

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究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： 迫 康仁  
所属機関名： 旭川医科大学  
所属部署名： 寄生虫学講座 職名： 講師  
所 在 地： 旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目  
電 話： 0166-68-2422 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国で蔓延している人獣共通寄生虫症(囊虫症)の迅速・簡便な検査法の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 迫 康仁	職名： 講師
所属機関名： 旭川医科大学	部署名： 寄生虫学講座
中国側研究者氏名： 李 調英	職名： 教授
所属機関名： 四川省疾病管理予防センター	部署名： 寄生虫病研究所

4. 当該研究における発表論文等

研究成果の一部を International Symposium on Cestode Zoonoses Control

(Oct. 29-30, Shanghai, China)および Joint International Tropical Medicine

Meetin 2012 (Dec. 12-14, Bangkok, Thailand)で口頭発表した。

現在、投稿準備中である。

## 中国で蔓延している人獣共通寄生虫症(囊虫症)の迅速・簡便な検査法の開発

研究代表者	迫 康仁
所属機関	旭川医科大学寄生虫学講座
中国共同研究者	李 調英
中国研究機関	四川省疾病管理予防センター

### 要旨：

有鉤囊虫症(cysticercosis cellulosae)は、有鉤条虫(*Taenia solium*)の幼虫である囊虫が筋肉、皮下、脳などに寄生することにより引き起こされる疾患であり、豚とヒトとの間で感染環が維持されている致死的人畜共通感染症である。また、本症は流行地域における癲癇発作の主な病因と考えられている。有鉤囊虫症の検査の一つに、ELISA法やイムノプロット法を用いて特異抗体を検出する血清検査法がある。現行の血清検査法は、信頼できる検査結果を提供するが、一方、特殊な設備とある程度の経験が必要であるため、臨床現場や流行現場で迅速な検査を行うことが出来ないという問題点がある。したがって、新たな血清検査法の開発が望まれている。最近、迅速・簡便な検査を提供できる汎用性の高い検査法として、イムノクロマトグラフィー(ICT)法が注目されている。そこで、本研究では、組換え有鉤囊虫症血清抗原を用いたイムノクロマトグラフィー法の開発を行った。その結果、従来のELISA法と同程度の検査性能を持つ血清検査法を開発することが出来た。今後、安定性・再現性に関する検討を、より多くの血清を用いて行う必要がある。

key words：有鉤囊虫症、血清検査、組換え抗原、イムノクロマトグラフィー法

### 緒言：

有鉤囊虫症は、有鉤条虫(*Taenia solium*)囊虫の感染に起因する疾患である。*T. solium*の終宿主はヒトであり、中間宿主は豚であるが、ヒトは偶発的に有鉤条虫の虫卵を経口摂取した場合あるいは自家感染により中間宿主となり有鉤囊虫症を引き起こす。特に神経症状を引き起こす脳有鉤囊虫症は临床上重要であり、流行地域における癲癇発作の主な病因となっている(1)。

本症の診断には、主にCT、MRIなどの画像診断が適用されており、その有用性が示されているが、寄生虫の寄生数が少ない場合あるいは典型的な画像所見を示さない場合はその感染を見逃す可能性が高い。また、コストの点より流行地域、特に発展途上国において画像診断を適用することは困難である。したがって、患者血清中の有鉤囊虫特異抗体を検出する免疫学的診断法は、確定診断を行うための補助情報を提供する重要な役割を担っている(2)。以前、我々は有鉤囊虫に特異的な組換え抗原を用いたELISA法およびイムノプロット法による血清検査法を開発し、その有用性を示した(3)。しかしながら、通常の検査で使用しているELISA法およびIB法は、特殊な器具を使用する必要があり、臨床現場で

の使用が制限されている。それに対し、イムノクロマトグラフィー法(ICT法)に基づく検査法は、特別な器具を必要とせず、さらに迅速・簡便に、病原体の抗原あるいは病原体に対する抗体を検出出来る方法として知られている。本研究では、イムノクロマトグラフィー法を用いた有鉤囊虫症の抗体検出検査法を開発し、ELISA法との検査性能に関する比較を行った。

#### 対象と方法：

**血清：**解析に用いたヒト血清は、中国・四川省カンゼ・チベット族自治州雅江県(Yajiang)の有鉤囊虫症流行地に於いて行われた住民検診で採取されたものである。四川省疾病管理予防センターのスタッフにより、研究目的が住民に説明され、同意を得た住民の血清のみを使用した。本研究には、有鉤囊虫症特異抗原を用いた検査により陽性を示した血清を用いた。対照として用いた多包虫症血清、単包虫症血清および陰性コントロール血清は、四川省疾病管理予防センターが保有する血清であり、これらも住民の同意を得たものである。

**組換え抗原の発現および精製：**本研究で使用した抗原は、大腸菌の系を用いて発現させた。有鉤囊虫症特異的抗原である、低分子量抗原 Ag1V1 および Ag2 を用いた(3)。また、有鉤囊虫症血清の一部は、これらの抗原に弱陽性を示すため、同じファミリータンパク質に属する抗原 10kAg-3 ならびに 10kAg-9 も使用した。4 抗原を、グリシン 5 残基をスペーサーとし、連結させたキメラ抗原(Tsol4Ags)として発現させた(図 1. A)。ただし、Ag2 ならびに 10kAg-9 抗原は、全長では大腸菌に毒性を示すため、エピトープ領域解析の結果を基に、Ag2 は N 末端および C 末端領域を、10kAg-9 は中央領域を保持する形で発現させた。発現させた組換えタンパク質は、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

**イムノクロマトグラフィー法：**精製 Tsol4Ags(1mg/ml)およびウサギ抗ヤギ IgG 抗体(1mg/ml)を、それぞれテストラインおよびコントロールラインとして、約 1mm 幅でニトロセルロース膜上に塗布した。乾燥後、1%スキムミルク溶液に浸漬してブロッキングした後、再び乾燥させた。約 5mm 幅の短冊状に切断した後、抗原塗布面を上にして台紙に貼付し、反応膜とした。その後、吸収パッドおよび基質レーザーバーと共に、サンプル添加窓と展開溶液添加窓を持つイムノクロマトグラフィーカセットに装着した。血清 10 $\mu$ l とアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体(0.1mg/ml)20 $\mu$ l をチューブ内で混合後、混合液 20 $\mu$ l をサンプル添加窓に添加した。添加後速やか(30 秒以内)に、展開液 200 $\mu$ l を展開溶液添加窓に添加し、静置した。20 分後、テストラインおよびコントロールライン部の発色により判定を行った。発色には、5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)を用いた。その後、バンド強度をイムノクロマトリーダーで測定し数値化した。相対バンド強度は、テストラインのバンド強度数値をコントロールラインのバンド強度数値で割ることにより算出した。

**統計学的解析：**検査性能に対してはマクネマー検定およびカッパー係数の算出により比較を行い、相関の解析はスピアマンの順位相関係数を求めることを行った。

結果：

### (1) 組換え抗原の発現および精製

安定した検査法を供給するには、大量の抗原が必要である。そこで、有鉤囊虫症血清診断用抗原として評価の高い、低分子量抗原 Ag1V1 および Ag2、ならびにそのファミリータンパク質 10kAg-3 および 10kAg-9 の大腸菌による発現を試みた。Ag1V1 および 10kAg-3 に関しては、大量発現に成功した。しかしながら、Ag2 および 10kAg-9 は大腸菌に対する毒性が強く、十分量の組換えタンパク質を得ることが出来なかった。Ag2 および 10kAg-9 抗原は、診断用抗原としての能力が高いため、高感度検査法を確立するには必須である。そこで、Ag2 のエピトープ領域は N-および C-末端に、10kAg-9 のエピ

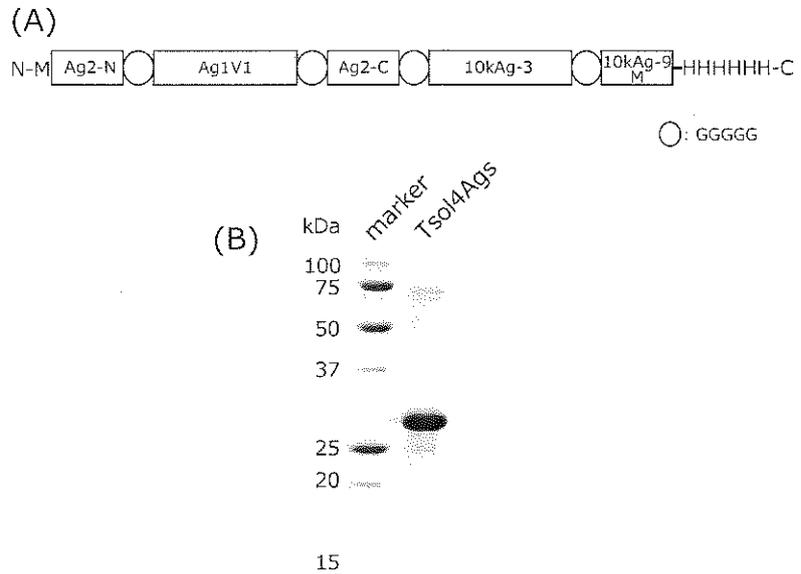


図1. Tsol4Ags の構造 (A) と精製組換え Tsol4Ags の SDS-PAGE 像 (B)

トープ領域は中央部に存在していることが判明していたため(未発表データ)、両抗原エピトープ領域のみの発現を試みた。また、4 種の抗原をそれぞれ発現させるのではなく、全抗原を、グリシン残基をスペーサーとして連結させたキメラ抗原(Tsol4Ags)として発現させた(図1. A)。特に、Ag1V1 抗原を Ag2 抗原の中央部位に挿入し、Ag2 の立体構造の破壊を行うことにより、大腸菌に対する毒性を減弱することが出来るのではないかと予測し、発現実験を行った。その結果、予測分子サイズ 30kDa の組換え抗原の大量発現に成功した(図1. B)。

### (2) イムノクロマトグラフィー法に基づく有鉤囊虫症血清検査法の開発

イムノクロマトグラフィー法を用いた血清検査の構築時に、予備実験として、有鉤囊虫の包虫液より精製した native 抗原と組換え Tsol4Ags 抗原との比較を行った。その結果、イムノクロマトグラフィー法の抗原としては、組換え Tsol4Ags が適していることが明らかとなった(未発表データ)。そこで、以降の実験には組換え Tsol4Ags 抗原を用いた。イムノクロマトグラフィー法では、図2に示すように、血清検査陽性の場合テストラインおよびコントロールラインに発色が、血清検査陰性の場合コ

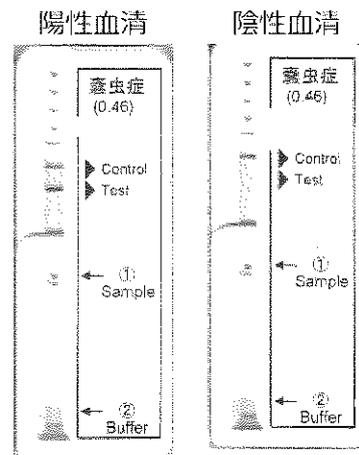


図2. 陽性血清および陰性血清を用いた ICT 法の結果

血清検査陽性の場合テストラインおよびコントロールラインに発色が、血清検査陰性の場合コ

ントロールラインのみに発色が観測される。

### (3) イムノクロマトグラフィー法の評価

本研究で開発したイムノクロマトグラフィー法の有鉤囊虫症血清検査としての評価を、有鉤囊虫症、多包虫症、単包虫症および陰性コントロール血清を用いて行った(表1および表2)。多包虫血清および単包虫症血清は、それぞれの血清診断抗原 Em18 (4)およびAntigenB (5)に強陽性を示したものを使用した。その結果、全ての有鉤囊虫症血清、13.3%の多包虫血清および40%の単包虫症血清が陽性と判断された。また、全ての陰性コントロールは、陰性であった。

検査性能に関して、従来の血清検査法である ELISA 法との間に統計学的差は認められなかった( $P = 0.371$ )。

また、ELISA 法との一致率は93.1% ( $\kappa$ 係数 = 0.859)であった。これより、イムノクロマトグラフィー法の有用性が示された。さらに、イムノクロマトグ

ラフィー法で得られた相対バンド強度は、ELISA で得られた吸光度と強い相関を示した(図3.  $R_s = 0.732$ ,  $P = 0.0000215$ )。

表1. 各血清に対する ICT 法と ELISA 法の結果

血清由来	検体数	ICT 法	ELISA 法
		陽性数(%)	陽性数(%)
有鉤囊虫症	22	22 (100)	22 (100)
多包虫症	15	2 (13.3)	3 (20.0)
単包虫症	15	6 (40.0)	8 (53.3)
陰性コントロール	20	0	0

多包虫症血清および単包虫症血清は、それぞれの診断抗原に強陽性を示しものを使用した。

表2. ICT 法と ELISA 法との比較

ICT 法	陽性数	ELISA 法 陰性数	合計
陽性数	29	1	30
陰性数	4	38	42
合計	33	39	72

一致率 = 93.1% ;  $\kappa$ 係数 = 0.859

### 考察 :

本研究では、大腸菌に対する毒性が強かったために、大量調製が困難であった有鉤囊虫症診断用抗原の大量発現に成功した。また、それを用いたイムノクロマトグラフィー法に基づく迅速・簡便な有鉤囊虫症血清検査法を開発した。

開発したイムノクロマトグラフィー法の検査性能を、有鉤囊虫症血清、多包虫症血清、単包虫血清および陰性コントロール血清を用いて評価した

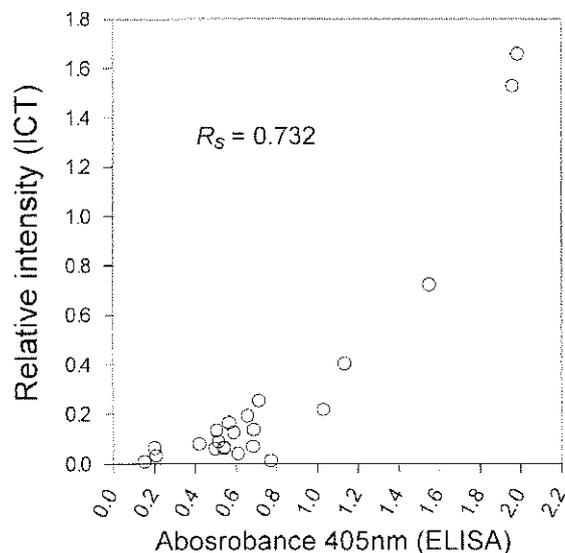


図3. 相対バンド強度(ICT法)と吸光度(ELISA法)の散布図  
有鉤囊虫症血清 (20例) を用いた結果。スピアマン順位相関係数( $R_s = 0.732$ )

ところ、従来の血清検査に用いられている ELISA 法と同程度の検査性能を持つことが明らかとなった。本研究で用いた血清は、それぞれの血清診断抗原に陽性を示すものである。つまり、血清選択の際に、ある程度のバイアスが存在しており、本来の各疾患の集団を反映しているものではない。したがって、今後、さらに多くの血清を用いて評価を行わなければならない。

イムノクロマトグラフィー法は、①専門知識、経験および特別な器具が必要ない、②比較的短時間(20 分)で検査結果を得ることが出来る、などの利点を持っている。そのため、イムノクロマトグラフィー法は、臨床現場における迅速かつ適切な治療の提供を可能とする検査法であり、また、設備の乏しい流行地現場でのスクリーニングツールとして使用できる検査法であると考えられる。今後、イムノクロマトグラフィー法の安定性・再現性に関して検討しなければならない。

#### 参考文献：

1. Mahanty, S., Garcia, H.H. (2010) Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Prog Neurobiol* 91, 172-184.
2. Ito, A., Craig, P.S. (2003) Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections. *Trends Parasitol* 19, 377-381.
3. Sako, Y., Nakao, M., Ikejima, T., Piao, X.Z., Nakaya, K., Ito, A. (2000) Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J Clin Microbiol* 38, 4439-4444.
4. Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Yamasaki, H., Gottstein, B., Lightowers, M.W., Schantz, P.M., Ito, A. (2002) Alveolar echinococcosis: characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18. *J Clin Microbiol* 40, 2760-2765.
5. Mamuti, W., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakao, M., Xiao, N., Nakaya, K., Sato, N., Vuitton, D.A., Piarroux, R., Lightowers, M.W., Craig, P.S., Ito, A. (2004) Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol* 42, 1082-1088.

## 財団法人 日中医学協会

2012年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013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調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：田中英明

所属機関名：熊本大学大学院生命科学研究部

所属部署名：神経分化学分野 職名：教授

所在地：熊本市中央区本荘1-1-1

電話：096-373-5292 内線：5292



1. 助成金額： 100万 円

2. 研究テーマ

毛髪の形成維持に関わる神経軸索ガイダンス分子draxinの機能解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：田中英明

職名：教授

所属機関名：熊本大学大学院生命科学研究部

部署名：神経分化学分野

中国側研究者氏名：蘇 玉紅

職名：副教授

所属機関名：中国河北医科大学

部署名：人体解剖学教研室

4. 当該研究における発表論文等

未発表

## 毛髪の形成維持に関わる神経軸索ガイダンス分子 draxin の機能解析

研究者氏名

教授 田中英明

日本所属機関

熊本大学大学院生命科学研究部神経分化学分野

中国研究者氏名

副教授 蘇 玉紅

中国所属機関

河北医科大学人体解剖学教研室

### 〈要 旨〉

我々の脳機能は、発生過程において正しく形成される神経回路網に依存する。発生過程の神経細胞はお互いに連結することが運命付けられた神経細胞に向かって軸索を伸ばし、軸索ガイダンス分子群の制御によってこの軸索成長は可能となり、正しい標的細胞に到達する。我々は、分子探索によって、draxinと命名した新規の分泌型タンパクである軸索ガイダンス分子を見出し、その受容体が DCC(Deleted in Colorectal Carcinoma)であることを明らかにした。さらに、DCC が生体内で受容体として機能するかどうかを明らかにするため、draxin(+/*LacZ*)とDCC(+/-)のダブルヘテロマウス draxin(+/*LacZ*)/DCC(+/-)を作製したところ、それぞれの単独ヘテロマウスでは観察されない脳梁形成異常が観察され、DCC が Draxin 受容体として働いていると結論した。

この研究過程で、ダブルヘテロマウス draxin(+/*LacZ*)/DCC(+/-)のヒゲが消失することを見出した。draxin の発現を*LacZ* の染色で確認したところ、draxin は毛の根本にある毛乳頭に選択的に発現し、DCC は毛根から毛母全体に発現しているものの、毛乳頭には発現していない。毛乳頭は発毛と育毛にとって重要な栄養素や酵素、BMP のようなシグナル伝達分子を分泌する細胞であり、Draxin もそのような役割を果たしていることが推察された。

### 〈Key Words〉

毛髪、毛球、毛乳頭、draxin、DCC(Deleted in Colorectal Carcinoma)

### 〈本文〉

#### 緒 言

軸索ガイダンス分子探索過程から draxin を発見し(1)、その受容体が DCC(Deleted in Colorectal Carcinoma)であることを明らかにした過程から(5)、ダブルヘテロマウス draxin(+/*LacZ*)/DCC(+/-)のヒゲが消失することを見出し、そのメカニズムを解析することを計画した。

#### 研究対象と方法

マウスのヒゲ領域を対象にして、免疫組織化学、電気穿孔法による遺伝子導入を、野生型マウス、draxin(+/*LacZ*)か DCC(+/-)のシングルヘテロマウス、ダブルヘテロマウス draxin(+/*LacZ*)/DCC(+/-)を対象にして解析する。

#### 結 果

1)野生型や DCC と draxin の単独ヘテロ、draxin のホモマウスでは正常ながら(図1左)、ダブルヘテロマウス DCC(+/-)/draxin(+/-)ではヒゲが脱落し、皮膚が見えている(図1右)。

2) マウスを固定し、皮膚を LacZ の酵素反応染色をすると、毛の根本の毛乳頭に選択的に色素が沈着する(図2右)。ホールマウント観察から、ヒゲの太い毛の毛乳頭では大きな染色像が得られ、体毛で小さな染色が観察された(図2左)。

図 1

(+/+), DCC(+/-), draxin(+/-), draxin(-/-) マウス

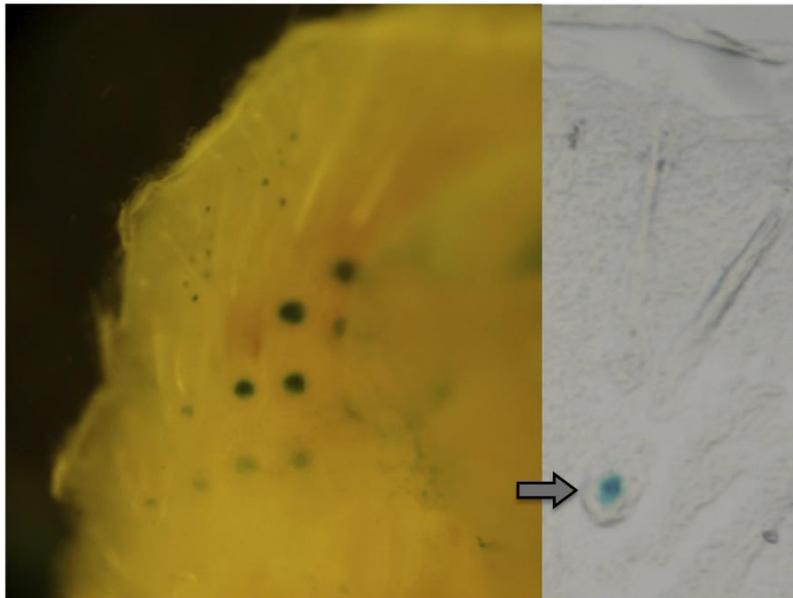
DCC(+/-)/draxin(+/-) マウス



図 2 LacZ 染色

ホールマウント皮下から観察

切片像



#### 考 察 :

我々が発見した軸索ガイダンス分子 draxin は全脳の交連神経(脳梁、海馬交連、前交連)形成に必須である重要な分子であるが(1、6)、軸索ガイダンスばかりではなく、神経冠細胞の移動(2)や脊髄介在神経の移動(4)も調節している。さらには、draxin 遺伝子欠損マウスの海馬では神経細胞死が誘導され海馬が萎縮することから、栄養因子的な働きもしている(3)。今回の研究から、draxin は毛髪成長維持にも関与することが明らかとなり、幅広い生物活性を持つ重要な因子であることが明らかになった。さらに、毛髪での draxin 受容体としても DCC である可能性が高いと思われる組織分布が既に報告されている(7)。今後は、draxin によってどのようなシグナルが入るのか、draxin タンパクが発毛を増進する塗り薬とし

て使えるのかどうかなど、興味深い疑問点を明らかにする予定である。

**参考文献：**

1. Islam S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Yuhong., Naser I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T. and Tanaka, H. (2009).

Draxin, a Repulsive Guidance Protein for Spinal Cord and Forebrain Commissures.

**Science** 323, 388–393.

2. Su, Yuhong, Naser, I. B., Islam, S. M., Zhang, S., Ahmed, G., Chen, S., Shinmyo, Y., Kawakami, M., Yamamura, K.-I., Tanaka, H. (2009). Draxin, an axon guidance protein, affects chick trunk neural crest migration.

**Dev Growth Differ.** 51, 787–796.

3. Zhang, S., Su, Yuhong, Shinmyo, Y., Islam, S. M., Naser, I. B., Ahmed, G., Tamamaki, N., Tanaka, H. (2010). Draxin, a repulsive axon guidance protein, is involved in hippocampal development.

**Neurosci. Res.** 66, 53–61.

4. Su Yuhong, Zhang, S., Islam, S. M., Shinmyo, Y., Naser, I. B., Ahmed, G., Tanaka, H. (2010). Draxin is involved in the proper development of the dl3 interneuron in chick spinal cord.

**Dev Dyn.** 239, 1654– 1663.

5. Ahmed G., Shinmyo Y., Ohta K., Islam S., Hossain M., Naser IB., Asrafuzzaman R., Su Y., Zhang S., Tessier-Lavigne M. & Tanaka H. (2011). Draxin Inhibits Axonal Outgrowth through the Netrin Receptor DCC.

**J. Neurosci.** 31, 14018–14023.

6. Hossain M, Ahmed G, Bin Naser I, Shinmyo Y, Ito A, Asrafuzzaman Riyadh M, Felemban A, Song X, Ohta K, Tanaka H. (2013). The combinatorial guidance activities of draxin and Tsukushi are essential for forebrain commissure formation.

**Dev Biol.** 374, 58–70.

7. Combates NJ., Chuong C-M., Stenn KS., Prouty SM. (1997). Expression of Two Ig Family Adhesion Molecules in the Murine Hair Cycle: DCC in the Bulge Epithelia and NCAM in the Follicular Papilla.

**J Invest. Dermatol.** 109, 672–678.

作成日：2013年3月6日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 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調査・共同研究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： 横山 耕治   
所属機関名：千葉大学 真菌医学研究センター  
所属部署名：病原機能研究分野 職名：准教授  
所在地：千葉市中央区亥鼻 1-8-1  
電話：043-226-2789 (直) 内線：5917

1. 助成金額： 90 万 円

2. 研究テーマ

フサリウム症原因菌と畑土壌のフサリウム属菌の生態に関する研究・調査

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 横山 耕治	職名：准教授
所属機関名：千葉大学 真菌医学研究センター	部署名：病原機能
中国側研究者氏名： 王 麗	職名：教授
所属機関名：吉林大学 白求恩医学院	部署名：病原生物学 教室

4. 当該研究における発表論文等

Dan He, Jilong Hao, Bo Zhang, Yangiu Yang, Wengang Song, Yunfeng Zhang, Koji Yokoyama, and Li Wang : Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of *Fusarium solani*. Immunology and Microbiology Investigative Ophthalmology & Visual Science, 52(2011),5,2804-2808

## フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態に関する 研究・調査

研究者氏名	准教授 横山 耕治
日本所属機関	千葉大学 真菌医学研究センター
中国研究者氏名	教授 王 麗
中国所属機関	吉林大学 白求恩医学院

### 調査概要：

フザリウム属菌は、角膜真菌症を起こし、*Fusarium solani* によることが多い。本菌属は抗真菌剤に対して抵抗性を示し抗真菌剤による治療を難しくしている。更に、本菌属には植物病原菌を含み、作物に大きな被害を出すことから、多量の農薬を使うことがあり、薬剤に対する耐性を獲得し更に薬剤耐性を高めていると考えられる。従って、フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態を調査、研究する必要性と緊急性が求められている。本研究課題は吉林大学王教授と2006年以来継続して行っており、本研究助成により中国山西省、甘粛省の調査、日本飛騨、能登の調査を行なった。

中国で66試料、日本国内16試料を採取した。菌の分離作業は続いているが、現在までに分離した菌は、中国で156株、日本で15株を分離した。本調査対象であったフザリウム属菌18株、*Aspergillus niger* 近縁株33株であった。遺伝子型の解析は現在進行中である。

Key Words：フザリウム症原因菌、フザリウム属菌の生態

### 調査目的：

フザリウム属菌は、病原菌、植物病原菌を含み、真菌の中でも重要な菌群であり、植物病原菌は作物に大きな被害を出すことがあり、特に重要視されている。また、病原真菌として角膜真菌症を引き起こす菌を含んでおり医真菌の分野でも重要な菌群である。

病原真菌の中でフザリウム属菌は治療に用いられる抗真菌剤に対して抵抗性を示し、治療を難しくしている。更に、農業分野では大量の農薬を使用することにより、薬剤耐性菌の出現が懸念されている。

従って、フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態を調査、研究は緊急の課題になっている。一方、本属菌は、形態的な特徴に乏しく形態的な分類が困難な菌属でもある。本菌属の分類、同定にはDNA解析が不可欠である。我々は、ミトコンドリア・チトクローム b 遺伝子の部分解析により病原真菌と近縁菌の遺伝子分類を進めてきた。このチトクローム b 遺伝子（約400bp）の解析で、真菌の同定が可能で、種内の変異も解析できることを示してきた。

本調査では、山西省、河南省、甘粛省の土壌を採取し、吉林大学で菌の分離を行い、日本での調査は飛騨、能登の土壌を採取し千葉大真菌医学研究センターで菌の分離を行い、中国と日本で分離した菌株は、吉林大学と千葉大学で保存し、千葉大で遺伝子の解析を行うこととした。

本研究調査とこれまでに継続してきた研究調査を含めてフザリウム属菌の遺伝子解析と薬剤耐性を調べることで、臨床分離株と環境分離株の遺伝子分類による株間遺伝子型と薬剤耐性の関係を明らかにしたい。

#### 調査方法：

吉林省、貴州省の試料は、吉林大学で採取し、山西省（平成24年6月11日～17日）、河南省・甘粛省（平成24年9月9日～20日）、王教授を招へい（平成24年11月8日～15日）し、飛騨、能登の調査を行った。

フザリウムの選択培地として、知られる駒田培地を市販が中止された農薬（PCNB：75%水和剤）に変えて、その主成分であったPentachloronitrobenzene 22mgをDMSO（Dimethyl sulfoxide）1mlに溶解し500mlにくわえて変法駒田培地として、フザリウム選択培地として使用した。

変法駒田培地組成、作成法：組成（500ml水溶液中）

A液：300mlの脱塩水に  
10g D(+)-ガラクトース  
1g L-アスパラギン(1水和物)  
1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
250mg KCl  
250mg MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O  
5mg Fe(III)-EDTA  
7.5g 寒天

オートクレーブ滅菌後約60℃まで冷ます。

B液：200mlの脱塩水に  
250mg コール酸ナトリウム(=オックスゴール)  
0.5g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>・10H<sub>2</sub>O  
150mg ストレプトマイシン硫酸塩  
を溶解し、ポアサイズ0.2μmのフィルターで除菌したものを  
A液（約60℃）に加える。

C液：22mg PCNB(Pentachloronitrobenzene)を  
1ml DMSO(Dimethyl sulfoxide)に溶解し、  
A+B液にC液を加える。

この時点で、pH6.8位なので、10%リン酸（約2ml）を加え、10%リン酸でpH3.8に調整する。シャーレーに流し込んで固化させる。

採取した土壌は1gを10mlの滅菌水に懸濁し、PDA(ポテトデキストロース寒天)培地及び変法駒田培地プレートに0.1mlを均一に塗布し、25℃にて培養後生育してきたコロニーから菌を分離した。

分離菌は、吉林大学と千葉大学で保存し、遺伝子解析は千葉大学真菌医学研究センターで行った。

調査地、土壌採取地：

表 1

山西省調査試料採取	
地名	日付
山西省洪洞	H24. 6. 12
山西省臨汾	H24. 6. 12
山西省 王家大院1, 2, 3	H24. 6. 13
山西省 五台山2, 3, 4	H24. 6. 14
山西省 大同五台山	H24. 6. 14
山西省 吉県	H24. 6. 15
山西省 懸空寺1, 2	H24. 6. 15

表 2

河南省、甘肅省調査試料採取	
地名	日付
河南省 洛陽 龍門石窟 1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 11
甘肅省 天水市麦積山1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 12
甘肅省 甘谷大像山1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 13
甘肅省 武山水簾洞1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 13
甘肅省 永靖炳靈寺	H24. 9. 15
甘肅省 蘭州 蘭山	H24. 9. 15
甘肅省 張掖丹霞山1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 張掖馬蹄寺1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 張掖大佛寺1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 嘉峪関文殊山	H24. 9. 17
甘肅省 嘉峪関長城第一墩	H24. 9. 17
甘肅省 敦煌榆林1, 2	H24. 9. 18
甘肅省 敦煌陽関1, 2, 3	H24. 9. 18
甘肅省 敦煌莫高窟1, 2, 3	H24. 9. 19

調査結果：

調査地(表 1 - 4)に示す調査地点で合計82試料を採取し、表5に示すように分離株180株、*Fsarium*属菌18株、2006年以来継続して行っている*A. niger* 33株を分離した。

表 3

王麗教授招へい調査	
地名	日付
高山市郊外	H24. 11. 12
飛騨古川駅	H24. 11. 12
飛騨古川大銀杏下	H24. 11. 12
荘川桜	H24. 11. 12
御母衣	H24. 11. 12
白川郷 展望台	H24. 11. 12
五箇山 相倉合掌集落	H24. 11. 13
五箇山 ダム湖	H24. 11. 13
五箇山 菅沼集落	H24. 11. 13
金沢市郊外	H24. 11. 13
能登 柳田	H24. 11. 13
輪島	H24. 11. 14
輪島 白米町 千枚田	H24. 11. 14
能登	H24. 11. 14
能登 三崎町	H24. 11. 14
能登 見附島	H24. 11. 14

表 4

吉林大学 採取

試料採取地
長春 実験室浮遊菌 1, 2
重慶 武隆土壌 1, 2
貴陽 盆景園土壌 1, 2
吉林 長白山積雪草土壌 1, 2
吉林 長春 南湖土壌 1, 2
吉林 三角龍湾土壌 1, 2
吉林 長春 花園土壌

<i>F. solani</i>	2株
<i>F. oxysporum</i>	5株
<i>F. poae</i>	2株
<i>F. semitectum</i>	2株
<i>F. tricinctum</i>	1株
<i>Fusarium</i> sp.	6株

表 5

は、それぞれに同定された。

分離株180株で未同定株については、遺伝子解析を進める。

*A. niger* に関しては継続的にチトクローム b 遺伝子とリボゾーム遺伝子のD1D2領域を調べ、遺伝子型の分類と地域特性について解析を進める。

#### 調査に関する考察：

*F. solani* は臨床分離株として高頻度に分離され、*F. oxysporum* は、植物病原菌として高頻度に分離される。今後継続して、これらの菌の薬剤感受性試験を行い、薬剤耐性菌の出現率や体性の程度を把握し、*Fusarium* 属菌の生態とともに明確にしていく。

本研究課題は、本年の研究助成以前から吉林大学王麗教授との共同研究で進められており、その成果は、Investigative Ophthalmology & Visual Science, April

2011, Vol. 52, No. 5. P2804-2808 に、角膜真菌症の原因菌種のスペクトラムと原因菌である *F. solani* の迅速同定プライマーについて報告した。

本研究成果は、*Fusarium* 属菌の生態と薬剤耐性菌の分布、耐性メカニズムの解明に貢献できると確信している。

#### 発表論文：

Dan He, Jilong Hao, Bo Zhang, Yangiu Yang, Wengang Song, Yunfeng Zhang, Koji Yokoyama, and Li Wang : Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of *Fusarium solani*. Immunology and Microbiology Investigative Ophthalmology & Visual Science, 52(2011), 5, 2804-2808

採取土壌数			
	吉林、貴州	15	
	山西省	12	
	甘肅省	39	66
	飛驒、能登	16	
		合計	82
分離株数			
	吉林、貴州	22	
	山西省	28	
	河南、甘肅省	115	165
	飛驒、能登	15	
		合計	180
<i>Fusarium</i> 属菌			
	吉林、貴州	8	
	山西省	1	
	河南、甘肅省	9	
	飛驒、能登	0	
		合計	18
<i>A. niger</i>			
	吉林、貴州	8	
	山西省	1	
	河南、甘肅省	6	15
	飛驒、能登	18	
		合計	33

作成日：2013年 3月12日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 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調査・共同研究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：陳 昱  
所属機関名：東京大学大学院新領域創成科学研究科  
所属部署名：人間環境学専攻 職名：准教授  
所 在 地：千葉県柏市柏の葉 5-1-5  
電 話：04-7136-4603 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

### 2. 研究テーマ

耳音響放射検査による乳児中耳貯留液診断の生体力学基礎のシミュレーション解析

### 3. 研究組織：

日本側研究者氏名：陳 昱	職名：准教授
所属機関名：東京大学大学院新領域創成科学研究科	部署名：人間環境学専攻
中国側研究者氏名：黄 麗輝	職名：研究員
所属機関名：首都医科大学附属同仁医院	部署名：北京市耳鼻咽喉科研究所

### 4. 当該研究における発表論文等

なし

---

---

---

---

---

## 耳音響放射検査による乳児中耳貯留液診断の生体力学基礎のシミュレーション解析

研究者氏名	准教授 陳 昱
日本所属機関	東京大学新領域創成科学研究科
中国研究者氏名	研究員 黃 麗輝
中国所属機関	北京市耳鼻咽喉科研究所

### 要旨

長期的な中耳貯留液の存在は乳児の聴覚、言語、知能と心理の成長に対して悪影響を与えることから、新生児を対象とする中耳貯留液の早期検出は临床上に重要な意義を持つ。乳児の難聴スクリーニング検査に用いられる一般的な手法である耳音響放射(OAE)だけでは中耳貯留液の診断に有効でないことが知られている。新生児の大規模なグループを対象とする中耳貯留液のスクリーニング検査方法として、7ヶ月以内の新生児に対して特定な高周波数のティンパノメトリーと OAE を併用する方法を提案したい。この提案は既存の研究結果に基づく発想であるが、実用化されるまで2つの問題を解決することが必要である。1つは実証研究により正常と非正常の新生児のティンパノメトリー検査結果の違いの確認である。もう1つは生体力学の基礎シミュレーションによって新生児に対する高周波数ティンパノメトリーの有効性の背後に働くメカニズムの解明である。本研究は以上の2つの問題解決を目的とする。研究の結果、正常の新生児に対して、高周波数 1kHz ティンパノメトリーの結果は最も安定で、基準化されやすいシングルピークの音響アドミタンスグラフを確認した。中耳貯留液の患児に対して同じ周波数での検査結果にはピーク値の著しい低下も観測できた。一方、外耳道、鼓膜及び鼓室を単純化した体系において多相流体中の音波の伝播現象の格子ボルツマンシミュレーションを行い、高周波数のティンパノメトリーの有効性の要因は主に耳構造の幾何学的効果であることがわかった。

**Key Words** ティンパノメトリー、OAE、中耳貯留液、新生児、格子ボルツマン法、音波

### 緒言:

新生児の中耳貯留液は、羊水や、間葉細胞や、骨髄などの未吸収に起因した液体[1]が新生児の中耳腔に貯留していることを指す。長期間を渡って中耳貯留液の存在は滲出性中耳炎を引き起こし、乳児の聴覚、言語、知能と心理の成長に対して悪影響を与えるとともに、胆脂瘤や耳管機能障害[2]につながる。早期かつ有効的乳児の中耳貯留液の検出は、临床上に重要な意義を持つことに間違いない。

先行研究[3]により、先天性聴力損失の発生率は約千分の一〜三である。新生児の難聴スクリーニング検査は聴力損失を早期に発見するための主要な方法である。このスクリーニング検査中に用いられる一般的な手法は耳音響放射(OAE)法である。OAE 検査とは、耳の中から外に向かってエコーが返ってくる現象を利用して、内耳蝸牛の病態を知る検査であり、その快速性と安全性が確認されている。一方、従来の難聴スクリーニング検査で異常を発見した新生児に対して、3か月後に聴性脳幹反応(ABR)や、OAE などの追加検査を行い、最終的に中耳貯留液の存在が診断された者は約 64.5%を占める[4]。OAE 検査は中耳貯留液存在と内耳の損害を区別しにくい理由は、新生児の中耳腔の容積が小さくて、貯留液は外から刺激音の伝播に妨げるだけでなく、蝸牛から外耳道への音声エネルギーの伝導にも影響することにある。従って、新生児の中耳貯留液の高精度の早期検出に適しないことが言える。临床上での中耳貯留液の確実な検出手法は側頭骨の CT と耳 MRI である[5]。診断費用と時間の面を考えると CT や MRI などの医療画像による診断手法は大規模なグループ検査に向いていない。

新生児の大規模なグループを対象にして中耳貯留液を早期に検出するために、簡単、快速かつ有効なスクリーニング検査方法の開発が必要である。ASHA(America Speech-Language-Hearing Association)と AAA(America

Academy of Audiology)は慢性的な中耳貯留液の検出を目的とするスクリーニング検査を提案したことがある。提案手法のガイドラインによれば、ティンパノグラムの特徴(音響アドミタンスのピーク値及びパノグラムの幅)を中耳貯留液の検出指標にすることが薦められている。しかし、この提案の検査対象は7月以上の児童を対象としていた。7月以下の乳児を対象外にする理由は、新生児に対するティンパノメトリー検査の結果について、正常か否かを判断する基準はまだ確立されていないことにある。一方、Swanepoelらの研究[6]は、従来の低周波数(226Hz)のティンパノメトリーの新生児の中耳貯留液に対する感度が悪く、高周波数(1kHz)ティンパノメトリー検査の結果に中耳貯留液の存在が反映されることを報告した。この観測にベースとして、効率的にかつ高精度で新生児の中耳貯留液を検出するために、7月以内の乳児に対して特定な高周波数(1kHz)でのティンパノメトリーとOAEを併用する検査方法を提案したい。

一方、提案手法を実用化する前に2つの問題を解決する必要がある。1つの問題はグループ実験により正常と非正常の新生児の高周波数ティンパノメトリー検査結果の違いの解明であり、もう1つの問題は新生児の中耳検査にとって高周波数ティンパノメトリーの有効性の背後に働くメカニズムの解明である。まず、OAE検査を通った新生児を対象にして異なる周波数のティンパノメトリー検査を行い、統計的手法を用いて正常の新生児のティンパノグラムの基準を確立する。次に高周波数のティンパノメトリーによって中耳貯留液の存在を既に確認した新生児に対して実施し、正常児の検査結果に比べて音響アドミタンスなどの変化を観察する。2つ目の問題を解決するには、耳中の音波シミュレーションのための格子ボルツマン多相流体モデルを構築し、外耳道、鼓膜及び鼓室を単純化した体系において多相流体中の音波の伝播現象のシミュレーションを行う。パラメータサーベーターなどを通してメカニズムを究明していく。

## 対象と方法：

### 1) 実験研究

正常の新生児のティンパノグラムの基準を確立するための実験対象は北京市海淀区婦幼保健医院に生まれた新生児の55名で、その内男児は32名、女児は23名である。測定時期は生後2d-9dで、その平均3.16dである。これらの新生児に対してまずOAE検査を行い、検査結果は正常であることを確認する。OAE検査に用いられる測定機器はMadsen社製のCAPELLAで、測定基準は先行研究のもの[6]を参考する。次にこれらの新生児にGSI社製のGSI-33中耳分析機器を用いて、226Hz、678Hz及び1000Hzの周波数のティンパノメトリー検査を実施する。測定開始時の圧力は+200dbPa、終了時圧力は-400dbPa、圧力の変化速度は50daPa/sの設定である。得られるティンパノグラムの特徴を統計し、最も安定的で、かつ判別しやすいティンパノグラムを正常時の基準とし、この基準値を得た時に使われる周波数を今後新生児の中耳貯留液検査における標準周波数とする。

続いてOAEと標準周波数のティンパノメトリー検査の併用によって中耳貯留液の検出の実験を行う。実験の対象は生まれた三日間でOAE及び標準周波数のティンパノメトリー検査に異常を発見した1人の患児である。この患児に対して0歳6ヶ月までOAEとティンパノメトリーの併用による追跡検査(42日間、3ヶ月、6ヶ月)を行い、最終的に側頭骨のCTによって中耳貯留液の有無を確認し、提案検査手法の検証を行う。

### 2) シミュレーション研究

生体力学シミュレーションの対象は中耳貯留液の存在を考慮した外耳道、鼓膜および鼓室内の音波伝播現象である。人の耳の内部構造は複雑で、細部をすべて反映する完全なシミュレーションはほぼ不可能だと言える。また、シミュレーションの目的は新生児に対して高周波数ティンパノメトリーの有効性のメカニズムを説明することである。この目的を果たすには、耳の内部構造を図1のように単純化することが考えられる。図の中のAの部分外耳道で、空気が満たしている。Bの部分は鼓室で、貯留液を含む混合流体が入っている。AとBの界面は鼓膜の存在を表している。領域の左の境界には音源を置き、音波は右方向に伝播していく。AとB領域に入っている流体の音速は異なることから、鼓膜内外の音響インピーダンスがミスマッチし、音響エネルギーの一



図1.単純化された耳の内部構造

部は反射され、もう一部は鼓室内部に伝わる。よって、ティンパノメトリーで測定した音響アドミタンスは A と B の中の音波の振動エネルギー、即ち振幅の比で定性的に表せる。また、図1に示された寸法は成人の耳のみであり、新生児の場合は領域の幅と高さをともに3/5にする。

本シミュレーションに用いる手法は格子ボルツマン法 (lattice Boltzmann Method, LBM) [7]である。LBM とは、現実の流体を空間格子上で運動しているミクロな仮想粒子で構成させ、多数の仮想粒子運動の集計を現実流体のマクロ流れと同じ振舞いをさせる流体モデルである。格子上の仮想粒子のミクロ運動方程式は以下に示す。

$$f_i(\mathbf{x} + \mathbf{e}_i, t + 1) - f_i(\mathbf{x}, t) = -\frac{1}{\tau}(f_i - f_i^{eq}), i = 0, 1, \dots \quad (1)$$

ここで、 $f_i(\mathbf{x}, t)$ は仮想粒子の空間格子点 $\mathbf{x}$ 、時刻 $t$ での粒子密度の分布関数である。ベクトル $\mathbf{e}_i$ は格子点間のリンクで、仮想粒子の運動速度を表す。従って、(1)式の左辺は単位時間間隔あたり、仮想粒子は現在の格子点 $\mathbf{x}$ から隣の格子点 $\mathbf{x} + \mathbf{e}_i$ へ飛んでいくことを示している。(1)式の右辺にあるパラメータ $\tau$ は緩和時間で、上付き指標の $eq$ は平衡状態の分布関数を示し、合わせて格子点 $\mathbf{x}$ での仮想粒子間の衝突の効果、つまり分布関数は局所的平衡状態に近づくことを表している。一方、仮想粒子の運動の集計は分布関数を通して計算される。

$$\rho = \sum_i f_i, \quad \rho \mathbf{u} = \sum_i f_i \mathbf{e}_i \quad (2)$$

ここで $\rho$ は流体の質量密度で、 $\mathbf{u}$ は流れの速度である。これらの物理量と重み因子 $\omega_i$ を持って、平衡分布関数をマックスウェル・ボルツマン分布の2次展開として定式化する。

$$f_i^{eq} = \omega_i \rho \left[ 1 + 3(\mathbf{e}_i \cdot \mathbf{u}) + \frac{9}{2}(\mathbf{e}_i \cdot \mathbf{u})^2 - \frac{3}{2}u^2 \right] \quad (3)$$

離散運動論 (discrete kinetic theory) と (3)式を用い、(1)式から仮想粒子に構成される仮想流体の連続の式と運動方程式を導出できる。

$$\partial_t \rho + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0, \quad \partial_t (\rho \mathbf{u}) + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u} \mathbf{u}) = \nabla (c_s^2 \rho) + \nu \nabla^2 (\rho \mathbf{u}) \quad (4)$$

上式中 $c_s$ は仮想流体の音速で、 $\nu = (\tau - 0.5)/3$ は動粘度である。流体密度に極めて小さな摂動を与え、即ち $\rho = \rho_0 + \Delta\rho$  ( $\rho_0$ は定数、 $\Delta\rho \ll 1$ )、かつ流れはほぼない ( $\mathbf{u} \approx 0$ ) 場合、(4)式から $\Delta\rho$ に関する波動方程式を導く。

$$\partial_{tt}^2 (\Delta\rho) = c_s^2 \nabla^2 (\Delta\rho) \quad (5)$$

(5)式の導出は格子ボルツマン法が音波伝播現象のシミュレーションに適用出来る理由になる。

LBM を図1に示す体系に適用するには、更に幾つの拡張が必要である。第一、二種類の流体を表す必要がある。これを実現するために、2種類の仮想粒子を導入し、その分布関数も2種類、即ち $f_i^\sigma(\mathbf{x}, t)$ , ( $\sigma = A, B$ )にする。第二、A 流体の仮想粒子と B 流体の仮想粒子間の衝突をモデル化する必要がある。運動量の交換は平衡分布関数 ((3)式)中の流速 $\mathbf{u}$ を A、B 流体の共同流速 $\tilde{\mathbf{u}}$ に置き換えること [8]によって実現できる。共同流速は下式になる

$$\tilde{\mathbf{u}} = \sum_\sigma \frac{\rho_\sigma \mathbf{u}_\sigma}{\tau_\sigma} / \sum_\sigma \frac{\rho_\sigma}{\tau_\sigma}, \quad \text{with } \rho_\sigma = \sum_i f_i^\sigma \quad \text{and} \quad \rho_\sigma \mathbf{u}_\sigma = \sum_i f_i^\sigma \mathbf{e}_i \quad (6)$$

第三、A と B 流体に異なる音速をもたらす必要がある。先行研究 [9]によって仮想粒子の運動方程式の右辺に $\beta(\nabla \rho_\sigma \cdot \mathbf{e}_i)/3$ という項を加える。但し、パラメータ $\beta$ は以下に定義する

$$\beta = \begin{cases} 0 & \rho_A > 0.5 \\ \alpha & \rho_A \leq 0.5 \end{cases} \quad (7)$$

(7)式によって、A 流体の音速は $c_s$ 、B 流体の音速は $\sqrt{c_s^2 - \alpha}$ となる。第四、鼓膜のモデル化が必要である。In Vivo の鼓膜の物性は把握されていない現状から、正確なモデリングは非常に困難だと言える。本研究では A と B 流体の間に表面張力を入れることによって形成する界面を鼓膜と見なす簡略化モデルを考案した。表面張力の導入は、仮想粒子の運動方程式の右辺に遠隔粒子間の相互作用項 [8]

$$F_i^\sigma = 3\omega_i g_\sigma \cdot (\mathbf{e}_i - \tilde{\mathbf{u}} + 3\mathbf{e}_i \mathbf{e}_i \cdot \tilde{\mathbf{u}}), \text{ with } g_\sigma = -\rho_\sigma(\mathbf{x}) \sum_{\bar{\sigma}, i} \omega_i G_{\sigma\bar{\sigma}} \rho_\sigma(\mathbf{x} + \mathbf{e}_i) \mathbf{e}_i \quad (8)$$

を導入する必要がある。(8)式の中にあるパラメータ $G_{\sigma\bar{\sigma}}$ は表面張力の強さを調整するもので、ラプラス則によってAB流体間の圧力差も調整できる。また、壁面とA、B流体間の相互作用項( $G_{AS}$ と $G_{BS}$ )を導入し、 $G_{AB}$ と合わせて鼓膜と壁のなす角を調整できる。第一から第四項までをまとめて、格子ボルツマン法による多相流体中の音波シミュレーションの支配方程式は次式になる。

$$f_i^\sigma(\mathbf{x} + \mathbf{e}_i, t + 1) - f_i^\sigma(\mathbf{x}, t) = -\frac{1}{\tau_\sigma} [f_i^\sigma(\mathbf{x}, t) - f_i^{\sigma, eq}(\rho_\sigma, \tilde{\mathbf{u}})] + \frac{1}{3} \beta (\nabla \rho_\sigma \cdot \mathbf{e}_i) + F_i^\sigma, \sigma = A, B, i = 0, 1, \dots \quad (9)$$

シミュレーションの準備として、上式を用いて中耳構造の簡素化モデルとしての計算領域を生成できる。3つの相互作用項の調整により、図2に示す異なる鼓膜と壁のなす角の体系が形成される。シミュレーションに使用されるのは実際の鼓膜と外耳道のなす角度に最も近い45度(図2(b))のみである。

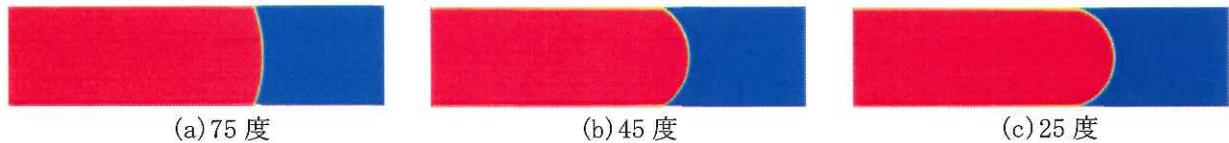


図2. シミュレーション体系の生成。領域の大きさは $300 \times 100$ で、赤色の部分の流体密度は $\rho_A = 0.94, \rho_B = 0.06$ 、青色の部分の流体密度はそれと逆である。モデルのパラメータは $G_{AB} = 2.0, G_{AS} = -0.02, \alpha = -0.2$ で、鼓膜と壁のなす角は75度の場合 $G_{BS} = 0.50$  ; 45度の場合 $G_{BS} = 1.39$  ; 25度の場合 $G_{BS} = 1.79$ である。

仮想流体の時間、空間、流速、密度等の量は無次元である。現実の体系の単位に変換する場合、音波現象を支配する無次元数に合わせる必要がある。波動方程式(5)式から無次元数 $c_s T/L$ を導出できる。空気音速 $c_s \approx 340\text{m/s}$ 、音波の周期 $T = 0.001\text{s}$ (1kHzの場合)、外耳道の長さ $L = 0.02\text{m}$ で、無次元数の値は17になる。一方、仮想流体Aの音速 $c_s \approx 0.577$ 、外耳道の長さ $L = 200$ から、シミュレーションの単位時間は実時間の約 $1.7 \times 10^{-7}\text{s}$ と見積もることができる。従ってLBMシミュレーションには大量な計算時間が必要である。本研究は助成金で購入したGPGPUカード(TESLA2070)を利用し、通常CPUの計算速度の150倍で計算できている。但し、本研究の目的は現象のメカニズムの説明にあつて、以下の結果は実単位に換算しないままで示す。

## 結果:

### 1) 実験の結果

OAE検査をパスし、中耳貯留液のない正常児に周波数1000Hz, 678Hz, 226Hzのティンパノメトリーを実施した結果は図3に示す。高周波数(1kHz)の場合、音響アドミタンスにシングルピークの存在するケースが一番多く、全体の96.4%を占める。低周波数(226Hz)の場合、ダブルピークの結果が一番多く、全体の90.0%に達している。図3(b)に示したように、中間的な周波数の結果は最も不安定である。シングルピークは全体の62.7%、ダブルピークは全体の34.6%になる。

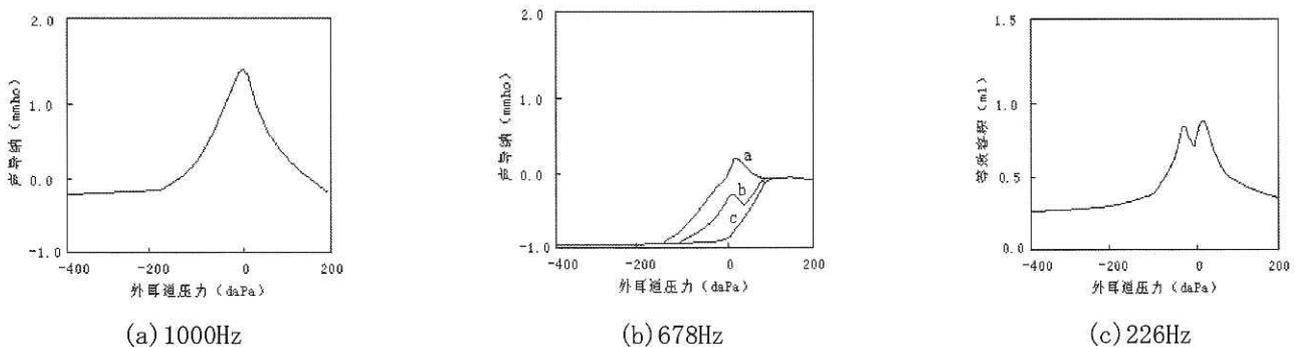


図3. 正常児に対する異なる周波数のティンパノメトリーから得た典型的な音響アドミタンス。

OAE 検査に問題のあった患児に対して、高周波数 (1kHz) のティンパノメトリーの追跡検査を行った。生まれた 3 日の結果は左右両方のティンパノグラムにシングルピークが現れず、生後 42 日及び 3 ヶ月での検査でもこの状況に変化が見られなかった。生後 6 ヶ月の検査では、左の耳の検査結果にシングルピークが現れ、右の耳の検査結果は蝶型になり、シングルピークの確認出来なかった。更に側頭骨 CT 検査を行い、左右の耳の中耳腔内の密度増加の有無を観測した。その結果、左の耳の中耳貯留液が吸収され、中耳貯留液の存在を確認できた。これらの結果は図 4 に示す。

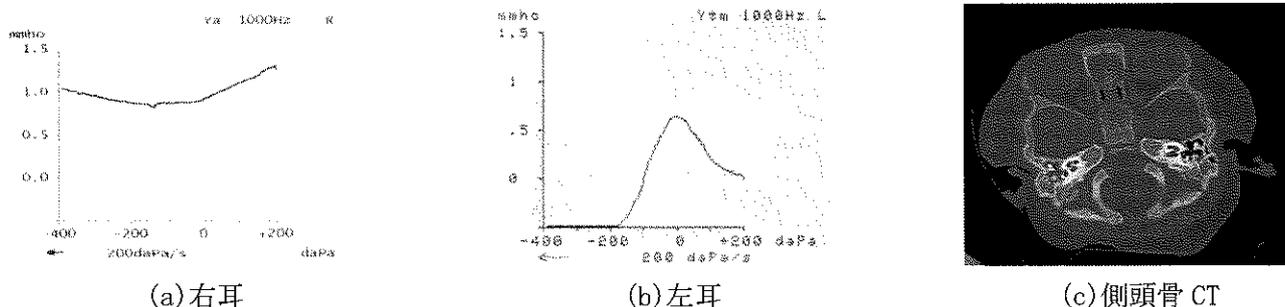


図 4. OAE 検査に異常が現れた患児に対する高周波数ティンパノメトリーの追跡検査結果及び側頭骨 CT の結果。中耳貯留液のある右耳の音響アドミタンスに正常児のシングルピークが現れなかった。

## 2) シミュレーションの結果

まず図 2 (b) の領域において、鼓室内と外耳道の圧力の一定の場合での音波の伝導様子を確認する。音源としての左境界の流体 A に、密度振幅 1%、周波数 200Hz のサイン関数的な強制振動を与えた。この密度の振動によって音波が発生し、右方向に伝播していく。定常時、鼓膜を通して鼓室内に伝わった音波と外耳道中音波の様子の比較は図 5 (a) に示す。鼓室内外の音響インピーダンスの相違 ( $\alpha = -0.2$ ) によって、一部の音響エネルギーは反射され、鼓室内の振幅が小さくなる原因である。次に、音源の周波数を変えながら、外耳道中の音波の振幅と鼓室内の音波の振幅の比を調べる。周波数 1200Hz から 200Hz まで減少するとともに、振幅比は小さくなり、音波の鼓室への伝導は良くなることを意味している。また、周波数が 400Hz のところ、振幅比に極小値が存在する。この極小値の現れる原因はこの周波数の音波の波長と耳構造の幾何学的特徴にマッチした結果と推測できる。50Hz-200Hz 間の振幅比の降下はモデル化された鼓膜の性質によるもので、実際の耳で起きるかどうかは更なる実験の検証が必要である。

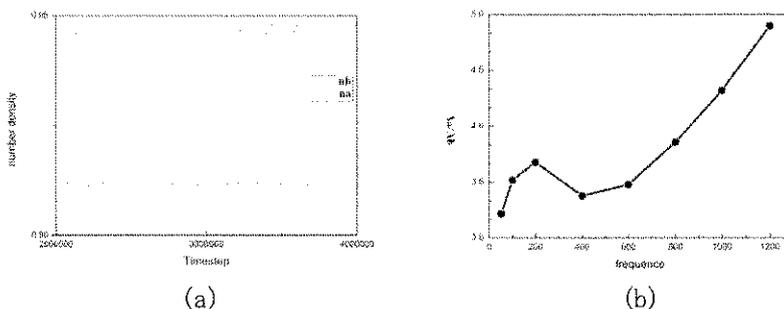


図 5. 成人の耳構造をモデル化した領域中の音波の伝播現象のシミュレーション。(a) 外耳道と鼓室内の音波の振動の様子。(b) 音源の周波数によって、外耳道と鼓室内の音波の振幅比の変化。シミュレーションのパラメータは図 2 (b) のと同じである。

次にティンパノメトリー検査のように、鼓室内と外耳道の圧力の差 ( $P_B - P_A$ ) を変化して、鼓膜を通して鼓室に伝わった音響エネルギーを振幅  $A_B$  で評価する。成人の耳、外耳道と直径だけを 3/5 にしたもの及び新生児の耳という 3 つの幾何学形状のモデルを用意した。シミュレーションの結果は図 6 (a), (b), (c) に示す。鼓室と外耳道の圧力差は前述のようにモデルのパラメータ  $G_{AB}$  によって調整できる。具体的には、 $G_{AB} = 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7$  の時、内外の圧力差は  $P_B - P_A = -1.759 \times 10^{-3}, 2.316 \times 10^{-3}, 5.515 \times 10^{-3}, 8.690 \times 10^{-3}, 1.485 \times 10^{-2}$  となる。

ただし、図 6 のグラフの横軸の実際のティンパノメトリーの定義と逆になっているため、各曲線はティンパノグラム（左半分（負圧の領域））に相当するものになる。ティンパノグラムの右半分（正圧の領域）のシミュレーションについて、計算中流体 B が流体 A に溶解してしまうために行わなかった。つまり、本研究で提案した簡略化モデルではこのような状況に対応できなく、更なるモデルの改良は必要である。

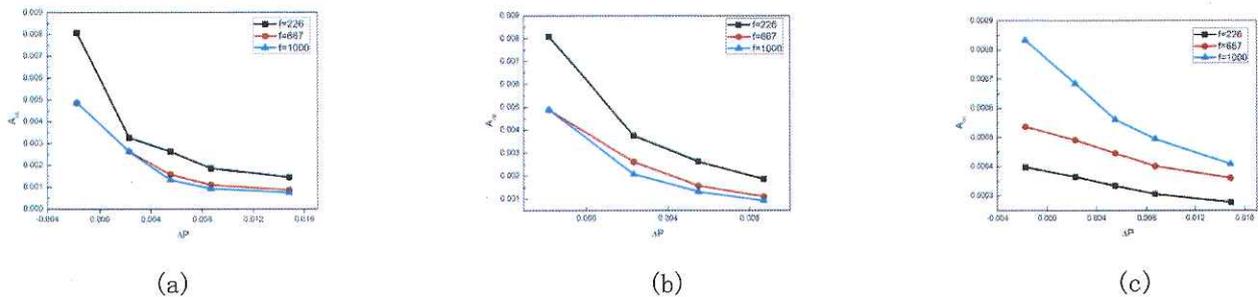


図 6. 3つの幾何学形状のモデルを用いたティンパノメトリーのシミュレーション。(a)成人の耳のモデル(300×100)；(b)外耳道半径だけ縮小した耳(300×60)；(c)新生児の耳モデル(180×60)

図 6 に示すシミュレーションの結果は定性的に実験で得られたティンパノグラムに一致した。外耳道の負圧が減少につれ、音波は鼓室に伝わりやすくなるため、鼓室内の振幅は大きくなっていく。成人の耳構造の場合、低周波数(226Hz)の音波による鼓室への音響エネルギーの伝達は一番しやすくなり、圧力差のゼロの付近での振幅は最も大きい。また、圧力差による振幅の変化も際立って、即ち外耳道の圧力変化による音響アドミタンスの変化は最も顕著である。外耳道と鼓室の直径のみを縮小してもこの傾向は変わらない。一方、新生児の耳構造において、全体的に音波は鼓室への伝達しにくくなるが、高周波数(1kHz)の方が逆転して鼓室に伝達する音響エネルギーが一番大きくなる。また図 6(c)に示すように、鼓室内の周波数 667Hz と 226Hz の場合の圧力差の変化による振幅の変化は平坦であり、中、低周波数の音波にとって外耳道の圧力変化による音響アドミタンスの変化は顕著ではないと言える。

## 考 察：

### 1) 実験についての考察

正常の新生児に対する異なる周波数のティンパノメトリーの結果から、使用周波数は 1kHz で、シングルピークの音響アドミタンスのグラフを新生児ティンパノメトリーの正常基準とするのは適当だと言える。理由は 1kHz のティンパノグラムは最も安定でかつ判別しやすいシングルピークとなっていることにある。低周波数(226Hz)の結果も安定しているが、音響アドミタンスは判別しにくいダブルピークになっている。中間的な周波数の結果は不安定で、採用しない。

中耳貯留液の患児に対する追跡検査の結果から、新生児に対する OAE と高周波数ティンパノメトリー検査の併用は早期に新生児から中耳貯留液を検出する有効な手段の一つであることが分かったが、この手法の有効性と信頼性についての定量的な評価は必要で、今後大規模なグループ実験で統計的に検証する必要がある。

### 2) シミュレーションについての考察

鼓室と外耳道の圧力差を考えない場合のシミュレーション結果から、鼓膜を通す音響エネルギーの効率的な伝導には、耳の幾何学的構造と音波の波長のマッチが必要であることが分かる。また、シミュレーションの計算領域では成人の耳構造をモデル化したものから、成人のティンパノメトリーは低周波数(226Hz)で行う理由の説明にもなる。新生児に対する高周波数のティンパノメトリーの有効性の理由に関して、これまでの複数の推測があった。新生児と成人の耳構造の違いや、新生児の柔らかい外耳道の音波に対する吸収によるものなどは典型的な説である。本研究のシミュレーション結果から、外耳道長さと鼓室の容積は支配的な要因であることが明らかになった。

今後、鼓膜を含めて正確な中耳モデルの構築や、どのような外部条件（例えば、これまで使用する音源の範

圏外の周波数)でティンパノグラムの特徴はもっとも顕著になることや、耳の内部条件の変化(中耳貯留液の量と存在の部位、新生児の成長による中外耳構造の変化)によるティンパノグラムの特徴はどのように変化することなどについて更に研究を深める必要がある。

**参考文献：**

1. Doyle KJ, Kong YY, Strobel K, Dallaire P, Ray RM. Neonatal middle ear effusion predicts chronic otitis media with effusion. *Otol Neurotol*, 2004, 25(3):318-322.
2. Ni DF, Infant diagnosis and treatment of otitis media. *J Clinical Otolaryngology*, 2005, 19: 577-579. (in Chinese)
3. Holster IL, Hoeve LJ, Wieringa MH, Willis-Lorrier RM, DeGier HH. Evaluation of hearing loss after failed neonatal hearing screening. *J Pediatr*, 2009, 155 (5): 646-650.
4. Boonea RT, Bowera CM, Martine PF. Failed newborn hearing screens as presentation for otitis media with effusion in the newborn population. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2005, 69(3), 393-397.
5. Sano M, Kaga K, Mima k. MRI findings of the middle ear in infants. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127(8) : 821-824.
6. Han DM, *Hearing Screening for Newborns and Infants*, People's Health Publishing House, Beijing, 2003, 103-112. (in Chinese)
7. Chen SY and Doolen GD, Lattice Boltzmann method for fluid flows, *Annual Review of Fluid Mechanics*, 1998, 30, 329-364.
8. Shan XW, Multicomponent lattice Boltzmann model from continuum kinetic theory, *Physical Review E*, 2010, 81:045701(R).

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 小野直樹   
所属機関名： 芝浦工業大学  
所属部署名： 工学部 職名： 教授  
所在地： 東京都江東区豊洲 3-7-5  
電話： 03-5859-8061 内線： 8061

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

「多孔質マイクロ流路による腫瘍血管内の血流力学挙動に関する研究」

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 小野直樹	職名：教授
所属機関名：芝浦工業大学	部署名：工学部
中国側研究者氏名：Ying He (賀 纓)	職名：教授
所属機関名：中国科学技術大学	部署名：近代力学系

4. 当該研究における発表論文等

1. Li, F., Hu, RQ, He, Y., Yamada, T. Ono, N., In-vitro Modeling of Red Blood Cell Distribution Basing on a Microchannel Network, Oral Presentation, The 10<sup>th</sup> National Conf. on Biomech. and the 12<sup>th</sup> National Conf. on Biorehology Chengdu, Oct. 11-15, 2012

2. Li, F., et al, J. Med. Biomech. 2013 (in Chinese) (予定)

## 多孔質マイクロ流路による腫瘍血管内の血流力学挙動に関する研究

研究者氏名 小野直樹

所属機関 芝浦工業大学 工学部教授

中国側共同研究代表者 賀纒

所属機関 中国科学技術大学 近代力学系 教授

### 要旨

腫瘍組織における流体流れは多孔質流れとされている。本報では、腫瘍血管をモデル化した多孔質マイクロチャンネルをシリコン樹脂で作製し、そこを通過する赤血球溶液の流れ挙動を観察し、体外で擬似腫瘍微小循環を構築することを目的としている。そのため、まず、 $250\mu\text{m}$ の多孔質マイクロチャンネルを半導体微細加工技術で加工した。次に、ラットの血液を採取し、遠心力装置によって赤血球を取り出し、生理塩水と混合し、異なるヘマトクリット(Hct)の赤血球溶液を作った。その次、人工多孔質マイクロチャンネル内の赤血球の流動分布状態を顕微鏡で観察した。さらに、マイクロチャンネルにおける流れの圧力損失測定も試みた。その結果、同じ流量に対し、ヘマトクリット(Hct)が大きくなるにつれ、マイクロチャンネル内の赤血球流速が大きくなることが示された。また、各分岐における赤血球流れの速度分布はHctによって不均一性が示され、赤血球はより低い流速のチャンネルに集合する様子が示された。

Key Words 多孔質マイクロ流路、腫瘍微小循環、赤血球分布、不均一性、Fahraeus 効果

### 1. はじめに

癌組織は酸素と栄養を取るため、血管内皮細胞増殖因子を分泌し、新生血管を作り、周囲の血管から血液を引いてくるのである。新生血管は短時間で形成されたため、正常な血管とは異なり、血管の構造は不均一性を示している。すなわち、血管の分岐や太さなど不規則したり、ねじれがあったり、血管壁の浸透性が高かったりしている。このような異常な血管構造は腫瘍組織への血液供給に影響し、低酸素領域と高い間質流体圧力 (Interstitial Fluid Pressure) が生じてしまうケースが多い。結果として、抗がん剤の移流と拡散により癌組織への到達を妨げて、効果的ながん治療が得られない。

これまで、いろいろ新生阻害薬 (たとえば、**combretastatin**, **neffinavir**) が開発されてきたが、それらの効果は定量的に予測することは容易ではない。したがって、コンピューターあるいは体外モデリング手法によって腫瘍微小循環を模擬する必要がある。**Pozrikidis**<sup>[1]</sup>は腫瘍組織を通す血管網を構築し、血液と間質流体流れを境界積分方程式により定式化し、間質流体圧力と血管浸透性のプラズマ流体に及ぼす影響を考察した。**Chapmann**<sup>[2]</sup>は腫瘍組織における流体流れを考察するため、マルチスケールモデルを提案した。このモデルには、マクロスケールの腫瘍組織に対して、均一連続体として扱い、そこに毛細血管は極めて小さいため、その働きは流体の線ソースになる。一方、マイクロ領域に対して、毛細血管を囲む円柱形モデルを提案した。その解析の結果は血管ネットワークと間質における流れ挙動は多孔質流れと考えられる。**Jain**<sup>[3]</sup>のモデルには浸透性と弾性のある微小血管は縦と横に四方形多孔質腫瘍組織に配列される。血管内の流れはポアズ流とし、血管壁面を通す流れは **Starling** 法則により定められ、腫瘍組織における流れは **Darcy** 流れとされる。

以上の研究から、腫瘍組織における流れは多孔質流れとして扱われることが多いことが分かった。これまで、Yamada ら<sup>[4]</sup>はフォトリソグラフィ PDMS を利用してマイクロ混合器に関する研究を行ってきた。そこで、本研究では、腫瘍血管をモデル化した多孔質マイクロチャンネルをシリコン樹脂で作製し、そこを通過する赤血球浮遊液の流れ挙動を観察し、体外で擬似腫瘍循環を構築することを目的としている。本報では、赤血球浮遊液は多孔質マイクロチャンネルを通過する過程に着目し、その様子を画像解析から、赤血球の流速を測定した。その上、マイクロチャンネルにおける圧力損失の測定も試みた。

## 2. 実験装置と方法

**2.1 多孔質マイクロチャンネル** 本研究で用いた PDMS 製のマイクロチャンネルの流路部分は Fig. 1 に示す。この流路の断面は  $250\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$  の長方形で、流路の中に  $100\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$  のブロックが六つ配列され、ブロックとブロック間の幅は  $50\mu\text{m}$  である。1 枚のチップに二つの多孔質流路を持つ。このチップをガラス基板に接着することにより、漏れのない流路を形成した。

**2.2 血液サンプルの作製** ラットから採血直後に、0.9%生理塩水を添加し、遠心分離装置に置き、1000 rpm の回転速度で 10 分間回転させた。赤血球のみを取り出し、再び生理塩水を添加し、Hct=1,2,3,5% の赤血球浮遊液を作製した。

### 2.3 実験方法と画像処理

赤血球浮遊液をシリンジポンプで多孔質流路に注入して、赤血球が流路を通過していく様子をハイスピードカメラで撮影した。実験パラメーターは表 1 に示す。収集された微小流路内に赤血球が流れる画像をもとに、画像解析ソフトを用いて解析し、流れ場を算出した。

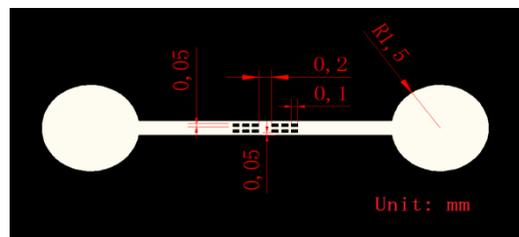


Fig.1 The Photograph of the Porous Micro-channel

表 1 多孔質流路に注入する赤血球浮遊液の流量と Hct

Hematocrit	Flow Rate (ml/h)		
Hct:1%	0.05	0.10	0.20
Hct:3%	0.05	0.10	0.20
Hct:5%	0.05	0.10	0.20

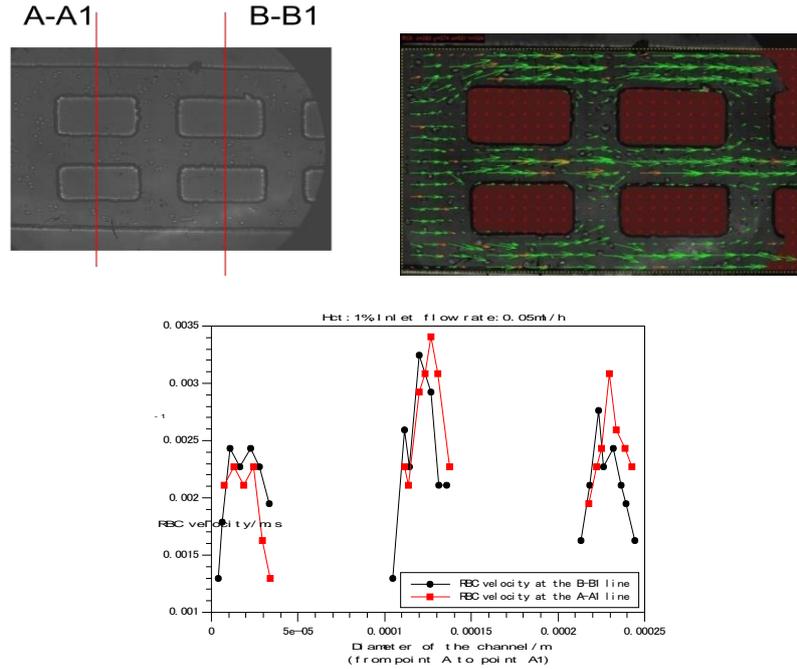


Fig. 2a. The Velocity Field of the RBCs Solution  
 b. Velocity Profiles in Cross Sections of A-A1 and B-B1  
 c. The image of RBCs through a Porous Microchannel  
 (Hct=1%,  $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$ )

### 3 実験結果

Fig. 2 a は  $Hct=1\%$ 、入り口流量  $Q_{in}=0.05\text{ ml/h}$  を設定する時、赤血球浮遊液が多孔質流路を通過する時の画像を示す。赤血球流れ場は Fig.2b に示す。赤血球は流れ方向の三分岐チャンネルを通し、流れ方向に垂直するチャンネルに赤血球の流入は観察されなかった。Fig2 c は断面 A-A1 と B-B1 における赤血球速度分布を示す。断面 A-A1 における三分岐の溶液速度変化は小さく、中間断面と両側断面の最大速度差は約  $0.001\text{ m/s}$  であり、断面 B-B1 における流速も A-A1 の流速とほぼ同じである。

Fig.3a は入口流量を  $0.1\text{ ml/h}$ 、ヘマトクリットを  $3$  と  $5\%$  と設定する時、赤血球浮遊液は断面 A-A1 の各分岐を通過する時の赤血球速度分布を示す。 $Hct=1\%$  時の均一な速度分布とは異なり、各分岐の赤血球流れ速度差が大きくなり、中間分岐における速度の上昇が一番大きいである。比較するため、断面 C-C1 の赤血球速度を Fig.3b に示す。断面 A-A1 と同じように、 $Hct=3\%$  と  $5\%$  の時の赤血球速度はかなり大きくなる。流量  $Q$  をマイクロ流路断面積で割れば、赤血球溶液の平均速度を求められる。 $Hct=1\%$  時の赤血球速度は溶液の平均速度とほぼ同じであることが分かる。しかし、ヘマトクリットは  $3$  と  $5\%$  の時の赤血球速度は溶液平均流速の約三倍になる。赤血球の相互作用が大きくなり、赤血球の Fahraeus 効果が表していると考えられる。

太い血管内のヘマトクリット ( $H_b$ ) と細いヘマトクリット  $H_t$  の比は次式で表す<sup>[5]</sup>

$$\frac{H_T}{H_D} = \frac{U_m}{U_c} \quad (1)$$

$U_m$  と  $U_c$  はそれぞれ溶液と赤血球の平均速度である。 $0.1\text{ ml/h}$  の入口流量に対して、ヘマトクリットが異なっても、断面 C-C1 の溶液平均速度は同じである。実験結果から、入口のヘマトクリットが大きくなるにつれ、断面 C-C1 の赤血球平均速度は大きくなる。したがって、入口のヘマトクリットが大きくなるにつれ、断面 C-C1 の  $H_T/H_D$  は小さくなる。また、Fig. 3a に示された

ように、Hct=5%の時、中間チャンネルの赤血球速度が一番早い。したがって、断面 A-A1 の中間チャンネルの  $H_T/H_D$  は両側チャンネルの  $H_T/H_D$  より小さいことが分かった。実験では、Hct=5%の時、赤血球は中間チャンネルから両側に流入する様子が観察された。

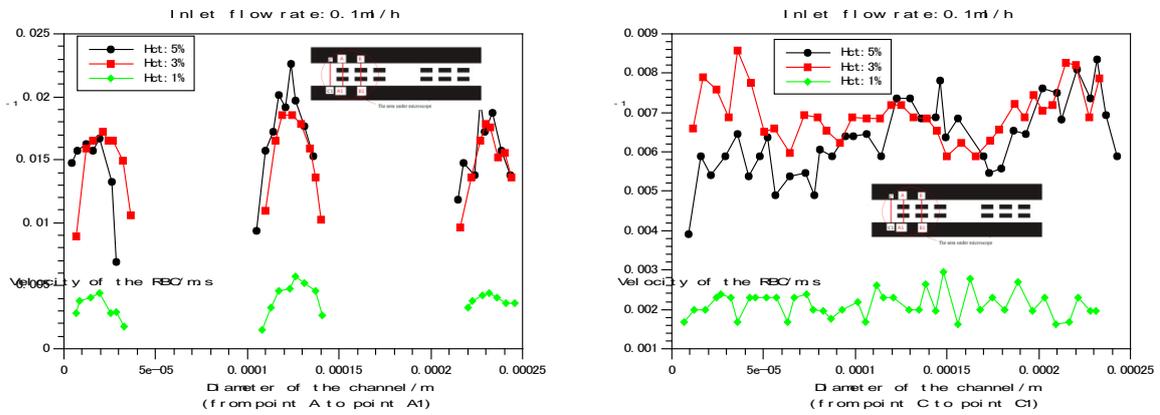


Fig. 3a. Velocity Profiles at Cross-section of A-A1  
 b. Velocity Profiles at Cross-section C-C1  
 (Hct=1,3,5%,  $Q_{in}=0.1\text{ml/h}$ )

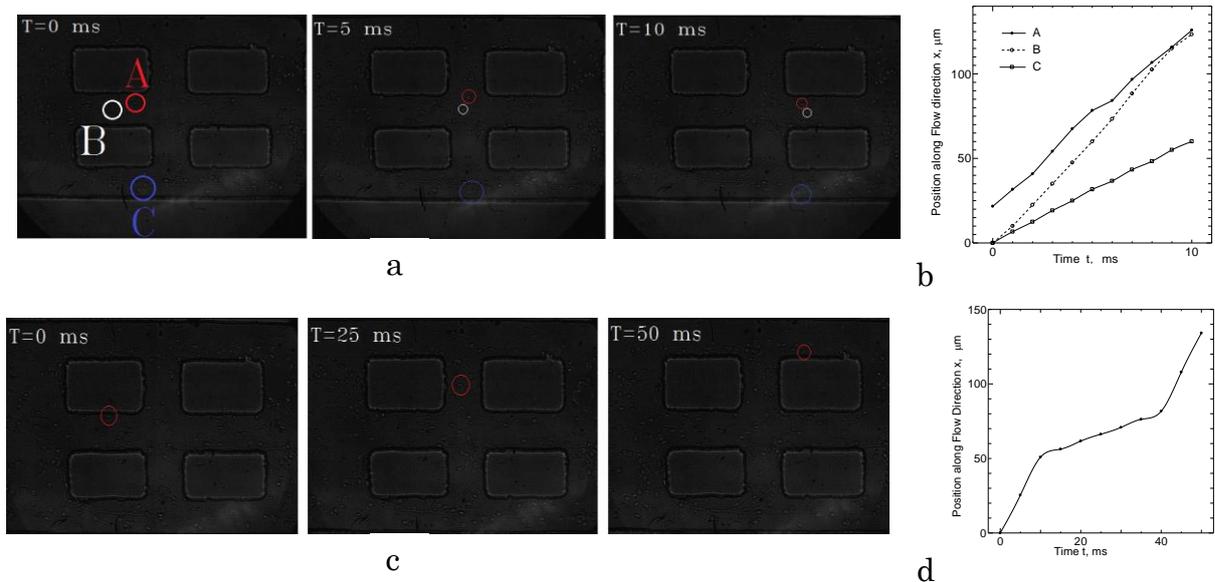


Fig. 4 a. Sequential Images of RBCs Flowing Straight Forward. b. Different Trajectories of RBCs in Fig. 4a  
 c. Sequential Images of RBCs shifting toward the lateral channel d. Trajectory of the RBC shifting toward the lateral channel (Hct=2%,  $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$ )

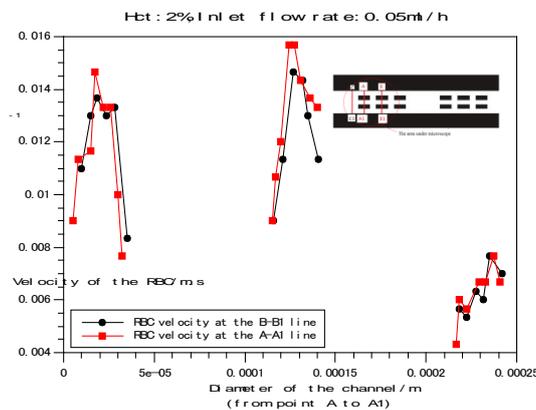


Fig. 5 Velocity Profiles of RBCs in the Cross-Section A-A1 and B-B1  
 (Hct=2%,  $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$ )

Fig 4 a と b に赤血球が多孔質マイクロチャンネルを通過する時の軌跡を示す。この時 Hct=2% である。色線で囲んだ赤血球の軌跡を注目すると、赤血球 A,B と C は全部下流の直線流路に入るが、下側のチャンネルの赤血球速度が一番遅いことが分かった。Fig 4 c には赤血球は横側のチャンネルを通す様子を示す。上側のチャンネルに流入したため、同じ時間で通す距離はかなり短くなる(Fig.4d)。この現象は Hct=5%の時にも観察された。Fig. 5 には Hct=2%時断面 A-A 1 と B-B1 の赤血球速度分布を示す。Fig.3a の Hct=5%時の速度分布と同様に、中間チャンネルの赤血球速度と両側チャンネルの赤血球速度差は大きいことが分かった。分岐管の赤血球速度差は赤血球分布の不均一性に影響があると考えられる。今の段階では、赤血球の分布は一定の不規則性を示しているが、Zhang<sup>[6]</sup>らは分岐血管における赤血球分離のシミュレーションを行った結果によると、変形しにくい赤血球は流量の低い分岐に入りやすく、プラズマ流体の粘性は高い時、赤血球は流量の高い分岐に入りやすいとされる。したがって、赤血球の分布は赤血球変形の影響もあると考えられる。今後には、両側チャンネルの圧力損失を測り、流体抵抗に対する粘性効果を考察する予定である。

#### 4. 圧力特性評価の試み

圧力特性評価のための流動実験は赤血球流動分布実験と同様な流動システムに圧力差を測定するための差圧計 (Testo) を取り付けておこなう。本報では気液界面の表面張力を利用して、マイクロチャンネル内の流れの圧力測定方法を用いた<sup>[7]</sup>。マイクロ流路に流入させる液体は赤色の色水を用い、主流流路と垂直する流路に空気を注入する。側面流路と主流流路との合流部での気液界面の様子を顕微鏡から観察し、気液界面の形状が同じになるように空気の注入を調整する。界面が安定してから、差圧計で圧力測定する。Fig. 5a は圧力を測定する時の気液界面を示す。Fig. 5b は純水をマイクロ流路を通す時、入り口流量による圧力差を示す。直線の勾配を表し、測定方法が妥当である。今後には、赤血球浮遊液を用い、マイクロ流路における圧力変化と赤血球分布の関係を考察することができる。

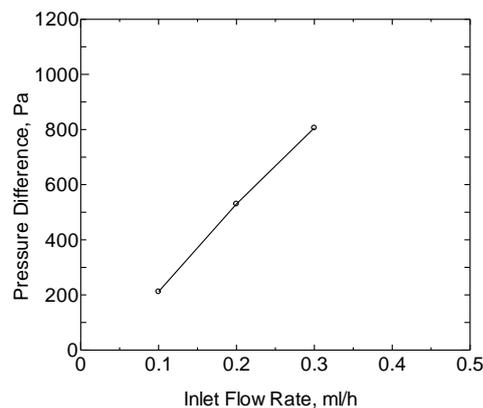
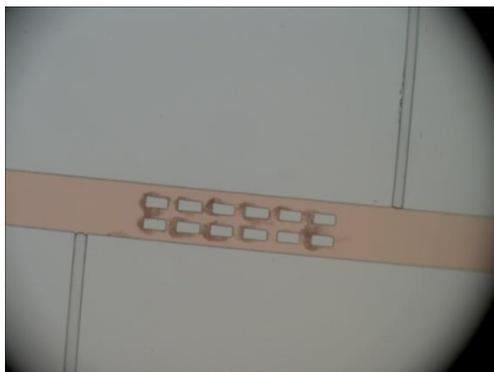


Fig. 5a Gas-liquid Interface for Measuring the Pressure Drop across the Microchannel  
b Channel Pressure Drop versus Flow Rate for Water

#### 5. まとめ

微小血管網をモデル化する多孔質マイクロチャンネルを用い、赤血球溶液の流動実験を行った結果、以下の通りになった。

- 1) ヘマトクリットが大きくなるにつれ、各分岐チャンネルの赤血球流速の差が大きくなる。流速の差がある程度大きくなる時、赤血球は側面チャンネルに集合する様子があった。し

かし、赤血球は側面流路に流入するケースは  $Hct = 2$  と  $5\%$  の時であり、一定の不規則性が示されている。今後、赤血球の分布は溶液と赤血球の流速と赤血球の変形性などに対する依存性を考察し、腫瘍血管網内での赤血球の不均質分布を引き起こす原因をさらに探求する。

- 2) 同じ入り口流量に対して、ヘマトクリットが大きくなるにつれ、赤血球平均流速が大きくなる。赤血球溶液は太いチャンネルから細いチャンネルに流入する時、Fahreus 効果を紹介して、流動抵抗が緩和されたと考えられる。
- 3) 多孔質マイクロ流路内の圧力測定方法が確定され、赤血球溶液の流動実験に応用できる。したがって、マイクロ流路内での流動抵抗が定量的に測定できる。これまで得られた結果はまだ初期段階の結果であるが、今後、多孔質マイクロ流路における赤血球分布と圧力-流量関係をさらに考察する予定である。

### 参考文献

1. Pozrikidis, C., Numerical Simulation of Blood and Interstitial Flow through a Solid Tumor, *J. Math. Biol.*, 2010, 60: 75-94
2. Chapman, SJ, Shipley, TJ, Jawad, R, Multiscale Modeling of Fluid Transport in Tumors, *Bulletin Math. Biol.*, 2008, Vol. 70(8): 2334-2357.
3. Baish, JW, Netti, PA, Jain, RK, Transmural Coupling of Fluid Flow in Microcirculatory Network and Interstitium in Tumors, *Microvas. Research*, 1997, 53: 128-141.
4. Yamada, T., Osato, N., Watanabe, Y., Ono, N., Experimental and Numerical Study on Micromixing by Utilizing the Movement of Gas-liquid Free Interface, *J. Fluid Science and Technology*, 2011, Vol. 6(2): 128-138
5. Pozrikidia, C, Axisymmetric motion of a file of red blood cells through capillaries, *Physics of Fluids*, 2005, Vol. 17, 031503-1-14
6. Xiong, WJ, Zhang, J., Two-dimensional Lattice Boltzmann Study of Red Blood Cell Motion through Microvascular Bifurcation :Cell Deformability and Suspending Viscosity Effects, *Biomech. Model. Mechnobiol.*, 2012, Vol. 11: 575-583
7. 鈴木剛史、気液自由界面を利用したマイクロ混合に関する研究、芝浦工業大学大学院修士論文、2007年度。

(その他の活動報告)

2012年2月27日

## 中国科学技術大学／芝浦工業大学 合同研究報告会

企画 芝浦工業大学 小野直樹

日時:2013年2月28日(木) 15:00~17:40

場所:芝浦工業大学 豊洲校舎 405教室

参加者(予定):

杉山博士(理化学研究所), 賀櫻先生(中国科学技術大学), Changjin 氏(中国科学技術大学), 小野研究室学生3名(山田(D1), 竹田(M2), 野中(B4)), 小野

プログラム:

15:00~15:30(質疑応答含む)

賀櫻先生(中国科学技術大学):「中国科学技術大学／芝浦工業大学の共同研究報告」

\* 本共同研究は, (財)日中医学協会の支援を受けて実施したものです.

15:30~16:25(質疑応答含む)

<招待講演>杉山博士(理化学研究所情報基盤センター):「Full Eulerian approach for solving fluid-structure interaction problems (toward multiscale thrombosis simulator)」

16:25~16:35 休憩

16:35~17:00(質疑応答含む)

Changjin 氏(中国科学技術大学博士課程):「On the modeling of pressure drop in stenotic flows」

17:00~17:20(質疑応答含む)

野中厚佑(芝浦工業大学小野研究室 B4):「液膜を利用したマイクロ混合器における流れの解析」

17:20~17:40(質疑応答含む)

小野直樹(芝浦工業大学):「小野研究室の研究テーマ紹介」

以上

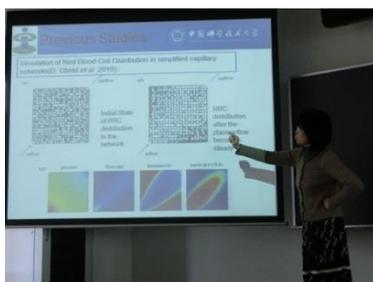
## (その他の活動報告)

### (1) 中国科学技術大学／芝浦工業大学 合同研究報告会

前頁のプログラムのように、2013年2月28日(木)に、今回の(財)日中医学協会殿からの助成によって展開した研究および関連の研究のまとめとして合同研究報告会を開催した。櫻教授のお知り合いの杉山博士(理化学研究所)にもご講演頂き、この分野の研究の知見を深めることができた。また日本(芝浦工業大学の小野研究室)および中国(中国科学技術大学の櫻研究室)の学部生および大学院生にも発表してもらい、学生間の交流も行い親交を深めることができた。



報告会の様子



櫻教授の講演



小野の講演

### (2) 中国科学技術大学での共同実験作業

日本(芝浦工業大学の小野研究室)側の博士課程の学生(山田君)が2012年7月に、中国(中国科学技術大学の櫻研究室(中国合肥))側に行き、共同研究に必要な実験技術に関する議論と準備のための実験等を実施した。

### (3) 芝浦工業大学での共同実験作業

中国(中国科学技術大学の櫻研究室)側から、修士課程の学生(Hu君)とポスドク研究員(Liさん)の2名が2012年8月に、日本(芝浦工業大学の小野研究室)側に来られ、小野研究室の実験施設にて、共同での実験と得られたデータに関する議論を実施した。

以上  
文責 小野直樹

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 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調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 羽尾 裕之	
所属機関名： 兵庫医科大学	
所属部署名： 病院病理部	職名： 准教授
所在地： 兵庫県西宮市武庫川町 1-1	
電話： 0798-45-6667	内線：

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

循環器疾患の病態に関与する新規バイオマーカーの検索

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 羽尾 裕之	職名： 准教授
所属機関名： 兵庫医科大学	部署名： 病院病理部
中国側研究者氏名： 俞 梦越	職名： 副主任医師
所属機関名： 阜外心血管病医院	部署名： 心内科

4. 当該研究における発表論文等

現在のところなし。

## 循環器疾患の病態に関与する新規バイオマーカーの検索

研究者氏名	准教授 羽尾裕之
日本所属機関	兵庫医科大学 病院病理部
中国研究者氏名	副主任医師 俞 梦越
中国所属機関	阜外心血管病医院

### 要 旨

我々はこれまで、心臓における冠状動脈の粥状動脈硬化の進展と血栓形成に至る粥状動脈硬化病変の破綻に小胞体ストレスが関与していることを世界に先駆けて報告し、急性心筋梗塞や不安定狭心症、心臓突然死を含む急性冠症候群の病態の一部を明らかにした。本研究ではこれらの知見を活かし、急性心筋梗塞、心筋炎、大動脈瘤などの循環器疾患における小胞体ストレス関連分子の病態への関与を検討し、更にこれらの疾患における小胞体ストレス関連分子のバイオマーカーとしての可能性について検討した。病理解剖症例や動物モデルを使って、心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤の組織における小胞体ストレス関連分子の分布を免疫組織化学によって検討した。これらの疾患の心筋や血管壁において、小胞体ストレスシャペロン分子 GRP78 や低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素 Ero1 の発現が認められた。当院及び阜外心血管病医院における急性心筋梗塞患者の急性期における小胞体ストレスシャペロン分子 GRP78 の血中濃度を ELISA 法で測定した。現在までのところ健常者コントロール群と比較してやや高値を示すものの有意差を認めなかった。今後、症例数を増やして更に検討を重ねる予定である。

**Key Words** 急性心筋梗塞, 心筋炎, 大動脈瘤, 小胞体ストレス, バイオマーカー

### 緒 言 :

小胞体は分泌蛋白質を合成する細胞内小器官で、全蛋白質の約 30% を産生している。新たに合成された分泌蛋白質は、小胞体内でシャペロンや酸化還元酵素により折りたたまれた後に分泌経路に運ばれる。一方、低酸素刺激は高次構造上の異常蛋白質の小胞体内蓄積を引き起こし、これを小胞体ストレスと呼ぶ。この小胞体ストレスに対する細胞応答として、蛋白質折りたたみを担う小胞体シャペロンが誘導され、同時に新規蛋白質の翻訳が抑制され小胞体への負荷を軽減させる。しかし、ミスフォールド蛋白質蓄積が小胞体応答による対応能力を逸脱した時、小胞体よりアポトーシスシグナルが発信される。現在では小胞体は細胞の生死を決定する重要な細胞内小器官として注目されている。近年ミスフォールド蛋白質蓄積が神経変性疾患や糖尿病・脂肪肝などの疾患に関与することが明らかになり、世界中で活発な研究が行われている。

我々はこれまで、冠状動脈の粥状動脈硬化の進展と血栓形成に至る動脈硬化病変の破綻に小胞

体ストレスが関与していることを世界に先駆けて報告した<sup>1)</sup>。しかし循環器疾患と小胞体ストレスの関連についての研究は十分されていないのが現状である。本研究では循環器疾患として重要な位置を占めている急性心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤などにおける小胞体ストレス関連分子の病態への関与を検討し、更にこれらの疾患における小胞体ストレス関連分子のバイオマーカーとしての可能性について模索した。

#### 対象と方法：

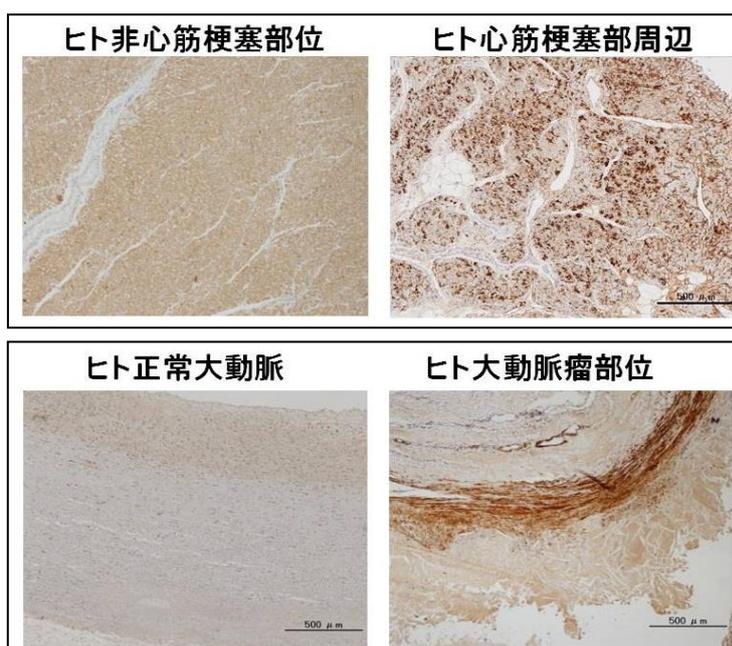
病理解剖症例の組織を用いて、心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤の組織における小胞体関連分子の分布を免疫組織化学によって検討した。小胞体関連分子として小胞体ストレスシャペロンである GRP78 および GRP94、低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素である endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (Ero1) について、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて酵素抗体法により、これらの蛋白の分布について検討した。

大動脈瘤については、動物モデルにおいてこれらの分子の分布を検討するため、Apolipoprotein E (ApoE) 欠損マウスに対する Angiotensin II 持続投与モデルを用いて腹部大動脈瘤モデルを作製し、大動脈瘤モデル動物における小胞体ストレス関連分子の発現についても検討した。

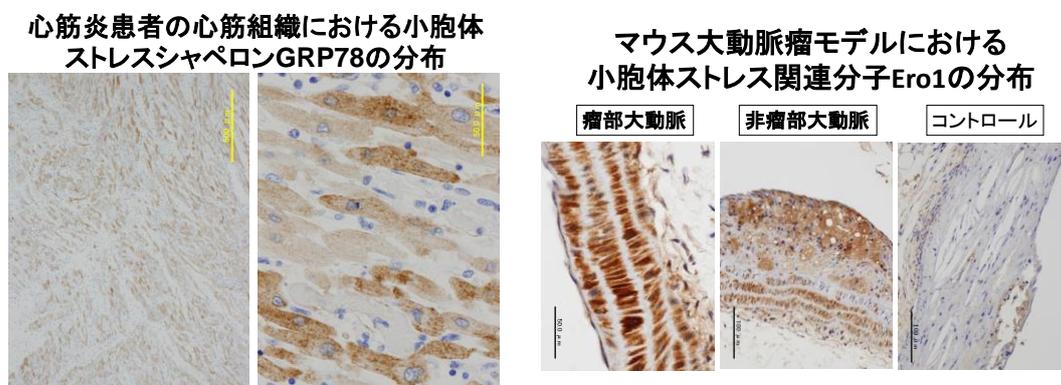
更に小胞体ストレス関連分子のうち ELISA 法にて測定可能な GRP78 (HSPA5) 測定キットを用いて、当院の 20 例及び阜外心血管病医院 15 例の急性心筋梗塞患者の血清中の GRP78 の濃度を測定した。

#### 結果：

心筋梗塞病変において免疫組織化学で Ero1 の分布が正常の非梗塞部位の心筋組織と比較して強く認められた（下図）。この結果より Ero1 が心筋梗塞の病態に関与している可能性が示唆された。さらに大動脈組織と腹部大動脈瘤組織での Ero1 の分布を検討したところ、正常大動脈では発現が認められなかったが、大動脈瘤壁で Ero1 蛋白が広く分布していた（右図）。大動脈瘤の病態にも Ero1 が関与している可能性が考えられた。また心筋炎患者における GRP78 の分布では心筋細胞の細胞質内に GRP78 の分布が認められ、心



筋炎にて障害された心筋細胞では、小胞体ストレスの過剰状態で、そのシャペロン分子である GRP78 の過剰発現が起こっていると考えられた（下左図）。



ApoE 欠損マウスに対する Angiotensin II 持続投与による腹部大動脈瘤モデルでもヒト大動脈瘤同様にコントロール<非瘤部大動脈<瘤部大動脈の順で Ero1 の発現は増強していた（上右図）。

そこで我々は心筋梗塞の急性期の血清中の小胞体ストレスシャペロン GRP78 の血中濃度の測定を ELISA 法で行った。これまでのところ日本・中国あわせて 35 症例の血清について検討したが、やや心筋梗塞症例で高値を示したものの、正常コントロール群と有意な差は認められなかった。

#### 考 察：

今回我々は心筋梗塞や筋炎・大動脈瘤といった循環器疾患でも特に生命予後を左右する重要な疾患において、小胞体ストレス関連分子が発現していることを同定した。さらに大動脈瘤においては、動物モデルでも小胞体酸化還元酵素 Ero1 の発現が増強しており、病態に深く関与している可能性が示唆された。現在さらにラット心筋梗塞モデルおよび筋炎モデルを作製しており、これらのモデル動物において病変の組織中・血清中の小胞体関連分子の分布や動態を検討する予定である。患者血清の検討では残念ながら今回の報告までの症例数では、正常群と患者群において血中 GRP78 の濃度は有意な差を認めなかった。しかし今後更に共同研究を継続して中国においても心筋梗塞患者の血清を確保し、血中の小胞体ストレス関連分子の動態について検討したい。さらに阜外心血管病医院は北京の循環器疾患専門病院であり、多くの心疾患患者の治療に当たっているため、急性心筋梗塞のみならず心不全・心臓弁膜症・筋炎などの重症循環器疾患患者の血清についても同様の検討を行って、同分野の診断や治療に応用できるバイオマーカーの検索を行っていきたい。

#### 参考文献：

1. Myoishi M, Hao H, et al: Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116:1226-1233, 2007.

作成日：2013年3月10日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013 年 03 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調査・共同研究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：王立楠  
所属機関名：三重大学  
所属部署名：大学院医学系研究科 職名：特任助教  
所在地：三重県津市江戸橋 2-174  
電話：059-231-5187（直通） 内線：



1. 助成金額： 80 万 円

2. 研究テーマ

CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いたがんに対する養子免疫療法の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：王立楠	職名：特任助教
所属機関名：三重大学大学院医学系研究科	部署名：遺伝子免疫 細胞治療学
中国側研究者氏名：丁曉慧	職名：教授
所属機関名：瀋陽医学院	部署名：病理学

4. 当該研究における発表論文等

1. Shirakura, Y., Mizuno, Y., Wang, L., Imai, N., Amaike, C., Sato, E., Ito, M., Nukaya, I., Mineno, J., Takesako, K., Ikeda, H., and Shiku, H. 2011. TCR gene therapy targeting MAGE-A4 inhibits human tumor growth in NOD/SCID/γc(null) mice. Cancer Science, 103(1):17-25.

5. 成果の概要

別紙添付

-日中医学協会助成事業-

CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いたがんに対する  
養子免疫療法の開発

日本研究者氏名 特任助教 王立楠

日本所属機関 三重大学大学院医学系研究科

中国研究者氏名 丁 曉慧

中国所属機関 瀋陽医学院

## 要旨

本研究では、複数種類のヒトシグナル伝達ドメインを付加した癌胎児性抗原 (CEA) 特異的 CAR のレトロウイルスコンストラクトを用いてヒト末梢血 T 細胞に導入し、*in vitro* における機能評価と NOG マウスを用いて *in vivo* における抗腫瘍効果を評価した。その結果、従来から研究が進められている CD3z と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CAR (28z) に加えて、申請者等が明らかにした CD4T 細胞や CD8T 細胞に制御性 T 細胞抵抗性を付与する GITR シグナル伝達ドメインを付加した CAR (zG) 導入 T 細胞が、極めて有効であることを見いだした。ヒトと同様の CEA 発現パターンを示す CEA トランスジェニックマウスに大腸発がんを誘発し、CEA 特異的 CAR を導入したマウス T 細胞を用いて、さらなる有効性と安全性を評価するための治療モデルを確立する目的で、細胞内シグナル伝達ドメイン (CD3z、CD28、GITR) をマウス型に置き換えたエコトピックウイルスを作製し、マウス T 細胞を用いてその発現と *in vitro* における機能評価を行った。その結果、マウス T 細胞においても機能的な CAR の発現が誘導できた。

**Key Words** キメラ抗原受容体、がん治療、複刺激シグナル分子

## 緒言

本邦における悪性腫瘍による死亡は死亡原因の 30% を超え、既存の治療法の改良に加えて、新規治療法の開発が積極的に行われてきている。なかでも、人工的に腫瘍特異性を付与した T 細胞をがん患者に移入する遺伝子改変 T 細胞輸注療法に期待が集まっている。その一つとして人為的に腫瘍特異性を付与した遺伝子改変 T 細胞を輸注する方法が注目されている<sup>1</sup>。これまでは、腫瘍細胞の細胞表面上の主要組織適合性抗原 (MHC) と腫瘍特異的抗原由来のペプチドとの複合体を認識する T 細胞受容体 (TCR) を、ウイルスベクターを用いて導入・改変した自己 T 細胞を利用した臨床試験が行われてきた。しかしながら、この療法には「ある特定の MHC に拘束されるために投与可能な患者数が制限されてしまう」、「MHC を欠落している腫瘍細胞が存在する」という短所がある。この問題を解決するための新たな試みとして、腫瘍細胞表面上に発現されるがん抗原を認識するモノクローナル抗体を T 細胞受容体として用いる方法が開発された。単鎖抗体 (scFv) と T 細胞受容体 (TCR) や副刺激分子のシグナル伝達ドメインからなるキメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor; CAR) を導入した T 細胞は MHC 非依存性のがん抗原を認識し破壊できることから、対象となるがん抗原を持つより広範囲の患者に適応可能となる長所を持つ。今までに複数の CAR 臨床試験が施行されてきたが、*in vitro* 評価系において優れた機能の発揮する CAR が、必ずしも優れた臨床効果を示していない。即ちこれまでの CAR 遺伝子導入 T 細胞は、*in vitro* での機能評価系を指標に順次開発されてきたものの、*in vivo* である

臨床効果との間に乖離が見られている。また、TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法で見られた程の有効性が、未だ CAR 臨床試験では確認されていない。このような期待に反する結果の理由として、投与後の抗腫瘍効果を予測するための *in vivo* での機能評価系が未成熟であることが挙げられる。現状では、投与薬剤そのものであるヒト T 細胞生体内細胞やヒトがん細胞は、マウス等の宿主の免疫系により拒絶される為に単純に投与することが出来ず、これまでの改変 T 細胞輸注療法における安全性、薬理薬効はほとんど実験動物では検証されないままに臨床研究が開始されてきた。最近になって、T 細胞移入細胞療法では、移入 T 細胞の生体内における長期生存性が優れた臨床効果を発揮するために必須の条件であることが明らかになり、*in vivo* での評価系が切望されている。本研究では、GITR を含む様々な副刺激分子のシグナル伝達ドメインを付加した癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen; CEA) 特異的 CAR 導入 T 細胞を作製し、ヒト T 細胞が生着可能な重度免疫不全マウスである NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$  (NOG) マウス及び CEA トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 評価系を樹立した。

## 材料と方法

### マウス

8 週令前後の重度免疫不全マウス (NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$  (NOG)) は公益財団法人実験動物中央研究所より購入、使用した。8 週令前後の C57BL/6 マウスは日本 SLC より購入、使用した。ヒト CEA プロモータ領域を含む CEA トランスジェニックマウス<sup>2</sup> (C57BL/6 バックグラウンド) は Wolfgang Zimmermann 教授 (Institute of Immunobiology, University of Freiburg, Germany) より御供与いただき、三重大学動物実験施設において飼育・繁殖した。

### 細胞

同意書による同意を得た上で、健康人末梢血から Ficoll 法により末梢血単核球を分離した。マウス細胞は、マウス脾臓をナイロンメッシュにてほぐし、単一細胞懸濁液を調製した。ヒト由来の CEA 陽性胃癌細胞株 (MKN45) と CEA 陰性胃癌細胞株 (MKN1) は対数増殖期に使用した。

### ウイルスコンストラクト

CEA 特異的単鎖抗体に図 1 に示すシグナル伝達分子の細胞内ドメインを付加した CAR コンストラクトを含むレトロウイルスを作製、使用した。

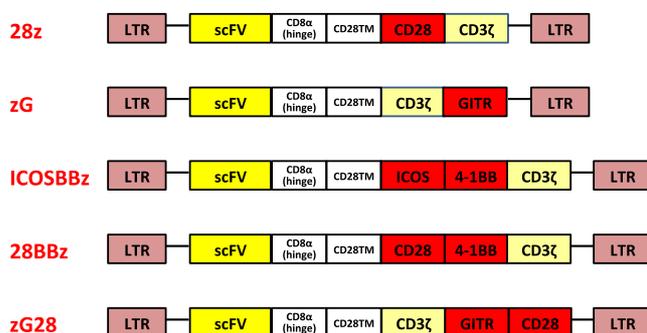


図 1. CAR コンストラクト

### 発がん実験

CEA-Tg マウスに AOM (10 mg/kg) を投与しその 1 週間後に 1% DSS を飲水にて反復投与 (7 日間連続、7 日間休止を 3 サイクル) を開始して、大腸発がんを誘発した。

## 結果

### 複刺激分子 GITR と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR の発現誘導

複刺激分子 CD28、GITR、ICOS、4-1BB のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR のヒト末梢血 T 細胞への導入を比較検討した。その結果、CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR の導入効率が陽性率の面でも発現強度の面でも最も高かった (図 2)。また、その際のレトロウイルスコピー数は最少で (図 3)、安全性が高いことも示唆された。

図 2. CAR 導入ヒト末梢血 T 細胞の CAR 発現

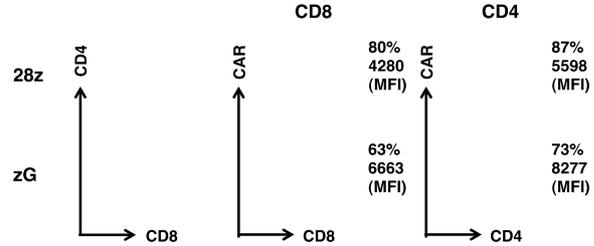
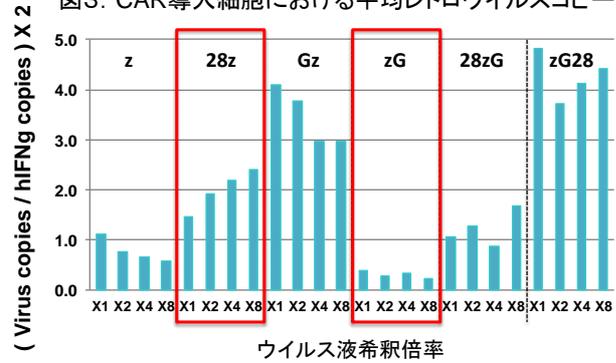


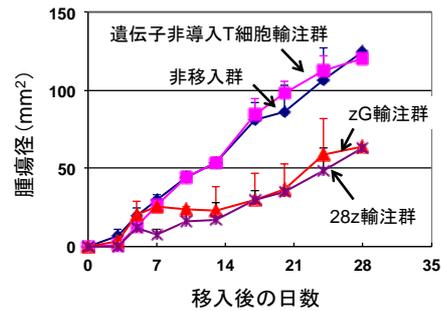
図 3. CAR 導入細胞における平均レトロウイルスコピー数



### 複刺激分子 GITR と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR の in vivo での抗腫瘍効果

次に in vivo での有効性を評価する目的で、ヒト癌細胞が生着可能な NOG マウスに CEA 陽性胃癌細胞株 MKN45 を接種すると同時に CEA 特異的 CAR 導入 T 細胞を輸注し、腫瘍縮小効果を評価した。その結果、CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR を導入したヒト T 細胞は抗腫瘍効果を発揮した (図 4)。

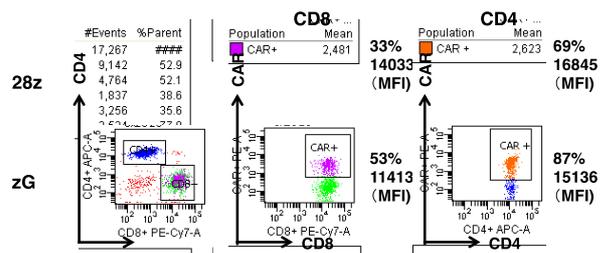
図 4. CAR 導入 T 細胞輸注 NOG マウスにおける CEA 陽性ヒト胃癌細胞株 MKN-45 の増殖抑制



### マウス T 細胞への CAR 導入

NOG マウスはヒト細胞が生着可能であるが、ヒト T 細胞を移入した場合は移植片対宿主病を発症してしまし、長期のわたる CAR 導入 T 細胞の有効性やまた安全性を評価することはできない。そこで、マウス T 細胞を用いた治療評価系を樹立する目的で、シグナル伝達ドメインをマ

図 5. CAR 導入マウス脾臓 T 細胞の CAR 発現

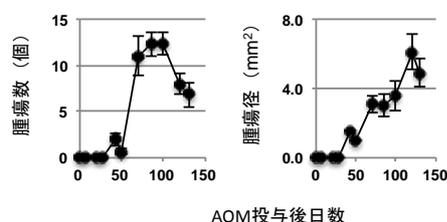


ウス型に置き換えた CAR コンストラクトを作製し、マウス T 細胞への導入効率を検討した。ヒトにおいて導入効率の高かった CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR を検討対象とした。その結果、マウスにおいても十分に発現が誘導できた (図 5)。

### マウス大腸がん系を用いた有効性と安全性評価系の樹立

正常状態でヒトと同様の発現パターン、即ち正常大腸上皮細胞の管腔側に弱く発現しする CEA トランスジェニック (CEA-Tg) マウス (C57BL/6 background) を本研究で用いる (導入・繁殖済み)。このマウスは、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与により大腸炎症の再燃と寛解を繰り返す潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌を模したモデルを作成すると、発生した大腸癌が CEA を強く発現することが示されている<sup>2</sup>。したがって、CEA-Tg マウスは T 細胞輸注療法の有効性を発がん系で評価するために格好のモデルマウスである。CAR 導入細胞の輸注による治療モデル作製のためには腫瘍発生時期のその後の腫瘍増殖がわかっていなければならない。そこで、C57BL/6 マウスに AOM (10 mg/kg) を投与しその 1 週間後に 1% DSS を飲水にて反復投与 (7 日間連続、7 日間休止を 3 サイクル) を開始して、大腸発がんを誘発し、大腸癌の発生時期と発生した大腸癌の増殖率を明らかにした (図 6)。

図6. AOM/DSS投与マウスの大腸癌発生時期と大腸癌増殖率



### 考察

本研究により、レトロウイルスベクターを用いたヒト T 細胞への導入において、CD28 と GITR を含む CAR が低ウイルスコピー数で効率よく発現誘導でき、また、*in vivo* でも抗腫瘍効果を発揮したことから、安全性と効率の面でも高いことが明らかになった。NOG を用いた CAR の *in vivo* 有効性評価には限界があるため、マウス型 CAR を作製し、その発現誘導を確認できた。従来、移植癌を用いた抗腫瘍効果の評価の限界点を超えるため、自家発がん系マウスモデルを作製し、発がんのタイミング等を明らかにできた。この 2 点を明らかにできたことで、今後マウス大腸発がん系を用いた CAR 導入 T 細胞の有効性と安全性評価系を確立していく予定である。

### 参考文献

1. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535–546, 2009.
2. Eades-Perner AM, Vander Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S, and Zimmermann W. Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res* 1994;54:4169–76.

# 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

平成 25 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調査・共同研究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： 袁 博  
所属機関名： 東京薬科大学・薬学部  
所属部署名： 臨床ゲノム生化教室 職名： 助教  
所在地： 東京都八王子市堀之内 1432-1  
電 話： 0426765738 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

フラボノイド併用による三酸化ヒ素の新規抗がん作用に関する基盤的研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 袁 博	職名： 助教
所属機関名： 東京薬科大学・薬学部	部署名： 臨床ゲノム生化学教室
中国側研究者氏名： 胡 曉梅	職名： 教授
所属機関名： 中国中医科学院・西苑医院	部署名： 血液科

4. 当該研究における発表論文等

原著(\*:corresponding author, †: equal contributor)

1. Iriyama, N., Yuan, B<sup>†</sup>., Hatta, Y., Horikoshi, A., Yoshino, Y., Toyoda, H., Aizawa, S., Takeuchi, J., Granulocyte colony-stimulating factor potentiates differentiation induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide and enhances arsenic uptake in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. Oncol Rep. 28, 1875-1882 (2012).
2. Iriyama, N., Yuan, B<sup>\*</sup>., Yoshino, Y., Hatta, Y., Horikoshi, A., Aizawa, S., Takeuchi, J., Toyoda, H., Aquaporin 9, a promising predictor for cytotoxic effect of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cell lines and primary blasts.

Oncol Rep. (in press).

3. Hu, X.M., Tanaka, S., Onda, K., Yuan, B., Toyoda, H., Ma, R., Liu, F., Toshihiko, H., Arsenic disulfide induced apoptosis and concurrently promoted erythroid differentiation in cytokine-dependent MDS-progressed leukemia cell line F-36p with complex karyotype including monosomy 7. Chin J Integr Med. (in press).
4. Kikuchi, H., Yuan, B\*, Nishimura, Y., Imai, M., Furutani, R., Kamoi, S., Seno, M., Fukushima, S., Hazama, S., Hirobe, C, Ohyama, K., Hu, X.M., Hirano, T., Toyoda, H., Cytotoxicity of Vitex agnus-castus fruits extract and its major component, casticin correlate with differentiation status in leukemic cell lines. Chin Med. (Under review)
5. Yoshino, Y., Yuan, B\*, Aoyama, R., Murota, R., Moriyama, C., Sato, A., Toyoda, H., Enhanced cytotoxic effects of arsenite in combination with delphinidin against a human leukemia cell line, HL-60. Preparation.

著書

1. Yuan, B\*, Imai, M., Kikuchi, H., Fukushima, S., Hazama, S., Akaike, T., Yoshino, Y., Ohyama, K., Hu, X.M., Pei, X.H., Toyoda, H., Cytocidal Effects of Polyphenolic Compounds, Alone or in Combination with, Anticancer Drugs Against Cancer Cells: Potential Future Application of the Combinatory Therapy. Ed. by Tobias M. Ntuli. Apoptosis and Medicine. InTech. Rijeka, 2012, pp. 155-174.

## フラボノイド併用による三酸化ヒ素の新規抗がん作用に関する基盤的研究

研究者氏名	助教 袁 博
日本所属機関	東京薬科大学薬学部
中国研究者氏名	教授 胡 曉梅
中国所属機関	中国中医科学院西苑医院

### 要 旨

骨髓性白血病細胞 HL-60 および急性前骨髄球性白血病(APL)細胞 NB4 に対するデルフィニジン(Del)と三酸化ヒ素( $As^{III}$ )の単独および併用効果について検討した。Del が両細胞に濃度依存的に細胞毒性を誘導したが、健常者由来末梢血単核球(PBMCs)の増殖に殆ど影響を与えなかった。Del と  $As^{III}$  の併用がそれぞれ単独処理より、 $As^{III}$  低感受性細胞 HL-60 のみならず、高感受性細胞 NB4 にもより強い殺細胞作用を示した。一方、PBMCs における両者の併用による殺細胞作用が顕著ではなかった。HL-60 に対する併用による殺細胞作用増強機構を検討したところ、それぞれの単独処理に比較し、両者の併用がミトコンドリア膜電位(MMP)の低下、Bid, caspase-9, -8 および-3 の活性化をより顕著に誘導した。さらに、Del がグルタチオン(GSH)枯渇剤である BSO(buthionine sulfoximine)と同様に細胞内 GSH 量を低下させた。興味深いことに比較的低濃度  $As^{III}$  に惹起された GSH の上昇が Del 存在下でコントロール以下まで低下した。また、Del が  $NF-\kappa B$ (nuclear factor- $\kappa B$ )活性を阻害したこと、 $NF-\kappa B$  阻害剤である JSH-23 および PDTC(pyrrrolibine dithiocarbamate)が Del と同様に、HL-60 に対する  $As^{III}$  の細胞毒性を増強したことが観察された。これらのことから、HL-60 における Del と  $As^{III}$  の併用による殺細胞作用増強機構に、ミトコンドリア障害に起因する caspase 活性化が関与するアポトーシスの誘導が密接に関係することが考えられた。さらに、Del が  $NF-\kappa B$  活性を抑制することにより、細胞内 GSH を低下させ、殺細胞増強機構に寄与することが示唆された。

**Key Words** フラボノイド、デルフィニジン、三酸化ヒ素、併用療法、HL-60

### 緒 言：

再発性・難治性 APL に優れた治療効果を示す  $As^{III}$  は、固形がん細胞を含む種々のがん細胞に殺細胞効果を発揮し、注目を集めている<sup>1,2)</sup>。一方、その臨床副作用である APL 分化症候群などが知られている。また、APL 以外のがん細胞の低感受性が  $As^{III}$  の臨床応用拡大を阻む要因の一つとなっている。フラボノイドの一種であるアントシアニジンは、有色性のフルーツ・野菜に豊富に含まれる化合物であり、がん細胞増殖を抑制することが報告され、ヒト由来正常細胞に対する低毒性も知られている。そこで、 $As^{III}$  の他のがん細胞への適応拡大を目的とし、 $As^{III}$  の殺細胞効果を維持・増強しつつ、投与量の減量、副作用の軽減をもたらす可能性のあるアントシアニジンの一種である Del (Fig. 1) について詳細な検討を行った。

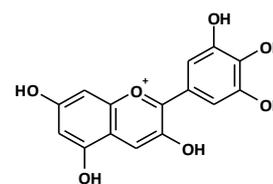


Fig. 1 Chemical structure of Del

### 対象と方法：

本研究では、HL-60、NB4 および PBMCs において、Del と  $As^{III}$  の単独および併用処理時に誘導される細胞増殖抑制は XTT 法で検討した。細胞周期は PI(propidium iodide)の核染色を用いた FACS 解析により検討した。ミトコンドリア膜電位(MMP)の低下は Rhodamine 123 を用いて検討した。アポトーシス誘導は Annexin V/PI 染色を用いた FACS 解析およびアガロースゲル電気泳動法により検討した。Bid, Bad, caspase-9, -8 および-3 の発現・活性化はウエスタンブロット(WB)法で検討した。細胞内 GSH の量は色素 MCB(monochlorobimane)を用いて検討した。 $NF-\kappa B$  の DNA 結合活性はゲルシフトアッセイにより評価した。尚、PBMCs を用いた研究は東京薬科大学倫理委員

会で認められており、健常者からインフォームドコンセントを得た。

## 結 果:

### I. Del による As<sup>III</sup> の細胞毒性の増強

1) 5 種類のアントシアニン (De1、マルビジン、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴジニン) で HL-60、PMMCs を 48h 処理した。Table 1 で示したように、5 種類アントシアニンのうち、De1 が PMMCs の増殖に殆ど影響を与えず、HL-60 に最も強い殺細胞作用を示した。また、8.0 μM De1 が約 20% の細胞増殖阻害率を示した。

2) As<sup>III</sup> と Del 単独、あるいは併用で細胞を 48h 処理した。As<sup>III</sup> が濃度依存的に HL-60、NB4 および PMMCs に細胞毒性を示し、それぞれの IC<sub>50</sub> は 11.2、2.4、9.9 μM であった。さらに、8.0 μM De1 の共存下でそれぞれの IC<sub>50</sub> は 1.5、1.4、8.2 μM となった (Table 2)。また、最も併用効果が示されたのは、5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM De1 の併用だったので、併用による殺細胞作用増強機構を詳細に検討するために、5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM De1 を用いた。

**Table 1. IC<sub>50</sub> values for cytotoxicity induced by each anthocyanidin**

	HL-60	PBMCs
Delphinidin	10.9 μM	> 50 μM
Malvidin	25.4 μM	> 50 μM
Peonidin	29.5 μM	> 50 μM
Cyanidin	31.6 μM	> 50 μM
Pelargonidin	85.2 μM	> 100 μM

**Table 2. IC<sub>50</sub> values for cytotoxicity induced by As(III) alone and the combination of As(III) and Del**

Cells	Treatment	IC <sub>50</sub>
HL-60	As(III) alone	11.2 μM
	As(III) + delphinidin 8μM	1.5 μM
NB4	As(III) alone	2.4 μM
	As(III) + delphinidin 8μM	1.4 μM
PBMCS	As(III) alone	9.9 μM
	As(III) + delphinidin 8μM	8.2 μM

### II. 細胞周期に対する Del と As<sup>III</sup> の併用時の影響

1) HL-60 を 5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM Del の併用で 24、48h 処理したところ、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>/M 期の細胞数は、コントロールと比較して有意な変化が認められなかった。一方、Sub G<sub>1</sub> 期の細胞数は、コントロールと比較して顕著に増加した (Fig. 2)。

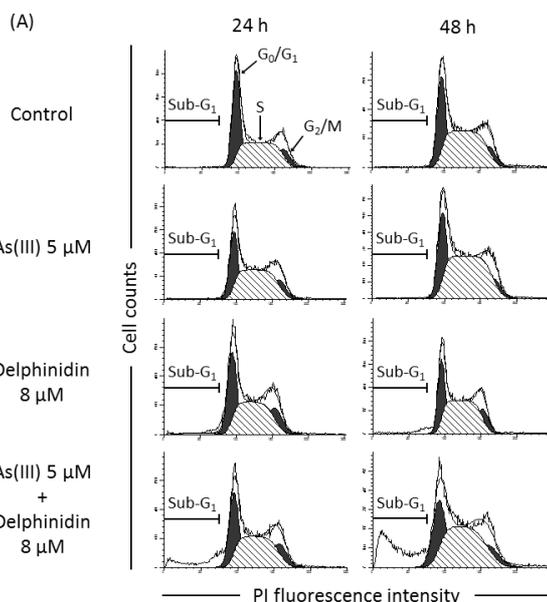
### III. MMP に対する Del と As<sup>III</sup> の併用時の影響

1) HL-60 を 5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM Del の単独、あるいは併用で 6h 処理したところ、Del 単独処理では MMP がある程度下がったが、As<sup>III</sup> 単独処理では MMP の低下が殆どなかった。また、それぞれ単独処理と比べ、併用処理では顕著な MMP 低下が認められた (Fig. 3)。

### IV. Del と As<sup>III</sup> の併用によるアポトーシスの誘導

1) HL-60 を 5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM Del の単独、あるいは併用で 12、24、48h 処理したところ、それぞれ単独処理では、わずかな DNA の断片化が確認されたが、併用では、明確な DNA の断片化が確認された (Fig. 4)。さらに、Annexin V/PI 染色を用いた FACS 解析により同様な結果が得られた。

2) HL-60 を 5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM Del の単独、あるいは併用で 6、12、24h 処理した後、WB 法で Bid、Bad caspase-9、8、3 の活性化を検討した。それぞれ単独処理と比べ、両者の併用では処理 6h 後において、すべてのタンパク質



**Fig. 2 Effects of As(III) and Del, alone or in combination, on cell cycle in HL-60 cells.**

の活性化が観察された。また、caspase-9、8、3の活性化は処理12、24h後においても観察された。

### V. Delによる細胞内GSHの量の低下

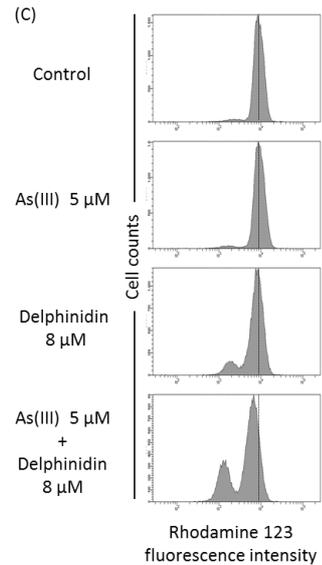
1) Delは、ポジコンのGSH枯渇剤であるBSOと同様に、有意にGSH量を低下させた。興味深いことに比較的低濃度のAs<sup>III</sup>によって上昇したGSH量がDelの存在下でコントロール以下まで有意に低下した(Fig. 5A)。

2) As<sup>III</sup>単独処理群と比べ、Del共存下の殺細胞作用増強効果と同様に、BSOも濃度依存的にAs<sup>III</sup>の殺細胞作用を増強させた(Fig. 5B)。

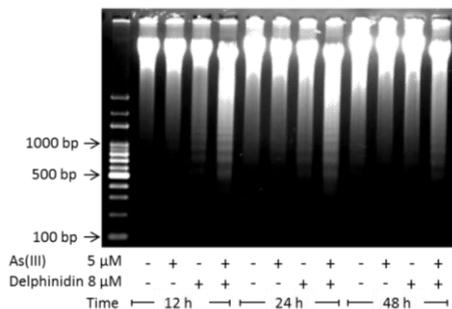
### VI. 細胞内GSH量の低下および殺細胞作用にNF-κB関与の可能性

1) HL-60細胞を5.0μM As<sup>III</sup>と8.0μM Delの単独、あるいは併用で、または、ポジコンとしてNF-κB活性阻害剤であるJSH-23、NF-κB活性化誘導剤であるTNF-αでそれぞれ48h処理した。NF-κB活性はDel単独処理では、JSH-23処理と同様に抑制された。また、As<sup>III</sup>単独処理によりNF-κB活性がある程度高まったが、Delの併用により顕著に低下した。これらの結果はFig. 5Aで示すGSHの結果と良く相関した。

2) JSH-23が濃度依存的にGSHの量が低下し、同時にJSH23との併用によりAs<sup>III</sup>の殺細胞作用は有意に増強された。同様な現象はNF-κB阻害剤であるPDTCにおいても観察された。



**Fig. 3 Loss of MMP in HL-60 cells treated with As(III) and Del, alone or in combination.**

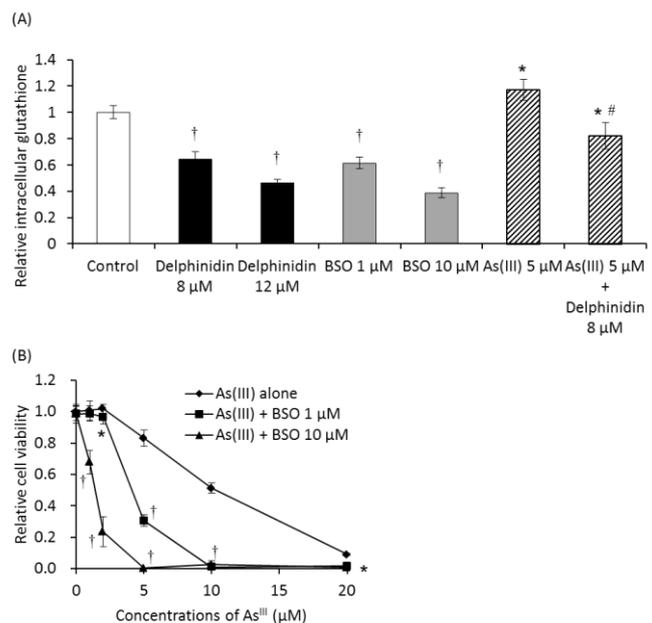


**Fig. 4 Apoptosis induction of As(III) and Del, alone or in combination, in HL-60 cells.**

### 考察:

本論文に用いられた5種類のアントシアニジンのうち、DelがPBMCsの増殖に殆ど影響を与えないだけでなく、HL-60に最も強い殺細胞作用を示したことから、Delが腫瘍細胞選択的な殺細胞作用を有することが示唆された。NB4細胞と比べ、HL-60細胞がAs<sup>III</sup>に対する低感受性であることが知られている<sup>3)</sup>。本研究において、HL-60およびNB4細胞におけるAs<sup>III</sup>のIC<sub>50</sub>はそれぞれ11.2と

2.4μMであったことから、NB4よりHL-60はAs<sup>III</sup>の低感受性細胞であることが改めて確かめられた。興味深いことに、8μM Delの共存下で、As<sup>III</sup>に対するHL-60のIC<sub>50</sub>は11.2μMから1.5μMとなった。また、1.5μM As<sup>III</sup>と



**Fig. 5 Contribution of Del-induced reduction of GSH content to enhanced cytotoxic effects of As(III) in combination with delphinidin in HL-60 cells.** (A) After treatment with Del, BSO, As(III), alone or in combination for 48 h, the alteration of GSH was investigated. \*,  $p < 0.05$  and †,  $p < 0.001$  vs. control; #,  $p < 0.05$ , As(III)-alone vs. As(III)+Del. (B) After exposure to various concentrations of As(III) in the presence or absence of BSO for 48 h, cell viability of HL-60 was determined. \*,  $p < 0.05$  and †,  $p < 0.001$ , As(III)-alone vs. As(III)+BSO (1 or 10 μM).

いう濃度は臨床上で到達できる濃度であり、十分な治療効果が期待できると報告されている<sup>2,4)</sup>。さらに、この併用はPBMCsより、むしろHL-60、NB4をより効率良く殺細胞作用を示すことから、今後難治性がん治療へのAs<sup>III</sup>とDe1の臨床応用の可能性が考えられた。今現在、臨床上の効果については、共同研究者の胡先生が進めているところである。

As<sup>III</sup>とDe1の併用が細胞周期に影響を与えず、顕著にMMPの低下、caspasesの活性化、DNAの断片化を誘導したことから、ミトコンドリア障害に起因するcaspases活性化が関与するアポトーシスの誘導が殺細胞増強機構に大きく寄与することが示唆された。また、興味深いことに、Bidの活性化が観察されたことから、intrinsic pathwayとextrinsic pathwayのcross talkがアポトーシス誘導に関与する可能性が示唆された。

GSHは亜ヒ酸と抱合体の形成や酸化ストレスの除去を通じて、亜ヒ酸の抵抗性に大きく寄与することが知られている。本研究では、5 $\mu$ Mと比較的低濃度As<sup>III</sup>はGSH量を増加させ、この増加がHL-60のAs<sup>III</sup>耐性に寄与している可能性が考えられた。また、De1がGSH枯渇剤であるBS0と同様に、GSH量を減少させただけでなく、比較的低濃度As<sup>III</sup>に惹起されたGSH上昇を是正した。さらに、De1がNF- $\kappa$ B阻害剤であるJSH-23と同様に、NF- $\kappa$ Bの活性を阻害した。NF- $\kappa$ Bは細胞内GSH量の調節に重要な役割をしていることが報告されている<sup>5)</sup>。以上ことから、De1がNF- $\kappa$ B活性を抑制することにより、細胞内GSHを低下させ、殺細胞増強機構に寄与することが示唆された。本研究成果がDe1とAs<sup>III</sup>の併用がHL-60のAs<sup>III</sup>感受性を増大させ、がん治療へのAs<sup>III</sup>の応用拡大につながる有用な知見を与えると思われる。

これまでに、私たちはトランスポーターであるAQP9がAs<sup>III</sup>の細胞毒性、治療効果に大きく関与することを報告した<sup>2,6,7)</sup>。この観点から併用時のAQP9の発現、細胞内ヒ素の蓄積を検討しているところである。

#### 参考文献：

- [1]. Litzow M.R., Arsenic trioxide, *Expert Opin. Pharmacother.* **9**, 1773-1785 (2008).
- [2]. Yuan B., Yoshino Y., Kaise T., Toyoda H., Application of arsenic trioxide therapy for patients with leukemia. Ed. by Sun Hongzhe. In *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*. John Wiley & Sons, New York, 2010, pp. 263-292.
- [3]. Rojewski M.T., Baldus C., Knauf W., et al., Dual effects of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation, *Br. J. Haematol.* **116**, 555-563 (2002).
- [4]. Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., et al., Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide, *N. Engl. J. Med.* **339**, 1341-1348 (1998).
- [5]. Peng Z., Geh E., Chen L., et al., Inhibitor of kappaB kinase beta regulates redox homeostasis by controlling the constitutive levels of glutathione, *Mol. Pharmacol.* **77**, 784-792 (2010).
- [6]. Yoshino Y., Yuan B., Kaise T., et al., Contribution of aquaporin 9 and multidrug resistance-associated protein 2 to differential sensitivity to arsenite between primary cultured chorion and amnion cells prepared from human fetal membranes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **257**, 198-208 (2011).
- [7]. Iriyama N., Yuan B., Yoshino Y., et al., Aquaporin 9, a promising predictor for cytotoxic effect of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cell lines and primary blasts, *Oncol Rep.* (in press).

#### 学会発表：

- [1] "EFMC-ISMIC 2012 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry" conference. Berlin, Germany. (2012.9.2-6)
- [2] "11th Meeting of Consortium for Globalization of Chinese Medicine" conference. Macau, China. (2012.8.20-23)

作成日：2012年3月10日

# 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013 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調査・共同研究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：西岡 安彦  
所属機関名：徳島大学大学院  
所属部署名：呼吸器・膠原病内科学  
所在地：徳島市蔵本町 3-18-15  
電 話：088-633-7127



職名：教授

内線：

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

Focal adhesion kinase 阻害薬を用いた肺線維症に対する分子標的治療の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：西岡 安彦

職名：教授

所属機関名：徳島大学大学院

部署名：呼吸器・膠原病内科学

中国側研究者氏名：文 富強

職名：教授・主任

所属機関名：四川大学附属華西病院

部署名：呼吸器内科

4. 当該研究における発表論文等

---

2013 年 6 月 22 日第 12 回肺サーファクタント研究会で発表予定

---

---

---

---

## Focal adhesion kinase阻害薬を用いた肺線維症に対する分子標的治療の開発

研究者氏名	教授 西岡 安彦
日本所属機関	徳島大学大学院
中国研究者氏名	教授・主任 文 富強
中国所属機関	四川大学附属華西病院

### 要 旨：

Focal adhesion kinase (FAK)は、インテグリンを介した細胞運動能や遊走能に関与する125kDaのチロシンキナーゼである。フィブロネクチンなどの細胞外基質からのシグナルを伝達するとともに、増殖因子レセプターからのシグナル伝達に関与する。マウス線維化肺においてFAK Y397がリン酸化されていることが確認されており、FAKリン酸化阻害は抗線維化効果を期待できる可能性がある。そこで我々はマウスブレオマイシン (bleomycin: BLM) 肺線維症モデルを用いてFAKチロシンリン酸化阻害薬TAE226の抗線維化効果を検討した。TAE226はヒトおよびマウス肺線維芽細胞のFAK Y397のリン酸化を抑制した。さらにTAE226は、肺線維芽細胞の増殖を用量依存性に阻害し、transforming growth factor (TGF)- $\beta$ によって増強されるコラーゲン産生と $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)発現を抑制した。*In vivo*実験の結果から、TAE226投与はマウスBLM肺線維症モデルにおける肺の線維化とコラーゲン産生を抑制した。Ki-67染色による検討結果から、TAE226処理は線維化肺において増殖している肺線維芽細胞の数を減少させることが明らかとなった。以上からFAKを標的としたアプローチは抗線維化療法として有効である可能性が示唆された。

**Key Words：**肺線維症、FAK、線維芽細胞、ブレオマイシン、チロシンリン酸化

### 緒 言：

Focal adhesion kinase (FAK)は、インテグリンを介した細胞運動能や遊走能に関与する125kDaのチロシンキナーゼである<sup>1,2)</sup>。フィブロネクチンなどの細胞外基質からのシグナルを伝達するとともに、増殖因子レセプターからのシグナル伝達にも関与する<sup>3)</sup>。がん細胞の遊走、浸潤、増殖に深く関与していることが報告されており、FAKを標的とした低分子阻害薬の開発が試みられている。既に動物モデルを用いた検討から、神経膠芽腫や卵巣がんに対するFAK阻害薬の抗腫瘍効果が報告されている<sup>4,5)</sup>。一方、マウス線維化肺においてFAK Y397がリン酸化されていることが確認されており<sup>6)</sup>、またtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ による線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化にFAKが介在しているとする報告がある<sup>7)</sup>。また、我々はCCN(CYR61、CTGF、NOV)ファミリーであるCCN6がインテグリンを介してFAK Y397をリン酸化することを報告している<sup>8)</sup>。以上から、FAKを介するシグナルが肺線維症において重要な役割を果たしている可能性があり、FAKリン酸化阻害は抗線維化効果を期待できる可能性がある。

### 対象と方法：

FAK阻害による抗線維化効果を検討するため、本研究においてはFAK阻害薬であるTAE226(ノバルティス社より供与)を使用した。C57BL/6マウス肺より作成した線維芽細胞株及びヒト肺線維芽細胞(MRC-5)を使用し、3H-TdR取り込み試験にて増殖反応を検討した。肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に及ぼす効果の検討は、TGF- $\beta$ にて誘導される $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)発現をWestern blottingで評価することで行った。また、肺線維芽細胞のcollagen I産生に及ぼす効果を同様にWestern Blotにて検討した。また、C57BL/6マウスのブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルを用いてTAE226の抗線維化効果の検討を

開始した。day1 に BLM(125mg/kg)を充填したポンプを C57BL/6 マウスの皮下に留置し、1 週間で持続皮下投与することで肺線維症モデルを作成した。day15~day28 に TAE226(30 mg/kg)を連日経口投与し、day29 に sacrifice したマウス右肺のヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて肺線維化スコア (Ashcroft Score) で検討した。また左肺は、Sircol collagen キットを用いてコラーゲン含量を定量した。さらに、Ki-67 に対する免疫染色を行いマウス線維化肺組織の中での増殖細胞をカウントした。

## 結果：

- 1) TAE226の肺線維芽細胞に対するFAK Tyr397のリン酸化抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞に対するTAE226のFAK Y397リン酸化抑制効果を検討した(図1)。その結果、TAE226は、5 $\mu$ M以上の濃度でFAK Y397のリン酸化を抑制した。

- 2) TAE226の肺線維芽細胞に対する増殖抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞およびMRC5細胞をPDGF(10 ng/ml)刺激下に培養し、TAE226の増殖能に及ぼす影響を検討した。その結果、TAE226は、C57BL/6マウス肺線維芽細胞に対しては3 $\mu$ M以上の濃度で、MRC5に対しては0.1 $\mu$ M以上の濃度で細胞増殖を抑制した。

- 3) TAE226の肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化および細胞外マトリックス産生に及ぼす効果

MRC5細胞をTGF- $\beta$ (5ng/ml)存在下で培養し、TGF- $\beta$ によって促進された $\alpha$ -SMAのおよびコラーゲン I 発現に対してTAE226が与える影響を検討した。TAE226はTGF- $\beta$ 刺激により促進された $\alpha$ -SMAおよびコラーゲン I の発現を濃度依存的に抑制した(図3)。

- 4) BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維症抑制効果
- BLM投与開始後、28日目の肺組織におけるAshcroft scoreの検討から、TAE226 30mg/kg/日の投与により、BLMにより惹起された肺線維化が有意に抑制されていることが組織学的に確認された(図4)。また、上記の肺組織をKi67染色にて評価した結果、BLM単独群と比較してTAE226投与群では特に肺間質に存在するKi67陽性細胞数が有意に減少しており、TAE226はin vivoにおいても肺線維芽細胞の増殖を抑制していることが確認された。

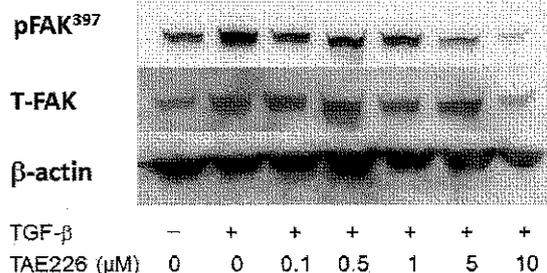


図1 TAE226の肺線維芽細胞に対するFAK Tyr397のリン酸化抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞をTGF- $\beta$ (10 ng/ml)および種々の濃度のTAE226存在下に24時間培養し、lysateを作成した。7.5%SDS-PAGE後に、抗FAKおよび抗リン酸化FAK(Y397)抗体を用いてWestern blottingで検討した。

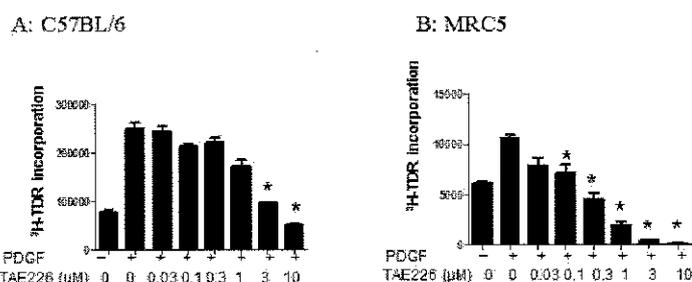


図2 TAE226の肺線維芽細胞に対する増殖抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞(A)およびMRC5細胞(B)を、PDGF(10 ng/ml)存在下に54時間培養した。同時に種々の濃度のTAE226を添加した。その後1 $\mu$ Ciの<sup>3</sup>H-TdRを添加し、18時間培養後に測定し増殖能を算出した。\*P<0.05

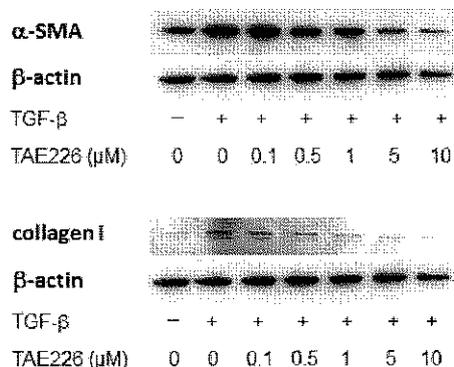


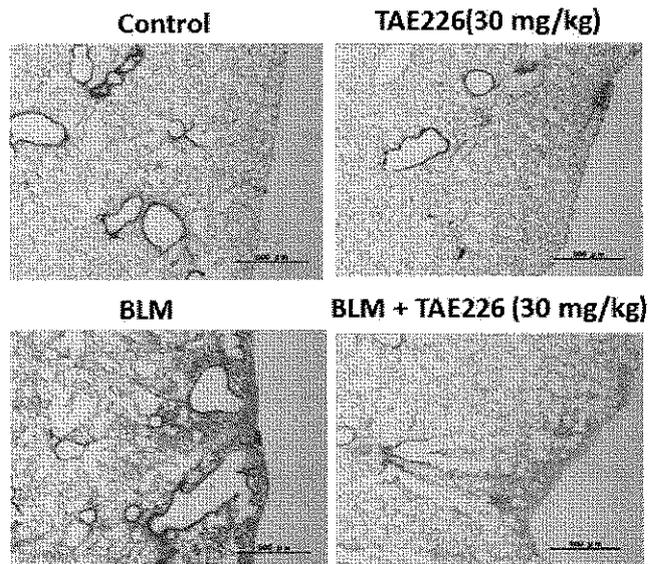
図3 TAE226の肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化および細胞外マトリックス産生に及ぼす効果

MRC5細胞を、TGF- $\beta$ (10 ng/ml)および種々の濃度のTAE226存在下に24時間培養し、lysateを作成した。7.5%SDS-PAGE後に、 $\alpha$ -SMAおよびコラーゲンIに対する抗体を用いてWestern blottingで検討した。

## 考察：

今回の検討からFAK阻害剤は肺線維芽細胞の増殖を抑制すること、さらには線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑

制することにより肺線維症に対する抑制効果を発揮することが確認された。BLM肺線維症モデルでは、FAK阻害剤は後半の2週間のみ投与されていることから、BLMで誘導される早期の炎症を抑制することによる抗線維化効果ではなく、恐らく直接肺線維芽細胞に作用することによって発揮された抗線維化効果であると思われる。現在FAK阻害剤は、がん分子標的治療薬として開発が進められているが、肺線維芽細胞増殖抑制作用、筋線維芽細胞への分化抑制作用、コラーゲン産生抑制作用を併せ持つことから、抗線維化薬としての応用も期待される。一方、TAE226については、IGF-1レセプターやインスリンレセプターに対する阻害作用があり、血糖値に影響を及ぼすことが報告されている。現在、さらにFAK特異的な阻害薬が開発されつつあり、今後このような第2世代のFAK阻害薬の抗線維薬としての可能性を検討することが重要と思われる。



**図4 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維化抑制効果**

C57BL/6マウスにBLM(125mg/kg)を投与し、肺線維症モデルを作製した。TAE226(30 mg/kg/day)は、day14よりday28まで連日経口投与し、day 28にH&E染色で肺線維化を検討した。

**参考文献：**

1. Schaller MD, et al., pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. Proc Natl Acad Sci USA 89: 5192-5196, 1992.
2. Hanks SK, et al., Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylation in response to cell attachment to fibronectin. Proc Natl Acad Sci USA 89: 8487-8491, 1992.
3. Sieg DJ, et al., FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nat Cell Biol 2: 249-257, 2000.
4. Liu T-J, et al., Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther 6: 1357-1367, 2007.
5. Halder J, et al., Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. Cancer Res 67:10976-10983, 2007.
6. Vittal R et al., Modulation of prosurvival signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury. Am J Pathol 166: 367-375, 2005.
7. Thannickal VJ et al., Myofibroblast differentiation by transforming growth factor- $\beta$ 1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. J Biol Chem 278: 12384-12389, 2003.
8. Batmunkh R et al., CCN6 as a profibrotic mediator that stimulates the proliferation of lung fibroblasts via the integrin  $\beta$ 1/focal adhesion kinase pathway. J Med Invest. 58(3-4): 188-96, 2011.

注：本研究は、2013年6月22日第12回肺サーファクタント研究会で発表予定

作成日：2013年 3月 12日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 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調査・共同研究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：秦 亮

所属機関名：久留米大学医学部

所属部署名：感染医学講座

職名：助教

臨床感染医学部門

所在地：福岡県久留米市旭町 6 7

電話：0942-31-7549

内線：



1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

中国上海市中病院における *Acinetobacter baumannii* の水平伝播及び薬剤耐性状況についての研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：秦 亮

職名：助教

所属機関名：久留米大学医学部

部署名：感染医学講座

臨床感染医学部門

中国側研究者氏名：胡必杰

職名：教授

所属機関名：复旦大学附属中山医院

部署名：感染性疾病科

4. 当該研究における発表論文等

研究データはまだ解析中であり、現在発表論文等はない。

---

---

---

## 中国上海市中病院における*Acinetobacter baumannii*の水平伝播及び薬剤耐性状況についての研究

研究者氏名	助教 秦 亮
日本所属機関	久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門
中国研究者氏名	教授 胡 必杰
中国所属機関	复旦大学附属中山医院 感染性疾病科

### 要 旨

近年、わが国でも多剤耐性アシネトバクター・バウマニ(MDRAB: Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*)が病院感染として問題視されるようになった。一方、中国において院内環境由来*A. baumannii*が高頻度で分離され、本菌による院内感染も報告されているが、情報はまだ不十分である。本研究において、*A. baumannii*の薬剤感受性や水平伝播の特徴などについての解析を行った。データの集計や解析などはまだ進行中であるが、現時点において、計41名の院内感染患者(男:31名,女:10名)から、50株の*A. baumannii*臨床株が分離された。また、院内環境調査も行い、計21株の*A. baumannii*環境由来株も分離された。患者の平均年齢は61歳(30-86歳)であり、うち21名の患者は基礎疾患を有し、5名が死亡した。死亡原因として、本菌との関連性は不明である。患者分離株のうち、35(70%)株は血液由来であり、5(10%)株は胸水または腹水由来であり、脳脊髄液及び肺組織からもそれぞれ1株が分離され、残りの8(16%)株は深部カテーテルから分離された。薬剤感受性試験の結果により、殆どの臨床株は多数の抗生剤へ耐性を示し、その内、16(32%)株は多剤耐性株(MDRAB)であることが示唆された。今までの結果により、中国の市中病院において、*A. baumannii*は院内感染を引き起す重要な病原菌の一種であることが明らかにとされた。また耐性株の割合は非常に高く、MDRABも高頻度で分離された。次のステップとして、薬剤感受性遺伝子の解析を行い、パルスフィールドゲル電気泳動法により、すべての分離株の水平伝播を調べる予定である。最後に我々は本研究を遂行する上で、多くの交流機会を設け、日中両国の相互理解を更に深めていくことを期待している。

Key Words *Acinetobacter baumannii*, 院内感染, 薬剤耐性, MDRAB, 水平伝播

### 緒 言 :

*Acinetobacter baumannii*は好気性のグラム陰性短桿菌であり、鞭毛を持たず不動性である。大きさは1.0~1.5 X 1.5~2.5  $\mu\text{m}$ であり、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、ブドウ糖を醗酵しない。2010年時点では、アシネトバクター属には少なくとも22の種名と11の遺伝型が確認されている。本菌名は1968年に微生物学者のPaul and Linda Baumann夫妻に由来する。1980年代に病原性を示す種として、*A. baumannii*が認知されるようになった。乾燥には比較的強く土壌など湿潤環境を好み、自然環境中に広く分布する。健康な人の皮膚や腸管にも存在することがあり、動物の排泄物からも分離されることがある。

近年、カルバペネムや第3世代セファロスポリン等の広域 $\beta$ -ラクタム薬、アミノ配糖体およびフルオロキノロンに広範囲の耐性を獲得したMDRABが報告され、日本感染症学会では、

ニューキノロン系のシプロフロキサシン (CPF) (>4 µg/ml)、カルバペネム系のイミペネム (IPM/CS) (>16 µg/ml)、アミノグリコシド系のアミカシン (AMK) (>32 µg/ml)の全てに耐性を示す菌株を、多剤耐性アシネトバクター (MDRA) と定義し、5類感染症の届け出の基準とされている。

癌末期や糖尿病など感染防御能力の低下した患者において、尿路感染症、肺炎や敗血症、手術部位感染症などの起原菌になっている。日本でも多数の病院や医療施設において、集団感染で本菌が注目を浴びつつあり、院内感染の重要な原因となることが認識されている。一方、中国において、院内環境由来*A. baumannii*が高頻度で分離され、本菌による院内感染も報告されている。しかし、病原菌である本菌の薬剤感受性や水平伝播の特徴及び重要な病原因子などについて、データはまだ不十分である。

#### 対象と方法：

中国・上海における市中病院（3施設程度）を訪問し、共同研究の合意を得た上で、共同研究プロトコールを作成した。2012年4月から、2013年3月までに、中国・上海における市中病院において、病院内感染患者及び病院内環境調査より、分離された*A. baumannii*を対象とし、計100株を目標数とした。

協力病院において、診療記録により*A. baumannii*が病原菌と考えられる感染症の患者を対象とし、ケースカードを作成し、分離された*A. baumannii*を保存する。また、前述の病院において、病院内環境調査もを行い、同定された*A. baumannii*を保存し、すべての分離株は中山病院で保管する。環境及び患者由来の*A. baumannii*に対し、臨床上よく用いられる抗生剤への薬剤感受性試験を行う。薬剤耐性株に対し、薬剤耐性の特徴を分子生物学手法で確認し、日本で分離された耐性株と比較する予定である。パルスフィールド電気泳動法を用いて、特に耐性*A. baumannii*の水平伝播を明らかにする。基礎研究のデータを加え、患者ケースカードのまとめを行い、臨床経過および予後についての検討を行う。

#### 結果：

- 1) 現地での見学を行い、共同研究についての打合せをし、共同研究プロトコールを作成した。（図1）
- 2) 本研究において、一部の分離株の薬剤感受性についての解析を行った。データの集計や解析はまだ進行中であるが、現時点において計41名院内感染患者（男：31名、女：10名）から、50株の*A. baumannii*が分離された。患者の平均年齢は61歳（30-86歳）であり、うち21名患者は基礎疾患を有し、5人が亡くなった。死亡原因として、本菌との関連性は不明である。患者分離株のうち、35（70%）株は血液由来であり、5（10%）株は胸水または腹水由来であり、脳脊髄液及び肺組織からもそれぞれ1株が分離され、残りの8（16%）株は深部カテーテルから分離された（図2）。また、院内環境調査もを行い、計21株の*A. baumannii*環境由来株も分離された。薬剤感受性試験の結果により、殆どの臨床株は多数の抗生剤へ耐性を示し（表1）、その内、16（32%）株は多剤耐性株（MDRAB）であることが示唆された。

#### 考察：

今までの結果により、中国の市中病院において、*A. baumannii*は院内感染を引き起す重要な病原菌の一種であることが明らかにとされた。また、耐性株の割合は非常に高く、MDRA Bも高頻度で分離された。次のステップとして、薬剤感受性遺伝子の解析を行い、パルスフ

イーロードゲル電気泳動法により、すべての分離株の水平伝播を調べる予定である。また、今回の調査結果に基づいて、中国における院内感染制御上有効な予防策についても検討する。研究結果は国内外での学会において発表し、かつ国際的雑誌に投稿し、フィードバックする。最後に我々は本研究を遂行する上で、多くの交流機会を設け、日中両国の相互理解を更に深めていくことを期待している。

#### 参考文献：

1. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53 (45): 1063-6. 2004
2. Rahal J. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2: S95-9. 2006
3. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. *IUBM B Life* 63 (12): 1048-54. 2011

図1 現地での見学及び共同研究の打合せ



図2 臨床分離株の内訳について

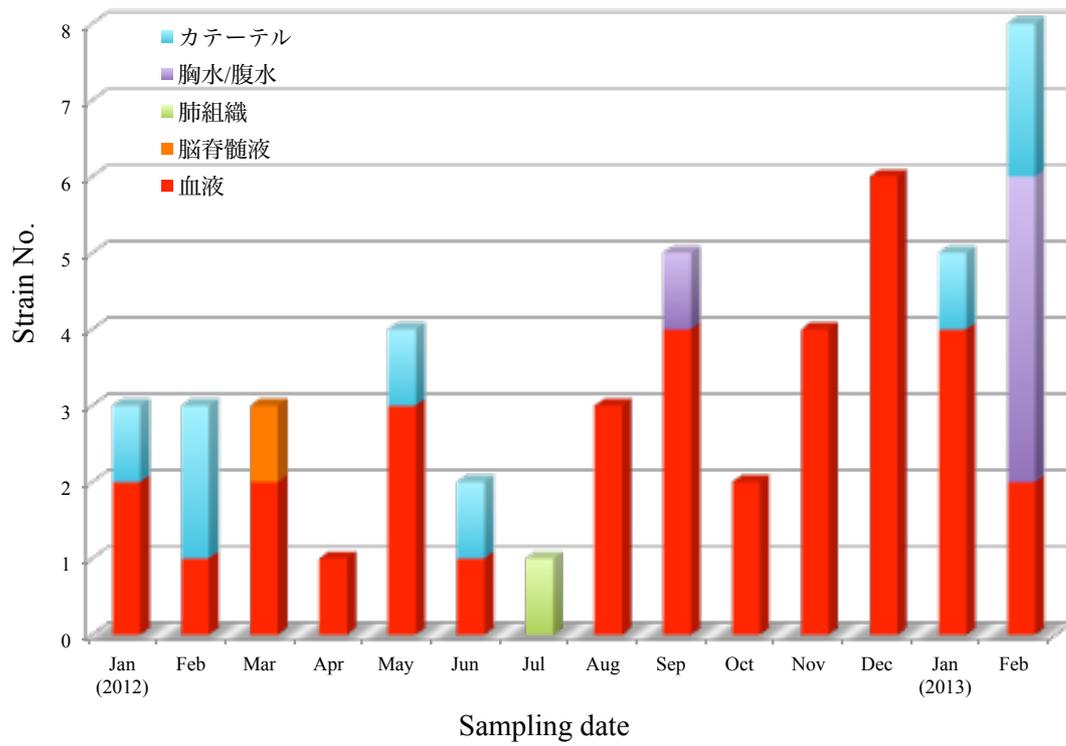


表1 一部臨床分離株の薬剤感受性試験の結果

	Antibiotics MIC <sub>50 (90)</sub>											(μg/ml)	
	AMK	GM	IPM	MEPM	CAZ	CTX	CFPM	PIPC	PL-B	ST	CPFX	LVFX	TC
All strains	>32(>32)	>8(>8)	>8(>8)	>8(>8)	>16(>16)	>32(>32)	>16(>16)	>64(>64)	<0.5(<0.5)	>2(>2)	>2(>2)	>8(>8)	>8(>8)

作成日：2013年3月15日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

平成 25 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調査・共同研究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： 國 土 典 宏   
所属機関名： 東京大学  
所属部署名： 医学部附属病院 職名： 教授  
所 在 地： 東京都文京区本郷 7 - 3 - 1  
電 話： 03-3815-5411 内線： 33339

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

システムバイオロジー技術を駆使した肝細胞癌の病態制御機構の総括的解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 國 土 典 宏	職名： 教授
所属機関名： 東京大学	部署名： 医学部附属病院
中国側研究者氏名： 敖 平	職名： 教授
所属機関名： 上海交通大学	部署名： システム生物医学研究院

4. 当該研究における発表論文等

(1). Zhong YS, Deng MH, Xu RY, Kokudo N, Tang W. Pseudomyxoma peritonei as an intractable disease and its preoperative assessment to help improve prognosis after surgery: A review of the literature. Intractable & Rare Diseases Research. 2012; 1:115-121.

(2). Song PP, Feng XB, Zhang KM, Song TQ, Ma KS, Kokudo N, Dong JH, Yao LN, Tang W.

Screening for and surveillance of high-risk patients with HBV-related chronic liver disease: Promoting the early detection of hepatocellular carcinoma in China.

Biosci Trends. 2013; 7:1-6.

(3). Xia JF, Gao JJ, Inagaki Y, Kokudo N, Tang W. Flavonoids as potential

anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line.

Drug Disco & Ther. 2013; in press.

## 5. 成果の概要

肝細胞癌特有の病態機構をターゲットとした診断技術や化学療法剤の開発が癌の早期発見や進行癌患者の予後改善に有効であると考え、DCP及びc-Metの臨床病理学的解析を実施し、両因子の発現性に関連性があることを示唆した。また、これらの因子の発現を蛍光で検出することで、高感度かつリアルタイムな診断技術、光線力学的治療技術への応用が可能であると考え、ICGを投与した移植癌モデルで検討を実施した。その結果、蛍光物質を利用した高感度診断及び光線力学的治療を検討する *in vivo* 解析系を構築できたと示唆される。

## 6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

本研究における中国側研究者の役割は、DCP及びc-Metの臨床病理学的解析を担当。中でも、両因子の発現性を評価する段階に従事した。さらに、システムバイオロジー技術を駆使した因子の発現評価システムの構築を試みた。

# システムバイオロジー技術を駆使した肝細胞癌の病態制御機構の総括的解析

研究代表者：國土 典宏

日本研究機関：東京大学医学部附属病院・肝胆膵外科学

中国側共同研究代表者：敖 平

中国所属機関：上海交通大学・システム生物医学研究院

**要旨：**肝細胞癌は、外科的切除術の発展などにより予後が改善しつつある癌疾患であるが、罹患者数の増加と進行癌患者に対する化学療法の開発が課題となっている。肝細胞癌の病態悪化にはDCPやc-Metといった特有の因子の関与が示唆されてきたが、臨床上の意義は十分に解明されていない。そこで、肝細胞癌特有の病態機構をターゲットとした診断技術や化学療法剤の開発が癌の早期発見や進行癌患者の予後改善に有効であると考え、DCP及びc-Metの臨床病理学的解析を実施し、癌の病態との関連性を検討した。その結果、DCP及びc-Metの高発現は癌部組織及び周辺非癌部組織の双方で検出された。また、両因子の高発現が同時に検出される症例が有意に高頻度であったことから、両因子の発現性に関連性があることが示唆された。また、これらの因子の発現を蛍光で検出することで、高感度かつリアルタイムな診断技術、光線力学的治療技術への応用が可能であると考え、ICGを投与した移植癌モデルで検討を実施した。肝細胞癌培養細胞由来の腫瘍組織を形成させたマウスにICGを投与したところ、腫瘍組織に集積するICGの蛍光を高感度かつ特異的に検出した。さらに、このICGを集積した腫瘍組織に近赤外光を照射したところ、腫瘍組織の拡大は有意に抑制された。従って、蛍光物質を利用した高感度診断及び光線力学的治療を検討する*in vivo*解析系を構築できたと示唆される。DCP及びc-Metの高発現と蛍光検出技術を融合させることにより、肝細胞癌の病態を評価可能な診断技術や進行した病巣に有効な治療技術の開発が期待される。

**キーワード：**肝細胞癌、c-Met、DCP、診断、治療

## 1. 導入

肝細胞癌は、世界的に罹患者数が増加しており、日本及び中国を含むアジア地域においては特に顕著である。外科的切除術の発展により肝細胞癌患者の予後は改善されつつあるが、癌患者の早期発見や進行癌患者に対する治療に関する技術はまだ開発途上にあり、手術不適応になった患者の予後は悪い状況にある。この臨床上の課題を克服するためには、肝細胞癌の病態機構を解明し、癌が進行する前の早期発見を可能とする診断技術や進行癌

患者の予後改善に貢献する化学療法の開発が求められる。

本研究グループでは、これまでに肝細胞癌に特有の病態機構に着目した臨床病理学的あるいは生化学的研究を実施してきた。肝細胞癌の診断マーカーとして知られるDes- $\gamma$ -carboxyprothrombin (DCP) が、癌部組織だけでなく周辺の非癌部組織でも発現し、その高発現が癌患者の予後の悪化と相関することを見出した。また、培養細胞を用いた基礎医学的研究では、DCPが癌細胞の増殖を促進させる活性をもつことを示し、その働きに癌細胞の細胞膜に発現する肝細胞成長因子受容体c-Metが重要な役割を果たすことを示唆した。従って、これらのタンパク質をターゲットとした診断技術の開発や治療薬の創出などが有効であると考えられた。

肝細胞癌組織を術中にリアルタイムで画像提示し、癌組織の大きさの分析や切除範囲の決定を可能とする技術が当研究グループによって開発された。その技術では、肝細胞癌細胞に取り込まれ、細胞内に長期的に維持されるIndocyanine green (ICG) という蛍光物質を用いている。その特性を利用して、癌組織を高感度に検出することを可能としている。一方、ICGが特定の波長をもつ近赤外光を吸収して熱を発することから、光線力学的な治療法の確立に有用であると考えられた。また、この蛍光標識技術を駆使して上述したDCPやc-Metをターゲットとした癌組織の描出法を構築することにより、癌の病態に基づく診断や治療技術の開発の可能性が期待された。そこで、本研究ではDCP及びc-Metの癌患者由来組織における発現性を組織化学的に解析して、これらの因子と癌の病態との関連性を検討した。そして、ICGを投与したマウス移植癌モデルを用いて、癌の診断及び治療における蛍光描出技術の有用性を*in vivo*の実験系で明らかにすることとした。

## 2. 方法

### 2.1 DCP 及び c-Met の発現性と臨床病理学的解析

肝細胞癌組織 153 例についてホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、抗 DCP 抗体あるいは抗 c-Met 抗体を用いた免疫組織化学的手法による解析を実施した。各種抗原の発現性は、癌部組織及び非癌部組織における局在性を観察すると共に、無作為に選出した 10 区域における陽性細胞の割合を算出して比較解析した。

### 2.2 蛍光ナビゲーションシステムによる肝細胞癌組織の描出

肝細胞癌培養細胞株HuH-7及びHepG2を10%牛血清含有Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地にて培養し、 $5 \times 10^6$ 個の細胞をBALB/cヌードマウスの皮下に移植した。約10日後、移植した癌組織が50~1000 mm<sup>3</sup>となったことを確認した後、ICGを5 mg/mLの濃度で尾静脈から血中投与した。24時間後、蛍光イメージングシステムを用いてICGの癌組織へ

の取り込みを観察した。

### 2.3 近赤外光照射

肝細胞癌培養細胞株HuH-7細胞をDMEM培地にて培養し、 $5 \times 10^6$ 個の細胞をBALB/cヌードマウスの皮下に移植した。約10日後、移植部位に腫瘍組織が形成されたことが確認できたマウスに対してICGを5 mg/mLの濃度で投与し、ICG投与から24時間後に蛍光発光を確認した。なお、同時にICGを投与しない移植癌マウスも作出した。これらのICG投与・非投与の移植癌マウスの腫瘍組織に対して $160 \text{ mW/cm}^2$ の光線密度で3分間近赤外光を照射し、その後3日おきに腫瘍組織の大きさを測定した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 DCP 及びc-Met の発現性と臨床病理学意義の解明

当研究グループでは、肝細胞癌特有の異常タンパク質である DCP が c-Met と協調して肝細胞癌の病態悪化に関与することを培養細胞を用いた基礎医学的解析により示唆した。しかし、肝細胞癌患者由来の組織での DCP 及び c-Met の発現性とその臨床病理学的意義に関しては不明であった。そこで、これらの因子の発現性を免疫組織化学的手法により解析し、肝細胞癌の病態との関連性を検討した。その結果、DCP 及び c-Met の発現は癌部組織において高頻度に検出されたが、非癌部組織においても検出された（表 1）。また、DCP が高発現している症例では c-Met の高発現が高頻度に認められたことから、これらの因子の発現の有無には関連性が示唆された（表 2）。さらに、c-Met の高発現が認められた症例群では、術後の予後が有意に悪化していた。以上の結果から、DCP と c-Met が予後の悪い症例の癌組織において協調的に発現していたことから、肝細胞癌の病態悪化に寄与することが癌患者由来の組織においても示唆された。また、これらの因子が、予後の悪い患者のスクリーニングを目的とした免疫組織化学的診断法の開発に有効であると考えられる。

### 3.2 移植癌モデルマウスを用いた ICG による肝細胞癌組織の描出

ICG は、肝細胞癌患者の肝予備能の診断という目的で臨床医療の場において用いられている。ICG は蛍光物質であり、癌細胞に取り込まれると長期的に維持される性質を有することから、癌組織を高感度に検出することを可能としている。この現象が、移植癌モデルマウスを用いた *in vivo* 条件下においても再現可能であるかを検討する目的で、肝細胞癌組織を形成させたマウスに対して ICG を投与し、蛍光を観察した。その結果、癌細胞腫によって強度は異なるものの、腫瘍組織の位置に ICG 由来の蛍光が検出された（図 1）。一方で、腫瘍組織周辺の非癌部組織は蛍光を示さなかったことから、この蛍光は腫瘍組織において

特異性高く観察された。以上の結果から、ICG の蛍光が、肝細胞癌細胞由来の腫瘍組織の検出に有効であることが、移植癌モデルマウスを用いた *in vivo* 実験でも証明された。この解析系の確立は、次項の ICG の更なる応用に関する研究に必須であるほか、上述した DCP や c-Met をターゲットとした診断や治療技術の開発にも応用可能であると考えられる。蛍光を検出する技術と病態制御に関わる因子の発現を融合させることにより、高感度な新規診断法を構築できると期待される。

### 3.3 ICG 蛍光法を応用した光線力学的治療法の確立

上述したように、ICG は静注後に肝細胞癌組織に特異性高く集積し、腫瘍組織の高感度検出を可能とすることを *in vivo* モデルで示した。そして、ICG は特定波長の近赤外光を吸収して発熱を呈することから、光線力学的な治療に有用であるとされてきた。そこで、この ICG の性質と当研究グループが明らかにした ICG による肝細胞癌組織の描出技術とを融合させることにより、肝細胞癌に対する高い特異性を有する光線力学的治療が可能であると考え、*in vivo* モデルを用いた解析を実施した。ICG の投与によって蛍光を呈した肝細胞癌組織に対して近赤外光を照射して腫瘍の大きさを継時的に観察したところ、照射していない肝細胞癌組織に比べて腫瘍組織の拡大が抑制された (図 2)。また、この効果は ICG を投与していない組織に近赤外光を照射しても誘導されなかった。なお、腫瘍組織周辺の正常組織には、近赤外光照射による顕著な障害は観察されなかった。以上の結果から、ICG は肝細胞癌組織の描出だけでなく、近赤外光照射による光線力学的治療への応用にも有効であることが示唆された。本技術は、ICG と同様の性質を有する物質が肝細胞癌の光線力学的治療法に有効であるか否かの評価に利用できる。

## 総括

本研究では、肝細胞癌組織における DCP と c-Met の高発現が関連性を有することを組織化学的解析により示した。細胞を用いた過去の研究において、DCP が c-Met を介して癌細胞の増殖と浸潤を活性化することが示唆されたことから、その現象が肝細胞癌患者の病態悪化に寄与していることが考えられる。一方、本研究では蛍光物質を利用した肝細胞癌組織の高感度検出と光線力学的治療に関する解析を可能とする *in vivo* 実験系の構築を達成した。DCP や c-Met といった肝細胞癌特有の病態関連因子を蛍光標識する技術、関連因子の発現性に基づく数理プログラムを用いた病態機構予測技術を構築することで、患者個々の癌の病態を評価できる方法の確立が期待される。

表 1. 肝細胞癌患者組織における発現性

Sub-group	DCP n (percent)	c-Met n (percent)
C(+ )NC(+)	15 (9.8%)	36 (23.5%)
C(+ )NC(-)	82 (53.6%)	66 (43.1%)
C(- )NC(+)	5 (3.3%)	8 (5.2%)
C(- )NC(-)	51 (33.3%)	43 (28.1%)
Total cases	153	153
C(+)	97 (63.4%)	102 (66.7%)
NC (+)	20 (13.1%)	44 (28.8%)

C : 癌部組織、NC : 非癌部組織

表 2. 肝細胞癌患者由来組織における DCP と c-Met の発現の関連性

Sub-group	DCP <sub>c</sub> ↔c-Met <sub>c</sub>	DCP <sub>nc</sub> ↔c-Met <sub>nc</sub>	DCP <sub>w</sub> ↔c-Met <sub>w</sub>
DCP(+ )c-Met(+ ) cases	78 (51.0%)	11 (7.2%)	89 (58.2%)
DCP(- )c-Met(- ) cases	32 (20.9%)	100 (65.4%)	30 (19.6%)
DCP(+ )c-Met(- ) cases	19 (12.4%)	9 (5.9%)	13 (8.5%)
DCP(- )c-Met(+ ) cases	24 (15.7%)	33 (21.6%)	21 (13.7%)
Total cases	153	153	153
p value	< 0.0001	0.0054	< 0.0001

DCP<sub>c</sub> : 癌部組織での DCP の発現、c-Met<sub>c</sub> : 癌部組織での c-Met の発現、DCP<sub>nc</sub> : 非癌部組織での DCP の発現、c-Met<sub>nc</sub> : 非癌部組織での c-Met の発現、DCP<sub>w</sub> : 組織全体での DCP の発現、c-Met<sub>w</sub> : 組織全体での c-Met の発現

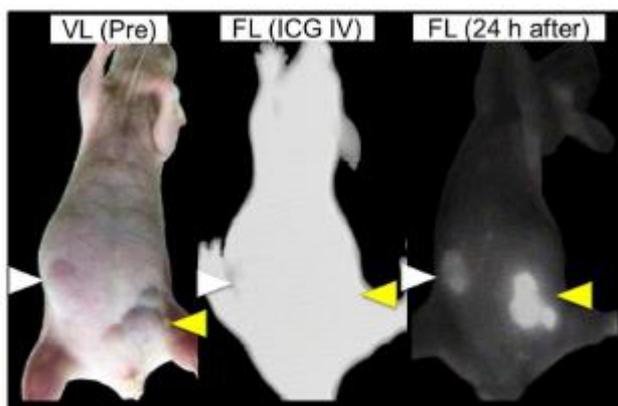


図 1. ICG を投与した移植癌マウスにおける蛍光発光。左側腹部に HuH-7 を移植し (黄矢印)、右側腹部に HepG2 を移植した (白矢印)。ICG 投与直後は全身で蛍光が検出されたが (図中央、FL(ICG IV))、投与 24 時間後では蛍光が腫瘍組織特異的に検出された (図右、FL(24h after))。

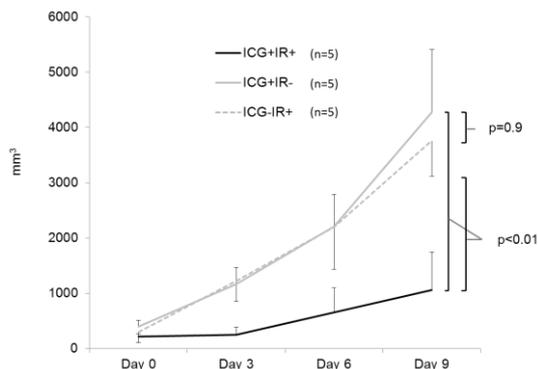


図 2. 近赤外光照射による肝細胞癌組織の拡大の抑制。近赤外光照射から 3 日ごとに腫瘍の大きさを測定したところ、ICG を投与して近赤外光を照射したマウスの腫瘍組織 (ICG+IR+) は、ICG を投与して近赤外光を照射していないマウスの腫瘍組織 (ICG+IR-) 及び ICG を投与せず近赤外光を照射したマウスの腫瘍組織 (ICG-IR+) と比較して 9 日後の体積が有意に小さかった (p<0.01)。

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013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調査・共同研究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： 鈴木康夫  ④  
所属機関名：中部大学  
所属部署名：生命健康科学部 職名：教授  
所在地：愛知県春日井市松本町 1200  
電 話：0568-51-6391 内線：直通

1. 助成金額：1,000,000 円

### 2. 研究テーマ

鳥インフルエンザウイルスのヒト適応変異におけるウイルスヘマグルチニンおよび受容体破壊酵素（ノイラミニダーゼ）の役割に関する研究

### 3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 鈴木康夫

職名： 教授

所属機関名： 中部大学

部署名： 生命健康  
科学部

中国側研究者氏名： 郭 潮潭

職名： 所長

所属機関名： 浙江省医学科学院

部署名： 生物工程  
研究所

### 4. 当該研究における発表論文等

現在、投稿準備中

Chao-Tan Guo, Keming Xu, Wengjun Song, Zhoujing He, C.Y. Cheung, Hoang Thuy Long, Honglin Chen, J.S.M. Peiris, Yasuo Suzuki, and Yi Guan: Receptor Binding Profile of H5N1 Influenza Virus Correlates with Glycosylation of Hemagglutinin and Length of Neuraminidase Stalk. *J. Biochem.*, to be submitted.

## 鳥インフルエンザウイルスのヒト適応変異におけるウイルスヘマグルチニン および受容体破壊酵素（ノイラミニダーゼ）の役割に関する研究

研究者氏名	教授 鈴木 康夫
日本所属機関	中部大学生命健康科学部
中国研究者氏名	所長 郭 潮潭
中国所属機関	中国浙江省医学科学院 生物工程研究所

### 要 旨

1) 現在流行している高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1 亜型、以下 H5N1）の多くは、ノイラミニダーゼ（NA）スパイクの stalk 部位に約 20 アミノ酸が欠落する変異が生じていた。2) HA 上のレセプター結合ポケット近傍の 169 番目のアミノ酸には常に糖鎖が付加していた。3) 158 糖鎖無/NA stalk 長の H5N1 は、主として、ヒト型レセプター（Neu5Ac  $\alpha$  2-6Gal）への結合性を示し、HA 158 糖鎖有/NA stalk 短の H5N1 は、鳥型レセプター（Neu5Ac  $\alpha$  2-3Gal）への結合性を、HA 158 糖鎖無/NA stalk 短の H5N1 は、鳥型（Neu5Ac  $\alpha$  2-3Gal）およびヒト型レセプター（Neu5Ac  $\alpha$  2-6Gal）の両者への結合性を示すことを見出した。4) さらに、自然界分離ウイルスと同様に人工的変異ウイルスでも上記の法則性が成り立つことを確認した。

以上により、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1 亜型）のヒト細胞受容体結合性獲得におけるレセプター破壊酵素（NA）の全く新しい役割の一端を明らかにすることが出来た。

Key Words インフルエンザウイルス、レセプター、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ、受容体破壊酵素、変異

### 緒 言：

A 型インフルエンザウイルスの自然宿主は、カモなどの野生水鳥である。ウイルスは、これらの体内では、低病原性で、水鳥を殺さず、水鳥腸管の細胞膜にあるシアロ糖鎖へ結合して、感染・増殖し、糞と共に湖水中へ排出され、それを飲んだ他の水鳥に感染が広がっていく（1-5）。水鳥の砂嚢は、酸性があまり強くなく、飲み込まれたウイルスは速やかに消化管へと運ばれ、体内に長く留まらず、抗体による圧力もあまり受けないので、変異の速度が遅いとされている。このようにして、大量のインフルエンザウイルスは、水鳥の渡りとともに、世界中に拡散する。1997 年に香港で発生し、ニワトリからヒトへ伝播した H5N1 ウイルスは、100 万羽を越すニワトリを殺すことにより一時的に流行は終息したが、再び 2003 年、中国福建省でヒトへの伝播が発生し、その後、世界各国へ広がっている。2010 年以降、最もヒトへの伝播が多い国はエジプト、インドネシア、カンボジア、中国である。現在、H5N1 は、様々な動物（ブタ、野鳥、ネコ科の動物、イヌ、アライグマなど）（6）へも宿主域を拡げている。

H5N1 を含む全ての A 型インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン（HA、3 量体）およびノイラミニダーゼ（NA、4 量体）スパイクを持つ（図 1）。両者は糖タンパク質で、宿主由来の N-型糖鎖が感染過程で付加される。これらの糖鎖は、HA、NA の生物学的活性発現や、HA、NA の 3 次構造の維持に重要である。さらに、付加された糖鎖は宿主由来であるため、ウイルスが宿主の免疫監視機構から逃れる上で重要な働きをしていると考えられている。HA は、ウイルスが宿主細胞のレセプターシアロ糖鎖へ特異的に結合する上で必須の役割を担っている。HA には  $\alpha$  2-6（ヒト型レセプター）、 $\alpha$  2-3（鳥型レセプター）シアロ糖鎖レセプターへ結合できる主要（1 番目）レセプター結合ポケットと  $\alpha$  2-3（鳥型レセプター）のみしか結合で

きない 2 番目のレセプター結合ポケットが存在する。一方、NA は、ウイルスが出芽により宿主細胞膜から遊離する上で必須の役割を果たす

(1-4)。近年、NA はウイルスの感染初期過程にも関わり、ウイルスの感染細胞内増殖とも深く関わる事が明らかとなっている (7)。我々は、これまでに、下記の点を明らかにしてきた。1) 鳥インフルエンザウイルスとヒトインフルエンザウイルスでは明らかにレセプター認識特異性が異なる (3)。2) これまで H5N1 感染患者 (中国、タイ、ベトナム、インドネシア、エジプトなど) から分離されたウイルスの中でヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異株を見出した (1, 5, 6, 8, 9)。鳥間で速やかに伝播する鳥インフルエンザウイルス (H5N1 を含む) は、宿主細胞膜の「シアル酸  $\alpha$  2-3 ガラクトース含有糖鎖: Sia  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-, 以後  $\alpha$  2-3 と

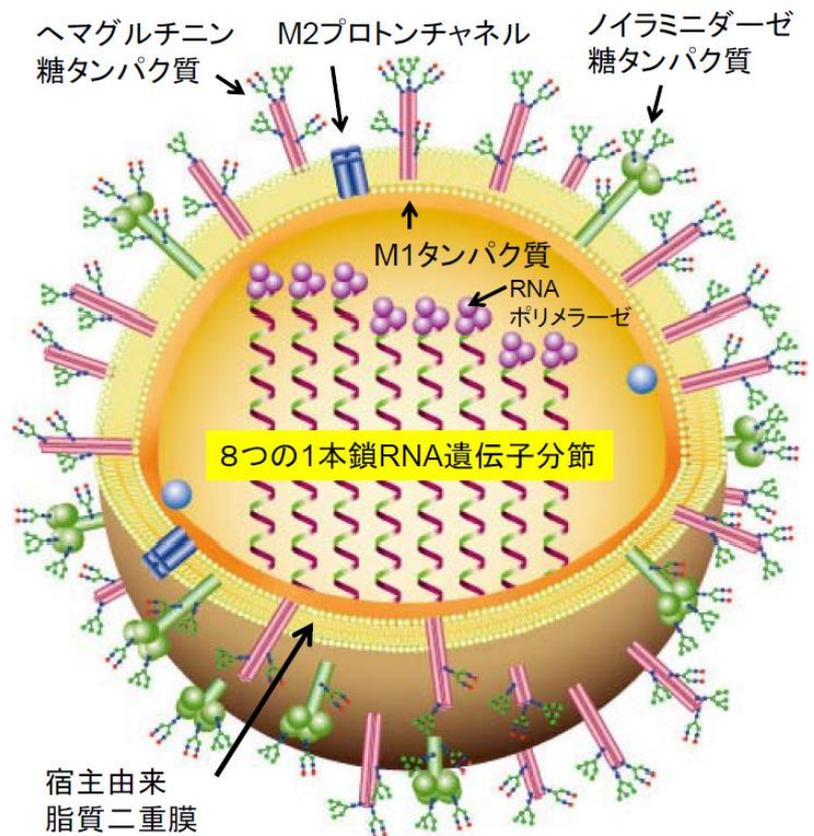


図1 インフルエンザウイルスの構造模式図

略」 (鳥型レセプターと呼ぶ) に優先的に結合する (1-5)。一方、ヒト間で流行する、例えば季節性のヒトインフルエンザウイルスは、「シアル酸  $\alpha$  2-6 ガラクトース含有糖鎖: Sia  $\alpha$  2-6Gal  $\beta$  1-,  $\alpha$  2-6 と略」 (ヒト型レセプター) に優先的に結合する (8, 9)。

#### 対象と方法：

インフルエンザウイルスは発育鶏卵またはMDCK細胞で培養した。ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼの任意のアミノ酸置換は、リバーシジェネティクスの手法により行った。

#### 結果：

(1) 自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス NA の役割  
今回、自然界から分離された H5N1 ウイルスの HA 内 158 番目の Asn における糖鎖付加の有無、さらに、NA の stalk(軸)部位における連続した 20 アミノ酸配列の欠失の有無が、H5N1 ウイルスのヒト型および鳥型レセプターへの結合性に深く関わることを見出した。香港大が所有するヒトおよび鳥 (カモ、ガチョウ、ウズラ、キジ、grey heron, Bar head goose) から分離された天然の H5N1 ウイルス (全 55 株) について、HA および NA 遺伝子、それによるアミノ酸配列、さらにレセプターシアロ糖鎖 ( $\alpha$  2-3,  $\alpha$  2-6) への結合特異性を調べた。その結果、H5N1 ウイルスは、

- 1) 主にヒト型レセプターシアロ糖鎖 ( $\alpha$  2-6) に優先的に結合するウイルス群 (グループ I, 7 株), 2) 鳥型、ヒト型レセプターシアロ糖鎖の両者に結合するウイルス群 (グループ II, 24 株)
- 3) 鳥型レセプターシアロ糖鎖 ( $\alpha$  2-3) へ優先的に結合するウイルス群 (グループ III, 24 株)

が存在することを見出した。

さらに、これらの3つのグループは、下記の特徴によって分類され得ることを見出した。

- 1) グループ I に属する H5N1 (ヒト型レセプターへ優先的に結合できるウイルス) は、158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されていない。また、NA の Stalk に連続した 20 アミノ酸欠失が無く正常の長さである。
- 2) グループ II に属する H5N1 (ヒトおよび鳥型レセプターの両者へ結合できるウイルス) はレセプター結合ポケットと近傍にある 158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されていない。しかし、NA の Stalk に 20 アミノ酸欠失があり、短くなっている。
- 3) グループ III に属する H5N1 (鳥型レセプターへ優先的に結合できるウイルス) は 158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されている。また、NA の Stalk に 20 アミノ酸欠失があり、短くなっている。

また、第一のレセプター結合ポケットの近傍には 158 番目の他に 169 番目の Asn にも *N*-型糖鎖が付加されているが、天然から分離された全ての H5N1 は 169 番目の糖鎖付加を持っており、糖鎖付加の有無は 158 番目の Asn に限られることが判明した。

自然界で分離された H5N1 ウイルスの HA 分子内 Asn158 のグルコシル化の有無、および NA 分子の長短により、H5N1 ウイルスの宿主レセプターへの結合特異性が変わることは、これまで知られておらず、初の観察である。

## (2) 自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス HA および NA の役割の証明

自然界で分離された H5N1 における HA 分子内 Asn158 の糖鎖付加の有無、NA 分子の stalk (軸) 部分の連続 20 アミノ酸欠失の有無 (NA 分子の長短) の組み合わせが、ヒト型レセプターへの結合性変異獲得に重要であることをさらに証明するために、リバーシジェネティクス手法により、8 種類の人工ウイルス (① Asn158-, Asn169-, NA 完全長; ② Asn158-, Asn169+, NA 完全長; ③ Asn158+, Asn169-, NA 完全長; ④ Asn158-, Asn169-, NA 短; Asn158-, Asn169+, ⑤ NA 完全長 Asn158-, Asn169+, NA 短; ⑥ Asn158+, Asn169-, NA 短; ⑦ Asn158+, Asn169+, NA 短; ⑧ Asn158+, Asn169+, NA 完全長) (+, - は糖鎖付加の有無を示す) を作成し、レセプター結合特異性を調べた。その結果、自然界で分離されたウイルスを用いた結果を再現出来ることが判明した。すなわち、② Asn158 の糖鎖付加なし、NA stalk 完全長のウイルスはヒト型レセプターへ優先的に結合し、⑤ Asn158 の糖鎖付加なし、NA stalk 短のウイルスは鳥およびヒト型レセプターの両方へ結合、さらに⑦ Asn158 糖鎖付加あり、NA stalk 短のウイルスは、鳥型レセプターへ優先的に結合した。また、HA 分子内 Asn169 の糖鎖付加の有無は結果に影響を及ぼさないことも確認された。以上により、自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス HA および NA の役割が再現性良く証明された。

### 考 察 :

以上、本研究により、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) のヘマグルチニン HA 分子内 Asn158 の糖鎖付加の有無、および NA 分子内 stalk (軸) 部位の連続 20 アミノ酸欠失の有無が、H5N1 ウイルスの鳥型レセプター ( $\alpha 2-3$ ) 結合特異性からヒト型レセプター ( $\alpha 2-6$ ) 結合特異性へのフェノタイプ変異をもたらすことが初めて明らかとなった。これまで、H5N1 を含むインフルエンザウイルスのレセプター結合特異性は、HA 分子内アミノ酸置換のみによるとされていたが、今回、NA stalk のアミノ酸欠失という NA の構造、機能にも関わることを初めて明らかにした。現在、流行している H5N1 の多くは⑤および⑦のタイプであり、今のところ②のヒト型レセプターへ優先的に結合出来る変異ウイルスは分離されていない。今後は、自然界における②タイプの H5N1 ウイルスの出現を監視することが重要である。

### 参考文献 :

- 1) Suzuki, Y. : *Chang Gung Med. J.*, 32, 258-263 (2009).

- 2) Sriwilaijaroen, N., Suzuki, Y. : Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc. Japan Academy Ser. B, Physical and biological Sciences* 88 (6) 226-249 (2012).
- 3) Suzuki, Y.: Sialobiology of influenza -Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses- *Biol. Pham. Bull.*, 28 (3) 399-408 (2005).
- 4) Suzuki, Y.: Highly pathogenic avian influenza. *J. Disaster Res.*, 6 (4), 398-403 (2011).
- 5) Watanabe, Y. *et al.*: Acquisition of Human-Type Receptor Binding Specificity by New H5N1 Influenza Virus Sublineages during Their Emergence in Birds in Egypt. *PLoS Pathogens*, 7, issue 5, e-1002068 (2011).
- 6) Nidom, C.A. *et al.*: Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 1515-1523 (2010).
- 7) Suzuki, T. *et al.*: Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. *J. Virol.*, 79, 11705-11715 (2005).
- 8) Auewarakul, P. *et al.*: An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J. Virol.*, 81, 9950-9955 (2007)
- 9) Le, Q.M. *et al.*: Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*, 437, 1108 (2005).

#### 謝辞

本研究は、財団法人日中医学協会の助成を受けたものであり、ここに深く感謝の意を表します。

作成日：2013年 3月5日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 2 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究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： 左 一八



所属機関名： 静岡県立大学

所属部署名： 薬学部

職名： 准教授

所在地： 静岡市谷田 52-1

電話： 054-264-5720

内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

### 2. 研究テーマ

受容体糖鎖構造に基づくウイルス機能阻害剤探索

### 3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 左 一八

職名： 准教授

所属機関名： 静岡県立大学

部署名： 薬学部

中国側研究者氏名： 郭 潮潭

職名： 所長

所属機関名： 浙江省医学科学院

部署名： 生物工程研究所

### 4. 当該研究における発表論文等

本研究は、Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 424, 573-578 (2012)に

紙上発表した。

## 受容体糖鎖構造に基づくウイルス機能阻害剤探索

研究者氏名	准教授 左 一八
日本所属機関	静岡県立大学薬学部生化学分野
中国研究者氏名	所長 郭 潮潭
中国所属機関	浙江省医学科学院生物工程研究所

### 要旨

Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖に対する新規単クローン抗体 (HYB4) を樹立し、その性状解析を行った。HYB4 の詳細な糖鎖認識性を明らかにし、HYB4 を用いた生化学的な Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖検出法を確立した。HYB4 はインフルエンザウイルス (IFV) の細胞表面への結合を有意に阻害したことから機能的 IFV 受容体 (Sia $\alpha$ 2-3) 糖鎖を検出できることが示唆された。ヒト IFV について、その受容体合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとして大腸菌を宿主として、より効率的かつ簡便に発現・精製できる系を確立した。

デングウイルス (DENV) についてウイルスの結合性、感染阻害効果を示す HNK-1 糖鎖分子の合成酵素遺伝子を細胞に導入した HNK-1 糖鎖高発現細胞において DENV の有意な感染性の上昇が観察された。HNK-1 が DENV の機能的受容体であることが示唆された。ウイルス機能制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 感染阻害活性を有する化合物として 3-O-硫酸化グルクロン酸を創出した。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコに強力な抗 DENV 活性を見出した。

**Key Words** インフルエンザウイルス、デングウイルス、糖鎖受容体、抗ウイルス剤

### 緒言：

感染初期におけるウイルスと宿主受容体糖鎖分子との相互作用の解明は、ウイルス感染による病態形成を理解するうえで必須である。インフルエンザウイルス (IFV) やデングウイルス (DENV) 感染症は、自然宿主動物からヒトへとウイルスが異種間感染することで引き起こされる。これまで宿主糖鎖分子のウイルス感染における機能、ウイルス異種間感染機構、さらには病態形成の分子機構は十分に解明されていない。ウイルス感染時、宿主側因子に作用する抗ウイルス剤は臨床応用されていない。

IFV の宿主認識において、シアル酸含有糖鎖 (シアロ糖鎖) は宿主特異的受容体として機能していると考えられている。IFV の表面には、ヘマグルチニン (Hemagglutinin, HA) と、ノイラミニダーゼ (Neuraminidase, NA) の 2 種類の糖タンパク質がスパイク状に突出しており、A 型 IFV は HA と NA の抗原性に基づいて多くの亜型 (HA は 1~16 種類 6)、NA は 1~9 種類 7) に分類される。HA は宿主細胞膜上に存在し受容体として機能する特定のシアロ糖鎖の認識、結合および膜融合による細胞内侵入に関わる [1]。IFV 受容体認識において、シアル酸の結合様式が深く関与している。ヒト IFV は  $\alpha$ 2-6 結合型のシアロ糖鎖 (Sia $\alpha$ 2-6 糖鎖) に対して高い親和性を持つ一方、トリ IFV は  $\alpha$ 2-3 結合型のシアロ糖鎖 (Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖) に対して高い親和性を持つことが明らかとなっている [2-4]。さらに IFV 受容体認識はシアル酸が結合する内部糖鎖構造によっても影響を受けることが近年報告されている [4, 5]。このような結合親和性の違いがトリーヒト間などの異種間感染において重要になると考えられている [6]。IFV 受容体の分子実体、受容体の生体内分布など、感染過程に関与する因子の網羅的探索研究は、新たな作用機序を有する抗インフルエンザ薬の開発など予防対策の物質的基盤を確立するうえで重要な知見となることが期待されている。

Flavivirus 属のデングウイルス (DENV) は広範囲におけるエピソードの引き金となる病原体であり、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) により人から人へ媒介される。熱帯・亜熱帯地域を中心に公衆衛生上の重要な問題となっている [7]。毎年 1 億人がデング熱を発症し、そのうち 50 万人がデング出血熱を発病している。DENV の感染者数は拡大の一途を示している。発展途上国における、人口の都市部への集中増加、温暖化による媒介動物の生息地域の拡大、航空機に代表される交通の発達など種々の要因により、世界的な流行が危惧されている [8]。DENV には 1~4 型の 4 つの血清型があり、いずれの血清型の感染によっても同様の感染症状を示すため、病態から感染した血清型を推定することはできない。初感染時、患者体内には同型に対する中和抗体は産生されるが、他型に対する交叉防御免疫が成立しない。そのため、他の血清型による再感染時の免疫応答がデング出血熱の発生リスクを上昇させていると考えられている [9]。その疫学的な複雑さから、病態の解明、ワクチンの開発が非常に困難である。現在、特異的な治療法もなく、対症療法が中心である。

これまでに chondroitin sulfate E (CSE) や heparin などの硫酸化グリコサミノグリカン分子がデングウイルスの宿主への結合・侵入に関わると予想されている。これらの物質は強力な感染阻害活性を示すことから、DENV 感染阻害、結合性を示す硫酸化糖鎖分子には、受容体活性を保持した共通の糖鎖構造が存在していることが推測されている。グリコサミノグリカンは直鎖状高分子多糖であり、繰り返し 2 糖単位に結合した硫酸基の数とその結合位置の違いにより、構造に多様性を有する硫酸化糖鎖分子である。

本研究では宿主受容体糖鎖分子の構造とそれを生合成する糖転移酵素 (GT) に着目して、感染初期における宿主側因子の性状を明らかにすることで、異種間感染および病態形成機構の解明を目指すとともにウイルス機能阻害剤となる物質の探索・同定を目的とした。

## 対象と方法：

1) IFV 受容体に対する単クローン抗体の作製・性状解析および IFV 受容体探索への応用：

Sia  $\alpha$  2-3 糖鎖構造を有する糖脂質 (Sia  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc  $\beta$  1-1' Cer) を免疫原、*Salmonera Minnesota* R595 株の菌体膜をアジュバントとして C3H マウスに免疫した。定法により得られたハイブリドーマの培養上清をスクリーニングして、抗体陽性クローン HYB4 を取得した。HYB4 の詳細な反応特異性を確認した。さらに HYB4 を用いた Sia  $\alpha$  2-3 糖鎖検出法として、ELISA、Western blotting、Flow cytometry、細胞染色法を検討した。従来 Sia  $\alpha$  2-3 糖鎖検出プローブとして利用されていたレクチンとの糖鎖反応性の比較を行うことで、HYB4 の Sia  $\alpha$  2-3 糖鎖検出プローブとしての有用性の評価を行った。

2) ヒト IFV 受容体生合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子の取得、および組換え体酵素の発現：

ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリーから PCR 法により、ST6Gal I の cDNA (NCBI, GenBank Accession Number, BC031476) を取得した後、制限酵素 *EcoRI* で処理し、細胞質領域および膜貫通領域を除去することで可溶化体 ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子を得た。この遺伝子を低温で高いタンパク質発現効率を有するコールドショックベクター、pCold TF にクローン化、大腸菌へ導入し、ヒト ST6Gal I 発現大腸菌を作製した。作製したクローン化 hST6Gal I 大腸菌を用いて、温度、添加剤、培養時間などの誘導条件を検討することにより酵素タンパク質発現を行った。さらにキレートカラムを用いた酵素タンパク質の精製を行った。

3) DENV 受容体合成酵素遺伝子高発現細胞の樹立と性状解析：

HNK-1 合成酵素遺伝子 GlcAT-P を COS-7 細胞にトランスフェクションすることにより HNK-1 高発現細胞を取得した。対照として遺伝子を含まない pIRES ベクターをトランスフェクションした。これらの細胞表面における発現は Flow cytometry および Western blotting 法により確認した。これらの細胞に対する DENV の感染性を定法に従って Focus forming assay により評価した。

4) 低分子糖誘導体設計・合成および薬用・食用共通素材であるキノコの抗デングウイルス感染阻害効果の評価：

glycosaminoglycan を構成する硫酸基を持つ低分子糖鎖誘導体の構造活性相関解析からデザイン、化学合成合成された低分子硫酸化糖誘導体の DENV 感染阻害効果を Focus forming assay により評価した。また、16 種類のキノコの抽出物について ENV 感染阻害効果を Focus forming assay により評価した。

**結果：**

1) IFV 受容体に対する単クローン抗体の作製・性状解析および IFV 受容体探索への応用：

新規 Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖検出プローブとして単クローン抗体 (HYB4) を確立した。本抗体は抗糖鎖抗体ではまれな IgG3 クラスの抗体であった。HYB4 は、IFV 受容体構造である Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R を特異的に認識した。本抗体は、細胞表面にあるシアロ糖鎖を認識できること、さらに IFV の結合を有意に阻害できることが明らかとなった (図 1、2)。

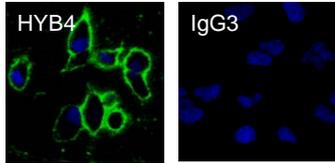


図1. HYB4によるA549細胞の免疫染色

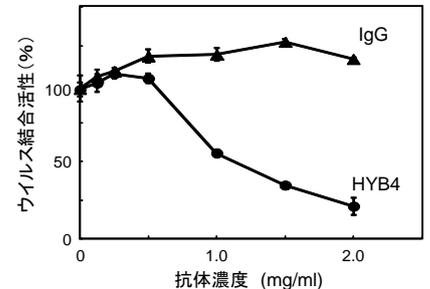


図2. HYB4によるIFVのA549細胞表面への結合阻害

2) ヒト IFV 受容体生合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子の取得、および組換え体酵素の発現：

ヒト IFV 受容体合成酵素 ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとって大腸菌で発現を行った。目的タンパク質の誘導時間の検討の結果、15 $^{\circ}$ C、24 時間のタンパク質誘導時間で目的タンパク質の発現量が増加することが明らかとなった (図 3)。同様の誘導条件で、従来用いていた pMAL-p2x vector を用いるタンパク質発現系との比較を行ったところ、今回用いた方法は従来の方法よりはるかに目的タンパク質の発現量が多いことが確認された。

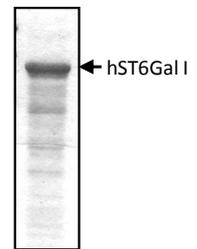


図3. 組換え体hST6Gal I CBB染色

3) DENV 受容体合成酵素遺伝子高発現細胞の樹立と性状解析：

Western blotting により、GlcAT-P 遺伝子導入 COS-7 細胞で HNK-1 糖鎖が合成されたことが確認された。また、Flow cytometry の結果から、合成された HNK-1 糖鎖は細胞表面に発現されていることが確認された。このとき、heparan sulfate や chondroitin sulfate など、他の糖鎖分子の発現量への影響は認められなかった。DENV 感染性を調べた結果、GlcAT-P 遺伝子導入 COS-7 細胞で有意に菅先生の上昇が観察されたことから、HNK-1 糖鎖が細胞表面上で受容体として機能していることが示唆された。

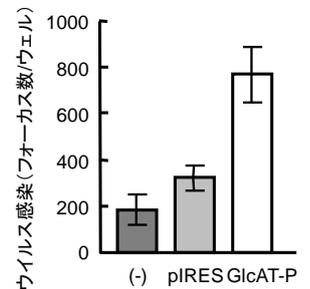


図4. HNK-1高発現細胞におけるDENV感染性の変化

4) 低分子糖誘導体設計・合成および薬用・食用共通素材であるキノコの抗 Dengue ウイルス感染阻害効果の評価：

糖鎖機能発現制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 特異的に相互作用を示す共通構造から、硫酸化グルクロン酸が推定された。種々の硫酸化グルクロン酸誘導体を化学合成し、阻害活性調べた。その結果、3-O-硫酸化体に阻害活性が認められた。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコ抽出液から抗 DENV 活性を探索した。その結果、オオヒラタケの熱水抽出物中に強力な Dengue ウイルス感染阻害活性を見出した。日本脳炎ウイルス感染を阻害しなかったことから特異的な阻害効果であることが示唆された (図 5)。

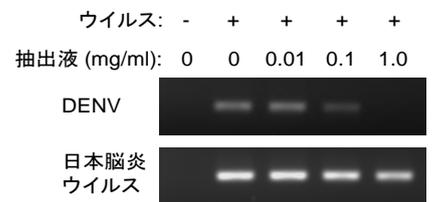


図5. オオヒラタケ抽出液によるDENV感染阻害

**考察：**

本研究では、Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖に対する新規単クローン抗体 (HYB4) を樹立し、HYB4 を用いた生化学的な Sia $\alpha$

2-3 糖鎖検出法を確立した。HYB4 はトリ型インフルエンザウイルス (IFV) の細胞表面への結合を有意に阻害した。トリ→ヒトへの異種間感染機構を理解するうえで、トリ型 IFV 受容体分子のヒトでの局在性を明らかにする必要がある。本抗体は IFV の異種間感染機構の解明に大きく寄与することが期待される。ヒト IFV について、その受容体合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとって大腸菌を宿主として、より効率的かつ簡便に発現・精製できる系を確立した。本酵素を用いることによりヒト IFV 受容体糖鎖を有する様々な誘導体の効率的かつ大量合成が期待される。

デングウイルス (DENV) についてウイルスの結合性、感染阻害効果を示す HNK-1 糖鎖分子の合成酵素遺伝子を細胞に導入した HNK-1 糖鎖高発現細胞において DENV の有意な感染性の上昇が観察された。本糖鎖分子は調べたすべてのウイルス感受性細胞に発現している一方、感染非感受性の細胞株には発現していないことなどの知見から、機能的な DENV 受容体である可能性が示された。今後、ヒトの組織における本糖鎖分子の発現を調べることにより、デングウイルスの病態形成の機序の解明が進むものと考えられる。ウイルス機能制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 感染阻害活性を有する化合物として 3-O-硫酸化グルクロン酸を創出した。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコに強力な抗 DENV 活性を見出した。DENV の吸着に関わる糖鎖構造を明らかにすることは、DENV の宿主認識メカニズムを解明に重要であり、今回創出した化合物は抗 DENV 薬開発に繋がるリード化合物となることが期待できる。また、生薬・食用資源であるキノコから熱安定性の抗デングウイルス活性が見出されたことから、本資源は熱帯地域において有用な生薬製剤として利用できる可能性がある。

#### 参考文献：

1. Wiley, N. C., Skehel, J. J. 1987. The structure and function of the HA membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56, 365-394.
2. Rogers, G. N., Paulson, J. C. 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127, 361-373.
3. Rogers, G. N., Pritchett, T. J., Lane, J. L., Paulson, J. C. 1983. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* 131, 394-408.
4. Suzuki, Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28, 399-408.
5. Hidari, K. I., Murata, T., Yoshida, K., Takahashi, Y., Minamijima, Y. H., Miwa, Y., Adachi, S., Ogata, M., Usui, T., Suzuki, Y., Suzuki, T. 2008. Chemoenzymatic synthesis, characterization, and application of glycopolymers carrying lactosamine repeats as entry inhibitors against influenza virus infection. *Glycobiology* 18, 779-788.
6. Beare, A. S., Webster, R. G. 1991. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 119, 37-42.
7. Weaver, S. C. and Barrett, A. D. 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol.* 2, 789-801
8. WHO website <http://www.who.int/en/>
9. IDSC (Infectious Disease Surveillance center) 国立感染症研究所 感染情報センター website <http://idsc.nih.go.jp>

注：本研究は、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 424, 573-578 (2012) に掲載。

作成日：2013年3月2日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013 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調査・共同研究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： 井 上 孝



所属機関名： 東京歯科大学

所属部署名：臨床検査病理学講座 職名：教授

所 在 地：千葉県千葉市美浜区真砂 1-2-2

電 話：043-270-3704 内線：直通

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

歯牙形成におけるシグナルカスケードの解析と生体外による歯牙硬組織、  
歯牙再生に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 井上 孝

職名：教授

所属機関名：東京歯科大学

部署名：臨床検査病理学講座

中国側研究者氏名： 白 玉娣

職名：講師

所属機関名：第四軍医大学口腔医院

部署名：小児歯科

4. 当該研究における発表論文等

---

Bone. 2011; 48 (6): 1417-1426 で発表以降はなし

---

---

---

— 日中医学協会助成事業 —

歯牙形成におけるシグナルカスケードの解析と生体外による歯牙硬組織、歯牙再生に関する研究

研究者氏名	教授 井上 孝
日本所属機関	東京歯科大学臨床検査病理学講座
共同研究者	松坂賢一
中国研究者氏名	講師 白玉娣
中国所属機関	第四軍医大学口腔医院小児歯科

**要 旨**

再生医療の中で、三次元構造を持つ組織・臓器の生体外再生は難しく、その為に組織工学の応用が重要である。本プロジェクトでは、組織工学のための、足場の検討、そして歯牙形成に関与する未分化な間葉系細胞の抽出と、シグナルを起こすタンパクの検討を行うことを目的としたが、日中間における国際的問題のため、来日ができず研究は準備段階で終わってしまった。

**Key Words** 間葉系細胞, 足場, シグナル, 歯牙形成, 組織工学

**緒 言 :**

歯牙の再生には、上皮・間葉の相互作用が関係している。発生期歯牙の上皮細胞と間葉系細胞を分離採取し、増殖させ、コラーゲンゲル内に戻すと歯牙が発生するという報告はある。しかし、未だ生体外で細胞を用いて歯牙を再生させたという報告は少ない。本研究では、再生に使用する幹細胞を歯牙発生期の組織より抽出し、さらに適切な足場と成長因子を加えて、三次元構造を持つ再生歯を作ることであった。

**対象と方法 :**

対象はまず、抗体の多いラットを用いて、生後2週間までの臼歯の未完成歯牙を採取して、細胞を分離培養する。その分離した培養の株を解析し、未分化なものを選択する。また同時に、足場となる物質の検討と改良を加え、その足場に未分化な間葉系の細胞に、分化・増殖・成長因子を加え検討する。

**結 果 :**

現在、歯牙発生時の細胞を分離培養し、様々な抗体を用い、免疫組織化学的に検討し、未分化な株の存在を検討している。

**考 察 :**

日本における準備は以上で、白先生来日によりその先の目的を達成する予定であった。

**参考文献 :**

1. Bai Y., Matsuzaka K., Inoue T, et al. Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells. Cell Tissue Res., 342: 221-231, 2010.
2. Bai Y., Matsuzaka K., Inoue T, et al. Cementum- and periodontal ligament-like tissue formation by dental follicle cell sheets co-cultured with Hertwig's epithelial root sheath cells. Bone, 48: 1417-1426, 2011.

作成日 : 2013年 3月 4日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

平成 25 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調査・共同研究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： 八若保孝  
所属機関名： 北海道大学大学院歯学研究科  
所属部署名： 口腔機能学講座 職名： 教授  
小児・障害者歯科学教室  
所在地： 札幌市北区北 13 条西 7 丁目  
電話： 011-706-4290 内線：



1. 助成金額： 484,996 円

2. 研究テーマ

機能性ナノ材料および生体化学物質を応用した新しい修復材料の応用と評価

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 八若保孝

職名： 教授

所属機関名： 北海道大学大学院歯学研究科

部署名： 口腔機能学講座

小児・障害者歯科学教室

中国側研究者氏名： 趙 璋

職名： 教授

所属機関名： 中山大学附属口腔医院

部署名： 小児歯科学

4. 当該研究における発表論文等

なし。

## 機能的ナノ材料および生体化学物質を応用した新しい修復材料の応用と評価

研究者氏名	教授 八若 保孝
日本所属機関	北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 小児・障害者歯科学教室
共同研究者名	星野 恵
中国研究者氏名	教授 趙 璋
中国所属機関	中山大学附属口腔医院小児歯科学

### 要 旨

齲蝕現象の要因の一つに歯科診療における初期齲蝕小窩裂溝填塞処置（以下：シーラント）の普及があげられる。このシーラントには、レジン系シーラント（従来型）とガラスアイオノマーセメント系シーラントが広く臨床応用されている。しかし、それぞれのシーラントには長所、短所が存在しており、万能なものではない。このような背景の中で、改良型としてS-PRGフィラー含有レジン系シーラントが開発された。本研究は、文化、気候、生活習慣などが異なる2地点（日本と中国）での同じ条件での臨床応用における予後観察を行うことにより、S-PRGフィラー含有レジン系シーラントおよびガラスアイオノマー系シーラントの長期的な効果を評価すること、ならびにS-PRGフィラー含有レジン系シーラントの基礎的な特徴を明らかにした。

材料は、S-PRGフィラー含有シーラント（ビューティーシーラント（松風社）：BS）とガラスアイオノマー系シーラント（Fuji III LC（GC社）：LC）を用いた。基本的に、左右同名歯にそれぞれのシーラントを填塞することで、同一被験者での比較を可能とした、また、臨床応用する2地点を日本の札幌市と中国の広州市とし、両国の担当者が、術式および予後調査の基準を定め、臨床応用を実施した。また基礎的研究では、上記2種のシーラントに加え、従来型（ティースメイトF1（クラレ社）：TM）も含めて、歯質接着強さ、フッ素徐放性、酸緩衝能について調べた。

結果として、臨床応用に関しては、現在、症例が増加してきており、予後調査を継続する予定である。現在のところ、予後不良例は認めていない。基礎的研究では、歯質接着強さについては、従来型より小さい傾向が認められたが、接着という概念からは、期待する範囲内であった。フッ素徐放性は、従来型より多くのフッ素徐放性を示したが、豊富なフッ素徐放性を示すガラスアイオノマーセメント系シーラントには及ばないものであった。酸緩衝能については、材料の周囲のpHの変化から、使用するシーラントとガラスアイオノマーセメント系シーラントは有効な酸緩衝能を期待できることが示された。

以上のことから、基礎的な特徴からBSは、脱離の可能性、シーラント材辺縁での齲蝕抑制効果などが考えられ、長期観察において、この点を明確にする必要があることが示唆された。現在経過観察を行っている症例については、この点を中心に長期観察を継続する予定である。

**Key Words :** 従来型レジン系シーラント, グラスアイオノマー系シーラント, S-PRGフィラー, 長期経過観察

### 緒 言 :

我が国では、小児期における齲蝕の減少が顕著になってきている<sup>1)</sup>。この要因の一つに、歯科診療における初期齲蝕小窩裂溝填塞処置（以下：シーラント）の普及があげられる。このシーラントは、当初接着性レジンの応用によるレジン系シーラントのみであった。しかし、従来型のレジン系シーラントにおいては、そ

の長期観察例から、①エナメルエッチング処理が必要であり、幼若永久歯や乳歯の歯質にダメージを与える可能性がある。②歯質強化に関するフッ素徐放性を有していない。③湿潤状態に弱く、ラバーダム防湿が必要である。④咬合力によるシーラント材の辺縁破折や辺縁部での微小漏洩が生じる。⑤シーラント材の辺縁部に④による環境下で齶蝕が生じる。といった短所が認められるようになってきた。そのため、従来型レジン系シーラントの改良が始まり、フッ素徐放機構が組み込まれたシーラントが開発されてきた。しかし、フッ素情報機能は、填塞後からの数時間～数日にとどまり、継続的なフッ素徐放を獲得することはできていない。このような背景から、ガラスアイオノマーセメント系シーラントが開発され<sup>2)</sup>、徐々に臨床での使用頻度が増加してきている。ガラスアイオノマーセメントは、その製造過程から、フッ化物が材料内に存在するため、持続的なフッ素徐放が可能な材料であり、また、化学的歯質接着性を有するため、エナメルエッチング処理を必要としない利点を有している。さらに、従来型レジン系シーラントほど硬くないため、咬合などによる摩耗が生じ、辺縁部の破折や微小漏洩が生じない。このような利点を有してはいるが、煩雑な操作性の問題、歯質接着性があるとはいえ、接着性自体レジン系シーラントに劣ることによる脱落の問題、摩耗によりシーラントの寿命が短くなる問題などが認められている。このように、従来型レジン系シーラントとガラスアイオノマー系シーラントには、それぞれ長所、短所が存在している。

このような臨床的問題に対して両方の利点を有した改良型レジン系シーラントが開発された。このシーラントにはガラスアイオノマーセメントを改良した機能性ナノ材料であるS-PRGフィラーが含有されている。このフィラーの効果には、フッ素徐放性、酸緩衝能、抗菌性などがあると考えられており、研究が進んできている<sup>3,4)</sup>。

本研究では、文化、気候、生活などが異なる2地点、すなわち日本（北海道）と中国（広州）での同条件でのシーラントの臨床応用における予後観察を行うことにより、S-PRGフィラー含有レジン系シーラントおよびガラスアイオノマー系シーラントの長期的な効果を評価することを主たる目的とした。これと並行して、S-PRGフィラー含有レジン系シーラントの基礎的な特徴を明らかにするものである。

なお、生体化学物質を応用した材料については、改良を進めているが、現時点で臨床応用に値するだけの材料ではないため、機能性ナノ材料であるS-PRGフィラーについての研究とした。

## 対象と方法：

材料は、S-PRGフィラー含有シーラント（ビューティーシーラント（松風社）：BS）とガラスアイオノマー系シーラント（Fuji III LC（GC社）：LC）を用いた。シーラントの臨床応用については、一人の被験者に対し、基本的に左右同名歯にそれぞれのシーラントを填塞することとし、同一被験者での比較を可能とした。また、臨床応用する2地点を日本の札幌市と中国の広州市とし、両国の担当者が、術式および予後調査の基準を定め、臨床応用を実施した（図1～3）。

基礎的研究では、上記2種のシーラントに加え、従来型（ティースメイトF1（クラレ社）：TM）を材料として、せん断強さを用いた歯質接着強さ、フッ素徐放性、酸緩衝能について調べた。

## 結果：

臨床応用に関しては、2012年9月下旬からの開始となった。実施が遅れたことに関しては、中国の共同研究者であるZhao教授のアメリカ留学期間と重なった関係で、日程調整に時間を有したためであった。現在、症例が増加してきており、予後調査を継続する予定である。現在のところ、両国において予後不良例は認めない。

基礎的研究では、歯質接着強さについては、試料を作製24時間後のせん断力は、BS群（ $23.4 \pm 4.9$  MPa）とTM群（ $24.1 \pm 4.9$  Mpa）は有意さが認められず、LC群は（ $15.5 \pm 7.0$  MPa）であり、BS群およびLC群との間に有意差が認められた。試料作製3か月後でBS群の強さに著明な減少が認められた（ $16.99 \pm 5.99$  MPa）。しかし、接着という概念からは期待できる範囲であった。

フッ素徐放性については、LC群ははじめ38ppmで徐々に減少し、5ppmで安定した。BS群ははじめ5ppmで徐々に減少し、0ppmに近付いた。TM群ははじめ3ppmでBS群よりも早く減少を示し、0ppmに近付いた。BS群はTM群より多くのフッ素徐放性を示したが、豊富なフッ素徐放性を示すLC群には及ばなかった。

酸緩衝能については、材料の周囲のpHの変化から、充填時はどの材料も約pH4.0を示し、30分経過により、BS群でpH4.8を超え、LC群でpH4.6に上昇した。しかし、TM群では、逆にpHが徐々に減少を示した。BS群とLC群には有効な酸緩衝能を期待できることが示された。

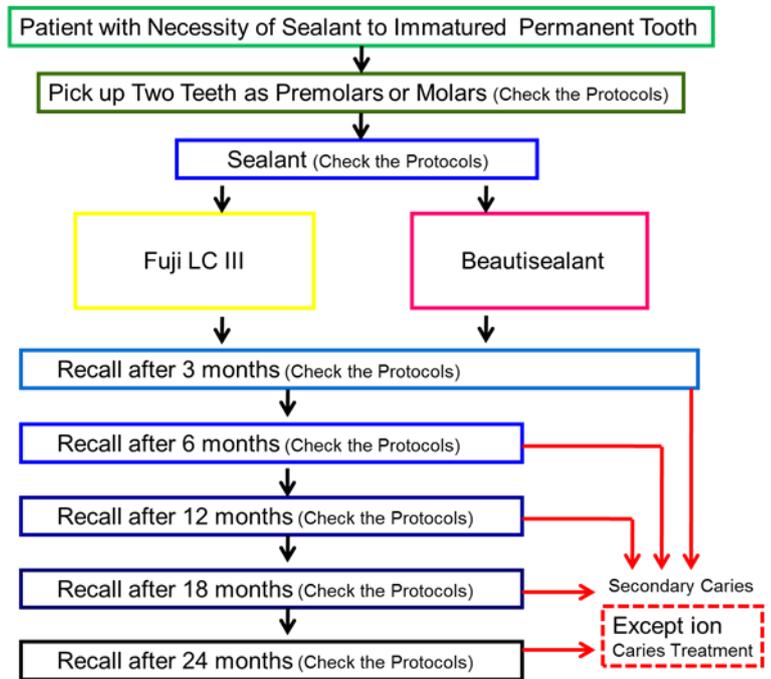


図1 臨床応用の流れ図

考察:

臨床における予後観察に関しては、現時点において残念ながら時間が不足しており、2種のシーラントの差が認められなかった。同様に、異なる地域での差についても明らかにできなかった。

基礎的研究から得た各種シーラントの特徴から、BS群は、従来型より歯質接着性が時間の経過とともに減少する傾向を示したことから、シーラント脱離の可能性が考えられた。また、フッ素徐放性は認められ、TM群より高かったもののLC群に及ばなかった。酸緩衝能については、有効な酸緩衝能を有していることが認められた。以上のことから、従来型の長期観察例で問題になっているシーラント材辺縁での破折や微小漏洩による齲蝕誘発に関して、抑制効果が期待できることが示された。

これらのことから、機能的ナノ材料であるS-PRGフィラーによる改良により、従来型の短所を補う作用を有することが示唆された。

得られた基礎的特徴が、実際の臨床においてどのような効果・影響を示すのかについては、今回の応用症例の長期観察が必要になってくる。経過観察の要点としては、前述したように2種のシーラントの長期的な変化が中心となり、特にシーラント材の脱離、シーラント辺縁の齲蝕発生についての詳細な観察が必要となる。

また、日本と中国の地域差による予後の違いが認められることも視野に入れておくべきである。文化、気

Name: \_\_\_\_\_ Sex: M F Age: \_\_\_\_\_

**First visit** Date: \_\_\_\_\_

Kind of Tooth: \_\_\_\_\_ Operator: \_\_\_\_\_

Caries: Sound CO (only coloration) C1 (only enamel defect) \_\_\_\_\_

Photograph: (+) (-) \_\_\_\_\_

Rubber-dam: (+) (-) \_\_\_\_\_

Tooth Cleaning: with Robinson's Brush with ENAC with NaOCl \_\_\_\_\_

Used Materials: LC III Beautisealant \_\_\_\_\_

**Recall** Date: \_\_\_\_\_

Kind of Tooth: \_\_\_\_\_ Operator: \_\_\_\_\_

Condition of Sealant: Perfect Retention (coloration: (+) (-)) Partial Retention Drop out \_\_\_\_\_

Part of Drop of Sealant (Only Partial Retention) \_\_\_\_\_

Occlusal Surface: Mesial Central Distal Other Fissure: Buccal Lingual \_\_\_\_\_

Photograph: (+) (-) \_\_\_\_\_

Secondary Caries: (+) (-) \_\_\_\_\_

Part of Secondary Caries: Near the Sealant Part of Drop out Under the Sealant \_\_\_\_\_

Convalescence: Good Seal again Seal additionally Caries Treatment \_\_\_\_\_

図2 プロトコール1

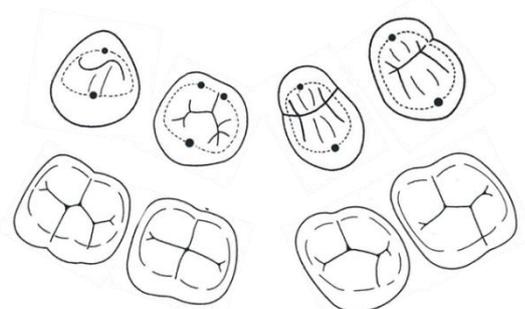


図3 プロトコール2

候、生活などが異なる2地点での予後の差は、地域の影響を加味した歯科材料開発の必要性を示すものである。本研究のような異なる2地点での同じ条件での予後観察を行った材料学研究はほとんど見られない。よって、現在進行している経過観察の長期的継続の必要性は重要であり、引き続き、両国間（2地点間）での情報交換を密にした研究継続を行う予定である。

今回、生体化学物質を応用した材料を研究に使用することができなかった。生体化学物質としては、N-acetylcysteinの応用<sup>5)</sup>を現在検討中である。この材料は、培養系において組織修復能を示すことが知られており、初期齲蝕の歯質に対してどのような効果を示すか、興味あるところである。この点についても、今後改良を重ね臨床応用に持っていく予定である。

#### 参考文献：

1. 厚生労働省：平成23年度歯科疾患実態調査．厚生労働省ホームページ．2012.
2. 堤 智紀, 小島 寛, 加我正行, 小口春久：小窩裂溝封鎖材として開発された光硬化型ガラスイオノマーセメントの保持に関する研究．小児歯科学雑誌, 33:1009-1016, 1995.
3. Genchou M. Kaga M. Hashimoto M. Yawaka Y.: Increase in pH by S-PRG filler containing sealant. 88<sup>th</sup> general session and exhibition of the IADR, abstract No. 4578, Barcelona, Spain. 2010.
4. Kaga M. Masuda J. Hoshino M. Genchou M. Minamikawa H. Hashimoto M. Yawaka Y.: Mechanical properties and ions release of S-PRG filler-containing pit and fissure sealant. Nano Biomedicine, 3:191-199, 2011.
5. Minamikawa H. Yamada M. Deyama Y. Suzuki K. Kaga M. Yawaka Y. Ogawa T.: Effect of N-acetylcystein on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. Journal of Endodontics, 37:637-641. 2011.

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 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調査・共同研究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：片田 範子  
所属機関名：兵庫県立大学  
所属部署名：看護学部 職名：学部長  
所在地：〒651-8588 兵庫県明石市北王子 13-71  
電 話：078-925-9402 内線：



1. 助成金額： 368,073 円

2. 研究テーマ：肥満児童の体質と血圧との関連に関する日中比較研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：片田範子

職名：学部長

所属機関名：兵庫県立大学

部署名：看護学部

中国側研究者氏名：龐書勤

職名：研究室長

所属機関名：福建中医薬大学

部署名：護理学院

4. 当該研究における発表論文等

未だ無

## 肥満児童の体質と血圧との関連に関する日中比較研究(中国側に焦点をあて)

研究者氏名 教授 片田 範子  
所属機関 兵庫県立大学看護学部  
中国研究者氏名 助教授 龐 書勤  
中国所属機関 福建中医薬大学護理学院

### 要旨(600字)

**目的** 日中両国における児童の体質と、生活習慣と体格の関係性を明確し、肥満児童の健康管理側面からの介入研究に必要な要素を抽出する。**方法** 体質に関する質問票と学生の健康度、生活習慣に関する診断検査票を用いて、単純性肥満児が多くなる12-18歳児を対象とし、中国側では260名、日本側では50名程度を調査した。**結果** BMI>24の児は10歳から15歳までの研究協力者の収縮期血圧は標準値より有意に高かった。拡張期血圧は、13歳組のみ標準値より有意に高くなり、その他はいずれも有意差が見られなかった。学級による拡張期血圧の影響も見られ、小学校より中学校、高校より中学校の拡張期血圧は有意に高かった。体質種類の判断に関して、80.4%(209)の対象者はどちらでもない結果になり、2種類以上の病理体質を揃えた雑合質は21名、平和質6名、その他8種類の病理体質はそれぞれ1名~6名までであり、それぞれの体質の年齢は有意差は見られなかった。各種類の体質において、生活習慣の得点は有意差は見られなかった。**結論** 体重は血圧に影響があるが、児童期の体質は分類できない傾向が見られた。

**Key Words:** 肥満, 中医体質, 児童, 看護, 生活習慣

### 緒言(目的や研究背景)

平成20年文部科学省の調査では、肥満度+20%以上の肥満傾向児は、男児10~13.5%、女児8.4~9.8%にもなった<sup>[1]</sup>。県によって、20%までも達した所もある(宮崎県調査、2012年1月31日日新聞朝刊)。昭和52年以来、2~3倍に増えてきた。そして、思春期の肥満は70~80%が成人期に移行している<sup>[2]</sup>。さらに高血圧、糖尿病等の生活習慣病のリスクとの関連がある。中国では、子どもの肥満傾向は、大都市での出現率は男児25%、女児17%も越えた<sup>[3]</sup>。子ども肥満の増加に伴い、生活習慣病の発症の若年化が進んでいる。肥満児の高血圧は、非肥満児の7.7~11倍となる<sup>[4]</sup>。このような子どもの生活習慣病は日中とも子ども看護領域において重大な課題になっている。

生活視点から肥満をコントロールする手段の中に、中国伝統医学(以下は中医学とする)の体質からの方略がある。体質学説はその中の一つである。体質は中医学からの発想であり、遺伝要因と生活要因による形成された特定な形態、生理状態、心理状態の傾向である。生活要因を変えると体質も変わるようになる。その体質は9種類があり、それぞれ平和質、気虚質、陽虚質、陰虚質、痰湿質、湿熱質、瘀血質、気鬱質、特稟質である<sup>[5]</sup>。そのなかに、平和質を除く他の8種類質は病理体質となる。病理体質は未病の段階から身体からの早期兆示で、体質段階の介入は疾病の早期予防につながる。中医学では、8種類の病理的体質はそれぞれ生活習慣に対する食事療法、運動療法、等特定な介入の方法がある。そこで、8種類病理体質に対応したそれぞれの生活習慣を明らかにしておくべきである。病理体質に対して、不良生活習慣を見直すと同時に、体質によって生活習慣を調整する方策もある。

本研究の枠組 肥満と体質は生活習慣に関係があり、両方とも血圧に関係がある。中医学の体質で、肥満が若干種類の病理的体質に分類され、それぞれの体質に対応した血圧によって、危険性の優先順位が大別できる。次の段階では、生活習慣を見直すことと同時に、病理的体質を調整する。それによ

て、生活習慣の矯正、生活習慣の調整という二つの看護の手段で児童肥満を克服し、肥満による血圧や生活習慣病を予防することが期待できる。そこで、日中両国における児童の体質と、生活習慣と体格の関係性を明確し、肥満児童の健康管理側面からの介入研究に必要な要素を抽出することを目的とした。体質、生活習慣との関係性を明確するにあたって、日中とも直面した生活習慣病を克服するために、情報共有、解決方略の探索にお互いに参考できる。

## 対象と方法

単純性肥満児が多くなる 12-18 歳児を対象とする。対象数は中国側では 260 名、日本側では 50 名程度とする。

### 調査用紙

#### 1 中国側

##### 1) 中国語版『学生の健康度、生活習慣に関する診断検査票』<sup>1</sup>

日本語版の学生の健康度、生活習慣に関する診断検査票を用いて、105 名の調査対象者のデータで検証した結果、Cronbach's 係数は 0.86 である。

2) 中国語版体質に関する質問票 (CCMQ) Wong らが開発した体質に関する質問票 (2004to2005) であり、9 の体質について 60 項目からなる標準化された自問式尺度である。

#### 2 日本側

##### 1) 学生の健康度、生活習慣に関する診断検査票<sup>6</sup>

この調査票には、生活習慣行動(14 項目)、運動条件(7 項目)、食生活状況 (14 項目)、休養状況 (4 項目)、睡眠状況 (7 項目)、計 46 項目がある。信頼係数は 0.6-0.8 で、尺度としての信頼性が得られたものである。

##### 2) 日本語版体質に関する質問票 (CJMQ)<sup>7</sup>

中国語版体質に対する質問(CCMQ) の日本語版を開発したものである。Test-re-Test 法で検証した結果ファルファ係数は 0.65-0.79 であり、尺度としての信頼性が得られている。

### 調査方法

#### 1 中国側

校長と担任、保健室の看護師の口頭での同意を得てから、保健室の看護師に健診に BMI>24 生徒に対して、以下のように携帯へ発信してもらいます(保健室の看護師は既往同じ方法で集団健康指導や個別健康指導を実施したことがあります)。

「生活習慣病をよりよい予防するために、現在本保健室にて生活習慣と体質について調査を行っており、研究協力者を募集しています。研究協力者へはこちらの生活習慣調査票と体質調査票を用いて無記名で記入してもらい、体重と身長、血圧を測定させていただきます。調査にあたって、約 20~30 分間がかかります。研究協力者への謝礼として 500 円(人民幣:40 元にあたる)相当の粗品を贈ります。以上のことを踏まえ、ご家族と相談の上自由意思で研究協力者を応募します。」

研究協力者に応募される生徒に、調査についても一度詳しく口頭で説明を行い、口頭同意を得てから研究の対象者となる。調査場所は、保健室もあれば、自宅で記入した子どももあった。

#### 2 日本側

調査のアクセシビリティを考慮に入れ、コンビニエントサンプリングを基本とし、これまで他の研究で協力を得てきた学校(養護学校等を含める)に協力(許可)を求め、12 歳-18 歳の子供を持つ養育者(教職員)を通して対象となる 12 歳-18 歳の子どもへの任意アンケート調査を配布し、無記名での郵送・回答・回収を行った。当初中国側と同様の小児を対象とする予定であったが、倫理的配慮並びにアクセシビリティの困難から、研究対象を確定することに時間がかかり、現在調査票の回収中である。

## 調査期間

中国では、2012.6-2012.12

日本では、2013.3月

## 倫理的配慮

中国と日本側はそれぞれの研究者が所属する施設の研究倫理審査を受け研究の実施を行った。

1) 子どもの意思を尊重し、調査の目的が理解できるように口頭と文書で説明、子どもの同意を得てから調査と測定を実施した。

2) 子どものプライバシーを保護するためにプライバシーを守ることができる場所を確保、調査のデータは本人が特定されないような形で提示した。

3) 本調査の成果は、日本と中国の看護雑誌上で発表する可能性があることを伝え、その際には個人が特定されないよう匿名性を保持すると伝えた。

## 結果

### 1 中国側データ収集の状況

研究協力に応募した381名に調査用紙を配布し、352部が回収できた。有効回答は260部、有効回答率は73.86%であった。

### 2 研究協力者の一般状況

研究協力者の一般状況は表1に示した。

有効回答の協力者は計260名であった。そのうち男生は172名(66.2%)、女生88名(33.8%)、平均年齢14.00(1.95)、年齢分布、学校、学校所在地は表1に示した通りである。

表1 研究協力者の一般状況

		例数	比率	合計
性別	男生	172	66.2	260
	女生	88	33.8	
年齢分布	10歳	6	2.3	260
	11歳	34	13.1	
	12歳	40	15.4	
	13歳	7	2.7	
	14歳	39	15.0	
	15歳	74	28.5	
	16歳	41	15.8	
	17歳	18	6.9	
学校	18歳	1	.4	260
	小学校	37	14.2	
	中学校	182	70.0	
	高校	41	15.8	
所在地	城市	132	50.8	260
	市郊	128	49.2	

### 3 年齢別の血圧とその基準値との比較

年齢別において、それぞれの血圧を同期の標準値を比較し、検定した結果として、10歳から15歳ま

での研究協力者の収縮期血圧は標準値より有意に高くなった。拡張期血圧は、13歳組のみ標準値より有意に高くなり、その他はいずれも有意差が見られなかった(表2)。

表2 年齢別の血圧とその基準値との比較

	BMI	収縮期血圧	拡張期血圧	標準値
10歳(n=6)	23.41(2.31)	105.67(5.13) *	70.33(10.61)	100/66
11歳(n=34)	24.45(3.00)	107.00(13.48) *	68.74(10.09)	102/68
12歳(n=40)	25.23(3.72)	111.13(12.58) **	70.40(10.40)	104/69
13歳(n=7)	25.90(2.76)	125.57(13.56) **	80.71(8.06) *	106/71
14歳(n=39)	24.88(2.49)	117.00(14.18) **	72.90(11.98)	108/72
15歳(n=74)	25.43(2.31)	115.16(14.42) *	72.23(11.86)	110/73
16歳(n=41)	26.13(4.19)	113.71(12.39)	70.63(10.54)	112/74
17歳(n=18)	25.07(3.17)	115.39(9.81)	72.17(10.18)	
18歳(n=1)				

注: \*\* p<0.01, \* <0.05

#### 4 性別、学校等による各変数の得点

表3に示したように、性別、学校、学校所在地毎における体重、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、生活習慣得点を計算し、それぞれ検証した。その結果、性別において、体重、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧は、女生より男生の得点は有意に高かった(p<0.01)。学校別において、体重は小学校、中学校、高校の3者との間にいずれも有意差がみれた(p<0.01)。BMIに関しては、小学校と高校との間に有意差がみれて、中学校と高校との間に有意差が見られなかった。また、学級による拡張期血圧の影響も見られ、小学校より中学校(p<0.05)、高校より中学校(p<0.01)の拡張期血圧は有意に高かった。学校所在地によって、市郊より都市部のほうは収縮期血圧が有意に高かった(p<0.05)、拡張期血圧も有意に高かった(p<0.01)。各項目において、生活習慣の得点は有意差が見られなかった。

表3 性別、学校等による各変数の得点

項目	体重	BMI	収縮期血圧	拡張期血圧	生活習慣	
性別	男生(n=172)	70.60(11.72)**	25.60(3.29)**	115.87(13.01)**	72.98(10.12)**	129.300(22.10)
	女生(n=88)	63.19(7.78)	24.54(2.58)	109.20(13.69)	68.76(12.26)	135.14(20.14)
学級	小学校(n=37)	61.11(11.42)	24.73(4.18)*	115.65(12.45)	78.19(6.77)	134.54(22.40)
	中学校(n=182)	67.74(9.79)	25.05(2.56)**	113.73(14.67)	71.14(11.86)	131.86(20.92)
	高校(n=41)	75.93(9.79)	26.54(3.84)	111.27(8.53)	67.37(7.30)	125.78(23.34)
所在地	都市	68.73 (11.91)	25.45 (3.51)	115.55 (12.62)*	73.80 (10.73) **	130.58 (23.15)
	市郊	67.43 (10.22)	25.02 (2.61)	111.62 (14.29)	69.23 (10.94)	132.00 (19.93)

注: \*\* p<0.01, \* <0.05

#### 4 研究協力者の体質分類

260名研究協力者の体質に関するデータを体質判定ソフトに導入し、判断した結果、9種類の体質に

はちらでもない判断は209名(80.4%)、2種類以上の病理体質を揃えた雑合質は21名、平和質6名、その他8類の病理体質はそれぞれ1名~6名までであった。具体的な分類は表2に示した通りである。また、それぞれの体質の年齢を検証した結果、 $P>0.05$ となり、有意差は見られなかった(表4)。

表4 研究協力者の体質分類

	例数	比率	年齢分布	平均年齢
どちらでもない	209	80.4	10~18	13.97(1.88)
平和質	6	2.3	10~16	13.83(2.04)
気虚質	6	2.3	11~17	13.83(2.04)
陽虚質	1	.4	17	17.00
陰虚質	5	1.9	10~17	13.00(3.24)
痰湿質	2	.8	17	17.00
湿熱質	1	.4	11	11.00
瘀血質	2	.8	10~16	13.00(4.24)
気鬱質	4	1.5	14~17	15.00(1.41)
特稟質	3	1.2	11~15	13.67 (2.31)
雑合質	21	8.1	10~17	14.38 (1.91)
合計	260	100.0		$P=.26$

#### 5 研究協力者の体質における各変数の得点

体質類毎に、それぞれBMI、収縮期血圧、拡張期血圧、生活習慣得点を計算し、検証した。その結果、 $P$ は.51、.45、.06、.76で、いずれも $>0.05$ となった(表5)。

表5 研究協力者の体質における得点

	例数	BMI	収縮期血圧	拡張期血圧	生活習慣
どちらでもない	209	25.29 (3.11)	113.6 (13.73)	71.40(10.79)	130.84 (21.85)
平和質	6	24.46 (3.68)	120.67 (22.80)	78.33(17.64)	126.67 (23.25)
気虚質	6	26.01 (3.23)	103.00 (8.08)	62.33 (4.08)	132.00 (18.43)
陽虚質	1	24.39	104.00	62.00	116.00
陰虚質	5	23.34 (2.75)	115.60 (12.78)	79.00(11.31)	128.80 (22.30)
痰湿質	2	28.09 (7.52)	127.00 (4.24)	84.50 (3.54)	130.00 (25.46)
湿熱質	1	22.66	119.00	89.00	146.00
瘀血質	2	27.32(.099)	115.00(7.07)	81.50(2.12)	155.00(4.24)
気鬱質	4	24.44(1.66)	117.50(6.40)	73.50(7.85)	134.75(15.84)
特稟質	3	23.67(2.35)	108.67(10.26)	66.67(11.55)	126.33(8.33)
雑合質	21	25.25(3.00)	112.48(12.20)	69.71(11.37)	135.14(23.84)
$P$		.51	.45	.06	.76

## 考察

### 1 BMIは血圧に対する影響

研究協力者の血圧を同年齢時期の標準値と比較した結果、10歳から15歳までの収縮期血圧は標準値

より有意に高くなった。それは、BMIの高さが血圧へ影響するのではないかと考える他の研究結果と一致している<sup>[8-9]</sup>。そして、年齢が低い程、BMIからの影響が高いという傾向が本研究の中に見られた。

## 2 性別、学級、地域によるBMIと血圧への影響

本研究では、女生より男生のほうは、体重、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧が有意に高い結果が得られた。体重とBMIは血圧に影響するため、体重とBMIの高い男生のほうは、血圧も高くなったと言える。学年による体重の相違に関しては、低学年の子どもは、より幼いため、体重もなれなりに高学年の子ども達より低くなると考えられる。

学年によるBMIに関しては、小学生と高校生との間に、有意差が見られた。それはサンプリングの偏差によるものなのか、それとも各学年による肥満比率の相違によるものなのかは明らかではない。

学級による血圧の変化に関しては、収縮期血圧は、各学年において、有意差は見られない。にもかかわらず、拡張期血圧のほうは高校生より中学生、中学生より小学生のほうが高いという結果が見られた。植物神経系への調整機能が低学年ほど未熟であるため、収縮期血圧より拡張期血圧のほうは影響されやすいのではないかと考えられる。都市部の子どもの拡張期血圧は都市部を離れた市郊の子どもより有意に高かった。

体質に関しては、80.4%の研究協力者の体質は判断できない状態で、どの種類でも入れない結果になった。この判断の年齢分布は10歳から18歳までの子ども達が含まれた。体質が判断できた8類の病理体質はそれぞれ1名~6名までで、いずれも少なかった。そして、体質判断できない部分とそうでない部分のこどもは年齢に有意差がないと見られた。この時期の子どもは、発達途中なので、体質も形成されている途中ではないかと推測される。類似な文献はまだ見付かれっていないため、今後の課題として、検討していく必要がある。また、今回の報告は血圧と体質との関係を中心に行っているが、それぞれの年齢に応じた生活習慣との関係についてさらに分析を加えることとなる。

## 引用参考文献

1. 平成20年度学校保健統計調査速報: [http://www.mext.go.jp/b\\_menu/toukei](http://www.mext.go.jp/b_menu/toukei).
2. 劉新彦, 北池正. 中学生の適正体重を維持する生活習慣及び自己効力感に関する研究, 千葉看護誌, 2009, 15(1):27-34.
3. 候冬青. 北京児童青少年血圧与肥胖及肥胖类型的关联分析, 北京协和医学院硕士论文, 2010.
4. 方初玉. 学龄儿童单纯性肥胖发生情况及相关因素分析. 科技信, 2009, 15(1):502, 485.
5. 靳琦, 王琦 “辨体 - 辨病 - 辨证诊疗模式” 的理论要素与临床应用, 北京中医药大学学报, 2006, 29(1):41-55.
6. 徳永乾雄, 橋本公雄. 学生健康度、生活習慣に関する診断検査の開発, 健康科学, 2001, 23:53-63.
7. 朱燕波, 折秀樹, 上馬場和夫他. 体質に関するCCMQ質問票日本語版の臨床開発とその妥当性の検証, 日東医誌, 2010:59(6), 783-792.
8. 常虹, 杨柳, 崔琴子. 儿童青少年单纯性肥胖症与血压关系分析, 中国学校卫生, 2008, 29(2):164-165.
9. 高曼, 肖芻霞, 孙寒. 单纯性肥胖儿童血压与体重指数的关系, 中国妇幼保健, 2010, 25(36):5414-5416.

作成日: 2013-3-14

## 財団法人 日中医学協会

2012年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2012年 12月 5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会議について報告いたします。

受給者氏名： 山内 広平  
所属機関名：岩手医科大学医学部  
所属部署名：呼吸器・アレルギー・  
膠原病内科  
職名：教授  
所在地：岩手県盛岡市内丸 19-1  
電 話：019-651-5111 内線：2331



1. 助成金額： 200,000 円

2. 会議名称・テーマ

第62回日本アレルギー学会秋季学術大会

3. 会議の概要

11月29日～12月1日まで大阪国際会議場にて開催された本会において、当科と共同研究を行っている中国・延辺大学の朴紅梅先生と延光海先生に、「ピリン組み替え蛋白のマウス喘息モデルにおけるアレルギー性気道炎症及びリモデリングに対する効果」(第2日目11月30日 演題番号046-2)と題し、研究発表を行っていただきました。

4. 被招聘者概要

- |                |           |
|----------------|-----------|
| 1. 被招聘者氏名：朴紅梅  | 職名：副教授    |
| 所属機関名：延辺大学附属医院 | 部署名：呼吸内科  |
| 2. 被招聘者氏名：延光海  | 職名：副教授    |
| 所属機関名：延辺大学医学部  | 部署名：基礎医学院 |
| 3. 被招聘者氏名：     | 職名：       |
| 所属機関名：         | 部署名：      |