術的進歩により造血幹細胞移植の適応となる患者の数は増加し、ドナーの絶対的不足が深刻な社会問題となっている。もし、ヒト ES 細胞から造血幹細胞への分化が可

能となれば、そうしたドナー不足を解決することができる。本研究の成果から鑑み、マウス造血幹細胞が発生する胎生 10 日頃のマウス胎仔の AGM(Aorta-Gonad-Mesonephros) 領域(参考文献 3) から樹立したストローマ細胞と共培養することにより、ヒト ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導が可能となるかもしれない。

現在、こうしたヒト ES 細胞から血液細胞への分化過程の様々な段階にある細胞を、蘇州大学・医学生物技術研究所で作製された種々の新規抗体 (B7H3、B7H4) を用いて分画し、その分画された細胞の分化能を検討中である。この検討により、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化機構が明らかとなれば、より効率的なヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導法の開発が期待される。

参考文献：

1. 辻浩一郎：ヒト胚性幹細胞からの血液産生と再生医療, 日小血会誌 vol119, 175-180 (2005).
2. 辻浩一郎：造血幹細胞の起源と性状, 医学のあゆみ vol194, 1021-1025 (2000).
3. 辻浩一郎：AGM 領域の造血幹細胞とストローマ細胞, 臨床血液 vol40, 268-271 (1999).

注：本研究の一部は、2007 年 9 月 29 日『International Society of Experimental Hematology 総会』, および 2007 年 10 月 11 日『日本血液学会・日本臨床血液学会・合同総会』にて口頭発表、『International Journal of Hematology』(2007 年 VOL85 巻 371-379 頁)に掲載。

作成日：2008 年 3 月 12 日

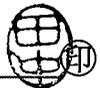
財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

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

受給者氏名： 田中 靖人 
所属機関名： 名古屋市立大学大学院医学研究科
所属部署： 臨床分子情報医学分野 職名： 准教授
〒 467-8601
所在地： 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1
電話： 052-853-8292 内線： 直通

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

HBV genotype C/D hybridの臨床的・ウイルス学的特徴の解析

3. 成果の概要 (100字程度)

中国側の共同研究者である南方病院、王 戦会先生が平成19年7月23日に来日した。当研究室にて1.2倍長の複製クローン作成方法およびサザンブロット法を教授し、帰国後は別紙報告書の様に研究を実施しHBV genotype/subgenotypeや特異的変異を決定する事で、肝病態進展を予測できる可能性が示唆された。

※発表論文等

1. Wang Z, Tanaka Y, Mizokami M, et al. Distribution and characteristics of hepatitis B virus genotype C Subgenotypes in China. J Viral Hepat. 14(6):426-34. 2007.

2. Wang Z, Tanaka Y, Mizokami M, et al. Clinical and Virological characteristics of hepatitis B virus subgenotypes Ba, C1 and C2 in China. J Clin Microbiol. 45(5):1491-6. 2007.

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 田中 靖人 職名： 准教授

所属機関： 名古屋市立大学大学院医学研究科 部署： 臨床分子情報医学分野

中国側研究者氏名： 王 戦会 職名： 研究員

所属機関： 南方病院 部署： 感染症科

HBV genotype C/D hybrid の臨床的・ウイルス学的特徴の解析

研究者氏名	田中 靖人
所属機関	名古屋市立大学大学院医学研究科
役職	准教授
共同研究者氏名	王 戦会
所属機関	中国南方病院
役職	研究員

要旨

我々がすでに王先生らと行った研究結果から、HBV Subgenotype C1 は主に海南省や広東省といった中国南部に分布し、C2 は中国全土に広く分布しており、チベットに隣接した青海省や甘肅省には S 領域が genotype D に遺伝子組換えを起こした C/D hybrid が存在した事が既に分かっていた。今回は C1、C2、C/D hybrid の臨床像の違いを明らかにする事と、中国に存在する C1、C2、C/D hybrid の 1.2 倍長の複製クローンを作成し、*in vitro* 複製系を用いて genotype/subgenotype によるウイルス学的違いを明らかにする事を目的とした。今回の検討結果からは中国広東省で、HBV/Ba, HBV/C1, HBV/C2 を広く認め、それぞれ異なる遺伝子変異パターンが存在した事、HBV genotype/subgenotype や特異的変異を決定する事により、肝病態進展の予測が可能となる事が示唆された。

Key Words B型肝炎ウイルス、genotype、subgenotype

背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は、現在まで A から H の 8 つの遺伝子型(genotype)が報告されている。アジアには genotype B と C が存在し、予後不良とされる HBV genotype C には主に 2 つの subgenotype が存在する。最近我々は PCR-RFLP 法を用いた簡便な分類法を開発し、Dr. Wang らとの共同研究により、中国全土から集められた HBV genotype C 陽性 534 検体の解析を行った。HBV/C1 112 例(21%)、C2 397 例(74%)であり、C1 は主に海南省や広東省といった中国南部に分布し、C2 は中国全土に広く分布した。さらに、チベットに隣接した青海省や甘肅省には S 領域が genotype D に遺伝子組換えを起こした C/D hybrid が存在した(約 5%) (文献 1)。こうした中国に存在する異なる genotype/subgenotype の臨床像及びウイルス学的特徴は明確にされていない。

目的

1. C1、C2、C/D hybrid の臨床像の違いを明らかにする。
2. 中国に存在する C1、C2、C/D hybrid の 1.2 倍長の複製クローンを作成し、*in vitro* 複製系を用いて genotype/subgenotype によるウイルス学的違いを明らかにする。

対象と方法

1. 中国広東省の慢性 B 型肝炎患者のコホート 211 人(慢性肝炎 132 人、肝硬変 32 人、肝細胞癌 47 人)から同意取得後、血清を採取。DNA を抽出した後、HBV genotype/subgenotype や病態進展に寄与するとされている enhancer II/core promoter/precore 領域の遺伝子配列を決定した。
2. Dr. Wang を日本に招聘し、我々の過去の報告(Sugiyama M, Tanaka Y, et al., Hepatology 2006)に基づいた 1.2 倍長の複製クローン作成方法およびサザンブロット法を教授した。中国に帰国後、上記患者血清から DNA を分離し、C1、C2、C/D hybrid の 1.2 倍長の複製クローンを作成した。

結果

1. 慢性B型肝炎患者のコホート211人中、HBV/Ba:108人(51.2%),HBV/C1:71人(33.6%),HBV/C2:32人(15.2%)で、C/D hybridは認めなかった(文献2)。
2. CH, LCにおいて、Baが有意であったが(それぞれ、59.8%、56.3%)、HCC患者ではgenotype Cの割合が有意に高くなった(76.6%; C1 55.3%, C2 23.3%)。
3. 各genotype/subgenotype毎の変異パターンは異なり、C1では1762T/1764A変異が多く(77.5%)、Baは1896A変異(41.7%)、C2は中間的な変異パターンで1762T/1764A変異53.1%、1896A変異31.3%認めた。さらに、1653T変異はC2、1753V変異はC1に有意に多い結果であったが、多変量解析では1653T変異、1753V変異、1762T/1764A変異及び年齢がHCCに寄与する因子となった。
4. C1、C2、C/D hybridの1.2倍長の複製クローンを作成した。ウイルス複製は、サザンブロット法により確認した。

結語

中国広東省では、HBV/Ba, HBV/C1, HBV/C2を広く認め、それぞれ異なる遺伝子変異パターンが存在した。HBV genotype/subgenotypeや特異的変異を決定することにより、肝病態進展を予測することが可能かもしれない。今後は、今回作成した1.2倍長の複製クローンを用いた細胞培養系により、ウイルス学的特徴を明確にしたい。

論文発表

1. Wang Z, Hou J, Zeng G, Wen S, **Tanaka Y**, Mizokami M, Naoumov NV, Qi Y. Distribution and characteristics of hepatitis B virus genotype C Subgenotypes in China. *J Viral Hepat.* 14(6):426-34. 2007.
2. Wang Z, **Tanaka Y**, Huang Y, Kurbanov F, Chen J, Zeng G, Zhou B, Mizokami M, Hou J. Clinical and Virological characteristics of hepatitis B virus subgenotypes Ba, C1 and C2 in China. *J Clin Microbiol.* 45(5):1491-6. 2007.

学会発表

1. Wang Z, **Tanaka Y**, Huang YH, Kurbanov F, Chen JJ, Zeng GB, Zhou B, Mizokami M, Hou JL. Subgenotypes BA, C1 and C2 of hepatitis B virus in china: Clinical and virological characteristics. 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of The Liver (EASL 2006) April 26-30, 2006, Vienna, Austria. [JOURNAL OF HEPATOLOGY. 46:S161.2007.]
2. Wang Z, **Tanaka Y**, Huang Y, Kurbanov F, Chen J, Zeng G, Zhou B, Mizokami M, Hou J. Clinical and virological characteristics of hepatitis B virus subgenotypes Ba, C1 and C2 in China. [Abstract P-0249, 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto, Japan.] *Hep Intl* 2007 Mar;1(1):117

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008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： 山内 広平 

所属機関名：岩手医科大学医学部

所属部署：内科学第三講座 職名：准教授

所在地：〒020-8505 盛岡市内丸19-1

電話：019-651-5111 内線：2332

1. 助成金額：980.000 円

2. 研究テーマ

中国における重症喘息の気道病態の解明と治療法の検討

3. 成果の概要 (100字程度)

中国重症気管支喘息患者はCOPDの合併率が高く、肺機能は閉塞性障害が高度であった。また血中IL-4、IL-5が高値であり、アレルギー性炎症の持続が示され、吸入ステロイド剤の必要性が示唆された。

※発表論文等

Yamauchi K, Inoue H. Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling-. Allergol Int. 2007;56:321-9.

4. 研究組織

日本側研究者氏名：山内 広平 職名：准教授

所属機関：岩手医科大学医学部 部署：内科学第三講座

中国側研究者氏名：安 昌善 職名：教授

所属機関：延辺大学医学院付属病院 部署：呼吸器内科

中国における重症喘息の気道病態の解明と治療法の検討

研究者氏名	山内 広平
日本所属機関	岩手医科大学医学部第三内科
中国研究機関	延辺大学医学院付属病院呼吸器内科
共同研究者	教授 安 昌善
共同研究者	助教授 朴 紅梅

要 旨

今回中国の重症喘息の臨床病態の解析と治療方法の検討を行うために、中国東北地方にある延辺大学医学部付属病院を受診した気管支喘息患者 22 名を対象にアトピー素因、アレルギー、肺機能、合併症、治療状況について調べ、岩手医科大学医学部を受診した喘息患者 76 名のデータと比較した。治療状況に関して、テオフィリン製剤は全員が服用していたが、吸入ステロイド剤の使用は半数に留まった。また COPD の合併が 50%に見られた。血清中 IgE は 70%が高値であり、ダニ RAST 陽性者は 50%を超え、日本と近似した数値を示した。血中サイトカイン測定結果は IL-4, IL-5 が中国重症喘息患者で有意に高く、十分にアレルギー性炎症が沈静化されていないと考えられる。肺機能では努力性肺活量は 2.15 ± 0.10 L ($64.8 \pm 4.66\%$)、1 秒量は 1.32 ± 0.10 L ($48.9 \pm 3.78\%$) と高度の混合性障害を示した。この 1 秒量の値は日本側の重症喘息患者の 76.0 ± 5.0 よりかなり低い。以上より、今回の中国重症喘息患者は、アレルギー性炎症が持続しており、加えて COPD の合併率も高く高度の肺機能障害を有していた。吸入ステロイド使用率が低く、頻回に発作を起こすことが肺機能障害を悪化させている原因の一つであることが推察された。今後、吸入ステロイド使用を推進することが重症喘息患者の治療の改善につながると考えられる。

Key Word: アレルギー、肺機能、一秒量、Th2 サイトカイン、吸入ステロイド剤

緒 言

気管支喘息の重症化要因は「喘息の診断と治療のための世界的な指針：GINA2002」にも記載されているが、我々は本研究においてはアトピー素因、アレルギー、肺機能、合併症、治療状況の解析を行う。典型的なアトピー性喘息における気道炎症は Th2 タイプのリンパ球が優位のアレルギー性気道炎症であり、気道粘膜下における IL-4, IL-5, IL-13 などの Th2 タイプサイトカインの過剰産生により、主に好酸球や肥満細胞を中心とした細胞浸潤と活性化が喘息病態の特徴であり、重症喘息では特に強く見られる。重症喘息においては、気道炎症の持続が気道組織の構造的変化、いわゆる気道リモデリングが生じ、気管支平滑筋の増殖肥大や気道壁肥厚により薬剤に抵抗性の非可逆的な気道閉塞が生じる。非可逆的な気道閉塞は恒常的な肺機能障害として労作時の息切れや日常生活の QOL の低下を招来する。

本研究において、中国及び日本の気管支喘息患者におけるアトピー素因、特異的 IgE、血中サイトカイン測定、肺機能測定を行う。また、COPD などの合併症の有無や吸入ステロイド剤を含む抗喘息薬の使用状況を調査して中国及び日本の気管支喘息患者間で比較を行い、治療法の検討を行う。

対 象

2006年4月1日から2007年2月29日までの期間で延辺医科大学呼吸器科を受診し、「喘息の診断と治療のための世界的な指針：GINA2002」にしたがって重症喘息と認定された喘息患者22名を対象とした。一方対照として、同期間に岩手医科大学第三内科アレルギー再来を受診し、「喘息の診断と治療のための世界的な指針：GINA2002」にしたがって気管支喘息と認定された喘息患者78名を解析対象とした。対象患者から同意を得て調査及び検査を施行した。

方 法

1. 血清中総 IgE 及び特異的 IgE

非発作時の喘息患者から外来もしくは入院時に採血し、血清中総 IgE 及び特異的 IgE を日中双方の医療機関にて測定する。

2. 血中サイトカイン測定

非発作時の喘息患者から外来もしくは入院時に採血し、血清中のサイトカイン測定を行う。サイトカイン測定は IL-4、IL-5、TNF- α 及びインターフェロン γ (INF-g) 濃度を ELISA キットを用いて測定する。

3. 肺機能検査

本研究に登録された喘息患者に対して、スパイロメトリーを施行して、肺活量、一秒量、一秒率を記録する。その後吸入 β 2刺激剤(サルブタモール)を200 μ g吸入し、20-30分後に再度同様のスパイロメトリーを施行して β 2刺激剤に対する可逆性を計算する。

結 果

1) 気管支喘息患者の治療状況と合併症

22名の喘息患者について調査をおこなった。内訳は男性11名、女性11名であり、平均年齢は61.3 \pm 2.59(平均値 \pm SEM)であった。平均罹病期間は10.2年であり、罹病期間10年以上の患者は14人(64%)であったが、一方1年未満も4人(18%)存在した。全員入院時に今回の調査を行った。入院中全員がテオフィリン製剤の点滴静注を5日間から43日間受けていた。22人中18人はステロイド剤(デキサメサゾン、メチルプレドニゾン)の点滴静注を受けており、10人は7日間以上の投与を受けていた。また治療薬剤は全員が経口テオフィリン製剤を服用しており、加えて11人が吸入ステロイドと即時型 β 2刺激剤の併用、4人が即時型 β 2刺激剤のみの併用を行っていた。また合併症としては、11人(50%)がCOPDの合併有し、内2人は慢性呼吸不全の状態であった。また4人がアレルギー性鼻炎を合併していた(表I)。

2) 気管支喘息患者のアトピー素因

測定できた21名の喘息患者中15名の総IgE値(IU/ml)が200以上の値を示した。また個々のRASTスコアではダニ陽性11名(52%)、ゴキブリ陽性2名(9.5%)、ヨモギなどの花粉抗原陽性0名、牛乳・卵陽性0名、イヌ、ネコなどのペット抗原陽性0名、真菌抗原陽性3名(14.2%)であった。

岩手医科大学第三内科患者76名の総IgE値(IU/ml)は220 \pm 43で約70%以上が基準値を上回った。RASTはハウスダスト、ダニが55%で陽性であり、花粉アレルギー25%、動物アレルギー(イヌ、ネコ)15%、卵白、小麦などの食物アレルギー8%であった(表I)。

3) 気管支喘息患者血中サイトカインの比較

気管支喘息患者の安定期に測定した血清中サイトカインはIL-4, IL-5が中国喘息患者群で日本の患者に比べ有意に高かった。一方IFN- γ は両者に有意の差はなかった(表II)。

4) 気管支喘息患者の肺機能

肺機能検査は22名中16人に施行できた。他の6名は病状が重くて施行できなかった例が2名、施行を拒否したものが4名であった。努力性肺活量(FVC)は 2.15 ± 0.10 L ($64.8 \pm 4.66\%$)、1秒量は 1.32 ± 0.10 L ($48.9 \pm 3.78\%$)、1秒率 $62.1 \pm 2.63\%$ であった。16名中9名において1秒量(%)が50%を下回る高度障害例であった(表I)。
気道可逆試験は施行できた16人中13人で確認されている。

表I 中国及び日本の気管支喘息患者の臨床指標

	延辺大学医学部受診喘息患者 (n=22)	岩手医科大学受診喘息患者 (n=78)
平均年齢 (平均 \pm SEM)	61 \pm 3 才 (男/女 ; 11/11)	61 \pm 1 才 (男/女 ; 35/43)
血清中 IgE 陽性者	71%	72%
RAST 陽性者 ダニ 花粉 イヌ・ネコ	52% 0% 0%	55% 25% 15%
肺機能 努力性肺活量 (%)	64.8 \pm 4.66	100.3 \pm 4.1 86.0 \pm 4.0 (重症 18名)
1秒量 (%)	48.9 \pm 3.78	94.2 \pm 4.0 76.0 \pm 5.0 (重症 18名)
合併症 COPD アレルギー性鼻炎	50% 5.5%	13% 37%
治療状況	全例 経口テオフィリン製剤 50%がICS+SABA	ガイドラインに従った薬剤投与 重症例は全例 ICS+LABA 90%以上でテオフィリン徐放剤と抗ロイコトリエン剤の併用

Note: 日本人重症喘息患者18名は女性10人、男性8人 ICS:吸入ステロイド薬、SABA:短時間作動型 β 2刺激剤, LABA: 長時間作動型 β 2刺激剤

表II 中国及び日本の気管支喘息患者の血中サイトカイン

	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IFN-g (pg/ml)	TNF-a (pg/ml)
日本喘息患者 (n=39)	1.27 \pm 0.24*	2.71 \pm 0.42*	3.99 \pm 0.59	2.03 \pm 0.29**
中国喘息患者 (n=22)	10.99 \pm 0.84	18.77 \pm 3.45	2.44 \pm 0.95	6.35 \pm 1.33

*p<0.0001, ** p<0.005

考察

今回中国東北地方にある延辺大学医学部付属病院を受診した気管支喘息患者を対象にアトピー素因、アレルゲン、肺機能、合併症、治療状況について調べた。今回調査できた中国の喘息患者が22名と少なかった。昨今の中国の医療状況の変化で直接大学病院を受診する気管支喘息患者が減少していることや臨床研究に協力する患者が少なかったことが原因と考えられる。また今回対象となった患者は全て入院患者であった。治療状況をみるとテオフィリン製剤が全員に使用されているのに対して、重症であっても吸入ステロイド使用群が50%と少ない。これは一つには薬価から見るとテオフィリン製剤は安く、吸入ステロイド剤が高く、保険加入率が20%程度の中国においては吸入ステロイド使用率が低い原因となっていることが考えられる。加えて患者が吸入ステロイドの臨床効果を理解できていないことも原因である。吸入ステロイドは発作を抑えるのではなく、予防するために重要且つ効果的な薬剤であることを患者に良く理解してもらうように啓蒙活動が必要であると考えられた。ただ北京などの都市部での吸入ステロイドの使用率は高く、中国東北地方において特に上記の啓蒙活動の必要性が強調されるべきであろう。

アトピー因子に関しては、当初の予想に反して血中IgE値やダニRAST陽性率は今回の日中喘息患者間で極めて近い数値を示した。日本ではアトピー、非アトピー喘息患者の比率は7:3位とされるが、今回の中国アトピー性喘息患者の比率は70%位と推察される。ただ今回の患者数が22人と少なく、軽症から重症まで含めた大規模調査が将来必要であろう。ダニRAST陽性率は日中間で近似した数値を示したが、日本では気管支喘息のアレルゲンとして重要な花粉抗原やイヌやネコなどの抗原に対する陽性患者が見つからなかったのは意外であった。たまたまやはり対象患者数が少ないため多くは推測になるが、花粉抗原は樹木、草木の種類の違いやイヌやネコなどのペットの飼育状況が日中で異なっていることは考えられる。

血中サイトカイン測定において、TH2サイトカインであるIL-4、IL-5が日本の患者に比べ中国患者で有意に高値であり、一方TH2サイトカインであるINF-gには差がなかったことより、中国重症患者では十分にTH2リンパ球による気道アレルギー性炎症が沈静化されていないことが推察され、吸入ステロイド剤使用率の低さの反映と考えられる。

今回は中国側の喘息患者については、喘息発作が重症化して入院した患者が対象であり、岩手医科大学の外来患者との比較については注意しなくてはならない。肺機能に関する結果は、1秒量(%pred.)の平均が48.9%とかなり低い。この数値は岩手医科大学の重症喘息患者の平均1秒量(%pred.)76%と比べてもかなり低い。合併症として半数以上COPDを合併しており、このことが高度の肺機能障害に至っている原因の一つと考えられる。中国喘息患者の22人中2人が慢性呼吸不全の状態にあり、気管支喘息の治療に加えて、COPDの治療も必要と思われた。

参考文献

Yamauchi K, Inoue H. Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling-. Allergol Int. 2007;56:321-9.

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008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： 小関 健由 

所属機関名： 東北大学大学院歯学研究科

所属部署： 口腔保健発育学講座 職名： 教授
予防歯科学分野

〒 980-8575

所在地： 宮城県仙台市青葉区星陵町4番1号

電話： 022-717-8327 内線：

1. 助成金額： 860,000 円

2. 研究テーマ

中日両国における歯周疾患の罹患状況と質問紙調査から導かれる予防策の検討

3. 成果の概要（100字程度）

日本と中国の口腔疾病構造や口腔衛生状態の大きな違いがあるものの、効果的な歯周疾患予防と地域歯科保健推進のために、歯科保健推進の啓発の気づきを促す学習歯科健診は大きく貢献する可能性が示された。

※発表論文等

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 小関 健由 職名： 教授

所属機関： 東北大学大学院歯学研究科 部署： 口腔保健発育学講座
予防歯科学分野

中国側研究者氏名： 胡 徳瑜 職名： 教授

所属機関： 中国四川大学華西口腔医学院 部署： 予防歯科

中日両国における歯周疾患の罹患状況と質問紙調査から導かれる予防策の検討

研究者氏名	小関 健由
日本研究機関	東北大学大学院歯学研究科 口腔保健発育学講座 予防歯科学分野 教授
共同研究者名	小関 一絵
中国研究者氏名	胡 徳瑜
中国所属機関	中国四川大学 華西口腔医学院予防歯科 教授

要旨

成人の歯の喪失を招く大きな原因として歯周疾患が挙げられるが、我々はこの予防対策として「学習歯科健診」を応用した歯科保健活動を提唱し、地域歯科保健に応用し成果を挙げている。本研究では、日本の歯科保健過疎地帯の歯科保健推進に極めて効果的な学習歯科健診の、中国の歯周疾患予防への応用の可能性を探ることを目的に、日本と中国の農村地帯の成人を対象に口腔内診査と質問紙調査を実施した。対象は日本は30～59歳代の同意を得た386名、中国は工場の従業員110名である。口腔内診査結果から、日本と中国の疾病構造は大きく異なり、日本はう蝕と歯周疾患の罹患が多いことから保存・補綴治療が多く、逆に中国ではう蝕の罹患が極めて少なく初期の歯周疾患の罹患率が高いことが示された。特に中国では、歯肉が健康な受診者が皆無であったのに対して、日本では18%であったことにも示されるように、口腔衛生状態の大きな違いが観察された。さらに、中国では歯みがき指導を受けたことのある受診者は一割でと少なかった。この状況を改善するために「学習歯科健診」の応用を考えた場合、啓発の気づきを促す方策としての口臭検査は中国の受診者の関心を大きくことが示された。中国の歯科医師数は日本と6倍以上の開きがあり、この歯科医療供給不足を補うためにも、効果的な歯周疾患予防と地域歯科保健推進のために、学習歯科健診は大きく貢献することが考えられた。

Keywords 歯周疾患, 疾病予防, 歯科健康診査, 質問紙調査,

緒言:

日本における21世紀における国民健康づくり運動(健康日本21)では、歯科保健の到達目標として8020運動が提唱・推進されている。日本の成人においては、歯の喪失を招く大きな原因として歯周疾患が挙げられ、多くの国民がこれに罹患している。この歯周疾患の予防法に関しては、口腔清掃を徹底させて歯面を清潔にするしか効果的な方策がなく、如何に口腔保健の大切さを国民に啓発し、日々の歯科保健行動を習慣づけるかが大きな課題である。当東北大学では、この問題の対決策として「学習歯科健診」を提唱し、地域歯科保健に応用を試みている。

「学習歯科健診」は、歯科健診を受診する機会に口腔保健の大切さを学び、日々の生活習慣に歯科保健行動を導入する学習を折り込む手法で、受診者から高い評価を受けている。これは、受診者が歯科健診の診査項目を進むごとに口の機能とそれを高く維持する歯科保健の大切さと自分の実体験して気づき、歯科保健推進の基礎となる口腔清掃の励行へ誘うといった、歯科健診にストーリー性を与えて実施するものである。即ち、歯科健診の導入部に口臭検査を実施し、自分の口と生活の困りごとを結びつけて口の大切さを自分で考えていただいてから、口の困りごとの聴取と口腔内診査を実施して、自分の口の困りごとと口の中の問題点を結びつける。問題点を理解した受診者は、健康な方も含めて口腔内状況に応じた口腔清掃を現場で体験して、かかりつけ歯科医への定期的受診と治療に結びつける流れである。特に口腔清掃指導の実施には、歯科健診への住民参加を企画し、歯みがきボランティアを養成して健診会場で受診者を口腔内状況に応じて歯みがきしてもらう。これは、口腔清掃は歯科医療ではなく生活習慣であることを受診者に理解してもらう目的と、ボランティアの方は多くの歯科的知識を得てもらい、地域にその情報を発信してもらう役割を果たしていただく

ためである。この歯みがきボランティアを含んだ学習歯科健診は、歯科保健推進の草の根的な展開を期待でき、住民の主体的な歯科保健ボランティア活動に繋がっている。

本研究では、日本の歯科保健過疎地帯の歯科保健推進に極めて効果的な学習歯科健診を、中国の歯周疾患予防への応用の可能性を探ると共に、地域の枠を越えた国際的な視点から学習歯科健診のより効果的な実施方策を考えるために、日本と中国の農村地帯の成人を対象に口腔内診査と質問紙調査を実施するものである。

対象と方法:

1) 対象

東北大学大学院歯学研究科口腔保健発育学講座予防歯科学分野にて、住民歯科健診に応用するために構築した学習歯科健診の有効性を調べるために、実際に日本で学習歯科健診を実施している農村地帯の歯科健診の受診者の統計データから、10歳きざみの30歳代、40歳代、50歳代の歯科健診データと、会場で回収した質問紙調査票の集計データを日本側の基礎データとした。歯科健診は住民総合健診に併設して設置し、20歳代から90歳代の1,027名が参加し、総計で386名(男性111名、女性275名)のデータを解析に用いた(表1)。

中華人民共和国四川省内の大都市郊外の農村地帯の二つの工場の従業員にて、研究に同意し口腔内診査と質問紙調査に協力をいただいた方を中国側のデータとし、両国の比較研究に用いた。受診者は110名で、男性83名、女性27名であった(表1)。

対象者	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
男性	111	14	34	63	83	27	39	17
女性	275	44	97	134	27	14	12	1
計	386	58	131	197	110	41	51	18

2) 歯周疾患検診の方法

日本側の歯科健診で使用した歯周疾患健診用の診査表を中国語に訳して診査表と質問票を制作した。同時にシオダ社製TUCLプローブ(CPI型、18グラム設定)にて歯周ポケットのプロービングについての規格化を検診者間で実施し、実際の健診でもTUCLプローブを可能な限り使用して診査を行った。中国での歯周疾患健診の健診会場では工場内に健診会場を設置した。受付で質問票を記入した後に、受診者は新コスモス電機社製プレストロンを用いて、通法に従って口臭値を測定した。その後口腔内診査を行った。

3) データの解析

集計したデータはSPSS11.5を用いて解析した。表では性別・年齢を均等配置調整した値を示して両国の比較とした。

結果:

1) 農村地帯における日中の成人の口腔内状況の比較

現在歯数は、日本では智歯が生えそれっている方は2%と少ないが、中国では4割の方が32本の完全な歯列を維持していた(表2)。治療していない歯を持つ者は、日本が多い傾向があるものの両国で大きな違いはなかった(表3)。しかしながら、歯を抜いた本数に関しては日本が多く(表4)、処置歯は日本がかけ離れて多くなっている(表5)。以上から、日本では歯を経験のない健全歯のみ口腔内に存在する、DMF歯が0の者がいなかったのに対して、中国では半数の者が永久歯の歯を経験がなかった(表6)。これは、補綴歯数にも現れ、補綴歯がある者が日本では半数であったが、中国では3%に過ぎなかった(表7)。

一方で、歯周組織の状況は、歯肉に炎症のないCPIコード値が0の者は日本では17%であったのに対して、中国では0%であった(表8)。さらに歯周炎に罹患した者は40歳代で日本で48%、中国で57%、50歳代で日本で61%、中国で78%と、中国の歯周疾患が進行していた。口臭測定値は moderate 以上が40歳代で日本で17%、中国で10%であった(表9)。

2) 質問紙調査に見られる歯科保健に対する取り組みの違い

これまで歯みがき指導を受けたことのある方は、日本では主に歯科医院と町の歯科健診にて受けた者が5割であり回数も複数回の者が2割だったが、中国では主に歯科医院で2割弱の方が1回指導を受けていた(表10)。一方、自分の口に気を遣っている者は、日本では4~7割なのに対して中国では8割以上であった(表12)。また、自分以外の口の健康に気を遣っている者は、日本では2~5割なのに対して、中国では7割以上がそう回答した(表12)。しかしながら、他の人の

表2

現在歯数	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
0本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1~3本	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
4~7本	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
8~11本	1%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
12~15本	2%	0%	1%	5%	2%	0%	0%	6%
16~19本	3%	0%	1%	9%	0%	0%	0%	0%
20~23本	12%	5%	13%	18%	2%	0%	0%	6%
24~27本	43%	30%	55%	44%	8%	7%	10%	6%
28~31本	66%	91%	75%	33%	52%	56%	43%	56%
32本	3%	7%	1%	1%	37%	37%	47%	28%

表4

M歯数	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
0本	36%	56%	33%	18%	74%	85%	82%	56%
1~3本	37%	30%	46%	35%	23%	15%	16%	39%
4~7本	18%	14%	15%	25%	1%	0%	2%	0%
8~11本	6%	0%	5%	12%	0%	0%	0%	0%
12~15本	2%	0%	1%	7%	0%	0%	0%	0%
16~19本	1%	0%	0%	2%	2%	0%	0%	6%
20~23本	0%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
24~27本	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
28~31本	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
32本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

表6

DNF歯数	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
0本	0%	0%	0%	0%	49%	44%	61%	44%
1~3本	1%	0%	2%	2%	41%	49%	31%	44%
4~7本	6%	11%	2%	6%	9%	7%	8%	13%
8~11本	14%	12%	14%	17%	0%	0%	0%	0%
12~15本	22%	25%	28%	14%	0%	0%	0%	0%
16~19本	27%	30%	25%	26%	0%	0%	0%	0%
20~23本	16%	11%	21%	18%	0%	0%	0%	0%
24~27本	9%	9%	7%	12%	0%	0%	0%	0%
28~31本	4%	4%	2%	5%	0%	0%	0%	0%
32本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

表8

最大CPI値	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
Code 0	18%	23%	21%	11%	0%	0%	0%	0%
Code 1	7%	9%	8%	3%	3%	5%	0%	6%
Code 2	25%	26%	23%	25%	36%	49%	43%	17%
Code 3	40%	39%	32%	49%	48%	44%	51%	50%
Code 4	11%	4%	16%	12%	12%	2%	6%	28%

表3

D歯数	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
0本	69%	63%	73%	72%	73%	61%	75%	83%
1~3本	26%	28%	25%	24%	26%	37%	25%	17%
4~7本	3%	5%	2%	3%	1%	2%	0%	0%
8~11本	1%	4%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
12~15本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
16~19本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
20~23本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
24~27本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
28~31本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
32本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

表5

F歯数	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
0本	0%	0%	0%	0%	85%	90%	86%	78%
1~3本	4%	2%	3%	5%	13%	10%	12%	17%
4~7本	11%	14%	4%	16%	3%	0%	2%	6%
8~11本	22%	16%	23%	26%	0%	0%	0%	0%
12~15本	33%	35%	35%	29%	0%	0%	0%	0%
16~19本	23%	26%	26%	17%	0%	0%	0%	0%
20~23本	7%	5%	9%	6%	0%	0%	0%	0%
24~27本	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
28~31本	1%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
32本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

表7

補綴歯数	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
0本	54%	70%	48%	43%	97%	##	96%	94%
1~3本	36%	30%	44%	35%	3%	0%	4%	6%
4~7本	6%	0%	7%	12%	0%	0%	0%	0%
8~11本	1%	0%	0%	4%	0%	0%	0%	0%
12~15本	1%	0%	1%	3%	0%	0%	0%	0%
16~19本	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
20~23本	0%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
24~27本	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
28~31本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
32本	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

表9

口臭値	日本				中国			
	全体	30歳	40歳	50歳	全体	30歳	40歳	50歳
normal	60%	60%	63%	57%	53%	61%	55%	44%
mild	25%	28%	21%	28%	36%	29%	35%	44%
moderate	12%	11%	14%	12%	7%	5%	6%	11%
severe	3%	2%	3%	3%	3%	5%	4%	0%

表10

質問項目	日本		中国	
	男性	女性	男性	女性
歯磨き指導をこれまで受けたことはありますか	48%	69%	17%	13%
どこで受けましたか(複数回答可)				
学校	1%	4%	2%	0%
歯科医院	25%	45%	7%	13%
町の教室	1%	14%	3%	0%
町の健診	15%	14%	5%	0%
町の相談	7%	4%	0%	0%
その他	0%	0%	0%	0%
全部で何回くらい受けましたか				
1回	30%	40%	10%	11%
2~3回	8%	20%	1%	0%
4~6回	2%	3%	0%	0%
7~12回	4%	1%	2%	0%

口を掃除したことがあるかの問いに関しては、日本女性が68%と中国女性の15%と比較して非常に多く、ほとんどが自分の子どもの歯みがきであった(表11)。

歯科健診を受けると自分の口に関心が持てる者は、日本では4~5割であるのに対して、中国ではほとんどの方がそう答えた(表12)。しかしながら、歯科医院を受診したことのある者は中国には1割に満たなかった。同様に歯周病に関する知識も1割の方しか持ち合わせていなかった(表13)。口臭検査に対しても歯科健診に関する質問の回答と御案じような傾向が見られた(表12)。口臭に関する意識では、日本も中国も関心が高いことが示された(表13)。

考察:

日本と中国の疾病構造の違いは大きく異なり、日本はう蝕と歯周疾患の罹患率が多いので保存・補

綴治療が多く、逆に中国ではう蝕の罹患率が日本と比較して極めて少なく歯周疾患の罹患率が高い。これは、中国全土をカバーする第三次全国口腔健康流行病学調査でも明らかであり、2005年の日本の歯科疾患実態調査でも同様である。う蝕の発生に関しては、今回の中国の調査対象者は、ショ糖を使用した食事や間食が少ない時代に年少時代を過ごしてきたためと考えられる。今回の健診は歯垢の付着を評価しなかったが、口腔清掃状態に関しては、歯垢の付着が日本より中国の方が格段に多いことを歯科健診を実施して実感した。これは、最大CPIコードにて、中国では歯肉が健康な受診者が皆無であったのに対して、日本では18%であったことにも現れている。歯垢の付着は歯肉炎発症の直接原因であるので、中国の歯肉の状態の改善を考えるのであれば、口腔清掃の向上が最大の課題であろう。歯周疾患に関する知識に関しては、日本では半分以上の受診者が知識があると回答したことに対して、中国では1割が知識があると答えたことにも現れているように(表13)、歯周疾患に関する啓発活動が先ず必要である。さらに、毎日の口腔清掃を実践してもらうには、歯周疾患発症のメカニズム、症状と治療法、口腔清掃の手技に関する知識を効果的に伝える啓発活動を地域全体に展開する必要がある。

我々が実施している学習歯科健診を導入した歯科健診を中国で実施した場合には、大きな啓発効果が期待できるであろう。特に口臭検査は中国の受診者の関心を大きく引いたようで、口臭検査の実施で9割が歯科健診に関心が上がると答え、さらに自分が口臭を持つと考えている受診

表11

質問項目	日本		中国	
	男性	女性	男性	女性
今まで自分以外の人の口を掃除したことはありますか	15%	42%	13%	11%
誰の口を掃除しましたか(複数回答可)				
自分の子ども	12%	37%	8%	11%
親	1%	3%	0%	0%
その他の家族	0%	3%	0%	0%
他人の子ども	0%	2%	0%	0%
他人	1%	3%	0%	0%
仕事で	3%	5%	2%	0%
全部で何人くらいの口を掃除しましたか				
1~2人	6%	6%	3%	8%
3~4人	5%	25%	0%	0%
5~6人	1%	7%	0%	0%
7~10人	0%	1%	0%	0%

表12

質問項目	日本		中国	
	男性	女性	男性	女性
自分のお口に関して、気をつかっていますか				
非常にそう思う	5%	15%	36%	31%
ややそう思う	36%	50%	49%	67%
どちらともいえない	35%	27%	9%	2%
あまりそう思わない	18%	8%	1%	0%
まったくそう思わない	7%	0%	2%	0%
自分以外の人の口口の健康に気をつかっていますか				
非常にそう思う	2%	10%	16%	15%
ややそう思う	15%	36%	58%	71%
どちらともいえない	38%	33%	12%	8%
あまりそう思わない	35%	17%	8%	6%
まったくそう思わない	9%	4%	3%	0%
歯科健診を受診すると、自分の口に関心が持てると思いますか				
非常にそう思う	9%	11%	56%	51%
ややそう思う	29%	27%	35%	46%
どちらともいえない	25%	31%	2%	0%
あまりそう思わない	27%	24%	2%	0%
まったくそう思わない	7%	5%	0%	0%
口臭検査を受けてみたいですか				
非常にそう思う	26%	34%	43%	30%
ややそう思う	42%	40%	45%	59%
どちらともいえない	19%	15%	10%	8%
あまりそう思わない	9%	10%	1%	3%
まったくそう思わない	4%	1%	2%	0%
口臭検査を受けると自分の口に関心を持てると思いますか				
非常にそう思う	25%	44%	46%	54%
ややそう思う	40%	42%	46%	43%
どちらともいえない	27%	10%	4%	0%
あまりそう思わない	5%	3%	3%	0%
まったくそう思わない	2%	1%	0%	0%

者が日本と同様に4～5割存在し、実際に口臭をかすか以上に持つ者が5割存在するので、口臭を通して自分の口の状態を自分の問題として認識することが可能となるからである。歯科健診では、歯科医師が口の困りごとの聴取と口腔内診査を実施し、歯垢の存在を容易に示すことができる。さらに口腔清掃指導に関しても、中国では歯みがき指導を受けたことのある受診者は13～17%に留まり、回数も一回だけがほとんどであるので、歯みがき指導そのものに興味を持って頂けると思われる。

口腔保健の大切さに気が付いて口腔清掃を実施する者は、自ら得た知識を他の人に伝えることができれば、歯科保健は草の根的に自ら広がってゆく。これは、口腔清掃の重要性を知っている保護者による年少児の仕上げ磨きが代表であり、保護者が必要性を感じて子どもに歯科保健を伝える大きな意味合いがある。この枠を押し広げて他人を磨くことができれば、指数関数的に歯科保健行動を起こす住民が増え、特に医療過疎地帯では歯周疾患予防と治療に絶大な効果を現す。日本では42%の女性が自分以外の歯みがきを実施した経験があると答えているが、大部分が自分の子どもに対してである。しかしながら、家族以外の方を歯みがきしたことがあると答えた方が3%存在し、これは当分野が対象地域で数年来歯科保健推進の歯みがき学習会を実施し、その場で互いみがきを実施した結果であろうと推測される。今回、この歯みがき学習会の参加者の一部は、学

習歯科健診では歯みがきボランティアとして活躍しているので、このような活動を中国で展開できれば、歯科保健推進の大きな力となるであろう。

中国の歯科医療の充実度は日本と大きな差が存在し、歯科医師数は中国は人口千人あたり0.11名(2001年)、日本は0.71名で(2002年)であるので6倍以上の開きがあり、歯科衛生士も存在しない。当面はこの歯科医療供給不足を補うためにも、効果的な歯周疾患予防と地域歯科保健推進を実現する学習歯科健診の応用が考えられる。口臭を気づきのきっかけにする方略も、今回の調査で十分に応用が可能であると考えられるので、中国の地域住民に受け入れられる民族的文化的な背景を詳細に検討すれば、今後の両国の口腔保健推進に学習歯科健診は大きく資すると考えられる。

参考文献:

- 1) A new portable sulfide monitor with a zinc-oxide semiconductor sensor for daily use and field study.
Tanda N, Washio J, Ikawa K, Suzuki K, Koseki T, Iwakura M.
J Dent. 2007 Jul;35(7):552-7.
- 2) Correlation between measurements using a new halitosis monitor and organoleptic assessment.
Shimura M, Watanabe S, Iwakura M, Oshikiri Y, Kusumoto M, Ikawa K, Sakamoto S.
J Periodontol. 1997 Dec;68(12):1182-5. Links
- 3) 平成17年歯科疾患実態調査結果について
<http://www.mhlw.go.jp/topics/2007/01/tp0129-1.html>
- 4) 第三次全国口腔健康流行病学调查报告
- 5) Human resources for health - Number of dentists (per 1000 population)
<http://www.who.int/whosis/indicators/2007HumanResourcesForHealth/en/index.html>

表13

質問項目	日本		中国	
	男性	女性	男性	女性
口がかきますか	21%	15%	51%	30%
口がくさいと自分で気付きますか	40%	33%	48%	38%
口がくさいと人から言われますか	20%	13%	24%	8%
人の様子から自分の口がくさいと思いますか	18%	15%	19%	2%
この1年間に歯科医院を受診しましたか	41%	54%	6%	5%
定期的に歯科医院を受診していますか	9%	20%	0%	0%
歯周病がどんな病気か知っていますか	54%	71%	8%	11%

作成日:2008年3月14日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金-調査・共同研究-報告書

2008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： 鈴木基之 
所属機関名： 昭和大学
所属部署： 歯学部 職名： 准教授
〒145-8515
所在地： 大田区北平車2-1-1
電話： 03-3789-1151 内線： 354

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ 歯周炎・糖尿病などの生活習慣病実態調査と住民参加型

予防プロジェクトの開発

3. 成果の概要 (100字程度)

歯周炎・糖尿病などの生活習慣病予防のため、住民参加型予防
指導プロジェクトを開始し、自強小学校父兄と児童への健康教育
と歯科予防指導と同意への生科検診を行い、疾患発生増加を
検証し、予防教育を行った。

※発表論文等

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 鈴木基之 職名： 准教授
所属機関： 昭和大学 部署： 歯学部
中国側研究者氏名： 魏雪峰 職名： 副教授
所属機関： 吉庆大学 部署： 口腔医学院

歯周炎・糖尿病などの生活習慣病実態調査と住民参加型 予防プロジェクトの開発

研究代表者名 鈴木基之 昭和大学歯周病学講座
共同研究者名 魏 秀峰 吉林大学口腔医学院

要旨

近年、急速な中国社会の発展に伴い、齲蝕と歯周疾患が増加していると報告されており、また急速な都市化により生活習慣病(糖尿病)の増加も報告されている。しかし中国における歯科医療事情は、単位人口あたりの歯科医師数で日本の約30分の1にあたり、このような状況を放置することは、中国国民にとって、極めて不幸な状況であり、今後の中国国民の健康を著しく阻害するばかりでなく、医療経済学的にも多大な損失となる事は明白である。

このような観点から、中国人歯科医師に対する生活習慣病としての歯周病治療の普及活動を行うことと、効果的な予防プログラム立案・施行することは極めて重要である。

本研究では中国人に対し歯周病と生活習慣病(特に糖尿病)の関係について指導を行うための予防指導者として中国人歯科医師を育成し、これら予防指導者が自強小学校父兄を中心とした住民に対し歯周病と生活習慣病(特に糖尿病)の関係について、歯科疾患予防法について指導し、またあわせて自強小学校児童に対し歯科検診および予防指導を行った。その結果良好な結果が得られた。

Key Words 歯科疾患罹患状況調査指導、歯周病予防教育、生活習慣病

緒言

日本人による中国における歯科疾患実態調査は、1990年代より多数行われており、齲蝕についてはその低罹患率が、報告されている。しかし、近年の齲蝕罹患状況比較報告では大都市郡における齲蝕の増加が報告され、今後、都市化の進行に伴い、急増すると考察されている。

一方歯科2大疾患のうちの歯周病についての実態調査報告は中国衛生部による第二次全国口腔健康流行病学抽样調査(全国歯科疾患罹患状況抽出調査1995-1998施行)と、我々が1993年より5年間中国河北省承德市にて行った歯周炎自然史調査と歯周炎予防プログラム(日中医学協会1996年度調査・共同研究助成)の実施のみである。これらの結果より10歳代の小児に歯肉炎および初期歯周炎が認められ20歳代後半より歯周炎が発生し、40歳代では90%以上の罹患率であった。

歯周病は抜歯原因の第1位であり、この歯周病治療の普及と歯周病予防対策を早期に行う必要がある。

また2002年11月北京市にて開催された「日中医学大会2002」において基礎歯学分野での中

国歯科界の目覚ましい発展を目の当たりにすることができたが、臨床歯学分野や予防歯学分野(特に歯周病学領域)での立ち遅れが顕著であった。

特に中国における歯科医療事情は、単位人口あたりの歯科医師数で日本の約30分の1にあたり、このような状況を放置することは、中国国民にとって、極めて不幸な状況であり、今後の中国国民の健康を著しく阻害するばかりでなく、医療経済学的にも多大な損失となる事は明白である。

また中国では急速に都市化が進行し、都市型食生活への変容が認められ、生活習慣病の発症が増加していると報告されている。これら生活習慣病(特に糖尿病)と歯周炎の関連については、深い因果関係が報告されており、良好な歯周組織を持つものでは全身疾患の罹患率が低いとの報告がなされており、歯周病予防を通じ生活習慣病を中心とした全身疾患の予防の可能性が示唆されている。我々は、このような観点から、中国人歯科医師に対する歯周病予防の普及活動を行い、これら歯科医師を中心として地域住民に予防活動を行う住民参加型予防の実施と、歯科疾患罹患状況調査を行った。

対象と方法：

対象は、吉林大学口腔医学院に在籍する歯科医師および口腔医学院に在学中の歯科学生とした。

方法は、以下に記す歯周病予防の普及教育と歯科疾患罹患状況調査についての指導教育を講義および実習により行った。これらの育成教育を受けた歯科医師を予防指導者とした。

結果

1. 歯周病予防指導者育成教育について

歯周病の原因とその治療法、歯周病と生活習慣病の関係、生活習慣病の全身に与える問題点、歯周治療の治療効果と全身への影響、歯周病予防の必要性と具体的な予防法について法についてスライド・ビデオなどの視聴覚器材を用いた教育を行った。(1回3時間2回、計6時間、2007年6月実施)

吉林大学口腔医学院における参加歯科医師と活動状況：歯科医師20名、歯科学生30名計50名が参加し、活発な質疑応答がなされ、十分な開発教育がなされた。

2. 歯周病罹患状況調査と齶蝕調査方法の指導教育について(2007年11月実施)

① 歯周組織調査

歯肉炎指数 (Löe & Silness) 歯周ポケット深さ 歯肉出血指数

アタッチメントレベル 歯周炎関連細菌検査

PCR法を用いて、対象者プラーク中の細菌検査を行う。

以上について、代表歯、6歯の検診を行う。

② 齶蝕および現在歯調査

WHOの歯科疾患調査基準に従い、齶蝕罹患状況と現在歯数の調査法。

上記診査について吉林大学口腔医院来院患者の協力を得て実地実習を行い、基本的診査について満足のいく結果が得られた。

3. 歯科疾患罹患状況調査(2007年11月実施)

自強小学校の児童を対象としてう蝕罹患状況調査を行った。対象児童は6歳から12歳の320名とした。

う蝕罹患状況派は2001年に我々が実施した結果と比べ95.8%と5ポイントの増加が認めら

れた。また一人平均う蝕経験歯数は乳歯・永久歯とも増加が認められ日本と比べ極めて悪い状況であった(表1、2)。

表1. 一人平均う蝕経験歯数 乳歯

年齢(歳)	2001年	2007年	日本
6	6.1	7.1	3.7
7	5.1	7.0	4.2
8	6.8	7.2	3.0
9	3.3	5.1	3.6
10	2.3	3.1	2.1
11	0.7	1.3	1.0
12	0.3	1.4	0.3

表2. 一人平均う蝕経験歯数 永久歯

年齢(歳)	2001年	2007年	日本
6	0.1	0.3	0.2
7	0.7	0.8	0.2
8	1.0	1.4	0.5
9	1.3	1.7	0.9
10	2.1	2.7	0.9
11	2.2	3.3	1.6
12	3.7	2.5	1.7

4. 歯周病予防指導者による住民への普及活動について(2008年3月実施)

住民への予防普及活動については当初、職域または居住地を中心として行う予定であったが、勤務時間、勤務状況などの問題で一括しての指導が困難であったため、対象住民を自強小学校通学児童の父兄(120名)とした。

住民への予防普及活動は吉林大学口腔医学院の歯周病予防指導者より自強小学校講堂にてスライド等の視聴覚器材を用いて、先に行った育成教育の内容を中心に約30分の教育講演を行った。参加者は全児童数の約三分の一であり今後も中国人歯周病予防指導者により継続教育を決定した。

内容は歯周病と生活習慣病に関するものだけでなく、家庭における児童への予防健康教育を行うことを含むことについて協議決定した。

5. 歯周病罹患状況調査(2008年3月実施)

2007年11月に実施した歯周病罹患状況調査について吉林大学口腔医学院口腔医院来院患者の調査を行い中国人歯科医師の健診能力判定を行い良好と認められたため、今後中国人歯科医師により継続調査を行い対象者数を増加することを協議決定。

考察

中国国内での歯科疾患罹患状況ならびに生活習慣病の発症は都市型生活様式の進行とともに増加が認められ極めて悪い状況である。一方、これらの疾病に対する予防活動は行われていない現状である。

本研究では歯周病予防指導者を育成し、これら歯周病予防指導者による住民へ歯周病・生活習慣病予防普及活動を行い、併せて歯科疾患罹患状況調査を行ったが、児童において明らかに歯科疾患罹患状況が悪化していた。これらのことより中国における歯科疾患罹患状況は全体としても悪化していることが推測される。このことより本研究のような予防活動の重要性が認識された。

住民への普及活動については当初、職域・居住地の住民を対象に歯周病予防指導者から予防指導を行うこととしたが、対象者が現状の勤務状況などにより参加が困難であったため変更を余儀なくされた。この点については住民の意識の中に現状では健康より経済が優先されていると推測された。

対象住民の変更にあたり小学生の父兄に変更したことは学校行事の合間に時間を作ること

により参加可能になると考えられた点と、児童に予防活動を行っても父兄が予防について無知・無関心では児童の予防教育上好ましくないとの観点からである。この点については今後親子の両者に対する予防した場合の効果について詳細な検討が必要である。

また今後、これらの教育活動のアップデートを計るための継続教育の必要性がある。

参考文献

1. 中国衛生部：第2次全国口腔健康流行病学抽調査. 1998. 人民衛生出版社. 北京
2. 中田 稔：中国人小児の歯科疾患と歯科的特質に関する実態調査. 1992. 文部省科学研究費報告書

作成日 2008年3月14日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2008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： 奥山 徹 

所属機関名： 明治薬科大学

所属部署： 天然薬物学教室 職名： 教授

〒 204-8588

所在地： 東京都清瀬市野塩2-522-1

電話： 042-495-8904 内線： _____

1. 助成金額： 950,000 円

2. 研究テーマ

慢性閉塞性肺疾患(COPD)に有効な新疆ウイグルで用いられる天然薬物の開発研究

3. 成果の概要 (100字程度)

新疆医科大学での講演を通じた相互理解と、共同研究の詳細な打ち合わせを行った。続いて、ホータン近郊で医療現場のウイグル伝承薬物実態調査、砂漠地帯での薬用植物の調査、甘草および蓍麻子の収集を行った。

※発表論文等

2度の講演会で新疆ウイグル薬物調査を通じての成果を報告した。(添付参照)

1. 2007年12月15日「うけら会」講演会(東京都薬用植物園)
2. 2008年2月24日「日本薬用植物友の会」講演会(仙台)

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 奥山 徹 職名： 教授

所属機関： 明治薬科大学 部署： 天然薬物学教室

中国側研究者氏名： Halmurat Upur 職名： 副学長

所属機関： 新疆医科大学 部署： _____

慢性閉塞性肺疾患（COPD）に有効な新疆ウイグルで用いられる天然薬物の開発研究

日本側研究者氏名	教授 奥山 徹
所 属 機 関	明治薬科大学
中国側研究者氏名	副学長 Halmurat Upur
所 属 機 関	新疆医科大学

要旨

2007年5月末に新疆ウイグル自治区を訪問し、新疆医科大学で講演を通した一層の相互理解と、共同研究の今後の展開について詳細な打ち合わせを行った。続いて、タクラマカン砂漠のオアシスの町、和田（ホータン）近郊でウイグル病院・薬局の実態を見学し、ウイグル伝承薬物の調査、砂漠地帯での薬用植物の調査、特に甘草の採集と集荷地での収集を行った。

研究室では、入手した甘草の種の鑑定を行い、各種標品との形態学上の比較、およびDAD-HPLCを用いた指標化合物の検出により、栽培および自生していた甘草は *Glycyrrhiza inflata* と同定した。しかし、現地の病院で用いられていた甘草は鑑定の結果 *G. glabra* であり、その詳細については今後の検討課題である。現在、入手した *G. inflata* の成分検索を行うと共に慢性閉塞性肺疾患（COPD）に対する活性について検討を行っている。

また、現地で喘息等の呼吸器系疾患に用いられている方剤「寒喘祖帕顆粒」および、その構成生薬「蕁麻子」に関しても COPD に対する活性について成分検索を交えて検討している。これまでのところ、寒喘祖帕顆粒に強い誘導型一酸化窒素（inducible-NO）産生抑制効果を認めており、その構成生薬の中でも「蕁麻子」に強い抑制活性を明らかにしている。また、「蕁麻子」に関しては成分検索の報告がなく、現在その活性成分について詳細に検討している。

Key Words 新疆ウイグル自治区, 慢性閉塞性肺疾患（COPD）, 天然薬物, 蕁麻子, 甘草

緒言：

新疆ウイグル自治区は中国西北地方に位置し、海から離れているため典型的な大陸性気候で、季節はもとより昼夜の気温の変化が大きく、少雨で日照時間が長く、空気は乾燥し、砂漠が多い。このような厳しい自然環境により、呼吸器疾患の発病率が高く、大きな社会問題となっている。

呼吸器系疾患は新疆ウイグル自治区でのみならず、世界でも増加の一途をたどっており、1990年のWHOの統計によると世界の死亡原因の第3位に肺炎、第6位に慢性閉塞性肺疾患（COPD）があげられており、2020年の死亡原因予測では第3～5位がCOPD、肺炎、肺がんと予想されている。

しかし、新疆ウイグル自治区の平均寿命は約68歳と決して低い数字ではなく、伝統的に用いられている生薬がこれら呼吸器系疾患を抑制・治療してきたのではないかと考えた。

そこで、ウイグル伝統薬として呼吸器系疾患に用いられる方剤および構成生薬について、そのCOPDに対する効果を検討し、有効成分の解明を通してこれら呼吸器系疾患の予防および治療に資することを目的として本研究に着手した。

事前文献調査により、新疆ウイグル自治区で呼吸器系疾患の治療に用いられている中薬エキス製剤「寒喘祖帕顆粒」に着目し、その方剤および構成生薬の収集を行うこととした。また、本処方構成生薬の一つでもある甘草は、新疆ウイグル自治区には *Glycyrrhiza uralensis*、*G. glabra*、*G. inflata* の3種およびこの交配種が分布するとされており、現地に生育するカンゾウ属植物の採集・収集を行い、入手した試料の種の同定、な

らびに成分検索を行うこととした。

COPD に対する抑制効果を検討する有用且つ簡便なスクリーニング系は現在のところ報告されていない。しかし、90年代から、一酸化窒素(Nitric Oxide, NO)が気管支喘息、肺炎、慢性閉塞性肺病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)など多くの気道炎症性疾患の病態に深く関わっていることが明らかにされていることから、本研究では一次スクリーニングとして、培養細胞を用いた誘導型一酸化窒素産生に及ぼす影響を検討することとした。

研究方法：

新疆ウイグル自治区南部の都市・和田(ホータン)市近郊、墨玉県の乾燥地帯で、カンゾウの全草(地上部、花、果実、根およびストロン)を採集し、同時に現地集積地において市場品甘草を入手した。また、和田人民病院にて、ウイグル医療に用いられる甘草を分譲していただいた。さらに、和田および、烏魯木齊(ウルムチ)の生薬市場にて各種生薬を購入した。

帰国後、採集したカンゾウの標本を形態学的特徴を調べ、日本各地で試験栽培されている各種カンゾウの標本を入手し、総合的な観点からの同定を試みた。同時に、それぞれ入手したカンゾウを凍結乾燥させ、80%メタノールで60℃加熱抽出を6時間行い、得られたエキスについてDAD-HPLCシステムを用いて各種標品とのスペクトルパターンの比較や指標化合物の検出により種の同定を試みた。

同時に、これら全ての生薬について、中薬エキス製剤「寒喘祖帕顆粒」およびその生薬組成による自家製剤とあわせて、マクロファージ細胞による誘導型一酸化窒素産生に対する抑制効果を検討した。

さらに、この中で活性の認められた「葶麻子」について成分検索を行った。

結果：

採集・収集した研究材料は以下の通りである。

- | | |
|-------------------|--------------------------|
| 1. 新疆甘草市場品 18kg | 墨玉県甘草集積場にて烏魯木齊病院経由で購入(根) |
| 2. 医療用カンゾウ 100g | 和田人民病院薬剤部より譲与(根) |
| 3. カンゾウ(栽培品) 3株 | 和田市郊外にて採集(根および地上部) |
| 4. カンゾウ(栽培品) 5株 | 墨玉県甘草集積場近郊で採集(根および地上部) |
| 5. カンゾウ(栽培品) 5株 | 和田市郊外にて採集(地上部) |
| 6. カンゾウ(野生品) 2株 | 墨玉県甘草集積場近郊で採集(根および地上部) |
| 7. 葶麻子(シシリ?) 500g | 和田市生薬市場で購入 |
| 8. 寒喘祖帕顆粒 6箱 | 和田市生薬市場で購入 |
| 9. 寒喘祖帕顆粒 6箱 | 和田市生薬市場で購入 |
| 10. 葶麻子 5kg | 烏魯木齊市生薬市場で烏魯木齊病院経由で購入 |
| 11. 石榴花 500g | 烏魯木齊市生薬市場で購入 |
| 12. 石榴子 500g | 烏魯木齊市生薬市場で購入 |
| 13. 石榴皮 400g | 烏魯木齊市生薬市場で購入 |

まずはじめに、1~6のカンゾウについて、植物種の鑑定を行った。採集したカンゾウ(3, 4, 5)はほぼ同じ形態を有し、小葉が幅の広い楕円形で皺と光沢があり蜜状質に被われており、豆果は長円形でまっすぐであり、膨脹していた。医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター・北海道研究部より、*Glycyrrhiza uralensis*、*G. glabra*をご恵与いただき、その地上部の形態と比較したが、葉の形状や繊毛の有無などでいずれの種とも異なる形状を有していた。採集したカンゾウ6に関しては、地上部の形状は*G. glabra*と類似点を持つが、花の形状が異なる為、同一種とは判定できなかった。

続いて、これらカンゾウの根と地上部をそれぞれ凍結乾燥し、80%メタノールで60℃加熱抽出を6時間行い、得られたエキスについて多波長紫外線検出装置(DAD-HPLC)を用いて、定法¹に従い成分の分析を試みた。こ

の結果、採集したカンゾウ（3，4，5）はいずれも地上部の成分組成が類似していること、根（3，4）および購入した新疆甘草（1）は *G. inflata* に特徴的な指標化合物 Licochalcone A のピークが観測されたことから、1，3，4，5は *G. inflata* と同定した。一方、和田人民病院で使用されている甘草は、特徴的な指標化合物 glabridin が観測されたことから *G. glabra* と同定した。² なお、本方法では採集したカンゾウ6については目立ったピークが観測されず、これまでのところ種は不明である。現在、大量入手した *G. inflata*（新疆甘草市場品1）の成分検索を行うと共に慢性閉塞性肺疾患（COPD）に対する活性について検討を行っている。

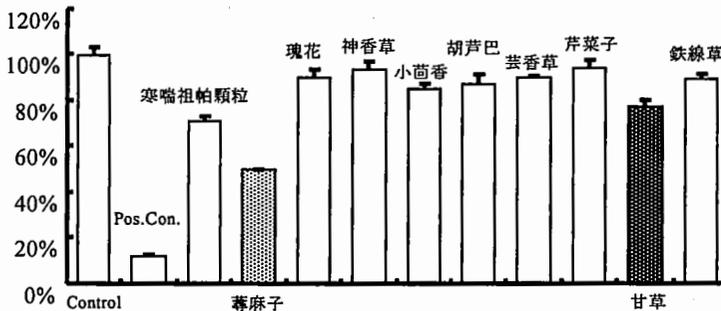
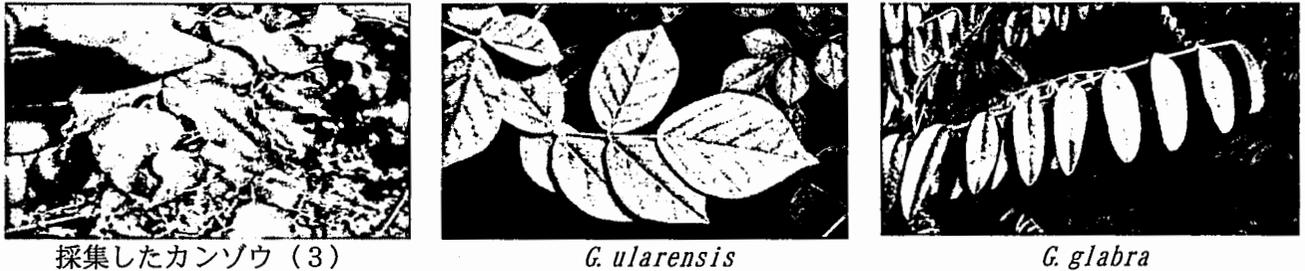


Fig. 1. Inhibitory Activities of the Extracts of “Han Chuan Zu Pa Ke Li” and Each Component on NO Production RAW264 was cultured with test samples (50 μ g/mL) or positive control (Pos. Con. Aminoguanidine 250 \cdot M) for 24 hr, and NO content in the culture supernatants were measured. Each value represents the mean \pm S. D.

* ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001, by t-test.

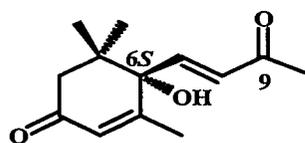
次に、中薬エキス製剤「寒喘祖帕顆粒」およびその生薬組成による自家製剤とあわせて、マクロファージ細胞による誘導型一酸化窒素産生に対する抑制効果を検討した。

その結果、Fig. 1 に示すように方剤および蕁麻子、甘草に比較的強い抑制活性を認めた。

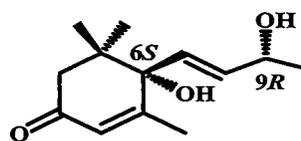
蕁麻子は新疆でのみ用いられている伝統的な生薬であり、その成分に関しては研究されていない。そこで、その成分に関して検討を行った。蕁麻子 8.5 kg を MeOH で抽出し、そのエキスを減圧下濃縮後、朝比奈式連続抽出器にて水に懸濁させて *n*-hexane で分配抽出し、*n*-hexane 可溶部を得た。以下、AcOEt、*n*-BuOH で同様の操作を行い、それぞれの可溶部を得た。蕁麻子の AcOEt 可溶部からメガスティグマン系化合物 1, 2 を単離し、化合物 2 については CD helicity 則、改良モッシャー法を用い、立体を含めた構造研究を行った。その結果、立体を含めて化合物 1 を (+) dehydrovomifoliol、化合物 2 を (+) blumenol A と同定した。また、フラボノイド配糖体 3-7 を単離し、それぞれを同定した。(Fig. 2) 蕁麻子からこれらの化合物の単離は初めてである。

考察：

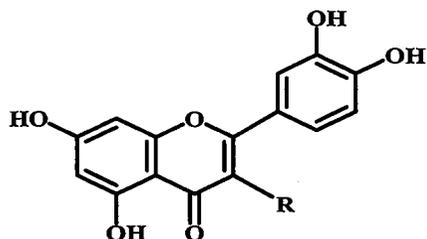
和田で甘草 *G. inflata* の幅の広い生息地を確認したことは、必要に応じて安定確保に貢献できるものと思われる。現地での *G. inflata* および *G. glabra*、*G. ularensis* の用いられ方の違いは確認できなかったが、医療の現場では近隣で収穫される *G. inflata* でなく *G. glabra* が用いられていたことは興味深い。新疆甘草の成分検索に関しては数多くの報告があるが、この慢性閉塞性肺疾患への効果に関する報告は未だにされておらず、



(+)-dehydrovomifoliol (1)

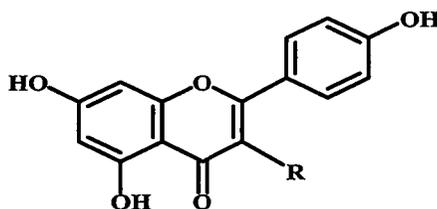


(+)-blumenol A (2)



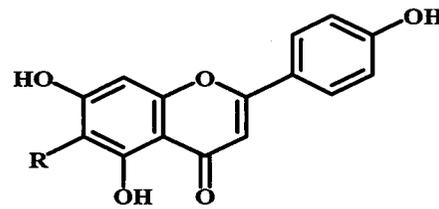
isoquercetin (3): R=O-Glc

quercitrin (4): R=O-Rha



astragalol (5): R=O-Glc

afzelin (6): R=O-Rha



isovitexin (7): R=C-Glc

今後の成分検索から有用な化合物の単離が期待される。

中薬エキス製剤「寒喘祖帕顆粒」ならびにこれに含まれる葶麻子、甘草に強い NO 産生抑制効果を認めたことは、新疆ウイグル自治区で多発している慢性閉塞性肺疾患に有効な手助けができてると考えている。なお、*G. glabra* と *G. inflata* の活性の相違については現在検討中である。

活性の認められた葶麻子から今回はじめて成分検索を行い、7種の化合物を単離・同定した。イラクサ科に属する葶麻は根や地上部の成分の報告があるのみで果実についての報告はない。今後、これらの化合物の詳細な活性もあわせて、二次スクリーニングによる活性評価等を検討する予定である。

参考文献：

1. H. Hayashi *et al*: Phylogenetic Relationship of Six *Glycyrrhiza* Species Based on *rbcl* Sequences and Chemical Constituents, *Biol. Pharm. Bull.*, 23 (5), 602-606 (2000).
2. 岩崎典明ら：日本薬学会第 128 年会 (横浜) 要旨集 第 2 巻 pp63 (2008).

注：本研究は、2007 年 12 月 15 日「うけら会」講演会（東京都薬用植物園）にて「シルクロードにロマンを求め新疆ウイグルの恵を味わう」と題した講演、および、2008 年 2 月 24 日日本薬用植物友の会講演会（仙台）にて「シルクロードにロマンを求めて甘草属植物の現地調査を中心に」と題した講演で成果を報告した。また、甘草の種の同定に関しては、2008 年 3 月 26-28 日日本薬学会第 128 年会（横浜）で 26PE-am039「新疆ウイグル伝承薬物の研究—新疆ウイグル自治区に生育する甘草属植物の種の同定—」と題して発表予定である。

作成日：2008 年 3 月 14 日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—中国人研究者・技術者招聘—報告書

2008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： 島田達生 

所属機関名： 大分大学

所属部署： 医学部看護学科 職名： 教授
〒879-5593

所在地： 大分県由布市挾間町医大ヶ丘1-1

電話： 097-586-5032 内線： 5032

1. 助成金額： 960,000 円

2. 研究テーマ

肥満モデル動物における神経性調節

3. 成果の概要 (100字程度)

KKAyマウスは高血糖を伴う肥満モデル動物である。対比マウスとしてC57BLマウスを使用した。水群と赤ワイン群に分けて、2週間飼育した。KKAyマウスにおいて、赤ワインは褐色脂肪組織を活性させ、白色脂肪細胞の肥大を抑え、脂肪肝をも改善させていた。免疫組織化学研究は赤ワインが交感神経終末に強く働いていることを暗示した。

4. 被招聘者

氏名：王海平 職名：准教授（副教授）

所属機関：河北北方学院 部署：医学部組織発生学講座

5. 滞在日程概要 (日付、主な活動・工程等)

平成19年5月～6月 : 大分大学医学部来日
動物実験の開始、試料作製

7月～8月 : 光学顕微鏡観察、電子顕微鏡観察

9月 : 一時帰国。博士論文を発表。河北北方学院医学部副教授に就任

10月～11月 : 動物実験再開。試料作製

12月～平成20年3月 : 免疫組織化学手法を取り入れた研究法を実施

3月28日 : 第113回日本解剖学会総会（大分）、ポスター発表

肥満モデル動物における神経性調節—赤ワインが脂肪組織に与える影響—

研究者氏名 王 海平
中国所属機関 河北北方学院
日本研究機関 大分大学医学部看護学科健康科学
指導責任者 教授 島田 達生
共同研究者名 千葉政一, 藤本佳菜子, 川里浩明,
安田愛子, 外菌英樹

要旨

肥満糖尿病モデル動物である KKAY マウスを使って、赤ワインが脂肪組織に与える影響を形態学的に調べた。肩甲骨間と胸大動脈の周囲の脂肪組織（褐色と白色）および腎臓周の脂肪組織（白色）を採取した。赤ワイン群の褐色脂肪組織(BAT)は水群に比べて、小型の脂肪滴を有し、エオジン好性の褐色脂肪細胞 (BAC) から構成されていた。電子顕微鏡観察によって、赤ワイン群の BAC はクリスタが発達したミトコンドリアを多数有していた。さらに免疫組織化学的研究は BAT が UCP-I 抗体や TH 抗体に強い陽性反応を示した。これらの所見は赤ワインが交感神経を刺激し、BAT を活性化させ、その結果、熱産生機能が亢進状態にあることを暗示した。一方、赤ワイン群における白色脂肪組織 (WAT) は水群の WAT に比べて、明らかに小型の白色脂肪細胞からなっていた。特にこのことは、内蔵脂肪において顕著であった。本実験から赤ワインの飲用は交感神経を刺激し、肥満や生活習慣病の予防にもつながることが推察される。

Key Words 褐色脂肪組織, 白色脂肪組織, 交感神経, 肥満モデル動物, 赤ワイン

緒言:

近年、社会的な問題として注目されているメタボリックシンドロームの病態は、肥満特に腹腔内の脂肪が蓄積する内蔵脂肪型肥満がその上流に位置している。ヒトを含む哺乳動物は、形態機能も異なる 2 種類の脂肪組織、白色脂肪組織(WAT)と褐色脂肪組織(BAT)を有している。一般に、脂肪組織といえば WAT を指しており、肥満になると大量の中性脂肪を蓄えているのが WAT である。一方、BAT は、小型脂肪滴と多くのミトコンドリアを有する細胞からなり、積極的に熱を産生し、体温の調節を行っている^{1,2)}。

今日、この BAT の熱産生が体温調節のみならず広くエネルギー消費の自立的調節に関与しており、その機能低下が肥満の一因になりうる^{3,4)}。さらに BAT は交感神経刺激によって活性化されるといわれている¹⁾。

先に、著者らは、赤ワインが BAT を活性化し、白色脂肪細胞の肥大を抑えていることを、UCP-I 抗体を用いた光学顕微鏡研究に加えて、透過電子顕微鏡と走査電子顕微鏡観察で明らかにした⁵⁾。本研究は、肥満モデル動物である KKAY マウスを使って、赤ワインが脂肪組織に与える効果を形態学的に調べる。また、uncoupling protein I(UCP-I)抗体と交感神経を同定するための tyrosin hydroxylase 抗体を使って、免疫組織化学的研究も併せて行う。

対象と方法:

生後 6 週齢の雄性肥満モデルマウス (KKAY マウス)、体重 26 g、と同週齢の対照動物 C57Black マウス、体重 22 g、各 8 匹総計 16 匹を 13 日間飼育した。飼料は固形飼料 (CE:日本クレア) を使用した。

KKAy マウスと C57BL マウスの 2 群をさらに、飲料水の違いにより、水群と赤ワイン群に分けた。赤ワインはマスカットベリーA（三和酒類）の 14%アルコール濃度のものを自由摂取させた。

ネンブタール深麻酔下で、マウスの肩甲骨間の皮下脂肪組織および脂肪組織を含む胸大動脈と腎臓を切り出し、光学顕微鏡（光顕）用、透過電子顕微鏡（TEM）用および走査電子顕微鏡（SEM）用試料を作製した。光顕用パラフィン切片を作製し、通常のヘマトキシリン・エオシン染色に加えて、uncoupling protein（UCP-I）抗体および tyrosine hydroxylase（TH）抗体を用いて免疫染色した。TEM 用には、厚さ約 70nm の超薄切片を作製し、ウランと鉛で二重染色した。SEM 用には、腎周囲の脂肪組織を凍結乾燥後に金蒸着した。

結果：

1. マウスの体重増加量と血糖値

13 日間飼育した 4 群の実験において、以下の結果が得られた。マウスの体重増加量は I 群（C57BL・水）では約 0.8 g、II 群（KKAy・水）は 10.3 g、III 群（KKAy・赤ワイン）は 8.45 g であった。赤ワイン摂取は明らかに体重の増加を抑えていた。

2. 脂肪組織の光学顕微鏡所見

1) 褐色脂肪組織（BAT）

8 週齢 C57BL マウスの肩甲骨間と胸大動脈の周囲に BAT が存在していた。それは光顕レベルでエオシン好性で小型の多胞性の脂肪滴を有する褐色脂肪細胞（WAC）から構成されていた（図 1a）。TEM レベルにおいて、WAC は小型脂肪滴の間にクリスタの発達したミトコンドリアを多数有していた（図 2a）。免疫組織化学的に、BAT は UCP-1 抗体と TH 抗体に対して強い陽性反応を示した。

KKAy・水群の BAT は、肩甲骨間と胸大動脈周囲の間で、大きな差異はなかった。BAC は対照群のそれよりもエオシンに対して染色性が低く、より大きな脂肪滴を有していた（図 1b）。KKAy・赤ワイン群の BAT は、エオシン好性で、小型の脂肪滴をもつ細胞によって構成されていた（図 1c）。CUP-1 抗体や TH 抗体に対する反応は水群よりも赤ワイン群の BAT において強かった。

2) 白色脂肪組織（WAT）

腎周囲の WAT はそれぞれの実験群で異なった様相を呈した。白色脂肪細胞（WAC）は、単一の大型脂肪滴を有し、核が辺縁にあることで容易に同定される。

KKAy・水群の WAT は、C57BL・水群のそれよりもはるかに大きな脂肪滴を有する細胞からなっていた（図 2a,b）。また、小型の再生された細胞もみられた。KKAy・赤ワイン群の WAT は、C57・水群よりもやや大きい細胞からなっていたが、KKAy・水群よりも明らかに脂肪細胞は小型であった（図 2c）。細胞の大きさは、C57 が 40-50 μm 、KKAy・水群が 80-100 μm 、KKAy・赤ワイン群が 60-80 μm であった。

3. 脂肪組織の電子顕微鏡所見

1) 透過電子顕微鏡所見

対象（正常）マウス（C57BL）の褐色脂肪細胞（WAC）は、細胞の中央に円形の核を有し、その細胞質は比較的小型（8 μm ~10 μm ）の脂肪滴とクリスタの発達したミトコンドリアによって占められていた。

KKAy・水群の WAC は、正常マウスのそれらに比べて、大型であり、核は辺縁に位置していた。細胞質はより大型（10 μm ~20 μm ）の脂肪滴によって占められ、ミトコンドリアは少なかった（図 3a）。KKAy・赤ワイン群の WAC は対象に近い像を呈し、脂肪滴は KKAy・水群よりも小型（8 μm ~12 μm ）で、ミトコンドリアも多かった（図 3b）。

2) 走査電子顕微鏡所見

走査電子顕微鏡は白色脂肪組織（WAT）を立体的に捉えることを可能にした。白色脂肪細胞（WAC）は球形であった。実験群の WAC の大きさはかなり異なっていた。C57BL マウスの WAC は約 50 μm であり、KKAy・水群の WAC は 100 μm で、かなり C57BL マウスのそれらよりも大きかった。KKAy・赤ワイン群の WAC は水

群よりも明らかに小型で約 60 μm 、対象に近い大きさの細胞もみられた。

考察：

KKAy マウスは肥満かつ糖尿病モデル動物として、一方、C57BL マウスは正常モデル動物として広く使われている。KKAy マウスは皮下脂肪のみならず、内臓脂肪も肉眼的に豊富にみられた。顕微鏡レベルに於いても、KKAy マウスの白色脂肪細胞は皮下のみならず内臓においても C57BL マウスのそれらよりも大型であった。一方、KKAy・水群の褐色脂肪細胞 (BAC) は C57BL マウスのそれらよりも大型で、より大きな脂肪滴で占められ、ミトコンドリアは明らかに少なかった。BAC 内のミトコンドリアに特異的な UCP-1 も少なかったことから、KKAy マウスの褐色脂肪組織 (BAT) は熱産生機能が低下していることが結論づけられた。

一般に、冬眠動物やヒトの新生児では、寒さが交感神経を刺激し、BAT を活性化し、熱産生が亢進する¹⁾。また、アルコールが BAT を活性化させるという報告がある²⁾。しかしながら、大量のアルコールや白ワインの 14 日間飲用は、C57BL マウスの BAT の機能低下をもたらし、白色脂肪細胞を肥大させた。一方、赤ワインは BAT を活性化し、白色脂肪細胞の肥大をおさえていた³⁾。今回の肥満モデル動物 KKAy を使った実験において、赤ワイン群の BAC は脂肪滴が小型化し、数多くのミトコンドリアを有していた。UCP-1 抗体に対しても強い陽性反応を示した。このような形態所見は、赤ワインが肥満動物においても BAT を活性化させることを物語っている。TH 抗体に対しても強い陽性反応を示したことは、赤ワインが交感神経を刺激し、その結果 BAT を活性化させたことが推察される。また、体重増加が抑えられ、白色脂肪細胞も小型化していた。

今回の赤ワインの飲用は大量であったため、今後、1 日の赤ワインの飲用量を減らし、長期間の実験を行う予定である。

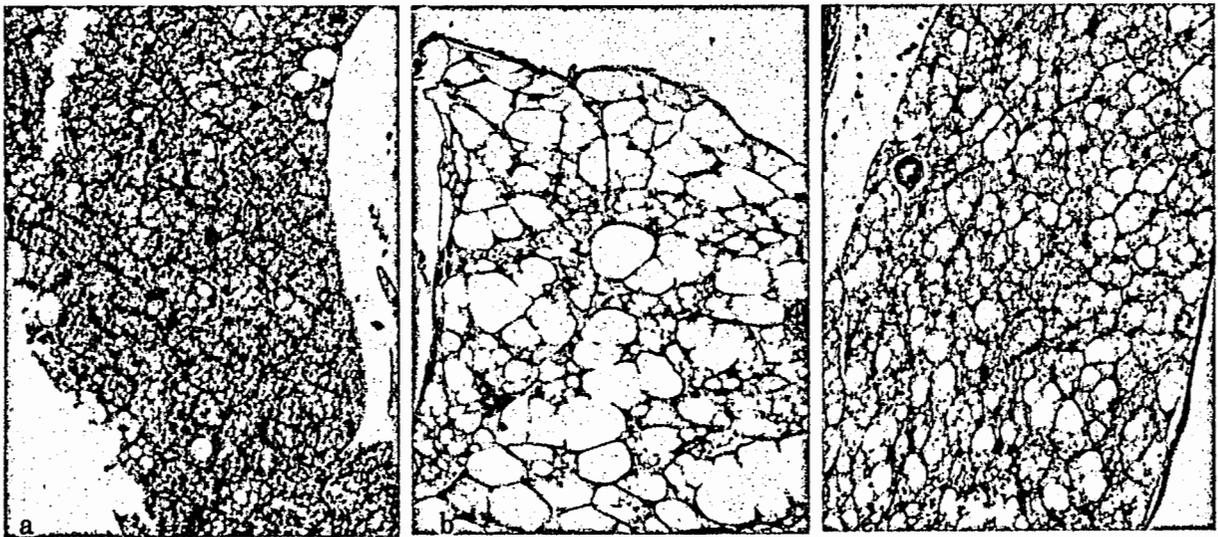


図 1 胸大動脈周囲の褐色脂肪組織

a : C57BL マウス

b : KKAy・水群

c : KKAy・赤ワイン群

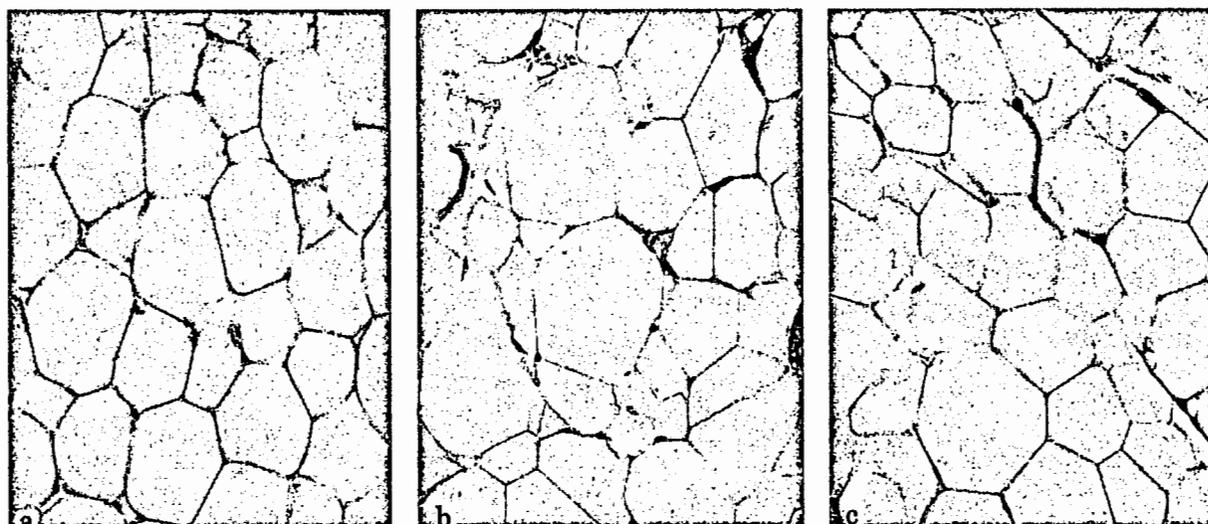


図2 腎周囲の白色脂肪組織

a : C57BL マウス

b : KKAY・水群

c : KKAY・赤ワイン群

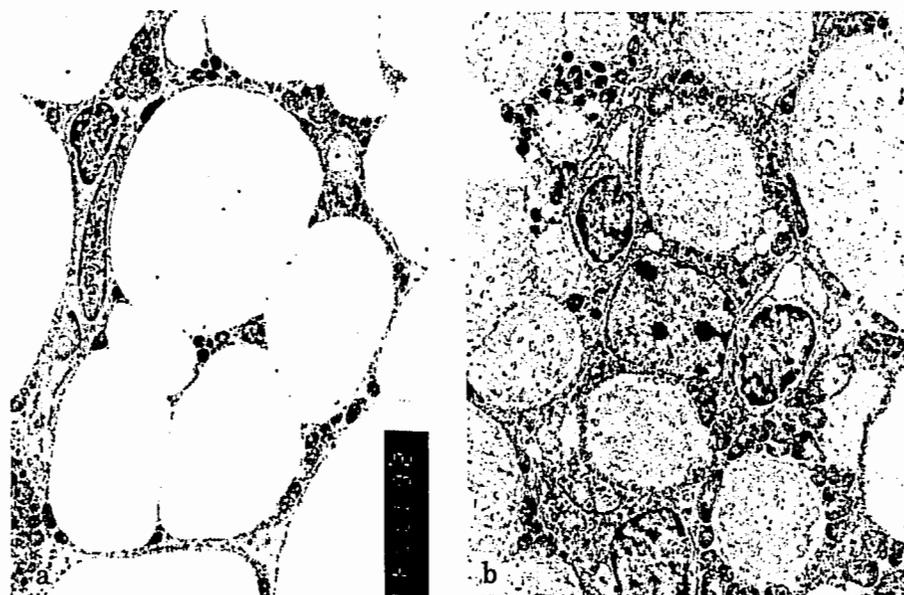


図3 KKAY マウス月の褐色脂肪細胞の透過電顕像

×2,000

a : KKAY・水群

b : KKAY・赤ワイン群

参考文献 :

1. Smith R.E. and Horwitz B.A.:Brown fat and Thermogenesis , phsiological Reviews. 49:330-408,1969
2. Juliet M.H. : The distribution of brown adipose tissue in the human. J.Anat. 112:35-39,1972
3. 野田幸子, 入江由希子, 木村和弘, 斉藤昌之:エネルギー代謝と褐色脂肪細胞. Pharma Medica 20:61-67,2002
4. 斉藤昌之:褐色脂肪細胞とメタボリックシンドローム. 実験医学, 25 : 61-67, 2007
5. 飯盛光葉, 千葉政一, 鹿子木和寛, 外菌英樹, 吉松博信, 島田達生:赤ワインによる褐色脂肪組織の活性, 形態学的研究, 肥満研究 12 : 199-205, 2006
6. Huttunen P .and Koetelainen:hong-term alcohol consumption and brown adipose tissue in man. Eur.J.Appl.physiol.60 :418-424,1990

作成日 : 2008年3月14日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－日本人研究者派遣－報告書

2007年 8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： グレッグ美鈴

所属機関名： 神戸市看護大学

所属部署： 看護部

職名： 教授

〒651-2103

所在地： 神戸市西区学園西町3-4

電話： 078-794-8080

内線： 2212

1. 助成金額： 220,000円

2. テーマ

中国の継続看護教育に活用できる質的研究

3. 成果の概要（100字程度）

中国の継続看護教育における質的研究活用の可能性を明らかにするために、2病院で看護管理者へのインタビューと「中国の継続看護教育に活用できる質的研究」のテーマで講演を行い、意見交換を実施した。これらの結果から、継続看護教育への質的研究の段階的導入の必要性が明らかになった。

4. 招聘機関

機関名： ①広州市赤十字医院、②上海交通大学附属[※] 代表者名： ①曹晓晓、②何夢姝 職名： ①副院長、②院長

所在地： ①広州市同福中路396号、②上海市宜山路600号

5. 滞在日程概要（日付、主な旅程・行事等）

2007年7月12日（木）関西国際空港～広州 病院関係者と会食

7月13日（金）広州市赤十字病院 講演・意見交換、看護部長インタビュー

7月14日（土）広州市赤十字病院 副看護部長インタビュー、広州～上海

7月15日（日）上海交通大学附属第六人民医院、教育担当師長インタビュー

7月16日（月）上海交通大学附属第六人民医院、講演・意見交換、看護部長インタビュー
上海～広州

7月17日（火）広州～関西国際空港

中国の継続看護教育に活用できる質的研究

研究者氏名 グレグ美鈴
所属機関 神戸市看護大学 教授

要旨

中国の継続看護教育（特に病院における現任教育）の現状を把握し、その教育においてどのように質的研究が活用できるかを明らかにすることを目的とした。2病院での看護管理者へのインタビューと、「中国の継続看護教育に活用できる質的研究」の講演を現任教育の一環として実施し、講演への反応を把握しデータとした。その結果、中国の現任教育のシステム（継続教育活動の受講証明による単位制）は、日本より整備されているが、大学院の教育においても量的研究が中心に教えられており、病院の看護管理者（看護部長、副看護部長レベル）にとっても質的研究は未知な領域であることが明らかとなった。しかし都市の大病院では、これまでに質的研究の講演を継続教育として実施したこともあり、地域格差は大きい。現任教育レベルでの質的研究の実施には、更なる教育が必要であるが、看護研究全般についての関心は高く、質的研究を継続看護教育として実施する素地は育っていると考えられる。継続看護教育への質的研究の段階的導入の必要性が明らかとなった。

Key Words 継続看護教育, 現任教育, 質的研究, 臨床看護研究

緒言：

日本においては、人間の経験を理解し得る質的研究の重要性が看護の中で認識され始め、継続看護教育の中でも活発に活用されている。日本と中国は、看護協会が連携して、学術集会を開催するなどの協力関係にあり、中国の継続看護教育への質的研究の可能性をさぐることは、両国にとって、究極的には看護の質の向上につながると思われる。本研究の目的は、中国の継続看護教育に、どのように質的研究が活用できるかを明らかにすることである。

対象と方法：

1. A病院の看護部長、副看護部長およびB病院の教育担当師長、病棟師長を対象に、継続看護教育の現状、および臨床における看護研究の現状についてインタビューを行った。
2. A・B病院における現任教育の場で、「中国の継続看護教育に活用できる質的研究」の講演を行い、参加者との意見交換を行った。
3. 上記1、2における発言内容を、継続看護教育の現状、臨床看護研究の現状、質的研究の現状に分けて分析した。

（A病院は病床数が約600床、B病院は約1,700床である。研修参加者は、A病院が約80名、B病院が約150名であった。）

結果：

1. 継続看護教育の現状

中国における看護学教育の課題は、人口の増加と高齢化に伴う社会のニーズに対応するために、看護師の数と質を確保することである。高等教育での看護学教育も増加傾向にあるが、全体の看護師数からみると、少数に過ぎない。そこで、基礎教育卒業後の継続看護教育が重要となる。中国では、1993年に制定された「中華人民共和国護士管理弁法」を基盤として、「護士管理施行規則」が定められ、免許制度、昇進制度と継続教育を組み合わせ

わせて、看護師の能力向上のためのシステムを導入している。継続看護教育活動として、学会、講演会、講習、研修への参加、論文発表などの活動が単位として記載された個人カードが作られている。1年で最低25単位を取得することが要求される（A病院・副看護部長）。

この継続看護教育制度については、次のような意見もあった（B病院・病棟師長）。「単位取得を気かけながら学習しなければならない状況に対して、これで本当に看護実践能力を向上させられるのか、忙しい日常の仕事とのバランスをどのように取れば良いのか悩む。看護師不足の中、研修などで学ぶことに時間を使うよりも、もっとベッドサイドで患者ケアをする方が重要なのではないかと思うこともある。今の継続看護教育制度で良いのだろうか。」

2. 臨床看護研究の現状

中国で行われている臨床看護研究は、研究数そのものも多くはないが、それらのほぼ全てが量的研究である。また、これらの量的研究も複雑なデザインではなく、統計も単純集計などの記述統計を中心としたものが多い現状にある（B病院・看護部長）。

A病院の研修参加者で、臨床看護研究を実施したことがあるものは1名のみであった。一方、B病院では、10年くらい前から病院は看護師に研究をするように勧めており、複数の看護師が研究発表を行っている。しかしB病院においても、研究指導者を得ることが難しく、大学卒業の看護師は、個人的に大学教員に指導を求めている（B病院・教育担当師長）。

講演は、質的研究を用いた継続看護教育に関するものであったが、研修参加者からは、研究全般に関連する質問が出された。例えば、質問紙を用いた量的研究のための尺度開発に関する内容である。他の国の調査で使われた質問紙を翻訳して、自分の国で用いることは問題がないか、もし自分の国で使用する場合、どのようなことに注意をすべきかについて質問があった。

3. 質的研究の現状

両病院とも質的研究について、詳しく知っている人はいなかった。質的研究を用いた論文を読んだことがある人もいなかった。日本では、グラウンデッド・セオリー、現象学、エスノグラフィー、質的記述的研究などが看護の中でしばしば使われているが、これらの名前を聞いたことがある人も皆無であった。B病院では、過去に1度、質的研究の概要の講義を現任教育として実施したことがあるとのことであったが、具体的手法や研究ではなく、量的研究との違いなどに焦点が当てられていた（B病院・教育師長）。

香港の修士課程で学んでいるA病院の副看護部長は、研究方法として学んでいるのは全て量的研究であり、質的研究については学ばないと話していた。統計学を用いた仮説検証型の研究が主であり、疫学研究で使用される無作為割付臨床試験、コホート研究、症例対象研究などの研究デザインに基づく学習を、看護のみではなく保健・医療関係を専攻する学生と学んでいるとのことであった。

A病院では、質的研究の講演後、全く新しい知識を得え、質的研究の重要性が理解できたと述べられていた（A病院・看護部長）。講演では、「主観を排除し、どのように客観的分析をするのか」、「質的研究の基礎となる学問は何か」（A病院・研修参加者）、「どのような理論が活用できるか」、「質的研究の弱点をどう補うか」、「インタビューでデータ収集をする場合に、どのようにして真実を話しているとわかるのか」（B病院・研修参加者）などの基本的質問の他、「日常の看護の多くを、医学的知識の低いヘルパーに委ねて、看護師不足を補っている状態であり、質的研究を役立てる方法が知りたい」という質問も出された。

考察：

中国では、看護師登録の有効期間は2年であり、看護師として仕事を継続しようとする場合には、2年ごとの再登録が必要となる。この免許更新時には、継続看護教育活動の実績を記載した個人カードの提出が求められる。このような継続看護教育システムについては、日本より進んでいると考えられる。しかし、継続看護教育の内容

としては、講習や研修など受身の学習が多い。継続看護教育に積極的に臨床看護研究を導入する必要性は、中国看護協会も認め、日本看護協会との共催で、日中看護学会が継続して開催されている。

今回、インタビューや講演を実施した2病院では、臨床看護研究に対する取り組みに大きな違いがみられた。都市部にある大病院では、病院が看護研究を推進しており、日本の事情に近いが、問題も日本に類似している。つまり臨床看護研究を指導する人材の不足である。中国も日本も、看護管理者（病棟師長レベル）に、臨床看護研究を学んだ者、あるいは臨床看護研究を実施した経験がある者が少なく、スタッフに指導ができない状況がある。今回、インタビューを実施したA病院の副看護部長は、政府の資金援助により、副看護部長の籍を置いたままフルタイムの修士課程の学生として学んでいた。このような努力が今後、臨床看護研究の指導者を育成していくことになると考えられる。しかし郡部にある中規模病院では、看護部の関心は、看護師数の不足に向いており、臨床看護研究による実践の向上というよりも、まずベッドサイドでのケアをヘルパー任せにするのではなく、看護師によって必要なケアを実施したいという状況であった。

それぞれの病院の事情を考慮しながら、臨床看護研究そのものについて学ぶ機会を、継続看護教育として準備することが必要である。中国の看護研究の現状として、研究論文の構成要素に基づかない報告が多く、実践の中で何らかの効果を得ている実感を持っているにも関わらず、その効果が研究的に証明されていないものがほとんどであり、看護研究に関する教育の体系化が必要であると指摘されている。

看護師数の不足が最大の関心事である病院においても、臨床看護研究を実施することによる看護実践の向上は必要不可欠であり、継続看護教育として取り組むことが望まれる。この場合、単発的な講義ではなく、臨床看護研究の基礎から実際までが理解できるようなシリーズとしての教育計画が重要である。また臨床看護研究は、講義を受けただけで実施することは困難であり、指導者を育成する際も、実際に研究に取り組むことが必要である。そのためにも、大学との共同研究が望まれる。今回、訪問した2病院では、大学との共同で臨床看護研究はなされておらず、今後、そのルートの開発が必要であろう。

質的研究においては、臨床看護研究を行ったことがある看護師のいる病院においても、実施されていない状況であった。中国の看護職の免許を規定する「中華人民共和国護士管理方法」の法律に定められた看護師の具体的業務は、次のとおりである。「看護師は医師の指示を正確に施行し、患者の心身の状態を正確に把握し、患者に対して科学的な看護処置を行う。緊急の場合は速やかに医師に知らせ、ともに救急処置にあたる。医師が不在の場合は、看護師が正確に判断して救急処置を行う。」（第21条）

この法律にある看護師の業務のうち、「科学的な看護処置」の表現が、実証主義的パラダイムの考え方と一致し、臨床看護研究の多くが量的研究である状況を産んでいると考えられる。実際に日中看護学会での中国側の研究発表に、質的研究はみられないことが報告されている（2001年9月の第7回日中看護学会）。今回は2病院の関係者の聞き取りであったが、看護研究の中で質的研究が実施されていない状況は、現在も大きく変わっていないことが推測される。しかし、講演後に活発な意見交換が行われたことを考えると、質的研究への興味は高いと言える。量的研究においても指導者が得られにくい状況にあることを考えると、より指導者の役割が重要となる質的研究の実施は、スタッフレベルの継続看護教育の一環としては困難であることが予想される。まず師長レベルの看護管理者を対象とした実施が現実的であると考えられる。

継続看護教育における質的研究の重要性については、講演などの方法で理解が得られることは、今回の講演後の反応でも明らかである。したがって、継続看護教育において質的研究を行うことが重要であることを、より多くの看護師に理解してもらい、既に発表されている質的研究結果を臨床で活用することから開始する必要がある。

継続看護教育の中で、まず臨床看護研究についての教育を行うこと、次に質的研究の重要性の理解の上で、既存の研究結果を臨床で活用すること、同時に病棟師長レベルの看護管理者を対象として、質的研究を実施するための教育を実施し、次いで大学教員との共同研究によって、質的研究を実施するという段階的な導入が必要である。

参考文献

1. 平井さよ子：中国の看護免許制度と継続教育制度, 看護管理, 13(7), 578-582, 2003.
2. 関谷由香里：中国の高等看護教育の現状と課題—第8回日中看護学会に参加して—, 日本赤十字広島看護大学紀要, 3, 109-111, 2003.
3. 淘江七海子, 松村千鶴, 堀美紀子：第9回日中看護学会事情と中華人民共和国における看護の現状, 香川県立保健医療大学紀要, 1, 159 - 164, 2004.
4. 原敦子, 早崎幸子, 奥村奈美子, 小野幸子：中国の看護研究の現状—第7回日中看護学会論文集の分析を試みて—, 岐阜県立看護大学紀要, 2(1), 69 - 75, 2002.
5. 李秀華, 王秀卿, 韓春燕他：看護の卒後継続教育における学分管理制の実施の現状, 看護管理, 7(5), 364-367, 1997.

作成日：2007年8月15日

广州市红十字病院



上海交通大学附属第六人民医院



財団法人日中医学協会

2007 年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2008 年 2 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

中国人研究者名： 孟 翔峰

指導責任者： 熱田 充 職名： 教授

所属機関名： 長崎大学医歯薬総合研究科

所在地：〒852-8588 長崎市坂本 1-7-1

電話：95-819-7688 内線：4352

1. 助成金額：600,000 円

2. 研究テーマ

シランカップリング剤の成分と pH 値と湿潤湿気がデュアルキュア型レジン接着剤のシリカベースマシナブルセラミックスとの接着耐久性及ぼす効果

3. 成果の概要

シランカップリング剤とレジン接着剤を適切に組み合わせることで、シランカップリング剤の劣化を防止できることがわかりました。さらに、シランカップリング剤のシロキサン量は接着耐久性には影響を及ぼさず、シランカップリング剤の pH が一部、レジン接着剤のセラミックスに対する濡れ性が最も大であることが明らかになりました。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 有

Meng X, Yoshida K, Atsuta M: Micro-shear bond strength of self-adhesive resin cement to silica-based machinable ceramic, The 2nd joint meeting of the Japan prosthodontic society and the greater New York academy of prosthodontics, Tokyo, Japan, 2007.

(2) 発表した論文 有

Meng X, Yoshida K, Atsuta M (2007) Influence of light irradiation condition on micro-shear bond strength of dual-cured resin luting agents. Dent Mater J, 26 (4): 575-581.

シランカップリング剤の成分と pH 値と湿潤湿気がデュアルキュア型レジン接着剤の
シリカベースマシナブルセラミックスとの接着耐久性及ぼす効果

研究者氏名 孟 翔峰
日本研究機関 長崎大学医歯薬総合研究科
指導責任者 教授 熱田 充
共同研究者 吉田 圭一

要旨

Objective. To evaluate the correlation between siloxane quantity, pH value and wettability of five silane coupling agents with resin bond durability of ceramic.

Methods. Five silane coupling agents { Monobond S (Ivoclar-Vivadent), Rely XTM Ceramic Primer (3M), Clearfil Ceramic Primer (Kuraray), GC Ceramic Primer (GC), Porcelain Liner M (Sun Medical)} were used. Their siloxane quantity, pH value and contact angle to Heliobond (Ivoclar-Vivadent) was measured irrespectively by a FTIR spectrophotometer, pH-indicator strips and a contact-angle meter. 1.5mm thick ceramic plates (ProCAD, A3) were polished and cleaned, and treated by ten combinations between five silane coupling agents and two dual-cured resin luting agents {Variolink (VLII Ivoclar-Vivadent), Linkmax HV(LMHV, GC)}. Their micro-shear bond strength were measured by after 0, 10,000, and 30,000 time thermal cycling. Data was analyzed by three-way ANOVA, four measure parameter of silane coupling agents were subjected to correlation analysis.

Results. Bond strength was significantly affected by silane coupling agents, thermal cycling, and not by resin luting agents. Significant correlation was established between contact angle and bond strength after TC30,000 of silane coupling agents in VLII and LMHV; and between pH value and bond strength of silane coupling agents in VLII.

Conclusion. The hydrolytic degradation of current dental silane for ceramic bonding might be inevitable under endurance test. The improvement of combination between silane coupling agent with resin luting agent could affect delay this hydrolytic degradation process, which is depended by the wettability to resin luting agent, partly by pH value, not by siloxane quantity of silane coupling agents.

Key Words silane coupling agent, pH, siloxane, resin luting agent, machianable ceramic, micro-shear bond strength

緒言 :

Silane as a coupling agent is used popularly in resin bond of silica-based ceramic restorative.^{1,2} Activated silane can provide a physical and chemical bond between resin luting agent and silica-based ceramic: its silanols could form a direct siloxane bridge with hydroxyls of ceramic surface, meanwhile produce crosslinked siloxane polymolecular layer which could form an interpenetrating polymer network (IPN) with resin luting agent; its organic part could take part in the polymerization with resin matrix to provide a direct covalent link with resin luting agent.³

Short-term resin bond strength to silaned ceramic could be obtained, which even could caused cohesive failure of silica-based ceramic in bond test, however this adhesive interfaces were not stable under endurance tests such as thermal cycling or long-term water storage, and different degree reduction of bond strength occurred in various dental silane coupling agents.⁴⁻⁹ Bond durability degradation is contributed to the hydrolysis of siloxane (-Si-O-Si-) in ceramic surface and IPN under water effect.^{10,11} Other field research suggested that the rate of hydrolytic damage of silane could be related to the proportion of Si_{silane}-O-Si_{silane} because the siloxane (Si_{silane}-O-Si_{silane}), siloxane is easier to break than the siloxane (Si_{silica}-O-Si_{silane}), and OH- groups could catalyze the hydrolytic reaction.¹² Miyata et al also suggested that a weaker silane coupling agent/resin bond

could result in a weaker filler/resin in composite with silanated filler.¹³

Current dental silane coupling agents have different silane concentration, activation modes, and supplemental compositions, which produces their different siloxane quantity¹⁴, pH value^{14,15}, wettability to resin luting agents. These factors could form different adhesive interface structures with resin luting agents, which might decide their water resistance. The fact that many dental silane coupling agents are used in different studies, make a correlation of data from various researchers rather difficult. A further understanding of the role of different properties of silane coupling agent can solve this ambiguity.

In this study, we attempted to explore the relationship siloxane bond quality, pH value and wettability of five commercial dental silane coupling agents with their resin bond durability to ceramic.

対象と方法 :

Table 1 Materials tested in this study (information provided by manufacturers)

Material (Abbreviation)	Chemical composition	Lot No.	Manufacturer
Silane coupler:			
Monobond S (MBS)	Ethanol 52%, water 47%, silane 1%, acetic acid	H26975	Ivoclar-Vivadent, Schaan, Liechtenstein
Rely X™ Ceramic Primer (RCP)	Ethanol 70-80%, water 20-30%, silane <1%	3UK	3M, ESPE, Seefeld, Germany
Clearfil Ceramic Primer (CCP)	Ethanol, MDP, silane (γ -MPTS) < 5%	00001B	Kuraray co., Ltd, Kurashiki, Japan
GC Ceramic Primer (GCCP)	A liquid: ethanol, silane B liquid: ethanool, MMA, UDMA, organic acid	0601262	GC Corp., Tokyo, Japan
Porcelain Liner M (PLM)	A liquid: MMA, 10% 4-META, other B liquid: MMA, silane (γ -MPTS) 10%, other	MR1	Sun Medical Co., Ltd, Moriyama, Japan
Resin luting agent:			
Variolink II (VLII)	A3, Resin matrix: Bis-GMA, UDMA, TEGDMA. Filler: content 72.3%, mean particle size 0.7 μ m, Ba-Al-F-Si-glass	Base: H23580 Catalyst: H23432	Ivoclar-Vivadent, Schaan, Liechtenstein
Linkmax HV (LMHV)	Universal, Resin matrix: UDMA, TEGDMA. Filler: content 70%, mean particle size 0.8 μ m, F-Al-Si-glass	Base: 0601131 Catalyst: 0601131	GC Corp., Tokyo, Japan

1. 1.5 mm thick of ceramic plates (13 X 11 mm squares) Ceramic plate preparation
2. The measurement of contact angle between resin bond agent and silane ceramic surface
3. The determination of pH value in five silane coupling agents
4. The FT-IR analysis of siloxane quantity in five silane coupling agents
5. Micro-shear test of bond strength between dual-cured resin luting agent and silanated ceramic surface before and after 10,000 and 30,000 thermal cycling time.

結果 :

Three-way ANOVA analysis showed that bond strength was significantly affected by silane coupling agent and thermal cycling, not by composite luting agent. The interactions were significant between silane coupling agent/thermal cycling, resin

luting agent/thermal cycling, silane coupling agent/reisin luting agent, silane coupling agent/resin luting agent/thermal cycling.

Table 2 pH value, siloxane signal absorbance strength and mean contact angle for five silane coupling agents.

Silane coupler	Contact angle θ	pH value	Siloxane signal absorbance strength
MBS	34.0 (1.5)	4.0	0.022
RCP	27.7 (1.2)	4.0	0.035
CCP	21.7 (1.2)	1.0	0.116
GCCP	20.7 (1.1)	1.4	0.053
PLM	21.5 (0.9)	2.2	0.075

Table 3 Mean bond strength (SD) of ten combinations between five silane coupling agents and two resin luting agents after 0, 10,000 and 30,000 time thermal cycling.

* Same letters at bond strength for each resin luting agent were not significantly difference by post HocTukey test ($p < 0.05$).

Resin luting agent	Silane coupler	Thermal cycling time		
		0	10,000	30,000
VL II	MBS	24.1 (2.2) ^f	18.6 (4.3) ^{dc}	3.6 (3.5) ^a
	RCP	18.6 (2.7) ^{dc}	7.3 (2.9) ^{ab}	5.2 (3.7) ^a
	CCP	21.7 (2.0) ^{ef}	23.0 (3.3) ^{ef}	10.8 (5.3) ^{bc}
	GCCP	24.0 (4.7) ^f	23.3 (4.6) ^{ef}	13.9 (2.6) ^{cd}
	PLM	25.1 (5.4) ^f	15.3 (2.9) ^{cd}	12.1 (4.2) ^{bc}
LMHV	MBS	22.5 (2.7) ^f	19.6 (4.5) ^{ef}	5.1 (5.2) ^a
	RCP	19.8 (2.2) ^{ef}	12.3 (3.3) ^{bc}	10.1 (3.3) ^b
	CCP	20.2 (2.2) ^{ef}	17.7 (3.0) ^{def}	10.9 (3.3) ^b
	GCCP	18.7 (2.6) ^{def}	17.9 (2.9) ^{def}	14.2 (3.1) ^{bc}
	PLM	22.1 (4.1) ^f	22.3 (2.6) ^f	15.8 (3.4) ^{cde}

Table 5 Pearson's correlation coefficient and respective p value between two properties. Correlation is significant at $p < 0.05$ (2-tailed).

Composite luting agent	VL II			LMHV		
	Contact angle	pH value	Siloxane absorbance	Contact angle	pH value	Siloxane absorbance
Properties of silane couplers						
Bond strength (TC0)	-0.154 (p=0.805)	-0.318 (p=0.603)	0.052 (p=0.933)	0.525 (p=0.364)	0.428 (p=0.473)	-0.164 (p=0.792)
Bond strength (TC10,000)	-0.353 (p=0.560)	-0.738 (p=0.154)	0.458 (p=0.437)	-0.175 (p=0.778)	-0.331 (p=0.586)	0.240 (p=0.697)
Bond strength (TC30,000)	-0.947 (p=0.014)*	-0.898 (p=0.039)*	0.622 (p=0.262)	-0.910 (p=0.032)*	-0.639 (p=0.245)	0.474 (p=0.420)

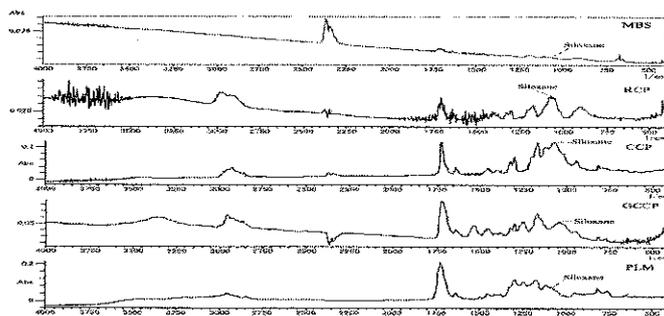


Fig 1-The FT-IR spectra of the five dental silane coupling agents. X-axis: wave number in cm^{-1} ; Y-axis: absorbance in arbitrary unit.

考察：

In this study, no silane coupling agents could maintain their role in resin bond of ceramic, and significant interaction between silane coupling agents and thermal cycling suggested that they had different hydrolytic degradation process of silane. The difference of composition in silane coupling agents could affect the hydrolytic rate of silane.

In this study, we simulated the silane film of ceramic on the KBr plate, and found that different siloxane absorbance strengths occurred in five dental silane coupling agents. This difference was not correspond their silane concentrations demonstrated by manufacturers. RCP with <1% silane had higher has siloxane absorbance strength than MBS with 1% silane, which suggested that the silane degree activation and condensation could not only depended by silane concentration, but also depended by other factor such as pH value, solvent type, hydrolysis time. Within the range of siloxane absorbance strength in this study, the difference of siloxane quantity might not cause a substantial influence on the hydrolytic degradation of silane coupling agent, because the siloxane absorbance strength of five dental silane coupling agents had any correlation with their bond strength at TC0 and 10,000 in two resin luting agents.

Five silane coupling agents have different activation modes: MBS and RCP activated by water, while CCP, GCCP and PLM activated by organic acid. So CCP, GCCP and PLM have lower pH value than MBS and RCP. Previous research showed pH value of ceramic surface and silane coupling agents could affect primary resin bond strength.¹⁶ In this study pH value of silane coupling agents had no correlation with their bond strength (TC0). After TC 30,000, the significant correlation between pH value and bond strength occurred in VL II. It might support at some extent the thought of Olmos et al¹², in which higher pH of silane coupling agent could catalyze the hydrolytic degradation of siloxane. However the correlation effect of pH value was lower than that of contact angle in VL II; even did not occur in LMHV.

Contact angle is a consequence of the inter-molecular interaction between the probing medium and solid. When two media of similar chemical composition are used to probe the surface, the one with a lower surface tension should yield a lower contact angle. VL II and LMHV are dual-cured composite resin luting agents with rather low fluidity. So we used a resin bond agent (Heliobond) as probing medium to reference the wettability of five dental silane coupling agents to resin luting agent. Comparing with pH value, contact angle showed more significant correlation with bond strength (TC 30,000) in two resin luting agents. This result further suggests that the water-resistance ability of resin bond interface to ceramic could be depended on the combination between silane coupling agent and resin luting agent. High wettability of silane coupling agent to resin luting agent helps to form their interpenetrating polymer network (IPN) and copolymerization. MBS and RCP activated by water showed lower wettability than those activated by the use of organic acid such as phosphate acid monomer. Even if under the same activation mode, solvent type and solution concentration also affected their wettability, in which RCP had higher wettability than MBS. To improve the lower wettability of MBS, the manufacturer recommends the additional use of flowable resin bond agent (Heliobond) follows the treatment of MBS. However our and other researches showed that this resolution was not more effective than the only use of MBS.^{17,18} Besides the use of organic acid, two-liquid silane coupling agents (GCCP and PLM) blend functional monomer such as MMA, UDMA into silane before the use of silane, and obtained better bond durability. This beforehand use of functional monomer might be an effective way to obtain better interpenetrating polymer network (IPN) and copolymerization between silane coupling agents and resin luting agents.

参考文献：

1. Peumans M, Van Meerbeek B, Lambrechts P, Vanherle G. Porcelain veneers: a review of the literature. *J Dent* 2000; 28: 163-177.
2. Blatz MB, Sadan A, Kern M. Resin-ceramic bonding: a review of the literature. *J Prosthet Dent* 2003; 89: 268-274.
3. Matinlinna JP, Lassila LV, Özcan M, Yli-Urpo A, Vallittu PK. An introduction to silanes and their clinical applications in

dentistry. *Int J Prosthodont* 2004; 17:155-164.

4.Kato H, Matsumura H, Tanaka T, Atsuta M. Bond strength and durability of porcelain bonding systems. *J Prosthet Dent* 1996; 75: 163-168.

5.Foxton RM, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Miura H. Durability of the dual-cure resin cement/ceramic bond with different curing strategies. *J Adhes Dent* 2002; 4: 49-59.

6.Foxton RM, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Miura H. Long-term durability of the dual-cured resin cement/silicon oxide ceramic bond. *J Adhes Dent* 2002; 4: 125-135.

7.Nakamura S, Yoshida K, Kamada K, Atsuta M. Bonding between resin luting cement and glass infiltrated alumina-reinforced ceramics with silane coupling agent. *J Oral Rehabil* 2004; 31: 785-789.

8.Ide T, Tanoue N, Yanagida H, Atsuta M, Matsumura H. Effective of bonding systems on bonding durability of a prefabricated porcelain material. *Dent Mater J* 2005; 22: 257-260.

9.Yoshida K, Yamashita M, Atsuta M. Bond strength between machinable glass-ceramic and dual-cured resin luting cements using silane coupling agents. *Am J Dent* 2005; 18: 327-330.

10.Ishida H, Koenig JL. A fourier-transform infrared spectroscopic study of the hydrolytic stability of silane coupling agents on E-glass fibres. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 1980; 18: 1931-1943

11.Nishiyama N, Ishizaki T, Horie K, Tomari M, Someya M. Novel polyfunctional silanes for improved hydrolytic stability at the polymer-silica interface. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 213-221.

12.Olmos D, Gonzalez-Benito J, Aznar AJ, Baselga J. Hydrolytic damage study of the silane coupling region in coated silica microfibers: pH and coating type effects. *J Mater Process Technol* 2003; 143-144: 82-86.

13.Miyata N, Matsuura W, Kokubo T, Nakamura T. Mechanical behavior of bioactive composite cements consisting of resin and glass-ceramic powder in a simulated body fluid: Effect of silane coupling agent. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15: 1013-1020.

14.Matinlinna JP, Lassila LV, Vallittu PK. Evaluation of five dental silanes on bonding a luting cement onto silica-coated titanium. *J Dent* 2006; 34: 721-726.

15.Kamada K, Taira Y, Yoshida K, Atsuta M. Effect of four silane coupling agents on bonding of two resin-modified glass ionomer cements to a machinable ceramic. *Dent Mater J* 2007; 26: 240-244.

16.Foxton FM, Nakajima M, Hiraishi N, Kitasako Y, Tagami J, Nomura S, Miura H. Relationship between ceramic primer and ceramic surface pH on the bonding of dual-cured resin cement to ceramic. *Dent Mater* 2003; 19: 779-789.

17.Reich SM, Wichmann M, Frankenberger R, Zajc D. Effect of surface treatment on the shear bond strength of three resin cements to a machinable feldspathic ceramic. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74: 740-746.

18.Meng X, Yoshida K, Atsuta M. Micro-shear bond strength of resin bonding systems to machinable ceramic with different surface treatments. *J Adhes Dent* 2008, in press.

注：本研究は、今欧米雑誌に投稿しています。

作成日：2008年2月20日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2008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： 惠 小剛  印

指導責任者名： 林 富 職名：教授

所属機関名：東北大学小児外科

〒980-8574

所在地：仙台市青葉区星陵町1-1

電話：022-717-7237(直通)

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

子豚を用いてTPN(完全静脈栄養)により肝機能障害におけるアミノ酸の役割についての検討—伊東細胞を介して関与する可能性

3. 成果の概要(100字程度)

本研究では、子豚を用いてTPNを2週間まで持続的に投与した。その結果、肝機能障害の発症にはTPNの成分が関係している事が示唆され、発症メカニズムには活性化を受けた伊東細胞も関与している事が明らかになった。即ち、アミノ酸を加えて投与すると肝細胞の脂肪化が著しくなりアポプトシスも発生する事が判明した。更に、胆汁鬱滞病変を中心とする肝障害はアミノ酸により引き起こされる事実も判明した。一方、伊東細胞の活性化に伴い類洞の正常構造が破壊され肝血流障害が起こり、肝細胞や毛細胆管の構成要素の慢性虚血が引き起こされ最終的に肝機能障害が発症するメカニズムを解明した。将来は、適正なアミノ酸組成の輸液を考案し、伊東細胞の活性化を抑制し、TPNによる肝機能障害を抑えることが可能になると考えられる。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 有 (学会名・演題)

(2) 発表した論文 無 有 (雑誌名・題名)

雑誌名 World Journal of Pediatrics

題名 Total parenteral nutrition-induced liver dysfunction: evidence and pathogenesis

子豚を用いてTPN(完全静脈栄養)により肝機能障害におけるアミノ酸の役割についての検討—伊東細胞を介して関与する可能性

研究者氏名	恵 小剛
中国所属機関	天津市兒童病院小児外科
日本研究機関	東北大学病院小児外
指導責任者	教授 林 富
共同研究者名	天江 新太郎, 和田 基, 西 功太郎, 松浦 俊治, 佐々木 英之, 風間 理郎

Abstract

Objectives To investigate whether amino acids would cause parenteral nutrition-associated cholestasis-based liver damages, and try to evaluate the possible roles of Ito cells in this pathogenesis.

Materials and methods 15 piglets were randomly assigned to three groups equally. Group 1 piglets were maintained on glucose alone; Group 2 piglets were administrated by amino acid plus glucose mixture; Group 3 represented control piglets receiving standard lab chows ad libitum. All PN (parenteral nutrition) animals were treated for 14 days continuously with isocaloric intravenous regimen. On the postoperative 14th day, all animals were anesthetized and blood samples were collected for liver function test, and liver biopsy specimens were harvested for histological assessment as well as immunohistochemistry for α -SMA, while TUNEL (TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labelling) method was employed to detect apoptosis of hepatocytes and TEM (transmission electron microscopy) was also used to observe ultrastructural changes of liver specimens.

Results The concentration of serum total bilirubin and total bile acids were significantly higher in group 2 than the other groups ($p < 0.05$); whereas liver enzymes showed no significant differences among three groups except for ALP (Alkaline phosphatase). Morphologically, steatosis was severer with vague sinusoid in group 2 than group 1 with mild cytoplasmic rarefaction in hepatocytes. In addition, immunohistochemistry revealed that the number of activated Ito cells significantly increased in group 2 compared with the other groups. Moreover, apoptotic index of hepatocytes in group 2 was significantly higher than group 1 and control group. TEM observation indicated that dilated bile canaliculi with decreased microvilli and deposition of bile pigments in hepatocytes were demonstrated in group 2. Besides, the sinusoid seemed to become shrank attributed to corresponding expansion of Disse space. In some specimen, we also observed that the slight production of collagen bundles in the Disse space and subendothelial deposition of base membrane-like materials. Apoptotic hepatocytes manifested by the earlier nuclear chromatin condensation characterized by crescent-shaped appearance and late development of apoptotic fragments or bodies.

Conclusions we have demonstrated that not glucose but amino acid was primarily involved in parenteral nutrition-associated cholestasis. Furthermore, aggravated steatosis and apoptosis of hepatocytes were also associated with the supplement of amino acids. Because numbers of Ito cells were activated in group 2, we suggested that the liver toxicity of amino acids would be related to subsequent activation of Ito cells, which would cause compromised microcirculation leading to chronic ischemic injuries to hepatocytes.

Key Words TPN, liver dysfunction, Amino acids, Ito cells, Liver microcirculation

Backgrounds and purposes

The development of progressive liver dysfunction has been a well-recognized complication of

prolonged total parenteral nutrition (TPN). Although more and more investigators have studied the possible mechanisms using animal models or retrospective clinical studies, the authentic pathogenesis was unknown. In recent decades, investigators began to concentrate on the toxic roles of components of TPN solution. Glucose and fat and their absolute or relative concentrations have been incriminated. (1) Fat emulsion, although they may cause fat accumulation in Kupffer cells, have been essentially excluded as being important in the genesis of cholestasis. (2) Amino acids are most frequently implicated in promoting cholestasis. Vileisis et al treated infants with either 2.5 or 4.0 g/kg of crystalline amino acid in an otherwise equal TPN regimen for at least 2 weeks while routine liver function tests were monitored. Although the frequency of cholestasis was the same in the two groups, the duration of TPN prior to onset of cholestasis was shorter, and the rate of rise of direct bilirubin was greater in the high-amino acids group, suggesting that the amino acid are more toxic when administered in excess. The inference is that amino acids can be toxic when administered at routine rates. (3) Black et al compared several parameters of liver function in essentially well premature neonates receiving amino acid glucose infusion or glucose alone for 1 week and found evidence for hepatic canalicular dysfunction in the group receiving amino acid. (4) These results suggest that amino acids solution has a direct effect on the excretory apparatus of the hepatocyte. Evidences for this view come from observations that amino acid solutions inhibit bile formation, particularly the bile acid-independent fraction in isolated perfused rat liver. (5) Particular amino acids have been also implicated. Methionine at a perfusate concentration of 20 to 30mM obliterated bile salt independent bile flow in perfused rat liver; Alanine inhibited uptake of taurocholate by isolated rat hepatocytes; Taurine supplementation increases bile acid excretion in premature infants and protects from lithocholate cholestasis in young guinea pigs. Of the major constituents of TPN solutions, amino acids are the most likely responsible for cholestasis. Preferential transport of the amino acids across the hepatic sinusoidal membrane may inhibit bile acid uptake. (6) Reduced uptake of bile acids by the hepatocyte results in a decreased transport and secretion of bile acids, the major driving force of bile flow. As opposed to amino acids-induced cholestasis during TPN, few studies reported that the protective role of amino acids in ameliorating calorie overloading-associated cholestasis. In a newborn rabbit TPN model, histological examination of the cholestatic liver showed ballooning and clear cell transformation of the hepatocytes resembling those observed in the liver with calorie overload. Ikeda et al reported that calorie overload changes in hepatocytes are ameliorated by an increased dose of amino acids. (7)

Therefore, although it has been a fact that TPN could cause intrahepatic cholestasis, the real toxic components and the related mechanisms were poorly understood. Our previous research on TPN-induced liver dysfunction (not yet published) demonstrated that major components including glucose and amino acids must have caused liver damages characterized by steatosis and cholestasis, and we also discussed on the potential implication of Ito cells in this pathogenesis. In the present study, we try to evaluate if glucose or amino acids would be primarily involved in liver dysfunction during TPN administration, further to explore which component would be mostly responsible for the activation of Ito cells in a piglet model.

Materials and methods

1 Animals and experimental design

Fifteen piglets with body weight ranging from 10 to 15kg were randomly assigned to three groups equally. Group 1 was glucose alone (50g/kg/d); Group 2 was glucose plus amino acids (glucose 50g/kg/d; amino acid 7.5g/kg/d); Group 3 was control receiving standard lab chows ad libitum. All

animals underwent the same catheter cannulation through external jugular vein in the aseptic manner. For control group, animals received physiologic saline infusion (20ml/h) for maintaining patency of catheter. For TPN groups, infusion lasted for 14 days continuously by fasting and deprivation of tap water. Besides, the infusion volumes were adjusted to keep same and isocaloric intravenous infusion regimen was also considered. Besides glucose or amino acids, electrolytes, vitamins and trace elements were given, but lipid was not included.

2 Blood samples and liver specimens

Blood samples for liver function tests were collected on the 14th postoperative day. The parameters include albumin (Alb), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TB), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) and total bile acid (TBA). Liver biopsy specimens were also harvested on the terminal day of this study. One part of light microscopy was fixed in 10% neutral formalin solution and embedded in paraffines; the residual part for TEM was prefixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer at 4°C.

3 Immunohistochemistry

All liver samples were immunostained with a monoclonal antibody to α -SMA (**dilute 1:800; DAKO**) to identify activated Ito cells with streptavidin-biotin complex immunostaining. As a negative control, normal rabbit IgG was used instead of the primary antibody. No specific immunoreactivity was detected in these sections. The positive expression of activated Ito cells was recognized by brown luminescence. The intensity of immunostaining was scored in light of specific scoring system.

4 Detection of apoptosis of hepatocytes by TUNEL

TUNEL was performed with peroxide *In Situ* apoptosis detection kit according to manufacture's instructions. (**CHEMICON S7101, USA**) The apoptotic hepatocytes exhibited brown stained nuclei. Twenty random fields were counted for each slide. The numbers of apoptotic hepatocytes were expressed as the percentages of the total number of the counted hepatocytes. (Apoptotic index)

5 Transmission electron microscopy (HITACHI 7100, JAPAN)

After primary fixation for 48 hours, specimens were washed with PBS, followed by secondary fixation in 1% osmium tetroxide in 0.1M PBS at 4°C for 2 hours. After washing with PBS, they were dehydrated and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and then examined with a transmission electron microscope.

Results

All 15 piglets were survival without events in this study. Group 2 and control piglets obtained the equivalent body weight gain, but Group 1 piglets showed almost stagnant body weight.

1 Liver function tests

After two weeks, the levels of serum TB and TBA in Group 2 were significantly elevated compared with that in group 1; however, serum enzymes level showed no significant changes except for the elevated ALP level in group 2. (**See Table 1**)

Table 1 Results for liver function tests

Group ($\mu\text{mol/L}$)	Alb (g/dl)	TB (mg/dl)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	ALP(IU/L)	γ -GT(IU/L)	TBA
1(n=5)	2.13 \pm 0.32	0.06 \pm 0.01	44.00 \pm 19.52	29.67 \pm 10.59	199.00 \pm 52.85	30.67 \pm 9.02	3.33 \pm 0.58
2 (n=5)	2.63 \pm 0.21	0.18 \pm 0.07*	46.67 \pm 35.53	37.00 \pm 13.28	654.67 \pm 112.61 [^]	29.00 \pm 14.93	15.00 \pm 2.65*
3 (n=5)	2.97 \pm 0.50	0.02 \pm 0.0	35.33 \pm 10.12	29.33 \pm 17.04	433.00 \pm 175.12	20.67 \pm 6.43	2.93 \pm 0.12

[^]Significant difference was determined between Group 2 and 1 ($p=0.01$); * significant difference was seen between

Group 2 and 1, or between Group 2 and control group. ($p<0.05$) Duncan's test was used following ANOVA.

2 Histological changes

Compared with mild steatosis in Group 1, the control specimens showed normal liver histological micrographs, but the Group 2 specimens displayed the significantly aggravated histological lesion manifested by vacuolation of hepatocytes. (See Fig 1)

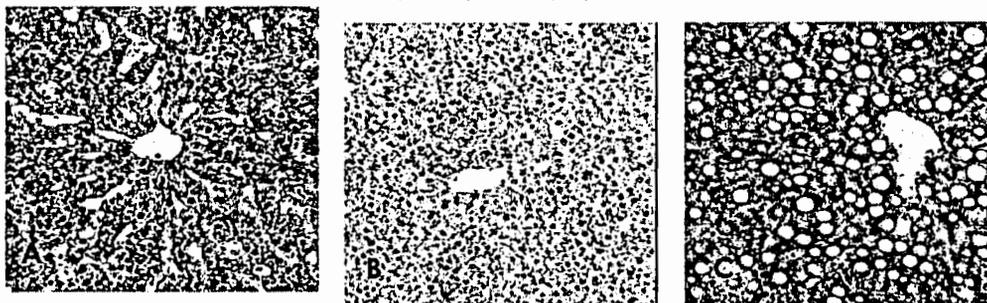


Fig1 Micrographs of liver specimens after treatment for two weeks (HE, x200) A, normal histological picture in control group; B, not severe changes except for mild cytoplasmic rarefaction in Group 1; C, dramatic vacuolation of hepatocytes with obscure sinusoid in Group 2.

3 Immunohistochemistry

In Group 2, considerable activated Ito cells immunoreactive to α -SMA antibody were demonstrated, whereas they were scarcely or sporadically found in Group 1 or control group. The scoring result indicated that there was significant difference between Group 2 and Group 1 or control group. (See Fig 2 and Table 2)

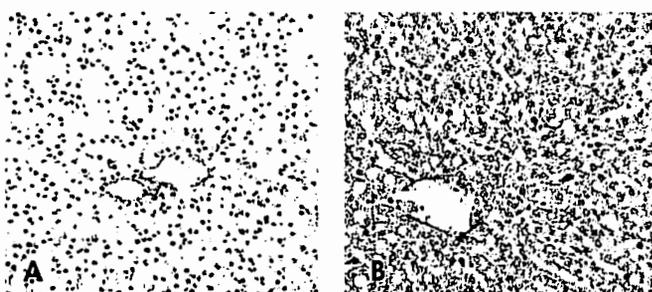


Table 2 scoring results of liver Ito cells

Group	Scoring				
	0	1	2	3	4
1 (n=5)	4	1	0	0	0
2 (n=5)*	0	0	0	1	4
3 (n=5)	5	0	0	0	0

Fig2 Immunohistochemistry for Ito cell in liver specimen. (x200) A, negatively * $p<0.05$ significantly higher expression of

Ito cells in detected in control or Group 1; **B**, massively detected in Group 2. (Brown stained) Group2

4 TUNEL assay

Apoptotic index indicated that there was significant increase in apoptotic hepatocytes in Group 2. (Group 1, 0.85 ± 0.46 ; Group 2, 28.59 ± 5.25 ; control group, 0.94 ± 0.73 $p < 0.05$). Besides, the apoptotic hepatocytes were more conspicuous in centrilobular region than peripheral area in hepatic lobule. (See Fig 3)

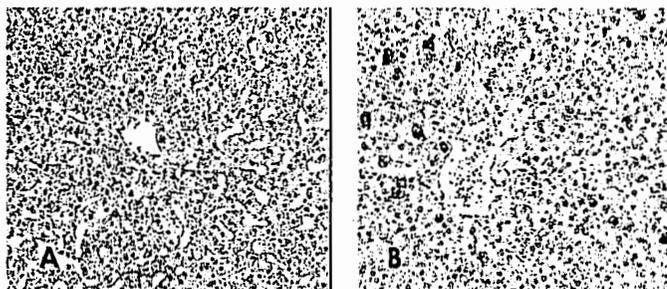


Fig3 Hepatocyte apoptosis by use of TUNEL method (Original magnification x200). A, apoptotic hepatocytes were seldom found in Group 1 and 3; B, significantly increased apoptotic hepatocytes converging on central part of lobule in Group 2.

5 Transmission electron microscopy

Under TEM, following meaningful changes have been observed. Firstly, the dilation of bile canaliculi accompanied by the loss of microvilli was usually seen only in group 2. Besides, some hepatocytes stored dark matter represented bile salts or pigments. Secondly, different phases of apoptotic hepatocytes could be easily found. Thirdly, base membrane-like materials produced by activated Ito cells brought about endothelial fenestrae disappear replaced by subendothelial deposition. Furthermore, activated Ito cells became “plump” in volume with long cytoplasmic processes, and slight collagen bundles produced around them. Lastly, the loss of lipid droplets in some activated Ito cells could be found. (See Fig 4)

Discussion

It is unknown whether steatosis and cholestasis are separate entities or represent a continuum of one disorder in TPN-induced liver dysfunction. Although different TPN regimens have been devised to explore harmful ingredients or clarify the mechanisms, it is controversial or undecided. In this study, the elevated serum TB and TBA level, together with bile canaliculi and accumulation of bile components in hepatocytes indicated that cholestasis developed in Group 2. Likely, the obvious fatty degeneration and hepatocytes apoptosis were shown in Group 2. These evidences indicated that amino acids are toxic to liver and could concomitantly induce steatosis and cholestasis. Before, it is hard to elucidate this composite liver damage. However, we proved that Ito cells were extensively activated, and these pathologic changes predominately located in the centre part of lobules. In addition, some studies reported that the activation of Ito cells has implicated in regulating sinusoidal blood and liver microcirculation. (8) We suggested that decreased sinusoidal blood supply maybe contribute to liver damages. Firstly, the replace of normal fenestrae by subendothelial base membrane could hamper the two-way communication between hepatocytes and sinusoid; Secondly, the proliferative activated Ito cells and deposition of collagen fibres could inflate Disse space through “pushing or squeezing” sinusoid resulting in increased blood resistance. Lastly, as activated Ito cells were transformed into myofibroblasts and obtained contractility, the tonic contraction could participate in increasing the resistance of blood

flow in sinusoid. Consequently, the compromised microcirculation not only amplified steatosis, but also induced hepatocyte apoptosis. Considering the direct effects of amino acids, we also suggested the accelerating roles in the form of physical pressure or ischemic attack on apparatus of bile system induced by Ito cells activation.

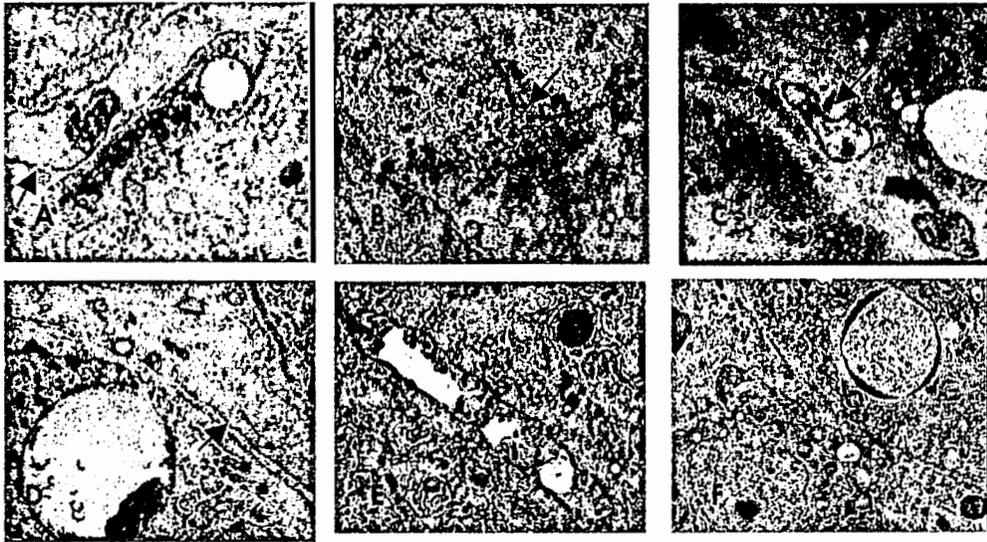


Fig 4 TEM micrographs (Original magnification x1000) A, normal sinusoid with subendothelial fenestrae; D, fenestrae structure was disappeared and replaced by base membrane like materials in Group 2. B, normal bile canaliculus in Group 1 and control; E, dilated bile canaliculus with decreased microvilli in Group 2; C, activated Ito cells with indentation attributed to loss of lipid droplet “push” sinusoid in Group 2; F, earlier apoptotic hepatocyte characterized by the chromatin condensation.

Conclusions

In the present study, we established the amino acids-induced liver toxicity biochemically and morphologically, indicating that severer fatty degeneration and cholestasis as well as hepatocyte apoptosis could simultaneously occur. Amino acids-dependent Ito cells activation maybe initiate or deteriorate these liver lesions by influencing on sinusoidal microcirculation. However, the present short-term TPN study fails us to draw a definite conclusion, and long-term experiment about relationship between amino acids and Ito cells would be further expected. It would be better if the evaluation of sinusoidal microcirculation secondary to the introduction of amino acids could be conducted in the future.

References

- 1 Rager R, Finegold MJ. Cholestasis in immature infants: Is parenteral alimentation responsible? *J Pediatr* 1975;86:264-269
- 2 Beale EF, Nelson RM, et al. Intrahepatic cholestasis associated with parenteral nutrition in infants. *Pediatrics* 1979;64:342-7
- 3 Vilseris RA. Prospective controlled study of parenteral nutrition-associated cholestatic jaundice. *J Pediatr* 1980;96(5):893-7
- 4 Black DD. The effect of short-term parenteral nutrition on hepatic function in human neonate. *J Pediatr* 1981;99:445-9
- 5 Graham MF, Tavill AS. Inhibition of bile flow in isolated perfused rat liver by amino acid mixture. *Hepatology* 1984;(4)69-73
- 6 Blitzer BL. Amino acid inhibition of bile acid uptake by basolateral membrane vesicles. *Gastroenterology* 1983;(84):1364A

7 Ikeda Y, Soda S. Are hepatomegaly and jaundice attributable to "glucose overload"? *Acta Chir Scand* 1979;494:170-172

8 Housset C, Rockey DC, Bissell DM. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9266-70

2008/3/1

財団法人日中医学協会

2007 度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2008 年 2 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

中国人研究者名： 孟 翔峰

指導責任者： 熱田 充 職名： 教授

所属機関名： 長崎大学医歯薬総合研究科

所在地： 〒852-8588 長崎市坂本 1-7-1

電話： 95-819-7688 内線： 4352

1. 助成金額：600,000 円

2. 研究テーマ

シランカップリング剤の成分と pH 値と湿潤湿気がデュアルキュア型レジン接着剤のシリカベースマシナブルセラミックスとの接着耐久性及ばす効果

3. 成果の概要

シランカップリング剤とレジン接着剤を適切に組み合わせることで、シランカップリング剤の劣化を防止できることがわかりました。さらに、シランカップリング剤のシロキサンの量は接着耐久性には影響を及ぼさず、シランカップリング剤の pH が一部、レジン接着剤のセラミックスに対する濡れ性が最も大であることが明らかになりました。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 有

Meng X, Yoshida K, Atsuta M: Micro-shear bond strength of self-adhesive resin cement to silica-based machinable ceramic, The 2nd joint meeting of the Japan prosthodontic society and the greater New York academy of prosthodontics, Tokyo, Japan, 2007.

(2) 発表した論文 有

Meng X, Yoshida K, Atsuta M (2007) Influence of light irradiation condition on micro-shear bond strength of dual-cured resin luting agents. Dent Mater J, 26 (4): 575-581.

シランカップリング剤の成分と pH 値と湿潤湿気がデュアルキュア型レジン接着剤の
シリカベースマシナブルセラミックスとの接着耐久性及ぼす効果

研究者氏名	孟 翔峰
日本研究機関	長崎大学医歯薬総合研究科
指導責任者	教授 熱田 充
共同研究者	吉田 圭一

要旨

Objective. To evaluate the correlation between siloxane quantity, pH value and wettability of five silane coupling agents with resin bond durability of ceramic.

Methods. Five silane coupling agents { Monobond S (Ivoclar-Vivadent), Rely XTM Ceramic Primer (3M), Clearfil Ceramic Primer (Kuraray), GC Ceramic Primer (GC), Porcelain Liner M (Sun Medical)} were used. Their siloxane quantity, pH value and contact angle to Heliobond (Ivoclar-Vivadent) was measured irrespectively by a FTIR spectrophotometer, pH-indicator strips and a contact-angle meter. 1.5mm thick ceramic plates (ProCAD, A3) were polished and cleaned, and treated by ten combinations between five silane coupling agents and two dual-cured resin luting agents {Variolink (VLII Ivoclar-Vivadent), Linkmax HV(LMHV, GC)}. Their micro-shear bond strength were measured by after 0, 10,000, and 30,000 time thermal cycling. Data was analyzed by three-way ANOVA, four measure parameter of silane coupling agents were subjected to correlation analysis.

Results. Bond strength was significantly affected by silane coupling agents, thermal cycling, and not by resin luting agents. Significant correlation was established between contact angle and bond strength after TC30,000 of silane coupling agents in VLII and LMHV; and between pH value and bond strength of silane coupling agents in VLII.

Conclusion. The hydrolytic degradation of current dental silane for ceramic bonding might be inevitable under endurance test. The improvement of combination between silane coupling agent with resin luting agent could affect delay this hydrolytic degradation process, which is depended by the wettability to resin luting agent, partly by pH value, not by siloxane quantity of silane coupling agents.

Key Words silane coupling agent, pH, siloxane, resin luting agent, machianable ceramic, micro-shear bond strength

緒言 :

Silane as a coupling agent is used popularly in resin bond of silica-based ceramic restorative.^{1,2} Activated silane can provide a physical and chemical bond between resin luting agent and silica-based ceramic: its silanols could form a direct siloxane bridge with hydroxyls of ceramic surface, meanwhile produce crosslinked siloxane polymolecular layer which could form an interpenetrating polymer network (IPN) with resin luting agent; its organic part could take part in the polymerization with resin matrix to provide a direct covalent link with resin luting agent.³

Short-term resin bond strength to silanated ceramic could be obtained, which even could caused cohesive failure of silica-based ceramic in bond test, however this adhesive interfaces were not stable under endurance tests such as thermal cycling or long-term water storage, and different degree reduction of bond strength occurred in various dental silane coupling agents.⁴⁻⁹ Bond durability degradation is contributed to the hydrolysis of siloxane (-Si-O-Si-) in ceramic surface and IPN under water effect.^{10,11} Other field research suggested that the rate of hydrolytic damage of silane could be related to the proportion of Si_{silane}-O-Si_{silane} because the siloxane (Si_{silane}-O-Si_{silane}), siloxane is easier to break than the siloxane (Si_{silica}-O-Si_{silane}), and OH- groups could catalyze the hydrolytic reaction.¹² Miyata et al also suggestd that a weaker silane coupling agent/resin bond

could result in a waker filler/resin in composite with silaned filler.¹³

Current dental silane coupling agents have different silane concentration, activation modes, and supplemental compositions, which produces their different siloxane quantity¹⁴, pH value^{14,15}, wettability to resin luting agents. These factors could form different adhesive interface structures with resin luting agents, which might decide their water resistance. The fact that many dental silane coupling agents are used in different studies, make a correlation of data from various researchers rather difficult. A further understanding of the role of different properties of silane coupling agent can solve this ambiguity.

In this study, we attempted to explore the relationship siloxane bond quality, pH value and wettability of five commercial dental silane coupling agents with their resin bond durability to ceramic.

対象と方法 :

Table 1 Materials tested in this study (information provided by manufacturers)

Material (Abbreviation)	Chemical composition	Lot No.	Manufacturer
Silane coupler:			
Monobond S (MBS)	Ethanol 52%, water 47%, silane 1%, acetic acid	H26975	Ivoclar-Vivadent, Schaan, Liechtenstein
Rely X™ Ceramic Primer (RCP)	Ethanol 70-80%, water 20-30%, silane <1%	3UK	3M, ESPE, Seefeld, Germany
Clearfil Ceramic Primer (CCP)	Ethanol, MDP, silane (γ -MPTS) <5%	00001B	Kuraray co., Ltd, Kurashiki, Japan
GC Ceramic Primer (GCCP)	A liquid: ethanol, silane B liquid: ethanool, MMA, UDMA, organic acid	0601262	GC Corp., Tokyo, Japan
Porcelain Liner M (PLM)	A liquid: MMA, 10% 4-META, other B liquid: MMA, silane (γ -MPTS) 10%, other	MR1	Sun Medical Co., Ltd, Moriyama, Japan
Resin luting agent:			
Variolink II (VLII)	A3, Resin matrix: Bis-GMA, UDMA, TEGDMA. Filler: content 72.3%, mean particle size 0.7 μ m, Ba-Al-F-Si-glass	Base: H23580 Catalyst: H23432	Ivoclar-Vivadent, Schaan, Liechtenstein
Linkmax HV (LMHV)	Universal, Resin matrix: UDMA, TEGDMA. Filler: content 70%, mean particle size 0.8 μ m, F-Al-Si-glass	Base: 0601131 Catalyst: 0601131	GC Corp., Tokyo, Japan

- 1.5 mm thick of ceramic plates (13 X 11 mm squares) Ceramic plate preparation
- The measurement of contact angle between resin bond agent and silane ceramic surface
- The determination of pH value in five silane coupling agents
- The FT-IR analysis of siloxane quantity in five silane coupling agents
- Micro-shear test of bond strength between dual-cured resin luting agent and silaned ceramic surface before and after 10,000 and 30,000 thermal cycling time.

結果 :

Three-way ANOVA analysis showed that bond strength was significantly affected by silane coupling agent and thermal cycling, not by composite luting agent. The interactions were significant between silane coupling agent/thermal cycling, resin

luting agent/thermal cycling, silane coupling agent/resin luting agent, silane coupling agent/resin luting agent/thermal cycling.

Table 2 pH value, siloxane signal absorbance strength and mean contact angle for five silane coupling agents.

Silane coupler	Contact angle θ	pH value	Siloxane signal absorbance strength
MBS	34.0 (1.5)	4.0	0.022
RCP	27.7 (1.2)	4.0	0.035
CCP	21.7 (1.2)	1.0	0.116
GCCP	20.7 (1.1)	1.4	0.053
PLM	21.5 (0.9)	2.2	0.075

Table 3 Mean bond strength (SD) of ten combinations between five silane coupling agents and two resin luting agents after 0, 10,000 and 30,000 time thermal cycling.

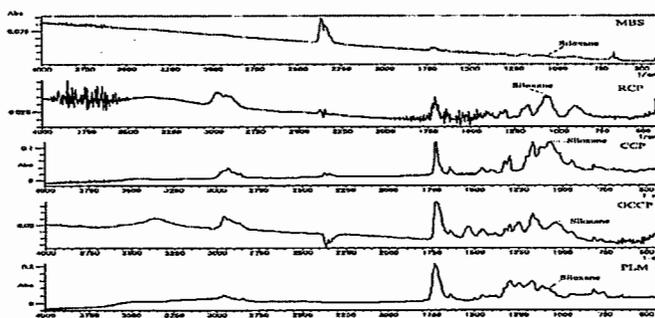
* Same letters at bond strength for each resin luting agent were not significantly difference by post HocTukey test ($p < 0.05$).

Resin luting agent	Silane coupler	Thermal cycling time		
		0	10,000	30,000
VL II	MBS	24.1 (2.2) ^f	18.6 (4.3) ^{de}	3.6 (3.5) ^a
	RCP	18.6 (2.7) ^{de}	7.3 (2.9) ^{ab}	5.2 (3.7) ^a
	CCP	21.7 (2.0) ^{ef}	23.0 (3.3) ^{ef}	10.8 (5.3) ^{bc}
	GCCP	24.0 (4.7) ^f	23.3 (4.6) ^{ef}	13.9 (2.6) ^{cd}
	PLM	25.1 (5.4) ^f	15.3 (2.9) ^{cd}	12.1 (4.2) ^{bc}
LMHV	MBS	22.5 (2.7) ^f	19.6 (4.5) ^{ef}	5.1 (5.2) ^a
	RCP	19.8 (2.2) ^{ef}	12.3 (3.3) ^{bc}	10.1 (3.3) ^b
	CCP	20.2 (2.2) ^{ef}	17.7 (3.0) ^{def}	10.9 (3.3) ^b
	GCCP	18.7 (2.6) ^{def}	17.9 (2.9) ^{def}	14.2 (3.1) ^{bc}
	PLM	22.1 (4.1) ^f	22.3 (2.6) ^f	15.8 (3.4) ^{cde}

Table 5 Pearson's correlation coefficient and respective p value between two properties. Correlation is significant at $p < 0.05$ (2-tailed).

Composite luting agent	VL II			LMHV		
	Contact angle	pH value	Siloxane absorbance	Contact angle	pH value	Siloxane absorbance
Bond strength (TC0)	-0.154 (p=0.805)	-0.318 (p=0.603)	0.052 (p=0.933)	0.525 (p=0.364)	0.428 (p=0.473)	-0.164 (p=0.792)
Bond strength (TC10,000)	-0.353 (p=0.560)	-0.738 (p=0.154)	0.458 (p=0.437)	-0.175 (p=0.778)	-0.331 (p=0.586)	0.240 (p=0.697)
Bond strength (TC30,000)	-0.947 (p=0.014)*	-0.898 (p=0.039)*	0.622 (p=0.262)	-0.910 (p=0.032)*	-0.639 (p=0.245)	0.474 (p=0.420)

Fig 1-The FT-IR spectra of the five dental silane coupling agents. X-axis: wave number in cm^{-1} ; Y-axis: absorbance in arbitrary unit.



考察：

In this study, no silane coupling agents could maintain their role in resin bond of ceramic, and significant interaction between silane coupling agents and thermal cycling suggested that they had different hydrolytic degradation process of silane. The difference of composition in silane coupling agents could affect the hydrolytic rate of silane.

In this study, we simulated the silane film of ceramic on the KBr plate, and found that different siloxane absorbance strengths occurred in five dental silane coupling agents. This difference was not correspond their silane concentrations demonstrated by manufacturers. RCP with <1% silane had higher has siloxane absorbance strength than MBS with 1% silane, which suggested that the silane degree activation and condensation could not only depended by silane concentration, but also depended by other factor such as pH value, solvent type, hydrolysis time. Within the range of siloxane absorbance strength in this study, the difference of siloxane quantity might not cause a substantial influence on the hydrolytic degradation of silane coupling agent, because the siloxane absorbance strength of five dental silane coupling agents had any correlation with their bond strength at TC0 and 10,000 in two resin luting agents.

Five silane coupling agents have different activation modes: MBS and RCP activated by water, while CCP, GCCP and PLM activated by organic acid. So CCP, GCCP and PLM have lower pH value than MBS and RCP. Previous research showed pH value of ceramic surface and silane coupling agents could affect primary resin bond strength.¹⁶ In this study pH value of silane coupling agents had no correlation with their bond strength (TC0). After TC 30,000, the significant correlation between pH value and bond strength occurred in VL II. It might support at some extent the thought of Olmos et al¹², in which higher pH of silane coupling agent could catalyze the hydrolytic degradation of siloxane. However the correlation effect of pH value was lower than that of contact angle in VL II; even did not occur in LMHV.

Contact angle is a consequence of the inter-molecular interaction between the probing medium and solid. When two media of similar chemical composition are used to probe the surface, the one with a lower surface tension should yield a lower contact angle. VL II and LMHV are dual-cured composite resin luting agents with rather low fluidity. So we used a resin bond agent (Heliobond) as probing medium to reference the wettability of five dental silane coupling agents to resin luting agent. Comparing with pH value, contact angle showed more significant correlation with bond strength (TC 30,000) in two resin luting agents. This result further suggests that the water-resistance ability of resin bond interface to ceramic could be depended on the combination between silane coupling agent and resin luting agent. High wettability of silane coupling agent to resin luting agent helps to form their interpenetrating polymer network (IPN) and copolymerization. MBS and RCP activated by water showed lower wettability than those activated by the use of organic acid such as phosphate acid monomer. Even if under the same activation mode, solvent type and solution concentration also affected their wettability, in which RCP had higher wettability than MBS. To improve the lower wettability of MBS, the manufacturer recommends the additional use of flowable resin bond agent (Heliobond) follows the treatment of MBS. However our and other researches showed that this resolution was not more effective than the only use of MBS.^{17,18} Besides the use of organic acid, two-liquid silane coupling agents (GCCP and PLM) blend functional monomer such as MMA, UDMA into silane before the use of silane, and obtained better bond durability. This beforehand use of functional monomer might be an effective way to obtain better interpenetrating polymer network (IPN) and copolymerization between silane coupling agents and resin luting agents.

参考文献：

1. Peumans M, Van Meerbeek B, Lambrechts P, Vanherle G. Porcelain veneers: a review of the literature. *J Dent* 2000; 28: 163-177.
2. Blatz MB, Sadan A, Kern M. Resin-ceramic bonding: a review of the literature. *J Prosthet Dent* 2003; 89: 268-274.
3. Matinlinna JP, Lassila LV, Özcan M, Yli-Urpo A, Vallittu PK. An introduction to silanes and their clinical applications in

dentistry. *Int J Prosthodont* 2004; 17:155-164.

4.Kato H, Matsumura H, Tanaka T, Atsuta M. Bond strength and durability of porcelain bonding systems. *J Prosthet Dent* 1996; 75: 163-168.

5.Foxton RM, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Miura H. Durability of the dual-cure resin cement/ceramic bond with different curing strategies. *J Adhes Dent* 2002; 4: 49-59.

6.Foxton RM, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Miura H. Long-term durability of the dual-cured resin cement/silicon oxide ceramic bond. *J Adhes Dent* 2002; 4: 125-135.

7.Nakamura S, Yoshida K, Kamada K, Atsuta M. Bonding between resin luting cement and glass infiltrated alumina-reinforced ceramics with silane coupling agent. *J Oral Rehabil* 2004; 31: 785-789.

8.Ide T, Tanoue N, Yanagida H, Atsuta M, Matsumura H. Effective of bonding systems on bonding durability of a prefabricated porcelain material. *Dent Mater J* 2005; 22: 257-260.

9.Yoshida K, Yamashita M, Atsuta M. Bond strength between machinable glass-ceramic and dual-cured resin luting cements using silane coupling agents. *Am J Dent* 2005; 18: 327-330.

10.Ishida H, Koenig JL. A fourier-transform infrared spectroscopic study of the hydrolytic stability of silane coupling agents on E-glass fibres. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 1980; 18: 1931-1943

11.Nishiyama N, Ishizaki T, Horie K, Tomari M, Someya M. Novel polyfunctional silanes for improved hydrolytic stability at the polymer-silica interface. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 213-221.

12.Olmos D, Gonzalez-Benito J, Aznar AJ, Baselga J. Hydrolytic damage study of the silane coupling region in coated silica microfibers: pH and coating type effects. *J Mater Process Technol* 2003; 143-144: 82-86.

13.Miyata N, Matsuura W, Kokubo T, Nakamura T. Mechanical behavior of bioactive composite cements consisting of resin and glass-ceramic powder in a simulated body fluid: Effect of silane coupling agent. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15: 1013-1020.

14.Matinlinna JP, Lassila LV, Vallittu PK. Evaluation of five dental silanes on bonding a luting cement onto silica-coated titanium. *J Dent* 2006; 34: 721-726.

15.Kamada K, Taira Y, Yoshida K, Atsuta M. Effect of four silane coupling agents on bonding of two resin-modified glass ionomer cements to a machinable ceramic. *Dent Mater J* 2007; 26: 240-244.

16.Foxton FM, Nakajima M, Hiraishi N, Kitasako Y, Tagami J, Nomura S, Miura H. Relationship between ceramic primer and ceramic surface pH on the bonding of dual-cured resin cement to ceramic. *Dent Mater* 2003; 19: 779-789.

17.Reich SM, Wichmann M, Frankenberger R, Zajc D. Effect of surface treatment on the shear bond strength of three resin cements to a machinable feldspathic ceramic. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74: 740-746.

18.Meng X, Yoshida K, Atsuta M. Micro-shear bond strength of resin bonding systems to machinable ceramic with different surface treatments. *J Adhes Dent* 2008, in press.

注：本研究は、今欧米雑誌に投稿しています。

作成日：2008年2月20日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2008年 3月 12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： 邵和 (印)
指導責任者名： 各内一彦 職名： 教授
所属機関名： 東北大学 医学系 研究科 機能薬理学
〒 980-8575
所在地： 仙台市青葉区星陵町2-1
電話： 022-717-8058 内線： 8057

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

ヒスタミン神経系の神経変性重カ物の作成：ヒスタミン神経の変性疾患は存在するか？

3. 成果の概要 (100字程度)

ヒスタミン神経系は、多くの機能を持つ重要なアミン系神経系である。本研究でペンタレントラゾール(PTZ)キンドリングマウスを作成したところ、フルキンドリングマウスは認知機能の低下を引き起こした。

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)

— 日中医学協会助成事業 —

ヒスタミン神経系の神経変性動物の作成：ヒスタミン神経の変性疾患は存在するか？

研究者氏名	邵 和
研究機関	東北大学大学院医学系研究科
指導責任者	教授 谷内 一彦
共同研究者	櫻井映子

要旨

ヒスタミン神経系は、睡眠/覚醒のリズム、自発運動量、摂食/飲水、学習・記憶、認知などに関する多くの機能を持ち重要なアミン系神経系である。ヒトにおいて、かぜ薬などに汎用されているヒスタミン H1 拮抗薬使用時に痙攣が誘発されたという多くの臨床報告がある。これは成熟小動物でも観察される知見なので、ヒスタミン神経変性疾患が存在するとすれば、ヒスタミン神経系の生体における役割が明らかになるばかりか、新たな治療薬が誕生する可能性がある。そこで、トランスジェニックマウスモデルを作成することを考えた。この実験に取り掛かる前に認知機能テストや疾患モデル動物の病態を把握する必要があったので、一次てんかんモデルと考えられている、ペンチレンテトラゾール(PTZ)キンドリングマウスを作成し、認知機能テストでどのような結果が出るか検討し、ヒスタミン神経系との関わりを明らかにした。PTZの連続投与による痙攣発作が Stage IVまたはVを3回繰り返したマウスをフルキンドリングとし、認知機能の実験にはフルキンドリングマウスについて、前頭前野関連課題、扁桃体関連課題、海馬関連課題を実行した。フルキンドリングマウスは認知機能の低下を引き起こした。ヒスタミンの含有量の低い餌を与えたマウスでは、ヒスタミンの含有量の高い餌を食べたマウスに比べ、有意に認知機能が低下していることが認められた。ヒスタミン神経系の保護のために食餌中のヒスタミンが役立つ可能性が考えられた。さらにアラキドン酸(ARA)含有食、ドコサヘキサエン酸(DHA)含有食は脳内神経保護に働くという説があり、PTZキンドリングモデルマウスのように神経系に異常をきたしたマウスにどのような作用があるか検討した。その結果は現在検討中である。

Key Words ヒスタミン神経系 てんかん ペンチレンテトラゾール(PTZ) 食餌

緒言：

ヒスタミンはアレルギーや炎症に関するメディエーターとして広く知られているが、末梢のみならず中枢に関与するヒスタミンの存在が1940年代から示唆されてきた。抗ヒスタミン薬を投与された小児やてんかん既往を持つ小児に痙攣を引き起こすケースがまれに臨床症例としてみられていたためである。1984年に渡邊らにより、中枢でヒスタミンを合成する酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素の抗体が作られ、ヒスタミン神経系の存在が明らかになった¹⁾。

ヒスタミン神経系は、睡眠/覚醒のリズム、自発運動量、摂食/飲水、学習・記憶、認知などに関する多くの機能を持ち、重要なアミン系神経系であることが古典的薬理学手法により明らかにされてきている²⁾。これは成熟小動物でも観察される知見なので、ヒスタミン神経変性疾患が存在するとすれば、ヒスタミン神経系の生体における役割が明らかになるばかりか、新たな治療薬が誕生する可能性がある。そこで、トランスジェニックマウスモデルを作成することを考えた。この

実験に取り掛かる前に認知機能テストや疾患モデル動物の病態を把握する必要があったので、一次てんかんモデルと考えられている、ペンチレンテトラゾール(PTZ)キンドリングマウスを作成し、認知機能テストでどのような結果が出るか検討し、ヒスタミン神経系との関わりを明らかにした。

対象と方法：

PTZフルキンドリングマウスの作成：4周令の雄性ICRマウスを購入し、一週間飼育した後、35mg/kgのPTZを一日一回30日間腹腔内投与した。PTZフルキンドリングは、伊藤らの方法³⁾により、PTZの投与により痙攣スコアのステージ4または5を3回繰り返したマウスを選び出して実験に用いた。PTZフルキンドリングモデルを形成後、1ヶ月間アラキドン酸含有食、DHA含有食とその対照食を与え、2日に一回餌を交換しながら飼育した。対照には4周令で購入後一週間飼育した雄性ICRマウスに、30日間生食を腹腔内に連続投与し、引き続き1ヶ月間普通食を与えたものを用意した。マウスの飼育は室温24±1℃、12時間の明/暗サイクル条件下で行った。

行動薬理学実験：

1ヶ月特殊食または普通食摂取後のマウスについて、1週間に1課題につき行動薬理学的実験を行った。行動薬理学的試験としては、object recognition test, acoustical fear conditioning test, passive avoidance test, Morris water maze testなどを用い、ストレスのより少ないと思われる課題から実施した。

脳内モノアミンの測定：

行動薬理学的試験の後、一週間経過後、エーテル麻酔下で腹部大静脈から採血し、脳を取り出した。脳は大脳、間脳、小脳、脳幹の4部位に分け、モノアミン測定まで-80度で冷凍保存した。採取した血液は3000rpmで15分間遠心分離し、血漿を-80度に凍結保存した。脳内モノアミンは、脳の各部位を3%の過塩素酸を含む5mM EDTA溶液でホモジネーとし、上清を高速液体クロマトグラフィーにより分析した。

結果：

1. PTZ 投与によるフルキンドリングマウス数と体重変化：

PTZ 投与回数とフルキンドリングマウスの数を図 1-a に、けいれん誘発に伴い体重の変化を図 1-b に示した。

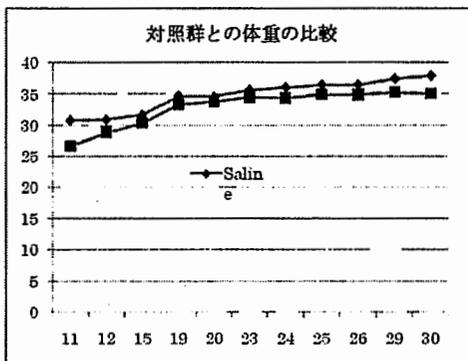
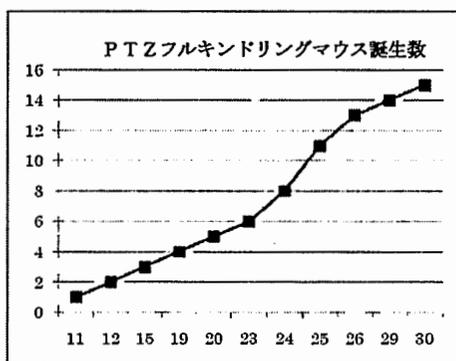


図 1-a 横軸は投与回数

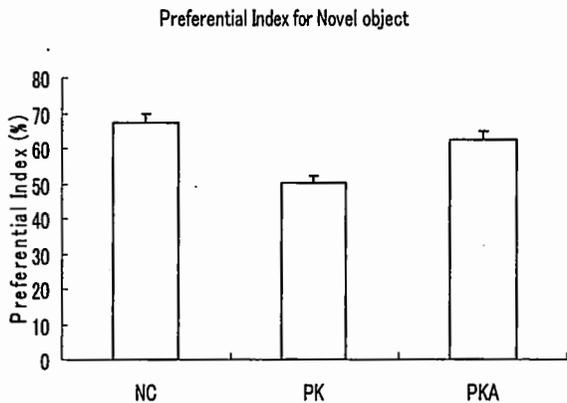
図 1-b ■は PTZ キンドリングマウス

投与開始後 11 日から 23 日までは直線的にフルキンドリングのマウスが増加したが、24 日目からはその数が急増し、30 日ではほぼ横ばいになった。この実験による大幅な体重の減少は認められな

かった。

2. PTZ 誘発フルキンドリングマウス⁴⁾の行動薬理学実験

行動薬理的試験としては、object recognition test(前頭前野関連課題), acoustical fear conditioning test(扁桃体関連課題), passive avoidance test(前頭前野・扁桃体・海馬関連課題), Morris water maze test(海馬関連課題)など、異なる脳部位を用いる課題を用い、ストレスのより少ないと思われる課題から実施した。現在結果は解析中である。その一例として新規物体の探索実験(object recognition test)の結果を図2に示した。NCはヒスタミンの多い通常食を与えたマウスの群の結果、PKはフルキンドリング形成後ヒスタミンの少ないアラキドン酸食の対照食を与えたマウス群の結果、PKAはアラキドン酸食を与えた群の結果である。図2に見られるように、ヒスタミンの少ない対照食を与えたフルキンドリング群では明らかに新規物体探索能力が低下していることが認められた。DHA食を与えた群はアラキドン酸食を与えた群とほぼ同じ結果だった。



3. PTZ 誘発フルキンドリングマウスの脳内モノアミンの変化

けいれん発作や認知機能の低下を起こしたマウスではモノアミンの変化が観察されることが多い。行動薬理学実験終了後に脳を取り出しモノアミンを測定した結果のうちドパミン(図3-a)とその代謝物(図3-b)の結果を図3に示した。

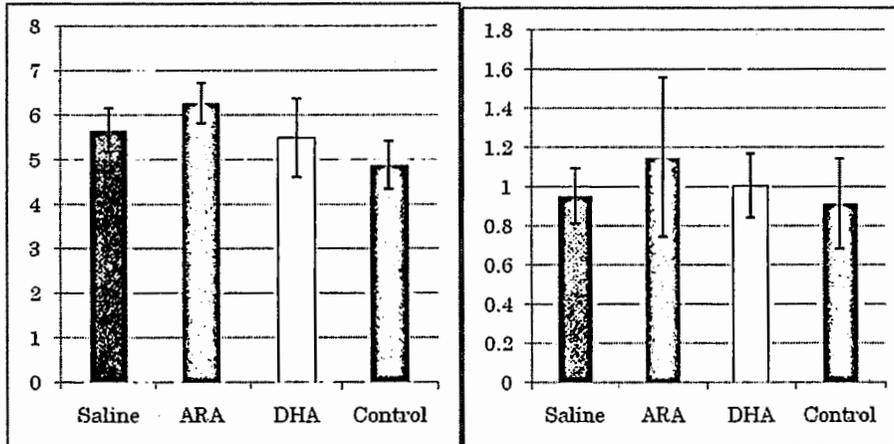


図3-a 各種食餌を2ヵ月摂取後の脳内
ドパミンレベル(nmol/g)

図3-b ドパミン代謝物である
DOPAC レベル(nmol/g)

フルキンドリングを起こしたマウスのうち、新規物体認識能が落ちていると認められたアラキド

ン酸対照食(Control)摂取群マウスの脳内ドパミンレベルはアラキドン酸摂取群に比べて有意に低下していた。代謝物の量には変わりがなかったが、けいれん発作時にドパミンが遊離されたものと考えられた。脳内ヒスタミンレベルに関しては個体差による変動が大きいため、再度検討する予定である。

考察：

PTZ 投与によるけいれん誘発は認知能力に影響を及ぼすが、本研究からヒスタミンの多い食餌を取ったマウスでは認知機能の低下を防ぐことが可能であることが示唆された。食事の取り方により認知機能障害の程度を減らすことが可能であるかもしれないことが示唆された。

謝辞：

本研究に対し助成金をいただいて研究を行えたことは、今後の発展につながると深く感謝申し上げます。日中友好に役立つことをしたいと考えております。

参考文献：

1. Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* 295(1):13-25 (1984).
2. Watanabe T & Yanai K. Studies on functional roles of the histaminergic neuron system by using pharmacological agents, knockout mice and positron emission tomography. *Tohoku J. Exp. Med.* 195: 197-217 (2001).
3. Ito T, Hori M, Yoshida K, Shimizu M. Effect of anticonvulsants on seizures developing in the course of daily administration of pentetrazol to rats. *Eur J Pharmacol.* 45(2):165-72 (1977).
4. Jia F, Kato M, Dai H, Xu A, Okuda T, Sakurai E, Okamura N, Lovenberg TW, Barbier A, Carruthers NI, Iinuma K, Yanai K, Effects of Histamine H3 antagonists and Donepezil on Learning and Mnemonic Deficits Induced by Pentylene tetrazol Kindling in Weanling Mice, *Neuropharmacology*, 50(4):404-411 (2006).

作成日：2008年3月24日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2008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： 張 曉春 

指導責任者名： 片田 範子 職名： 教授

所属機関名： 兵庫県立大学看護学研究科

〒 673-8588

所在地： 兵庫県明石市北王子13-71 兵庫県立大学明石キャンパス地域ケア開発研究所

電話： 078-925-0860 内線： 538

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

子どもの韌性尺度の信頼性と妥当性の検証:小児看護の視点から災害を経験した子どもに

3. 成果の概要 (100字程度)

人的災害を経験した中国の小学生高学年(4~6年生)を対象とし、小児看護の視点から子どもの韌性(resilience)の状況をアセスメントするための中国語版「子どもの韌性尺度」(Children's Resilience Scale, CRS)を提案した。この研究者によって提案された「子どもの韌性尺度」を用い、人的災害のほか、地震を経験した中国の小学生649名(4~6年生)を対象に、自記式質問紙調査を実施した。調査の結果から、「子どもの韌性尺度」の信頼性、基準関連妥当性、構成概念妥当性を検証するとともに、さらに、地震のような自然災害を経験した子どもを対象とした尺度の汎用性も検討した。

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)

子どもの韌性尺度の信頼性と妥当性の検証 - 小児看護の視点から災害を経験した子どもに焦点を当てて -

研究者氏名 張 曉春
所属機関 兵庫県立大学看護学研究科
指導責任者 教授 片田 範子
日本研究機関 兵庫県立大学看護学部

要旨

人的災害を経験した中国の小学生高学年(4~6年生)を対象とし、小児看護の視点から子どもの韌性(resilience)の状況をアセスメントするための中国語版「子どもの韌性尺度」(Children's Resilience Scale, CRS)を提案した。この研究者によって提案された「子どもの韌性尺度」を用い、人的災害のほか、地震を経験した中国の小学生649名(4~6年生)を対象に、自記式質問紙調査を実施した。調査の結果から、「子どもの韌性尺度」の信頼性、基準関連妥当性、構成概念妥当性を検証するとともに、さらに、地震のような自然災害を経験した子どもを対象とした尺度の汎用性も検討した。

Key Words 小児看護, 韌性(resilience), 災害, 尺度, 中国

緒言

災害のようなトラウマ的出来事が子どもの身体面、精神面、生活面にわたり、子どもの成長発達に深刻な影響を及ぼすことが多くの研究で取り上げられている。これらの子どもがおかれている厳しい状況にうまく適応し、強く生き抜ける能力、いわゆる韌性をどのように支えていくことへの重要性が多くの専門家によって指摘されている^{1), 2), 3), 4)}。

近年、中国では様々な自然災害、人的災害が多発しており、その影響を受けた子どもには適切な看護ケアが必要とされている^{5), 6)}。しかし、中国では、現在災害を経験した子どもの韌性に関する看護研究が少なく、災害を経験した子どもの韌性を測定する看護独自のアセスメントツールはまだ開発されていない。

対象と方法

1. 「子どもの韌性尺度」の作成と洗練

筆者の博士論文研究として、子どもの韌性関連の先行研究の文献検討、概念分析及び人的災害を経験した中国の子どもを対象とした予備調査に基づき、韌性の概念枠組み、下位概念を明らかにしながら、小児看護の視点から人的災害を経験した子どもにとって重要と思われる韌性の下位概念、関連項目を追加し、52項目版の「子どもの韌性尺度」を作成した。なお、尺度の包括的妥当性、表面妥当性の検討を通し、尺度及び質問項目の表現を修正し、49項目版に洗練した。

その後、将棋倒し事故を経験した中国の小学生678名を対象とし、「子どもの韌性尺度」の信頼性、基準関連妥当性、構成概念妥当性を検討し、5因子26項目の中国語版「子どもの韌性尺度」を提案した。

2. 研究目的

開発された子どもの韌性尺度の信頼性、妥当性を検証することにより、「子どもの韌性尺度」の汎用性を検証することを研究の目的とした。

3. 調査対象

2005年11月26日中国中部某地域でM5.7の地震が発生した。13名が死亡、約8000名が重軽傷を負い、約60万人の人々が何らかの被災を受けた(総人口43万の中型都市、以下地域1とする)。



写真1 地域1震災直後の被災状況(人民图片網より)

また、2007年6月3日中国南西部某地域でM6.4の地震が発生し、2名が死亡、約30名の重傷者及び18万人の人々が何らかの被災を受けた(総人口19万の小型都市、以下地域2とする)。

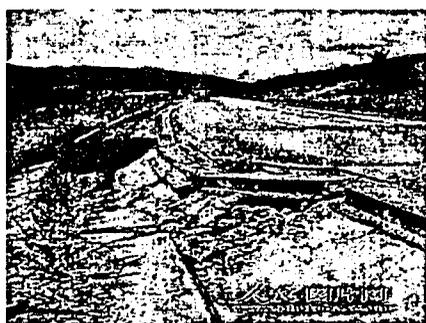


写真2 地域2震災直後の被災状況(人民图片網より)



写真3 震災後に地域2小学校の仮設教室

本調査を実施した時期は、地域1は地震が発生してから2年が経過している。地域2については、5ヶ月が経過している。そこで、この2つの地域で生活している児童及びその養育者876名を対象者(地域1には390名、地域2には486名)に調査を実施した。

なお、地震発生地域児童の結果と地震で被災経験がない地域である中国北西部某大型都市の小学生306名の調査結果を比較群とした。調査対象とされた3地域の児童はすべて小学校4～6年生の生徒であった。

4. 調査方法

自記式質問紙調査法

5. 調査内容

児童に記入してもらう内容には筆者が提案した中国語版「子どもの韌性尺度」(26項目版)のほか、子どもの韌性に寄与する概念「自己効力感」、「自尊」をアセスメントする中国語版の「自己効力感尺度」、中国語版「児童自尊尺度」及び子どもの一般属性等の内容が含まれている。調査表への記入時間は約20分～30分である。

なお、子どもの養育者に記入してもらう内容は中国語版「Rutter 児童行為尺度」及び養育者の一般属性であった。調査表への記入時間は約 10 分である。「Rutter 児童行為尺度」により、13 点以上を問題行為があるとされる。

6. 調査期間

2007 年 3 月～12 月までの期間であった。

結果

1. 研究対象者の一般属性

地震が発生した 2 つの地域における有効回答は 649 名、有効回答率は 74.1%であった。地域 1 の有効回答は 276 名、有効回答率は 70.8%、地域 2 の有効回答は 373 名、有効回答率は 76.8%であった。649 名の児童には男子 314 名 (48.4%)、女子 335 名 (51.6%)、年齢範囲は 8 歳～14 歳、平均年齢 10.64 歳 (SD=1.02) であった。比較群の有効回答は 273 名、有効回答率は 89.21%、年齢範囲は 9～13 歳、平均年齢 11.46 歳 (SD=1.03) であった。

なお、子どもの養育者には男性 301 名 (46.4%)、女性 348 名 (53.6%) いた。「Rutter 児童行為尺度」を記入した養育者の 9 割近くは両親 (583 名, 89.8%)、祖父母の割合はわずかであった (43 名, 6.6%)。地震を経験した後に子どもが問題を抱える場合、最も相談したい人の順番は「専門医」(276 名, 42.5%)、「似た同じような経験を持つ周囲の人」(156 名, 24.0%)、「自分で解決できる」(125 名, 19.3%)、「学校の先生」(53 名, 8.2%)となり、「専門の看護師」と答えた養育者はわずかであった (24 名, 3.7%)。また、専門の看護師に最も提供してほしい具体的なケアに関して、「具体的な健康指導、生活指導」(367 名, 56.5%)、「こころのケア」(136 名, 21.0%)、「自分たちの悩みを聞いてくれる」(83 名, 12.8%) の順番であった。

2. 「子どもの韌性尺度」に関する検討

地震発生地域児童の「子どもの韌性尺度」の合計得点を求め、子どもの韌性得点とする。その結果、平均合計得点は 85.92 点 (M=9.10)、非正規分布であった (歪度 -.51, 尖度 -.16)。

1) 「子どもの韌性尺度」の信頼性

表 1 「子どもの韌性尺度」(26 項目版)全体及び各因子の平均値, SD, α 係数(N=649)

尺度全体と各因子	M(SD)	α 係数
信念と態度	25.13 (2.40)	.558
社会的能力	15.65 (3.19)	.713
学業の遂行	20.45 (2.51)	.652
自信と自尊	12.20 (2.42)	.604
基本的日常生活の維持	12.49 (2.50)	.565
尺度全体	85.91(9.10)	.826

「子どもの韌性尺度」全体及び各因子の Crobach's α 係数を計算した。その結果、尺度全体の α 係数は.826、各因子の α 係数は.56～.71 で、尺度の内的整合性が検証された (表 1 に示す)。

2) 「子どもの韌性尺度」の妥当性

(1) 基準関連妥当性

「子どもの韌性尺度」は「自己効力感尺度」、「児童自尊尺度」との相関を求めた結果、「子どもの韌性尺度」全体と各因子は中程度の正の相関を示した (表 2 に示す)。この結果から、尺度の併存的妥当性が支持された ($r=.61$, $p<.01$; $r=.57$, $p<.01$)。

表2 「子どもの韌性尺度」(26項目版)と「自己効力感尺度」,「児童自尊尺度」との相関(N=649)

尺度全体と各因子	自己効力感尺度	児童自尊尺度
信念と態度	.44**	.41**
社会的能力	.36**	.32**
学業の遂行	.47**	.48**
自信と自尊	.46**	.50**
基本的日常生活の維持	.42**	.33**
尺度全体	.61**	.57**

** $p < .01$

(2) 構成概念妥当性

本研究では、地震を経験した子どもを地域1, 地域2と分けた。なお、地震を経験した子どもの結果を検討するために、中国北西部某市の児童の結果も含め、仮説検証法を用い、設定した研究仮説を検討し、尺度の構成概念妥当性を検証した。設定した研究仮説は「比較群と比べ、地震を経験した子どもの韌性得点が低い」、「問題行爲が無い子どもより、問題行爲が有る子どもの韌性得点が低い」、「一般属性と韌性との関連」である。

①研究仮説1: 「比較群と比べ、地震を経験した子どもの韌性得点が低い」

地震発生地域の2群, 比較群の「子どもの韌性尺度」の得点について、一元配置分散分析を行った結果、比較群より、地震発生地域の2群の韌性得点が低く、多重比較を行ったところ、群間に有意な得点差があった($F(2, 919) = 21.93, p < .001$) (表3に示す)。そのため、研究仮説1「比較群と比べ、地震を経験した子どもの韌性得点が低い」が支持された。

表3 「子どもの韌性尺度」(26項目版)の平均得点の分散分析結果(N=649)

群別	CRS 尺度得点 M (SD)	F
地域1(n1=276)	86.32 (9.61)	21.93***
地域2(n2=373)	85.62 (8.71)	
比較群(n3=273)	90.23 (9.15)	

*** $p < .001$

②研究仮説2: 「問題行爲が無い子どもより、問題行爲が有る子どもの韌性得点が低い」

問題行爲の有無による子どもの韌性得点について、U検定を行った。その結果、問題行爲の無い子どもの平均得点は86.99点(SD=8.78)、問題行爲の有る子どもの平均得点は82.10点(SD=9.23)で、問題行爲の無い子どもより、問題行爲の有る子どもの韌性得点が有意に低かった($Z = -5.38, p < .001$)。したがって、研究仮説2「問題行爲が無い子どもより、問題行爲が有る子どもの韌性得点が低い」が支持された。

③一般属性と子どもの韌性得点との関連

一般属性には性別、学年、年齢、健康状態に対する子どもの自覚、家庭の経済状況、重要他者と対応方法が含まれた。一般属性と子どもの韌性得点との関連についてU検定、または一元配置分散分析で検討した。その結果、性別、年齢、重要他者による韌性得点に関して、有意ではなかった。

一方、4年生(M=8.747, SD=8.02)、6年生(M=87.25, SD=9.53)より、5年生(M=84.01, SD=8.98)の得点が最も低く、群間に有意な得点差があった($F(2, 646) = 10.94, p < .001$)。

家庭の経済状況が良くない・あまり良くないと回答した子ども(M=82.46, SD=8.69)より、良い・比較的良いと回答した子どもの得点(M=87.98, SD=8.54)が最も高く、群間に有意な得点差が見られた($F(3, 645) = 9.80, p < .001$)。

地震発生後、積極的な対応方法をとる子ども(M=86.39, SD=8.7)と比べ、消極的な対応方法をとる子ども(M=82.26, SD=9.75)、その状況をどう対応するかが分からないと回答した子ども(M=80.14, SD=11.05)の韌性得点が低く、群間に有意な得点差が見られた($F(3, 645) = 5.52, p < .01$)。

考察

本研究が「子どもの韌性尺度」の信頼性と基準関連妥当性、構成概念妥当性を検証するとともに、地震を経験していない他の地域の子どもの結果と検討することにより、尺度の汎用性について検討した。なお、この尺度が看護独自のアセスメントツールとして、小児看護の視点から人的災害を経験した子どものみならず、地震のような自然災害を経験した子どもの韌性の傾向を全体的に把握することができる。さらに、今後、災害を経験した子どもに看護ケアを提供する場合、看護ケア前後における韌性の把握、看護ケア効果の評価に新しい示唆を与えると考えられる。

参考文献

1. Grotberg, E. H. (1995). A guide to promoting resilience in children: strengthening the human spirit. Retrieved May 22, 2006, from <http://resilnet.uiuc.edu/library/grotb95b.html#appendix2>.
2. Grotberg, E. H. (2001). Resilience programs for children in disaster. Ambulatory Child Health, 7 (2), 75-83.
3. Discovery Health Channel and APA Practice Directorate (2002). The Road to Resilience. Washington DC: American Psychological Association. Retrieved May 16, 2006, from http://www.apahelpcenter.org/dl/the_road_to_resilience.pdf
4. Kersting, K. (2003). Teaching children about resilience. APA Monitor on Psychology, 34 (9), 44.
5. 張曉春, 片田範子, 勝田仁美, 小迫幸恵, 三宅一代, 岡田和美, 寺下久美子 (2006). 日本で開発されたパンフレットが中国で応用していく可能性の検討: 災害後の中長期における子どもを対象に, 第10回日中看護学会論文集, 46-50.
6. Zhang Xiaochun (2006). The care needs of children after man-made disaster: a large-scale coal-mining accident in China. The 9th Annual Conference East Asia Forum on Nursing Science, 134.

作成日:2008年3月14日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2008 年 2 月 18 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： 劉 赫 

指導責任者名： 本望 修 職名： 講師

所属機関名： 札幌医科大学脳神経外科

〒060-8543

所在地： 札幌市中央区南1条西16丁目

電話： 011-611-2111 内線： 3356

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ
骨髄移植による脳梗塞治療効果の機序の解明

3. 成果の概要（100字程度）
ラットの一過性中大脳動脈閉塞モデルを用いて、経静脈骨髄幹細胞を移植しました。その治療効果を観察し、評価しました。幹細胞の移植によって、血管新生、運動能力の向上及び脳梗塞領域は縮小が認められた。

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）

骨髄移植による脳梗塞治療効果の機序の解明

研究者氏名 劉 赫
中国所属機関 中国北京朝陽病院脳神経外科
日本研究機関 札幌医科大学脳神経外科
指導者責任者 講師 本望 修
共同研究者名 原田 邦明, 濱田 洋文

要旨

近年骨髄細胞を用いて、脳梗塞動物モデルへ移植すると、動物の梗塞範囲の主縮小と神経症状の改善が認められたが、その機序はまだ完全に解明されていません。われわれは、中大脳動脈閉塞モデルを用いて、経静脈的に骨髄細胞を投与すると、神経保護と血管新生の相乗効果によって、脳梗塞縮小また神経症状改善が認められました。更に、治療効果と作用機序を検討した。

Keywords 脳梗塞, 骨髄幹細胞, 血管新生

緒言：

現代医療には、脳梗塞の患者さんに対し、さまざまな治療手段がありますが、治療効果がなかなか満足するべきとは言えません。われわれは骨髄幹細胞を用いて、経静脈移植して、その神経保護作用、血管新生作用によって、脳梗塞の縮小化、また神経症状の改善を求めて、研究を行いました。

対象と方法：

- 1、我々はSDラットを用いて、一過性（120分）MCAOモデルを作成した。
- 2、MCAO 3時間後に、骨髄幹細胞を、経静脈的に移植した。対象組と治療組各10匹ラットを使用した。
- 3、MCAO後、経時的に、画像診断学および行動学的に評価し、治療効果を判定した
- 4、組織学的解析では、脳梗塞の体積および血管新生の状態を解析した。

結果：

1、経静脈移植された骨髄幹細胞はラット虚血巣に集積したことが観察された。

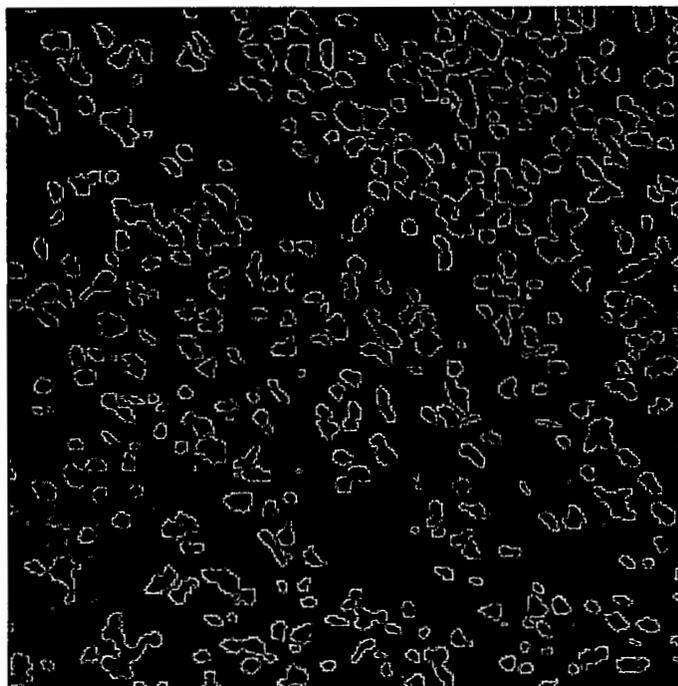


図1：LacZで標識された骨髄幹細胞（赤）が梗塞病変周辺に集積ことが認められました。

2、骨髄幹細胞による治療では、脳梗塞巣の縮小効果が認められました。



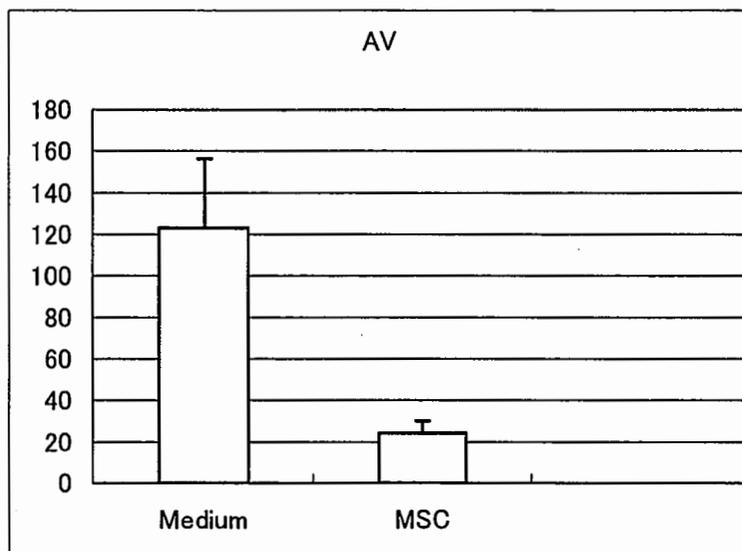
図2：移植によって、脳梗塞（白い部分）が縮小化が認められました。

3、骨髄幹細胞強力な血管新生作用が認められた。



図3：移植によって、血管新生が認められました。

4、骨髄幹細胞協力的な神経保護作用が認められた。



Graph 1 : 移植によって、apoptosis cells ($p < 0.01$; cells/mm²) が減少することが認められました。

考察：

脳虚血後、神経細胞は虚血により、Apoptosisが起こります^[1]。また虚血により、脳内毛細血管内皮細胞も死んでしまいます。骨髄幹細胞は神経保護作用があり、また多分化能力も持っています。移植すると、骨髄幹細胞は虚血周辺に集積し、細胞因子を放出します^[2]。それらの因子が神経保護作用を果たします。また、骨髄幹細胞は Neuron また glia に分化し、神経代替作用を果たします。それで相互作用して、脳梗塞縮小化と神経症状改善の治療効果が得られました。

参考文献：

1. Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, et al.
2. al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. J Clin Invest 2003; 111: 1843-51.
3. Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. Neuropathology 2002; 22: 275-9.

作成日期：2008年2月19日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2008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： 孫 芳 

指導責任者名： 中西 敏雄 職名： 教授

所属機関名： 東京女子医科大学
国際統合医科学インスティテュート

〒 162-8666

所在地： 東京都新宿区河田町8-1

電話： 03-3353-8111 内線： 28482

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

小児肺高血圧症に対するシトルリン酸による治療に関する基礎的研究

3. 成果の概要 (100字程度)

本研究の目的は、小児肺高血圧のモデルをラットで作成することと、シトルリン酸の投与が肺高血圧の
治療に有効であるかを動物実験で検討することでした。前者の研究目的は達成しました。後者は未だ
検討が必要です。

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)

小児肺高血圧症に対するシトルリン酸による治療に関する基礎的研究

研究者氏名 孫 芳
中国所属機関 北京大学 第1病院小児科
日本研究期間 東京女子医科大学
国際統合医科学インスティテュート
指導責任者 教授 中西敏雄

要旨

肺高血圧症は、小児、成人をとわず、予後不良の疾患で、いまのところ完璧な治療法や薬剤は無いのが現状である。よりよい小児肺高血圧治療法の開発をめざす目的で本研究を開始した。アルギニンから一酸化窒素産生酵素により一酸化窒素が産生され、血管、とくに肺血管は弛緩する。シトルリン酸はアルギニンの前駆物質となりうるアミノ酸で、肺高血圧症の治療に有効である可能性がある。本研究の目的は、小児肺高血圧のモデルをラットで作成することと、シトルリン酸の投与が肺高血圧の治療に有効であるかを動物実験で検討することである。妊娠ラットを低酸素下に置き、生後も新生仔を低酸素下に置いて、肺高血圧ラットを作成した。また、モノクロタリンを新生仔ラットに投与して若年ラットの肺高血圧モデルを作成した。新生仔期から2ヶ月間シトルリン酸(100mg/kg)を腹腔内投与し、シトルリン酸が肺高血圧にあたえる影響を調べた。低酸素やモノクロタリンは肺内小動脈の内膜肥厚をもたらしたが、シトルリン酸はそれを防止できなかった。さらなるシトルリン酸投与方法、投与量の検討が必要である。

Key Words 肺高血圧、小児、ラット、低酸素、モノクロタリン、シトルリン酸

緒言：

肺高血圧症は、小児、成人をとわず、予後不良の疾患である。原発性のは100万人に1-2人の割合で発症し、小児が25%を占める。原発性肺高血圧以外に、先天性心疾患に合併した肺高血圧も小児で多くみられる。その治療には、Ca受容体拮抗剤、シルデナフィル、ボセンタン、エボプロステノールなどが用いられてきた。しかし、それらの薬剤の効果は限定的なもので、副作用もありうるので、いまのところ完璧な治療法や薬剤は無いのが現状である。よりよい肺高血圧治療法の開発をめざす目的で本研究を開始した。

アルギニンから一酸化窒素産生酵素により一酸化窒素が産生され、血管、とくに肺血管は弛緩する。アルギニンの投与は一酸化窒素の産生を増加させ、血管拡張をきたすことが知られている。

しかし、アルギニンはあまりにも急激な血行動態の変化をきたすので、アルギニンによる肺高血圧の治療はヒトで実用化されるには至っていない。一方、シトルリン酸はアルギニンの前駆物質となりうるアミノ酸である。シトルリン酸の投与は、肺高血圧症の治療に有効である可能性がある。本研究の目的は、シトルリン酸の投与が肺高血圧の治療に有効であるかを動物実験で検討することである。

対象と方法:

1) 低酸素による肺高血圧の作成

若年ラットでの肺高血圧モデル動物の作成をおこなった。妊娠ラットを妊娠18日から低酸素飼育ボックスにて飼育した。酸素濃度は12-16%とした。低酸素状態のまま分娩させ、母親と新生仔を低酸素状態においた。そのまま、生後2ヶ月まで飼育した。生後2ヶ月の時点で屠殺し、肺動脈における内膜肥厚、中膜肥厚の有無について、組織検査をおこなった。

2) モノクロタリンによる肺高血圧の作成

生後2週の新生仔ラットにモノクロタリン(60mg/kg)を腹腔内投与し、生後2ヶ月まで飼育した。生後2ヶ月の時点で屠殺し、肺動脈における内膜肥厚、中膜肥厚の有無について、組織検査をおこなった。

3) 肺組織所見の観察

肺組織を Hematoxilin-Eosin で染色した。また、弾性線維を染色するため、Elastica van Gieson 染色も行った。

4) シトルリン酸投与の効果

新生仔期から2ヶ月間シトルリン酸(100mg/kg)を1週間に1回、腹腔内投与し、シトルリン酸が肺高血圧にあたえる影響を、組織所見から検討した。

結果:

1) 低酸素による肺高血圧の作成

若年ラットでの肺高血圧モデル動物の作成が可能であった。酸素濃度を12-16%とし、生後2ヶ月まで飼育し、生後2ヶ月の時点で組織検査をおこなうと、肺小動脈において内膜肥厚をみとめた。

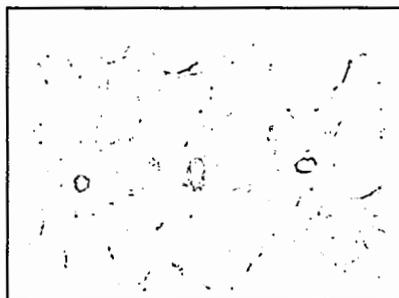


図1 (左図). 低酸素による内膜肥厚

図2 (右図). 低酸素による内膜肥厚

2) モノクロタリンによる肺高血圧の作成

生後2週の新生仔ラットにモノクロタリン(60mg/kg)を腹腔内投与し、生後2ヶ月まで飼育した。

生後2ヶ月の時点で屠殺し、組織検査をおこなった。肺小動脈において内膜肥厚を認めた。

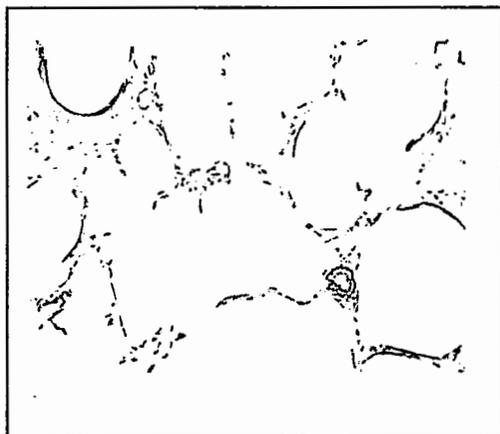


図3. モノクロタリンによる内膜肥厚

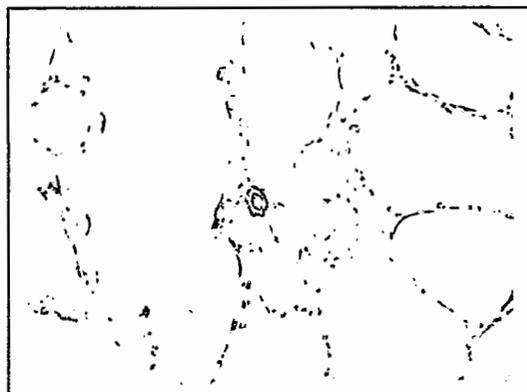


図4. モノクロタリンによる内膜肥厚

3) シトルリン酸投与の効果

シトルリン酸(100mg/kg)を1週間に1回、腹腔内投与し、シトルリン酸が肺高血圧にあたえる影響を、組織所見から検討した。この量のシトルリン酸では、内膜肥厚を防止できなかった。

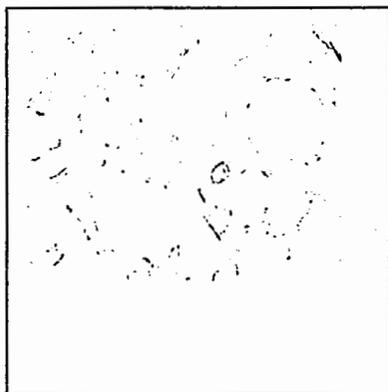


図5. 低酸素による内膜肥厚

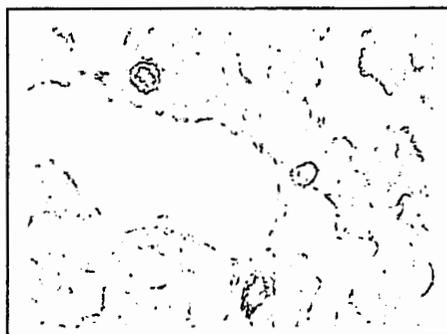


図6. モノクロタリンによる内膜肥厚

考察:

肺高血圧症は、小児、成人をとわず、予後不良の疾患である。現存の薬剤の効果は限定的なもので、副作用もありうる。一方、シトルリン酸はアルギニンの前駆物質となりうるアミノ酸で、正常に体内に存在する。シトルリン酸の投与は、安全で、且つ肺高血圧症の治療に有効である可能性がある。

肺高血圧の治療について研究するためには、よい動物モデルを作成する必要があった。本研究の第1の目的は、よい動物モデルを作成することであった。新生時期からの低酸素は、内膜肥厚

をもたらし、モノクロタリンと同じ程度の肺血管病変をもたらした。モノクロタリンの新生仔投与も内膜肥厚をもたらした。本研究では低酸素、モノクロタミンともに、若年ラット肺高血圧モデルの作成に有用であった。モノクロタミンは成獣ラットにおいては、肺高血圧をきたすことが知られており、多くの研究がある。しかし、新生仔-若年ラットにおける肺高血圧モデルはなく、本研究でいままでにない結果を得ることができた。

次に、シトルリン酸の投与が肺高血圧の治療に有効であるかを動物実験で検討した。シトルリン酸(100mg/kg)を1週間に1回、腹腔内投与し、シトルリン酸が肺高血圧にあたえる影響を、組織所見から検討したが、本研究では、この量のシトルリン酸では、内膜肥厚を防止できなかった。本研究は端緒に付いたばかりで、今後シトルリン酸の投与方法(静脈注射、経口投与など)や量(50, 100, 150 mg/kg)、投与頻度(隔日、毎日など)の検討を行っていかねばならない。

作成日 2008年3月10日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2008 年 2 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： 劉 舵 

指導責任者名： 山下 康行 職名： 教授

所属機関名： 熊本大学大学院医学部 放射線科
〒 860-8556

所在地： 熊本市本荘 1-1-1

電話： 096-373-5261 内線： _____

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

多列検出器ヘリカルCTによる肺限局性スリガラス陰影の検出及び性状解析

3. 成果の概要 (100字程度)

肺癌検診に低線量ヘリカルCT導入されて以来、今までX線写真で見つかなかった小さな肺結節が多数見つかるようになってきている。我々が模擬スリガラス影を含む胸部ファントムを使用し、病変と肺実質のCT値及び管電流の関係を判明した。さらに、GGOを示すAAHとBACの鑑別について基礎と臨床を検討し、CTと臨床所見を用いることにより、両者の鑑別が82.4%の可能であることが判明した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

- 1) 第64回日本医学放射線学会学術発表会 (横浜)
肺結節のthin slice helical CTデータの定量解析による良悪性の推定
- 2) 第161回日本医学放射線学会九州地方会 (宮崎)
低線量MDCTによる肺限局性スリガラス影の検出
- 3) 第162回日本医学放射線学会九州地方会 (沖縄)
低線量高分解能CTによる限局性スリガラス影の検出能および画質の検討

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

Radiation Medicine (Volume 26・Number 1・January 2008)

Identification and characterization of focal ground-glass opacity in the lungs by Multidetector Helical CT

多列検出器ヘリカルCTによる肺限局性スリガラス陰影の検出 及び性状解析

研究者氏名	劉 舵
中国所属機関	中国西電集団病院放射線科
日本研究機関	熊本大学医学部放射線科
指導責任者	教授 山下 康行
共同研究者名	粟井 和夫、船間 芳憲、 尾田 済太郎、中浦 猛、弥永 由美、 羽手村 昌弘、河中 功一、 山下 康行

Introduction:

A focal ground-glass opacity (GGO) on chest computed tomography (CT) images may be attributable to atypical adenomatous hyperplasia (AAH), bronchioloalveolar carcinoma (BAC), focal inflammation, and focal fibrosis. Therefore, the accurate diagnosis of GGO nodules on chest CT is important. Thin-section helical CT using multidetector CT (MDCT) can analyze the GGO nodules because MDCT can scan nodules as volume data under one breath-hold. As thin-section helical CT involves relative high radiation exposure, it is desirable to reduce the radiation dose in follow-up studies. We used a chest phantom to investigate how much the radiation dose can be reduced when identifying and characterizing GGO nodules on thin-section helical scans obtained by MDCT.

Key words: Ground-glass opacity (GGO) · Lung cancer · High-resolution CT · Phantom

Abstract:

Purpose. The aim of this study was to investigate how much the radiation dose can be reduced for the identification and characterization of focal ground-glass opacities (GGOs) by high resolution computed tomography (HRCT).

Materials and methods. A chest CT phantom including GGO nodules was scanned with a 40-detector CT scanner. The scanning parameters were as follows: tube voltage 120 kVp; beam collimation 32×1.25 mm; thickness and intervals 1.25 mm; tube current and rotation time 180, 150, 120, 90, 60, and 30 mA. 180 mA was the standard. Using a three-point scale at different currents, we visually evaluated image quality. Furthermore, we carried out observer performance tests using receiver operating characteristic

(ROC) analysis to evaluate the ability to identify GGO nodules at each current.

Results. By visual analysis, the scores for all particulars were significantly lower on images obtained at less than 120 mA than at 180 mA (Steel's test, $P < \square 0.05$). There was no statistically significant difference in any particulars other than artifact on images obtained at 180, 150, and 120 mA. By ROC analysis there was no statistical difference in the Az value to identify GGO nodules on images obtained at 180, 150, 120, 90, or 60 mA. However, the Az value at 30 mA was significantly lower than at 180 mA (Dunnett's test, $P < 0.01$).

Conclusion. The minimum current necessary for the characterization of GGO nodules on HRCT was 120 mA, although their identification was possible at currents of >30 mA.

Table 1. Results of Qualitative Analysis of Simulated GGOs

Particulars	Tube current-time product (mAs)					
	180	150	120	90	60	30
Artifact in lung fields	2.8±0.4	2.7±0.5	2.5±0.5*	2.0±0.4*	1.7±0.6*	1.2±0.4*
Homogeneity of GGO nodules	2.9±0.4	2.7±0.5	2.9±0.4	2.5±0.6*	1.8±0.7*	1.2±0.4*
Margin clearness of GGO nodules	2.5±0.5	2.6±0.5	2.3±0.6	2.1±0.9*	1.5±0.7*	1.1±0.4*
Overall image quality	2.7±0.5	2.7±0.5	2.5±0.5	2.2±0.8*	1.6±0.6*	1.1±0.3*

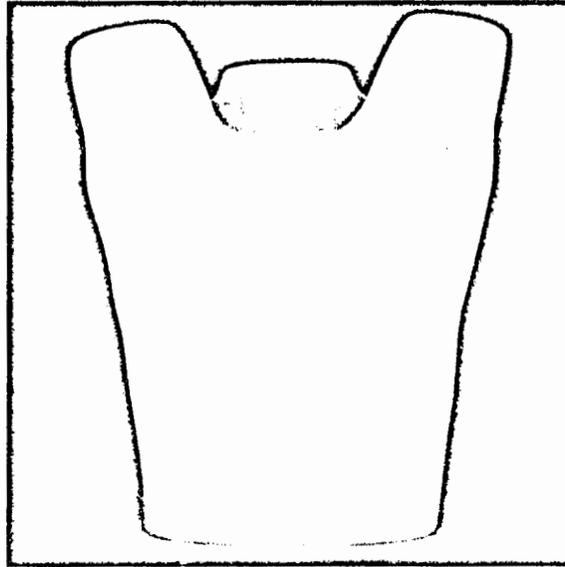
* $P < 0.05$ at Steel's test

Table 2. Az values of 6 radiologists for identification of simulated GGO nodules

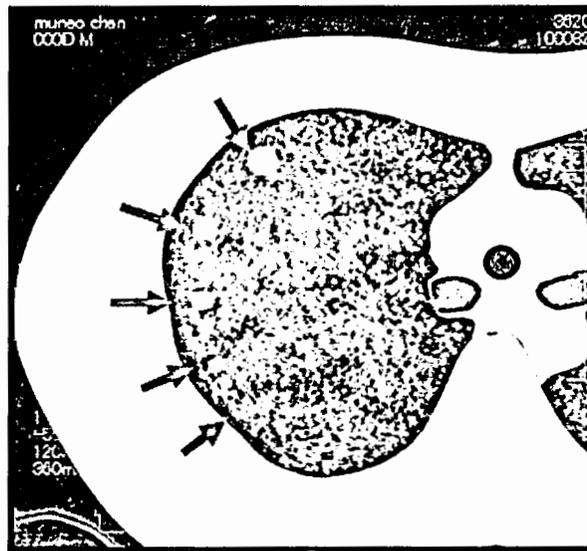
Observers	Tube current-time product (mAs)					
	180	150	120	90	60	30
1	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.91
2	1.00	1.00	0.92	0.94	0.96	0.93
3	1.00	1.00	0.97	0.92	0.86	0.90
4	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.92
5	1.00	0.99	0.98	1.00	0.93	0.86
6	1.00	1.00	1.00	1.00	0.92	0.69
Mean	1.00	1.00	0.98	0.98	0.94	0.87
P value	-	1.00	0.84	0.84	0.31	< 0.01

Values at 180 mAs were the control for Dunnett's test

Figure 1. Chest phantom used for this study

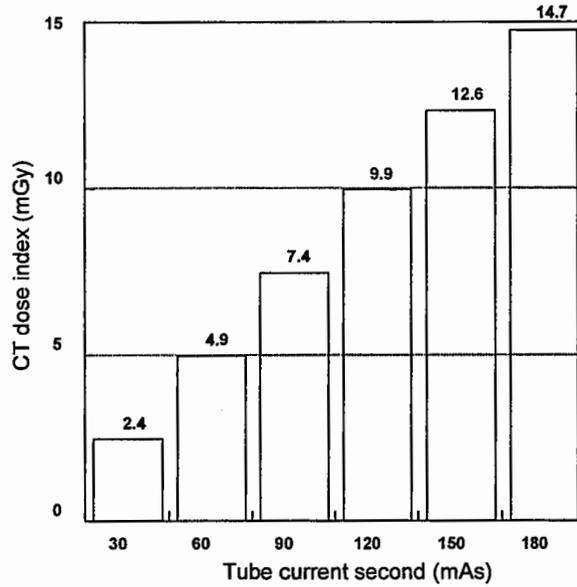


A. Gross appearance of the chest phantom (LSCT001, Kyoto Kagaku Co. Kyoto, Japan) used in this study.



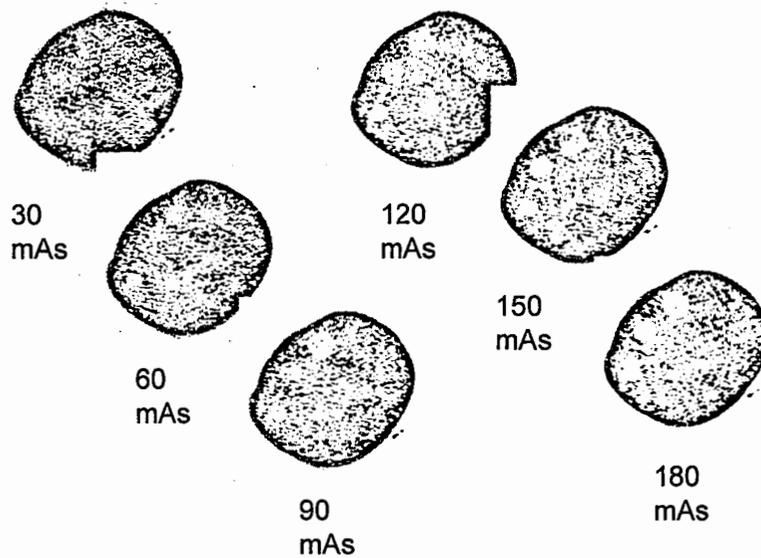
B. Right lung of the chest phantom at the level of the carina. Simulated ground glass opacities (GGOs) measuring 4-, 6-, 8-, 10-, and 12 mm are indicated by arrows.

Figure 2. CT Dose Index in scan with various mAs setting



CTDI_w for the detection of GGOs at different mAs settings. When the CTDI_w of 180mAs was assumed to be 100%, the CTDI ratio was 16.3% at 30 mAs, 33.3% at 60 mAs, 50.3% at 90 mAs, 67.3% at 120 mAs, and 85.7% at 150 mAs.

Figure 3. Simulated GGOs on images obtained with various mAs



Simulated GGOs on images obtained with 30-, 60-, 90-, 120-, 150-, and 180 mAs.

REFERENCES:

1. Austin JH, Muller NL, Friedman PJ, Hansell DM, Naidich DP, Remy-Jardin, et al. Glossary of terms for CT of the lungs: recommendations of the Nomenclature Committee of the Fleischner Society. *Radiology* 1996; 200:327-31.
2. Kodama K, Higashiyama M, Yokouchi H, Takami K, Kuriyama K, Mano M, et al. Prognostic value of ground-glass opacity found in small lung adenocarcinoma on high-resolution CT scanning. *Lung Cancer* 2001; 33:17-25.
3. Kuriyama K, Seto M, Kasugai T, Higashiyama M, Kido S, Sawai Y, et al. Ground-glass opacity on thin-section CT: value in differentiating subtypes of adenocarcinoma of the lung. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173:465-9.
4. Nakajima R, Yokose T, Kakinuma R, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A. Localized pure ground-glass opacity on high-resolution CT: histologic characteristics. *J Comput Assist Tomogr* 2002; 26:323-9.
5. Henschke CI, Yankelevitz DF, Mirtcheva R, McGuinness G, McCauley D, Miettinen OS. CT screening for lung cancer: frequency and significance of part-solid and nonsolid nodules. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178:1053-7.
6. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, et al. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 1999; 354:99-105.
7. Sone S, Takashima S, Li F, Yang Z, Honda T, Maruyama Y, et al. Mass screening for lung cancer with mobile spiral computed tomography scanner. *Lancet* 1998; 351:1242-5.
8. Swensen SJ. CT screening for lung cancer. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179:833-6.
9. Aoki T, Nakata H, Watanabe H, Nakamura K, Kasai T, Hashimoto H, et al. Evolution of peripheral lung adenocarcinomas: CT findings correlated with histology and tumor doubling time. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174:763-8.
10. Hasegawa M, Sone S, Takashima S, Li F, Yang ZG, Maruyama Y, et al. Growth rate of small lung cancers detected on mass CT screening. *Br J Radiol* 2000; 73:1252-9.

... ..

注：本研究は、『Radiation Medicine』（2008年1月VOL26巻）に掲載。

作成日：2008年2月28日

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2008 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： 哈力沙・艾山



指導責任者名： 奥山 徹 職名： 教授

所属機関名： 明治薬科大学

〒 204-8588

所在地： 東京都清瀬市野塩2-522-1

電話： 042-495-8904 内線： _____

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

慢性閉塞性肺疾患に有効な新疆ウイグル伝承薬物の研究開発

3. 成果の概要 (100字程度)

ウイグル伝統薬の「蕁麻子」(*Urtica cannabina* L.の果実)の成分検索、および蕁麻子はじめ9種の生薬から構成されている方剤「寒喘祖帕顆粒」とそれぞれの構成生薬について一酸化窒素産生抑制効果に関する研究を行ない、た方剤らびに数種の生薬に抑制活性を認めた。

蕁麻子の研究は初めてであり、2種のメガステグマン化合物を単離し、立体を含めた構造研究を行った。更に、5種のフラボノイド系配糖体を単離構造を明らかにした。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

1 日本生薬学会第53回年会 (2006年9月、埼玉)

「寒喘祖帕顆粒」一酸化窒素産生能の検討

○ 哈力沙・艾山、馬場正樹、角 咲貴子、奥山 徹

2 日本薬学会第127年会 (2007年3月、富山)

「寒喘祖帕顆粒」方剤および構成生薬蕁麻子の活性成分の研究

○ 哈力沙・艾山、馬場正樹、奥山 徹

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

新疆ウイグル伝統薬物の研究

研究者氏名 哈力沙・艾山 (Halisha, Aishan)
中国所属機関 新疆医科大学中医学院中西医结合教室助教
日本研究機関 明治薬科大学大学院天然薬物教室
指導責任者 教授 奥山 徹

要 旨

新疆ウイグル自治区は中国西北地方に位置し、気温の変化が大きく、少雨で日照時間が長く、空気は乾燥し、砂漠が多い。このような厳しい自然環境により、呼吸器疾患の発病率が高く、大きな社会問題となっている。

90年代から、一酸化窒素(Nitric Oxide, NO)が気管支喘息、肺炎、慢性閉塞性肺病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)など多くの気道炎症性疾患の病態に深く関わっていることが明らかにされている。

ウイグル伝統薬として、喘息、咳嗽、関節炎、リウマチなどに使用されているものの、これまで成分および生物活性の研究が行われていない蕁麻子(*Urtica cannabina* L. の果実)に着目し、その成分検索およびNO産生抑制効果を検討した。また、蕁麻子をはじめ9種の生薬から構成されているウイグル伝統方剤「寒喘祖帕顆粒」が主に咳、痰、喘息を伴う慢性気管支炎などの治療に用いられていることから、本方剤およびそれぞれの構成生薬について、同様にNO産生抑制効果に関する研究を行った。

更に、日本に生育しているイラクサは日本での伝承薬・民間薬としての用途と共に、地方によっては春の山菜として愛用している。日本で入手したイラクサについても検討した。

Key Words: ウイグル伝承薬物；蕁麻子；*Urtica cannabina*；イラクサ；寒喘祖帕顆粒；慢性閉塞性肺疾患(COPD)；一酸化窒素(NO)産生抑制

結 言

新疆ウイグル自治区は中国の北西部、ユーラシア大陸の内陸部に位置し、モンゴル、ロシア、カザフスタン、パキスタン、キルギスタン、タジキスタン、アフガニスタン、パキスタン、インドなどと国境を接している。新疆ウイグル自治区の総人口は約1800万人(2000年の中国の国勢調査)。総人口に占めるウイグル人の割合は約45%を占める。多民族国家で、他に漢族、カザフ族など12種族から構成されている。

100歳以上に対するウイグル人の割合は93%で、ウイグル人の占める割合が最も多いホータン地区では、長寿国日本の平均を上回っている。

ウイグル医学は典型的な「医食同源」の考え方に基づいている。新疆がシルクロードに沿った地域に位置する関係上、いろい

ろな民族の伝統医学が合わさって形成され、体験と実践を根底とした理論で体系づけられた医学である。ウイグル人がイスラーム教であるため、ウイグル医学は理論体系上ではアラビア医学の系統に属している。

治療は、過剰になった悪い体液を無毒化する薬剤（塾成剤）をまず与え、次に無毒化した過剰な体液を排泄する薬物（瀉剤）を投与する。この体液のバランスを大切に診断する。視診、脈診、触診などの身体所見を行い、次に乾、湿、熱、寒などの観点から診断／薬物を処方する。治療としては、植物、動物、鉱物などによる薬物療法に加えて、薬浴、あるいは砂浴療法も行う。

ホータン市にあるウイグル病院では400種以上の生薬が使われているが、外国からの輸入は約140種程度で、ホータン産の種類が多いのがこの病院の特徴である。

奥山教授は新疆医科大学を訪問し、共同研究の打ち合わせを行うと共に、哈力沙・艾山 (Halisha, Aishan) の研究／研修状況を報告した。更に、タクラマカン砂漠のオアシス都市、ホータン (和田) でウイグル伝承薬物の採集、収集を行った。

呼吸器系疾患に用いられるウイグル伝統生薬及び方剤

生薬：蕁麻子 「ウイグル薬誌」1999年版より

基原：*Urtica cannabina* L. (イラクサ科Urticaceae)の果実

薬効：鎮咳、活血、利尿薬、嗽咳、喘息、関節炎、リウマチ、早漏等

方剤：『寒喘祖帕顆粒』

【処方】小茴香 125 g 芹菜子 125 g 神香草 75 g 玫瑰花 75 g

芸香草 75 g 蕁麻子 70 g 鉄線草 75 g 胡芦巴 75g

甘草 70 g

以上の生薬を抽出したエキスに賦形剤を適量加えて、顆粒1000 gとする。

【効能・主治】 鎮咳、去痰、温肺止喘、急性感冒、寒性咳嗽、喘息。

【用法・用量】 内服、一日二回、一回1包 (12 g)。

研究方法

1. 蕁麻子の成分検索

蕁麻子 8.5 kg を MeOH で抽出し、そのエキスを減圧下濃縮後、朝比奈式連続抽出器にて水に懸濁させて n-hexane で分配抽出し、n-hexane 可溶部を得た。以下、AcOEt、n-BuOH で同様の操作を行い、それぞれの可溶部を得た。蕁麻子の AcOEt 可溶部からメガスティグマン系化合物 1, 2 を単離し、CD helicity 則、改良モッシャー法を用い、立体を含めた構造研究を行った。また、フラボノイド配糖体 3-7 を単離し、それぞれを同定した (Fig. 1.)。蕁麻子からこれらの化合物の単離は初めてである。

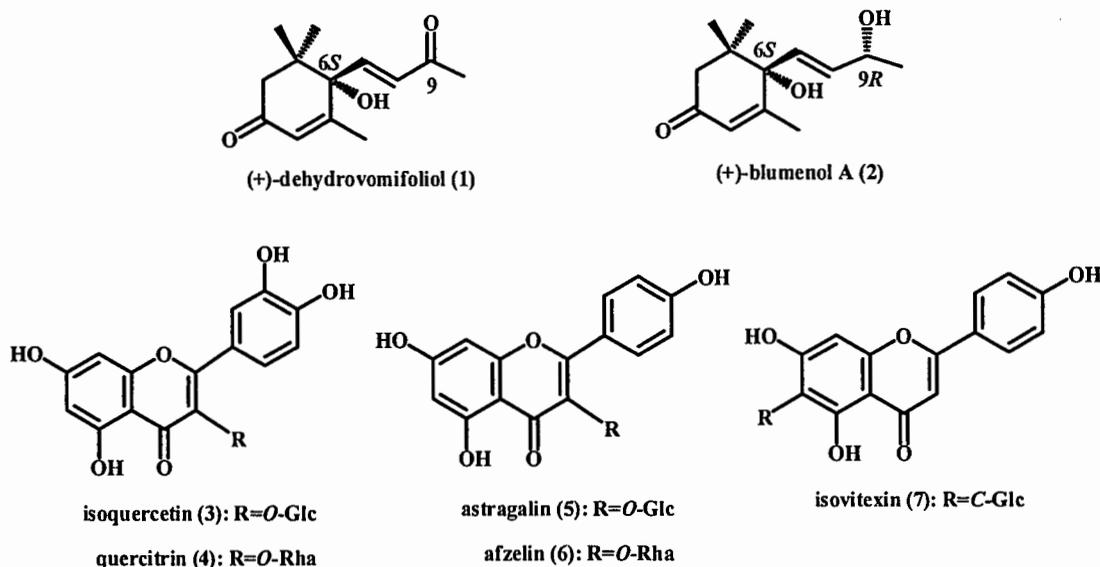


Fig. 1. Structures of Compounds 1-7

2. 蕁麻子の一酸化窒素(NO)産生抑制効果の検討

1. で得た蕁麻子のエキス、および各可溶部について、RAW264 細胞に対する NO 産生抑制能・細胞障害性の測定を行った。AcOEt 可溶部がコントロール比 15.4%とポジティブコントロールのアミノグアニジンより強い NO 産生抑制活性を認めた。n-hexane 可溶部は 4.7%と強く抑制したものの、細胞の生存率は 62.0%と細胞障害性を示した(Fig. 2.)。

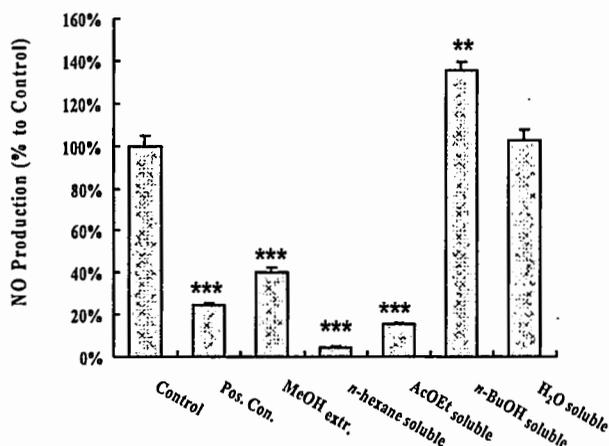


Fig. 2. Inhibitory Activities of the Extracts of *U. cannabina* on NO Production.

RAW264 was cultured with test samples (50 μ g/mL) or positive control (Pos. Con.: Aminoguanidine 250 μ M) for 24 hr, and NO contents in the culture supernatants were measured.

Each value represents the mean \pm S. D.

** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.001$, by t-test. \$: Viability% < 80%.

3. 「寒喘祖帕顆粒」方剤および構成生薬の一酸化窒素産生抑制効果の検討

「寒喘祖帕顆粒」の処方量を参考にして、処方量の 1/10 量で自家製剤を作り、AcOEt、MeOH で順次加熱還流抽出した。また、9 種の構成生薬を同様な方法で抽出を行った。それぞれのエキスについて、NO 産生抑制能・細胞障害性の測定を行った。いずれも AcOEt エキスが有意な抑制活性を示し、特に自家製剤(5.0%)、蕁麻子(2.0%)、神香草(4.3%)、小茴香(8.1%)、胡芦巴(4.5%)、芸香草(17.3%)はポジティブコントロールのアミノグアニジンより強い活性を認めた。なかでも蕁麻子は MeOH エキスにおいても同濃度で 49.9%と比較的強い活性を認めた。また、芹菜子、甘草、鉄線草はそれぞれ 2.6%、1.6%、3.4%と強く抑制したものの、細胞の生存率は 64.0%、14.6%、13.7%と細胞障害性を示した(Fig. 3.)。

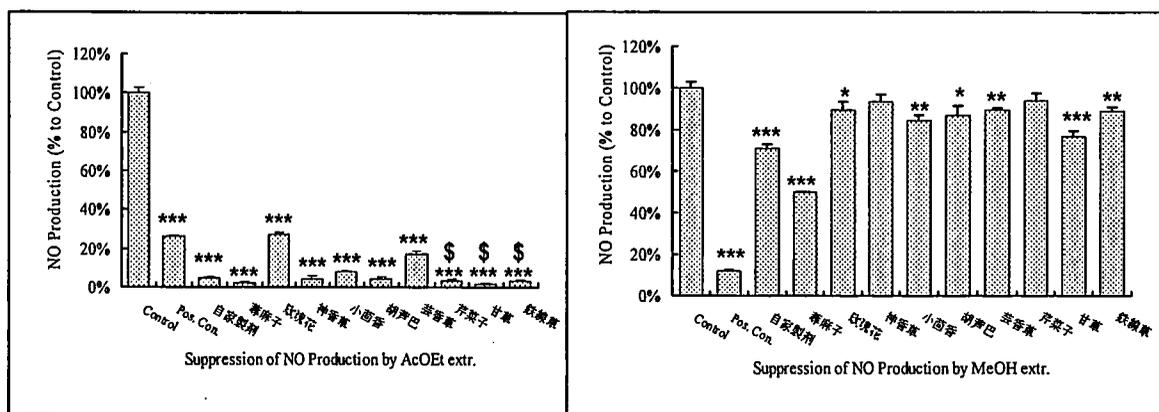


Fig. 3. Inhibitory Activities of the Extracts of “Han Chuan Zu Pa Ke Li” and Each Component on NO Production RAW264 was cultured with test samples (50 μ g/ml) or positive control (Pos. Con. Aminoguanidine 250 \cdot M) for 24 hr, and NO content in the culture supernatants were measured. Each value represents the mean \pm S. D. * ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001, by t-test. \$: Viability%<80%.

結果・考察

以上のように、蕁麻子の研究は初めてであり、メガスティグマン系の化合物2種、フラボノイド5種の単離およびNO産生抑制効果を認めたことは大変興味深い。また、蕁麻子を含む「寒喘祖帕顆粒」方剤に強いNO産生抑制効果を認めた。呼吸器疾患の西洋医学の治療薬の中で、抗炎症薬である吸入ステロイド薬は全身性の副作用がある。これに対して、「寒喘祖帕顆粒」を併用することで、諸症状の緩和、炎症の病態改善により、吸入ステロイド薬の用量、使用回数を減らせるものと期待できる。今後さらなる蕁麻子の分画を進め、活性物質を探索して行く予定である。

更に、「寒喘祖帕顆粒」の蕁麻子以外の構成生薬の活性成分の検索を行うと共に、慢性閉塞性肺疾患（COPD）に有効なウイグル伝承薬物の研究開発を行う予定にしている。

参考資料

本研究は、哈力沙・艾山が日本生薬学会、日本薬学会、明治薬科大学大学院修士論文、並びに指導教官の奥山が講演会で紹介を行った。

- 1 (日本生薬学会；2006年9月；埼玉)
- 2 (日本薬学会；2007年3月；富山)
- 3 「シルクロードにロマンを求め新疆ウイグルの恵を味わう」
(2007年12月15日「うけら会」講演会；東京都薬用植物園)
- 4 「シルクロードにロマンを求めて甘草属植物の現地調査を中心に」
(2008年2月24日；日日本薬用植物友の会講演会；仙台)
- 5 「新疆ウイグル伝統薬物蕁麻子及び“寒喘祖帕顆粒”方剤の一酸化窒素(NO)産生抑制効果」(哈力沙・艾山；明治薬科大学修士論文)

作成日：2008年3月20日