

2008年度 共同研究等助成事業報告集

財団法人 日中医学協会

2008年度共同研究等助成事業報告集目次

1. 調査・共同研究

山崎 浩	中国青海省におけるエコノコックス症：プロテインチップを用いた早期診断バイオマーカーの検索	1
喜多 和子	中国医療における水の安全：環境因子のヒトへの有害性を高感度で検出する方法を用いる安全性評価	7
島 正之	中国における自動車排出ガスの健康影響：北京オリンピック開催時の大気汚染状況の変化との関連	1 3
余 福勲	SARS(新型肺炎)の血清学的診断法確立並びに血清免疫学的研究	1 8
市原 学	工業ナノマテリアルの健康影響に関する調査研究	2 4
菅内 文中	B型肝炎ウイルス(HBV)組換え遺伝子型の臨床的およびウイルス学的特徴の解析	2 9
鈴木 一幸	日中間におけるB型肝炎ウイルス(HBV)による急性肝炎・劇症肝炎の病態の差異	3 4
安井 孝周	尿路結石に特徴的な一塩基多型による人種差の検討	3 8
洪 光	唾液分泌増強作用を有する生薬成分配合義歯安定剤に関する研究	4 3
三宅洋一郎	アテロームplaque形成の初期段階におけるPorphyromonas gingivalis HUの役割についての解析	4 9
水上 元	夏天無アルカイドの品質規格と薬理作用に関する研究	5 4
関水 和久	抗インフルエンザウイルス作用をもつ化合物の開発	5 9

2. 中国人研究者・技術者招聘

村田	真理子	Epstein-Barrウイルス感染上咽頭癌発症におけるDNAメチル化と酸化ニトロ化ストレスの役割解明	6 2
森	則夫	新生血管構築による新たな統合失調症治療法の開拓と微小循環動態	6 7
桂木	猛	ATPのオートクリン/パラクリン放出とその痛みシグナルへの関与	7 2

3. 日本人研究者派遣

田村	友秀	血液サンプルを用いた上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異の検出及び臨床研究の意見交換	7 6
----	----	--	-----

4. 在留中国人研究者

王	天英	神経回路再構築におけるCI-ホメオスタシスの役割	7 9
叢	莉蔓	シリカコーティング量子ドットによる癌のセンチネルリンパ節生検と分子画像診断	8 5
孫	媛	急性腎不全における尿細管細胞の抵抗性獲得機序の検討	9 0
郭	文智	ヒト細胞においてユビキチン様蛋白質SUMO-3を介するX線応答反応における分子メカニズム	9 6
王	春霞	新規緑内障原因遺伝子の探索と変異・機能解析—家系の収集、リンケージ解析、変異スクリーニング—	100
鄧	穎氷	肝癌においてDNAメチル化により遺伝子を網羅的に解析する	105
危	英	人参加水分解産物トリテルペン誘導体の抗HIVproteaseおよび抗HCVprotease作用に関する研究	109
孫	皎	太極拳を取り入れた認知症予防プログラムの開発に関する研究—日本と中国における高齢者の心身に与える影響の比較—	112

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成 21 年 3 月 7 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： 山崎 浩



所属機関名： 国立感染症研究所

所 属 部 署： 寄生動物部第二室 職 名： 室 長

〒 162-8640

所 在 地： 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話： 03-5285-1111 内線： 2200

1. 助 成 金 額： 1,000,000 円

2. 研究 テーマ

中国青海省におけるエキノコックス症：プロテインチップを用いた早期診断バイオマーカーの検索

3. 成 果 の 概 要 (100字程度)

ヒトのエキノコックス症(単包虫症)の早期診断のためのバイオマーカーを検索するために、中国青海省の単包虫症患者と健常者、各々20、計 40 の血清を対象にプロテインチップ解析を行なった。その結果、単包虫症患者群と健常人群との間に診断バイオマーカー候補分子が見出された。

※発表論文等

4. 研 究 組 織

日本側研究者氏名： 山崎 浩 職 名： 室 長

所属機関： 国立感染症研究所 部署： 寄生動物部第二室

中国側研究者氏名： 王 虎 職 名： 所 長

所属機関： 中国・青海省地方病予防抑制所 部署：

中国青海省におけるエキノコックス症：プロテインチップを用いた早期診断バイオマーカーの検索

研究者氏名 山崎 浩
所 属 機 関 国立感染症研究所 寄生動物部第二室 室長
共同研究者名 王 虎
所 属 機 関 中国青海省地方病予防抑制所 所長

要 旨

ヒトのエキノコックス症には多包虫症と単包虫症があり、いずれもエキノコックスと呼ばれる幼虫の寄生によって引き起こされる。ヒトは虫卵を経口摂取することによって感染し、自覚症状が出現するまでに、通常、数年～20 数年を要する。この間、無症状で経過するので、発症した時には病巣が進行して難治性となる。とくに、多包虫症は致死性である。しかしながら、感染早期に発見されれば、薬物治療や外科手術によって完治し、予後も良い。エキノコックス症の検査診断は、画像検査の他に、血清診断法が普及しているが、血清検査法による感染初期患者の発見は難しい。そこで、エキノコックス症感染初期患者の血清タンパク質を網羅的に調べ、エキノコックス症早期患者に特徴的に検出される、あるいは減少・消失するような分子を捕捉することができれば、それはエキノコックス症の早期診断バイオマーカーとして臨床的に応用することができる。プロテインチップ (ProteinChip) はそのような分子の検出に最も適した新しい解析技術である。

本研究では、中国青海省チベット族自治州のエキノコックス症流行地域における疫学調査で得られた単包虫症患者と健常者(非感染者)の血清を用いてプロテインチップによるエキノコックス症の早期診断に役立つバイオマーカーの検索を行った。

その結果、単包虫症患者と健常人との間で検出された 33 種類のバイオマーカー候補のうち、両群で最も大きなシグナル強度差を示した分子について、その性状を解析した。

Key Words エキノコックス症、単包虫症、プロテインチップ、早期診断バイオマーカー

緒 言:

ヒトのエキノコックス症には多包虫症と単包虫症があり、それぞれ多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*) と単包条虫 (*Echinococcus granulosus*) の幼虫 (= 包虫、エキノコックス) が寄生することによって引き起こされる寄生虫感染症である。前者はユーラシア大陸(わが国では北海道に分布)と北米など北半球で流行する。後者は世界の遊牧・牧畜地域に広く蔓延している。ヒトはこれら条虫卵を偶発的に経口摂取することによって感染し、自覚症状が出現するまでに、通常、数年～20 数年を要する。この間、無症状で経過するので、発症した時には病巣は進行し、診断治療が遅れることとなり難治性となり、とくに多包虫症は致死性である。

申請者らの研究グループは、中国疾病予防センター・上海寄生虫病研究所ならびに青海省地方病予防抑制所

との共同研究として 2005 年より青海省のチベット族住民、ならびに野生動物を対象にエキノコックス症に関する研究を行ってきたが、これまでの調査研究から、住民 10 人に対して 1 人がエキノコックス症に感染しているという、極めて深刻な状況であることが明らかになってきた。流行地は都市部からのアクセスが悪く、医療設備の不備、またエキノコックス症に関する住民の医学的知識の欠如などにより、その対策は遅々として進んでおらず、感染状況は年々悪化の一途を辿っている。

エキノコックス症は難治性疾患ではあるが、感染早期に発見されれば、薬物治療や外科手術による治療が効を奏し、予後は良い。エキノコックス症では、その病巣は肝臓を主体に、肺や脳、骨などに形成されるために、病態の進行に伴って、患者血清中のタンパク質あるいはペプチドの発現様態に変化が起きる可能性が考えられる。現在、検査診断法として、画像検査の他に、血清中の抗体検出に基づく血清診断法が普及しているが、血清検査法による感染初期患者の発見は難しい。そこで、エキノコックス症感染初期患者の血清タンパク質を網羅的に調べ、エキノコックス症早期患者に特徴的に検出される、あるいは減少・消失するような分子を捕捉することができれば、診断バイオマーカーとして臨床応用することができる。プロテインチップ技術はそのような分子の発現様態や検出に最も適した最新の解析法であることから、エキノコックス症早期感染者の早期発見に役立てるバイオマーカーを検索し、それを同定することが本研究の目的と動機である。

対象と方法:

1. 血清サンプルの採取: 解析に用いたヒト血清は、中国・青海省玉樹チベット族自治州囊謙県(Nangqian)のエキノコックス症流行地において、2007年に中国青海省地方病予防抑制所のスタッフによって行われた住民検診で採取されたものである。住民検診に際して、研究目的を住民に説明し、住民の同意を得た。結果的には 1,329 名が受診し、受診者の氏名、年齢、性別、民族、職業、病歴などを聞き取り、超音波診断装置により、腹部検査を行った。超音波検査受診者のうち、エキノコックス抗体検査を希望する者については採血を実施した。
2. 単包虫患者の診断基準: 超音波腹部検査所見による単包虫症患者の診断は WHO による診断基準に準じて行い、その中から、早期と考えられる CL 型および CEI~CEII 型を選んだ。エキノコックス抗体検査は、単包虫の包虫液から精製した血清診断抗原(Antigen B)を用いた酵素抗体法(ELISA)を用いて実施した。また、血清抗体検査(ELISA)でエキノコックス症陽性と診断された者についてはエキノコックス症診断キット(LDBIO 社製 Echinococcus IgG Western Blot)を用いて精査した。
3. プロテインチップ解析に用いた血清サンプル: 腹部画像検査で単包虫症と診断された 36 名の患者のうち、エキノコックス抗体陽性者は 23 名、抗体陰性者は 13 名であった。この中から、民族はチベット族とし、早期の単包虫症と考えられる患者(男性 10 名、女性 10 名)を選んだ。これらの患者と性別、年齢がマッチした健常人を男女それぞれ 10 名ずつ対照群血清として選んだ。年齢構成は単包虫症患者が 9~40 歳、健常者は 8~35 歳であった。
4. プロテインチップシステムによる解析: 前述の被検血清は変性バッファー(9 M urea/2% CHAPS/50 mM Tris-HCl, pH 9.0)で前処理し、その遠心上清をプロテインチップ解析に用いた。今回は、陽イオン交換チップ

(CM10)と陰イオン交換チップ(Q10)を用いて、バイオマーカー分子のチップへの結合、洗浄、溶出条件を検討した。プロテインチップへの結合実験に先立って、陽イオン交換チップおよび陰イオン交換チップ表面をそれぞれ 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.0 と 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 で平衡化し(150 μ L/spot)、次いで、前処理した血清(10 μ L)をチップに吸着させた。チップの洗浄を 3 回繰り返す、さらに 50%飽和シナピン酸(sinapinic acid, SPA)をチップ上に添加し、乾燥させた。質量分析計によるバイオマーカーの検出はチップ上に吸着された成分を ProteinChip SELDI-TOFMS system (BioRad Laboratories)により行い、測定範囲は低分子領域として 0~100,000 m/z (Focus mass/SPA-Low; 6,500)、また高分子領域として 10,000~200,000 m/z (Focus mass/SPA-High; 20,000)とした。

5. データ解析: 得られたスペクトルデータは ProteinChip Data Manager Software を用いて解析した。バイオマーカーの候補分子として、単包虫症患者群と健常人群で検出されたスペクトルのピーク比(S/N)が 2.5 以上のものを解析の対象とし、2 群間の有意差検定は Mann-Whitney u-test (独立 2 群比較)で検討し、 $p < 0.05$ を有意差の目安としてバイオマーカー候補を抽出した。
6. バイオマーカー候補分子の精製と同定: バイオマーカー候補分子を同定は次の 4 つの工程で実施した。第1工程は精製条件のスクリーニング、すなわち精製条件について、陽イオン交換チップ、陰イオン交換チップを用いた場合の吸着バッファー、溶出バッファーの pH と塩濃度のプロテインチップ上で候補分子の最適吸着条件、および溶出条件を検討した。第 2 工程と第 3 工程では、バイオマーカー候補分子の 2 段階の精製を行った。血清中のバイオマーカー候補分子を超高速分析用イオン交換カラム(HPLC TSK-Gel Amido-80, 1 x 100 mm)と超高速分析用逆相カラム(HPLC TSK-Gel Super ODS, 1 x 50 mm)を用いて精製した。次いで、最終精製した標品はトリプシン分解し、得られたペプチド断片を質量分析計で分析し、そのアミノ酸配列と分子サイズから想定されるタンパク質を同定した。

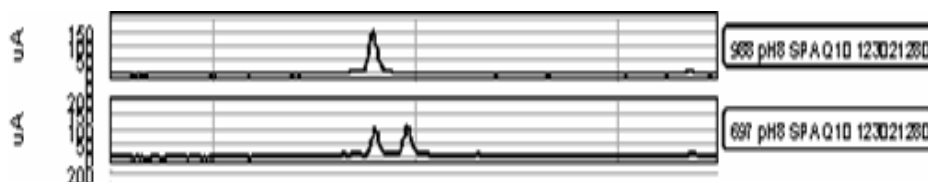
結 果:

1. バイオマーカー候補分子の抽出: 単包虫症患者と健常人の性別、年齢、民族をマッチングさせた血清サンプルについて陰イオン交換チップと陽イオン交換チップに結合したバイオマーカー候補分子の ProteinChip SELDI-TOFMS system を用いて検索を行った結果、単包虫症群と健常人群の 2 群間で検出されたスペクトルピークのうち、ピーク強度差が 2 倍以上のものが 5 個、2 倍未満のものが 28 個、計 33 個のバイオマーカー候補シグナルが得られ、表1にはそのうちの 5 つのバイオマーカー候補ピークを示した。陰イオン交換チップを用いた時にのみ検出されたピークのうち、Fig. No. 3 のピークはその強度差が 14 倍と最も大きかった。単包虫症患者でのみ検出される、あるいは増加するスペクトルピークはなかったが、ピーク強度差が最も大きかった Fig. No. 3 を EGHU と名づけ、より詳細な解析を行った。興味深いことに、この EGHU は健常者でより高頻度に検出され、単包虫症患者ではむしろこのスペクトルピークは低下、もしくは消失する傾向が見られた(図1)。

表 1. バイオマーカー候補シグナルピークの一覧

ProteinChip Condition	p-value	2 群間のピーク強度の差	対照群に対する変化傾向	備考	Fig. No.
陰イオン交換 pH8 /Low	0.008	14.0 倍	減少		3
陰イオン交換 pH8 /Low	0.007	2.2 倍	減少	m/z 5106 と同一タンパク質の可能性あり 同 タンパク質の可能性あり	4
陰イオン交換 pH8 /Low	0.005	2.1 倍	減少		5
陰イオン交換 pH8 /Low	0.001	2.2 倍	減少		6
陰イオン交換 pH4 /Low	0.007	2.0 倍	減少		7

図 1. 陰イオン交換
チップ (Q10) を使用
し、50 mM Tris-HCl,
pH 8.0 の条件下に



おけるスペクトルピークの比較。上段:単包虫症患者血清。下段:健康人血清。単包虫症患者では、右側のスペクトルピークが低下、または消失する傾向が見られた。

- EGHU の精製条件と同定: EGHU の分子同定を行うために、その精製条件を検討した。陰イオン交換カラム(Q Sepharose)で pH 4-pH 9 で吸着し、pH 8 においては、0.1 M NaCl 条件下で強く吸着したことから、EGHU は疎水性の高い物質であると考えられた。そこで、陰イオン交換カラムで分画し、有機溶媒、もしくは 90% アセトニトリル/0.1% TFA で溶出された分画を質量分析計で分析したところ、EGHU であることが確認された。この Q Sepharose の分画をさらに逆相 HPLC と順相 HPLC を用いてさらに精製し、質量分析を行ったところ、逆相 HPLC の分画には EGHU 以外の混入はなく、単一シグナル(Fr 30)として精製された(図 2)。この分画をトリプシン消化したところ、EGHU 由来の 2~4 本のペプチド断片しか検出されなかったことから、高純度のバイオマーカー候補を精製することが出来た。現在、その同定作業を行っている。

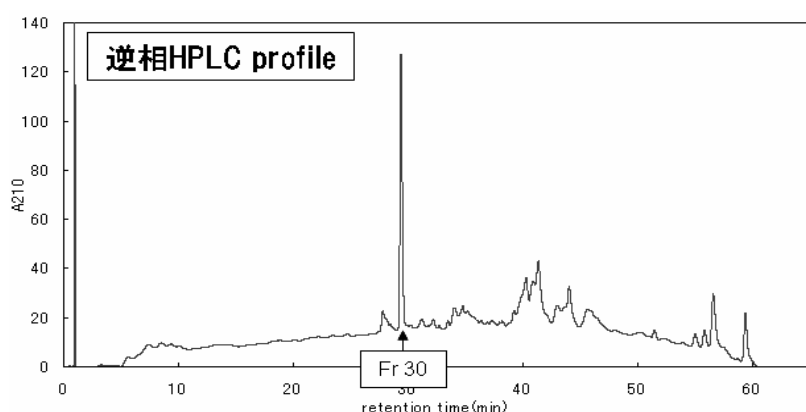


図 2. 超高速分析用逆相カラム Q Sepharose によるバイオマーカーの精製。
カラム: TSK-Gel Super ODS (1 x 50 mm)
流速: 53 μ L/min
分画: 53 μ L/min/Tube
溶媒 A: 0.1% TFA
溶媒 B: 90% アセトニトリル/0.1% TFA

考 察:

本研究では、エキノコックス症早期診断に有用なバイオマーカーを検索し、臨床に応用することを目的として研究を行った。エキノコックス症の中で、単包虫症は超音波画像所見によって概ね、病態の進行状況が把握できることから、感染早期患者の特定が可能であり、得られたデータ解析が多包虫症に比べて単純化することが可能と考え

られたので、本研究では単包虫症に焦点を絞ってバイオマーカーを検索した。今回は 2 種類のイオン交換チップを用いて、それらに結合するバイオマーカーを検索し、最終的には EGHU という分子がバイオマーカー候補として抽出されたが、この分子はむしろ健常人で高いシグナルピークとして検出され、単包虫症患者ではそのシグナルが低下、もしくは消失する傾向が見られた。プロテインチップ技術を用いて診断用バイオマーカーも検索が行われた寄生虫症として、羊の肝蛭症¹⁾と豚の有鉤囊虫症²⁾が報告されているが、ヒトのエキノコックス症に関する早期診断にプロテインチップ技術を応用した報告はない。今後は、この EGHU がエキノコックス症早期診断のマーカーの一候補として有用であるか否かについてより多くの血清サンプルを用いた検討が必要と考えられた。また、EGHU の機能や単包虫症における臨床的意義についても検討する必要性が考えられた。

参考文献:

1. Rioux MC, Carmona C, Acosta D, Ward B, Ndao M, Gibbs BF, Bennett HP, Spithill TW. Discovery and validation of serum biomarkers expressed over the first twelve weeks of *Fasciola hepatica* infection in sheep. International Journal of Parasitology 38:123-136, 2008.
2. Deckers N, Dorny P, Kanobana K, Vercruysse J, Gonzalez AE, Ward B, Ndao M. Use of ProteinChip technology for identifying biomarkers of parasitic diseases: the example of porcine cysticercosis (*Taenia solium*). Experimental Parasitology 120: 320-329, 2008.

作成日:2009 年 3 月 10 日

財団法人日中医学協会

2008 年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成 21 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： 喜多 和子



所属機関名： 千葉大学大学院医学研究院

所属部署： 環境影響生化学 職名： 講師

〒260-8670

所在地： 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

電話： 043-226-02041 内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国医療における水の安全性：環境因子のヒトへの有害性を高感度で検出する方法を用いる
安全性評価

3. 成果の概要（100 字程度）

日本や中国の医療機関へ供給されている水道水とその供給源である河川水などの自然環境水のヒトへの安全性を、培養ヒト細胞を用いた生命科学検査により検証した。限定された地域に関する調査ではあるが、必ずしも安心という水質レベルではないことが示唆された。

※発表論文等

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 喜多 和子 職名： 講師

所属機関： 千葉大学大学院医学研究院 部署： 環境影響生化学

中国側研究者氏名： 董 玫 職名： 教授

所属機関： 河北医科大学 部署： 基礎医学院法医学

中国医療における水の安全性：環境因子のヒトへの有害性を高感度で検出する方法を用いる安全性評価

研究者氏名 喜多和子
所 属 機 関 千葉大学大学院医学研究院・講師
研究協力者 呂 颯, 宋 丹, 胡高峰, 孫 卓, 陳仕萍
中国側共同研究代表者名
董 玫
所 属 機 関 河北医科大学・教授

要旨

水に関する視点から人々の健康を守ることを目標とし、日本や中国の医療機関へ供給されている水道水とその供給源である河川水などの自然環境水について、ヒトへの安全性を培養ヒト細胞を用いて検証した。さらに、飲用者の血清における毒性物質の存在の可能性を検討するため、河川水や血清の生命科学的検査法を立案し活用した。種々の化合物に致死高感受性の培養ヒト細胞であるRSa細胞を用い、MTT法を用いて検査した。検査資料である水や緩衝液で希釈した血清をカラムクロマトグラフィー法で濃縮し、その濃縮液を培養液中へ添加することにより細胞生存率を測定に供した。その結果、水道水用取水口近辺での江戸川河川水による細胞生存率が多摩川水より低い値であった。また、1年間の月別の測定値は、両河川水ともに、生存率が夏期に低かった。多摩川水では4月でも低値を示した。一方、中国河北省滹沱川については、浄水場近辺の河川水の値が低く、その一因に上流域ダムの水の悪化が示唆された。なお、血清については、検査した10名の中で、1名において、生存率の低下レベルが大であるものが検出された。今後の精査を必要とすることが示唆された。以上の結果から、日本と中国における限定された地域での飲用水源地での河川に関する調査ではあるが、必ずしも安心という水質レベルではないことが示唆された。

Key Words 水質, 河川水, 培養ヒト細胞, 生命科学検査

緒言：

地球は表面の3分の2が水に覆われているが、人が直接使用できる水は、全体のたったの0.0001%に過ぎない(1)。そのように貴重な水の水質を管理して保全することは大変重要なことである。日本の水道水源は約7割が地表水で、残りの3割は伏流水や地下水等である。その地表の水源の中には河川水があり、我々が毎日使っている水道水の重要な取水源となっている。水道水は河川水を取水口から引き込み、浄水場で浄化後供給されている。

一方、中国における河川水による水道水の供給源の構成は日本と酷似している。河川上流域にダム湖を有し、中流域での取水である。河北省内を流れる滹沱川については、取水口の上流域に黄壁荘ダムを有し、さらにその上流域に岡南ダムを有している。日本の多摩川では、上述の取水口より上流域に多摩湖(小河内ダム)を有し、江戸川では、その河川水の供給源領域に複数のダムを有している。

水道水の重要な水源として利用される河川水の水質は、ヒトの健康にも直接影響すると考えられる。我々が飲用水や料理水として毎日使っている水道水は、本当に安全かという問題がある(2)。過去には、河川水の水質汚濁により、ヒトの健康被害が指摘されてきている。多摩川の水を例にすると、1950年代後半からの高度成長期に向けて、汚染が激しくなってきた。特に、「アンモニア性窒素」の濃度は1960年代に入ると激増し、同時に、BOD値も急上昇した。1960年後半～1970年代には、魚類の生息限界のBOD値までに達していた。1970年9月19日朝日新聞の一面トップでは、多摩川の水を飲むとカシンバック病になるのでは？という疑いの記事が発表されたが、当時、水俣

病やイタイタイ病のいわゆる公害病も注目されていたことから大騒ぎとなった。カシンベック病は、直接死に繋がることはないが、骨の成長期に軟骨に異常が出るもので、成長と共に「骨多孔症」という症状が見られ、骨が脆弱になる。また、関節部分が竹の節のようにゴツゴツと膨れてしまい、外見上目立ってしまう疾病である。その他、多摩川の水質汚濁には、石炭酸の流出により水道水に異臭が発生したという例や、多摩川へのシアン流出により玉川浄水場が 34 時間取水停止という例がある。江戸川にも漁業被害という例があった。都市化が進行した高度成長期以降、江戸川の水質は急速に悪化した。原因のひとつが、東京のベッドタウン化した地域を流れる 16 の支流の水質悪化であった(3,4)。

現在の中国においては、水質悪化と共に水量の枯渇という深刻な問題が発生している。本研究ではこのような多摩川や江戸川の歴史を配慮しつつ、また、中国でも同様な歴史をくりかえさないためにも、病院で使用されている水道水の供給源としての河川水については、取水口周辺とその上流域での河川水の水質を独自の生命科学検査法で調査することとした。

対象と方法：

1. 水サンプルの採取

日本においては、各月別の水サンプルを得た。採水場所は多摩川の小作浄水場近くと、江戸川の金町浄水場近くとした。また、千葉県内と東京都内の水道水も、病院や家庭などで採取した。中国においては、董玫河北医科大学教授が滹沱川の水や水道水を採取した。採水した水サンプルを -20°C で保存した。

2. 水含有成分の濃縮

ペリスタポンプを用いて、水サンプル 250 ml をウォーターズの OASIS HLB カラム(1 ml)に 190 ml/h の流速で通過させ、水の中にある有機化合物を吸着させた。このカラムを 5%メタノール 2.0 ml で洗浄後、吸着成分を 100%メタノール 2.0 ml で溶出し、デシケーターで減圧乾燥後、DMSO 20 μl で溶かし、約 10,000 倍の濃縮サンプルとした。濃縮サンプルを -20°C で保存した。

3. MTT assay

様々な化合物に致死高感受性の培養ヒト細胞 R5a を用い、既報(5)の方法により細胞の生存レベルを MTT 法で測定した。いわゆる環境ホルモンの一種である bisphenol A あるいは濃縮サンプルを培養液中へ添加後、48 時間培養し、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) tetrazolium bromide)液を添加し、4時間後波長 570 nm で吸光度を測定した。

4. 血清とその成分の準備

検査希望者の血液について、日本においては、報告者所属の論理審査に基づき、インフォームドコンセントを施行の上、採取した。中国の人々については、中国において招携研究者が収集した。それぞれの施設において、通例の遠心操作法により、凝固層から解離した血清を得て、その血清に 100 倍量の平衡液を加えて、水と同様に血清成分の濃縮を行った。

結果：

1. Bisphenol A 処理細胞の生存率

Bisphenol A の濃度が 200 μM 以上に高くなると、生存率が下がり、500 μM 以上では細胞は殆んど生存しなかった(Fig. 1)。

2. 多摩川の水質検査の結果

多摩川の河川水は上流から下流にいくに従い、細胞生存率が低くなった(Fig. 2)。多摩川中流域の小作で行った定点観察では、4 月と 7 月に細胞の生存率が著しく低かった(Fig. 3)。

3. 江戸川の水質結果

江戸川の金町浄水場近辺で行った定点観察では、8月に細胞生存率が一番低くなった(Fig. 3)。

4. 中国検査の結果

上流の岡南ダム地域での河川水における生存率は90%と100%の間であったが、下流へいくに従い、多摩川と同様に低下した(表1)。

5. 中国人血清成分処理細胞の生存率

9名の血清で80%前後の生存率であったが、1名が70%より低値であった(Fig. 4)。

考察：

1. 水質検査

現在日本において設定されている水質基準は、人の健康の保護の観点から設定された項目と、生活利用上障害が生ずるおそれがないかという観点から設定された項目からなる。人の健康の保護の観点から設定された項目は、1番目の一般細菌から31番目ホルムアルデヒドまでの31項目がある(平成20年4月1日より、塩素酸が水質基準に追加されている)。また、生活利用上障害が生ずるおそれの有無の観点から設定された項目には、32番目の亜鉛及びその化合物から51番目の濁度までの20項目がある(6)。今回調査したbisphenol Aが環境ホルモン作用として存在するとされている濃度は100 μ Mよりも低い濃度である。従って、200 μ M以上で生存率低下が見られたことから、今回の水の検査で生存率が下がれば、生存に有害な因子が混入している可能性はある。

多摩川と江戸川の2つの河川水の結果を同一の図にして比べると、江戸川のほうが細胞の生存率が多摩川より低い傾向が見られた(Fig. 3)。また、季節の変化では、両河川水ともに、夏季に生存率が低くなることが示唆された。理由は不明であるが、河川流域では、夏期に除草剤などの使用が増えることが一つの可能性として考えられる。また、高温のため水質の悪化がすすむことが影響する可能性も考えられよう。一方、中国においては、中流ダム湖周辺での水質悪化が示唆され、その理由が、日本の両河川水の夏期における悪化と同じか否か問題となる。

2. ヒト血清検査

ヒト血清による細胞生存率への影響を見ることの最終的目標は、飲用水なかの毒性因子がヒト血液中に残存していることを推測する方策である。サイトカイン類など細胞の増殖を抑制する因子が血液中に存在することが、ある程度の生存率低下は予測される。しかし、極度に低い検体も存在していたことから、そのような内因的原因以外にも、日々飲用する水も含めて、特定地域で特定の時期に生存率低下が著しい場合、その原因を精査する必要があるとの示唆を得た。

参考文献：

1. 水の百科事典, 丸善株式会社, 2000, 2, 10.
2. 鈴木信夫, 喜多和子, 長谷川博之: 水から学ぶ健康の泉, 2008, 4, 26.
3. 関東甲信越: 日本の水環境 3, 日本水環境学会, 技報堂出版, 2000, 9, 25.
4. 高井雄: 水のなかの有害元素(元素をめぐって 4), 研成社, 1999, 4, 30.
5. Wano C, Kita K, Takahashi S, Sugaya S, Hino M, Hosoya H and Suzuki N, Protective role of HSP27 against UVC-induced cell death in human cells. *Exp. Cell Res.*, 298, 584-592, 2004.
6. 東京都水道局水質情報の水質基準
URA http://www.waterworks.metro.tokyo.jp/w_info/s_kijun1.htm

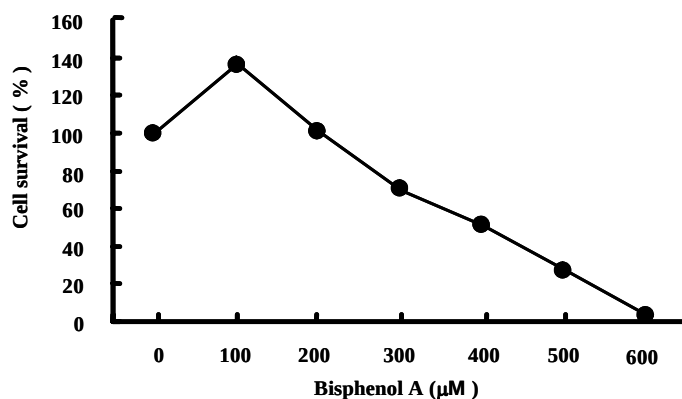


Fig. 1. Effects of bisphenol A on RSa cell viability. The survival rate of cells treated with distilled water samples was estimated as 100%.

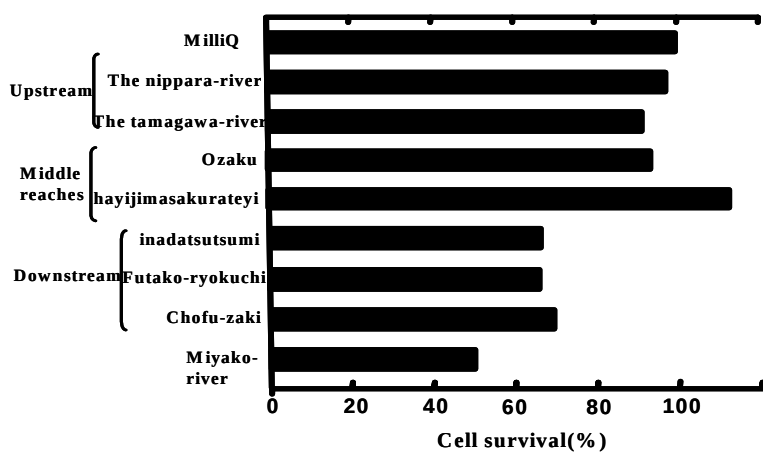


Fig. 2. Effects of water samples from various points of the Tamagawa river on RSa cell viability. The survival rate of cells treated with distilled water samples was estimated as 100%.

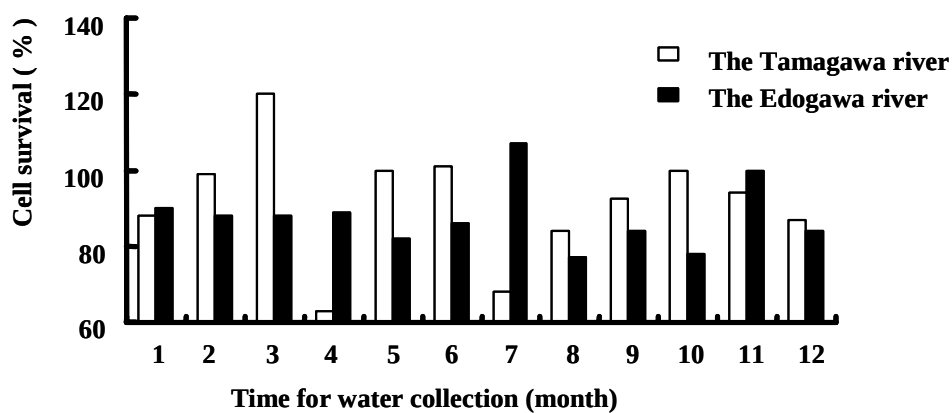


Fig. 3. Effects of the Tamagawa (Ozaku) river and Edogawa (Kanamachi) river water on RSa cell viability during one year. The survival rate of cells treated with distilled water samples was estimated as 100%.

表 1 日本の多摩川と中国の滹沱川の上流域における水質検査阻害率の比較

	多摩川	滹沱川
上流ダム	101%	96%
中流ダム	—	53%
ダム下流	90—60%	86—71%

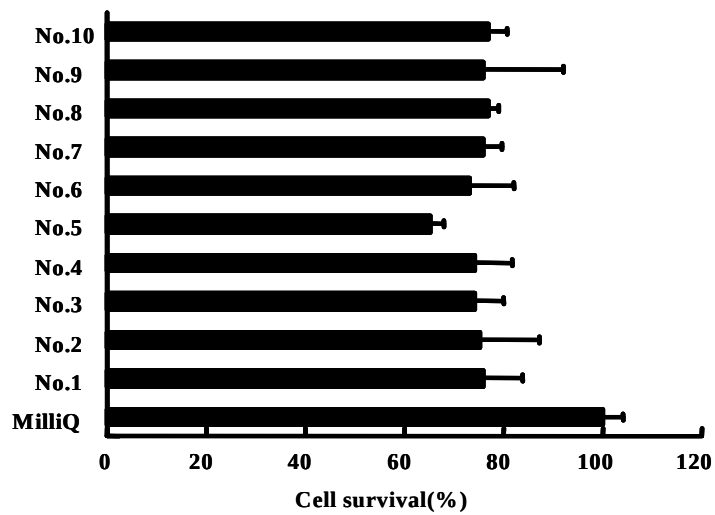


Fig. 4. Effects of serum from Chinese on RSa cell viability.

作成日:2009年3月10日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成21年 3 月 6 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： 島 正之 

所属機関名： 兵庫医科大学

所 属 部 署： 公衆衛生学 職 名： 教 授

〒 663-8501

所 在 地： 兵庫県西宮市武庫川町1-1

電話： 0798-45-6565 内線： 6565

1. 助 成 金 額： 1,000,000 円

2. 研 究 テ ー マ

中国における自動車排出ガスの健康影響

－ 北京オリンピック開催時の大気汚染状況の変化との関連 －

3. 成 果 の 概 要（100字程度）

北京における粒子状物質による大気汚染が住民の肺機能に影響を及ぼしている可能性が示された。

北京オリンピック開催中の大気中有粒子状物質濃度は大きく改善しており、肺機能への影響は観察されなかった。

※発表論文等

4. 研 究 組 織

日本側研究者氏名： 島 正之 職 名： 教 授

所属機関： 兵庫医科大学 部署： 公衆衛生学

中国側研究者氏名： 鄧 芙蓉 職 名： 講 師

所属機関： 北京大学 部署： 公共衛生学院

中国における自動車排出ガスの健康影響

— 北京オリンピック開催時の大気汚染状況の変化との関連 —

研究者氏名	島 正之
日本所属機関	兵庫医科大学公衆衛生学教授
研究者氏名	鄧 芙蓉
中国所属機関	北京大学公共衛生学院講師
共同研究者名	田村憲治(独立行政法人国立環境研究所), 宋曉明, 郭新彪(北京大学公共衛生学院)

要 旨

北京では2008年8月のオリンピック開催に伴って積極的な大気汚染対策が実施され、大気環境は大きく改善した。本研究では、北京オリンピック開催前(2008年5~6月)、開催中(8~9月)、開催後(10~11月)に、北京市の住民41名を対象に約2週間ずつ肺機能モニタリングを繰り返し実施して、大気中粒子状物質の変動が呼吸器系に及ぼす影響を評価した。

大気中の粒径 $10\mu\text{m}$ 以下の粒子状物質(PM_{10})濃度は、5~6月には高かったが、オリンピックが開催された8~9月には大きく改善した。しかし、10~11月には再びやや増加がみられた。5~6月には、大気中 PM_{10} 濃度が増加すると、男性では夜、女性では朝のPEF値の低下と有意な関連が認められた(大気中 PM_{10} 濃度 $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加あたりの変化量は、それぞれ $-7.36\text{L}/\text{min}$ 、 $-2.80\text{L}/\text{min}$)。8~9月には、男女ともにPEF値の変化と大気中 PM_{10} 濃度との関連はみられなかった。10~11月には、男性の夜のPEF値のみ大気中 PM_{10} 濃度の増加と有意な負の関連が認められた(大気中 PM_{10} 濃度 $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加あたり $-12.01\text{L}/\text{min}$)。

以上より、北京における粒子状物質による大気汚染が住民の肺機能に影響を及ぼしている可能性が示された。北京オリンピック開催中の大気汚染は大きく改善し、肺機能への影響は観察されなかった。

Key Words 自動車排出ガス, 粒子状物質, 大気汚染, 肺機能, 最大呼気流量

緒 言 :

中国では近年急速に自動車が増加し、北京をはじめとする大都市圏の幹線道路では渋滞が著しく、大気汚染が大きな問題となっている¹⁾。特に2008年の北京オリンピック開催に伴い、中国の大気汚染は国際的に関心が高まり、交通規制や建設工事の停止等の積極的な対策が実施され、大気環境は大きく改善した。本研究では、北京オリンピック開催の前後に住民を対象として肺機能モニタリングを繰り返し実施し、大気中粒子状物質が呼吸器系に及ぼす急性影響を評価し、大気環境の大きな変化と住民の肺機能に及ぼす影響との関連性について検討した。

対象と方法 :

北京大学医学部の周辺に居住する成人41名(男18名、女23名、50~72歳)を対象として、標準的な呼吸器症状質問票(ATSDLDに準拠)を用いて、咳、痰、喘鳴、喘息等の呼吸器症状、既往歴、家族歴、職業歴、喫煙等の生活環境因子の評価を行った。2008年5~6月、8~9月、10~11月には、1台ずつ電子式ピークフローメーター(Electronic PEF/FEV₁ Diary, Vitalograph社)を渡して、それぞれ約2週間ずつ連続して毎日朝と夜の1日2回、立位で最大呼気流量(PEF)と1秒量(FEV₁)の自己測定を行ってもらった。

大気汚染濃度は、対象者居住地の近傍にある2カ所の大気環境測定局で測定・公表されているAPI(Air

Pollution Index) 値より粒径 $10\mu\text{m}$ 以下の粒子状物質 (PM_{10}) 濃度に換算した日平均値を用いた。また、対象者の一部については、ミニポンプ (MP-Σ3、柴田科学) にインパクト (ATPS-20H、柴田科学) を接続した個人サンプラーを用いて住宅内外の粒子状物質を 1 日ごとに捕集し、 PM_{10} 濃度を実測した。

解析は、同一対象者で同一項目を反復測定したデータには自己相関があるため、それを考慮したモデルである一般化推定方程式 (GEE) を用いた。各時期に繰り返し測定された PEF または FEV_1 値を従属変数とし、性別に対象者の年齢、喫煙歴、喘鳴症状の有無、気温の影響を調整して PM_{10} 濃度 $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加時の PEF 及び FEV_1 値の変化量を示した。

本研究は兵庫医科大学倫理委員会の承認を受け、対象者からのインフォームド・コンセントを得て実施した。

結 果：

各検査実施期間の API より換算した PM_{10} の平均濃度 ± 標準偏差は、5～6 月 $221.3 \pm 145.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、8～9 月 $60.1 \pm 35.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、10～11 月 $122.6 \pm 83.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった (図 1)。5～6 月は高く、8～9 月には大きく低下していたが、10～11 月には再び増加がみられた。個人サンプラーで実測した屋外の PM_{10} 平均濃度は、5～6 月 $183.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、8～9 月 $86.4\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。屋内濃度の平均は、それぞれ屋外濃度よりわずかに低かった。API から求めた PM_{10} 濃度と比較すると、5～6 月には実測濃度の方がやや低い、変動パターンは一致しており、8～9 月の屋外測定値は濃度もほぼ一致していた (図 2)。

肺機能検査対象者の特性は表 1 に示した。男性のうち、現在喫煙しているのは 2 名 (11.1%)、既喫煙者は 8 名 (44.4%) であった。女性は全員喫煙の経験がなかった。喘鳴症状があるのは男性 3 名 (16.7%)、女性 2 名 (8.7%) であった。期間中の 1 人当たりの肺機能検査実施回数は、男性 57.6 ± 18.3 回、女性 58.0 ± 23.5 回であった。

各時期における PEF 及び FEV_1 の朝と夜の平均値を表 2 に示した。3 期を通じて、男性では朝の PEF 平均値よりも夜のほうが低く、女性では逆に朝よりも夜のほうが高かった。 FEV_1 の平均値は男女ともに朝よりも夜のほうが低かった。

大気中 PM_{10} 濃度 $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加あたりの PEF の変化量を表 3 に示した。5～6 月に

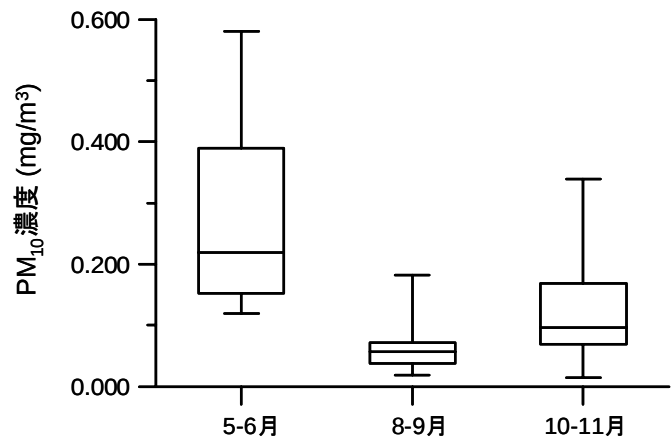


図1. 肺機能検査期間中の PM_{10} 濃度の分布

対象者居住地近傍の測定局におけるAPI値から換算した濃度

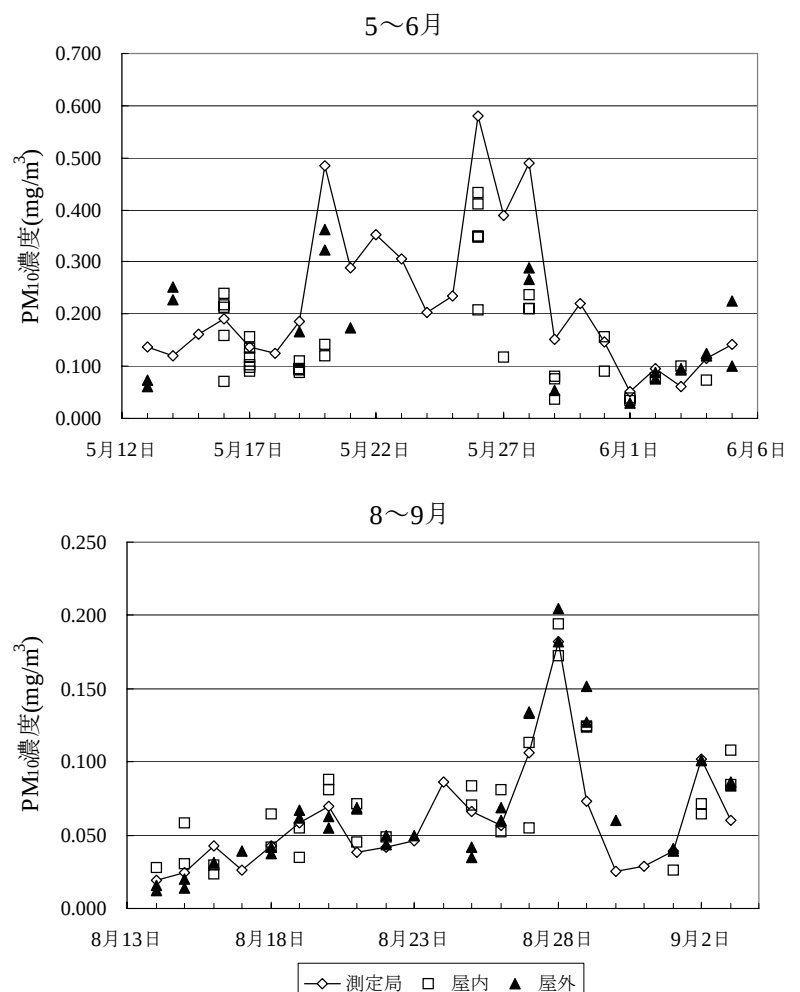


図2 測定局における PM_{10} 濃度と屋内外 PM_{10} 濃度の比較

は、男性では朝 +2.18L/min、夜 -7.36L/min、女性では朝 -2.80 L/min、夜 +4.34L/minであり、大気中 PM₁₀ 濃度の増加により男性は夜、女性は朝の PEF の有意な低下が観察された。8～9 月には、大気中 PM₁₀ 濃度 50 μ g/m³増加あたりの朝の PEF の変化量は男女ともに 5～6 月よりも大きかったが有意ではなく、夜の PEF は男女ともに PM₁₀ 濃度との関連はみられなかった。

表 1. 肺機能検査対象者

	男 (n = 18)	女 (n = 23)	計 (n = 41)
平均年齢 (標準偏差)	57.9 (6.4)	58.1 (5.2)	58.0 (5.7)
喫煙習慣 (%)			
喫煙歴なし	44.4	100.0	75.6
既喫煙者	44.4	0.0	19.5
限喫煙者	11.1	0.0	4.9
咳・痰症状 (%)	5.6	13	9.8
喘鳴症状 (%)	16.7	8.7	12.2
肺機能検査実施回数 平均 (標準偏差)	57.6 (18.3)	58.0 (23.5)	57.8 (21.1)

表 2. 検査時期別最大呼気流量 (PEF) および 1 秒量 (FEV₁) 平均値 (標準偏差)

	男		女	
	朝	夜	朝	夜
PEF (L/min)				
5～6月	461.1 (127.9)	390.5 (116.8)	313.2 (82.1)	355.3 (60.9)
8～9月	430.1 (111.6)	423.0 (113.3)	323.1 (64.5)	332.6 (61.9)
10～11月	411.8 (132.2)	401.3 (135.2)	326.6 (64.9)	329.1 (75.4)
FEV ₁ (L)				
5～6月	2.75 (0.59)	2.37 (0.47)	2.02 (0.47)	2.02 (0.48)
8～9月	2.65 (0.62)	2.53 (0.57)	1.97 (0.39)	1.93 (0.36)
10～11月	2.62 (0.60)	2.53 (0.64)	2.06 (0.50)	1.96 (0.46)

表 3. PM₁₀濃度増加と最大呼気流量 (PEF) の変化量

		朝			夜		
		変化量	95%信頼区間	p値	変化量	95%信頼区間	p値
5～6月	男	2.18	-1.35 5.70	0.226	-7.36	-12.98 -1.75	0.010
	女	-2.80	-4.32 -1.27	<0.001	4.34	-1.06 9.74	0.115
8～9月	男	-4.84	-37.26 27.57	0.770	11.00	-39.46 61.45	0.669
	女	-4.95	-16.16 6.26	0.387	-1.49	-11.05 8.07	0.760
10～11月	男	2.60	-4.77 9.97	0.490	-12.01	-23.60 -0.42	0.042
	女	1.64	-3.63 6.92	0.541	4.00	-2.07 10.06	0.197

PM₁₀濃度 50 μ g/m³増加あたりの PEF 変化量 (L/min)

対象者の年齢、喫煙歴、喘鳴症状の有無、気温の影響を調整した。

表 4. PM₁₀濃度増加と 1 秒量 (FEV₁) の変化量

		朝			夜		
		変化量	95%信頼区間	p値	変化量	95%信頼区間	p値
5～6月	男	16.1	-1.0 33.2	0.066	-16.3	-39.2 6.7	0.165
	女	-7.7	-24.2 8.8	0.358	27.8	-3.5 59.0	0.081
8～9月	男	14.7	-124.8 154.2	0.837	67.18	-86.4 220.8	0.391
	女	50.8	-12.0 113.5	0.113	68.91	6.32 131.5	0.031
10～11月	男	-39.7	-96.5 17.1	0.171	-57.2	-118.8 4.3	0.068
	女	-15.4	-68.0 37.3	0.567	6.8	-50.3 63.9	0.815

PM₁₀濃度 50 μ g/m³増加あたりの FEV₁ 変化量 (ml)

対象者の年齢、喫煙歴、喘鳴症状の有無、気温の影響を調整した。

10～11 月には、男性の夜の PEF 変化量は、PM₁₀ 濃度 50 μ g/m³ 増加あたり -12.01L/min であり、有意な低下が認められた。しかし、男性の朝、女性の朝及び夜の PEF はいずれも PM₁₀ 濃度との関連はみられなかった。

FEV₁ については、5～6 月、8～9 月、10～11 月のいずれにおいても、大気中 PM₁₀ 濃度との間に有意な負の関連は認められなかった（表 4）。

考 察：

中国では近年急速に自動車が増加し、大都市圏の幹線道路では渋滞が著しく、大気汚染が大きな問題となっている。特に 2008 年の北京オリンピック開催に伴い、中国の大気汚染は国際的に関心が高まり、交通規制や建設工事の停止等の積極的な対策が進められた。北京市で公表されている API 値から換算した PM₁₀ 濃度は、2008 年 5 月に比して 8～9 月には大きく改善しており、大気汚染対策の効果が確認できた。また、肺機能検査対象者の居住地で個人サンプラーを用いて実測した PM₁₀ 濃度は、API から換算した濃度とほぼ一致していた。そのため、本研究では対象者の居住地近傍にある測定局の API 値から換算した PM₁₀ 濃度を用いて肺機能値の変動との関連を評価することとした。

PEF などの肺機能値の変動に与える大気中粒子状物質の短期的影響は、これまで主に気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患等の呼吸器疾患を有する人を対象に研究が行われてきた²⁾。これらの研究では、大気中 PM₁₀ 濃度が増加すると PEF 値が低下することを認めたものが多い。一方、健常者を対象とした研究は少なく、大気中粒子状物質濃度との関連性は必ずしも一貫性が得られていない³⁾。

今回、北京市の 5～6 月大気中 PM₁₀ 濃度は著しく高く、男性の夜、女性の朝の PEF 値との間に有意な負の関連が認められた。しかし、8～9 月には男女ともに PEF 値と大気中 PM₁₀ 濃度との関連は有意ではなく、10～11 月には男性の夜の PEF 値のみ大気中 PM₁₀ 濃度と有意な負の関連がみられた。本研究の対象者のほとんどは呼吸器疾患を有しない健常成人であったが、大気中 PM₁₀ 濃度が高い時期には、濃度が増加すると PEF 値が有意に低下するという関連性が認められた。日本や欧米諸国に比して、大気中 PM₁₀ 濃度が相当高かったためであろう。一方、オリンピック開催に伴って大気汚染対策が実施された 8～9 月には、大気中 PM₁₀ 濃度は低下しており、PEF 値との関連は認められなかった。

本研究においても、PEF 値と大気中 PM₁₀ 濃度との関連は、性、時間帯などにより必ずしも一貫性のある結果が得られたわけではない。曝露から肺機能測定までの時間（ラグタイム）、肺機能に及ぼす様々な因子の影響等についてさらに詳細に検討する必要がある。5～6 月の大気中 PM₁₀ 濃度は著しく高かったが、この時期には黄砂の飛来があったこともその一因であり、粒子状物質の粒径や成分についても考慮すべきである。近年、粒径 2.5 μ m 以下の微小粒子状物質（PM_{2.5}）の健康影響が国際的に注目されているが、北京市ではまだ PM_{2.5} 濃度の測定は行われていない。微小粒子の健康影響については今後の課題である。

以上より、北京における粒子状物質による大気汚染が住民の肺機能に影響を及ぼしている可能性が示された。北京オリンピック開催中の大気汚染は大きく改善しており、肺機能への影響は観察されず、積極的な大気汚染対策の効果であると考えられた。

参考文献：

1. 郭新彪、鄧芙蓉. 中国都市交通汚染の現状及び健康に対する影響. 日中医学 22(9):17-19, 2007.
2. Ma L, Shima M, Yoda Y, Yamamoto H, Nakai S, Tamura K, Nitta H, Watanabe H, Nishimuta T. Airborne Particulate Matter and Respiratory Morbidity in Asthmatic Children. J Epidemiol, 18,97-110, 2008.
3. Kasamatsu J, Shima M, Yamazaki S, Tamura K, Sun G. Effects of winter air pollution on pulmonary function of school children in Shenyang, China. Int J Hyg Environ Health, 209,435-444, 2006.

注：本研究は、2009 年 3 月 31 日『第 79 回日本衛生学会学術総会』にて口頭発表（予定）。

作成日：2009 年 3 月 6 日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2009 年 3 月 15 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 余 福 勲 
所属機関名： 長崎大学熱帯医学研究所
所属部署： ウイルス学分野 職名： 助教
所在地： 〒852-8523長崎市坂本1-12-4
電話： 095-819-7829 内線： 7829

1. 助 成 金 額： 100万 円

2. 研究テーマ SARS(新型肺炎)の血清学的診断法確立並びに血清免疫学的研究

3. 成果の概要 (100字程度)

今回バキュロウイルス発現系を使って組換えN蛋白抗原を用いた間接IgG ELISAを開発した。本法は感染性が無く、安全で、特異性が高く、感度が高い診断系であり、SARSの診断、調査および疾病予防への応用が十分期待できる。

※発表論文等

結果をまとめ、国際雑誌に投稿する予定

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 余福勲 職名： 助教
所属機関： 長崎大学熱帯医学研究所 部署： ウイルス学分野
中国側研究者氏名： 張奉学 職名： 教授
所属機関： 広州中医薬大学熱帯医学研究所 部署： ウイルス学分野

SARS(新型肺炎)の血清学的診断法確立並びに血清免疫学的研究

研究者氏名	余福勲
所属機関	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野助教
共同研究者名	張奉学
所属機関	中国広州中医薬大学熱帯医学研究所教授

Abstract

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a newly emerged human disease associated with pneumonia originated from Guangdong province of China. The disease has affected 30 countries in 5 continents, with more than 8400 cases and more than 910 deaths during the outbreak in 2003. SARS has been identified as an emerging zoonotic diseases with bats are the most possible natural reservoirs. Hence the threat of re-emergence of SARS persists although there is no outbreak of SARS-CoV after 2003. Since there are no suitable antiviral drugs and effective vaccine for SARS virus, active surveillance is the key measure for preventing future SARS outbreaks. Sensitive and specific sero-diagnosis of SARS-CoV infection in wild animals and human is critical for SARS surveillance.

We reported that an N-terminus truncated E.Coli originated recombinant N protein based IgG ELISA was more sensitive compared with whole virus based ELISA system, but has low titer of false positive reaction when evaluated with healthy volunteer sera (10). The cross reaction of recombinant SARS-CoV with other corona viruses were also reported (7,8). Leung DT et al reported that the cross reactivity of recombinant N protein was originated from the E.Coli bacteria, not from the SARS-CoV(3). To confirm if the low rate of cross reactivity was really caused by the expression of N protein in E.Coli and to develop a safe, sensitive and specific sero-diagnosis method for surveillance and clinical use, we expressed and purified the whole length and N-terminus truncated SARS-CoV N protein in insect Tn5 cell line by using the BAC-TO-BAC baculovirus expression system. Indirect IgG ELISA systems for human and bat sera were developed using the recombinant N proteins as antigen.

Compared with E.Coli derived N and N_{Δ121} based IgG ELISA, insect cell derived N and N_{Δ121} based IgG ELISA have the same sensitivity in detecting SARS patient sera, out of 37 patients, 36 were positive, positive rate was 97.3%. When evaluated with healthy human sera, insect cell derived N based ELISA was more specific than E.Coli derived N based ELISA while the two N_{Δ121} based ELISA has similar specificity, indicating the E.Coli origin was only partially responsible for the low titer of non-specific reaction.

In surveillance of human sera from different age groups in Guangzhou, China, the low titer of SARS-CoV IgG positive rate increased as the age increases, implying the low titer of cross reactivity was caused by other closely related corona viruses.

Key words

SARS-CoV, recombinant N protein, sero-diagnosis, ELISA

Introduction

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a newly emerged human disease associated with pneumonia. The outbreak is believed to have originated in November, 2002 in the Guangdong province of China with several hundred of cases of severe atypical pneumonia (1,10). The disease quickly affected 30 countries in 5 continents, with more than 8400 cases and more than 910 deaths (9). Several laboratories have unraveled the genetic information of the SARS virus. The genome size of the SARS coronavirus is ~29 kb and has 11 open reading frames, composed of a stable region encoding an RNA-dependent RNA

polymerase with 2 open reading frames, a variable region representing 4 coding sequences for viral structural genes [spike (S protein), envelope (E protein), membrane (M protein), and nucleocapsid (N protein)], and 5 putative uncharacterized proteins (5, 6).

The rapid identification of highly similar viruses in masked palm civet and raccoon dog in the live-animal markets provided strong evidence of an animal origin of SARS-CoV and played an important role in the prevention of further outbreaks (2, 4). However, subsequent epidemiological studies on civets from market, farm and wild populations demonstrated that there was no widespread infection among wild or farmed civets, implying that wild animal(s) other than civets may serve as the natural reservoir(s) of SARS-CoV. In efforts to search for the origin of SARS-CoV, several research groups reported that bats may be the natural reservoirs of SARS-CoV (2, 4). Hence the threat of re-emergence of SARS persists although there is no outbreak of SARS-CoV after 2003.

Currently, there are no suitable antiviral drugs and effective vaccine for SARS virus. Therefore active surveillance is the key measure to prevent future SARS outbreaks. Sensitive and specific sero-diagnosis of SARS-CoV infection in wild animals and human is critical for the active surveillance.

We reported that a N-terminus truncated E.Coli originated recombinant N protein based IgG ELISA was safe and more sensitive compared with whole virus based ELISA system, but has low titer of false positive reaction when evaluated with healthy volunteer sera (10). The cross reaction of recombinant SARS-CoV with other corona viruses were also reported (7,8). Leung DT et al reported that the cross reactivity of recombinant N protein was originated from the E.Coli bacteria, not from the SARS-CoV(3). To confirm if the low rate of cross reactivity was really caused by the expression of N protein in E.Coli and to develop a safe, sensitive and specific sero-diagnosis method for surveillance and clinical use, we expressed and purified the whole length and N-terminus truncated SARS-CoV N protein (N and N_{Δ121}) in insect Tn5 cell line by using the BAC-TO-BAC baculovirus expression system. Indirect IgG ELISA systems for human and bat sera were developed using the recombinant N proteins as antigen. SARS patients sera and healthy human sera were used to evaluate the newly established systems and sero-surveillance was conducted in Guangzhou, China, the original place of SARS.

Materials and Methods

Cloning, expression, and purification of the N proteins of SARS-CoV. The SARS-CoV N gene and truncated N gene were amplified by RT-PCR as previously described(10). The 1.3-kb and 0.9-kb PCR amplified DNA fragments were digested with BamHI and Sal I and cloned into the corresponding restriction site of pFastBacHT B vector. Competent *Escherichia coli* DH10BAC cells, containing bacmid (baculovirus shuttle vector plasmid) and helper plasmid, were used to generate recombinant bacmids according to the manufacturer's instructions (BAC-TO-BAC baculovirus expression system; Life Technologies). The recombinant bacmid DNA was transfected into insect cells using the CELLFECTIN reagent. Tn 5 cells were cultured at 27°C in Sf-900 II SFM. For each transfection, 9×10^5 cells were seeded in 35-mm wells of a six-well plate and allowed to attach for ~1 h. Lipid reagent and DNA were diluted separately into 100 µl of Sf-900 II SFM cells and then combined to form lipid-DNA complexes, which were then diluted to 1 ml with SFM and added to the cells. The cells were incubated for 5 h at 27°C after which the transfection medium was removed and replaced with fresh medium. These cells were analyzed for protein expression at 24 to 72 h post transfection. Positive recombinant viral supernatant was collected at 72 h post transfection and used for large scale culture of insect Tn5 cell inoculation.

The recombinant N and N_{Δ121} protein fused to a histidine affinity tag at its N terminus was purified using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin. Briefly, Tn5 cells at a density of about 1.5×10^6 /ml in shaker flasks

were infected with the recombinant baculovirus at a multiplicity of infection (MOI) of about 5 and incubated with shaking for 72 h at 27°C. The infected cells were harvested and the pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.5], 5 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM KCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Tween 20. After clarification by centrifugation at 30,000 ×g for 15 min. The supernatant was loaded onto an Ni-NTA column, after washing the protein was eluted from the column with 5 ml of buffer C (20 mM Tris-HCl [pH 8.5], 5 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM KCl, 10% [vol/vol] glycerol, 500 mM imidazole. The samples were collected in 0.5-ml fractions and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Protein concentrations were determined according to the Bradford method using bovine serum albumin (Sigma) as the standard.

Western blot analysis. Western blot was performed as described previously (10). A semi-dry protein transfer method was used to immobilize the recombinant proteins to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Briefly, protein separated in a 10% polyacrylamide gel was transferred to a PVDF membrane (Immobilon, Millipore) using a semidry electroblotter (Sartorius, Germany). The membrane was initially blocked overnight at 4 °C with Blockace, then reacted with Blockace diluted mouse anti-histidine (1:200) or patient serum(1:100) for 1h at 37 °C, incubated with rabbit anti-mouse IgG or goat anti-human peroxidase conjugate diluted 1:1000 with TBS-T for 1h. The reaction was visualized by DAB(Wako, Japan).

Production of bat hyperimmune sera. Two fruit bats were injected intraperitoneally with 100 µl (100 µg) of purified recombinant N protein emulsified with an equal volume of Freund's complete adjuvant (MP Biomedicals, USA). Two booster injections were given by the same dose of N protein in Freund's incomplete adjuvant (MP Biomedicals, USA) with 14 days intervals. One week after the final booster injection, bat immune sera were collected .

ELISA using recombinant nucleocapsid proteins. Indirect IgG ELISA systems were established using the recombinant N and N_{Δ121} protein obtained from insect cell like previously described (10). 175 serum samples collected from healthy volunteers before the SARS outbreak and 150 serial serum samples collected from 37 SARS patients with pneumonia were used for the assessment of the newly established systems. The results were compared with ELISA using E.Coli originated recombinant systems. IgG ELISA for bat was established similarly with the second antibody using 1:10,000 diluted HRP-conjugated anti-bat IgG (Funakoshi, Japan).

Sero-surveillance in Guangzhou, China. Sera samples were collected from different age groups in outpatients in Guangzhou, China. Age 0–5 years: 100 samples; 5–10 years: 50 samples, 10–20 years: 50 samples; 20–40 years: 50 samples; above 40 years: 50 samples. The baculovirus expressed N_{Δ121} protein based IgG ELISA was used to check the SARS-CoV IgG antibody. Questionnaires about pneumonia, hospitalization, occupation and life style were asked.

Results

Expression and purification of recombinant SARS-CoV N proteins. To produce recombinant SARS-CoV N proteins, the sequence coding for amino acid residues 5-422 and 122-422 of the nucleocapsid protein was amplified by RT-PCR and cloned into the BamHI and Sall sites of pFastBacHT B vector in frame and downstream of the six histidine tag. The recombinant proteins were expressed in Tn5 insect cells and purified by Ni-NTA affinity column under natural conditions. Analysis of purified recombinant protein by SDS-PAGE and Coomassie blue staining revealed a single protein band of 52 kD and 40 kD respectively. The resultant recombinant protein bands are 8 kD bigger than the recombinant protein obtained from E.Coli because of the extra amino acid originated from the pFastBacHT B vector. The identity of the recombinant

SARS-CoV N and SARS-CoV N_{Δ121} protein was further confirmed by western blot with mouse antiserum to histidine and SARS patient serum.

Assessment of recombinant N and N_{Δ121} protein ELISA using healthy volunteers sera. Serum samples collected from 175 health volunteers before the SARS outbreak were used to for the assessment of indirect IgG ELISA test for the insect cell derived recombinant SARS-CoV N and N_{Δ121} protein compared with E.Coli derived N and N_{Δ121} based IgG ELISA. In E.Coli derived N based ELISA, 38 out of the 175 serum samples has a titer of more than 100, ranging 100~3,200, while in insect cell derived N ELISA, 28 out of the 175 serum samples has a titer of more than 100, ranging 100~400. In E.Coli derived N_{Δ121} ELISA, 11 out of the 175 has a titer above 100, the highest titer was 400, while in insect cell derived N_{Δ121} ELISA, 10 out of the 175 has a titer above 100, the highest titer was 400. The positive samples were all confirmed by western-blot. Insect cell derived N based ELISA was more specific than E.Coli derived N based ELISA while the two N_{Δ121} based ELISA has similar specificity, indicating the E.Coli origin was only partially responsible for the low titer of non-specific reaction.

Assessment of recombinant N and N_{Δ121} protein ELISA using SARS patients sera. Serial serum samples collected from 37 SARS cases were assessed for the insect cell derived N and N_{Δ121} ELISA compared with E.Coli derived N and N_{Δ121} based IgG ELISA. In all ELISA systems, 36 patients showed specific IgG seroconversion, the titer ranged from 600 to 204,800. The positive rate was 97.30%. All the positive samples were confirmed by western-blot. Among the 36 IgG positive patients, the IgG seroconversion rate to the N protein was 22.22% in less than 7 days after the onset of fever, 69.44% in less than 2 weeks and reached 100% in less than 3 weeks.

In the recombinant N_{Δ121}-based IgG ELISA, the highest titer of the 175 health volunteers is 400, the SARS patient's sera titer is 600 or above, so we set the cut-off titer of our N_{Δ121}-based IgG ELISA as 400 to ensure a 100% specificity of the assay system.

Human sera surveillance in Guangzhou province, China. The SARS-CoV IgG titer in different age groups in Guangzhou was determined by the baculovirus expressed N_{Δ121} protein based IgG ELISA. In individuals aged 0~5 years group, out of 100 people, no SARS-CoV IgG was detected. In age 5~10 years group, 2 out of 50 people (4%) have IgG titer 100~200. In age 10~20 years group, 3 out of 50 people (6%) have IgG titer 100~400. In age 20~40 years group, 4 out of 50 people (8%) have IgG titer 100~400. In age 40 years group, 4 out of 50 people (8%) have IgG titer 100~400. The positive people had no past history of SARS like disease and close contact with wild animals.

Discussion

The predicted N protein of SARS-CoV is a highly charged basic protein of 422 amino acids with seven successive hydrophobic residues near the middle of the protein. Although the overall amino acid sequence homology among coronavirus N proteins is low, a highly conserved motif [FY YLGTGP] occurs in the N-terminal half of all coronavirus N proteins, including that of SARS-CoV. Other conserved residues occur near this highly conserved motif (6). It was reported that the most immunoreactive epitopic site in the SARS coronavirus N protein is located at the COOH terminus of the N protein. This made it possible theoretically to remove the N terminus part including the conserved motif to reduce the cross reactivity for SARS diagnosis. We expressed a truncated SARS-CoV N_{Δ121} protein, which deleted the highly conserved motif [FY YLGTGP]. In our insect cell derived and E.Coli derived N_{Δ121} ELISA, lower titer and lower positive rate were detected in healthy human sera, indicate that the SARS-CoV N protein has cross reactivity with other corona viruses and it is partially caused by the conserved motifs. Leung DT et al reported that the cross reactivity of recombinant N protein was originated from the E.Coli bacteria, not from the SARS-CoV(3). In our study, when evaluated

with healthy human sera, insect cell derived N based ELISA was more specific than E.Coli derived N based ELISA while the two N_{Δ121} based ELISA has similar specificity, indicating the E.Coli origin was only partially responsible for the low titer of non-specific reaction.

Compared with E.Coli derived N and N_{Δ121} based IgG ELISA ,insect cell derived N and N_{Δ121} based IgG ELISA have the same sensitivity in detecting SARS patient sera, out of 37 patients, 36 were positive, positive rate was 97.3%. The titer was ranging 600~204,800.Among the 36 positive cases, the timing of IgG sero-conversion against N_{Δ121} protein after onset of illness were 22.2% in the first week, 69.4% in the second week and reached to 100% in the third week. Indicated N_{Δ121} based IgG ELISA is a sensitive assay system for SARS diagnosis. In the recombinant N_{Δ121} –based IgG ELISA, the highest titer of the 175 health volunteers is 400, while the SARS patient sera titer is 600 or above, so we set the cut-off titer of our N_{Δ121} –based IgG ELISA as 400. This cutoff titer ensures 100% specificity of SARS diagnosis.

In surveillance of human sera from different age groups in Guangzhou China, the low titer of SARS-CoV IgG positive rate increased as the age increases, implying the low titer of cross reactivity was caused by other closely related corona viruses. The positive people had no past history of SARS like disease and close contact with wild animals. We hypothesize that a yet unidentified SARS-CoV close related virus might be endemic in the study area. Further studies are needed to identify the origin of this low titer of reactivity. This result also demonstrated that a properly cut-off is very important for sero-diagnosis and care should be taken in diagnosis when facing isolated low titer of positive samples.

In conclusion, our newly developed SARS-CoV N_{Δ121} protein-based IgG ELISA is a safe, specific and sensitive test for diagnosing SARS-CoV infection. It will contribute to the SARS diagnosis, surveillance, prevention and control.

References

1. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. 2003.. N Engl J Med. 348:1953-1966.
2. Lau SK, Woo PC, Li KS,et al.Proc Natl Acad Sci U S A. 2005,27;102:14040-5.
3. Leung DT, van Maren WW, Chan FK,et al .J Virol. 2006,80:8920-8.
4. Li, W., Shi, Z., Yu, M. et al . Science 2005, 310, 676–679.
5. Marra, M. A., S. J. Jones, C. R. Astell, et al. 2003. Science 300:1399-1404.
6. Rota, P.A., M.S. Oberste, S.S. Monroe, et al 2003.. Science. 300(5624): 1394-1399.
7. Sun ZF, Meng XJ. 2004..J Clin Microbiol. 42:2351-2352.
8. Woo PC, Lau SK, Tsoi HW, et al. 2004. Lancet. 363(9412):841-845.
9. World Health Organization. 2003. Wkly. Epidemiol. Rec. 78:86-87.
10. Yu F, Le MQ, Inoue S, Thai HT, et al.Clin Diagn Lab Immunol. 2005,12:848-54.

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2009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： 市原 学 

所属機関名： 名古屋大学

所属部署： 大学院医学系研究科 職名： 准教授
〒466-8550

所在地： 名古屋市昭和区鶴舞町65

電話： 052-744-2123 内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

工業的ナノ素材の心肺機能への影響に関する調査研究

3. 成果の概要（100字程度）

酸化チタン取り扱い工場の曝露評価ならびに労働者の健康調査を行った。凝集体が重量的には大きな割合を占めていた。単純胸部X線写真では、石灰化と粒状陰影が見つかったが、曝露との関係は明らかではなかった。

※発表論文等

Ichihara G. et al. Exposure assessment and health status of the workers handling titanium dioxide. Toxicological Sciences 2009, 108: 61

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 市原 学 職名： 准教授

所属機関： 名古屋大学 部署： 大学院医学系研究科

中国側研究者氏名： 李 衛華 職名： 准教授

所属機関： 上海市計生育科学研究所 部署： 生殖生物学分野

工業的ナノ素材の心肺機能への影響に関する調査研究

市原 学¹、李 衛華²、小林隆弘³、丁 訓誠²、藤谷雄二⁴、劉 穎²、崔 雨佳¹、畑菜摘¹、王 強毅²、市原 佐保子^{1,5}

1 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学分野、2 上海市計画生育科学研究所、3 東京工業大学、4 国立環境研究所、5 三重大学生命科学研究支援センター ヒト機能ゲノミクス分野

抄録

酸化チタンは顔料、紫外線遮断材、光触媒として広範に使用されている。いくつかの疫学的研究は、酸化チタンに曝露された労働者について行われているが、それらの研究においては、粒子サイズに関する情報がない。本研究では、酸化チタンを取り扱っている工場において比較的高濃度に酸化チタンに曝露されている労働者の呼吸器、循環器への影響を調べた。あわせて違った大きさの酸化チタン粒子を評価した。労働者に、質問紙表を用いて面談を行った。単純胸部 X 線、スパイロメーター、心臓エコー、心電図検査を行った。サイズを区別するインパクトは、1 ミクロン以上の粒子が、事務室に比べて 500 倍であることを明らかにした。粒状影が胸部 X 線写真で一人の労働者に見つかった。さらに大動脈硬化症が別の一人に見つかった。しかし、それらの曝露との関係は明らかでなかった。肺繊維化をしめしたものはなかった。スパイロメーターで機能異常を示したものはなかった。CPC (Condensation Particle Counter) によって測られた粒子数は肉眼的な Dustiness とは対応していなかった。本研究は、1 年から 7 年の期間高濃度に酸化チタンに曝露された労働者に呼吸器、循環器の異常が認められないことを明らかにした。

キーワード：酸化チタン、ナノ素材、凝集体、呼吸器、循環器

はじめに

酸化チタンは広く、顔料、紫外線遮断剤、光触媒として広く用いられている。いくつかの疫学的研究が報告されているが、粒子サイズまで調べた研究はない。また、製造工場における報告はあるが、取り扱い工場におけるデータがない。私たちの予備的研究では、高濃度の酸化チタンに曝露された労働者群が見つかった。本研究では、これらの労働者における呼吸器、循環器への影響を調べた。

対象と方法

1. 曝露評価

環境中酸化チタンのレベルが、condensation particle counter (CPC, TSI, USA)によって調べられた。インパクターを伴った個人サンプラーを用いて質量濃度を調べた。調べた場所は、事務室、酸化チタン梱包場、保存部屋、工場の裏庭であった。

2. 健康調査

9人の労働者がリクルートされ健康調査に協力した。記述されたインフォームドコンセントが得られ、すべての研究プロトコルは倫理関連の法律に従い、名古屋大学医学部および三重大学倫理委員会によって事前に承認された。労働者は、質問紙に基づいて面談された。理学的検査が中国人内科医師によって行われた。胸部単純X線写真、心電図、心エコー検査が行われ、呼吸器、循環器系への影響が評価された。

3. 結果

本工場で取り扱われていた酸化チタンにはルチル、アナターゼの両方の化学型に属するものが含まれていた。ルチルのうち、半分のものは食料添加に使われていた。工場は中国の様々な地域および台湾から様々な種類の酸化チタンを得ていた(図1)。工場では、ユーザーの求めに応じて、様々な種類の酸化チタンを混合していた(図2)。労働者は、酸化チタンの袋を開け、混合機に投入していた。混合している時、肉眼的に見える酸化チタンの粒子が現れ、まわりは雲のようになった。酸化チタン混合後、労働者は粒子を粉砕機にシャベルで投入した。これらの過程において、労働者は高濃度の酸化チタン粒子に曝露された。最後に労働者は、粉砕機から酸化チタン粒子を回収し、重さを量った。労働者は保護マスクを用いていたが、そのマスクの効率は明らかでなかった(図3)。工場では、蓄積した多くの酸化チタンが見つかった(図4)。工場の様々なポイントでは、CPCによる粒子数が計測された。そのポイントには、事務室、混合、粉砕、袋詰め場所が含まれていた。個人サンプラーによる質量濃度分布が得られた(図7)が、袋詰め場所と事務室とのCPCによって計測された粒子数にはっきりとした違いがなかった。一方、質量濃度は、事務室より袋詰め場所のほうが明らかに高かった。健康調査では、粒状影、石灰化像が見つかった(表1)が、他の検査では異常が見つからなかった。

考察

CPCによって評価された粒子数は、肉眼的誇りっぽさとは対応していなかった。凝集粒子への曝露影響も調べる必要がある。労働現場で使いやすい簡単なナノ粒子計測機の開発が求められている。粒状影と大動脈の石灰化が発見されたが、それらの酸化チタン暴露との関係は明らかでなかった。繊維化は認められなかった。また、スパイロメーター検査では、機能異常は認められなかった。労働者の健康状態に対する監視システムが必要である。国際的、学際的な共同が工業ナノマテリアルの健康影響を調べる上で有用である。

結論

CPC によって評価された粒子数は、肉眼的な誇りっぽさとは関連しなかった。本研究は、1-7 年高濃度の酸化チタンに曝露された労働者に呼吸器、循環器系の異常が認められないことを明らかにした。

本研究の一部は、第 48 回米国毒性学会（Baltimore, MD, USA, 2009）で発表された。本研究は日中笹川財団研究助成によって行われた。

2009 年 3 月 19 日



図 1 取り扱われていた酸化チタン



図 3 使用されていた保護マスク



図 2 混合過程



図 4 貯蔵場所

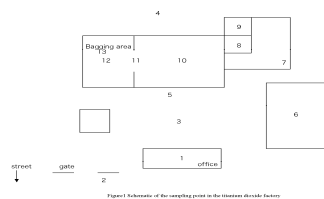


図5 サンプリングポイント
の図解

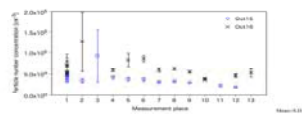


図 6 Condensation Particle Counterによって計測さ
れた粒子数

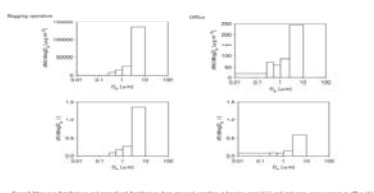


図7梱包場所（13）と事務室（1）における個人サンプラー
による質量濃度分布

表 1. 健康調査結果

番号	年齢	性	曝露年数	喫煙歴	胸部X線/心エコー
1	43	男	1		
2	41	男	7	20 年	
3	41	男	2	4 年	
4	44	男	1		
5	37	男	3	20年	
6	38	男	2		石灰化/ 大動脈弁狭窄
7	44	男	2		
8	54	男	5		粒状影
9	41	男	5	4-5年	

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2009年 3月 6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： 菅内 文中 

所属機関名： 名古屋市立大学大学院医学研究科

所属部署： 消化器・代謝内科学 職名： 病院講師
〒467-8601

所在地： 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1番地

電話： 052-851-5511 内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

B型肝炎ウイルス(HBV)組換え遺伝子型の臨床的およびウイルス学的特徴の解析

3. 成果の概要(100字程度)

中国および本邦でのB型慢性肝疾患患者からr-HBV-B/C (Ba)および既存の報告にない新たなr-HBV-A/Cが検出された。中国厦門地区ではr-HBVのB/C (Ba)において、CHおよびLC群と比較してHCC群において遺伝子型Cとは異なる変異が有意に高頻度に認められ、肝発癌とr-HBVによる特異的なウイルス変異との関連が示唆された。

※発表論文等

本研究成果内容の一部を以下の国際学会で発表

第18回アジア太平洋肝臓学会議(2008年3月:ソウル)

第59回全米肝臓学会議(2008年11月:サンフランシスコ)

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 菅内 文中 職名： 病院講師

所属機関： 名古屋市立大学大学院医学研究科 部署： 消化器・代謝内科学

中国側研究者氏名： 夏宁 邵 職名： 主任教授

所属機関： 厦門大学 部署： NIDVD

B型肝炎ウイルス(HBV)組換え遺伝子型の臨床的 およびウイルス学的特徴の解析

研究者氏名	菅内 文中
所属機関	名古屋市立大学大学院医学研究科
共同研究者名	夏宁 邵
所属機関	厦門大学

要旨

DNA データバンクに登録されている 807 本の HBV 全塩基配列を用いて HBV 組換え遺伝子型 (r-HBV) の検索を行なった。合計 28 種類、150 株以上の r-HBV の存在が明らかとなった。本邦の若年発症 B 型肝炎癌例、免疫・化学療法後の HBV 再燃例および中国厦門地区の B 型慢性肝疾患患者例を用いた r-HBV の検索において、r-HBV B/C および既存の報告にない r-HBV A/C が検出された。各 HBV クローン間の *in vitro* HBV 複製モデルを用いた検討で、遺伝子型 Bj かつ PC 変異クローンで複製がより亢進していた。遺伝子型別の検討で既報にない 171320C, 1504C, 1505C, 1800C, 2045A, 2059A, 2075G 変異が遺伝子型 B の HCC 群、126T, 2120G 変異が遺伝子型 C の HCC 群で高頻度に認められた ($P < 0.05$)。

Key Words B型肝炎、遺伝子型、遺伝子変異、肝炎ウイルス、肝癌

緒言

HBV (Hepatitis B Virus) 遺伝子型は現在までに分子系統樹を基に A から H までの 8 型に分類されている。その世界分布には地域特異性が存在し、HBV 遺伝子型と臨床像との密接な関連についても報告されている。近年 HBV 遺伝子が部分的に異なる遺伝子型に置き換わった HBV 組換え遺伝子型 (r-HBV) の存在が注目され、研究者らもこれまで各種の r-HBV を発見しその臨床的重要性について報告してきた¹⁾²⁾。しかしこれまでに r-HBV を考慮した HBV 遺伝子型分類やその臨床像との関連についての検討は十分ではなく網羅的検討がなされていない。本研究では本邦と中国の夏宁らの共同研究により r-HBV の網羅的検討を行い、その臨床的・ウイルス学的特徴を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

1) DNA データバンクに登録されている HBV 全塩基配列株を用いてコンピュータ解析により全 r-HBV の検索を行いその種類について解析を行った。2) 本邦における若年発症 B 型肝炎がん 14 症例、免疫・化学療法後の HBV 再燃 4 例および中国厦門地区の B 型慢性肝疾患患者 303 例の保存血清を用いて HBV 塩基配列の決定を行い r-HBV の関与および遺伝子変異と臨床像との特徴について検討を行った。3) *In vitro* HBV 複製モデルを用いて HBV クローンのウイルス複製効率の測定を行いウイルス学的特徴の検討をおこなった。

結果

DNA データバンクに登録されている 807 本の HBV 全塩基配列株について 300bp ごとに分子系統樹の作成を行い確実な非組み換え遺伝型株 641 本を選出して分子系統樹を作成した。その 641 本をもとに sub-genotype 別を含む各遺伝子型のコンセンサス配列を作成後、残りの 166 本の

HBV 全塩基配列に対して SimPlot 解析を用いて r-HBV 株の検索を行った。SimPlot 解析にて合計 28 種類、150 株以上の r-HBV の存在が明らかとなった。遺伝子型 AD の種類が最も多く 12 種類、30 株以上の r-HBV がアフリカ、欧州、インドに分布していた。その他 2 種類の r-HBV A/C、2 種類の r-HBV A/E、1 種類の r-HBV A/G および A/B/C、アジアに広く分布する 100 株以上で最多の 2 種類の r-HBV B/C、北西中国に分布する 2 種類の r-HBV C/D、1 種類の r-HBV C/F および C/G、2 種類の U/C および 1 種類のチンパンジーと C の r-HBV が検索された。

治療前 HBs 抗原陰性で造血器悪性腫瘍に対する治療後に HBV 再活性をきたした 4 例の HBV 遺伝子型は Bj 2 例、C 2 例であり r-HBV の存在は認めなかった。CP(1762/1764)配列は全例が野生株で PC(1896)変異株は 1 例に認めた。In vitro HBV 複製モデルを用いた再活性化例の各 HBV クローン間の比較検討では、重症肝炎による死亡例の遺伝子型 Bj かつ PC 変異陽性例の HBV クローンで複製がより亢進していた (図 1)。

40 歳以下で発症した肝細胞癌 14 症例の HBV 遺伝子型は遺伝子型 A, Ba (組換え遺伝子型 B/C), C がそれぞれ 1、1、11 例に認められ、残りの 1 例は SimPlot 解析から 2814 番から 1573 番の塩基配列は遺伝子型 Ae に分類され、1574 番から 2813 番の塩基配列は遺伝子型 C に分類される既存の報告にない新たな r-HBV A/C であった (図 2)。PreS 領域において欠損変異が 64% に認められ、PreS1 と PreS2 領域の欠損変異はそれぞれ 35% と 43% に認められた。X 遺伝子の Enhancer II 領域の C1653T 変異は 29% に認められた。コアプロモーター領域の A1762T/G1764A 変異は 79% に認められた。ブレコアの G1896A 変異株は 21%、野生株は 57%、混在株は 21% に認められた。

中国厦門地区の B 型慢性肝疾患患者 303 例の遺伝子型は C 144 例 (48%)、r-HBV の Ba が 159 例 (52%) に認められた。遺伝子型毎の肝臨床病期別に年齢、性別をマッチさせたケース・コントロールスタディーにおいて (表 1, 2)、肝発癌関連 HBV 変異について遺伝子型毎に検討した。遺伝子型 Ba では既報の肝発癌関連変異である 68T, 1762T, 1764A, 1768A, 1899A は HCC 群で高頻度に認められ ($P < 0.05$) (表 3)、既報にない新たな 171320C, 1504C, 1505C, 1800C, 2045A, 2059A, 2075G 変異が HCC 群で高頻度に認められた ($P < 0.05$) (表 4)。一方遺伝子型 C では既報の肝発癌関連変異である 68T, 386I, 497G, 674C, 1762T, 1764A, 1899A は HCC 群で高頻度に認められ、($P < 0.05$) (表 5)。既報にない新たな 126T, 2120G 変異が HCC 群で高頻度に認められた ($P < 0.05$) (表 6)。

考察

中国および本邦での B 型慢性肝疾患患者から r-HBV B/C (Ba) および既報にない新たな r-HBV A/C が検出された。本邦の 40 歳以下の HBV 関連肝細胞癌発症例では遺伝子型 C が 80% を占めていたが 14% の症例に r-HBV が検出され、肝癌発症には PreS 領域の欠損変異とコアプロモーター変異との関連とともに r-HBV についても考慮する必要があると考えられた。また中国厦門地区では r-HBV の B/C (Ba) が 52% に認められ、CH および LC 群と比較して HCC 群において遺伝子型 C とは異なる変異が有意に高頻度に認められ、肝発癌と r-HBV 特異的なウイルス変異との関連が示唆された。

参考文献：

- 1) Sugauchi F, Orito E, Mizokami M et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. J Virol. 76:5985-92;2002.
- 2) Sugauchi F, Orito E, Mizokami M et al. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. Gastroenterology. 124:925-32;2003.

図1 *In vitro* HBV 複製モデルを用いた各 HBV クローン間の複製効率の比較

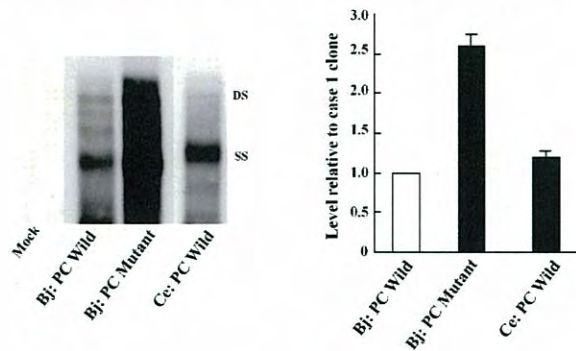


図2 本邦の若年発症肝癌例より検出された新たな組換え HBV 遺伝子型 A/C

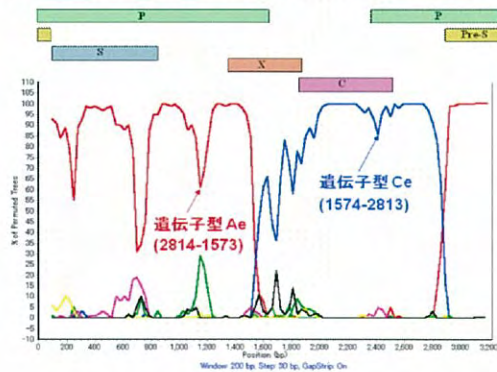


表 1

Genotype C	Clinical status			P Value
	CH (n=52)	HC (n=22)	HCC (n=70)	
Age	49±12	50±11	51±12	Matched
Sex(M:F)	42:9	15:7	10:60	Matched
HCV	0	0	0	Matched
DNA(log10)	6.2±1.6	5.2±1.4	5.0±1.3	NS
ALt(log10)	2.6±0.5	1.8±0.4	1.7±0.3	<i>P</i> <0.001
HBeAg	30(57.7%)	3(13.6%)	9(11.7%)	<i>P</i> <0.001
Anti-HBe	22(42.3%)	12(54.5%)	44(54.1%)	<i>P</i> =0.032
Bibulosity	6(11.5%)	3(13.6%)	13(16.9%)	NS
AFP(log10)	1.2±0.7	1.5±0.9	3.1±1.5	<i>P</i> <0.001
Familial	11(21.2%)	6(27.3)	8(11.4%)	NS

表 2

Genotype B	Clinical status			P Value	Base line in ASC N=83
	CH (n=86)	HC (n=16)	HCC (n=57)		
Age	48±10	50±12	49±11	Matched	32±13
Sex(M:F)	74:12	13:3	51:6	Matched	45:38
HCV	0	0	0	Matched	0
DNA(log10)	6.6±1.7	4.7±2.0	4.5±1.6	<i>P</i> <0.001	unknown
ALt(log10)	2.6±0.5	1.7±0.4	1.7±0.3	<i>P</i> <0.001	<1.6 log10
HBeAg	41(47.7%)	4(25.0%)	6(10.5%)	<i>P</i> <0.001	29/34.9%
Anti-HBe	31(36.0%)	7(43.8%)	38(66.7%)	<i>P</i> <0.001	43/51.8%
Bibulosity	15(17.4%)	10(62.5%)	10(17.5%)	<i>P</i> <0.001	unknown
AFP(log10)	1.2±0.8	0.8±0.6	2.6±1.6	<i>P</i> <0.001	unknown
Familial	17(19.8%)	6(25.0%)	7(12.3%)	NS	7(8.0%)

表 3

Reported HCC-related Mutations of Patients Infected with HBV/B in Minnan					
Genotype B	Clinical status				Base line in ASC N=83
	CH (n=86)	HC (n=16)	HCC (n=57)	P Value	
I68T(sAg)	1(1.2%)	1(6.3%)	7(12.3%)	0.009	3(3.6%)
I653I(X:I194Y)	1(1.2%)	2(12.5%)	3(5.2%)	0.230	2(2.4%)
I753C(X:I127T)	1(1.2%)	0	2(3.5%)	0.494	2(2.4%)
I762I(X:K130M)	19(22.1%)	4(25.0%)	38(66.7%)	<0.001	15(18.0%)
I764A(X:V131I)	18(20.7%)	4(25.0%)	33(57.9%)	<0.001	16(18.0%)
I766T(X:Nc)	0	0	2(3.5%)	0.164	3(3.6%)
I768A(X:F132Y)	0	1(6.3%)	4(7.0%)	0.037	1(1.2%)
I896A(PcMut)	53(61.2%)	12(75.0%)	40(70.2%)	0.313	47(56.6%)
I899A(PcMut)	10(11.6%)	4(25.0%)	22(38.6%)	<0.001	10(10.8%)

表 4

New HCC-Related Mutations of HBV Infected Patients with HBV/B in Minnan					
Genotype B	Clinical status				Base line in ASC N=87
	CH (n=86)	HC (n=16)	HCC (n=57)	P Value	
A1320C(Xp)	5(5.8%)	0	12(21.0%)	0.008	8(9.6%)
I504C(X:I44T)	3(3.4%)	1(6.3%)	10(17.5%)	0.006	4(4.8%)
I505C(X:Nc)	3(3.4%)	1(6.3%)	9(15.8%)	0.014	2(2.4%)
I635G(X:N88D)	1(1.2%)	1(6.3%)	4(7.0%)	0.346	1(1.1%)
I636I(X:N88D)	1(1.2%)	1(6.3%)	4(7.0%)	0.346	1(1.1%)
I800C(X:C143R)	3(3.4%)	2(12.5%)	15(26.3%)	<0.001	6(7.2%)
2045A(C:S45I)	6(7.0%)	2(12.5%)	11(19.3%)	0.037	9(10.8%)
2059A(C:Nc)	1(1.2%)	1(6.3%)	7(8.4%)	0.009	2(2.3%)
2075G(C:I59V)	2(2.3%)	1(6.3%)	7(8.4%)	0.027	2(2.3%)

表 5

Reported HCC-related Mutations of HBV/C in Minnan				
Genotype C	Clinical status			P Value
	CH (n=52)	HC (n=22)	HCC (n=70)	
I68T(HBsAg)	4(7.7%)	2(9.1%)	15(21.4%)	0.042
I386A(X:V4M)	9(17.3%)	6(27.3%)	29(41.4%)	0.008
I467C(X:G32R)	10(19.2%)	5(22.7%)	22(31.4%)	0.169
I497G(X:S42A)	7(13.5%)	5(22.7%)	23(32.9%)	0.018
I653T(X:H94Y)	6(11.5%)	6(27.3%)	19(27.1%)	0.056
I674C(X:S101P)	4(7.7%)	2(9.1%)	15(21.4%)	0.042
I753C(X:I127T)	8(15.4%)	4(18.2%)	21(30.0%)	0.069
I762T(X:K130M)	25(48.1%)	16(72.7%)	54(77.1%)	0.001
I764A(X:V131I)	29(55.8%)	19(86.4%)	64(91.4%)	<0.001
I766T(X:Nc)	7(13.5%)	7(31.8%)	13(18.5%)	0.620
I768A(X:F132Y)	1(1.9%)	9(40.9%)	10(14.3%)	0.114
I896A(PcMut)	17(32.7%)	10(45.5%)	40(57.1%)	0.173
I899A(C:V4M)	2(3.8%)	4(18.2%)	15(21.4%)	0.011

表 6

New HCC-Related Mutations of HBV Infected Patients with HBV/C in Minnan				
Genotype C	Clinical status			P Value
	CH (n=52)	HC (n=22)	HCC (n=70)	
I126T(sAg)	10(19.2%)	5(22.7%)	28(40.0%)	0.016
I320C(Xp)	5(9.6%)	2(9.1%)	11(15.7%)	0.378
I846T(PcMut)	9(17.3%)	6(27.3%)	23(32.9%)	0.071
2120G(C:S74G)	1(1.9%)	2(9.1%)	14(20.0%)	0.003

作成日：2009 年 3 月 6 日

財団法人日中医学協会
2008 年度共同研究等助成金一調査・共同研究一報告書

財団法人 日中医学協会御中

2009 年 3 月 15 日

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 鈴木 一幸
所属機関名： 岩手医科大学
所属部署：消化器・肝臓内科 職名：教授
〒020-8505
所在地：盛岡市内丸 19-1
電話：019-651-5111 内線：3210



1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

日中間における B 型肝炎ウイルス (HBV) による急性肝炎・劇症肝炎の病態の差異

3. 成果の概要 (100 字程度)

岩手医科大学消化器・肝臓内科 (日本) 及び中国貴州省遵義医学院附属病院感染科 (中国) で経験した急性肝炎 (AH) 例と劇症肝炎 (FH) 例の HBV genotype 及び subtype を測定したところ、日本における AH・FH では genotype C が、一方、中国では genotype B が主体を占めた。また、genotype B では中国例はすべて Ba 型であった。さらに、precore 及び core promoter 領域の変異頻度にも差異が認められた。

※発表論文等

- 1) 阿倍弘一、鈴木一幸：B 型肝炎キャリアの長期予後。日本医事新報、4393：90-91, 2008.
- 2) 滝川康裕、遠藤龍人、小野寺美穂、柿坂啓介、片岡晃二郎、佐藤彰宏、鈴木一幸：急性重症肝障害における DIC 合併の診断と治療法の検討。東北止血・血栓研究会会誌 1：20-24, 2008.
- 3) 遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸：劇症肝炎に対する血液浄化療法の有効性と今後の課題。臨床消化器内科、23：1781-1787, 2008.
- 4) 滝川康裕、鈴木一幸：急性肝不全・劇症肝炎。からだの科学、258：55-99, 2008.

4. 研究組織

日本側研究者氏名：	鈴木 一幸	職名：	教授
所属機関：	岩手医科大学	部署：	消化器・肝臓内科
中国側研究者氏名：	林 世徳	職名：	教授
所属機関：	中国貴州省遵義医学院附属病院	部署：	感染科

日中間における B 型肝炎ウイルス (HBV) による急性肝炎・劇症肝炎の病態の差異

研究者氏名	鈴木一幸
日本所属機関	岩手医科大学消化器・肝臓内科教授
中国所属機関	貴州省遵義医学院附属病院感染科教授
共同研究者名	林 世徳

要旨

B 型肝炎ウイルス (HBV) による genotype、precore 領域及び core promoter 領域の変異の有無が肝病態に影響することが明らかになってきていることから、日中間における急性肝炎 (AH) と劇症肝炎 (FH) において HBV genotype 頻度や precore 領域及び core promoter 領域の変異の有無について比較検討した。日本における AH・FH では genotype C が、一方、中国では genotype B が主体を占めた。また、genotype B では中国例はすべて Ba 型であった。さらに、precore 及び core promoter 領域の変異頻度にも差異が認められた。

Key Words B 型肝炎ウイルス (HBV)、HBV 遺伝子型、急性肝炎、劇症肝炎

目的：

アジア地域では B 型肝炎ウイルス (HBV) による急性肝炎は日常よく遭遇する肝疾患の 1 つである。最近、HBV の genotype、precore 領域及び core promoter 領域の変異の有無が肝病態 (劇症化、肝炎の進展、発癌) に影響することが明らかになってきているが、日中間における急性肝炎 (AH) と劇症肝炎 (FH) において HBV genotype 頻度や precore 領域及び core promoter 領域の変異の有無について比較検討した報告はない。

対象と方法：

岩手医科大学消化器・肝臓内科 (日本) 及び中国貴州省遵義医学院附属病院感染科 (中国) で経験した AH (それぞれ 30 例、12 例)、FH (11 例、17 例) を対象として genotype を測定し、genotype B については subtype (Ba、Bj) を検討した。さらに、precore 領域及び core promoter 領域の変異の有無を検討した。

結果：

表 1 に対象の背景を示す。性差では両国とも男性が多い傾向を示し、年齢は両国とも若年者であり、とくに中国の AH 例で最も低年齢であった。肝機能では血清トランスアミナーゼ値が日本例で高い傾向を示した。日本における AH30 例の genotype は A:3 (10%)、B:3 (10%)、C:23 (76.3%)、Bj+C:1 (3.3%) であり、FH11 例では A:0 (0%)、B:2 (18.2%)、C:9 (81.8%) であった。Genotype B の 3 例のうち 1 例が Ba、2 例が Bj であった。一方、中国の AH12 例では B:8 (66.7%)、C:4 (33.3%)、FH17 例では B:13 (76.5%)、C:4 (23.5%) であり、B はすべて Ba であった。Precore 領域及び Core promoter 領域の変異の有無を検討したところ、表 2 に示すように日本例では中国例に比しとくに FH 例で Precore 領域及び Core promoter 領域に変異を有する例が高かった。また、AH 例でみるといずれの変異も中国例で高い頻度を示した。

表1. 対象の背景因子

項目	日本		中国	
	AH	FH	AH	FH
例数	30	11	12	17
性(男:女)	19:11	5:6	9:3	16:1
年齢(歳)	37.1±18.0	39.5±17.0	24.5 ± 7.9	37.4 ± 10.4
肝機能検査値*				
T-Bilirubin (mg/dl)	7.7±7.8	8.6±3.1	6.4±3.5	16.3±9.8
AST(IU/l)	1208±883	3453±3021	745±449	605±565
ALT(IU/l)	2006±1186	4555±3118	1245±545	590±541
Prothrombin time (%)	79.1±23.3	15.6±10.2	100.6±28.3	29.7±9.7

* 入院時(平均値±標準偏差)

表2. HBV genotypeとprecore、core promoter変異の頻度

項目	日本		中国	
	AH	FH	AH	FH
Genotype				
A	3(10.0%)	0	0	0
Ba	1(3.3%)	0	8(66.7%)	13(76.5%)
Bj	2(6.7%)	2(18.2%)	0	0
C	23(76.7%)	9(81.8%)	4(33.3%)	4(23.5%)
H	0	0	0	0
Bj+C	1(3.3%)	0	0	0
Precore変異				
G1896A	2(6.7%)	9(81.8%)	3(25.0%)	7(41.2%)
G1899A	1(3.3%)	2(18.2%)	0	1(5.9%)
Core promoter変異				
A1762T and G1764A	4(13.3%)	9(81.8%)	5(41.7%)	9(52.9%)

考察：

日中間の急性肝炎および劇症肝炎の HBV genotype には差異がみられ、日本では genotype C が、中国では genotype B が主体を占め、両国間で差異が認められた。また、中国の genotype B はすべて Ba であった。さらに、Precore 領域及び Core promoter 領域の変異の有無にも差異を認め、これには genotype B の subtype が関連していることが考えられた。

今回の検討では、中国からの患者検体の移送に関わる中国政府との手続きに時間を要したため、研究期限内に詳細な報告を行うには至らなかった。また、わが国で検討されている急性肝炎重症型との比較は中国例の検体がえられなかったため、検討は出来なかった。今後、症例 HBV の genotype, precore 及び core promoter 領域の変異と肝病態の関連を詳細に検討する予定である。

参考文献

- 1) 阿倍弘一、鈴木一幸：B型肝炎キャリアの長期予後. 日本医事新報、4393：90-91, 2008.
- 2) 滝川康裕、遠藤龍人、小野寺美穂、柿坂啓介、片岡晃二郎、佐藤彰宏、鈴木一幸：急性重症肝障害における DIC 合併の診断と治療法の検討. 東北止血・血栓研究会会誌 1：20-24, 2008.
- 3) 遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸：劇症肝炎に対する血液浄化療法の有効性と今後の課題. 臨床消化器内科、23：1781-1787, 2008.
- 4) 滝川康裕、鈴木一幸：急性肝不全・劇症肝炎. からだの科学、258：55-99, 2008.

作成日：2009 年 3 月 15 日

財団法人日中医学協会

2008 年度共同研究等助成金・調査・共同研究報告書

平成 21 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： 安井 孝周
所属機関名： 名古屋市立大学大学院医学研究科
所 属 部 署： 腎・泌尿器科学分野 職名： 講師
所 在 地： 〒467-8601
名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1
電話： (052) 852-5511 内線： 8266

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

尿路結石に特徴的な一塩基多型による人種差の検討

3. 成果の概要 (100 字程度)

尿路結石患者に特徴的な遺伝子多型をオステオポンチン (OPN) で同定し、遺伝子多型により、OPN プロモーター活性が変化することを確認した。さらに、全ゲノムの網羅的探索によって尿路結石と強い関連を示す、4 番染色体長腕および 17 番染色体短腕の 2 領域を同定した。

(中国人共同研究者 高兵が 2008 年 5 月 31 日～8 月 2 日来日し、上記研究を共同して行い、成果を、第 11 回国際尿路結石症シンポジウムで発表した。)

※ 発表論文等

Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for urolithiasis.(投稿準備中)

4. 研究組織

日本側研究者氏名：安井 孝周 職名： 講師

所属機関：名古屋市立大学大学院医学研究科 部署：腎・泌尿器科学分野

中国側研究者氏名： 高 兵 職名： 教授

所属機関：瀋陽医学院

部署：細胞生物与遺伝学研究室

尿路結石に特徴的な一塩基多型による人種差の検討

研究者氏名 安井 孝周
所属機関 名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科学分野 講師
共同研究者名 高兵

要旨

尿路結石は遺伝因子に食生活などの生活習慣である環境因子が重なり、発症すると考えられる。遺伝子の一塩基多型 (SNPs) は個体差を形成し、多因子疾患の原因となることが報告されている。疾患に相関する特定遺伝子の SNPs が判別出来れば、個体レベルでの発症リスクを推測し、疾患の早期診断、予防に有用である。本研究では、OPN の SNPs 解析により結石発生のリスクとの関係を検討し、機能解析を中国人共同研究者とともにを行った。また、ピロリン酸のトランスポーターである ANKH 遺伝子でも検討した。さらに、ゲノムワイドな網羅的探索によって、新規の関連遺伝子領域を同定した。

OPN の SNPs では人種差を同定できなかったが、プロモーター解析によって結石と健常者に特徴的な SNPs によって発現変化が生じることを確認し、機能に変化が生じることが推察された。ANKH では特徴的な SNPs を見つけられなかった。上記研究を、中国人共同研究者 高兵が 2008 年 5 月 31 日～8 月 2 日来日し、共同して行い、成果を、第 11 回国際尿路結石症シンポジウムで発表した。大規模なゲノムワイドに網羅的解析を行い、日本人において尿路結石症と強い関連を示す、4 番染色体長腕および 17 番染色体短腕の 2 領域を同定した。今後、遺伝子領域の中で、特定遺伝子を同定し、機能解析を行うことと、各遺伝子型における再発率を検討することで、遺伝子診断への応用が期待できる。

Key Words 尿路結石, オステオポンチン, 遺伝子多型, ゲノムワイド

緒 言：

尿路結石は遺伝因子に食生活などの生活習慣である環境因子が重なり、発症すると考えられる。尿路結石症の生涯罹患率は急増し、我が国では 100 人中 6 人、欧米では 20 人にも達する国もみられ、生産年齢の男性に多く、その成因の究明と再発予防法の確立は急務であるが、遺伝子レベルに研究が進んでからも画期的な再発予防法は開発されていない。

オステオポンチン (OPN) はカルシウム結石のマトリクスとして同定され、結石モデルラットでは結石形成に先行して発現し、尿細管細胞と尿酸カルシウム結晶の接着、結晶の成長に関与し、結石形成に重要な役割を果たすと考えられている。

遺伝子の一塩基多型 (SNPs) は個体差を形成し、多因子疾患の原因となることが報告されている。疾患に相関する特定遺伝子の SNPs が判別出来れば、個体レベルでの発症リスクを推測し、疾患の早期診断、予防に有用である。本研究では、OPN の SNPs 解析により結石発生のリスクとの関係を検討した。また、ピロリン酸のトランスポーターである ANKH 遺伝子でも検討した。

さらに、同定されていない遺伝子を含めたゲノムワイドに遺伝子解析を行うため、タグ SNP を用いた網羅的探索法にて検討した。

対象と方法：

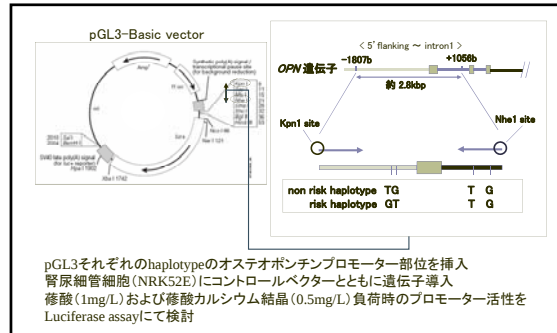
SNP の同定と解析

カルシウム結石患者 126 名(平均 57.6±13.5 歳、男性 93 名、女性 33 名)と結石既往のない健常者 214 名(平均 68.6±11.8 歳、男性 165 名、女性 49 名)を対象とした。まず、99 例で血液よりゲノム DNA を抽出し、OPN 遺伝子の全配列を決定した。連鎖不均衡解析を行い、結石患者に特徴的な haplotype

tagging SNPs (htSNPs)について全例で SNPs を検討、解析した。ANKH では全ゲノムの遺伝子配列を同定し、同様に解析を行った。

OPN プロモーター活性の検討

特徴的な htSNPs について、蓚酸 (1mM) および蓚酸カルシウム一水和物 (COM) 結晶 (500 μ g/ml) 添加時のプロモーター活性を検討した。それぞれの htSNPs について、-1807bp から 1056bp 領域をプラスミド pGL3 basic vector に組み込み、HK-2 細胞 (ヒト腎尿細管細胞由来) にコントロールプラスミド (pRL-TK) とともに co-transfection した。蓚酸 (1mM) または蓚酸カルシウム一水和物 (COM) 結晶 (500 μ g/ml) を添加し、OPN プロモーター活性を 1,3,6,12,24 時間後に Luciferase assay にて経時的に検討した。



結石関連遺伝子のゲノムワイドな網羅的探索

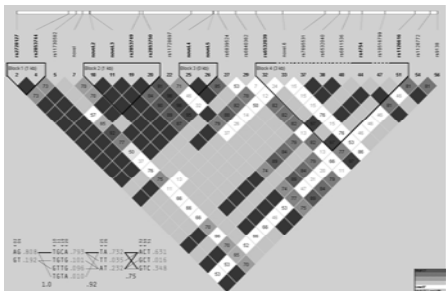
カルシウムを主成分とする尿路結石の形成機序は、食事などの環境因子に加えて、遺伝因子が重要であると考えられる。遺伝因子としては、「個人差程度の違い」である遺伝子多型 (SNP) が、いくつも複雑に関連して疾患が発症していると考えられている。ハプロタイプブロックの領域には、「タグ SNP」と呼ばれる、その領域を代表する SNP が存在しており、約 10 万ヶ所のタグ SNP をタイピングすることで、尿路結石関連遺伝子の一次スクリーニングを行い、インフォームドコンセントのうえ、収集した結石患者のゲノム遺伝子を、1000 名以上で二次スクリーニングを行った。

結 果：

SNP の同定と解析

61 ヶ所の SNPs を確認し、連鎖不均衡解析にて 4 つの block を同定した (図 1)。Block 2 で結石患者および健常者に特異的なハプロタイプを同定した。結石患者と健常者の遺伝子型を比較すると、ハプロタイプ G-T-T-G は結石患者に多く ($p=0.0227$ odds 比 1.676)、ハプロタイプ T-G-T-G は健常者に多く ($p=0.016$ odds 比 0.351) みられた。日本人と中国人での差異については明らかにできなかった。

99名のOPN SNPについて連鎖不均衡解析を行った。太枠の内部がhaplotype blockを示し、太字の SNP 番号がブロック内のhaplotype tagging SNP (htSNP)を示す。



尿路結石患者 (126名) と健常者 (214名) でBlock2にあるhaplotypesについて解析を行った。 GTTGは結石患者に多く、 TGTGは健常者 (非結石患者) に多い**。

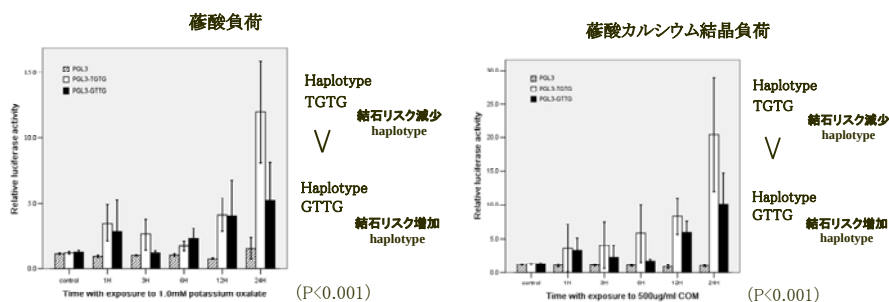
Block 2 Haplotypes (SNP Frequency 10-11-19-20)		Cases (n=126)	Controls (n=214)	OR	95% CI	Chi square	P value
TGCA	0.756	192.0 / 60.0	321.9 / 106.1	1.054	0.659-1.364	0.080	0.7777
GTTG	0.132	43.0 / 209.0	46.8 / 381.2	1.676	1.072-2.621	5.189	0.0227*
TGTG	0.088	11.0 / 241.0	49.2 / 378.8	0.351	0.179-0.689	9.978	0.0016**
TGCG	0.012	4.0 / 248.0	3.8 / 424.2	1.801	0.438-7.395	0.667	0.414

* $P<0.05$. ** $P<0.01$.

ANKH 遺伝子で、SNPs を同定したが、結石患者と健常者に特徴的な SNPs は同定できなかった。

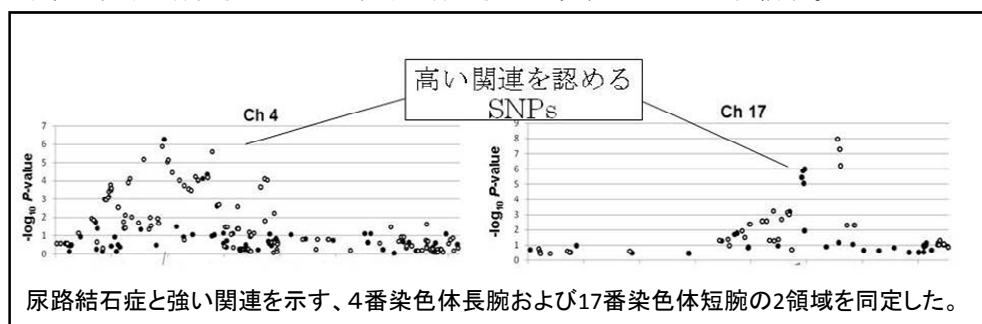
OPN プロモーター活性の検討

Luciferase assay では蓚酸および COM 結晶の刺激により、OPN プロモーター活性は経時的に上昇し、24 時間後にピークを認めた。ハプロタイプ TG-TG はハプロタイプ G-TTG と比較して、蓚酸または COM 結晶刺激による、OPN プロモーター活性が有意に上昇していた。



結石関連遺伝子のゲノムワイドな網羅的探索

多因子疾患として OPN 以外の遺伝因子を探索するため、以下の如く尿路結石症としては世界初となるゲノムワイド解析を行った。同定されていない関連遺伝子も含めた全ゲノムの網羅的探索として、尿路結石患者と健常者の大規模ゲノムワイド関連解析を行い、日本人において尿路結石症と強い関連を示す、4 番染色体長腕および 17 番染色体短腕の 2 領域を同定した(投稿中)。



考 察：

カルシウム結石は単一の遺伝子異常で説明ができていないが、近年、遺伝子多型(一塩基多型、single nucleotide polymorphism: SNP)を中心とした解析が行われ、カルシウム代謝に関係する Vitamin D 受容体、カルシウム感受性受容体、ウロキナーゼ等について報告されてきている。

本研究ではカルシウム結石患者と健常者を比較し、結石マトリクスである OPN について有意に、ハプロタイプ G-TTG では結石発症のリスクが高く、ハプロタイプ TG-TG では健常者(非結石患者)である可能性が高いことを示した。さらに、それぞれのハプロタイプでプロモーター活性が変化することを確認した。採血による遺伝子解析によって、特定のハプロタイプで尿路結石の発症リスクが診断できる可能性があり、再発予防に有用であることが示唆された。

ゲノムワイドな網羅的探索で得られた関連遺伝子領域については、特定遺伝子を同定し、今後機能解析と、尿路結石患者と健常者における再発について検討することで、新規関連遺伝子の同定、再発リスク診断が可能となる将来性が期待される。

参考文献

1. Okada A, Yasui T, Hamamoto S, Hirose M, Kubota Y, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Genome-Wide Analysis of Genes Related to Kidney Stone Formation and Elimination in the Calcium Oxalate Nephrolithiasis Model Mouse: Detection of Stone-Preventive Factors and Involvement of Macrophage Activity. J Bone Miner Res. 2008 Dec 29. [Epub ahead of print]

2. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Li Z, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Association of osteopontin gene haplotypes with nephrolithiasis. *Kidney Int.* 72(5):592-8, 2007.
3. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stones. *J Urol.* 177(6):2361-5, 2007.
4. Gao B, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. *J Urol.* 174(4 Pt 1):1472-6, 2005.
5. Vezzoli G, Soldati L, Proverbio MC, Adamo D, Rubinacci A, Bianchi G, Mora S: Polymorphism of vitamin D receptor gene start codon in patients with calcium kidney stones. *J Nephrol.* 158-164, 2002.
6. Nishijima S, Sugaya K, Naito A, Morozumi M, Hatano T, Ogawa Y: Association of vitamin D receptor gene polymorphism with urolithiasis. *J Urol.* 167: 2188-2191, 2002.
7. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, Soldati L, Bianchin C, Franceschelli F, Malentacchi C, Porfirio B, Adamo D, Terranegra A, Falchetti A, Cusi D, Bianchi G, Brandi ML: Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol.* 13: 2517-2523, 2002

学会発表：

Takahiro Yasui, Bing Gao, Yasunori Itoh, Masayuki Usami, Atsushi Okada, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Yasuhiko Hirose, Masahito Hirose, Keiichi Tozawa, Kenjiro Kohri. Haplotypes in the *osteopontin* gene associate with nephrolithiasis and without bone mineral density. 11th International Symposium on Urolithiasis (Nice, France) Sep 2-5, 2008 (presentation Sep 4, 2008)

作成日：2009年3月8日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2009 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： 洪 光 
所属機関名： 広島大学大学院医歯薬学総合研究科
所属部署： 歯科補綴学研究室 職名： 助教
〒734-8553
所在地： 広島市南区霞 1-2-3
電話： 082-257-5681 内線：

1. 助 成 金 額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

唾液分泌増強作用を有する生薬成分配合義歯安定剤に関する研究

3. 成果の概要（100字程度）

義歯安定剤の増粘剤であるメトキシエチレン無水マレイン酸共重合体（PVM-MA）およびカルボキシメチルセルロース（CMC）の含有量が本剤の理工学的性質に及ぼす影響について比較、検討を行った結果、PVM-MA 35wt%、CMC 20wt%、ワセリン 40wt%、流動パラフィン 5wt%含有する試作品が長時間作用型クリームタイプ義歯安定剤として有望であることが示唆された。また、バクモントウからの抽出成分を用いた老齢ラットで耳下腺管腔膜 AQP5 の増加が認められた。

※発表論文等

- 洪 光, 林田健太郎, 前田武志ら：PVM-MA および CMC 含有量が試作クリームタイプ義歯安定剤の理工学的性質に及ぼす影響。日本補綴歯科学会九州支部・中国・四国支部共同学術大会(別府), 2008. 8. 30.
- Hong G, Lian YM, Sadamori S, Hamada T, Murata H.: A questionnaire survey of dentists and dental students in China about denture adhesives. Int Chin J Dent 8(3), 33-37, 2008.

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 洪 光 職名： 助教
所属機関： 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 部署： 歯科補綴学研究室
中国側研究者氏名： 鄭 剛 職名： 教授
所属機関： 北京大学口腔医学院 部署： 歯科材料研究室

唾液分泌増強作用を有する生薬成分配合義歯安定剤に関する研究

日本側研究者氏名	洪 光
所 属 機 関	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 歯科補綴学研究室 助教
中国側研究者氏名	鄭 剛
所 属 機 関	北京大学口腔医学院 歯科材料研究室 教授

要 旨

高齢者では、特に総義歯装着者では口腔乾燥症が高い頻度で認められ、摂食・嚥下障害や義歯装着困難な患者が増え続けている。漢方医学では古くから口腔乾燥症の治療に生薬を使っていた。そこで、多くの総義歯装着者は義歯装着困難を解決するために義歯安定剤に口腔乾燥症治療効果を有する生薬成分を配合することにより唾液分泌増強作用を有する生薬成分配合義歯安定剤に関する検討を行った。まずは、長期作用型クリームタイプ義歯安定剤の開発を目指し、本剤の増粘剤であるメトキシエチレン無水マレイン酸共重合体 (PVM-MA) およびカルボキシメチルセルロース (CMC) の含有量が本剤の理工学的性質に及ぼす影響について比較、検討を行った。その結果、PVM-MA 35wt%、CMC 20wt%、ワセリン 40wt%、流動パラフィン 5wt% 含有する試作品が長時間作用型クリームタイプ義歯安定剤として有望であることが示唆された。その次は、生薬抽出成分が Wistar rat の耳下腺管腔膜のアクアポリン 5 (AQP5) に及ぼす影響を検討するため、ブクリョウ、トウキシおよびバクモントウの 3 種類の生薬を用い、99%エタノール浸漬 2 ヶ月による成分抽出を行い実験に用いた。8 週齢および 9 ヶ月齢の Wistar rat にそれぞれの生薬抽出成分を飲用水に 80ppm 添加し、2 ヶ月間投与した。その後屠殺し、耳下腺免疫染色切片を作製し、共焦点走査型レーザー顕微鏡で解析を行った。その結果、バクモントウからの抽出成分を用いた老齢ラットで耳下腺管腔膜 AQP5 の増加が認められた。以上のことから、長時間作用型クリームタイプ義歯安定剤に生薬成分を配合することにより、口腔乾燥症に用いる唾液分泌増強作用を有する生薬成分配合義歯安定剤の開発が可能であることが示唆された。

Key Words 生薬, 義歯安定剤, AQP5, 口腔乾燥症, 粘着力

緒 言:

中国は 1999 年に経済発展と共に高齢化社会に突入し、高齢化率は 11% であり、アジアの高齢者全体の半分を抱えている。中国国家高齢化問題委員会の調査によると、2020 年には高齢者人口は全人口の 17.2% に増加し、2051 年には、全人口の 30% 以上を占めるようになると予測している。しかも、一人っ子政策を特に都市部において厳格に実施してきた影響で、都市部を中心に高齢化問題が顕在化している。内閣府の「平成 19 年版高齢社会白書」によると、日本の高齢化率は 20.8% であり、高齢社会から確実に超高齢社会 (高齢化率 21.0% 以上) を迎えている。それにともない日中両国において、総義歯患者も増加するものと考えられる。また、現代社会はドライといわれ、ドライアイ、ドライスキン、ドライマウスといずれも保湿系補助剤が必要になっている。高齢者では、口渇感、咽頭部の乾きなどを訴えるものが多く、いわゆるドライマウス (口腔乾燥症) が高い頻度で認められ、摂食・嚥下障害、口臭や義歯装着困難な患者が増え続けている。人は老化により管腔膜の AQP5 量

が減少し、唾液分泌が減少すると考えられる。疫学的には 65 歳以上の高齢者のうち 56.1%が口腔乾燥症を自覚していると報告されており、早急な対策が望まれている。総義歯の口腔内での維持力は、介在唾液の粘度（ η ）などの要素により決まり、介在唾液の粘度は高い程（ η が大きい程）接合力は高いことが明らかである。漢方医学では古くから口腔乾燥症の治療に生薬を使っている、“神農本草経”などの薬物書にも、絡石（らくせき）、麦門冬（ばくもんどう）などは口と舌が乾く病などを治すことができ、尿、汗、涙、むくみ、唾液の 5 種類の体液の異常な状態のゴリュウの病を治すことができるとも記載されている。

そこで、これらの生薬成分を義歯の維持・安定に使用されている義歯安定剤に配合することにより、唾液分泌増強作用を有する義歯安定剤の試作が可能であると考えられ、長期作用型クリームタイプ義歯安定剤の試作および生薬抽出成分が Wistar rat の耳下腺管腔膜のアクアポリン 5（AQP5）に及ぼす影響について検討を行った。

対象と方法：

本研究で使用した試作義歯安定剤の組成成分を表 1 に示す。メトキシエチレン無水マレイン酸共重合体（PVM-MA）、カルボキシメチルセルロース（CMC）、ワセリン（PL）および流動パラフィン（LP）を組み合わせ、A から J の十種類を作製した。またコントロールとして PL100wt%の試料を使用した。

表 1：試作義歯安定剤の成分組み合わせ

Code	PVM-MA	CMC	PL	LP
Control	0 wt%	0 wt%	100 wt%	0 wt%
A	60 wt%	0 wt%	40 wt%	0 wt%
B	50 wt%	0 wt%	50 wt%	0 wt%
C	30 wt%	0 wt%	70 wt%	0 wt%
D	0 wt%	35 wt%	65 wt%	0 wt%
E	0 wt%	30 wt%	70 wt%	0 wt%
F	0 wt%	20 wt%	80 wt%	0 wt%
G	35 wt%	15 wt%	50 wt%	0 wt%
H	30 wt%	20 wt%	50 wt%	0 wt%
I	25 wt%	25 wt%	50 wt%	0 wt%
J	35 wt%	20 wt%	40 wt%	5 wt%

表 2：市販義歯安定剤

Code	Material	Manufacturer	Type
PGS	ポリグリップ S	GSK(株)	クリーム
CRC	コレクトクリーム	塩野義製薬(株)	クリーム
LDC	ライオデントクリーム	ライオン(株)	クリーム
PGP	ポリグリップパウダー	GSK(株)	粉末
PDT	ポリデント	GSK(株)	クッション

また、比較検討のために、表 2 に示す 3 種類の市販クリームタイプ義歯安定剤、1 種類の市販粉末タイプおよび 1 種類のクッションタイプの計 5 種類を用いた。

初期粘度の測定は、キャリメド社製ストレス制御式レオメーター CSL500 を用い、直径 20mm、コーン角 2 度のコーンプレートで、カップ間距離 54 μm 、測定温度 37 度、ずり速度 1 から 10 における各材料の粘度を測定した。粘着強さの測定は、日本工業規格 JIS T6525-1 の規定とおり、試料 0.5 g を試料ホルダに均一に塗布し、37 度蒸留水に 0、1、10、30、60、180 および 360 分浸漬した後、9.8N のおもりで 30 秒間圧着後、引張モード、クロスヘッドスピード 5mm/min で粘着強さを測定しました。測定には Instron 社製の材料試験機 5565 を使用した。得られたデータは一元配置分散分析および SNK による多重比較を危険率 5% で統計処理を行った。

生薬抽出成分がラット耳下腺管腔膜のアクアポリン 5 (AQP5) に及ぼす影響については、まずは、ブクリョウ、トウキシおよびバクモントウの 3 種類の生薬を 99% エタノール浸漬 2 ヶ月による成分抽出を行った。8 週齢および 9 ヶ月齢の Wistar rat (Charles river Co.) 40 匹に、それぞれの生薬抽出成分を飲用水に 80ppm 添加し、2 ヶ月間投与を行った。その後屠殺し、耳下腺を採集、免疫染色切片を作製し、共焦点走査型レーザー顕微鏡により解析を行った。

結 果:

初期粘度の結果は図 1 に示す。材料間で有意差が認められ、Control と CRC が他の材料より有意に低い粘度を示し、最も高い粘度を示した材料は市販クッションタイプの PDT であった ($p < 0.05$)。試作品では水溶性高分子の含有量が低いほど粘度は低くなる傾向であった。

浸漬前における各材料の粘着強さを図 2 に示す。材料間で有意差が認められ、試作品 I が最も低い値を示し、Control と市販粉末タイプの PGP が有意に高い粘着強さを示した ($p < 0.05$)。試作品では水溶性高分子の含有量が低いほど浸漬前における粘着強さが高い値を示した。

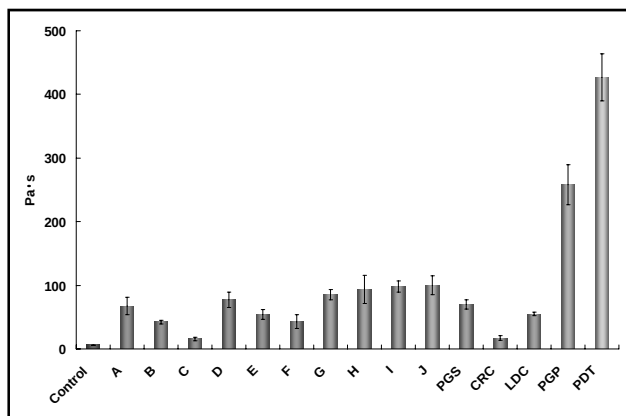


図 1：各材料の初期粘度

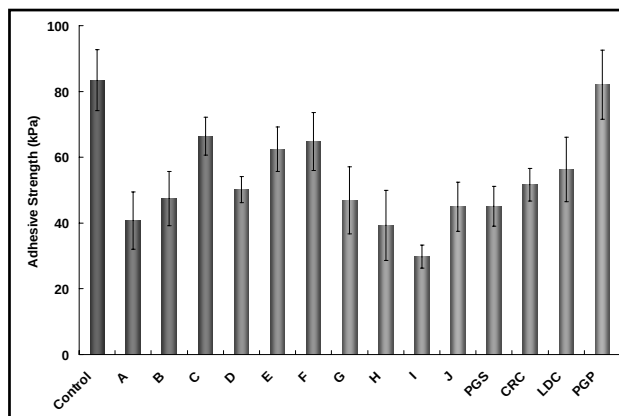


図 2：各材料の浸漬前における粘着強さ

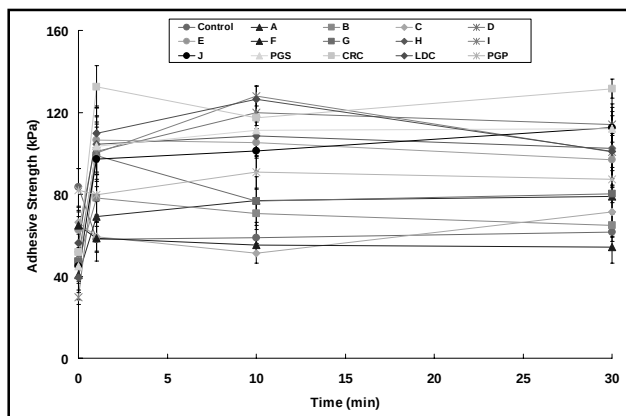


図 3：各材料の浸漬 30 分までの粘着強さ

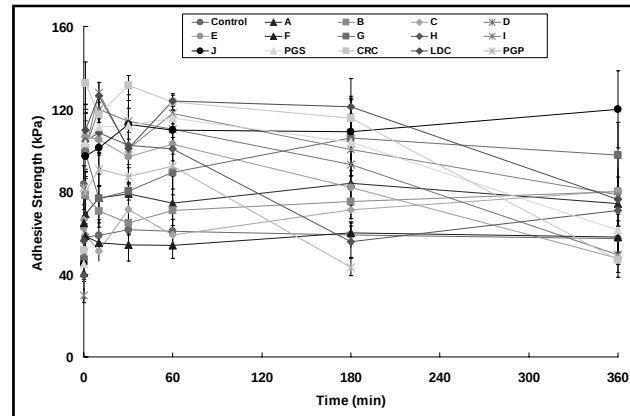


図 4：各材料の浸漬 360 分までの粘着強さ

浸漬 30 分までの粘着強さを図 3 に示す。Control、試作品 C および F を除いたすべての材料では浸漬 1 分後、顕著な粘着強さの上昇が認められた。Control、試作品 C および F では浸漬 1 分後の粘着強さは浸漬前より有意に低下した。図 4 に浸漬 360 分までの粘着強さを示す。すべての市販製品では浸漬 60 分から 180 分間で粘着強さの低下が認められた。市販粉末タイプの PGP は浸漬 180 分後材料が溶解して測定不能であった。試作品では CMC 含有の材料は浸漬 30 分から 60 分後には粘着強さが低下するのに対し、PVM-MA 含有の材料では浸漬 30 分から 60 分後には粘着強さが上昇する傾向を示した。試作品 J の粘着強さは浸漬 30 分まで上昇した後、360 分まで安定した傾向を示し、浸漬 360 分後には他の材料に比べて有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

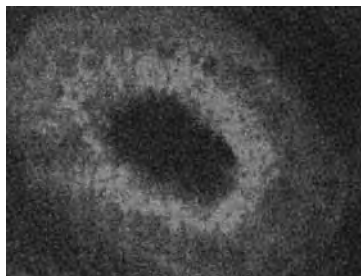


図 5：蒸留水投与群

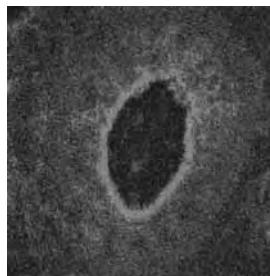


図 6：バクモントウ投与群

図 5 に蒸留水投与群老齢ラットの耳下腺凍結免疫染色切片を、図 6 にバクモントウ投与群老齢ラットの耳下腺凍結免疫染色切片を示す。蒸留水投与群ラットの耳下腺の小葉間導管において AQP5 は管腔側細胞質に多く存在した。それと対照的で、バクモントウ投与群ラット耳下腺では、AQP5 が管腔膜へ移動していた。

考 察：

水溶高分子は水に溶解する高分子の総称である。その化学的特長としては分子中に水との強い相互作用を有する極性基を多数含むことである。PVM-MA はビニルエーテルと無水マレイン酸の完全共重合体であり、水および有機溶媒に溶ける水溶高分子である。CMC は数ある水溶性高分子のなかでも最も一般的なものであり、天然パルプを原料とし安全性が高く、環境や人体への安全性が問われる幅広い用途で使用されている。

本研究で測定した初期粘度に関しては、PVM-MA および CMC が吸水反応前の状態であり、粉末成分が軟膏基剤に分子としてそのまま存在している半固体のコロイド状態と考えられる。粘度は質量流速、ずり速度などに影響されるが、本研究では質量流速以外は統一しているため、材料の初期粘度は質量流速に影響される。よって、粉末成分の含有量が大きいほうが質量流速は大きくなり、初期粘度が高くなる。また、同質量の PVM-MA および CMC 含有の試作試料でその初期粘度に差異が認められたのは、粉末の粒径が CMC が大きく、アイリングの粘性理論におけるワセリンの自由体積が小さいために初期粘度が高くなるものと考えられる。

本研究では浸漬前のワセリンの粘着強さは初期粘度が最も低いにも関わらず、有意に高い結果となった。これは、ワセリンが温度影響を受けやすい材料であり、粘度測定は 37℃、粘着強さは 23℃ と測定温度に差があることに起因するものと考えられる。

PVM-MA は中に含まれている亜鉛イオンが強い共有結合により作用延長につながる。今回使用した PVM-MA はナトリウムとカルシウムの混合塩であり、カルシウムが弱いイオン架橋をしており、水和する時間の延長につながっているものと推察される。一方、CMC は 1 価のナトリウム塩であり、短時間で水和し、増粘性を高めるものと考えられる。さらに、試作試料に軟膏基剤である流動パラフィンを添加することにより、軟膏基剤の粘度が減少し、真空練和時に分離することなく、水溶性高分子の増加が可能となり、粘着強さが高く、なおかつ長期に維持できると考えられる。

バクモントウを投与することにより、AQP5 は耳下腺管腔膜への移動が認められた。これは、バクモントウ抽出物が唾液腺細胞の基底膜にある M_3 ムスカリン受容体に作用して AQP5 を細胞質より管腔膜へ細胞内移動させて管腔膜で増量させたのが原因だと推測される。

今後、AQP5 の管腔膜への移動にポジティブに作用する生薬成分を含有した長期作用型クリームタイプ義歯安定剤からの生薬成分の溶出傾向、収放性、生薬成分が AQP5 配置への作用機序、生薬成分が霊長類の唾液腺管腔

膜 AQP5 に及ぼす影響などについてさらに検討していく予定である。

参考文献:

- 濱田泰三、村田比呂司、夕田貞之、玉本光弘、貞森紳丞：義歯安定剤：デンタルダイヤモンド社、東京、p103、2003.
- Hong G, Lian YM, Sadamori S, Hamada T, Murata H.: A questionnaire survey of dentists and dental students in China about denture adhesives. Int Chin J Dent 8(3), 33-37, 2008.
- Inoue N, Iida H, Yuan Z, Ishikawa Y, Ishida H.: Age-related decreases in the response of Aquaporin-5 to acetylcholine in rat parotid glands. J Dent Res 82(6), 476-480, 2003.

注：本研究の一部は 2008 年 8 月 30 日『日本補綴歯科学会九州・中国・四国支部合同学術大会』にて口演発表、『International Chinese Journal of Dentistry』(2008 年 VOL8) に掲載。

作成日：2009 年 3 月 12 日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2009年3月9日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 三宅 洋一郎



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： 口腔微生物学分野 職名： 教授

〒 770-8504

所在地： 徳島市蔵本町3丁目18-15

電話： 088-633-7329 内線： 直通

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

アテロームplaque形成の初期段階における*Porphyromonas gingivalis* HUの役割についての解析

3. 成果の概要 (100字程度)

歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* の病原因子の解明を目指し、ヒストン様タンパク質と関連の深い DnaK について検討を行った。同菌の *dnaK* 遺伝子を大腸菌で発現し、DnaK タンパク質を得ることができた。また、同遺伝子ノックアウト株を得た。これらを用いることによって DnaK の病原性における役割の解析が可能となった。

※発表論文等

Purification of recombinant *Porphyromonas gingivalis* DnaK and creation of its mutant

第82回日本細菌学会総会，2009年3月12日，名古屋国際会議場

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 三宅 洋一郎 職名： 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： 口腔微生物学分野

中国側研究者氏名： 束 蓉 職名： 教授

所属機関： 上海交通大学附属第九人民医院口腔医学院 部署： 牙周病科

アテローム plaque 形成の初期段階における *Porphyromonas gingivalis* HU の役割 についての解析

研究者氏名	教授 三宅 洋一郎
日本研究機関	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野
中国側研究代表者	教授 束 蓉
中国所属機関	上海交通大学附属第九人民医院口腔医学院 牙周病科
共同研究者	梁 景平, 劉 大力, 湯本浩通

要 旨

Porphyromonas gingivalis は歯周病の原因とされている細菌であり、それが産生する毒素や酵素などの病原因子がいくつか明らかにされてきた。しかし、未だに不明な病原因子が多く残されている。細菌 DNA の複製、転写、などに重要な役割を果たしているヒストン様タンパク質は病原性発揮にも役割を果たしていることがあり、この菌での役割は興味深い。その解明の端緒として、関連の深い DnaK について検討をすることとした。*P. gingivalis* W83 株の *dnaK* 遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて発現し、生成したものを得ることができた。また、エリスロマイシン耐性を持った同遺伝子を *P. gingivalis* に形質転換することができた。これらを用いることによって DnaK の病原性における役割の解析が可能となった。

Key Words *Porphyromonas gingivalis*, ヒストン様タンパク質, DnaK, 歯周病

緒 言：

細菌細胞においては一群の nucleoid-associated proteins (NAPs) により核酸は効率よくコンパクトにされており、それらのタンパク質は真核細胞のヒストンに機能が似ていることから、ヒストン様タンパク質 (histone-like DNA binding proteins, HLPs) と呼ばれている。その中でも HU はもっとも一般的なものである。大腸菌の HU は最もよく研究されており、DNA に結合しシャペロンとして DNA をコンパクトな構造とし、さらに DNA の複製、転写、翻訳、組み替え、修復などで重要な働きをしている。他の菌種でも HU に似た構造は見出されているが、それらの HLPs の生理学的及び分子生物学的な解析は行われていない。溶血性レンサ球菌やミュータンスレンサ球菌の HLP は心臓組織や腎臓組織への結合に関与し、これらの菌による炎症の病原性に関与していることが示唆されている。そのメカニズムは明らかではなかったが、我々は近年 *Streptococcus intermedius* の HLP がヒト単球からのサイトカインの産生に関与していることを報告した¹⁾。

Porphyromonas gingivalis は歯周病の原因とされている細菌であり、その HU の働きは興味深い。しかし、この菌の HU は大腸菌やレンサ球菌のそれと異なっているようで、10 の遺伝子が DNA 結合タンパク質をコードしているといわれている。したがって、この複雑な HU システムがこの菌の HU の研究の妨げとなっている。そこでまず HU との関連も示唆される DnaK のクローニングを行い、その働きについての検討から始めることとした。

対象と方法：

Porphyromonas gingivalis W83 は BHI 寒天平板培地で培養し、嫌気ボックス内で保存した。*Escherichia coli* DH-5 α を DNA クローニングおよびプラスミドの組み換えに、*E. coli* BL21 を組み替えタンパク質発現に使用した。これら大腸菌は LB broth 中で培養を行った。

組み換えプラスミドの作成は図 1 で示すように行った。*Pg-dnaK* 遺伝子を *P. gingivalis* W83 株の染色体 DNA から *Sma* I および *Hind* III サイトを含む範囲で PCR 増幅した。増幅した PCR 産物は *Sma* I および *Hind* III で処理し、pQE-1 を *Pvu* II および *Hind* III で処理したものの His タグ下流に T4 リガーゼで組み込み、pQE83 を作成した。エリスロマイシン耐性を付与するために pQE-hlp-orf-erm を鋳型として 2425bp のフラグメントを増幅し、pQE83 に組み込み、pQE83::Em^r を作成した。

His-*Pg*-DnaK タンパク質を発現させるために、pQE83 を組み込んだ *E. coli* BL21 の培養液 400ml に isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を 0.5 mM, 1 mM, 2 mM の各最終濃度で加えた。37℃にて 8 時間培養後、菌体を遠心により集菌し、10ml の溶菌バッファーに懸濁した。懸濁液を超音波処理し、Triton X-100 を加えることによりタンパク質を溶出した。タンパク質を含む上清を溶菌バッファーで平衡化した Ni-agarose カラムに添加した。洗浄後、イミダゾールを含む溶出バッファーによりタンパク質の溶出を行った。

作成した組み替え *Pg*-DnaK タンパク質を確認するために、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびウェスタン分析を行った。変性させた標品を 15%SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動し、CBB で染色すると共にフッ化ポリビニリデン膜に electrotransfer によって転写した。膜はスキムミルクでブロッキング後、抗 His タグ抗体と室温で 1 時間反応させた。洗浄後ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体と室温で 1 時間反応させ、ECL 検出キットを用いて発色させた。

P. gingivalis の 37℃一夜培養液 200ml を遠心により集菌し、100ml の electroporation バッファーで洗浄後、同バッファー 2ml に懸濁しコンピテントセルとした。100 μ l ずつに分注し、使用するまで -40℃で保存した。100 μ l のコンピテントセルに 2 μ g の pQE83::Em^r を加えたものをキュベットに入れ、2,500V で electroporation を行った。直ちに 1ml の BHI 培地を加え、37℃で 16 時間培養を行った。得られた菌株はエリスロマイシン含有 BHI 寒天培地上で選択を行った。

結 果：

P. gingivalis の DnaK タンパクを得るために *Pg-dnaK* 遺伝子を pQE-1 プラスミドに挿入 (図 1)、*E. coli* BL-21 に形質転換し、IPTG による誘導で発現させた。図 2 に示すように菌株 A が抗 His タグ抗体と反応する単一のバンドを呈し、またその分子サイズが 72kDa と予測する数値と近似していたため、この菌株を *E. coli* BLQEK83 と命名し、以後の実験に使用した。

次に *E. coli* BLQEK83 による His-r*Pg*-DnaK 産生に与える IPTG 誘導の影響について検討を行った。図 3 に示すとおり、培養時間 8 時間で IPTG 濃度 0.5mM 以上の条件で効率的に発現が観察されたため、以降 IPTG 濃度 1mM で 8 時間培養を行うこととした。

上記条件で培養した *E. coli* BLQEK83 の菌体を集め、超音波により破碎し、その上清を用いて His-r*Pg*-DnaK の精製を行った。精製はニッケル吸着カラムを用いて行った。図 4 に示すように、イミダゾールによる溶出画分に、ウェスタン分析による小さい分子サイズの本が見られるものの予想された分子サイズのタンパクが得られていることが明らかになった。CBB 染色ではまだ多くの夾雑物は含んでいるが、今後の精製に使用できるものと思われる。

Pg-DnaK をノックアウトした変異株を作成するために、この遺伝子中にエリスロマイシン・カセットを組み込んだプラスミド pQE83::Em^r を作成した (図 1)。この遺伝子を *P. gingivalis* に形質転換し、エリスロマイシン耐性株を得ることができた。現在得られた菌株の中から、目的の遺伝子との組み換えが生じている菌株を選択している。

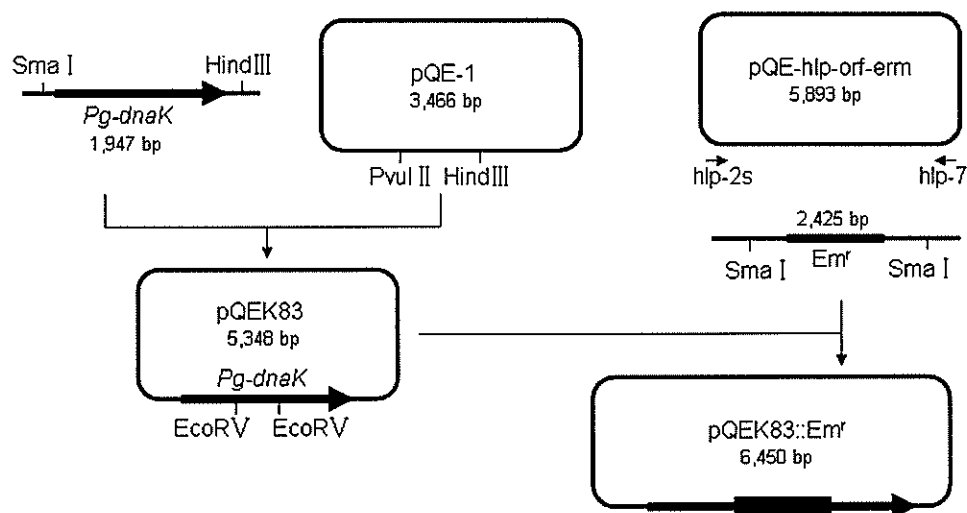


図1 プラスミド pQE83 および pQE83::Emr の構築法

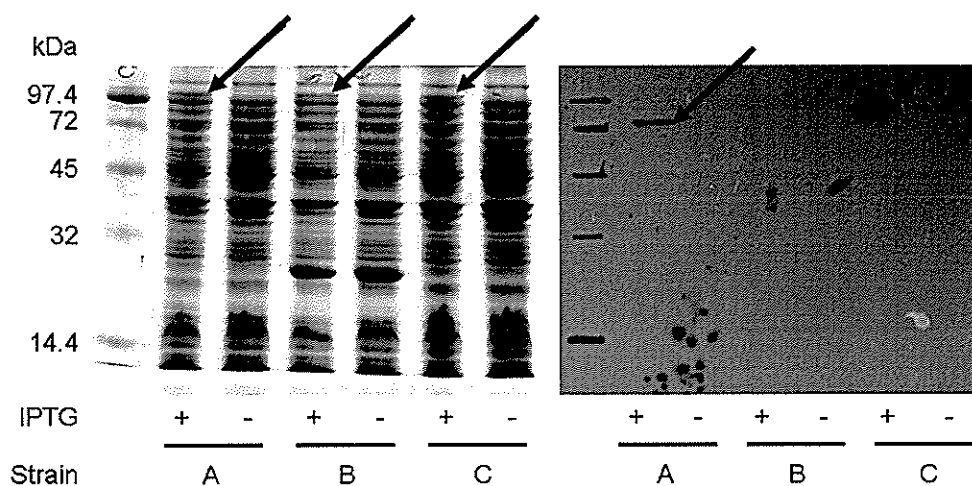


図2 菌株による His-rPg-DnaK 発現の違い

(左) CBB 染色, (右) ウェスタン分析 A, B, C : 菌株名

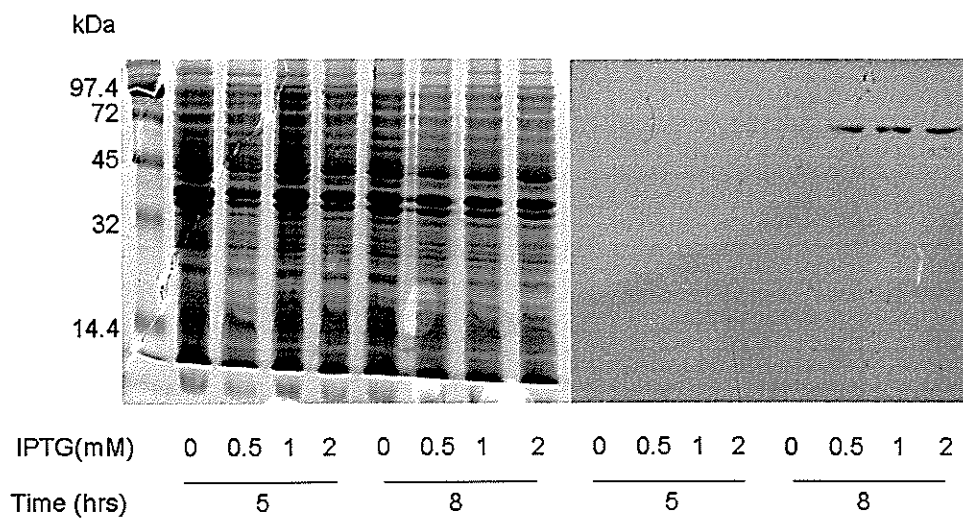


図3 *E. coli* BLQEK83 による His-rPg-DnaK 発現への IPTG 濃度および培養時間の影響

(左) CBB 染色, (右) ウェスタン分析

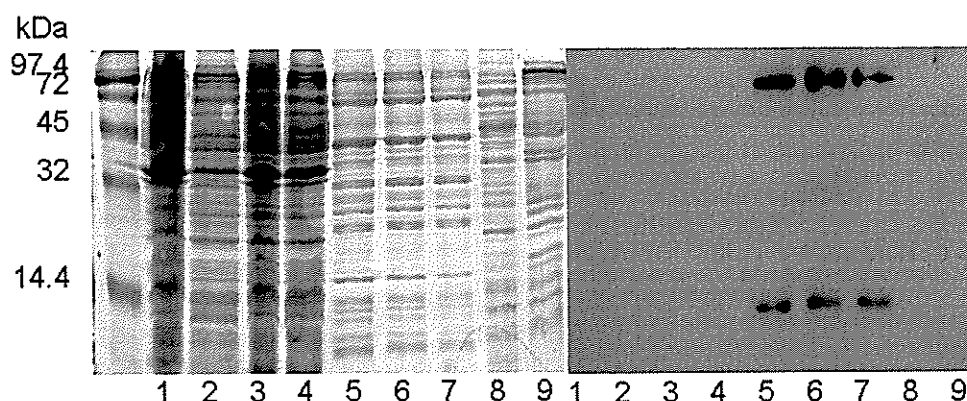


図4 His-rPg-DnaK の精製

(左) CBB 染色, (右) ウェスタン分析 各レーン 1:細胞画分, 2:粗抽出液, 3, 4:超音波処理前の上清, 5, 6, 7:イミダゾールによる溶出画分, 8, 9:洗浄画分

考 察:

*P. gingivalis*は歯周病の原因とされている細菌であり, その病原因子の解明はこの菌による歯周病の予防や治療に役立つと思われる。細菌 DNA の複製, 転写, などに重要な役割を果たしているヒストン様タンパク質は病原性発揮にも役割を果たしていることがあり, レンサ球菌などでそのことが示されている¹⁾。歯周病原菌である *P. gingivalis*でも同様の役割を果たしているかは興味深い。その解明の端緒として, まず関連の深い DnaK について検討をすることとした。*P. gingivalis* W83 株の *dnaK* 遺伝子をクローニングし, 大腸菌を用いて発現し, 付与した His タグを用いた精製を行った画分を得ることができた。この画分にはまだ夾雑物があるものの, 更なる精製を行うことにより, 組み換えタンパク質を得ることができる。それを用いることにより, DnaK タンパク質の宿主への影響, あるいは菌体内での生理的役割の解明に役立つものと考え。また, エリスロマイシン耐性を持った同遺伝子を *P. gingivalis* に形質転換することができた。現在それらの菌株の中から *dnaK* 遺伝子をノックアウトした株の検索を行っており, それが得られればこの遺伝子の病原性への関与, また関連の深い HU 系とのかかわりについての検索が可能となる。

この後行うべきことが多く残されているが, 本実験により得られた組み換えタンパク質及びノックアウト変異株は, 歯周病原菌 *P. gingivalis* の病原性解明に役立つものといえ, 今後の研究の発展に寄与できると信じている。

参考文献:

- 1) Dali Liu, Hiromichi Yumoto, Katsuhiko Hirota, Keiji Murakami, Kanako Takahashi, Kouji Hirao, Matsuo Takashi, Kazuto Ohkura, Hideaki Nagamune, Yoichiro Miyake: Histone-like DNA binding protein of *Streptococcus intermedius* induces the expression of pro-inflammatory cytokines in human monocytes via activation of ERK1/2 and JNK pathways. Cell. Microbiol. 10(1): 262-276, 2008.

注: 本研究は, 2009 年 3 月 12 日「日本細菌学会総会」においてポスター発表。

作成日: 2009 年 3 月 9 日

財団法人日中医学協会

2008 年度共同研究等助成金一調査・共同研究一報告書

平成 21 年 3 月 10 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団の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：水上 元



所属機関名：名古屋市立大学

所 属 部 署：大学院薬学研究科 職名：教 授

〒467-8603

所 在 地：名古屋市瑞穂区田辺通 3 - 1

電話：052-836-3415（ダイヤルイン）

1. 助 成 金 額：1,000,000 円

2. 研 究 テーマ

夏天無アルカロイドの品質規格と薬理作用に関する研究

3. 成 果 の 概 要

虚血性脳疾患による各種症状の治療薬として用いられている夏天無について、その超臨界流体 CO₂ エキスの品質のコントロールのためのアルカロイド分析法を確立するとともに、経口投与時のアルカロイドの血中移行について解析した。

※発 表 論 文 等

該当なし

4. 研 究 組 織

日本側研究代表者氏名：水上 元 職名：教 授

所属機関：名古屋市立大学 部署：大学院薬学研究科

中国側代表研究者氏名：楊 義芳 職名：副主任研究員

所属機関：上海医薬工業研究院 部署：中薬研究室

夏天無アルカロイドの品質規格と薬理作用に関する研究

研究者氏名 水上 元

所属機関 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中国側共同研究者 楊 義芳

所属機関 上海医薬工業研究院

要 旨

中国ではその総アルカロイド画分が、虚血性脳疾患による各種症状の治療薬として用いられている夏天無について、その超臨界流体 CO₂ エキスの品質のコントロールのためのアルカロイド分析法を確立するとともに、それをラットに経口投与したときの含有 4 アルカロイドの血中濃度推移を測定することを目的として、分析方法のバリデーションと実際にラットに投与したときの体内動態を検討した。血清を酢酸酸性下アセトニトリルで処理することにより除タンパクし、パパベリンを内部標準とした LC/MS/MS ESI(+) 分析を行うことにより、含有 4 化合物において 0.1~3.0 µg/mL の濃度範囲で回収率、再現性、直線性いずれも良好な検量線を描くことが出来た。夏天無エキス 53.2 mg/kg (ヒト常用量の 20 倍量) をラットに経口投与した後の含有 4 化合物の血中濃度推移を元に薬物動態学的パラメーターを算出し、protopine、egenine、tetrahydropalmatine、bicuculline の最高血中濃度 C_{max} は、それぞれ 49.9、44.4、127、31.6 (ng/mL) であった。

Key Words 夏天無, イソキノリンアルカロイド, 薬物動態, LC/MS/MS

緒 言:

夏天無は *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. (ケシ科) の根茎を基原とする生薬であり、中医学における薬能は、祛風除湿、舒筋活血、通絡止痛である。中国では夏天無に含まれるアルカロイドの注射液が開発され、ラット脳虚血再灌流障害モデルに対する有用性が報告されている¹⁾。しかし、生薬エキスの注射液は、中国国外では医薬品としての使用するための認可を得ることは困難であるため、経口投与による製剤開発が求められる。夏天無に含まれているアルカロイドには、protopine (1)、egenine (2)、tetrahydropalmatine (3)、bicuculline (4)、palmatine (5)、kikemanine (6)、coptisine (7) 等 (構造式を図 1 に示す) が報告されている。本研究では、夏天無の超臨界流体 CO₂ エキスをラットに経口投与したときの化合物 1~4 の血中濃度推移を測定し、消化管吸収と体内分布を調査することを目的とする検討を行った。

方 法:

材 料: 夏天無の超臨界流体 CO₂ エキス、化合物 1~4 の標準品は、共同研究者の楊義芳先生から供与されたものを使用した。夏天無超臨界流体 CO₂ エキスのヒト常用量は 130 mg/day であることから、体重換算で 2.6 mg/kg/day をヒト常用量として投与量を計算した。

実験動物: Wistar ST ラット (9 週齢、オス) を日本 SLC より購入して使用した。

アルカロイド分析方法: 適宜前処理したサンプルを、LC/MS/MS により分析した。システムは Quattro Premier XE (Waters, Milford, MS) の ESI (+)-MRM モードで行い、カラムは Inertsil ODS-3、2.1 mm i.d.×50 mm、4 µm、移動層、10 mM AcONH₄ 緩衝液、pH 3.0: MeCN (80/20)、0.2 mL/min を使用した。検出に用いた条件

は以下の通りである：化合物 1、353.89→188.5、cone voltage 14 V、collision energy 29 eV (tR 4.3 min)；化合物 2、369.9→189.9、cone voltage 13 V、collision energy 13 eV (tR 2.5 min)；化合物 3、355.9→191.9、cone voltage 41 V、collision energy 29 eV (tR 4.9 min) 化合物 4、367.9→307.0、cone voltage 29 V、collision energy 25 eV (tR 2.9 min)；papaverine、339.9→201.9、cone voltage 37 V、collision energy 29 eV (tR 3.7 min)。

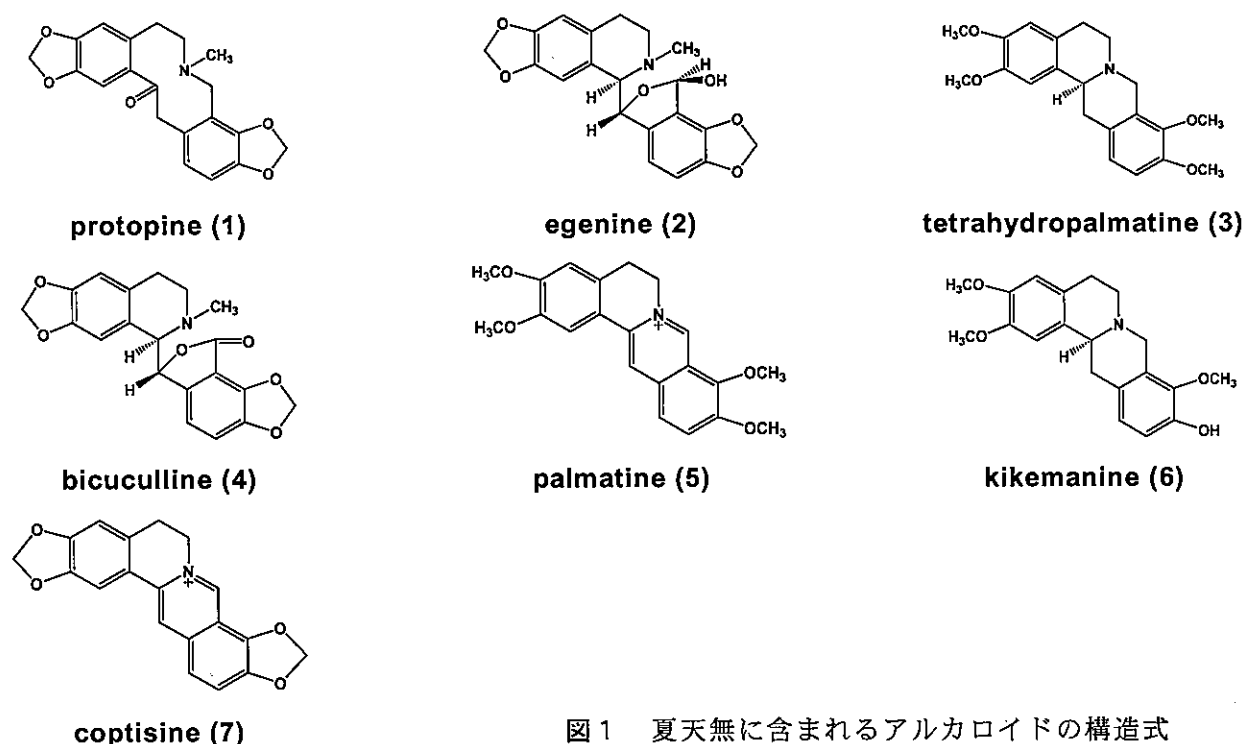


図1 夏天無に含まれるアルカロイドの構造式

結 果：

まずはじめに、移動層で適宜希釈した化合物 1～4 溶液 180 μ L に、内部標準として papaverine (97 ng/mL) 溶液 20 μ L 加えることで調製した標準溶液を、LC/MS/MS で分析し、検量線を描いた。その結果、化合物とも 14～450 ng/mL の濃度範囲で、 r^2 値 0.998 以上の良好な検量線が描けた。これをもとに夏天無の超臨界流体 CO_2 エキス中の各化合物含量を求め、化合物 1～4 で 20.4、20.1、10.8、2.4 (w/w)% の値を得た。

次に、各化合物を血清に溶解させたときの分析方法について検討した。各種、除タンパク前処理方法を検討した結果、血清 75 μ L に、papaverine (24 ng/mL) in MeCN : AcOH (98/2) 溶液 75 μ L を加え、激しく攪拌後、-20℃で 30 分静置し、12,000 g、7 min 遠心し、その上清 10 μ L を LC/MS/MS にインジェクトする、という方法で、表 1 に示す分析条件が得られた。

表1 分析条件のバリデーション

	protopine (1)	egenine (2)	tetrahydropalmatine (3)	bicuculline (4)
500 ng/mL での回収率 (%)	108	100	115	100
100 ng/mL での回収率 (%)	109	101	119	106
30 ng/mL での回収率 (%)	137	131	144	140
日内変動係数 (%)	3.5	2.8	1.8	3.8
日間変動係数 (%)	6.0	4.5	5.0	5.2
3 回凍結融解変動係数 (%)	5.0	4.1	3.7	5.0

検量線は、4～500 ng/mL の濃度範囲内で r^2 値がそれぞれ 0.990 以上の良好な検量線が描けたものの、30 ng/mL 以上の濃度において、回収率の低下が認められたことから、この濃度においては血清由来成分によるマトリクス効果を排除できないことが推測され、若干の誤差を生じる可能性が示唆された。

頸静脈にカニューレーション手術を施して、覚醒時でも容易に採血を可能にしたラットに対して、夏天無の超臨界流体 CO_2 エキスを 1%カルボキシメチルセルロースに 5.32 mg/mL の濃度で懸濁させたものを、10 mL/kg の容量で経口投与（53.2 mg/kg、ヒト常用量の 20 倍量に相当する）し、経時的に採血して化合物 1～4 の血中濃度推移を測定した。その結果を図 2 に示す。

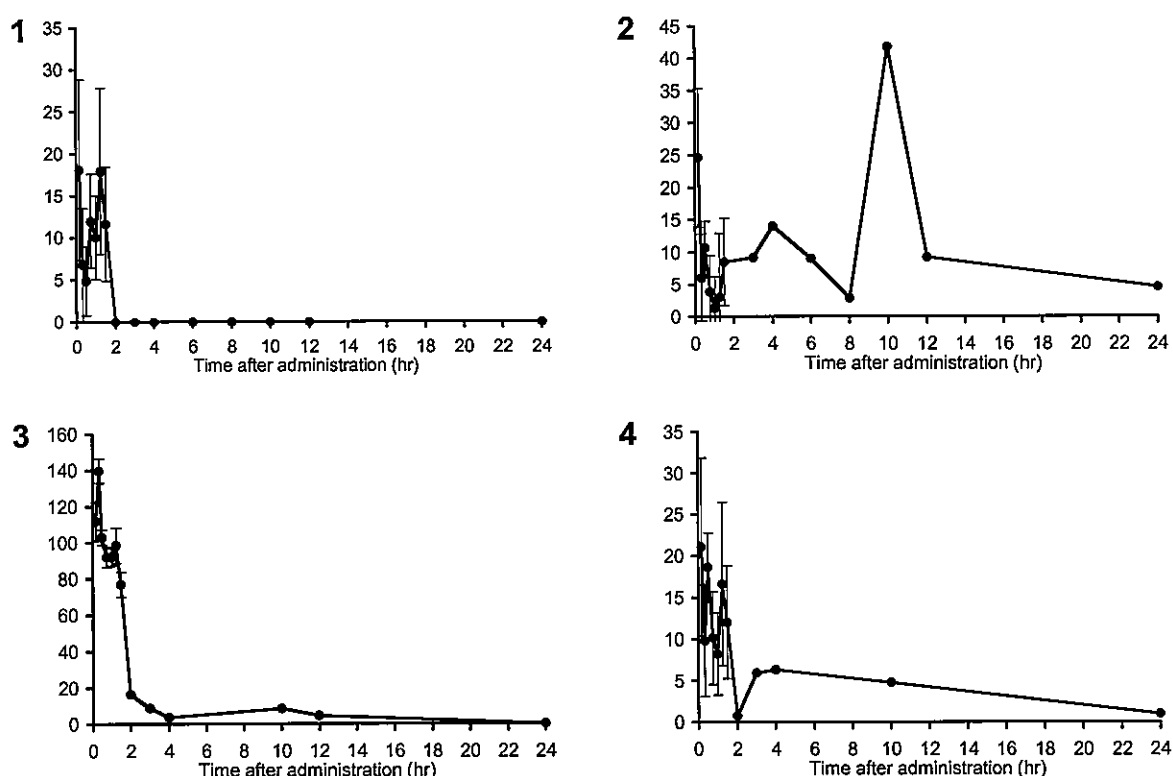


図 2 夏天無エキスをラットに経口投与した後の化合物 1～4 の血中濃度推移

表 2 薬物動態学的パラメータ

	protopine (1)	egenine (2)	tetrahydropalmatine (3)	bicuculline (4)
投与量 (mg/kg)	10.8	10.7	5.75	1.28
AUC (ng/mL・h)	19.5	249.3	259.7	105.0
Cmax (ng/mL)	49.9	44.4	127	31.6

夏天無エキに含まれているアルカロイドの含量から算出した、個々の化合物における投与量と、ラットにおける血中の濃度推移から算出した薬物動態学的パラメータを、表 2 に示す。4 つのアルカロイドのうち、最も血中濃度が高かったのは tetrahydropalmatine (3) で、経口投与後速やかに吸収され、4 時間後には血液中からはほぼ消失していた。また、エキス中の含量が最も多い protopine (1) は、最も低い血中濃度推移曲線下面積（AUC）を示した。

考 察：

夏天無に含まれているアルカロイドの LC/MS/MS における定量を試み、化合物を移動層である 20% MeCN に溶解した場合には、2 ng 程度までの高感度で良好に分析できることが明らかになった。しかし、それらを血清に溶解した場合には、有機溶媒を用いた除タンパク法では 30 ng/mL の濃度では 100% を大幅に超える回収率が得られた。有機溶媒により血清を処理すると、タンパク質は沈殿により除去することが可能であるが、脂質は上清中に残ってしまうため、残存脂質が MS での分析に影響するマトリクス効果と呼ばれる現象が起こることが知られている。従って、各化合物 30 ng/mL 以下の濃度では、そのマトリクス効果による影響が無視できないものとなり、定量の正確性が低下してくる可能性が推定された。

本研究において、ラットに投与した夏天無エキスは、ヒト常用量の 20 倍の投与量である。このときに調製した夏天無エキス (5.32 mg/mL) 1% カルボキシメチルセルロース懸濁液は、エキスの粘性が著しく、容器や注射器に吸着したまま離れないなど、正確な投与量を均一な懸濁液として投与が出来ていない状態であった。夏天無エキスに含まれるアルカロイドの水溶性は低く、本研究では生薬からの抽出効率を高めるために超臨界流体 CO₂ を用いた抽出方法を採用しているが、実際に経口投与製剤を調製する際にはそれらの難水溶性という性質が問題となることが明らかとなった。界面活性剤では懸濁化が困難であったため、シクロデキストリンを用いた包接化合物化など、水への分散性を改善する必要性がある。

また、夏天無エキスをヒト常用量の 20 倍量ラットに投与したが、化合物 1~4 の最高血中濃度は 30~120 ng/mL と、マトリクス効果の影響が無視できる濃度ではないものであった。一方、予備実験で夏天無エキスをヒト常用量の 100 倍量でラットに経口投与したときには、ラットは投与直後に強直性痙攣を起こして死亡したことから、投与量をヒト常用量の 20 倍量に増量することは困難で、血中濃度をこれ以上の高値を想定することは出来ない。従って、マトリクス効果の影響を考慮して、標準溶液を調製するための正常ラット血清を実験に使用するラットと同一ロットで調製する必要があると考えられた。

本研究で測定対象とした化合物のうちでは、夏天無エキスには protopine (1) が最も多く含まれているが、本化合物の消化管吸収は極めて低く、ほぼ同量含まれている eginine (2) の約 20 分の 1 の AUC しか示さなかった。一方、bicuculline (4) は夏天無エキス中には eginine (2) の約 8 分の 1 しか含まれていないが、eginine (2) の約 3 分の 2 の C_{max} と、約 2 分の 1 程度の AUC と、含量の割には高い値を示した。Eginine (2) と bicuculline (4) は、分子構造内では水酸基とケトン基の違いであることから、pH 分配仮説に従い、脂溶性の高いケトン基を持つ bicuculline (4) の方が消化管吸収が高いことが説明される。一方、protopine (1) の脂溶性は、eginine (2) や bicuculline (4) よりも高いことから、細胞膜の透過性はそれらよりも高いことが推測されるが、実際の血中濃度は極めて低いものとなった。これは、その脂溶性の高さから、経口投与に用いた懸濁液中への分散性が低くなり、不溶物のまま消化管内に滞在してしまい、吸収されなかったものと考えられた。また、tetrahydropalmatine (3) は、エキス中の含量は eginine (2) の約 2 分の 1 であるが、約 3 倍の C_{max} とほぼ同程度の AUC の値を示した。Tetrahydropalmatine (3) については、分子構造を特異的に認識して能動的に消化管内から血液中へ輸送される何らかのトランスポーターの基質になっている可能性が示唆された。

夏天無アルカロイドを経口投与製剤として開発するための課題としては、化合物の水への分散性を高める必要性がまず第一にあげられる。しかし、本化合物の毒性は低くはなく、本実験で使用した投与量の 5 倍量でラットが死亡するほどであることから、化合物の水への分散性を高めて血中濃度が上昇すること自体は決して歓迎できることではない。本化合物を安全に有効に医薬品として開発するためには、徐放性製剤など剤型の工夫が必要と考えられる。

(2001 年 3 月 7 日作成)

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2009年 3月 15日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 関水 和久



所属機関名： 東京大学大学院薬学系研究科

所属部署： 微生物薬品化学教室 職名： 教授
〒113-0033

所在地： 東京都文京区本郷7-3-1

電話： 03(5841)4820 内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

抗インフルエンザウイルス作用をもつ化合物の開発

3. 成果の概要（100字程度）

カイコのバキュロウイルス感染モデルを用いて、様々な天然由来サンプルについて抗ウイルス活性の探を試みた。その結果、納豆及び野菜などの食材由来抽出物に治療効果があることが明らかとなった。さらにこれらの食材由来抽出物の効果は、ウイルスの増殖抑制ではなく宿主の自然免疫活性化によることが示唆された。

※発表論文等

論文として学会誌に発表予定（雑誌名は未定）

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 関水 和久 職名： 教授

所属機関： 東京大学大学院薬学系研究科 部署： 微生物薬品化学教室

中国側研究者氏名： 李 荀 職名： 副教授

所属機関： 山東大学薬学院 部署：

-日中医学協会助成事業-
抗インフルエンザウイルス作用をもつ化合物の開発

研究者氏名	関水 和久
日本所属機関	東京大学大学院薬学系研究科教授
中国所属機関	山東大学薬学院副教授
中国側指導責任者	李 荀

要旨

カイコのバキュロウイルス感染モデルを用いて、様々な天然由来サンプルについて抗ウイルス活性の探索を試みた。その結果、納豆及び野菜などの食材由来抽出物に治療効果があることが明らかとなった。さらに、これらの食材由来抽出物の効果は、ウイルスの増殖抑制ではなく、宿主の自然免疫活性化によることが示唆された。これらの結果は、カイコ幼虫のウイルス感染モデルは、自然免疫活性化による抗ウイルス作用物質の探索系として有用であることを示唆している。

Key Words カイコ、バキュロウイルス、抗ウイルス薬、自然免疫活性化

緒言：

私たちはカイコのバキュロウイルス感染モデルは、抗ウイルス薬の治療効果を評価する上に有用であることを提言している。すでに私たちは、この系を用いて、漢方薬の麻黄湯からシンゼイラニン抗ウイルス活性物質として単離精製することに成功している。一方、私たちは、カイコを用いて、自然免疫活性化物質を評価できることを見いだしている。最近のショウジョウバエを用いた研究から、自然免疫経路がウイルスを認識することが明らかになっている。したがって、カイコのバキュロウイルス感染モデルは、自然免疫活性化を機序とする抗ウイルス薬の評価系として優れていると期待される。本研究では、様々な食材の中から、この系で抗ウイルス活性を示す画分を得ることを目指した。

材料と方法：

カイコのバキュロウイルス感染モデルは、私たちが確立した方法にしたがった(J. Gen. Virol. 89, 188 (2007))。カイコの免疫活性化物質の評価も、私たちが報告した方法にしたがった(J. Biol. Chem. 283, 2185 (2008)) (図1、図2)。

食品由来の抽出液は主にオートクレーブによる熱水抽出により調製した。



図1 ウコン抽出液によるカイコ筋収縮

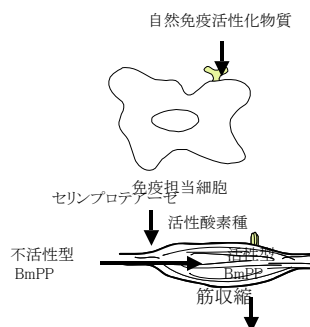


図2 自然免疫活性化によるカイコ筋収縮の機構

結果：

自然免疫活性化能の高い農産物や食品を探索する事を目的として、数10品目についてカイコ筋収縮を指標とした自然免疫活性化試験を行った。従来知られたアガリクスやメカブフコイダンと同等か、それ以上(5~10倍)の活性を示す野菜(農産物1)や茶(緑茶)(食品1)を特定した。さらに、自然免疫活性化物質の抽出法を確立すると共に、従来より数10倍高い比活性を得る前処理法を確立した。また、自然免疫促進活性を有する、これらの野菜には抗ウイルス活性が有る事をウイルス感染症カイコを用いて示した(表1、2)。

表 1 農産物や食品の自然免疫促進活性と抗ウイルス活性

検体	比活性 (units/mg) a	抗ウイルス活性 b
農産物 1	10	++
食品 1	20	++
ハウレンソウ	<0.3	-
メカブフコイダン	2	+
ニンジン	0.6	+
ピーマン	0.3	+
カボチャ	0.9	++
羅漢果	0.6	++

a 農産物や食品の抽出液の凍結乾燥品 1mg 当りの活性

b 6～12 時間 (+)、12 時間以上 (++) の延命効果

表 2 農産物や食品の自然免疫促進活性と抗ウイルス活性

検体	比活性 (units/g) a	抗ウイルス活性 b
農産物 1	1700	++
食品 1	6700	++
アガリクス	410	+
ハナビラタケ	120	-

a 農産物や食品 1g 当りの活性 b 6～12 時間 (+)、12 時間以上 (++) の延命効果

考察：

私達は、これらの自然免疫活性化物質を癌予防・治療薬／機能性食品として利用すべく、今後、哺乳動物を用いた抗ウイルス試験などの前臨床試験を行う。食経験の有る農産物や食品などを出発材料とし、ウイルスの増殖阻害ではなく免疫細胞の活性化を作用機序とするウイルス感染症の予防・治療薬は副作用の少ない、「QOL（生活の質）」に配慮した画期的な薬となろうし（医薬品）、これらの自然免疫活性化物質を（「免疫の素」などとして）食品や飲料水に添加するなどして機能性を与える事が出来よう（機能性食品）。

参考文献：

1. Orihara, Y., Hamamoto, H., Kasuga, H., Shimada, T., Kawaguchi, Y., Sekimizu, K. J. Gen. Virol. 26, 38-42 (2008)
2. Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., Sekimizu, K. J. Biol. Chem. 283, 2185-2191 (2008)

作成日：2009 年 3 月 7 日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－中国人研究者・技術者招聘－報告書

2009 年 2 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： 村田 真理子

所属機関名： 三重大学大学院

所属部署： 医学系研究科 職名： 教授

〒 514-8507 津市江戸橋2-174
所在地：

電話： 059-231-5011 内線：

1. 助成金額： 700,000 円

2. 研究テーマ

Epstein-Barrウイルス感染上咽頭癌発症におけるDNAメチル化と酸化ニトロ化ストレスの役割解明

3. 成果の概要（100字程度）

ヒト上咽頭癌由来培養細胞を用いて、メチル化特異的PCR法を用いてメチル化の変化を検討した。その結果、ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1)を含む癌抑制遺伝子候補を見いだした。

4. 被招聘者

氏名： 張 哲 (Zhe Zhang) 職名： 講師

所属機関： 広西医科大学 部署： 第一臨床学院

5. 滞在日程概要（日付、主な活動・工程等）

2008年11月23日、来日

12月 炎症によるエピジェネティクス変化の検討

2009年1月 炎症による酸化ニトロ化DNA損傷の解析

1月23日、24日 第8回分子予防環境医学研究会（東京大学大学院医学系研究科）に出席し

Hypermethylation of UCHL1 promoter in nasopharyngeal carcinomaを口頭発表した。

2月 DNAメチル化部位の解析

2月15日、帰国

Epstein-Barr ウィルス感染上咽頭癌発症における DNA メチル化と 酸化ニトロ化ストレスの役割解明

招聘研究者名	張 哲
中国所属機関	中国広西医科大学 第一臨床学院 耳鼻咽喉頭頸部外科
日本所属機関	日本三重大学大学院医学系研究科環境分子医学
申請者名	教授 村田 真理子
共同研究者名	黄光武, 莫穎禧, 馬寧, 平工雄介, 及川伸二

要 旨

上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma; NPC) は東南アジアおよび中国南部において有病率が高く予後不良である。Epstein-Barr (EB) ウィルス感染が関与することに加えて、がん抑制遺伝子のエピジェネティック異常が発がん重要な役割を果たすと考えられている。ヒト NPC における新規がん抑制遺伝子候補を探索するために、我々はプロモーター領域の hypermethylation により不活化されている遺伝子を全ゲノムスクリーニングし、ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (*UCHL1*) が NPC における異常 hypermethylation のターゲットであることを見いだした。我々は 6 種の培養細胞株と正常上咽頭上皮組織を用いて RT-PCR により *UCHL1* の発現レベルを解析した。正常上咽頭組織においては中程度の *UCHL1* 発現が見られた。一方、6 種の培養細胞株のうち 5 種の細胞で *UCHL1* は発現低下し、C666-1 においては発現がなかった。メチル化特異的 PCR (methylation-specific PCR, MSP), により 6 種すべての NPC 培養細胞株および原発腫瘍の 74% (23/31) で *UCHL1* プロモーター領域の hypermethylation が観察されたのに対し、非 NPC 患者の正常上皮にはなかった。DNA methyltransferase 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) により NPC 培養細胞での *UCHL1* 発現低下は劇的に改善された。*UCHL1* のエピジェネティックな不活化は NPC において頻度が高く、また腫瘍特異性が高いことから、*UCHL1* は NPC における新規がん抑制遺伝子候補であると考えられる。さらに、我々は ニトロ化 DNA 損傷である 8-nitroguanine と酸化的 DNA 損傷である 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) を NPC 生検標本を用いて蛍光二重免疫染色した。NPC 腫瘍細胞および間質の炎症細胞において強い DNA 損傷が認められた。EB ウィルス感染を介した酸化ニトロ化ストレスによる DNA 損傷が発がんのイニシエーション・プロモーションに重要な役割を果たし、*UCHL1* の hypermethylation によるがん抑制遺伝子作用の喪失が NPC のプログレッションに寄与すると考えられた。

Key Words: Epstein-Barr ウィルス, 上咽頭癌, *UCHL1*, DNA メチル化, 酸化ニトロ化ストレス

緒 言:

上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma; NPC) は著しく民族特性および 地域特性をもつ癌である。この癌は東南アジアおよび中国南部において有病率が高く、特に広東と広西地域に多く、非常に重要な健康問題である。その一方で、世界の他の地域では稀な疾病である。すべての NPC は事実上強く Epstein-Barr (EB) ウィルス感染に関係するが[1, 2], NPC 発症の分子機構は未だに不明な点が多い[3]。近年 10 年間で、より注目されたのは NPC の進展におけるエピジェネティクスの役割についてである。プロモーション領域の hypermethylation によるエピジェネティックながん抑制遺伝子 (tumor suppressor genes, TSGs) の抑制はしばしば NPC の病態に見いだされる。NPC の新しい TSGs を探索するために、DNA methyltransferase を薬物により阻害し、マイクロアレイを用いた発現解析を行うことで、ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (*UCHL1*)

が NPC における異常 **hypermethylation** のターゲットであることを見いだした。本研究において、我々は半定量的 RT-PCR によりマイクロアレイの結果を確認し、上咽頭癌培養細胞株および原発腫瘍における **UCL1** のメチル化異常について検討した。さらに、我々は EB ウィルス感染下における酸化ニトロ化ストレスによる DNA 損傷について NPC 生検標本を用い免疫染色法により観察した。

対象と方法：

NPC 培養細胞株, NPC 生検および正常上咽頭組織

NPC 培養細胞(CNE1, CNE2 TW03, HNE1, C666 および HONE1) は 37°C にて常法により培養した。広西医科大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学（中国、南寧）において、研究への参加についてインフォームド・コンセントの得られた新規上咽頭癌患者より腫瘍生検 31 検体を得た。診断は熟練した病理医により WHO 分類に従って行われた。正常上咽頭上皮組織は扁桃摘出術にて健常対照より得た。生検標本は DNA および RNA 抽出まで液体窒素中で保存した。

5-Aza-dC 処理, RNA 抽出 と半定量 RT-PCR

NPC 培養細胞株4種 (CNE1, CNE2, HONE1 および C666-1)を 6-well ディッシュに 24 時間培養し、その後4 日間 10 μ M 5-aza-dCにより処理した。試薬および培養液は24 時間毎に交換した。無処理の細胞を対照とした。TRIzol 試薬を用いてNPC 培養細胞よりRNA を抽出した。1 μ g のtotal RNA から MMLV reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) を用い、マニュアルに従ってcDNAを合成した。PCR反応は 計 20 μ l の反応液 (1xPCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 pmol deoxynucleotide triphosphates, 100 pmol primers, 1 unit AmpiTaq Gold (Applied Biosystems, Branchburg, NJ)) にて行った。PCR は 95°C・10 分間の後、94 °C・30 秒間、各アニーリング温度にて45秒間、72 °C・90 秒間を34 サイクルとした。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールとした。

DNA 抽出と精製

生検組織をホモゲナイズし、50 μ g/ml proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA) で56°C・3時間酵素反応した。高分子ゲノム DNA を通常の phenol/chloroform 処理し、エタノールにより抽出した。NPC 培養細胞の DNAは TIANamp Genomic DNA Kit (Tiangen Biotech, Beijing, China)を用いて抽出した。

ゲノムDNAの bisulfite処理

bisulfite 処理は Olek et al. [4]の方法を一部改変して行った。すなわち、500 ng のゲノム DNA を0.3 M NaOH で37°C・15 分間インキュベーションして1本鎖とし、2倍量の 2% 低融点アガロースを加えた。アガロース/DNA 混合液を冷やしたミネラルオイル中に滴下し アガロースビーズを作製した。ビーズは200 μ l の 5 M bisulphate solution (2.5 M sodium metabisulphite, Sigma; 100 mM hydroquinone, Sigma; pH5.0)を含むチューブに入れた。反応液を 50°C・16時間、暗所にてインキュベーションした。1 ml のTE buffer による平衡化で反応を止め、500 μ l の 0.2 M NaOHにより脱スルホン化した。ビーズを 1 ml の蒸留水で洗い、PCR 反応に供した。

メチル化特異的PCR(methylation-specific PCR, MSP)

bisulfite処理 DNA 2 μ l を加え、計20 μ l の PCR 反応液(1xPCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 pmol deoxynucleotide triphosphates, primers 100 pmol, 1 unit Hot start ExTaq polymerase (Takara Bio INC))にてPCR反応を行った。PCR は 95°C・3 分間の後、94 °C・30 秒間、各アニーリング温度にて45秒間、72 °C・90 秒間を38 サイクルとした。MSP 生成物は2% アガロースゲル電気泳動し、ethidium bromideにより染色した。

免疫組織学的検討

8-Nitroguanine と 8-oxodG の免疫染色性を上咽頭生検標本において二重蛍光免疫染色法により評価した。すなわち、6- μ m 厚のパラフィン切片を rabbit polyclonal anti-8-nitroguanine antibody (2 μ g/ml) および mouse monoclonal anti-8-oxodG antibody(5 μ g/ml, Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi, Japan) にて室温で一晩インキュベーションした。その後、Alexa 594-labeled goat antibody against rabbit IgG と Alexa 488-labeled goat antibody against mouse IgG (1:400each, Molecular Probes Inc., Eugene, OR)で3時間反応させた。染色されたスライドを倒立型レーザースキャン顕微鏡(Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)にて観察した。

結 果：

脱メチル化剤のみによる *UCHL1* 発現の回復

当初のマイクロアレイによる発現解析で発現上昇していたTSGsの候補遺伝子は、培養細胞を脱メチル化試薬 5-aza-dC および ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤trichostatin A (TSA)で処理していたため、脱メチル化ではなく脱アセチル化酵素阻害により回復した可能性がある。そのため、我々は4種のNPC 培養細胞株を 5-aza-dC のみで処理した。Fig.1に示すように、半定量 RT-PCR 解析により、4種のNPC培養細胞株において *UCHL1* は脱メチル化のみにより転写活性が回復することが示され、NPC においてプロモーター領域の hypermethylation が *UCHL1* の低発現に関する重要事象であることが明らかになった。

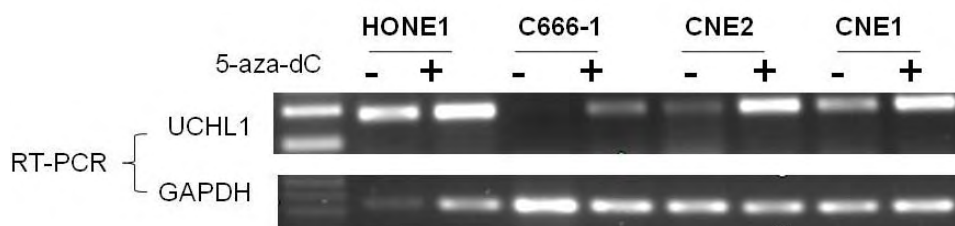


Fig. 1. 5-aza-dC 単独処理による *UCHL1* の発現の回復。

NPC培養細胞および原発腫瘍における *UCHL1* のhypermethylation

DNA methyltransferase 阻害剤 5-aza-dC処理により、発現回復したことから *UCHL1* のプロモーター領域がDNA hypermethylationのターゲットであることが示された。しかしこの遺伝子の発現が間接的効果である可能性が残されている。そこで我々はMSPにより *UCHL1* のメチル化の状況を調べた。*UCHL1*プロモーター領域のhypermethylation はNPC 培養細胞株 6種すべて (100%)で検出され、また NPC患者 31名中24名の原発腫瘍(74%)でメチル化が検出された。一方、正常上咽頭上皮組織では *UCHL1* のメチル化は検出されなかった (Fig. 2)。

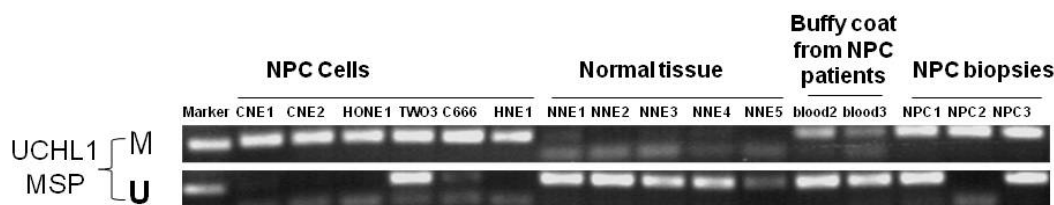


Fig. 2. NPC培養細胞、原発腫瘍および正常上咽頭上皮 における *UCHL1* のメチル化

NPC 組織における 8-nitroguanine および 8-oxodG の検出

我々は二重蛍光免疫染色法により NPC 患者の上咽頭組織における DNA 損傷について検討した。癌細胞

では 8-nitroguanine と 8-oxodG の強い染色性が認められた。これらの DNA 損傷塩基は核に明瞭に観察され、8-nitroguanine は細胞質にも少し認められた。さらに、これらの免疫染色性は NPC 患者の癌腫の下にある間質の炎症細胞でも観察された。これらの DNA 損傷は EB ウィルス陽性慢性上咽頭炎患者の上皮組織でも観察されたが、EB ウィルス陰性患者ではほとんど認められなかった。

考 察：

UCHL1 は PGP9.5 [5] としても知られており、カルボキ末端側ユビキチン加水分解酵素であり、細胞のユビキチンレベルを制御している。最近の研究から、この遺伝子はがん抑制遺伝子の候補であることが示されている [5-7]。 *UCHL1* はアポトーシスを含む細胞増殖阻害により腫瘍細胞の成長を抑制し、また脱ユビキチン化により p53 を安定化させる作用をもつ [7]。本研究において、我々は NPC のメチル化異常のターゲットを同定するために、5-aza-dC および TSA で処理した 2 種の培養細胞株の発現プロファイルを解析し、 *UCHL1* のプロモーター領域の hypermethylation を見いだした。 *UCHL1* mRNA 発現が NPC 細胞株で down-regulation しており、また *UCHL1* プロモーターが NPC 細胞株および原発腫瘍で過剰にメチル化していることを明らかにした。過剰メチル化した DNA は正常な組織では見られず、画期的な分子腫瘍マーカーになる可能性を示した。MSP の結果より、 *UCHL1* プロモーター領域はすべての NPC 培養細胞株および 74% の NPC 患者でメチル化のターゲットとなっていることを示した。それゆえに、 *UCHL1* メチル化は NPC 患者において頻度が高く in vitro の培養細胞のみの現象でないことを示した。加えて、正常の上咽頭組織においては *UCHL1* メチル化が認められず、 *UCHL1* のメチル化によるサイレンシングは発がんに特異的な過程であることが示唆された。したがって、 *UCHL1* は NPC のがん抑制遺伝子の有力な候補と考えられる。メチル化 *UCHL1* は NPC 診断の有用なバイオマーカーとなる可能性がある。我々は NPC 組織において変異原性 DNA 損傷である 8-nitroguanine および 8-oxodG が核に強く染まることを見だし、EB ウィルス持続感染による慢性炎症に起因するものと考えられた。結論として、EB ウィルス感染を介した酸化ニトロ化ストレスによる DNA 損傷が発がんのイニシエーション・プロモーションに重要な役割を果たし、 *UCHL1* の hypermethylation によるがん抑制遺伝子作用の喪失が NPC のプログレッションに寄与すると考えられた。

引用文献：

1. Raab-Traub, N., Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol*, 12, 431-41(2002).
2. Tao, Q., et al., Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers--genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Front Biosci*, 11, 2672-713(2006).
3. Tao, Q. and A.T. Chan, Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Rev Mol Med*, 9, 1-24(2007).
4. Olek, A., et al., A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 24, 5064-6(1996).
5. Yamashita, K., et al., PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res*, 66, 3921-7(2006).
6. Tokumaru, Y., et al., The role of PGP9.5 as a tumor suppressor gene in human cancer. *Int J Cancer*, 123, 753-9(2008).
7. Yu, J., et al., Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology*, 48, 508-18(2008).

注：本研究は、2009 年 1 月 24 日『第 8 回分子予防環境医学研究会』にて口演発表。

作成日：2009 年 3 月 3 日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－中国人研究者・技術者招聘－報告書

平成 20 年 9 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：

森 則夫



所属機関名：

浜松医科大学

所属部署：

精神神経科

職名：教授

〒431-3192

所在地：

浜松市東区半田山 1-20-1

電話：053-435-2295 内線：

(直通)

1. 助成金額：70万 円

2. 研究テーマ

新生血管構築による新たな統合失調症治療の開拓と微小循環動態

3. 成果の概要 (100字程度)

X線照射モデル(統合失調症モデル)で、前頭葉皮質と海馬で血液脳関門の透過性増大を確認し、微小循環動態の計測法を確立した。これを基礎に、脳内微小循環を改善する手法を確立し、その効果を調べていく。

4. 被招聘者

氏名：

金 学隆

職名：

教授

所属機関：

天津医科大学

部署：

生理学教室

5. 滞在日程概要 (日付、主な活動・工程等)

6月8日～6月15日 第1回来日

(1) 研究うち合わせ。(2) 日本脳科学会(6月13～14日、東京)にて微小循環の計測手法について発表。

7月24日～8月18日 第2回来日

(1) 動物モデルでの血液脳関門の透過性について研究。(2) 中国における精神神経疾患の微小循環研究と、そのための科学誌発行のうち合わせ(8月6日、日本大学医学部(日本脳科学会編集局))。(3) 脳内微小循環に及ぼす森田療法の影響について研究のうち合わせ(8月7日、森田療法研究所)

新生血管構築による新たな統合失調症治療法の開拓と微小循環動態

研究者氏名	金 学隆
中国所属機関	天津医科大学生理学教室
日本研究機関	浜松医科大学精神神経医学講座
指導責任者	教授 森 則夫
共同研究者名	岩田泰秀, 鈴木勝昭

要 旨

統合失調症では、微小循環系に異常が生じている可能性がある。本研究では、統合失調症の動物モデルである X 線照射モデルを用い、このモデルにおける基礎運動量、社会的行動、驚愕反応における先行刺激による抑制 (PPI) を評価するとともに、脳内における脳血液関門 (BBB) の透過性の異常の有無を血液成分の内在的マーカーである IgG を指標に検討した。その結果、X 線照射モデルでは基礎運動量に異常はなかったが、社会的行動の減少と PPI の低下が認められた。脳内では、前頭葉皮質と海馬において脳実質内の IgG 様反応の増加が認められた。以上から、X 線照射モデルは統合失調症患者にみられる BBB の異常をも再現している可能性が示唆された。

Key Words: 統合失調症、脳血液関門、微小循環、X 線照射、IgG

緒 言 :

統合失調症は幻覚、妄想、解体した会話などの陽性症状と、感情の平板化、意欲の欠如、思考の貧困などの陰性症状とにより特徴づけられる原因不明の精神疾患である。その病因はいまだ明らかではないが、その病態の一部に脳内ドパミン系の異常の存在が想定されている。統合失調症の治療にはドパミン受容体遮断作用を持つ薬物が用いられ、陽性症状に対し有効であるが、陰性症状への効果は限られている。したがって、陰性症状に対する効果的な治療法の開発が待たれている。

統合失調症では脳内循環系に機能的、かつ、形態的異常が生じていることが多くの研究により示唆されている。例えば、統合失調症患者では、脳全体の血管容量が健常者より増加している¹⁾。統合失調症患者では、後頭葉、視床、小脳などで循環速度が健常者よりも速い²⁾。統合失調症患者の脳内血流量は脳部位により異なる。前頭葉では血流量が低下しており、この低下は統合失調症の陰性症状に関係している。これに対し、視床、帯状回、小脳などでは増加している³⁾。さらに、統合失調症では血液脳関門の透過性が増している⁴⁾。以上の知見から、統合失調症の陰性症状の背景に、脳内循環系の異常が存在することが示唆される。

さて、成人の末梢血分画から単離される CD34 陽性細胞は血管内皮細胞にも分化し、生体の虚血部位においては血管新生に必要である。最近のげっ歯類を用いた実験から、CD34 陽性細胞は、それを脳内局所に注入した場合にも^{5,6)}、全身性に投与した場合にも⁵⁾、脳虚血部位の血管新生を促し、虚血部位を小さくさせることが報告されている。以上の知見を勘案すると、先に述べた統合失調症に想定される脳内循環系の異常を CD34 陽性細胞の移植により改善させることで、統合失調症の症状、とりわけ陰性症状を改善させることが可能かもしれない。

本研究では、統合失調症の動物モデルである X 線照射モデル⁷⁾を用い、このモデルの脳内血管系に起きている変化を明らかにするために、脳血液関門の透過性が亢進しているか否かを検討した。

対象と方法：

X線照射モデルの作成

成熟 (8 週齢) Sprague Dawley 系雄性ラット 20 匹を用いた。深麻酔下にラットの頭部を定位脳固定装置に固定し、interaural line から吻側へ 1.5 mm～11.5 mm、側方幅 15 mm の領域 (側脳室と海馬歯状回を含む) に 5Gy の X 線照射を週 2 回の割合で、計 6 回行い、これを照射群(n=10)とした。照射野以外の部分は鉛板で防護した。X 線照射を除き照射群と同様に処置した動物を作成し、偽照射群(n=10)とした。

行動学的評価

X 線照射の 3 ヶ月後に、以下の評価を行った。

(i) 基礎運動量の評価：赤外線センサーによる行動量測定装置 (SCANET SV-10; 株メルクエスト製) を用いて基礎運動量を測定した。

(ii) 社会的行動評価：ラットは通常お互いの身体接触を好む。この社会的行動における障害の有無を検討した。異なるケージで飼育されたラット 2 匹を、50cm×50cm のオープンフィールド内に置き、5 分の観察時間内に見られた社会的行動 (相手に対して行なわれる臭いかぎ、追尾などの自発的行動) に費やす時間を測定した。

(iii) 感覚運動系機能評価：統合失調症の生物学的マーカーと目されている、聴覚刺激に対する驚愕反応の先行刺激による抑制 (prepulse inhibition: PPI) の障害の有無を検討した。ラット用 PPI 測定装置 (San Diego Instruments 社製) を用いて PPI の障害の有無を評価した。

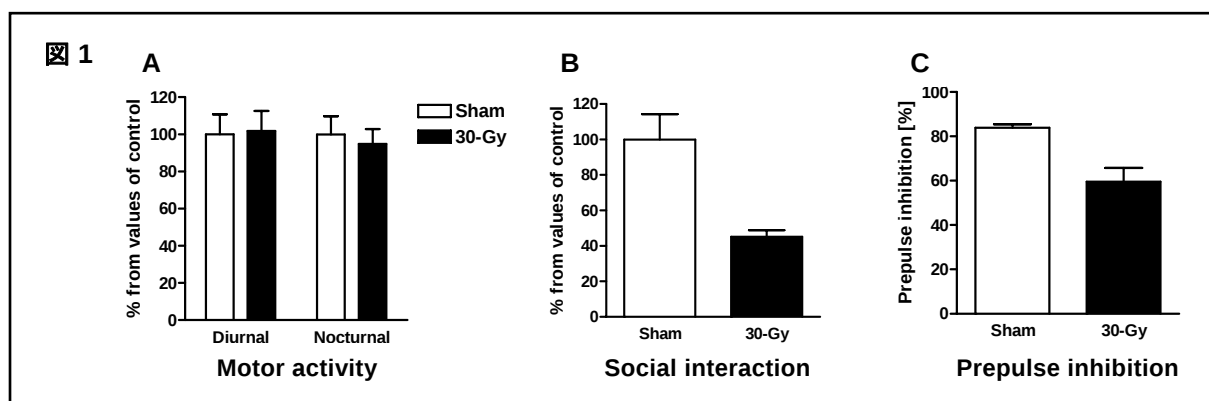
組織学的評価

行動学的評価の終了後、動物をネンブタール(50 mg/kg)の腹腔内投与により深麻酔下におき、経心臓的に 0.01M リン酸緩衝生理食塩水を 5 分間灌流し脱血した後、0.1M リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド液により灌流固定し、脳を取り出した。脳をドライアイスにて凍結し、クリオスタットにより 40- μ m 厚の冠状断凍結切片を作成した。前頭皮質と海馬を含む切片を選び、ビオチン化抗ラット IgG ポリクロナール抗体 (Vector 社製) を用いた免疫組織化学法に供した。Bectastain ABC Elite kit (Vector 社製)と diaminobenzidine (Sigma-Aldrich 社製)により可視化後、光顕用プレパラートを作成し、前頭皮質と海馬における脳実質内の免疫反応を照射群と偽照射群とで比較した。

結 果：

行動学的評価

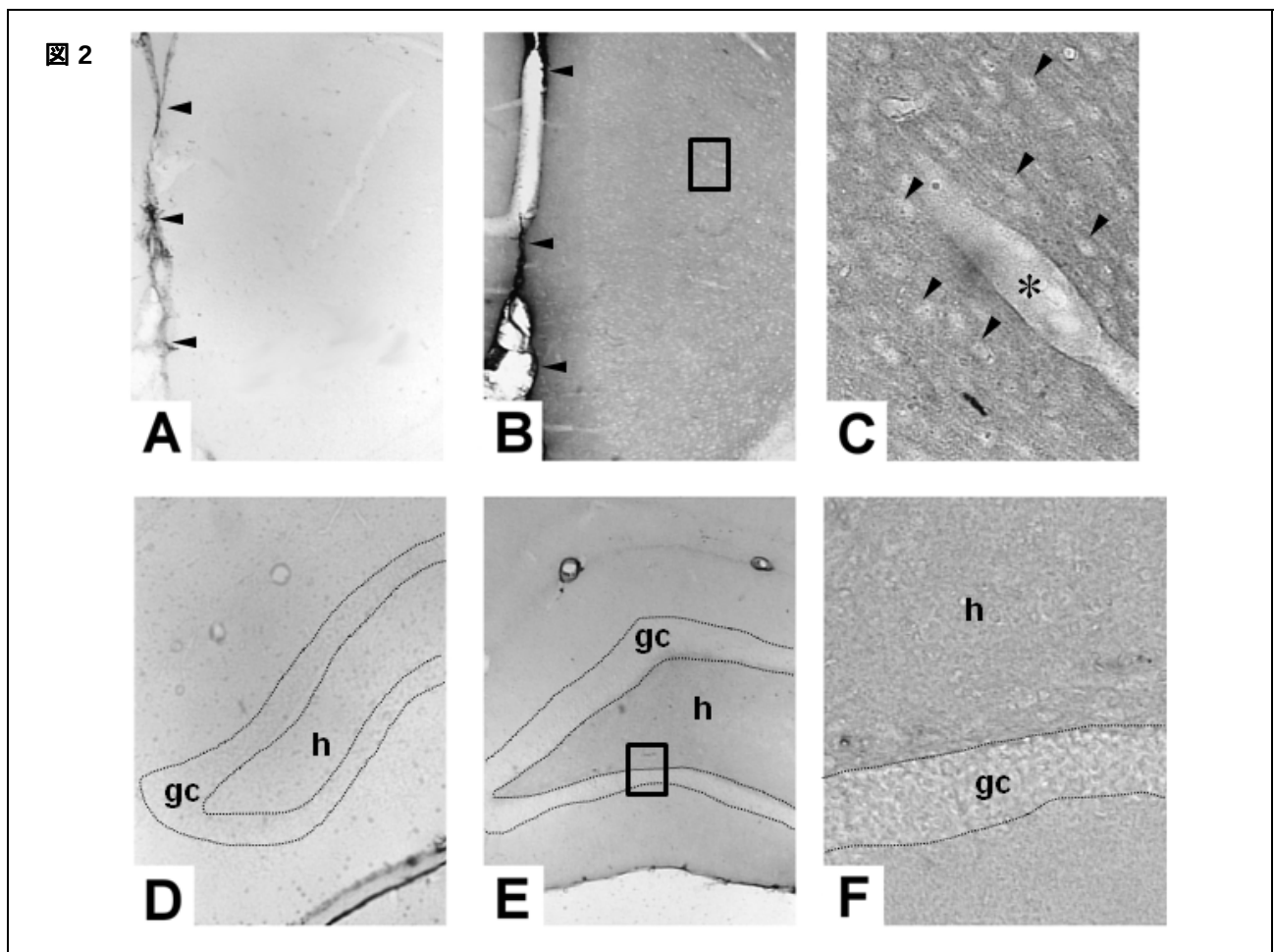
基礎運動量を測定した結果を図 1A に示す。6:00～18:00 (Diurnal)と、18:00～6:00 (Nocturnal)とのいずれの時間帯においても、照射群(30-Gy)と偽照射群(Sham)との間に有意な運動量の差はなかった。



社会的行動評価の結果を図 1B に示す。照射群は偽照射群に比べ、社会的行動を示す時間が有意に短かった。感覚運動系機能評価の結果を図 1C に示す。照射群は偽照射群に比べ有意に PPI が障害されていた。

組織学的評価

抗 IgG 免疫組織化学の結果を図 2 に示す。前頭皮質(A~C)と海馬(D~F)について、偽照射群(A, D)と照射群(B, C, E, F)より各 1 匹を例示した。前頭皮質においては、偽照射群では軟膜(A, 矢頭)のみに強い IgG 様反応を認めた。照射群では、軟膜に加え大脳皮質の実質内に IgG 様反応を認めた(B)。強拡大での観察(C)においては錐体細胞の細胞体が IgG 様反応の欠損として認められた(C, 矢頭)。また細血管(*)の血管壁に境界不明瞭な IgG 様反応の集積を認めた(C)。海馬においては、偽照射群ではそうではなかったが、照射群においてはびまん性の IgG 様反応を認め、その反応は門(h)において強く、顆粒細胞層(gc)で弱かった(B, C)。



考 察：

本研究において、X 線照射に曝露されたラットは社会的行動の低下と PPI で示される感覚運動系機能の障害とを示し、我々の先の報告⁷⁾が支持された。さらに、本研究から、X 線照射モデルの脳実質内において IgG 様反応が増加していることが明らかにされた。この結果は、X 線照射を受けた動物の BBB が IgG のような巨大分子(分子量 15,000)を容易に通過させる状態にあることを示している。このことから、X 線照射モデルの前頭葉と海馬で BBB の透過性が亢進していることが示唆される。

本研究により、脳内微小循環動態の計測法を確立した。今後、脳内微小循環を改善する手法を開発し、その効果を明らかにするとともに、臨床への応用を検討していく予定である。

参考文献：

- 1) Cohen BM, et al. Abnormalities of regional distribution of cerebral vasculature in schizophrenia detected by dynamic susceptibility contrast MRI. *Am J Psychiatry* 1995; 152:1801-3.
- 2) Andreasen NC, et al. Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naive patients. *Lancet* 1997; 349:1730-4.
- 3) Franck N, et al. Cerebral blood flow changes associated with Schneiderian first-rank symptoms in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; 14:277-82.
- 4) Müller N, et al. Increase in expression of adhesion molecule receptors on T helper cells during antipsychotic treatment and relationship to blood-brain barrier permeability in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1999; 156:634-6.
- 5) Taguchi A, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004; 114:330-8.
- 6) Shyu WC, et al. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats. *J Neurosci* 2006; 26:3444-53.
- 7) Iwata Y et al. Irradiation in adulthood as a new model of schizophrenia. *PLoS ONE*. 2008; 3:e2283.

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－中国人研究者・技術者招聘－報告書

2001 年 3 月 9 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・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： 桂木 猛 

所属機関名： 福岡大学

所属部署： 医学部 職名： 教授

〒 814-0180

所在地： 福岡市城南区七隈7-45-1

電話： 092-801-1011 内線： 3323

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ ATPのオートクリン/パラクリン放出とその痛みシグナルへの関与

3. 成果の概要（100字程度）

細胞外へ放出されるATPの起源が小胞体（ER）であることを明らかにするための研究を行った。ATP transporter (VNUT) の抗体を用いNIH3T3およびNRK細胞のERへの発現について検討し、いずれも特異的な発色が認められた。またATPの蛍光アナログであるMant ATPのMDCK細胞への取り込み実験を行ないERでのこのマーカーの蛍光染色が確認された。今後は単離ERからATP放出実験および痛みシグナルへのATPの関与について検討を行う予定である。

4. 被招聘者

氏 名： 孫 竞 職名： 講師

所属機関： 中国上海同济大学 部署： 口腔医学院

5. 滞在日程概要（日付、主な活動・工程等）

H20年7月～9月、MDCK細胞の大量培養を行い、さらにこれより高速遠心分離を行ない最終的にミクロゾーム分画を採取した。しかしミクロゾームのダメージが大きく、これを用いたATP放出実験を断念。現在、小胞体抽出キットによる方法を検討中である。

H20年10月～12月、ATP transporter (VNUT)抗体を入手し、本抗体のNIH3T3細胞の小胞体への発現の有無を検討した。

H21年1月～3月、MDCK細胞、小胞体のATP蛍光アナログのMant ATPの取り込み実験を行った。

ATP のオートクリン/パラクリン放出とその痛みシグナルへの関与

研究者氏名	孫 競
中国所属機関	上海同済大学 講師
日本研究機関	福岡大学医学部
指導責任者	教授 桂木 猛、講師 緒方 繁憲

要 旨

近年、ATP はシグナル伝達物質として、広く細胞外へ放出されることが知られている。

そこで、放出される ATP の細胞内起源を探る目的で、小胞体 (ER) に着目し、先ず、ATP transporter (VNUT) が小胞体内に存在するか否かについて、cell line を用いて検討を行った。その結果、マウス由来の NIH3T3 細胞の小胞体において VNUT による蛍光が発現し、これが小胞体であることは ER 蛋白である PDI の蛍光と全く一致した。しかし、ゴルジ体の蛋白の GM130 の蛍光とは、重ならなかった。次いで、ATP の蛍光アナログである Mant ATP について MDCK 細胞への取り込み実験を行った。0.5 mM ATP により膜透過性を亢進させて Mant ATP を load したところ、MDCK 細胞内が蛍光染色された。この蛍光部位が小胞体であることは、ER-Tracker Red による染色との merge により確認された。

以上の結果、放出される ATP の細胞内起源が小胞体である可能性が、示唆された。

Key Words ATP, ATP transporter, NIH3T3 細胞, 小胞体, MantATP.

緒 言 :

ATP はエネルギー供給系としての細胞内での役割に加え、近年、オートクリン/パラクリン物質として細胞外へ放出され、細胞膜上の種々の ATP 受容体を介して、痛み、炎症、さらに免疫などの広汎な細胞機能の調節物質である事が、明らかにされてきた(1)。しかしながら、現在、ATP の細胞外輸送のメカニズム、そこに至る細胞内シグナル機構、さらにその細胞内放出部位についてはほとんど不明のままである。

報告者のグループは、ATP 放出機構について長年研究を重ね、caffeine (2) や adenosine (3)、に加え、bradykinin(4)、angiotensin II(5) などのペプチド類が有効な ATP 放出物質であることを見出し、その放出に至る細胞内シグナル経路について検討し、Ins(1, 4, 5)P₃ 経路の重要性を明らかにしてきた(4, 5)。Caged Ins(1, 4, 5)P₃ を load した培養細胞からフォトフラッシュにより ATP が放出されること、また、過塩素酸処理培養細胞からの ATP 放出が小胞体由来する可能性を示す結果が得られた(4)。

そこで、本研究では、最近、同定された ATP transporter (VNUT) 抗体を入手したので、これによる小胞体への特異的な発現が見られるか否か、また、ATP の蛍光アナログの Mant ATP が小胞体に取り込まれるかについて検討し、ATP 放出の細胞内起源が小胞体である可能性を明らかにする。

方 法 :

細胞培養

MDCK 細胞を始め NIH3T3 細胞などの cell line は Dullbecco's modified Eagle medium (D-MEM) にペニシリン-G、ストレプトマイシン、10%FCS を加えた培養液中で、37℃ の CO₂ インキュベーターにて 1-2 日間培養した。

ATP transporter (VNUT) の同定

Cover glass 上で NIH3T3 細胞などの培養を行い、これを 16%パラホルムアルデヒド、0.1% Saponin で処理した後に VNUT などの第 1 抗体を 1 時間浸漬し、さらに洗浄後 Alexa Fluor 4884 などの第 2 抗体を加え、現れる蛍光を蛍光顕微鏡（カールツワイス製）にて観察した。また、蛍光部位を特定するために、ゴルジマーカーは GM130 を、小胞体マーカーは PDI の各蛋白をそれぞれ第 1 抗体として用いた。なお、VNUT 抗体は、岡山大学、守山教授より譲り受けた(6)。

MantATP の取り込み実験

MDCK 細胞を glass bottom dish に培養し、膜透過性を亢進させるために以下の実験を行った。培養液を A 液 (NaCl、136.9 ; KCl、5.9 ; ATP、0.5 ; glucose、5.6 ; HEPES、4.2 (mM)) に替え、10 分間浸漬し、1 mM MgCl₂ を加えた後、洗浄し、B 液 (NaCl、136.9 ; KCl、5.9 ; CaCl₂、1.5 ; MgCl₂、1.2 ; glucose、5.6 ; HEPES、4.2 (mM)) に替え、2-2.5 時間浸漬した。この細胞への 360nm および 446nm の励起および蛍光波長で現れる MantATP の蛍光は、蛍光顕微鏡(ニコン製)にて観察した。データ処理は Metamorph にて行われた。なお、これが小胞体由来である事の同定は、ER Tracker Red(励起、568nm; 蛍光、590nm)によって確認した。

結果と考察：

ATP transporter(VNUT)の小胞体における発現

入手した VNUT 抗体は、マウス由来のポリクロナール抗体であるため、マウス由来の NIH3T3 細胞における本抗体の蛍光の発現について検討した。その結果、NIH3T3 細胞で VNUT 抗体の明瞭な発現が見られ、これが小胞体であるか否かの確認のため、小胞体の特異蛋白である PDI 抗体での蛍光染色の結果、VNUT 抗体は確かに小胞体の特異的に染色したことが明らかになった。一方、ゴルジ体の特異抗体である GM130 の発現部位は VNUT のそれとは全く異なっていた (Fig. 1)。この結果から、小胞体には ATP を取り込む蛋白が存在することが明らかとなり、それにより、ATP が小胞体内へ蓄積する可能性が示唆される。

MantATP の小胞体への取り込み。

ATP の蛍光アナログである MantATP を ATP を含む膜透過液で処理した後、MDCK 細胞に取り込ませた。その結果、細胞内に MantATP の蛍光が現れ、これが小胞体であることは小胞体のマーカーである ER Tracker Red による merge により確認された (Fig. 2)。

現在、小胞体に ATP が存在すかどうかは、明らかにされていないが、これらの結果は、ATP が小胞体内に存在する可能性を強く支持するもので、計画中の単離小胞体を用いた ATP 放出実験の結果が大いに期待される。

参考文献：

1. 桂木 猛、右田 啓介:オートクリン/パラクリン分子としてのATPの放出機構、日本薬理学雑誌、Vol. 123、382-388 (2004)。
2. Katsuragi, T., Sato, C., Usune, S., Ueno, S., Segawa, M., Migita, K. : Caffeine-inducible ATP release is mediated by Ca²⁺-signal transducing system from endoplasmic reticulum to mitochondria. Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 378, 93-101 (2008)。
3. Migita, K., Zhao, Y., Katsuragi, T. : Mitochondria play an important role in adenosine-induced ATP release from Median-Darby canine kidney cells. Biochem. Pharmacol. 73, 1676-1682 (2007)。
4. Zhao, Y., Migita, K., Sato, C., Usune, S., Iwamoto, T., Katsuragi, T. : Endoplasmic reticulum is a key organelle in bradykinin-triggered ATP release from cultured smooth muscle cells. J. Pharmacol. Sci. 105, 57-66 (2007)。
5. Katsuragi, T., Sato, C., Lou, G., Honda, K. : Inositol(1,4,5)trisphosphate signal triggers a

receptor-mediated ATP release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 686-690 (2002).

6. Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., Moriyama, Y.: Identification of vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 5683-5686 (2008).

作成日 : 2009 年 3 月 9 日

財団法人日中医学協会
共同研究等助成金－日本人研究者派遣－報告書

平成 21 年 3 月 16 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った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： 田 村 友 秀 
所属機関名： 国立がんセンター中央病院
所 属 部 署： 総合病棟部 職 名： 部長
〒 104-0045
所 在 地： 東京後文京部築地 5-1-1
電話： 03-3542-2511 内線： 7067

1. 助 成 金 額： 150,000 円

2. テ ー マ

血液サンプルを用いた上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子変異の検出及び臨床研究の意見交換

3. 成果の概要（100字程度）

中山大学がんセンターの若手教授陣の熱意ある活動、豊富な患者数など、急速な発展と大きなポテンシャルを実感できた。日本の状況を紹介し、今後のがん臨床・基礎研究における連携について具体的に意見を交換した。

4. 招 聘 機 関

機関名： 中山大学がんセンター 代表者名： Zhang Li 職 名： 教授
所在地： 651 Dongfeng Road East, Guangzhou, China 510060

5. 滞在日程概要（日付、主な旅程・行事等）

2月23日（月）	夕食会	がんセンター長、教授人と意見交換
2月24日（火）	午前	双方の施設、研究活動の紹介と討議
	午後	病棟および研究施設を視察
		小細胞肺癌治療について講演 （出席者150名）
	夕食会	基礎研究、新薬開発について討議
2月25日（水）	午前	共同基礎研究について打ち合わせ

血液サンプルを用いた上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子変異の検出及び臨床研究の意見交換

研究者氏名 田村 友秀
所属・役職 国立がんセンター中央病院
・総合病棟部長

要旨

中国広州の中山大学がんセンターZhang 腫瘍内科教授からの招聘により、2泊3日のスケジュールで同センターを訪問した。若手教授陣の熱意ある診療・研究活動、我々の施設を大きく上回る豊富な患者数、国際共同試験への積極的な参加など、中国のがん研究の急速な発展と大きなポテンシャルを実感することができた。日本のがん研究の状況についても紹介し、今後の臨床・基礎研究における連携について具体的な意見交換を行った。日本のこれまでの実績、繊細な診療・研究技術と中国の潜在能力を融合することで、近い将来、日中両国が世界のがん研究の中心となることが期待される。

目的

中国広州の中山大学がんセンターを訪問し、腫瘍内科 Zhang 教授、Liu 医師（昨年まで当院に1年間留学）らと、日中の肺がん診療の現状や問題点、臨床サンプルを用いたトランスレーショナル・リサーチをはじめとする今後の共同研究の可能性について意見を交換する。

研究内容

〔渡航計画〕

渡航者	田村友秀（国立がんセンター中央病院総合病棟部長）
同伴者	小泉史明（国立がんセンター中央病院 11F 支援施設）
渡航期間	平成 21 年 2 月 23 日～25 日（3 日間）
訪問地	中華人民共和国広州
訪問施設	中山大学がんセンター（Sun Yat-Sen University Cancer Center）
招聘者	Zhang Li（張力）腫瘍内科教授

〔活動内容〕

2 月 23 日（月）	夕刻、東京より広州に到着 歓迎夕食会 Yi-Xin センター長、Guan 名誉教授、Rui-hua 副センター長、Zhang 教授らと意見交換
2 月 24 日（火）	午前 8 時 30 分～11 時 00 分 がんセンター内会議室にて会談 ・ 中山大学がんセンターについて概説（Ma 教授） ・ 国立がんセンター中央病院および研究所について（田村、小泉） ・ 中山大学がんセンター腫瘍内科での臨床研究（Zhang 教授） ・ 国立がんセンター中央病院における臨床研究、トランスレーショナルリサーチ（田村、小泉） 午前 10 時 30 分～12 時 30 分

がんセンター内の病棟、研究施設を視察

午後2時30分～5時30分

がんセンター講義室にて講演と質疑（Zhang 教授司会、出席者 150 名）

- ・ 「小細胞肺癌治療における最近の進歩」 （田村）
- ・ 「がん化学療法におけるバイオマーカー研究」 （小泉）

午後7時より夕食会

- ・ Xiao-Eeng 教授らと基礎研究について討議。

2月25日（水）

午前

- ・ Liu 医師の研究について打ち合わせ

午後、広州出発、夜 東京到着

結果と考察

中華人民共和国の中山大学がんセンターの Zhang Li 腫瘍内科教授からの招待を受け、国立がんセンター中央病院 11F 支援施設の 小泉医師とともに、同センターを訪れた。Zhang 教授の部下である Liu Junling 医師が日中医学協会日中笹川医学奨学金制度により当院肺内科および 11F 支援施設に 1 年間留学したことがきっかけであり、Liu 医師の研究継続の支援、および肺癌診療・研究に関する交流と今後の共同研究の土台作りが訪問の目的である。

中山大学がんセンターは、中国第 3 の都市である広州市の中心部に位置する。1000 を超える病床をもつ大病院であり、従事者も国立がんセンター中央病院の 3 倍以上である。教授陣は 40 代の若手が多く、活気に満ちている。肺癌診療では、年間の新入院患者数は約 1000 例であり、当院の 3 倍以上である。肺癌臨床研究では、数多くの国際共同治験に参加しており、登録症例数も各試験で世界のトップクラスを占めている。中国で開発された薬剤を含む、新薬の第 1 相試験にも意欲的に取り組んでいる。基礎研究においても、中国で見出された分子標的薬の評価などにおいて、徐々にそのレベルを上げてきているようである。その一方で、診療現場や診療の手順においては、荒削りと思える一面も感じられた。総じて、若いスタッフの臨床研究、基礎研究への意義込み、多くの患者数など、近い将来世界の中心的存在となりえる、大きな可能性が強く感じられた。

我々の講演に対しては、若手医師より数多くの質問があり、予定時間を大きく超過してしまうほどであった。「小細胞肺癌に対する最新の治療」「分子標的治療のバイオマーカーに関するトランスレーショナル・リサーチ」に関して、すでに実績のある日本から多くを学ぼうとする熱意が伝わってくるものであった。

今後の基礎・臨床研究の連携に関しては、日中両国、さらに韓国などを加えた「東アジアにおける東洋人を対象とした研究」の重要性、必要性について双方の認識を確認することができた。これまで、新薬承認システムなどレギュレーションの違いなどの障壁により臨床共同研究の実施が困難であったが、近年になり国際共同開発が強調、推進され、実現は目の前まで来たと言えよう。Liu 医師の研究については、現在の進行状況を確認し、培養がん細胞の調達、試験キット入手の援助、今後の実験計画など、具体的な支援の段取りを決めることができた。

今回の中山大学がんセンターの訪問により、中国のがん臨床・基礎研究への熱意とポテンシャルの高さを実感し、また将来の共同研究に関しても討議することができ、極めて有意義であったと考える。

作成日 2009 年 3 月 16 日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

21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： 王 天英



指導責任者名： 福田 敦夫 職名： 教授

所属機関名： 浜松医科大学生理学第一講座
〒431-3192

所 在 地： 静岡県浜松市東区半田山1-20-1

電話： 053-435-2246 内線：

1. 助 成 金 額： 600,000 円

2. 研究テーマ

皮質凍結損傷で誘発したマウス微小脳回の形成期におけるGABAとglutamate作動性ニューロンの特異な集積

3. 成果の概要（100字程度）

大脳皮質凍結損傷による層構造形成異常動物を作製し、異常皮質の形成過程を調査した。

その結果、表層部にGABA細胞が先に集積し、続いて胎生17.5日に発生した本来浅層を形成する錐体細胞がその回りに移動してくることを見出した。さらに、異常皮質形成には、GABAとCl⁻ホメオスタシスが関与する可能性を示した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ ☒ (学会名・演題)

第31回日本神経科学学会

Aberrant cortical organization of freeze lesion-induced microgyrus in mouse model of polymicrogyria.

第55回中部日本生理学会

Accumulation of GABAergic interneurons during organization of freeze lesion-induced microgyrus in mouse.

研究領域「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」第6回領域内研究報告会

皮質凍結損傷で誘発したマウス微小脳回の形成期におけるGABAとglutamate作動性ニューロンの特異な集積

(2) 発表した論文 ☒ ・ 有 (雑誌名・題名)

皮質凍結損傷で誘発したマウス微小脳回の形成期における GABA と glutamate 作動性ニューロンの特異な集積

研究者氏名	王 天英
中国所属機関	ハルビン医科大学
日本研究機関	浜松医科大学生理学第一講座
指導責任者	教授 福田 敦夫
共同研究者名	熊田 竜郎、森島 寿貴、柳川 右千夫

Abstract

Freeze lesion-induced microgyrus resembling human polymicrogyria are associated with seizures. In order to investigate cortical organization with respect to GABAergic and glutamatergic neurons in microgyrus, we made a focal freeze lesion on the GAD67-EGFP knock-in mouse cerebral cortex at P0. The microgyrus was identified with a small sulcus and 3- or 4-layered dysplastic cortex at P7. We found GABAergic interneurons accumulated in superficial layer as well as in the boundary of necrosis at P4. Birthdate analysis showed that the microgyrus contained BrdU-labeled glutamatergic neurons generated on E17. They accumulated around necrotic center at P4 and then formed the cell dense portions in layer ii of microgyrus. The chemokine Cxcl12, a chemoattractant for cortical interneurons, was expressed in the meninges overlying the dysplastic cortex at P4 after freeze lesion. However, significant induction of Cxcl12/Cxcr4 mRNA expression in the dysplastic cortex could not be detected, suggesting Cxcl12/Cxcr4 signaling was not be responsible for accumulation of GABAergic interneurons at P4. Imaging studies on endogenous GABA, another molecule for modulating the migration of immature cortical neurons, revealed GABA release was aberrant in the lesioned area at P4. Thus, neonatal freeze lesion can cause assembly of certain populations of neurons associated with characteristic release of GABA at early stage, which may underlie the formation of microgyrus.

Keyword: freeze-lesion, microgyrus, GABAergic interneuron, glutamatergic pyramidal neuron, GABA

Introduction

Structural abnormalities of the human cortex including polymicrogyria are frequently associated with epilepsy. Cortical malformation can be induced by freeze lesion on the cortex of neonatal rat (Luhmann & Raabe, 1996; Luhmann et al., 1998a, 2000). The abnormal structure of cortex can be characterized by a small sulcus and three- or four-layered dysplastic cortex in the freeze-lesioned rat (Luhmann et al., 1998b). In vitro electrophysiological studies showed lesion-induced microgyrus can cause focal hyperexcitability (Jacobs et al., 1996).

Microgyrus with epileptic activities can be induced by freeze-lesion only on the day of birth (P0) or P1. So far most of studies involved in molecular and electro-physiological changes in the function of GABAergic inhibition and glutamatergic excitation in the microgyrus (Shimizu-Okabe et al., 2007; Zilles et al., 1998) Although laminar abnormalities in freeze lesion-induced microgyrus have been thought to be a migratory defect, the mechanism of the development of microgyrus is not completely understood yet.

Newly born cortical neurons undergo extensive migration before reaching their final destination in the brain. GABAergic interneurons derive from the medial ganglionic eminence (MGE) and lateral ganglionic eminence (LGE) of the subpallium and reach the developing cortex through a long tangential migration. These neurons migrate in two main streams, one

migrating through the marginal zone (MZ) and another one in the lower intermediate zone (IZ)/ subventricular zone (SVZ). Glutamatergic neurons originate throughout the ventricular zone (VZ) of the pallium and migrate radially to establish the different layers of the cortex in an inside-out progression. Interactions between GABAergic interneurons and glutamatergic pyramidal neurons have been thought to be involved in cortical organization (Lujan et al., 2005). For example, GABAA receptor activation can modulate movement and migration of immature cortical neurons and also provide stop signal once the cells reached their destination (Heck et al., 2007). Therefore, we focused on cortical organization with respect to GABAergic and glutamatergic neurons in microgyrus.

Materials and methods

Animal: We used glutamic acid decarboxylase (GAD)67-enhanced green fluorescent protein (GFP) knock-in (KI) mice in which GFP is expressed under the regulation of the endogenous GAD67 promoter (Tamamaki et al., 2003). GABAergic interneurons can be easily detected by expression of GFP in GAD67-GFP KI mice.

1. Induce a cortical freeze-lesion on the newborn GAD67-GFP KI mice: A liquid nitrogen-cooled copper rod with a tip diameter of 0.5 mm was positioned for 5 sec on the surface of the exposed calvaria of P0 mice. In order to produce a longitudinal microgyrus, three focal freeze-lesions were made in a line near to the midline in a rostro-caudal direction, with a distance of 0.5 mm between the lesions.

2. Birthdates analysis: Pregnant mice were injected intraperitoneally with a single dose of an S-phase marker BrdU (50 mg/kg) on either E14.5 or E17.5. Then the location of BrdU positive neurons was determined at different stages by mean of immunohistochemistry..

3. Immunohistochemistry: Coronal sections were cut at a thickness of 25- μ m with a cryostat. Free-floating method was used to perform immunostaining with specific antibodies (anti-GFP, BrdU, Cux1 and Tbr1 antibodies).

4. In situ hybridization: Coronal brain sections of 16- μ m thickness were prepared from freeze lesioned-mice at P4. Digoxigenin-labeled cRNA probes for Cxcl12 and Cxcr4 were used. The hybridization signals of Cxcl12 and Cxcr4 mRNAs were enhanced by Tyramide Signal Amplification (TSA) system.

5. GABA imaging: Living coronal brain slices with a thickness of 400- μ m were prepared for GABA imaging. During the degradation of GABA by GABase, a fluorescent concomitant NADPH was produced. NADPH is excited by 340nm UV and can emit the fluorescence of 480nm. The fluorescence of NADPH was detected with CCD camera (Keyence, BZ-9000, JP). Endogenous GABA release can be quantified as it is released from cells in the brain slice by NADPH fluorescence intensity.

Result

Figure 1. Formation of a microgyrus after freeze lesion

A. A dorsal view of a mouse brain after freeze lesion. A longitudinal microgyrus can be observed at P7 in the right hemisphere (marked with arrowheads). B. Thionin-stained coronal sections at different stages. At P2, the position of the lesion was identified by necrotic tissue in the lesioned area. At P4, a cell dense layer was observed in the superficial part (arrow) as well as in the boundary (arrowheads) of lesioned area. At P7 and P10, a microgyric architecture could be detected with 3- or 4- layered dysplastic cortex.

Figure 2. GABAergic interneurons accumulated in the superficial part of lesioned area at P4.

Distribution of E14.5-/E17.5-born cells and GAD67-GFP positive cells in freeze-lesioned mouse cortex at P4. Coronal sections of neocortex stained with anti-BrdU and anti-GFP antibodies which injected with BrdU on either E14.5 or E17.5. Note GAD67-GFP positive cells accumulated in the superficial layer and boundary (arrows) of necrosis. BrdU positive cells generated on E14.5 were absent in the lesioned cortex, but BrdU positive cells generated on E17.5 were already accumulated around lesioned area at P4 (arrowheads).

Figure 3. High density of E17.5-generated cells in layer ii of dysplastic cortex at P7

Distribution of E14.5-/E17.5-born cells and GAD67-GFP positive cells in freeze-lesioned mouse cortex at P7. Coronal sections of neocortex stained with anti-BrdU and anti-GFP antibodies which injected with BrdU on either E14.5 or E17.5. Paucity of BrdU positive cells generated on E14.5 was observed in the dysplastic cortex. Note a high density of BrdU-labeled cells generated on E17.5 dispersed throughout the dysplastic cortex (marked with asterisks) at P7.

Figure 4. Cxcl12/Cxcr4 signaling was not involved in the accumulation of GABAergic interneuron at P4

In situ hybridization of Cxcl12 and Cxcr4 mRNA at P4. By using the TSA in situ hybridization, we found some positive signals of Cxcl12 in the meninges overlying on the cerebral cortex at P4 as previously reported. Apparent expression of Cxcl12 could not be detected in/surrounding the boundary of necrotic tissue. At P4, significant induction of Cxcr4 mRNA expression in the dysplastic cortex could not be detected although GABAergic interneuron accumulated at this stage.

Figure 5. Endogenous GABA release at different stages after freeze-lesion at P0

At P2, lesioned area was identified with necrosis, the signal of GABA imaging in lesioned area was much lower than that in peri-lesioned area. At P4, GABA release was evident in the superficial layer as well as the boundary of lesioned area compared with peri-lesioned area (arrows). The position was correlated with accumulation of GABAergic interneurons at P4. These signals were disappeared in the absence of GABase (showed in negative control).

Discussion

To our Knowledge, this is the first study to demonstrate that there is a peculiar accumulation of GABAergic and glutamatergic neurons at the early stage of freeze lesion-induced microgyrus in mice. In this study, we developed a mouse model of microgyrus by focal freeze-lesion on the cerebral cortex of newborn GAD67-GFP KI mice. This model reproduces anatomical characters of the cortical malformation present in human polymicrogyria. By using the GAD67-GFP KI mice, we found GABAergic interneurons gathered in the superficial layer as well as boundary of lesioned area at P4. E17.5-born but not E14.5-born glutamatergic pyramidal neurons accumulated around GABA-rich necrotic center at P4 and then formed the cell dense portions in layer ii of microgyrus.

Functioning of the cerebral cortex requires the coordinated assembly of circuits involving glutamatergic projection neurons and GABAergic interneurons. Although much is known about the migration of interneurons from the subpallium to the cortex, our understanding of the mechanisms controlling their migration within the cortex is still limited. In freeze lesioned-mice model, we surprisingly found GABAergic interneurons gathered in the superficial layer as well as boundary of lesioned area at P4. Cxcl12 is a chemoattractant for migration of interneurons through its receptor Cxcr4 during the developmental stage (Stumm et al., 2003, López-Bendito G et al., 2008). Thus we tried to investigate the distribution pattern of Cxcl12 and Cxcr4 mRNAs by in situ hybridization. However, significant induction of Cxcl12/Cxcr4 mRNA expression in the dysplastic cortex could not be detected, suggesting Cxcl12/Cxcr4 signaling was not be responsible for accumulation of GABAergic interneurons at P4.

The major excitatory and inhibitory neurotransmitters in the brain, glutamate and GABA, activate both ionotropic and metabotropic receptors, and are generally associated with neuronal communication in the mature brain. Interestingly, besides their function in synaptic transmission, neurotransmitters have been shown to promote several developmental processes that contribute to the establishment and maintenance of the CNS. Therefore we performed GABA imaging by using the freeze lesioned-mice model. The results showed GABA was almost absent in the lesioned area at P2. However, the endogenous GABA concentration in the lesioned area was high compared with peri-lesioned area at P4. The position was correlated with accumulation of GABAergic interneurons at P4. GABA itself release from accumulated GABAergic interneurons at early stage might play a role in controlling the migration of both glutamatergic pyramidal neurons and GABAergic interneurons. Both GABAergic and later-born glutamatergic pyramidal neurons accumulated around

GABA-rich necrotic center at P4, as a result of the redifferentiation and its differential physiological responses to ambient GABA.

References

1. Heck N, Kilb W, Reiprich P, Kubota H, Furukawa T, Fukuda A, Luhmann HJ. GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration in vitro and in vivo. *Cereb Cortex*. 2007; 17(1):138-48.
2. Jacobs KM, Gutnick MJ, Prince DA. Hyperexcitability in a model of cortical maldevelopment. *Cereb Cortex*. 1996; 6(3):514-23.
3. López-Bendito G, Sánchez-Alcañiz JA, Pla R, Borrell V, Picó E, Valdeolmillos M, Marín O. Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci*. 2008; 28 (7): 1613-24.
4. Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*. 2005; 130(3):567-80.
5. Luhmann HJ, Raabe K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: I. Expression of epileptiform activity in an animal model. *Epilepsy Res*. 1996;26(1):67-74.
6. Luhmann HJ, Karpuk N, Qü M, Zilles K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures. II. Intracellular in vitro recordings. *J Neurophysiol*. 1998a; 80(1):92-102.
7. Luhmann HJ, Raabe K, Qü M, Zilles K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: extracellular in vitro recordings. *Eur J Neurosci*. 1998b; 10(10):3085-94.
8. Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann HJ, Fukuda A. Changes in the expression of cation-Cl-cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neurosci Res*. 2007; 59(3):288-95.
9. Stumm K.R. et al., CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci*. 2003 23(12):5123-30.
10. Zilles K, Qü M, Schleicher A, Luhmann HJ. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: Quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA_A and GABA_B receptors. *Eur. J. Neurosci*. 1998; 10:3095-3106.

Figure 1. Formation of a microgyrus after freeze lesion.

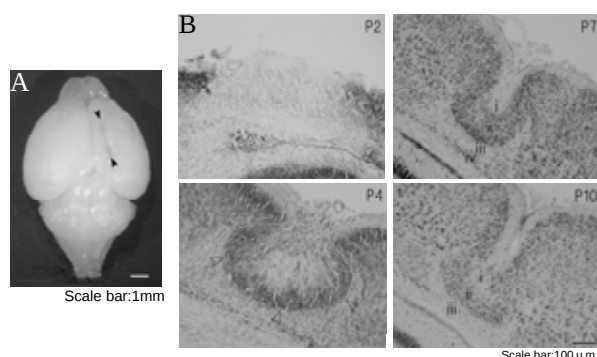


Figure 2. GABAergic interneurons accumulated in the superficial part of lesioned area at P4.

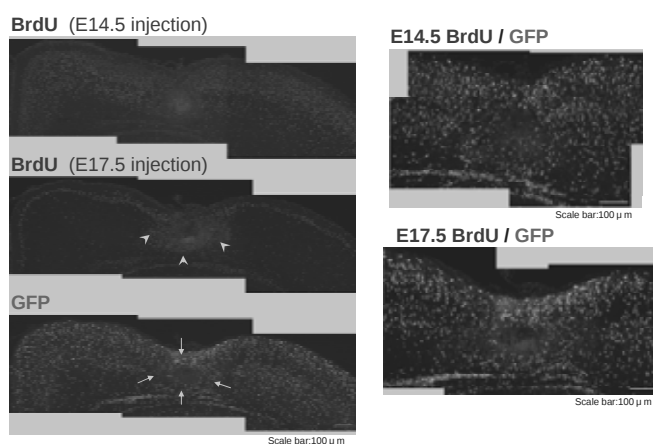


Figure 3. High density of E17.5-generated cells in layer ii of dysplastic cortex at P7

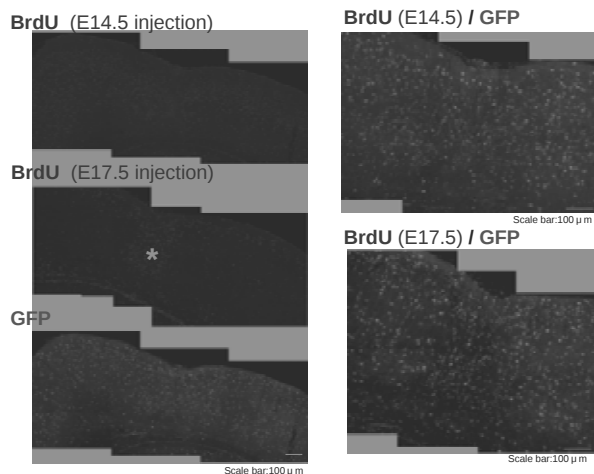


Figure 4. In situ hybridization of Cxcl12 and Cxcr4 mRNA at P4.

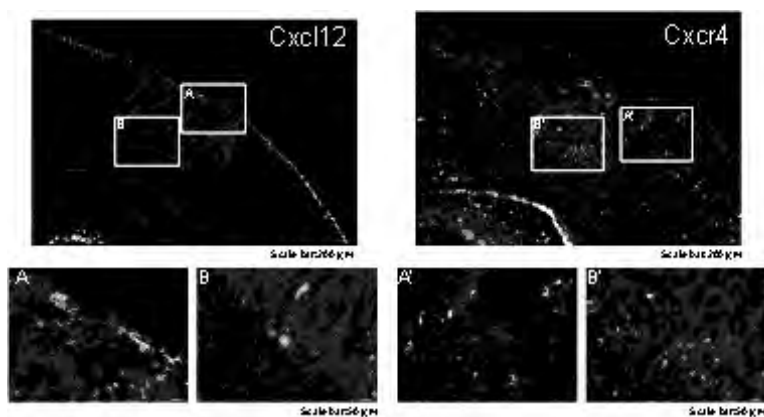
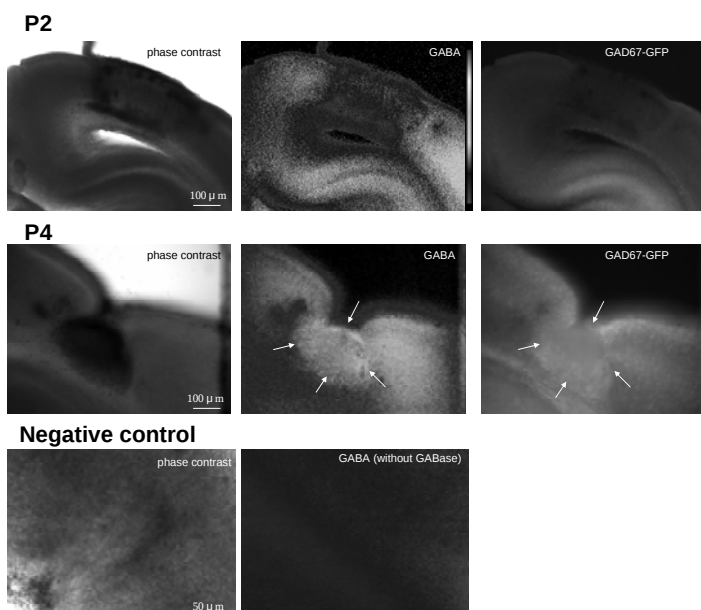


Figure 5. Endogenous GABA release at different stages after freeze-lesion at P0



作成日：2009年3月13日

財団法人日中医学協会

2008年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2009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： 叢 莉蔓 
指導責任者名： 大内 憲明 職名： 教授
所属機関名： 東北大学大学院医学系研究科
所在地： 〒980-8575
仙台市青葉区星陵町2番1号
電話： 022-717-7214 内線： 7214

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

シリカコーティング蛍光ナノ粒子を用いたセンチネルリンパ節生検並びにリンパ節到達様式に関する研究

3. 成果の概要（100字程度）

独自に作製したシリカコーティング蛍光ナノ粒子をラットの皮下に投与し、高感度蛍光計測装置を用いて体表からセンチネルリンパ節を計測した。リンパ管からセンチネルリンパ節への最適な粒径がわかり、シリカコーティングをしない場合に比べて、蛍光寿命が延びることが明らかになり、センチネルリンパ節生検に応用できる可能性が考えられた。また、透過型電子顕微鏡による観察ではシリカコーティング蛍光ナノ粒子はマクロファージ並びに樹状細胞の両方において、二通りの輸送様式が併存することが強く示唆された。

4. 研究業績

(1) 学会における発表無・☒ (学会名・演題)

■ 第6回 ナノ学会

シリカコーティング蛍光ナノビーズによるセンチネルリンパ節生検と画像診断

■ PCEM（東北臨床超微形態懇談会）

シリカコーティング蛍光ナノ粒子によるセンチネルリンパ節到達様式の検討

(2) 発表した論文 無・☒ (雑誌名・題名)

PCEM (Tohoku Univ. Med. School) Vol. 28, 11-13 2008.

シリカコーティング蛍光ナノ粒子を用いたセンチネルリンパ節生検 並びにリンパ節到達様式に関する研究

研究者氏名： 叢 莉蔓
日本研究機関： 東北大学大学院医学系研究科・腫瘍外科学分野
指導責任者： 大内 憲明 教授

Abstract :

Sentinel lymph node biopsy (SLNB) has been developed as a new diagnostic and therapeutic modality in melanoma and breast cancer surgery. There are two major methods for detection of SN using blue dye and radioisotope. However, there are disadvantages for each method. In this study we used nano-sized fluorescent beads of extremely narrow diameter distribution. This paper describes silica-coating of fluorescent microspheres by means of a seeded polymerization technique based on the Stöber method with modifying TEOS concentration at 0.00038-0.2M. We have successfully performed silica coating of fluorescent microspheres. We then demonstrated an application of silica-coated fluorescent beads for sentinel lymph node mapping by an animal model. Taken together, the chemical, optical and in vivo data presented in this study demonstrate the potential role of silica-coated fluorescent beads for imaging in medical treatments.

Key words: sentinel lymph node biopsy, radioisotope method, silica-coated fluorescent nano-particle, Stöber method

背景・目的：

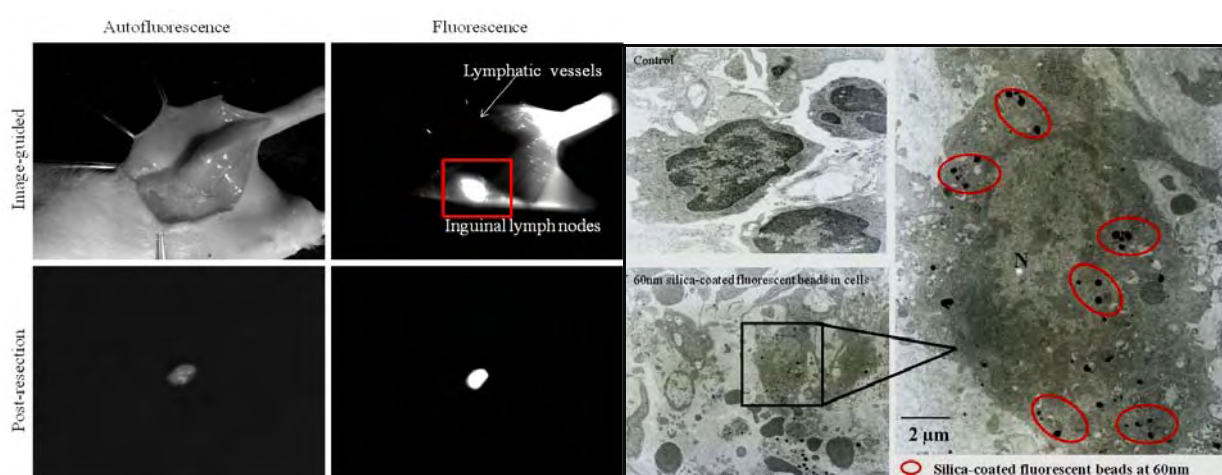
センチネルリンパ節生検はオーダーメイド医療を具現化する技術といえる。現在ラジオアイソトープ法、色素法の 2 種類が一般に施行されているが、前者は放射線管理区域でしか使用できないことから施設が限定されることや、少量とはいえ被爆の問題がある。後者は色素注入から切開まで適切な時間を要求され、客観的評価が困難である事、検出感度がやや低い事、体外診断できない事等それぞれ短所がある。それらの欠点を補う新しいトレーサーが求められている。蛍光計測法はこれらの欠点を解決し得る新しいセンチネルリンパ節検出技術として期待され、蛍光ナノ粒子を新しいトレーサーとして利用する試みがなされている。これまで我々は、粒径 100nm のポリスチレン蛍光ビーズのシリカコーティングに成功し、蛍光寿命の延長など蛍光特性の改善を認めた、本研究ではシリカコーティング法をナノ粒子の安定化技術として用いるべく、20nm および 40nm の蛍光ビーズのシリカコーティングを試み、シリカによるカプセル化合成条件の探索を行い、更に動物実験を通じてセンチネルリンパ節の蛍光造影効果を検証した。

方法：

蛍光波長 680nm で粒径 20nm および 40nm のポリスチレン蛍光ビーズを Stöber 法によりシリカコーティングした。シリカ供給源である Tetraethylorthosilicate (TEOS) の濃度を 0.00038–0.2M の範囲で変え、最適な条件を検討した。動物はラット（ドンリュウ、オス 5–7 週齢、体重 150–170g）をそれぞれの粒子につき 5 匹 10 肢ずつ実験に用いた。シリカコーティング蛍光ナノ粒子をラット後肢足背に皮下注射後、鼠径部および膝窩部にレーザー光を当て、1、10、20、30、60、120、180 分後にそれぞれを蛍光計測した。その後リンパ節を摘出し、蛍光の確認、透過電子顕微鏡（TEM）による蛍光ナノ粒子並びに組織観察、従来のパテントブルーを用いた色素法との比較検討を行った。さらに、シリカコーティング蛍光ナノ粒子及び色素法の間で検出感度を比較した。

結果：

TEOS 0.02M で厚さ 10nm のシリカ層を生成し、20nm および 40nm のビーズからそれぞれ粒径 40nm および 60nm のナノ粒子を作製できることがわかった。センチネルリンパ節造影例においては、粒径 40nm および 60nm のシリカコーティング蛍光ナノ粒子のラット足背皮下投与後双方 1 分後には下肢の皮下リンパ管が造影され、30 分後には鼠径または膝窩のどちらかのリンパ節が造影されはじめ、60 分後には鼠径および膝窩リンパ節が明確に確認できた。120 分後もリンパ管及びリンパ節全体の造影が維持され、コーティングしない粒子に比べて造影時間の延長を認めた。粒径 40nm のシリカコーティング蛍光ビーズのリンパ節検出感度は 50%であり色素法とほぼ同等であり、粒径 60nm のシリカコーティング蛍光ナノ粒子の検出率 70%と高いことがわかった。TEM による観察では 40nm 及び 60nm のシリカコーティング蛍光ナノ粒子は双方に観察されたことからマクロファージに貪食されて受動的にリンパ節に運ばれるものと直接リンパ管をリンパ流に乗って輸送されるものの両方が存在することがわかった。



左図： シリカコーティング蛍光ナノ粒子を用いたラットのセンチネルリンパ節の蛍光計測検出画像。

右図： 60nm シリカコーティング蛍光ナノ粒子がマクロファージに取り込まれていた。

考察：

粒径 40nm および 60nm のシリカコーティング蛍光ナノ粒子は遊走性貪食細胞であるマクロファージ並びにリンパ節内在性貪食細胞である樹状細胞の双方に観察されたことから直接リンパ管を通してリンパ節の樹状細胞に取り込まれて造影効果が得られる場合といったマクロファージに取り込まれからマクロファージの移動によるリンパ節の造影効果が得られる場合の二通りの輸送様式が存在することが強く示唆された。シリカコーティング技術は蛍光ナノ粒子を保護することで蛍光寿命の改善、安全性確保、またサイズ調節による組織滞留性の向上等の点から様々な応用が考えられる。本研究により TEOS 濃度を変えることで微細なナノ粒子のコーティングを行い得ることがわかった。今後の展開として、大型動物モデルによる有用性並びに長期を含めた安全性の確認、更に、シリカ層表面への機能分子修飾による応用の拡大を目指している。シリカコーティング蛍光ナノ粒子は簡便で低侵襲な画像診断を実現する上で極めて有用な技術と考えられる。

参考文献：

1. Haagensen CD. Diseases of the Breast, 2nd ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 815-832, 1971.
2. Cabanas R. An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer. 39: 456-466, 1977
3. Borgstein P, Meijer S. Historical perspective of lymphatic tumour spread and the emergence of the sentinel node concept. Eur J Surg Oncol. 24: 85-95, 1998.
4. Noguchi M, Tsugawa K, Bando E. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer; Identification of sentinel lymph node and detection of metastases. Breast Cancer Res Treat. 53: 97-104, 1999.
5. 三輪 佳宏. 蛍光・発光試薬の選び方と使い方. 羊土社、164-170, 2007.
6. 草野 満夫. LED 励起 ICG 蛍光をトレーサーとした新しいセンチネルリンパ節同定法—消化器癌への応用—. 日消外会誌, 39: 1464, 2006.
7. Kataoka K. Block copolymer micelles for drug delivery: design characterization and biological significance Adv Drug Deliv Rev. 47: 113-131, 2001.

8. Kobayashi Y, Misawa K, Kobayashi M, Takeda M, Konno M, Satake M, Kawazoe Y, Ohuchi N, Kasuya A. Silica-coating of fluorescent polystyrene microspheres by a modified Stöber method and their stability against photo-bleaching. e-Polymers. 52: 1-8, 2005.
9. Nakajima M, Takeda M, Kobayashi M, Suzuki S, and Ohuchi N. Nano-sized fluorescent particles as new tracers for sentinel node detection: experimental model for decision of appropriate size and wavelength. Cancer Sci. 96: 353-357, 2005.
10. Kobayashi Y, Misawa K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A, Konno M. Control of Shell Thickness in Silica-Coating of AgI Nanoparticles. Adv Mater Res. 29-30: 191-194, 2007.

注：本研究は、2008 年 5 月 7 日～9 日「ナノ学会第 6 回大会」にて口頭発表、
「PCEM Tohoku Univ. Med. School」(V01. 28, 1-5 2008) に掲載。

作成日：2009 年 3 月 13 日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2009 年 3 月 16 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御 中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 孫 媛



指導責任者名： 菱田 明 職名： 教授

所属機関名： 浜松医科大学

〒431-3192

所 在 地： 浜松市東区半田山1-20-1

電話： 053-435-2261 内線：

1. 助 成 金 額： 600,000 円

2. 研究テーマ

軽度の腎障害から回復したラットにおける酢酸ウラニウム再投与時の抵抗性獲得

3. 成果の概要（100字程度）

軽度障害から回復したラットでは2度目の腎毒性用量酢酸ウラニウムにより尿細管細胞障害のピークが早期かつ軽度となった。又、HGF/c-Met経路の発現亢進を介する尿細管細胞の増殖促進が、抵抗性獲得と回復促進に因子している可能性がある。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 ☐ 無 ・ ☒ (学会名・演題)

Acceleration of tubular cell proliferation as a possible mechanism of acquired resistance in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats.

Yuan Sun, Yoshihide Fujigaki, Masanori Sakakima, Takayuki Tsuji, Akira Hishida
第51回日本腎臓学会学術総会

(2) 発表した論文 ☒ 有 (雑誌名・題名)

軽度の腎障害から回復したラットにおける酢酸ウラニウム再投与時の抵抗性獲得

研究者氏名	孫 媛
中国所属機関	中国大連医科大学医学部
日本研究機関	浜松医科大学医学部第一内科
指導責任者	教授 菱田 明
共同研究者名	藤垣嘉秀

Abstract

Background: Animals recovered from acute renal failure (ARF) induced by nephrotoxic substances are resistant to subsequent insult by the same substance (acquired resistance). However, animals recovered from mild proximal tubular (PT) injury without renal dysfunction acquire similar resistance remains unknown.

Methods: Renal function and fate of PT cells 2 weeks after recovery from 0.2 mg/kg of uranyl acetate (UA) insult (low dose to induce mild PT injury) was examined in response to 4 mg/kg of UA insult (nephrotoxic dose to induce severe PT injury). To examine the contribution of accelerated PT cell proliferation on recovery from ARF, cell cycle was inhibited by colchicine and factors affecting cell survival or proliferation were investigated.

Results: Rats recovered from mild PT injury gained partial resistance with reduced renal dysfunction in response to the second UA. This resistance was associated with accelerated proliferation (BrdU-positivity) and upregulated hepatocyte growth factor (HGF)/c-Met axis compared with vehicle treatment in the first insult. Colchicine inhibited PT cell proliferation, reduced the upregulated cyclin D1 and phospho-Rb, totally abolishing accelerated recovery. Unexpectedly, rats recovered from mild PT injury showed earlier peak of PT damage (necrosis and apoptosis) but less severity of peak damage in the proximal three-quarter of S3.

Conclusions: Rats that recovered from mild PT injury showed partial acquired resistance to nephrotoxic dose of UA with accelerated PT cell injury and proliferation. Cell cycle progression of PT cells with upregulated HGF/c-Met axis may contribute to the accelerated recovery from ARF.

Key Words acquired resistance, acute renal failure, hepatocyte growth factor, proliferation, uranyl acetate

Introduction

Animals recovered from acute renal failure (ARF) are resistant to subsequent insults with nephrotoxins, including uranyl acetate (UA), and this phenomenon is termed acquired resistance to ARF [1]. A series of studies on UA-induced ARF in our laboratory suggested that renal tubular cells that recover from ARF may become resistant to a rechallenge injury with UA [2-4]. However, whether animals recovered from mild proximal tubular (PT) injury without renal dysfunction acquire similar resistance remains unknown.

We previously reported that rats with ARF induced by 2 or 5 mg/kg of UA (nephrotoxic dose of UA) exhibited significant increase in Scr and almost complete depletion of tubules in the proximal three-quarter of the S3 segment of the nephron. On the other hand, 0.25 or 0.5 mg/kg of UA (low dose of UA) induced focal PT cells depletion mainly in the proximal three-quarter of S3 segment without significant increase in Scr [5]. It is clear that kidneys recovered from apparent ARF induced by nephrotoxic dose of UA can gain resistance to subsequent insult [4]. However, it remains unknown whether kidneys recovered from mild PT injury by low dose of UA can also gain similar resistance to nephrotoxic dose of UA.

Materials and Methods

Experiment 1

Male Sprague-Dawley rats were divided into four groups: Group 1 received i.v. injection of saline, followed by another saline injection 14 days after the first insult. Groups 2, 3 or 4 received i.v. injection of saline, 0.2 mg/kg of UA (low dose of UA) or 4 mg/kg of UA (nephrotoxic dose of UA), respectively, followed by a second insult of 4 mg/kg of UA 14 days after the first insult. At 0, 3, 5, and 7 days after the second insult, three rats in each group were served for histological examination of PT cell injury and proliferation and for measurement of Scr level.

Experiment 2

Rats were divided into five groups: Group I received i.v. injection of 4 mg/kg of UA at 14 days after saline injection as vehicle. Groups II and III received 4 mg/kg of UA at 14 days after 0.2 mg/kg of UA injection, followed by intraperitoneal injection of saline or 1 mg/kg of colchicine at 6 hours before 3 days after the second insult, respectively. Groups IV and V received saline at 14 days after saline or 0.2 mg/kg of UA, respectively, followed by intraperitoneal injection of 1 mg/kg of colchicine at 6 hours before 3 days after the second insult. For determination of cells at the S-phase, all rats were injected intraperitoneally with 40 mg/kg of bromodeoxyuridine (BrdU) one hour before sacrifice. Three to five rats in each group were sacrificed just before and at 1, 2, 3, 5 and 7 days after the second insult.

Histological examination

For evaluation of tubular damage, sections were stained with periodic acid Schiff (PAS) reagent. Standardized avidin-biotin-complex technique was applied as described previously [5] to detect antigens by using the antibodies of Ki67 and BrdU. Apoptosis was assessed using the terminal uridine nick-end labeling (TUNEL) technique as described previously [6]. The number of necrotic tubules, Ki67-positive, BrdU-positive and TUNEL-positive PT cells were counted in 20 randomly selected fields of OSOM at $\times 400$ magnification.

HGF measurement

The HGF concentration in OSOM of the kidneys was determined using an enzyme immunoassay kit specific for rat HGF based on the protocol provided by the manufacturer.

Western blot

OSOM of the kidneys were dissolved at 4°C in lysis buffer in the presence of protease inhibitor cocktail. Equal amounts of proteins were loaded for SDS-PAGE gel electrophoresis as described previously [6]. Blots were probed with the primary antibodies of Cyclin-D1 and phosphorylated retinoblastoma at 4°C overnight. β -actin was used as an internal control.

Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR)

Total RNA was extracted from the OSOM of the kidneys using ISOGEN. The mRNA samples were reversibly transcribed into cDNA using a First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR. Real time RT-PCR was performed in a Light Cycler. Data were analyzed using Light Cycler software, and normalized by GAPDH mRNA expression.

Statistical analyses

All values are expressed as mean $\pm$ SD. Differences between groups were examined for statistical significance using analysis of variance followed by least significant difference. A *P* value less than 0.05 denoted the presence of a statistically significant difference.

Results

Experiment 1-Renal injury by rechallenge insult with nephrotoxic UA

Following the second insult, Scr and the number of necrotic tubules at day 5 were significantly lower in group 3 than those in group 2. Unexpectedly, Scr was significantly higher at day 3 in group 3 than in group 2 (Fig. 1). The number of Ki67-positive PT cells in group 3 were significantly higher than in group 2 at days 3 and 5 (Fig. 1B-c).

Experiment 2

1) Early changes in rechallenge injury with UA

In group II, Scr level was significantly higher at days 1, 2 and 3 than in group I (Fig. 1A). Significantly larger numbers of necrotic tubules and TUNEL-positive PT cells were noted at day 2 in group II than in group I (Fig. 1B and 1C).

2) Proliferation and cell cycle progression of PT cells in response to rechallenge injury with UA

The number of BrdU-positive PT cells in S3 were significantly greater at days 3 and 5 in group II than in group I (Fig. 2D). Western blot analysis showed significantly higher levels of cyclin D1 protein (early G1 phase marker) in OSOM at day 5 in group II than in group I, and of phospho-Rb protein (G1 to S phase marker) at days 3 and 5 in group II than in group I (Fig. 3).

3) Colchicine inhibits cell cycle progression

Colchicine treatment in group III inhibited the number of BrdU-positive PT cells and protein levels of cyclin D1 and phospho-Rb at day 5 compared with group II (Fig. 2D and 3). Colchicine treatment in group III induced increases in Scr level, number of proximal tubules and TUNEL-positive PT cells at days 5 and 7 than in group II (Fig. 2A-C).

4) HGF/c-Met axis and other growth factors

HGF protein level in OSOM was significantly higher at day 0 in groups II and III than in group I (Fig. 4A). HGF mRNA and c-Met mRNA in OSOM were significantly higher at day 2 in groups II and III, compared with group I (Fig. 4B and 4C). The expression levels of IGF-1, EGF and VEGF mRNAs in OSOM were not significantly higher in groups II and III than in group I at anytime (Fig. 4D-G).

Discussion

In this study, we demonstrated that rats recovered from mild PT injury induced by low dose of UA showed less functional injury and acquired partial resistance to rechallenge injury with nephrotoxic dose of UA, with earlier peak of PT damage but less severity of peak damage and accelerated PT proliferation compared with animals treated with vehicle alone followed by nephrotoxic dose of UA.

The number of BrdU-positive cells was higher at appearance and peaked earlier in group II than in group I, indicating accelerated proliferation of PT cells in group II. In the process of cell proliferation, the cell is required to pass a number of checkpoints. Cyclin D1 acts as a growth factor sensor in G1 phase [7] and cyclin D1-CKD4 complex acts as the Rb phosphorylator [8]. Phosphorylation of Rb disrupts complexes with E2Fs, allowing for cell cycle progression into S phase [8]. In the present study, the expression levels of cyclin D1 and phospho-Rb at days 5 and 3, respectively, were higher in group II than in group I, probably contributing to the accelerated PT cell proliferation in rats pretreated with low dose of UA.

To examine whether accelerated proliferation of PT cells observed in rats pretreated with low dose of UA contributes to accelerated recovery from ARF, we inhibited cell cycle progression by colchicine [9]. Korrapati et al. reported successful inhibition of PT cell proliferation by colchicine in mouse model of ARF and concluded that stimulated cell division and renal tissue repair by the priming dose of DCVC [9], were critical mechanisms that allow sustained compensatory tissue repair and survival of mice. In the present study, kidneys of group III treated with colchicine tended to show reduced phospho-Rb at day 3 and significant reduction at day 5 after the second insult, resulting in not only partial inhibition of PT cell proliferation but also total abolishment of accelerated cellular and functional recovery from ARF. Our findings suggest that accelerated PT cell proliferation in rats pretreated with low dose of UA is essential for accelerated recovery from ARF.

Among possible cytoprotective growth factors for PT cells [10], only HGF mRNA in OSOM of the kidneys was significantly upregulated after the second insult in the present study. In the kidney, HGF plays an important role in tubular regeneration and in the antiapoptotic response of tubular epithelial cells through its receptor c-Met [11]. In the present study, HGF mRNA and c-Met mRNA in OSOM was significantly higher day 2 in group II but not in group I, suggesting that HGF could act earlier on PT cells with upregulated c-Met in group II than in group I. Upregulation of renal HGF/c-Met axis may

contribute to inhibition of PT apoptosis and to acceleration of PT proliferation. Since protein levels and their receptors were not examined for other possible cytoprotective and/or renotropic growth factors, such as IGF-1, EGF, VEGF and BMP-7, contribution of these molecules to accelerated recovery from ARF in group II remains to be clarified.

In the clinical setting, many patients are treated with various drugs at the same time and in series. The results of the present study showed that kidneys with subclinical damage may be vulnerable to the next nephrotoxic agent and may develop renal damage much earlier than we expect. In addition, the current study demonstrated that previous subclinical damage attenuates the peak level of renal damage in rechallenge injury. Therefore, one may underestimate the toxic dose of drugs and administer the same or larger dose of drugs in occasions when the patients were not resistant to that drug. The results of this study emphasize the need for a closer assessment of renal function when we use nephrotoxic drugs in series.

In summary, kidneys recovered from mild PT injury gained acquired resistance in response to nephrotoxic dose of UA. Furthermore, PT cells mainly in the distal area of S3 showed accelerated proliferation with dedifferentiated phenotype as increased regenerative response to rechallenge injury by UA under upregulated renal HGF/c-Met axis, contributing to accelerated recovery from ARF.

Reference

1. Honda N, Hishida A, Ikuma K, Yonemura K: Acquired resistance to acute renal failure. *Kidney Int* 1987;31:1233–1238.
2. Furuya R, Kumagai H, Hishida A: Acquired resistance to rechallenge injury with uranyl acetate in LLC-PK1 cells. *J Lab Clin Med* 1997;129:347–355.
3. Mizuno S, Fujita K, Furuya R, Hishida A, Ito H, Tashim Y, Kumagai H: Association of HSP73 with the acquired resistance to uranyl acetate-induced acute renal failure. *Toxicology* 1997;117:183–191.
4. Sano K, Fujigaki Y, Miyaji T, Ikegaya N, Ohishi K, Yonemura K, Hishida A: Role of apoptosis in uranyl acetate-induced acute renal failure and acquired resistance to uranyl acetate. *Kidney Int* 2000;57:1560–1570.
5. Fujigaki Y, Goto T, Sakakima M, Fukasawa H, Miyaji T, Yamamoto T, Hishida A: Kinetics and characterization of initially regenerating proximal tubules in S3 segment in response to various degrees of acute tubular injury. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:41–50.
6. Luo J, Tsuji T, Yasuda H, Sun Y, Fujigaki Y, Hishida A: The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2198–2205.
7. Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F: Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade. *Kidney Int* 1999;56:1258–1261.
8. Seville LL, Shah N, Westwell AD, Chan WC: Modulation of pRB/E2F functions in the regulation of cell cycle and in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5:159–170.
9. Korrapati MC, Chilakapati J, Lock EA, Latendresse JR, Warbritton A, Mehendale HM: Preplaced cell division: a critical mechanism of autoprotection against S-1,2-dichlorovinyl-L-cysteine-induced acute renal failure and death in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F439–455.
10. Liu KD, Brakeman PR: Renal repair and recovery. *Crit Care Med* 2008;36 (4 Suppl):S187–192.
11. Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura K: Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4357–4361.

Figure Legends

Figure 1. Renal injury and proliferation of proximal tubular cells before and after the second insult in Experiment 1. Serial changes in serum creatinine level (A). Morphometric analysis of the number of necrotic proximal tubules (B) and number of Ki67-positive proximal tubular cells (C) in the outer stripe of the outer medulla OSOM. V, vehicle; 4 mg, 4 mg/kg of uranyl

acetate; 0.2 mg, 0.2 mg/kg of uranyl acetate. $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ v.s. day 0; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

Figure 2. Serial changes in serum creatinine level (A), morphometric analysis of the number of necrotic proximal tubules (B), number of TUNEL-positive proximal tubular cells (C) and number of BrdU-positive proximal tubular cells (D) in OSOM in Experiment 2. Abbreviations are the same as figure 1. CLC, colchicine. $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ v.s. day 0; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

Figure 3. Western blot of protein from OSOM of kidneys of groups I, II and III with antibodies for cyclin D1, phospho-Rb and β -actin (A) and relative abundance of cyclin D1 (B) and phospho-Rb (C) to β -actin. Western blot and densitometric analyses were carried out in triplicate. Abbreviations are the same as figure 2. $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ v.s. day 0; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

Figure 4. Serial changes of HGF protein content in OSOM of the kidneys (A) before and after the second insult in groups I, II and III. Real-time RT-PCR analysis of HGF (B), c-Met (C), IGF-1 (D), EGF (E), VEGF (F) and BMP-7 (G) mRNA expressions in OSOM before and after the second insult in groups I, II and III. Abbreviations are the same as figure 2. $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ v.s. day 0; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

Figure 1

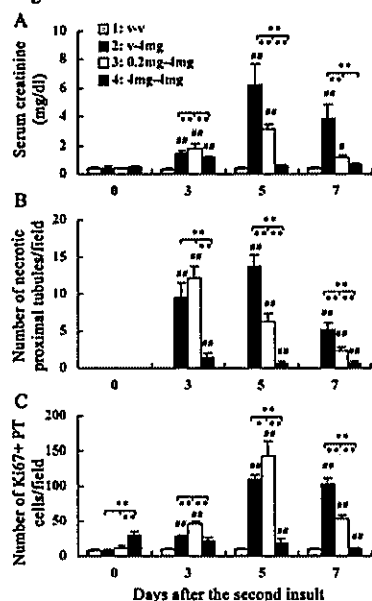


Figure 2

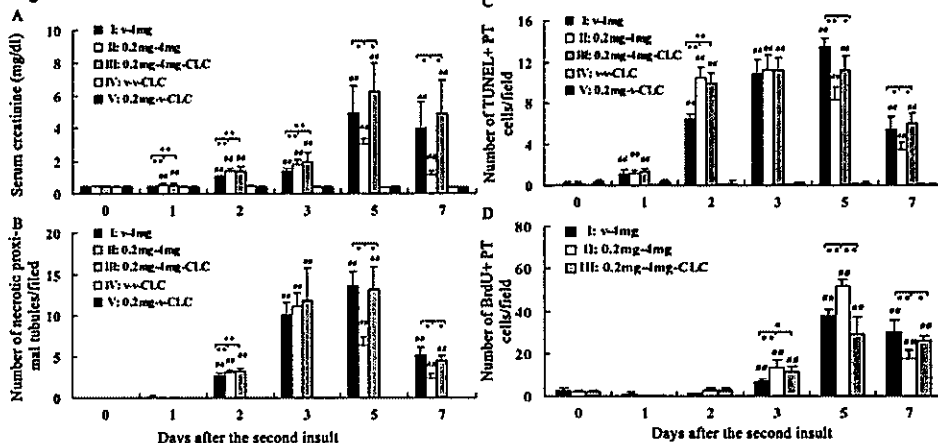


Figure 3

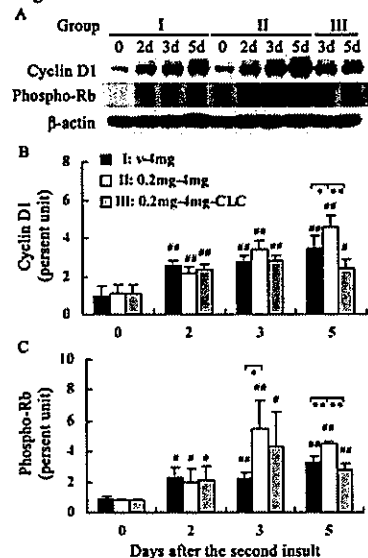
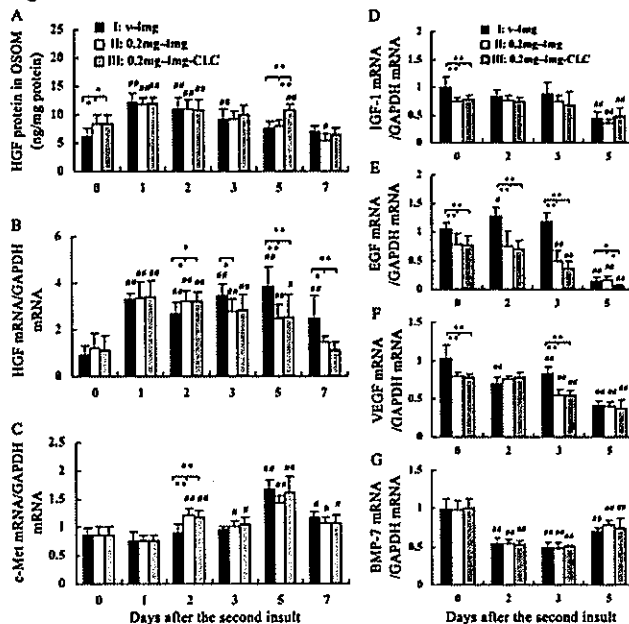


Figure 4



注：本研究は、2008年6月1日<第51回日本腎臓学会学術総会>にポスター発表。

作成日：2009年3月7日

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2009年 3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 郭文智 
指導責任者名： 鈴木信夫 職名： 教授
所属機関名： 千葉大学 環境影響生化学
〒 260-8670
所在地： 千葉市中央区支那1-8-1
電話： 043-226-2041 内線： 5133

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

ヒト細胞においてユビキチン様蛋白質sumo-3を介するX線応答反応における分子メカニズム

3. 成果の概要 (100字程度)

X線照射後にDNA合成レベルが上昇する現象が「ゴースト」患者由来細胞で見出されている。本研究では、この現象におけるsumo-3遺伝子の発現低下の関与が調べられた。sumo-3発現を抑制したHela細胞において、二次元電気泳動において差別的発現解析を行い、X線照射後に量的変動するタンパク質を複数見出した。これは、Nm23-H1と同定され、sumo-3と結合することがHis-sumo-3過剰発現Helaにおいて確認された。

4. 研究業績

(1) 学会における発表

無

・ ☒ (学会名・演題)

2008.11.19~21. 日本放射線影響学会第51回大会.

ヒト細胞で見られるX線照射後のDNA合成能の増大に
関するユビキチン様タンパクsumo-3の役割.

(2) 発表した論文

無

・ 有 (雑誌名・題名)

ヒト細胞においてユビキチン様蛋白質 SUMO-3 を介するX線応答反応における分子メカニズムの解明

研究者氏名	郭文智
中国所属機関	河北医科大学薬理学 助手
日本研究機関	千葉大学 院生
指導責任者	教授 鈴木 信夫
共同研究者	菅谷茂、佐藤守、野村文夫

要旨

細胞の DNA 合成レベルは放射線照射後通常低下するが、X 線照射後に DNA 合成レベルが上昇する現象がゴーリン患者由来細胞で見出されている。本研究では、この現象におけるユビキチン様 SUMO-3 遺伝子の発現低下の関与が調べられた。RNA 干渉法により SUMO-3 発現を抑制させた HeLa 細胞を作製し、X 線照射後の DNA 合成レベルをパルス標識法を用いて調べたところ、X 線照射後の DNA 合成誘導が見られた。また、SUMO-3 発現を抑制させた HeLa 細胞において、二次元電気泳動法により差別的発現解析を行い、X 線被照射後に量的変動するタンパク質を複数見出した。うち一つは、Nm23-H1 と同定され、Nm23-H1 の siRNA 処理でも、X 線照射後の DNA 合成上昇が見られた。一方、X 線照射後に Nm23-H1 は SUMO-3 と結合することが His-SUMO-3 過剰発現 HeLa 細胞において確認された。

Key Words Nm23-H1, DNA synthesis, SUMO-3, X-ray irradiation, human cell

緒言:

細胞の DNA 合成レベルは放射線照射後低下することは、生物種を問わない不変の現象である。ところが、X 線照射後に DNA 合成レベルが上昇する現象もあることをゴーリン患者由来細胞で見出している。さらに、X 線照射後の DNA 合成能の誘導にユビキチン様 SUMO-3 遺伝子の発現低下が関わるとの示唆を得ている。SUMO-3 タンパク質は様々なタンパク質の局在化、安定性に関わることが知られている。そこで、本研究では、SUMO-3 と結合するタンパク質を探索することにより、SUMO-3 を介した X 線照射後の DNA 合成上昇に関わる分子機構の解明を試みた。

方法:

SUMO-3 タンパク質の産生を RNA 干渉法(siRNA)により抑制させた HeLa 細胞を作製し、その細胞において、X 線照射後の DNA 合成レベルを pulse-labeling 法を用いて調べた。また、SUMO-3 発現抑制させた HeLa 細胞において、二次元電気泳動法により差別的発現解析を行い、X 線被照射後に量的変動するタンパク質を探索した。この探索したタンパク質の発現を RNA(siRNA)干渉法により HeLa 細胞において抑制し、X 線照射後の DNA 合成レベルを測定した。また、His-SUMO-3 過剰発現 HeLa 細胞を作製し、SUMO-3 と結合するタンパク質を検出し、目的とするタンパク質の SUMO 化の有無を調べた。

結果:

ゴーリン患者由来細胞のみならず、HeLa 細胞においても、SUMO-3 の siRNA 処理により、X 線

照射後の DNA 合成誘導が見られた。一方、SUMO-3 産生を低下させたことに連動して、X 線照射後発現量が変化する複数のタンパク質を見出した。うち一つは、Nm23-H1 と同定され、NM23-H1 の siRNA 処理でも、X 線照射後の DNA 合成上昇が見られた。一方、X 線照射後に Nm23-H1 は SUMO-3 と結合することが確認された。

考察:

Nm23-H1 は、癌転移の抑制因子として単離され、DNA 代謝に関わるヌクレオチドニリン酸キナーゼ(NDP kinase)活性を持つことが知られている。今回、SUMO-3 の発現抑制した場合のみ、X 線照射後に Nm23-H1 タンパクの低下が見られ、しかも、X 線照射後の DNA 合成上昇に Nm23-H1 の関与が示唆されたことから、SUMO-3 は Nm23-H1 と共に DNA 合成に関わるメカニズムのあることが示唆された。

参考文献:

- [1] K. Fujii, N. Suzuki, S. Ishijima, K. Kita, T. Sonoda, M. Dezawa, K. Sugita, H. Niimi, Abnormal DNA synthesis activity induced by X-rays in nevoid basal cell carcinoma syndrome cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 (1997) 269-272.
- [2] S. Sugaya, H. Nakanishi, H. Tanzawa, K. Sugita, K. Kita, N. Suzuki, Down-regulation of *SMT3A* gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in NBCCS cells, *Mutat. Res.* 240 (2005) 327-332.
- [3]. V. Lapenta, P. Chiurazzi, P. van der Spek, A. Pizzuti, F. Hanaoka, C. Brahe, SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family, *Genomics.* 40 (1997) 362-366.
- [4] M. Sramko, J. Markus, J. Kabát, L. Wolff, J. Bies, Stress-induced inactivation of the c-Myb transcription factor through conjugation of SUMO-2/3 proteins, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 40065-40075.
- [5] Y. Azuma, A. Arnaoutov, M. Dasso, SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis, *J. Cell. Biol.* 163 (2003) 477-87.
- [6] H. D. Ulrich, S. Vogel, A. A. Davies, SUMO keeps a check on recombination during DNA replication. *Cell Cycle* 4 (2005) 1699-1702.
- [7] F. Z. Watts: Sumoylation of PCNA, wrestling with recombination at stalled replication forks, *DNA Repair (Amst).* 5 (2006) 399-403.
- [8] T. Li, R. Santockyte, R.F. Shen, E. Tekle, G. Wang, D.C. Yang, P.B. Chock, Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 36221-36227.
- [9] Y. Kozaki, T. Ariki, M. Kubo, T. Onishi, M. Muramatsu, trans-4-amidinocyclohexanecarboxylic acid 4-tert-butylphenyl ester, a trypsin inhibitor, blocks entry of HeLa cells from G2 phase into mitosis, *Biol. Pharm. Bull.* 16 (1993) 829-833.
- [10] L. Zhai, K. Kita, C. Wano, Y. Wu, S. Sugaya, N. Suzuki, Decreased cell survival and DNA repair capacity after UVC irradiation in association with down-regulation of GRP78/BiP in human RSc cells, *Exp. Cell. Res.* 305 (2005) 244-252.
- [11] C. Pasquali, S. Frutiger, M.R. Wilkins, G.J. Hughes, R.D. Appel, A. Bairoch, D. Schaller, J. Sanchez, D.F. Hochstrasser: Two-dimensional gel electrophoresis of *Escherichia coli* homogenates, the *Escherichia coli* SWISS-2DPAGE database, *Electrophoresis.* 17 (1996) 547-555.
- [12] L. Tonella, B.J. Walsh, J.C. Sanchez, K. Ou, M.R. Wilkins, M. Tyler, S. Frutiger, A.A. Gooley, I.

- Pescaru, R.D. Appel, J.X. Yan, A. Bairoch, C. Hoogland, F.S. Morch, G.J. Hughes, K.L. Williams, D.F. Hochstrasser, '98 Escherichia coli SWISS-2DPAGE database update, Electrophoresis. (1998) 1960-1971.
- [13] J. Lu, T. Suzuki, M. Satoh, S. Chen, T. Tomonaga, F. Nomura, N. Suzuki, Involvement of aldolase A in X-ray resistance of human HeLa and UV(r)-1 cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 369 (2008) 948-952.
- [14] T. Nishimori, T. Tomonaga, K. Matsushita, M. Oh-Ishi, Y. Koder, T. Maeda, F. Nomura, H. Matsubara, H. Shimada, T. Ochiai, Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin, Proteomics 6 (2006) 1011-1018.
- [15] H. Saitoh, H. Joseph, Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-Related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3, J. Biol. Chem. 275 (2000) 6252-6258.
- [16] J. Shimada, T. Maruyama, T. Hosogi, J. Tominaga, N. Kamiya, M. Goto, Conjugation of DNA with protein using His-tag chemistry and its application to the aptamer-based detection system, Biotechnol Lett. 30 (2008) 2001-2006.
- [17] M.L. Lacombe, L. Milon, A. Munier, J.G. Mehus, D.O. Lambeth, The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases, J. Bioenerg. Biomembr 32 (2000) 247-258.
- [18] P.S. Steeg, G. Bevilacqua, L. Kopper, U.P. Thorgerisson, J.E. Talmadge, L.A. Liotta, M.E. Sobel, Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential, J. Natl. Cancer. Inst. 80 (1988) 200-204.
- [19] J. Nordman, O. Skovgaard, A. Wright, A novel class of mutations that affect DNA replication in *E coli*, Mol Microbiol. 64 (2007) 125-138.
- [20] MH. Bosnar, R. Bago, K. Gall-Troselj, T. Streichert, J. Pavelic: Downstream targets of Nm23-H1, gene expression profiling of CAL 27 cells using DNA microarray, Mol Carcinog. 8 (2006) 627-633.
- [21] E. Warbrick, The puzzle of PCNA's many partners, BioEssays. 22 (2000) 997-1006.
- [22] L. Haracska, I. Unk, Robert E. Johnson, B. Phillips, J. Hurwitz, L. Prakash, S. Prakash, Stimulation of DNA Synthesis Activity of Human DNA Polymerase α by PCNA, Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 784-791.
- [23] J. Xu, GF. Morris, p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation, Mol. Cell. Biol. 19 (1999) 12-20.
- [24] M. Scheffner, JM. Huibregtse, RD. Vierstra, PM. Howley, The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, Cell. 75 (1993) 495-505.
- [25] J. Wesierska-Gadek, D. Schloffer, V. Kotala, M. Horky, Escape of p53 protein from E6-mediated degradation in HeLa cells after cisplatin therapy, Int. J. Cancer, 101 (2002) 128-136.
- [26] S. Nakahara, A. Raz, Regulation of cancer-related gene expression by Galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway, Cancer. Metastasis. Rev. 26 (2007) 605-610.
- [27] R. L. Welchman, C. Gordon, R.J. Mayer, ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6 (2005) 599-609.
- [28] F. Melchior, SUMO--nonclassical ubiquitin, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16 (2000) 591-626.

注:本研究は、2008 年 11 月 19 日「日本放射線影響学会」にてポスター発表

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2009 年 3 月 10 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 王 春霞



指導責任者名： 堀田 喜裕 職名： 教授

所属機関名： 浜松医科大学

〒431-3192

所 在 地： 静岡県浜松市東区半田山1-20-1

電話： 053-435-2256 内線： 2256

1. 助 成 金 額： 600,000 円

2. 研究テーマ

新規緑内障原因遺伝子の探索と変異・機能解析
－家系の収集、リンケージ解析、変異スクリーニング－

3. 成果の概要（100字程度）

高齢化社会で失明原因の上位を占める緑内障の発症機序解明を目指した分子生物学的解析を行った。基盤材料となる家系性症例の検体を多数収集し、既知原因遺伝子WDR36の塩基配列を解析したところ、疾患原因変異は見つからなかった。それら収集症例は新規原因遺伝子の探索に役立つことが期待できる。一方、既知原因遺伝子OPTNタンパクの機能解析を行い、ラットの視細胞の細胞質及び核における発現を初めて検出し、視細胞の核でOPTN とNRL（網膜色素変性の原因遺伝子）が相互作用することを強く示唆した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

第31回日本分子生物学会年会・オプチニューリンとNRL蛋白の相互作用の解析

(2) 発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・題名)

臨床眼科・分子遺伝学的検査により確定診断し得たBest病の一例

新規緑内障原因遺伝子の探索と変異・機能解析 －家系の収集、リンケージ解析、変異スクリーニング－

研究者氏名	王 春霞
中国所属機関	中国医科大学附属第四病院眼科
日本研究機関	浜松医科大学眼科
指導責任者	教授 堀田 喜裕
共同研究者名	朝岡 亮、大石健太郎、細野克博、 大坪正史、蓑島伸生

要 旨

緑内障は、高齢化社会における失明原因として最も重要な眼疾患のひとつである。緑内障は、多因子性と言われているが、遺伝要因が非常に大きく、その主要な病型である原発開放隅角緑内障（POAG）の場合、患者の数%～約半数の頻度で家族性であることが報告されている。POAG の原因遺伝子はこれまでに、ミオシリン（MYOC）、オプチニューリン（OPTN）、WDR36 の 3 種類が、他に先天性緑内障の原因遺伝子 CYP1B1 が同定されたが、これらの遺伝子に変異が見られるのは、家族性症例の数パーセント程度である。筆者の所属研究室では、緑内障の発症機構の理解と臨床への応用のために、より多くの症例の原因となる新規原因遺伝子の探索と発症機序の追究を行っている。筆者は、それらの研究の一環として、重要な研究資材となる家族性症例の収集と検体調製を行うとともに、実際の遺伝子変異探索、原因遺伝子の機能解析を行った。緑内障症例については、日本人 69 家系（患者 166 人）のうち、116 人（患者 111 人、非発症者 5 人）の血液から DNA を抽出し、株化もほぼ全例成功した。また、収集した症例を新規原因遺伝子探索に用いるために、既知原因遺伝子に変異のある症例は除外する必要があるため、まず WDR36 遺伝子についてプレスクリーニングを行った。その結果、エクソン上には塩基変化は見つからなかったが、イントロンで IVS12+90C>T、IVS13+89G>A、IVS17-30A>G の 3 つの多型と思われる変化を認めた。そのうち、IVS17-30A>G は新規の多型であった。さらに、既知原因遺伝子 OPTN の機能解析の一つとして、OPTN タンパクと bZIP 転写因子 NRL（Neural Retina Leucine zipper）タンパクとの相互作用の検討を行った。その結果、ラットの視細胞の細胞質および核における OPTN の発現を初めて検出し、視細胞の核において OPTN と NRL（網膜色素変性の原因遺伝子）が相互作用することを強く示唆することができた。

Key Words 緑内障，原因遺伝子，WDR36，変異

緒 言：

緑内障は、中国、日本を含めた高齢化社会における失明原因として症例数が非常に多い重要な眼疾患のひとつであり、治療法、治療薬の開発は喫緊の課題である。緑内障は多因子性と言われているが、遺伝的要因が大きく、患者の数%～約半数の頻度で家族性を示すことが報告されている。一方、遺伝的要因以外の要因にも発症が左右されることが知られており、総括すれば多因子性・多遺伝子性疾患と考えられる。原因遺伝子については、緑内障の主要な病型である原発開放隅角緑内障（POAG）と正常眼圧緑内障（NTG）の場合、ミオシリン（MYOC）、オプチニューリン（OPTN）、WDR36 の 3 種類が現在までに同定された。他に、先天性緑内障では CYP1B1 が同定された。しかし、これらの遺伝子に変異が見つかるのは家族性症例全体の数%でしかなく、他の大多数の症例の発症を説明できる未知の原因遺伝子が存在すると考えられる。既知の原因遺伝子の機能、変異による発症の分子機序も不明である。

筆者の所属研究室では、緑内障の発症機構の理解と臨床への応用、オーダーメイド医療の確立のために、より多くの症例の原因となる新規原因遺伝子の探索と発症機序の追究を行っている。筆者は、それらの研究の一環として、重要な研究資材となる家族性症例の収集と検体調製を行うとともに、実際の遺伝子変異探索、原因遺伝子の機能解析を行った。具体的には以下の3点に関して研究を遂行した。

1. 新規原因遺伝子同定に活用するための緑内障家族性症例の収集
2. 収集した症例における既知原因遺伝子変異のプレスクリーニング
3. オプチニューリンと網膜色素変性の原因遺伝子タンパク NRL の相互作用の解析

対象と方法：

1. 新規原因遺伝子同定に活用するための緑内障家族性症例の収集

対象疾患は、原発開放隅角緑内障（POAG）、正常眼圧緑内障（NTG）、高眼圧症（OH）とした。浜松医科大学附属病院及び関連病院を受診したそれらの疾患の患者で、家族にそれらの疾患のいずれかを有する例について収集対象とした。インフォームドコンセント取得後、末梢血を 10ml 採取した。5ml の血液から分離したリンパ球に EB ウイルスを感染させ、不死化 B リンパ球株の確立を試みた。残り 5ml の血液からは DNA を抽出した。

2. 収集した症例における既知原因遺伝子変異のプレスクリーニング

前項で収集した緑内障症例は、新規原因遺伝子の探索に用いるため、既知原因遺伝子に変異のある症例はプレスクリーニングにより除外する必要がある。そこで、まず WDR36 遺伝子の変異をスクリーニングした。末梢血から抽出した DNA を鋳型として、WDR36 遺伝子のエクソン領域を PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を解析した。

3. オプチニューリンと網膜色素変性の原因遺伝子タンパク NRL の相互作用の解析

筆者の所属研究室では、緑内障の原因遺伝子の一つである OPTN の機能と緑内障の発症機序を解析するために、OPTN と相互作用するタンパクの酵母 2 ハイブリッド法によるスクリーニングが行われている。その過程で、bZIP 転写因子 NRL（Neural Retina Leucine zipper）タンパクが OPTN と結合する可能性が示唆された。NRL 遺伝子は、網膜色素変性の原因遺伝子としても知られている。筆者は、二つの重要な遺伝性眼疾患の原因遺伝子が相互作用する可能性に注目して、その実験的証明を以下のように行った。

- (1) NRL と OPTN の cDNA をそれぞれ HA タグ、FLAG タグ配列を含むベクターにクローニングし、HeLaS3 細胞に共導入してタグ抗体による共免疫沈殿の後、ウェスタンブロット法(WB 法)で相互作用の検討を行った。
- (2) ラットの眼球を摘出し、ホルマリン固定パラフィン包埋の組織切片を作製し、抗 NRL 抗体と抗 OPTN 抗体で蛍光抗体染色を行った。
- (3) ラット神経網膜組織から核と細胞質の両画分を調製して、WB 法と共免疫沈殿法で両タンパクの相互作用を検討した。

結 果：

1. 新規原因遺伝子同定に活用するための緑内障家族性症例の収集

POAG、NTG、OH の日本人家系の収集および不死化 B リンパ球株の樹立を行った。現在までに、収集された日本人 69 家系（患者 166 人）のうち、116 人（患者 111 人、非発症者 5 人）の血液から DNA を抽出し、株化もほぼ全例（114/116）成功した。

2. 収集した症例における既知原因遺伝子変異のプレスクリーニング

WDR36 遺伝子のエクソンとエクソン近傍のイントロン領域を解析した結果、エクソン上には塩基変化は見つからなかったが、イントロンで IVS12+90C>T、IVS13+89G>A、IVS17-30A>G の 3 つの多型と思われる変化を認めた。そのうち、IVS17-30A>G は未報告の新規の多型であった。

3. オプチニューリンと網膜色素変性の原因遺伝子タンパク NRL の相互作用の解析

- (1) HeLaS3 細胞で NRL と OPTN を共発現させて、抗 FLAG 抗体で NRL を免疫沈殿したところ、WB 法で HA タグ付き NRL (33 kDa) のバンドが認められた。抗体を逆の順序で用いたところ、FLAG タグ付き OPTN (69 kDa) のバンドが認められた。即ち、両者は HeLaS3 の中で結合することが示された。
- (2) ラット眼組織において、NRL は外顆粒層（視細胞の核）に発現していた。一方、OPTN は、視細胞内節、外網状層に加え、外顆粒層にも発現していた。外顆粒層における OPTN は主として細胞質に蛍光染色が見られたが、核は染色の見られる細胞と見られない細胞が混在していた。この結果は、OPTN が視細胞に存在し、一部はその核にも存在することを示し、視細胞核内での NRL との相互作用の可能性を示唆した。
- (3) ラット眼組織から調製した神経網膜の核画分には細胞質画分に比して少量ではあるが OPTN が存在することが WB 法で確認できた。そこで、核画分から抗 OPTN 抗体で免疫沈殿を行い、抗 NRL 抗体で WB 法を行ったところ、NRL が検出された。

考 察：

1. 家系性緑内障症例の検体の収集と不死化 B リンパ球株の確立は順調に行うことができた。失敗例は、いずれも末梢血の新鮮度が落ちていた例（採取後 5～7 日経過）であり、新鮮血での成功率は 100%であった。
2. 日本人緑内障家系の WDR36 遺伝子に、従来報告されていない IVS17-30A>G を含め、合計 3 種類の多型と思われる塩基変化を認めた。緑内障の原因遺伝子は 4 種類（WDR36、OPTN、MYOC、CYP11B1）知られているが、それらに変異が見つかる症例は数%にすぎない。緑内障原因遺伝子解析は、病態の正確な把握と確定診断に有用であるばかりでなく、治療法、治療薬開発にも直結する知見を得られる可能性も大きいので、今後も積極的に進める計画である。
3. 視細胞での OPTN の発現の報告は本研究が初めてである。培養細胞での実験で、OPTN は細胞に H₂O₂ 処理等のストレスにより核に移行することが報告されており、一部の視細胞のみで核に OPTN が存在する現象には、ストレスなどの細胞の状態が関与している可能性がある。これまでに OPTN と結合するタンパクは、Huntingtin, TFIIIA, Rab8 などが報告されたが、眼に特異的なタンパクとの相互作用は、本報告の NRL が最初である。OPTN は眼以外の組織でも機能するタンパクであるにも関わらず、その変異が緑内障のみを起こす理由は、今後解明されねばならないが、眼に特異的なタンパクとの相互作用が、その糸口となる可能性は大きい。また、視細胞の核で OPTN が NRL と相互作用することの意味は不明であるが、OPTN の視細胞での機能とともに解析する必要がある。さらに、OPTN の変異が神経節細胞のみならず視細胞に与える影響をノックアウトマウス等を用いて解析することで、緑内障と網膜色素変性の病態とともに、神経網膜の細胞死に関しての新しい知見が得られる可能性がある。

参考文献：

1. Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet.* 2005;14(6):725-733.
2. Kramer PL, Samples JR, Monemi S, et al. The role of the WDR36 gene on chromosome 5q22.1 in a large family with primary open-angle glaucoma mapped to this region. *Arch Ophthalmol.* 2006;124(9):1328-1331.
3. Stone EM, Fingert JH, Alward WL, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science.* 1997;275:668-670.
4. Rezaie T, Child A, Hitchings R, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science.* 2002;295:1077-1079.
5. Hauser MA, Allingham RR, Linkroum K, et al. Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:2542-2546.

6. Bessant DA, Payne AM, Mitton KP, et al. A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1999;21:355-356.
7. Kroeber M, Ohlmann A, Russell P, Tamm ER. Transgenic studies on the role of optineurin in the mouse eye. *Exp Eye Res.* 2006;82:1075-1085.
8. De Marco N, Buono M, Troise F, Diez-Roux G. Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus. *J Biol Chem.* 2006;281:16147-16156.
9. Hattula K, Paranen J. FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr Biol.* 2000;10:1603-1606.
10. Moreland RJ, Dresser ME, Rodgers JS, et al. Identification of a transcription factor IIIA-interacting protein. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:1986-1993.
11. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, et al. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol.* 2005;169:285-295.

注：本研究は、2008年12月9日「日本分子生物学会年会」にてポスター発表。

作成日：2009年3月10日

財団法人日中医学協会

2008 年共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告者

2009 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致します。

添付資料：研究報告書

中国人研究者名： 鄧 穎氷 

指導責任者名： 國土 典宏 職名：教授

所属機関名： 東京大学附属病院肝胆脾外科人工臓器移植外科
〒113-8655

所 在 地： 東京都文京区本郷 7-3-1

電話： 03 (3815) 5411 内線： 33321

1. 助 成 金 額： 600000 円

2. 研究テーマ

Comprehensive Analysis of Aberrantly Suppressed Genes due to Promoter
Hypermethylation in Hepatocellular Carcinoma

3. 成果の概要

Aberrant DNA methylation is deeply involved in human carcinogenesis through inappropriate gene silencing. Previous studies have reported that some tumor suppressor genes were silenced by aberrant promoter hypermethylation and the mRNA expression of these genes were reversible by 5-Aza-dC treatment. In this study, we performed genome-wide analysis of both transcriptional and epigenetic profile of hepatocellular carcinoma (HCC) using microarray-based technologies. After treatment of HCC cell line Hep3B with 5-Aza-dC and/or TSA, changes of mRNA levels were measured by microarrays. Then, we compared upregulated genes to the list of candidate promoter hypermethylated genes identified by MeDIP-chip analysis. Array-based analysis revealed the capability of re-expression by pharmacological treatment and DNA hypermethylation in promoter region showed close relationship not only in the limited cases but also in a genome-wide manner. Our data provide the evidence that aberrant promoter methylation of the candidate genes is more frequently seen in HCV-positive HCC than HBV-positive HCC.

4. 研 究 業 績

(1) 学会における発表 有 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer
Association (JCA)

(2) 発表した論文 無
今 投稿の準備

肝癌における DNA 異常メチル化癌抑制遺伝子の網羅的な解析

研究者氏名	鄧 穎冰
中国所属機関	中国吉林省人民病院 医師
日本研究機関	日本東京大学附属病院肝胆膵外科
指導責任者	教授 國土 典宏
共同研究者名	永江 玄太, 金田 篤志, 油谷 浩幸

Abstract

HCC, the major type of primary liver cancer, is one of the most common cancers worldwide and a leading cause of death in many countries. Although many of the major viral and environmental risk factors for hepatocellular carcinoma (HCC) development have been unraveled, the genetic and epigenetic pathways leading to malignant transformation of liver cells have remained obscure. Epigenetic instability characterized by methylation of multiple cancer-related genes is gaining recognition as a key mechanism of tumor suppressor gene silencing in many human cancers, including HCC. Aberrant DNA methylation is deeply involved in human carcinogenesis through inappropriate gene silencing. Previous studies have reported that some tumor suppressor genes were silenced by aberrant promoter hypermethylation and the mRNA expression of these genes were reversible by 5-Aza-dC treatment. In this study, we performed genome-wide analysis of both transcriptional and epigenetic profile of HCC using microarray-based technologies. After treatment of HCC cell line Hep3B with 5-Aza-dC and/or TSA, changes of mRNA levels were measured by microarrays. Then, we compared upregulated genes to the list of candidate promoter hypermethylated genes identified by MeDIP-chip analysis. 2016 genes among 3266 hypermethylated genes showed expression level less than 50 in gene chip score in control cells (i.e., without 5-Aza-dC/TSA treatment), which were upregulated after 5-Aza-dC treatment in 336 genes (expression level more than 50 in gene chip score). And 274 genes among 3266 hypermethylated genes showed 2.5 fold expression than the genes without treatment. 451 genes were upregulated after 5-Aza-dC+TSA treatment. And 346 genes showed 2.5 fold expression than the genes without treatment. Array-based analysis revealed the capability of re-expression by pharmacological treatment and DNA hypermethylation in promoter region showed close relationship not only in the limited cases but also in a genome-wide manner. The presence of hepatitis viruses, especially HCV, could play a role in accelerating the methylation process that is involved in HCC development than HBV. Our data provide the evidence that aberrant promoter methylation of the candidate genes is more frequently seen in HCV-positive HCC than HBV-positive HCC.

Keywords: methylation, hepatocellular carcinoma, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC), Trichostatin A (TSA)

Background/Purpose

Aberrant DNA methylation is deeply involved in human carcinogenesis through inappropriate gene silencing and chromosomal instability. Previous studies have revealed that some tumor suppressor genes were silenced by aberrant promoter hypermethylation and the genes were re-expressed by 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) treatment. However, the genome-wide analysis of DNA methylation were poorly understood in hepatocellular carcinoma (HCC). In this study, we examined silencing caused by the aberrant methylation of those promoters in HCC and re-expression of the genes

in hepatoma cell line (Hep3B) after 5-Aza-dC treatment.

Materials and Methods

Liver cancer cell line, Hep3B cells was treated with 5-Aza-dC and/or Trichostatin A (TSA) to analyze the effect of pharmacological reversal of aberrantly DNA hypermethylation and/or histone deacetylation. Changes of mRNA levels after these treatments were measured by Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 microarrays. Then, we compared re-expressed genes by 5-Aza-dC/TSA treatment to the list of candidate promoter hypermethylated genes identified by MeDIP-chip (methylated-DNA immunoprecipitation with high-resolution tiling array) analysis. A total 105 liver tissues, including 50 pairs of HCCs and the matched noncancerous liver tissues, and 5 normal liver tissues, were analyzed for promoter methylation status of the candidate genes by MassARRAY system.

Results

Relationship between gene expression and promoter methylation

The relation of upregulated genes after the treatment (5-Aza-dC or 5-Aza-dC+TSA) and hypermethylation-detected genes by MeDIP-chip analysis were determined. 2016 genes among 3266 hypermethylated genes showed expression level less than 50 in gene chip score in control cells (i.e., without 5-Aza-dC/TSA treatment), which were upregulated after 5-Aza-dC treatment in 336 genes (expression level more than 50 in gene chip score). And 274 genes among 3266 hypermethylated genes showed 2.5 fold expression than the genes without treatment (Fig. 1A). 451 genes were upregulated after 5-Aza-dC+TSA treatment. And 346 genes showed 2.5 fold expression than the genes without treatment (Fig. 1B).

MeDIP-chip

274 genes or 346 genes in Fig.1 included gene SFRP1, SOCS1 and the other candidate gene1, gene2 of HCC-specific and gene3 of HCV(+) HCC-specific hypermethylated genes were selected by MeDIP-chip analysis (HBV(+) HCC-specific hypermethylated genes couldn't be selected). We observed that SFRP1, SOCS1 and gene1, gene2 and gene3 showed significantly higher levels of methylation in Hep3B cells.

GeneChip score

In this study, SOCS1, gene1 and gene3 showed upregulation after the treatment. SOCS1 and gene1 which were hypermethylated in HCC and hypomethylation in liver cirrhosis (LC) and normal liver tissue (NL) in MeDIP-chip analysis, and gene3 were only hypermethylated in HCV(+) HCC. Their expression showed silencing.

MassARRAY

SFRP1, SOCS1, gene1 and gene2 were frequently methylated, Gene3 was preferentially methylated in HCV(+) HCC ($p=0.002$, χ^2 -test).

Discussion

HCC, the major type of primary liver cancer, is one of the most common cancers worldwide and a leading cause of death in many countries. Although many of the major viral and environmental risk factors for HCC development have been unraveled, the genetic and epigenetic pathways leading to malignant transformation of liver cells have remained obscure. Epigenetic instability characterized by methylation of multiple cancer-related genes is gaining recognition as a key mechanism of tumor suppressor gene silencing in many human cancers, including HCC. In this study, we performed a detailed quantitative methylation analysis of a large number of methylation in a total 105 liver tissues, including 50 pairs of HCCs and the matched noncancerous liver tissues, and 5 normal liver tissues. The results presented herein clearly demonstrate that higher degree of methylation occurs in the

promoter region of hepatocellular carcinoma, and it is likely that methylation of some gene may sequentially progress and participate in the development of carcinogenesis. Another important observation is that the presence of hepatitis viruses, especially HCV, could play a role in accelerating the methylation process that is involved in HCC development than HBV.

Conclusion

Our data provide the evidence that aberrant promoter methylation of the candidate genes is more frequently seen in HCV-positive HCC than HBV-positive HCC.

Reference

1. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*. 2003 Apr;3(4):253-66. Review.
2. Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*. 2003 Sep;163(3):1101-7.
3. Ehrlich M, Nelson MR, et. al Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 1;102(44):15785-90.
4. Hirasawa Y, Arai M, Imazeki F, Tada M, Mikata R, Fukai K, Miyazaki M, Ochiai T, Saisho H, Yokosuka O. Methylation Status of Genes Upregulated by Demethylating Agent 5-aza-2-Deoxycytidine in Hepatocellular Carcinoma. *Oncology*. 2006;71(1-2):77-85. Epub 2007 Mar 6.
5. Hayashi H, Nagae G, Tsutsumi S, Kaneshiro K, Kozaki T, Kaneda A, Sugisaki H, Aburatani H. High-resolution mapping of DNA methylation in human genome using oligonucleotide tiling array. *Hum Genet*. 120(5):701-11, 2007 [Sep 26, 2006; Epub ahead of print]
6. Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland CR, Goel A. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 Mar;47(3):908-18.

作成日 : 2009 年 3 月 10 日

2008年度共同研究等助成金 - 在留中国人研究者 - 報告書

2009年3月4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：危英 

指導責任者名：服部征雄 職名：教授

所属機関名：富山大学和漢医薬学総合研究所薬物代謝工学分野

〒930-0194

所在地：富山市杉谷2630番地

電話：076-434-7633 内線：7633

1. 助成金額：600,000 円

2. 研究テーマ

人参加水分解産物トリテルペン誘導体の抗 HIV protease および抗 HCV protease 作用に関する研究

3. 成果の概要 (100字程度)

- 1) Three new artificial triterpenoids were isolated from an acidic hydrolysate of *Panax ginseng*, along with three known triterpenes. Four of them show inhibitory activity against HIV-1 protease.
- 2) Sixteen dammarane triterpenes were synthesized, all of the mono and di-succinyl derivatives show strong inhibition on HIV-1 PR ($IC_{50} < 10 \mu M$), only di-succinyl and 2,3-*seco*-2,3-dioic acid derivatives show strong inhibition on HCV PR ($IC_{50} < 10 \mu M$).

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・ ☒ (学会名・演題)

日本薬学会第128年会 口頭発表 P.81

(2) 発表した論文 無・ ☒ (雑誌名・題名)

1) Phytochemistry Letter, Available online 16 December 2008

Anti-HIV Protease Triterpenoids from the Acid Hydrolysate of *Panax ginseng*

2) Submitted to Bioorg. Med. Chem.

Synthesis of Dammarane type triterpene derivatives and their inhibitory activities against HIV and HCV protease

人参加水分解産物トリテルペン誘導体の抗 HIV protease および抗 HCV protease 作用に関する研究

研究者氏名	危 英
中国所属機関	貴陽中医学院薬学系
日本研究機関	富山大学和漢医薬学総合研究所
指導責任者	教授 服部 征雄
共同研究者名	馬 超美

要旨:

ADIS is one of the most fatal infectious diseases in the world, which is caused by HIV. Since HIV is easy to mutate and develop resistance to current drugs, it was described to be “a silent epidemic”.^{1,2} As in the case of hepatitis C, only 50% therapeutic effect for HCV infected patients by using pegIFN- α .^{3,5} Therefore, it is emergency to develop new chemopreventive agents against HIV and HCV.

Keywords: Dammarane; triterpene; 2,3-seco derivative; succinyl derivative; HIV protease; HCV protease

緒言:

In previous paper, we reported that some natural products and their derivatives have anti-HIV-1 PR,⁶ we also reported that embelin show inhibition on HCV PR.⁷ Numerous studies during past decade have demonstrated that pentacyclic triterpenes showed inhibitory activity on HIV.^{8,9} However, tetracyclic triterpenes, especially dammarane type triterpene derivatives were not reported for their inhibitory activity against HIV and HCV PRs.

対象と方法:

1. Strong acid were used to hydrolysize a methanol extract of *P. ginseng*.¹⁰
2. (20*R*)-panaxadiol and (20*R*)-panaxatriol were used as starting material to prepare various 2,3-*seco*, A-nor and acetylated derivatives by using oxidation and substituent reactions.^{11,12}

結果:

1. Three new artificial triterpenoids were isolated from an acidic hydrolysate of *Panax ginseng* along with three known triterpenes. Four of them show inhibitory activity against HIV-1 PR.
2. Sixteen dammarane triterpenes were synthesized. All of the mono- and di-succinyl derivatives show strong inhibition on HIV PR. Only di-succinyl and 2,3-*seco*-2,3-dioic acid derivatives show strong inhibition on HCV PR.

考察:

Inhibitory activity of dammarane type triterpenes against HIV-1 and HCV proteases

参考文献:

1. Kohl, N. E.; Ermini, E. A.; Schleif, W. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, 4686-4690.
2. <http://www.kff.org/hiv/aids/upload/pdf>. pp 7124-05. Access date : 05/11/2008

3. Feld, J. J.; Hoofnagle, J. H. *Nature* **2005**, *436*, 967-972.
4. Neumann, A. U.; Lam, N. P.; Dahari, H.; Gretch, D. R.; Wiley, T. E.; Layden, T. J.; Perelson, A. S. *Science* **1998**, *282*, 103-107.
5. Fried, M. W.; Shiffman, M. L.; Reddy, D. K. R.; Smith, C.; Marins, G.; Goncales, F. L.; Häussinger, D.; Diago, M.; Carosi, G.; Dhumeaux, D.; Craxi, A.; Lin, A.; Hoffman, J.; Yu, J. *New Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 975-982.
6. Ma, C. M.; Nakamura, N.; Hattori, M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 77-99.
7. Hussein, G.; Miyashiro, H.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kakiuchi, N.; Shimotohno, K. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 510-516.
8. Sun, I. S.; Wang, H. K.; Kashiwada, Y.; Shen, J. K.; Cosentino, L. M.; Chen, C. H.; Yang, L. M.; Lee, K. H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4648-4657.
9. Kashiwada, Y.; Chiyo, J.; Ikeshiro, Y.; Nagao, T.; Okabe, H.; Cosentino, L. M.; Fowke, K.; Lee, K. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 183-185.
10. Urban, M.; Sarek, J.; Klionot, J.; Korinkova, G.; Hajduch, M. *J. Nat. Prod.*, 2004, *67*, 1100-1105.
11. Ma, C. M.; Nakamura, N.; Hattori, M. *Chem. Pharm. Bull.*, 2000, *48*, 1681-1688.

注: 本研究 2008 日本薬学会第 128 年会 口頭発表 P. 81

Paper 1: Phytochemistry Letter (Available online 16 December 2008)

Paper 2: Submitted to Bioorg. Med. Chem.

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2009年 3 月 1 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 皎 
指導責任者名： 金川 克子 職 研究課長  名誉教授
所属機関名： 石川県立看護大学
〒
所 在 地： 929-1212 石川県かほく市中沼ツ 7 番 1
電話： 076-281 、 8300 内線： _____

1. 助 成 金 額： 600,000 円

2. 研 究 テ ー マ 太極拳を取り入れた認知症予防プログラムの有効性に関する介入研究
—日本の一地域での試みを基盤に、中国の一地域での研究成果を通して—

3. 成 果 の 概 要 (100字程度)

—本研究は日本の対象者 13 名、中国の対象者 138 名の高齢者に 3 ヶ月間(週 2 回)太極拳を実施し、太極拳の実施前後における生活機能、体力機能及び脳機能を測定した。日本の調査ではいずれも統計的有意差は見られなかった。中国の調査では 10m 歩行速度、握力(右)、MMSE において介入群が対照群より有意な改善が見られた。介入群内で生活機能、握力(右)、MMSE において、介入後が介入前より有意な改善が見られた。

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)

太極拳を取り入れた認知症予防プログラムの有効性に関する介入研究

— 日本の一地域での試みを基盤に、中国の一地域での研究成果を通して —

研究者氏名	孫 皎
中国所属機関	中国吉林大学第一病院幹部病棟
日本研究機関	日本石川県立看護大学
指導責任者	教授 金川 克子

要旨

本研究は、太極拳の実施により高齢者の生活機能、体力機能、及び脳機能に及ぼす効果を明らかにすることを目的とした。試行研究において、対象者は13名の高齢者であり、平均年齢は 68.5 ± 5.9 であった。3ヶ月間(週2回)太極拳を実施し、太極拳の実施前後における生活機能(老研式活動能力指標)、体力機能(開眼片足立ち、10m通常歩行速度、握力左、握力右)、及び脳機能(MMSE, FAB)を測定した。いずれも統計的有意差は見られなかった。その結果を参考にして、中国での調査は対照群を作成し、介入群と対照群の前後変化量及び両群内の結果を比較した。研究の対象者は、138名の高齢者で介入群77名(平均年齢 68.3 ± 5.9 歳)、対照群66名(平均年齢 70.1 ± 5.7 歳)であった。3ヶ月間(週2回)太極拳を実施し、太極拳介入前後における生活機能(老研式活動能力指標)、体力機能(開眼片足立ち、10m通常歩行速度、握力左、握力右)、及び脳機能(MMSE, FAB)を測定した。介入群と対照群の前後変化量の結果、体力機能では10m通常歩行速度、握力(右)、脳機能ではMMSEにおいて、介入群が対照群より有意な改善が見られた。介入群での介入前後の比較結果、老研式活動能力指標、体力機能では握力(右)、脳機能ではMMSEにおいて、介入後が介入前より有意な改善が見られた。対照群での観察前後の比較結果、老研式活動能力指標、体力機能では開眼片足、10m通常歩行速度において、観察後が観察前より有意な改善が見られた。以上より太極拳は高齢者の認知症予防、健康維持・増進に有効であると考えられた。

Key Words 太極拳, 脳機能, 高齢者, QOL

緒言:

世界一の長寿国となった日本では、老後の健康で生きがいに満ちた生活のあり方への関心が高まっている。高齢者の増加に伴い認知症症状を示す人が増加し、認知症の処遇が大きな社会問題となってきている。現在、中国の人口は13億人を越え、世界の人口のおよそ五分之一を占めている。特に中国政府は「一人っ子」政策を実施しており、人口の高齢化が急速に進んでいる。高齢化率の増大とともに、痴呆性高齢者の急増も避けられず、1999年のデータによると、55歳以上のアルツハイマー病は310万人になった。65歳以上の有病率は4.8%、75歳以上で10%、85歳以上で20%程度となった。2025年には1,009万になると予測されている。今後、人口の増加と共に認知症の人数が増加の傾向があると言われる¹⁾。近年、要介護状態にならないようにすること(介護予防)や、自立した生活の支援を行うこと(生活支援)を目的とする運動療法の介入の研究が進んでいる。その中、太極拳は中国の伝統武術の一つであり、ソフトで軽快な動きを以って、低い重心と円の運動を保ちながら四肢の動作と呼吸の協調性を求める心身を鍛える運動である^{2,3)}。これまでは太極拳を行っている高齢者に対する健康増進効果や転倒予防や骨粗鬆症予防(筋力向上、バランス能力向上)に関する研究は数多く行われている。しかし、高齢者に対する太極拳による認知症予防に関する研究はまだ少ない。また、日本と中国の両国における高齢者の認知症

予防についての研究はまだ少ない。

本研究では、日本の一地域における高齢者に太極拳を試行し、その方法や成果を参考に、中国の一地域の高齢者を対象に、太極拳の実施により認知機能、心身に与える効果を明らかにすることを目的とする。本研究の結果は、今後認知症予防に関する介入を検討する上で、有意義な知見となることが期待される。さらに日本と中国の比較を通して、諸外国に特有な医療事情を知ることはそれぞれの国の医療問題、高齢化対策及び認知症予防対策を考える上でも有用な知識を与えると考ええる。

研究対象と方法:

1) 日本の一地域で試行した調査対象

日本の石川県の一地域(人口が概ね1万人のT町)の集会所で3ヶ月間太極拳を行った。対象者は集会所の利用者であった。太極拳を試行する前に、「太極拳教室」に関するちらしが町内で配布し、教室参加者を募集した。研究として進めるために、同意を得た教室参加希望者は60歳以上13人であり、その中に男性1名、女性12名であった。参加者に質問紙調査、体力測定と脳機能測定(面接調査)を行った。

2) 中国における調査対象

対象者は中国の吉林大学における離・退職者向けの老人活動センターの利用者である。老人活動センターの利用者は一日平均50人程度である。研究開始前に、「太極拳教室」に関するちらしを貼って、教室参加者を募集した。研究に関する同意を得た教室参加希望者は60歳以上150人であった。乱数表に基づく無作為割付により介入群(75人)と対照群(75人)に分けた。太極拳をする前のベースライン調査には全員参加したが、入院などの理由で脱逸し、3ヵ月後の調査では介入群が72人、対照群が66人になった。太極拳の評価として、老人活動センターの利用者には質問紙調査、体力測定、脳機能測定(面接調査)の三つとした。なお、本研究は石川県立看護大学論理委員会の承認を得たものである。

3) 太極拳プログラム

本研究の太極拳プログラムの指導者は、定年前に運動の教育を行っており、ほぼ30年間太極拳をしているこの道の専門家が担当した。音楽に合わせて24式の太極拳を実施した。

研究期間は2008年6月から11月までであるが、最初の3ヶ月間は準備と対象者に対するベースライン調査とした。その後は2008年9月から11月までの3ヶ月間介入を行った。すなわち、対象者は週2回、10分間の認知症予防の資料を読み、その資料について研究者が説明し、60分間太極拳を実施した。介入群、対照群いずれも同じ会場で週2回、10分間の認知症予防の資料を読み、その資料について研究者の説明を実施した。その後、介入群が継続に太極拳する60分間、対照群が自由行動とした。

4) 質問紙調査の分析

調査票は基本属性・患者背景として、性別、年齢、学歴、家族構成を質問した。これ以外の質問項目は、老研式活動能力指標に関する14つの質問項目であるが、中国の事情を勘案して1つの項目を削除し、13つの質問項目とした。回答は「1点:はい」と「0点:いいえ」の2分類にし、点数化(0-13点)で分析した。また、中国の調査での介入群と対照群の前後における老研式活動能力指標の変化量及び各群の介入/観察前後の比較を行った。量的変数(年齢、老研式活動能力指標)の群間比較にはt検定、カテゴリー変数(性別、学歴、家族構成)の群間比較には χ^2 検定を行った。

5) 体力測定、面接調査項目の分析

体力測定では、握力(左、右)、開眼片足立ち、10m通常歩行速度を測定した。面接調査では、脳機能検査を行った。知的機能全般の変化を見る指標として、Mini-Mental Statement (MMSE)と前頭葉機能の検査としてFABを用いた。連続変数(握力、開眼片足立ち、10m通常歩行速度、MMSE、FAB)に関しては平均値、標準偏差を算出した。また、介入群と対照群の群間の前後変化量及び群内の介入/観察前後の変化にはt検定を行った。

すべての統計解析には解析ソフトSPSS 13.0を使用して、 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

結果:

1) 日本での試行研究の結果

対象者の属性は、男性が1人(7.7%)、女性が12人(92.3%)であった。年齢は60～83歳に分布し、平均年齢68.5歳(標準偏差5.9歳)であった。学歴は短期大学以上2人(15.4%)、以下11人(84.6%)であった。家族構成は子供と同居する6人(46.2%)、配偶者と同居する4人(30.8%)、一人暮らし1人(7.7%)であった。疾患は心臓病1人(7.7%)、高血圧2人(15.4%)、脳梗塞1人(7.7%)、他9人(69.2%)であった。老研式活動能力指標、体力機能、脳機能測定値の介入前後の比較の結果、介入前後の各項目では、いずれも統計的有意差が認められなかった。

2) 中国での研究の結果

(1) 介入前における対象者の特徴及び老研式活動能力指標、体力機能、脳機能の特徴

介入群の人数が75人であり、男性が15人(20%)、女性が60人(80%)であった。年齢は60～85歳に分布し、平均年齢68.5歳(標準偏差6.1歳)であった。学歴は短期大学以上42人(56%)、以下33人(44%)であった。家族構成は子供と同居する28人(37.3%)、配偶者と同居する43人(57.4%)、一人暮らし4人(5.3%)であった。疾患は心臓病17人(22.7%)、高血圧12人(16.1%)、脳梗塞4人(5.4%)、糖尿病4人(5.3%)であった。

対照群の人数が75人であり、男性が24人(32%)、女性が52人(68%)であった。年齢は60～80歳に分布し、平均年齢70.5歳(標準偏差5.6歳)であった。学歴は短期大学以上53人(70.7%)、以下22人(29.3%)であった。家族構成は子供と同居する19人(25.3%)、配偶者と同居する50人(66.7%)、一人暮らし6人(8%)であった。疾患は心臓病10人(13.4%)、高血圧19人(25.3%)、脳梗塞9人(12%)、糖尿病4人(5.3%)、他33人(44%)であった。介入群と対照群との間に年齢、学歴は統計的有意差が認められた($P<0.05$)。以外の項目はいずれも有意ではなかった。

介入前の介入群と対照群との老研式活動能力指標、体力機能各項目、脳機能各項目の平均値の差の検定を行った。老研式活動能力指標、握力(左)において統計的有意差が認められた(老研式活動能力指標：介入群 11.7 ± 1.2 、対照群 10.8 ± 2.2 、握力(左)：介入群 24.5 ± 6.9 、対照群 23.8 ± 10.2 、 $p<0.05$)。以外のいずれの項目においても、有意ではなかった。

(2) 介入群と対照群の前後変化量の比較

表1は介入群と対照群の前後変化量の比較を示した。体力機能における10m、握力(右)では、両群間の変化は統計的有意差が認められた($p<0.01$)。10m通常歩行速度、握力(右)において介入群が対照群より有意に改善した。脳機能におけるMMSEでは、両群間の変化は統計的有意差が認められた($p<0.01$)。MMSEにおいて介入群が対照群より有意に改善した。以外のいずれの項目においても、有意ではなかった。

表1 介入群と対照群の前後変化量の比較

項目	介入群(n=72)	対照群(n=66)	p-value
老研式活動能力指標(0-13点)	0.5 ± 1.0	0.5 ± 1.5	0.64
体力機能			
開眼片足	8.1 ± 35.5	11.0 ± 26.1	0.38
10m	-0.2 ± 2.2	0.8 ± 1.3	<0.001
握力(左)	0.2 ± 2.9	-0.5 ± 3.5	0.20
握力(右)	1.2 ± 3.2	-0.5 ± 4.1	<0.01
脳機能			
MMSE(0-30点)	1.4 ± 2.2	0.3 ± 2.2	<0.01
FAB(0-18点)	0.3 ± 1.8	0.3 ± 2.6	0.35

介入群と対照群の前後変化量に対する平均値の差の検定結果を示した。

(3) 両群での介入/観察前後の各項目の比較

表2に両群の老研式活動能力指標、体力機能、脳機能測定値の介入前後の群内比較を示した。介入群の介入前後の老研式活動能力指標、握力(右)、MMSEの平均値±標準偏差はそれぞれ 11.7 ± 1.3 と

12.1±0.9、25.5±7.0と26.7±7.2、26.4±2.4と27.8±1.7であった。対照群の観察前後の老研式活動能力指標、開眼片足、10m 通常歩行速度の平均値±標準偏差はそれぞれ10.7±2.1と11.2±2.0、23.3±23.0と34.3±37.5、8.9±2.5と9.7±2.6であった。いずれも介入/観察前後で統計的有意差が認められた(p<0.05)。両群とも老研式活動能力指標が改善した。介入群では握力(右)、MMSEが改善したが、対照群では10m 通常歩行速度が遅くなった。対照群では開眼片足が改善した。一方、介入群、対照群とも握力(左)、FABにはいずれも統計的有意差は見られなかった。

表2 両群での介入前後の老研式活動能力指標、体力機能、脳機能の比較

項目	介入群			対照群		
	前	後	p-value	前	後	p-value
老研式活動能力指標	11.7±1.3	12.1±0.9	p<0.001	10.7±2.1	11.2±2.0	p<0.01
体力機能 開眼片足	28.7±27.1	36.9±38.3	0.22	23.3±23.0	34.3±37.5	p<0.05
10m 歩行	8.7±2.1	8.5±2.0	0.20	8.9±2.5	9.7±2.6	p<0.001
握力(左)	24.7±6.9	24.9±6.5	0.73	23.6±10.3	23.1±11.5	0.11
握力(右)	25.5±7.0	26.7±7.2	p<0.01	23.9±10.5	23.4±11.5	0.09
脳機能 MMSE(0-30点)	26.4±2.4	27.8±1.7	p<0.001	26.8±1.7	27.1±1.8	0.43
FAB(0-18点)	14.6±2.1	14.9±2.4	0.22	14.1±2.7	14.3±2.8	0.22

両群での介入前後の老研式活動能力指標、体力機能、脳機能に対する平均値の差の検定結果を示した。

考察:

1) 脳機能の変化

本研究では太極拳の実施により認知症予防効果を検証した。日本での試行研究では、介入前後ではいずれも統計的有意差が見られなかった。この結果に基づいて、中国の調査は対照群を作成し、対照群と比較した。その結果3ヶ月間、週2回計24回の認知症予防を意図した太極拳運動により、両群の介入/観察前後変化量の比較において、介入群では、MMSEの効果が対照群と比べて顕著であった。また、介入群の介入前後の比較において、介入後ではMMSEの効果が介入前と比べて顕著であったことから、太極拳運動は健康な高齢者の認知症予防に有効であることが示唆される。運動は脳血流を高めることが報告されており⁴⁾、神経伝達の効率改善についてもColcombeら⁵⁾による中高齢者を対象としたウォーキングのトレーニングによって、選択刺激に対する前帯状回の改善が報告されていた。Larson EBとLaurin Dによれば^{6,7)}、高い有酸素を持つ者は記憶、視空間、注意といった認知機能も高いことが示されたように、太極拳は有酸素運動として目と手の協調において、視線は常に手先の動きを追従して運動し、指先からつま先まで身体全体が一体化して連動する様子で脳のエピソード記憶、短期記憶、長期記憶、注意力の集中の機能を活発にすることを考える。前頭葉機能、記憶は加齢により低下しやすい脳機能であるが、有酸素運動により、高齢者の脳機能の一部が改善され得ることを示したエビデンスが期待される。

2) 生活機能と体力機能の変化

老研式活動能力指標の分析の結果について、介入群と対照群の前後変化量をみると、統計的有意差は見られなかったが、介入群、対照群とも介入/観察後が介入/観察前より有意な差が見られた。野村ら⁸⁾は3ヶ月間(週1回、1回ごと60~90分)の太極拳プログラムを65歳以上の高齢者97名(介入群47名、対照群50名)に実施した結果、両群ともに介入/観察前後で有意な変化が認めなかった報告した。本研究では、両群ともに介入/観察前後で有意な変化が見られた。老研式活動能力指標は高次の生活機能を表すものであり、健康に関する番組に関心を示すことや本や雑誌を読むなどの項目で表されるような人生に対する前向き態度や姿勢を表しておく。毎回太極拳を実施する前に、認知症予防の資料を読み、研究者の説明を聞くことによって、生活機能が向上する可能性があると考えられる。

本研究では3ヶ月間の太極拳実施による身体体力機能において、両群の介入/観察前後変化量の比較の結果を見たら、10m通常歩行速度、握力(右)が有意に向上した。また介入群内介入前後の比較では、握力(右)が有意に向上したが、対照群内観察前後の比較では、10m通常歩行速度が長くなった。これは、3ヶ月間太極拳を定期的に行うことで、筋力、歩行能力において介入群のほうが向上したことを示唆するものである。高杉と劉ら^{9,10)}は地域の高齢者を対象に3ヶ月間の太極拳を指導した結果、歩行速度、握力など有意な改善が認められた報告した。本研究は先行研究の結果と一致すると考える。RossらとHartmanら^{11,12)}は、8週間と12週間の太極拳実施前後の開眼片足立ち時間測定で有意な変化がなかったと報告した。Wuは開眼片足立ち時間に影響を与える太極拳実施回数は40回以上であると報告した。本研究においては、介入群の片足立ち時間に有意な改善はなかったが、対照群に有意な改善があった。このことは、本研究では太極拳の実施時間が短い24回であり、他の要素に影響されたことと考えられる。

試行研究では参加者の人数が少ない、両国の文化、習慣、価値観が異同のために、太極拳の実施の効果に影響される可能と考える。現在両国でも認知症患者に対する在宅・施設ケアシステムの設立はまだ不十分であるため、認知症の予防、早期発見は高齢者のQOLを向上させる方法であると考えられる。本研究のような認知症の知識を学びながら、太極拳を実施するプログラムはほとんどなかった現実では、安心して暮らせる地域づくり、認知症の理解と予防につながる啓発普及の必要があると言える。

本研究は、高齢者に太極拳の実施により、認知症予防に向けた介入研究の最初の試みである。しかし、調査対象者は一カ所であるため、未だ得られた結果を一般化するには至らないと考える。太極拳運動には種類が多く、練習時間、練習頻度、練習強度などによって、脳機能に与える影響に差が出ると考えられ、今後の課題となる。

参考文献:

- 1) 王春生：中国老年看護の発展現状と展望、第四屆中韓看護及び第三屆老年看護学会抄録集、4-8, 2000.
- 2) 中華人民共和国体育委員会：太極拳運動、人民体育出版社、18, 1983.
- 3) 日本武術太極拳連盟：2003年全日本武術太極拳競技大会誌、12, 2003.
- 4) Williamson JW, Friedman DB, Mitchell JH, et al.: Mechanisms regulating regional cerebral activation during dynamic handgrip in humans. *J Appl Physiol*, 81:1884-1890, 1996.
- 5) Colcombe SJ, Kramer AF, Erickson KI, et al.: Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *Proc Natl Acad Sci*, 101:3316-3321, 2004.
- 6) Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, et al.: Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med*, 144:73-81, 2006.
- 7) Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, et al.: Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol*, 58:498-504, 2001.
- 8) 野村卓生、菅野伸樹、長野聖等：“太極拳を取り入れた体操”の開発と介護予防効果に関する予備検証、*J Rehabil Health Sci*5:1-6, 2006.
- 9) 高杉紳一郎、河野一郎、上島隆秀等：リハビリテーション技術 太極拳～現代に活かす東洋伝統武術、*Journal of clinical rehabilitation*15(9):878-881, 2006.
- 10) 劉雲発：高齢者の24式太極拳のトレーニング効果について、*教育医学* 48:347-352, 2003.
- 11) Hartman CA, Manos TM, Winter C, et al.: Effects of Tai Chi training on function and quality of life indicator in older adults with osteoarthritis, *J Am Geriatr*48:1553-1559, 2000.
- 12) Ross MC, et al.: The effects of a short-term exercise program on movement, pain, and mood in the elderly, Results of a pilot study, *J Holist Nurs*17, 139-147, 1999.

注：本研究は、2009年7月『石川県立看護雑誌』に掲載予定。

作成日：2009年3月1日

この助成事業は競艇の交付金による
日本財団の助成金を受けて実施しました

2008年度共同研究等助成事業報告集
財団法人 日中医学協会
〒101-0053 東京都千代田区神田美土代町11-2
TEL:03-3291-9161 FAX:03-3291-9164
発行日 2009年4月
発行人 安達 勇