

ASAHIKAWA MEDICAL UNIVERSITY RESEARCH BULLETIN VOL. 15

CONTENTS

Essay	IIZUKA Hajime	2
Commissions		
Development of anti-parkinsonian agents from existing drugs with retentive effect of PI3 kinase/Akt signaling.	TASAKI Yoshikazu	4
therapy of diabetic retinopathy	OOMAE Tsuneaki	13
Submissions		
Factors affecting the decision of Sotsunyu (child-initiated weaning) and Dannyu (mother-initiated weaning)	SASAKAWA Asako • KURODA Midori	18
Doctoral Dissertations		
Species identification and strain typing of dermatophytes by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the ribosomal DNA and polymerase chain reaction analysis of subrepeat elements in the intergenic spacer region of <i>Trichophyton rubrum</i>	Takahashi Ichiro, Fukushima Kazutaka, Miyaji Makoto, Nishimura Kazuko, Asano Kazuhiro, Iizuka Hajime	27
Commissions		
Collaborative Projects Between Asahikawa Medical University and Primary/Secondary Schools in the Asahikawa Area.		
1) "Watch Your Body", A Basic Medical Laboratory Course for Junior High School Students in Asahikawa Area	HARUMI Tatsuo	37
2) Report on a science laboratory: relation between colors and wave lengths	INAGAKI Katsuhiko	41
3) Experiment Course 2014 for High School Students	HIRA Yoshiki	45
2012/2013 Innovative Research in Life Science		
1) Effects of Metformin on Contrast-Induced Nephropathy (part 2)	TAKIYAMA Yumi	49
2) Regulation of the tumor-angiogenesis and -lymphangiogenesis within the tumor microenvironment.	SAITOU Yukihiro	51
3) Finite element analysis about stress fracture after rotational periacetabular osteotomy in Dysplastic hip model	SATOU Tatsuya	53
4) Secondary effect with elevation of testosterone by dutasteride for patients with benign prostatic hyperplasia: effect on bone density	WADA Naoki	54
5) Analysis of pharmacological function of pioglitazone for insulin signaling and lipid metabolism in HepG2 cells	IIDA Shinya	55
6) Identification of intrinsic factor that modulate microglial activation	TANAKA Tatsuhide	56
7) Species Specificity of Mitochondrial Function in Spermatozoa	HARUMI Tatsuo	57
8) Olfactory transport of mitochondrial respiration inhibitor induced neurodegeneration at the olfactory bulb and the substantia nigra	SASAJIMA Hitoshi	58
9) Analysis of protein expression dynamics in primary cultured mouse hepatocytes	FUJII Kiyonaga	60
10) Possible roles of MKK7 in liver regeneration and injury	OOSHIO Takako	62
11) Microsomal cytochrome b5-interacting proteins of visinin-like protein subfamily	OIKAWA Kensuke	64
12) Molecular structure and tissue localization of collectin liver 1	MATSUDA Yasuyuki	65
13) Formaldehyde exposure in food affected intestinal immune system and carcinogenesis	NAKAGI Yoshihiko	66
14) Effects of prenatal yoga on perinatal outcomes	KAWANISHI Yasuyuki	68
15) Analysis of neuronal death mechanism and search for novel therapeutic agent in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	SAWADA Jun	69
16) Genetic analysis of Japanese patients with iron overload by targeted next-generation sequencing	TOKI Yasumiti	71
17) 「Preoperative mGPS is a predictive factor for prognosis in patients who underwent radical operation (R0) for colorectal cancer	TANI Tikayoshi	75
18) A new predictive indicator for prognosis of residual thyroid carcinoma on I-131 whole-body scintigraphy	NAKAYAMA Michihiro	76
19) Evaluation of IndoCyanine Green Angiography for Glioblastoma	MITSUI Nobuyuki	77
20) The effect of bone repair by intravenous injection of adipose tissue derived stem cells	YOSHIDA Masatsugu	80
21) Development of NIRS based diagnostic aid system for ADHD.	IKEGAMI Masanaga	82
22) A Model for the Mechanism of Identifying Fragmented Letters	TAKAHASHI Tatsuhisa	83
23) A study of the postural control of the knee joint deficiency and Application for preventing overturning.		
--Proposal of the clinical methods for calculating joint angles.--	OBARA Kazuhiro	86
24) Effect of the cognitive function improvement trial	SAKUNAMI Akiko	88
2013 Innovative Research in Life Science		
CDR3 analysis of TCR Vβ repertoire of CD4 T cell from Vogt-Koyanagi-Harada disease	KINOUCHI Reiko	91
Research Projects for the Clinical Application using Capillary Stem Cells.	KAWABE Junichi	94
Development of procedures measuring the chain length of polyphosphates (poly P) and analysis of the therapeutic effects of poly P on intestinal inflammations	FUJIYA Mikihiro	99
JICA Training course JFY 2014 "Health System Management for Regional and District Health Management Officers for African Countries"		
ITOU Toshihiro, YOSHIDA Takahiko, FUJII Tomoko, KITAMURA Kumiko		103
News	MATSUDA Mitsuyoshi • TAKEKAWA Masanori / HIRATA Satoshi	116
Books	TAKAHASHI Masaharu / SUZUKI Akihiro	121
Material	FUJIO Hitoshi	125
Editor's Note / Cover Story		129

旭川医科大学研究フォーラム



旭川医科大学研究フォーラム 第15巻 (平成27年刊) 目次

巻頭エッセイ

医学生物学における研究の曖昧性：S T A P細胞をめぐるって	飯 塚 一	2
---------------------------------	-------	---

依頼論文

PI3 kinase/Aktシグナル活性保持作用を持つ医薬品のパーキンソニズム抑制効果と治療薬の開発	田 崎 嘉 一	4
糖尿病網膜症の治療	大 前 恒 明	13

投稿論文

卒乳・断乳の決定に影響を与える要因	笹川 朝子・黒田 緑	18
-------------------	------------	----

博士学位論文

Species identification and strain typing of dermatophytes by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the ribosomal DNA and polymerase chain reaction analysis of subrepeat elements in the intergenic spacer region of Trichophyton rubrum	Ichiro Takahashi, Kazutaka Fukushima, Makoto Miyaji, Kazuko Nishimura, Kazuhiro Asano, Hajime Iizuka	27
---	--	----

依頼稿 (報告)

旭川医科大学と地元小・中・高との連携事業		
1) ヒトの体を見る、知る、学ぶ～中学生のための基礎医科学実習～	春 見 達 郎	37
2) 「自然科学実験教室：色と波長の関係」の実施報告	稲 垣 克 彦	41
3) 高校生実験体験講座2014を開催して	平 義 樹	45
平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題		
1) 造影剤腎症におけるメトホルミン効果についての検討 (その2)	研究代表者 滝山 由美	49
2) 癌微小環境における腫瘍血管、リンパ管の調節	研究代表者 齊藤 幸裕	51
3) 臼蓋形成不全に対する骨切り手術前・後の応力解析ー恥骨・後柱骨折発生要因の検討ー	研究代表者 佐藤 達也	53
4) 前立腺肥大症に対するデュタステリドのテストステロン上昇による副次効果ー骨密度への影響	研究代表者 和田 直樹	54
5) 肝培養細胞を用いたピオグリタゾンのインスリンおよび脂質代謝シグナルに対する薬理作用の解析	研究代表者 飯田 慎也	55
6) ミクログリアの活性化を調節する内在性制御因子の同定	研究代表者 田中 達英	56
7) 精子ミトコンドリア機能の種特異性の解析	研究代表者 春見 達郎	57
8) ミトコンドリア阻害による新規中枢性嗅覚障害モデルマウスとドパミン神経変性の評価	研究代表者 笹島 仁	58
9) プロテオミクスによる肝細胞の増殖・分化制御機構の機能形態学的検討	研究代表者 藤井 清永	60
10) 肝細胞の再生性および腫瘍性増殖におけるMKK7の機能解析	研究代表者 大塩 貴子	62
11) Visini-like protein subfamilyとmicrosomal cytochrome b5との親和性についての研究	研究代表者 及川 賢輔	64
12) コレクチンCL-L1の分子構造と組織局在に関する解析	研究代表者 松田 泰幸	65
13) 食品中に含まれるホルムアルデヒドが消化管免疫および発がんに及ぼす影響	研究代表者 中木 良彦	66
14) マタニティヨガの周産期予後改善効果に関する研究	研究代表者 川西 康之	68
15) 孤発性筋萎縮性側索硬化症における神経細胞死のメカニズムの解析と新規治療薬の探索	研究代表者 澤田 潤	69
16) 半導体マイクロチップ型シーケンサー対応original custom panel導入による 本邦へモクロマトーシス新規感受性遺伝子の探索研究	研究代表者 土岐 康通	71
17) 術前modified Glasgow Prognostic Score(mGPS)は大腸癌患者の予後を決定する一因子である	研究代表者 谷 誓良	75
18) 甲状腺癌放射性ヨード内用療法における新たな予後評価因子の有用性	研究代表者 中山 理寛	76
19) 悪性神経膠芽腫におけるIndoCyanin Greenの有用性についての研究	研究代表者 三井 宣幸	77
20) 脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与による骨再生の研究	研究代表者 吉田 将亜	80
21) 近赤外分光法を用いた注意欠如／多動性障害の診断補助システムの開発	研究代表者 池上 将永	82
22) 断片文字認知メカニズムのモデル化	研究代表者 高橋 龍尚	83
23) 健常人に対する膝関節疾患モデルの姿勢制御の研究と転倒予防への展開 ～臨床的関節角度計算方法の提案と考察～	研究代表者 小原 和宏	86
24) 高齢者の認知機能向上プログラムの効果に関する研究	研究代表者 作並亜紀子	88
平成25年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題		
Vogt-小柳-原田病で増加するCD4陽性T細胞クローンの検索とその抗原ペプチド同定による 診断法・治療法の研究	木ノ内 玲 子	91
毛細血管幹細胞 (Capillary Stem Cells) の再生医療応用 プロジェクト創生にむけた包括的研究活動	川 辺 淳 一	94
長鎖ポリリン酸の精密鎖長解析技術の開発と腸炎改善作用の解析	藤 谷 幹 浩	99
2014年度 JICA「アフリカ地域 地域保健担当官のための保健行政」コース		
	伊藤 俊弘・吉田 貴彦・藤井 智子・北村久美子	103
学界の動向		
第11回 日本口腔ケア学会総会・学術大会開催のご報告	松田 光悦・竹川 政範	116
第36回 日本手術医学会総会を終えて	平 田 哲	119
本学教員執筆書籍の紹介		
心理学のための英語論文の基本表現	高 橋 雅 治	121
「あてて見るだけ！劇的！救急エコー塾」	鈴 木 昭 広	123
旭川医科大学 回顧資料 (16) 昭和63 (1988) 年度		
臨床検査医学講座の誕生	藤 尾 均	125
投稿規程		128
編集後記・表紙解説		129

巻頭エッセイ

医学生物学における研究の曖昧性 ： S T A P 細胞をめぐる

飯 塚 一

筆者は、学際的なものも含め、いろいろな賞の選考委員を務めているが、その中に有機化学と医学生物学の2つの領域の審査員が、各々、審査して、最終的な発表会は、合同でおこなうという、結構、権威のある賞がある。個々の領域の選考委員にとっては、全くの異分野であるから、お互い、何を言っているのか、ちっとも分からないというのは、ある意味で当然なのだが、その時、しみじみ感じるのは、有機化学系の仕事の精密さである。彼らの仕事は、構造と機能が細かい部分で連動しており、しかも、検出、同定の手段が高度で、生物系には太刀打ちできないものばかりである。正直、圧倒されるし、いいかえると、彼らのデータと、そこから引き出されてくる結論の信頼性は、極めて高い。

その彼らがみて奇妙に思うのが、今回の S T A P 細胞の騒動で、なぜ結果的に再現性がない論文が、一流とされるグループから出てくるかという問題である。(小保方さんはともかく、故・笹井さんも若山さんも一流の学者である。)

彼らは、純粹に不思議に思っただけであるから、医学、生物系の選考委員(筆者を除いて、同じく一流の学者ばかり)は、返答に窮するわけであるが、よく考えると、これは、2つの科学領域の対象とアプローチの違いを如実に示しており、決して、なおざりにはできない問題である。筆者が思うに、これには生物系の仕事の特殊性、特に曖昧性が、大きく関与している。

まず、前提として、われわれの相手にしている細胞は、何億年もの淘汰の圧力に耐えて、生き延びてきたシステムであり、したがって、細胞に備わった冗長性、バックアップ機構のもとで、大抵のことには、問題なく対処できるようになっているという驚くべき現実がある。そうでなければ、生命は生き延びることができなかったわけである。そのような細胞を、常時、相手にしている研究者は、経験を積み重ねれば、自分の扱っている細胞の賢さに、いやでも気づかされることになる。細胞は、そして生命体は、見れば見るほど、実によくできており、ある意味で、尊敬に値する実体だと感ずるようになる。細胞というのは「凄い」という感覚で、その結果、今回の S T A P にしても、生物系の研究者の反応は、当初は、「ほんとかよ」であったとしても、次の反応は、「ありうる」と思ってしまうことになる。なにしろ細胞は賢いのである。

そこで、検証の問題になるのだが、次に出てくるのが、生命現象における曖昧さの問題である。われわれが行っている実験は、たいていの場合、精密度において、有機化学の水準とは、ほど遠いものであり、その結果、データは、通常、統計的解釈に頼らざるを得ないレベルにとどまっている。これは、なかなか厳しい現実で、特に S T A P の場合、細胞の可塑性の証明であるから、曖昧さの中にある真実の検出という、考えようによっては、大変、困難な問題に直面することになる。

これを言い換えると、S T A P の証明にあたっては、細胞の持つ能力に対する強い信頼は、実験を遂行するにあたり、研究者にとって、心理的に重要な動機づけにはなるのだが、同時に、その研究者は、生命科学の実験系の曖昧さを、常に念頭に置いて、冷静にデータ解釈をしなければならないということになる。(データの捏造うんぬんについては、ここでは触れない。) また、ある意味で、一番怖い追試についての覚悟は、当然、必要である。なぜなら、これだけのインパクトのある仕事に対しては、発表後、直ちに追試がかかるのは自明のことであ

り、逆説的だが、それに耐えた iPS 細胞の仕事は、それ故にこそ、なおさら立派なのである。

筆者は、在任期間の最後の 7 年間は、研究担当の副学長であったため、学位論文の発表はすべて聞かせていただいたことになる。当然のことながら、そこには、際立って素晴らしいものもあるし、そうとは言い難いものもあった。いくつか感想はあるのだが、特に危険だと思うのが、研究者の想いが先行してしまう一方で、提示されるデータが、必ずしも、それに追いついていない論文で、これは、ひょっとしたら、S T A P と同じ間違いを犯している可能性があるかもしれないという謙虚さは、個々の研究者、そして特に指導者は、心構えとして持つべきである。なぜなら、これは、当該論文のデータの曖昧さが、はたして許されるレベルかという科学の基本的な問題に直結しているからである。

この曖昧さが、本当は、自分自身で解決できればよいのだが、必ずしも、そう、うまくいくとは限らない。そこで曖昧さの補強において、個々のデータは、意外なところで、互いに補い合って正しさを証明しているという昔からの経験則が役に立つ。実は、その重要なデータは、自分自身が意識しないで持っているかもしれないし、過去の誰かが、全く別の目的で、公表しているかもしれないのである。論文検索は、その目で行ったほうがよい場合があり、その検討の結果、いくつかのデータが重なり合った時、初めて、予期せぬ正しさが、勝手に立ち上がってきて、驚愕させられた経験のない研究指導者は、おそらく、いないはずである。細胞の持っている能力と比べたら、われわれの頭は極めて劣弱であり、注意深くなされた実験のデータは、一般論として、常に正しいのである。だからデータは怖い。ネガティブデータから、新しい情報伝達経路の発見に至ったというのは、よくある話であるし、うまくいかない実験の方が、最終的には、より重要な知見につながるというのは、このあたりの微妙なところを指している。

結論として、希望的観測で、データをみてはいけないという極めてありふれたものであるが、同時に、生命科学実験の持つ曖昧さによって、ひやりとさせられたことのない研究者は、筆者も含め、事実上、存在しないということも、この機会に、あわせて述べておきたい。自分にとって、本当は都合の悪い、気になるデータを持ったことのない研究者は、おそらく、いないはずである。そのデータを忘れることなく、自分の見ている細胞を信頼して、原因を追及していけばよい。あとになって振り返ってみれば、そこには必ず、自明な理由が存在するはずである。専門家とは、その分野で、ありとあらゆる間違いを犯した人間を指すという言葉もある。この駄文が、これから医学生物学の研究に入ろうとする人たちにとって、少しでもお役に立てば幸いである。

なぜ成功したかって？たくさん失敗したからさ。

(旭川医科大学名誉教授 前理事・副学長 札幌乾癬研究所 所長)

注：

S T A P 細胞：Stimulus- Triggered Acquisition of Pluripotency 細胞：刺激惹起性多能性獲得細胞：分化した細胞に、弱酸性溶液に浸すなどの外的刺激を与えて、再び分化する能力を獲得させたとされる細胞。2014 年、Nature 誌に発表された 2 つの論文は、直後から様々な疑義が出され、最終的に撤回された。再現実験を続けていた理化学研究所は、同年末、「S T A P 現象の確認に至らなかった」と報告し、実験の打ち切りを発表している。

依頼論文

PI3 kinase/Akt シグナル活性保持作用を持つ医薬品の パーキンソニズム抑制効果と治療薬の開発

田 崎 嘉 一*

【要 旨】

パーキンソン病治療の主役は、進行するドパミン神経細胞死により失われたドパミンを補充する薬物療法を中心とした対症療法であるが、長期服用による問題点も多い。現在までに、病気の進行を遅らせるまたは止められることができる、いわゆるドパミン神経細胞死抑制作用を有する原因療法に基づく薬剤は開発されておらず、その登場が切望されている。著者らは、これまでに市販されている薬剤の中から、パーキンソン病に関連した神経細胞死を抑制できるオキシカム系非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）を見つけ出し、その抑制メカニズムが NSAIDs の抗炎症作用発現メカニズムのシクロオキシゲナーゼ（COX）抑制ではなく、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt シグナル活性保持作用に基づく新規作用であることを見出した。さらに本メカニズムにより、オキシカム系 NSAIDs がパーキンソン病動物モデルでも薬効を示すことが明らかとなり、本薬剤の臨床応用の可能性が高まった。本薬剤は、すでに市販されている薬剤であり、早い臨床応用が可能と考えられる。

キーワード オキシカム系 NSAIDs、meloxicam、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase)、Akt、パーキンソン病、神経細胞死抑制薬

1. はじめに

パーキンソン病は、脳の黒質から線条体へと投射するドパミン神経が選択的に細胞死を起こすことで運動障害が起こる神経変性疾患である¹⁾。パーキンソン病治療は、失われたドパミンを補充する薬物療法が主流でドパミンの前駆体であるレボドパが著効を示すが、対症療法であるため進行を止めることができず、長期に服用することで薬効の低下や日内変動など様々な問題が起こることが知られている^{2), 3)}。これまでもドパミン神経細胞死を抑制する薬剤が開発中であったが、臨床応用されているものはなく、神経細胞死抑制薬の登場が望まれている⁴⁾。

一方で、パーキンソン病におけるドパミン神経細胞死の原因は十分にはわかっていない。弱毒性神経毒の蓄積や酸化ストレスなどが原因の候補に挙げられている

が、脳内の免疫活性化による神経変性もその一つであり^{5), 6)}、初期のパーキンソン病患者の脳の黒質線条体系神経周辺でも免疫活性化による炎症反応が見られている⁷⁾。この炎症反応が神経細胞死を引き起こすのか、神経細胞死の結果として起こるのかは議論の分かれているところではあるが、いくつかの非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）がパーキンソン病の進行を抑制するという報告もあり⁸⁾⁻¹⁰⁾、脳内における炎症反応を阻害すれば、パーキンソン病の進行を抑制できる可能性が示されている。NSAIDsによる炎症反応抑制は、プロスタグランジン類の産生を担う cyclooxygenase (COX) を阻害することによるものであり、特に誘導型の COX-2 を阻害すると、パーキンソン病の黒質で見られている活性化マイクログリアによる炎症性サイトカインの産生を抑制し、神経変性を遅延するものと考えられている。しかし、COX-2 は神経細胞にも発

*旭川医科大学病院 薬剤部

現しており、これを直接抑制することにより神経細胞死を抑制できるか否かについては、本研究着手当時の2007年ごろには明らかになっていなかった。

そこで、NSAIDsが直接、神経細胞のCOXを抑制して神経細胞死を抑制するかについての検討を行うこととした。神経細胞としては、ヒト神経線維芽細胞由来のSH-SY5Y細胞を用い、ヒトでもパーキンソン病様症状を発症する1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)の活性代謝物である1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP⁺)により細胞死を惹起し、化合物の細胞死抑制作用の検討を行なった。

2. パーキンソン病関連神経毒 MPP⁺ による神経細胞死に対する NSAIDs の細胞死抑制効果¹¹⁾

まず、NSAIDsとしては、代表的な医薬品のindomethacin、ibuprofen、meloxicamを選び、COX-2選択性の高い阻害物質のCAY10404、NS-398についても神経細胞死抑制作用を評価した。神経細胞は、前

述のSH-SY5Y培養細胞を用い5mM MPP⁺を24時間暴露することにより神経細胞死を惹起し、細胞生存率 (Cell viability) と細胞死により細胞から漏出するLDHの放出 (LDH leakage) を評価した。COX阻害薬は、MPP⁺の暴露と同時に各濃度で添加した。その結果、どちらの評価系でも濃度依存的な神経細胞死抑制作用を明確に示したのは、meloxicamのみであった(図1)。他のNSAIDsは、神経細胞に直接働く細胞死抑制効果を持たないと考えられる。meloxicamは、よりCOX-2選択的な薬剤であるが、CAY10404、NS-398の方がCOX-2選択性は高い。また、COX-1阻害活性は、indomethacinが評価したい薬剤の中で最も高く、これらのことを総合すると、本系におけるmeloxicamの神経細胞死抑制作用は、COX阻害によるものではないことが示唆された。

3. meloxicam による神経細胞死抑制の新規メカニズム¹¹⁾

meloxicamによる神経細胞死抑制効果が、COX阻

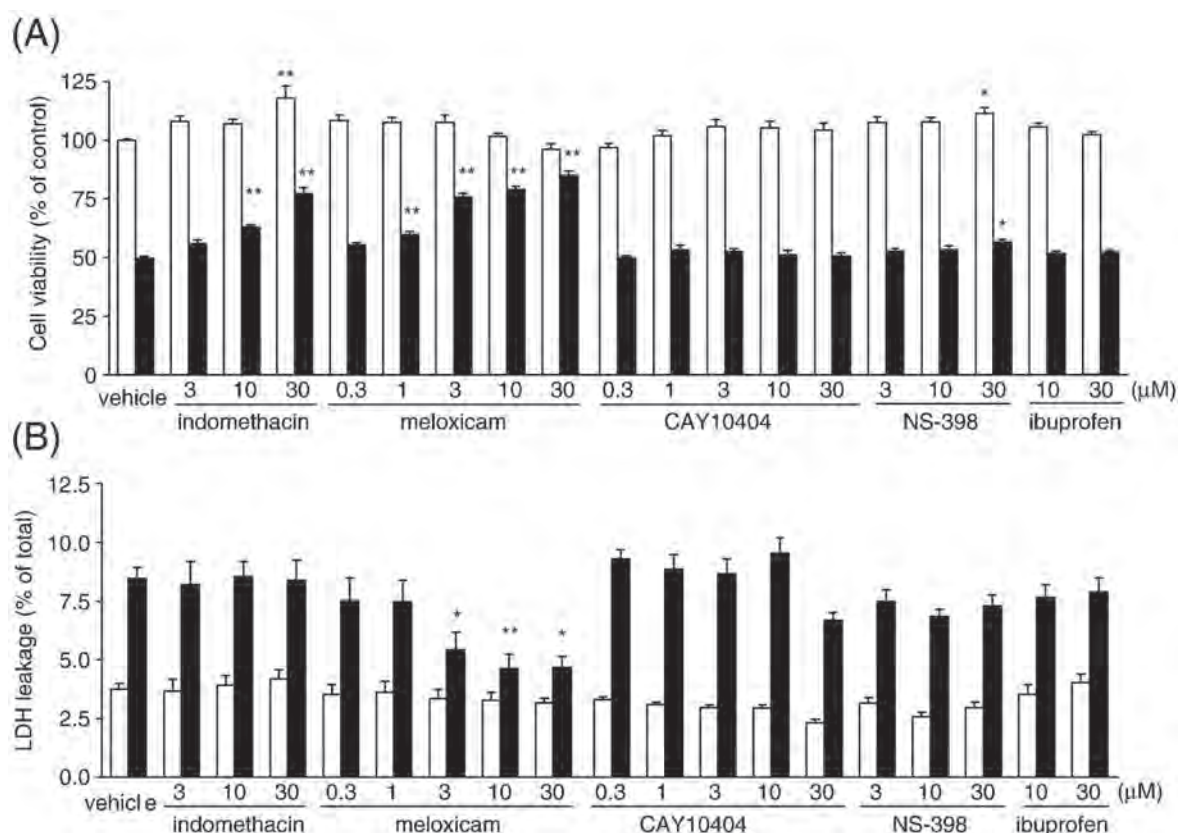


図1 MPP⁺暴露によるSH-SY5Y神経細胞死に対する各NSAIDsの効果

(A) cell viability、(B) LDH assaysであり、5mM MPP⁺存在下は黒いカラム、非存在下は白いカラム。データは、mean ± SEM; p<0.05 (*), p<0.001 (**) Tukey's test after ANOVA。(文献 11)

害活性に依存していないことから、細胞内の生存シグナルとして extracellular signal-regulated kinase (ERK) と PI3K/Akt の経路の関与が想定され、これらについて検討した。前述の SH-SY5Y 細胞を用いた MPP⁺ による神経細胞死の系を用い、mitogen activated protein-ERK kinase (MEK) 経路の阻害剤 PD98059 または PI3K 阻害剤の LY294002 を共存させた場合に meloxicam の細胞死抑制効果がどのように変化するかを前節と同様、cell viability と LDH leakage で評価した。その結果、meloxicam の神経細胞死抑制効果は、どちらの評価系でも PD98059 共存下では変化がなかった (図 2 A,C) のに対し、LY294002 共存下では、細胞死抑制効果が消失した (図 2 B,D)。

さらに、PI3K/Akt 経路の関与を確かめるため、細胞を破碎し、ウエスタンブロット法により Akt のリン酸化量を画像解析装置 (LAS3000, FUJIFILM 社製) にて定量した。リン酸化 Akt (pAkt) は、Akt の活性化体であり Akt 経路が活性化している状態を示している。細胞生存シグナルの変化は、細胞死に先立っ

て変化すると考えられたため、アッセイ開始 4 時間後と 18 時間後について検討を行った。その結果 (図 3)、リン酸化 Akt 量は、MPP⁺ による細胞死が始まる 8 時間より前の 4 時間の時点で有意に減少しており、meloxicam を共存させることによりリン酸化 Akt 量を正常 (コントロール) レベルに保持していることが分かった (図 3A)。また、18 時間後でも同様の結果 (図 3B) であり、total Akt 量、 β -actin 量に変化がなかったことから、細胞死によるタンパク量自体の変化によるものではなく、リン酸化割合の変化であることが明らかとなった。以上のことより meloxicam の神経細胞死抑制の作用機序は、Akt 活性保持作用によることが示唆された。

次に、meloxicam が MPP⁺ による PI3K/Akt シグナル抑制を阻害するだけでなく、その後の Akt シグナル下流の apoptosis も阻害しているかを検討した。apoptosis の評価には DNA 断片化と apoptosis 実行酵素の caspase-3 の活性化指標である caspase-3 断片化を検討した。その結果、どちらの系においても MPP⁺ に

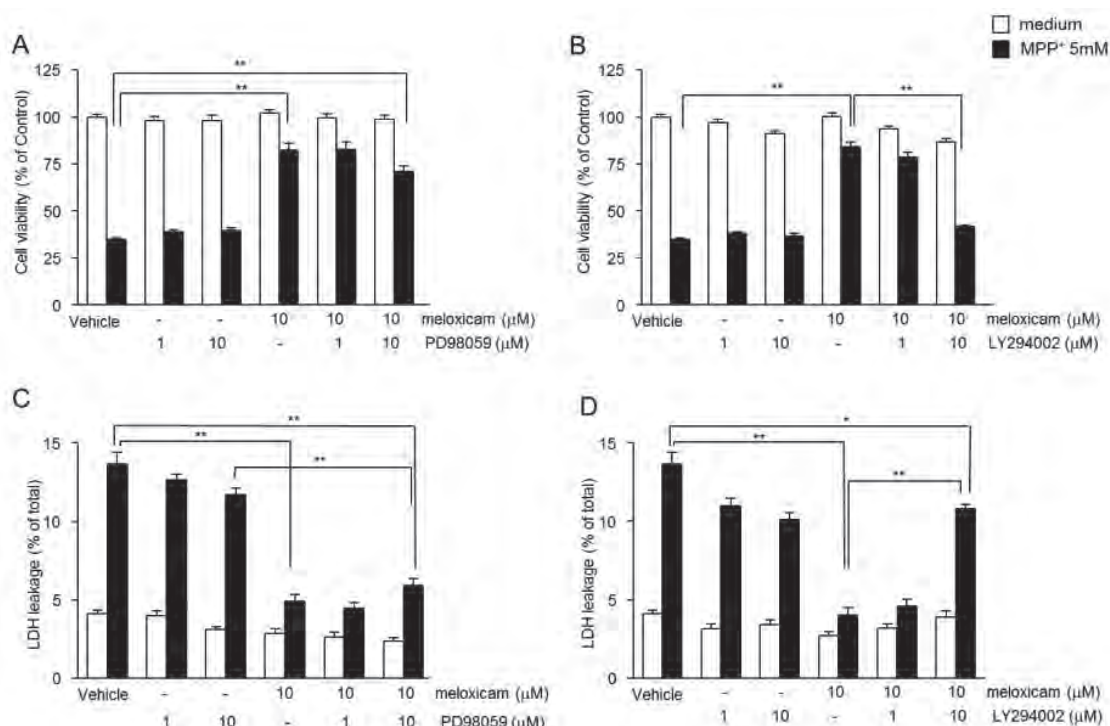


図2 meloxicam による神経細胞死抑制作用に対する MEK 阻害剤 (PD98059) および PI3K 阻害剤 (LY294002) の効果

(A, B) cell viability、(C, D) LDH アッセイであり、5mM MPP⁺ 存在下は黒いカラム、非存在下は白いカラム。共存させる PD98059 (A, C) or LY294002 (B, D) の濃度は、図中に示した。

データは、mean $\pm$ SEM; $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**) Tukey's test after ANOVA。 (文献 11)

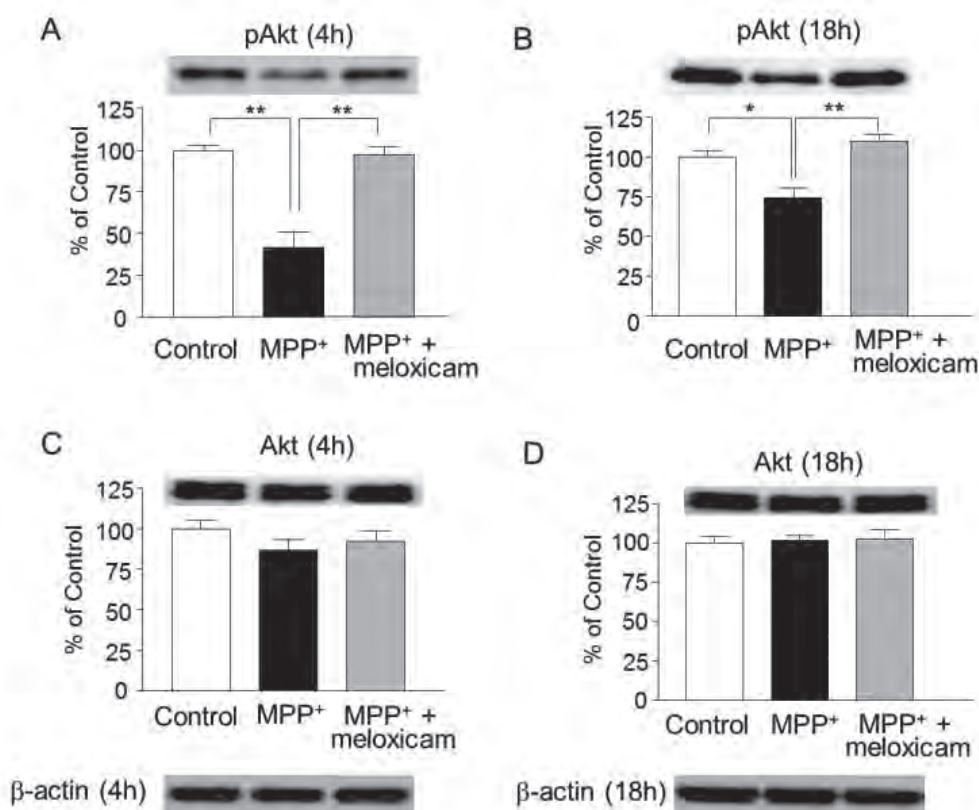


図3 Aktリン酸化量に対する meloxicam の効果

Western blotting によるリン酸化 Akt 量 (A, B) および total Akt 量 (C, D) と対応する β -actin 量
インキュベーション時間は、4h (A, C) および 18h (B, D)。MPP⁺ (5 mM), meloxicam (30 μ M)

データは、mean $\pm$ SEM (n=3 or 4)。p<0.05 (*), <0.001 (**) by the one-way factorial ANOVA after the Tukey's test. (文献 11)

よる DNA 断片化および caspase-3 断片化を meloxicam が阻害し、さらに PI3K 阻害剤の LY294002 により meloxicam の効果は消失し、再び断片化が起こることが明らかとなった (図 4)。従って、meloxicam は PI3K/Akt の活性保持作用により MPP⁺ 誘発の apoptosis による神経細胞死を抑制していることが確かめられた。

4. meloxicam による ERK、JNK、p38 シグナルに対する効果¹¹⁾

次に、meloxicam の神経細胞死抑制作用が PI3K/Akt 経路に特異的なものか否かを確かめるために、細胞生存シグナルの ERK リン酸化、細胞死促進シグナルの JNK、p38 リン酸化を Western blotting により検討を行った。実験は、MPP⁺ 単独添加および meloxicam 共存下における変化を無添加の場合と比較した。その結果、meloxicam の神経細胞死抑制作用を説明できる ERK、JNK、p38 のシグナル変化は見られず、これらのシグ

ナル経路は、関与していないことがわかった (図 5)。meloxicam は、PI3K/Akt 経路を特異的に活性保持していることが明らかとなった。

5. meloxicam と同様の神経細胞死抑制作用を発揮する化学構造特異性の検討¹²⁾

前述のように、MPP⁺ 誘発の神経細胞死を抑制する化合物は、調べた 5 化合物の中では meloxicam だけであった。しかし、この作用が meloxicam だけに見られる作用であるのか、他のオキシカム系化合物や他の系統の NSAIDs でも見られるのか不明であった。そこで、神経細胞死抑制作用における構造特異性の検討を行った。ほぼすべての NSAIDs の母核を含む 13 化合物 (サリチル酸系 3 化合物、コキシブ系 6 化合物、オキシカム系 3 化合物、ポリフェノール系 1 化合物) を選択し、神経細胞死抑制作用をこれまでと同様 cell viability と LDH leakage 系で評価した。その結果、調べた全化合物のうち両方の系で神経細胞死抑制作用を示したの

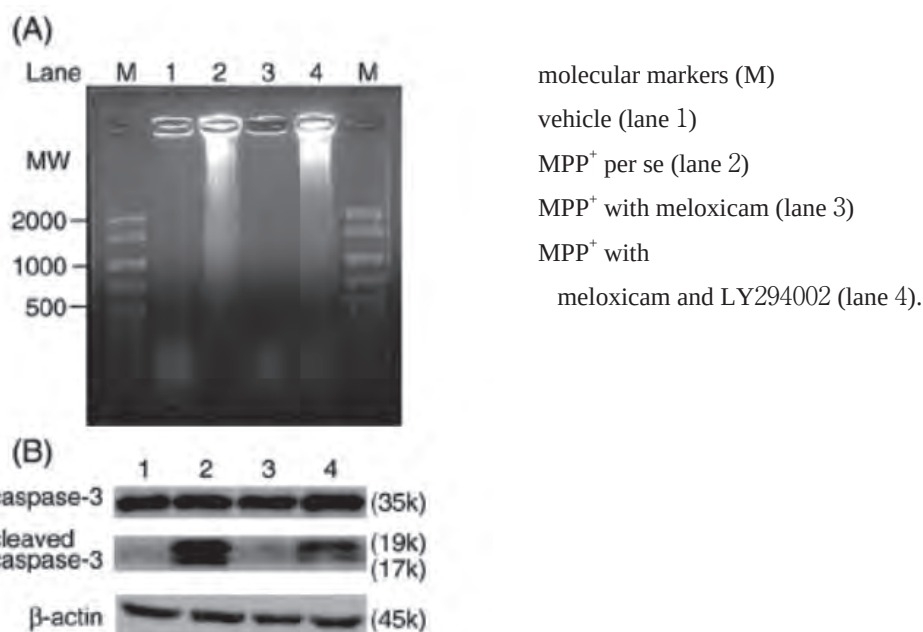


図4 MPP⁺誘発 apoptosis に対する meloxicam の効果
DNA 断片化 (A) と Western blotting による caspase-3 断片化量と β-actin 量 (B)
インキュベーション時間は 24h (A) および 18h (B)。MPP⁺ (5 mM)、meloxicam (30 μM)、
LY294002 (10 μM)。 (文献 11)

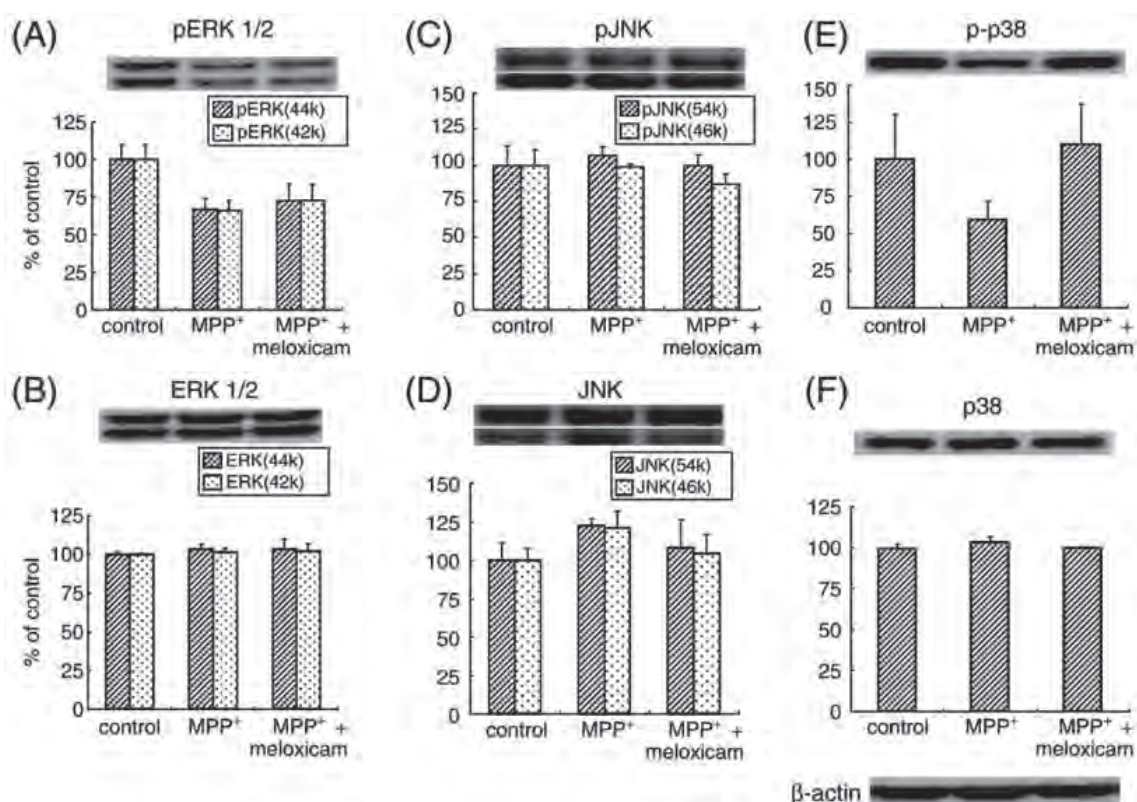


図5 ERK、JNK、p38 リン酸化に対する meloxicam の効果
ERK (A, B)、JNK (C, D)、p38 (E, F) のそれぞれリン酸化体量と total 量、対応する β-actin 量を示した (文
献 11)。
インキュベーション時間は 4h。MPP⁺ (5 mM)、meloxicam (30 μM)。各値は mean ± SEM (n=3 - 4)
どの 2 グループにも有意差なし (one-way ANOVA)。

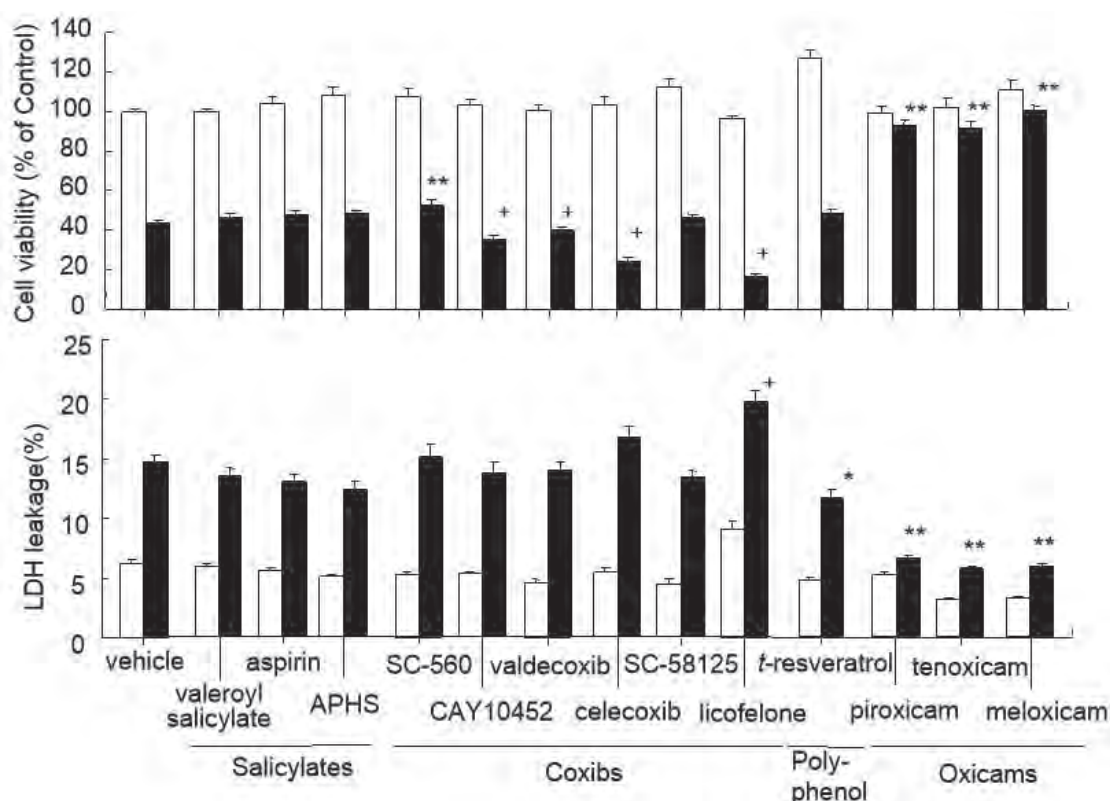


図6 MPP⁺ 暴露による SH-SY5Y 神経細胞死に対する各 NSAIDs の効果
(A) cell viability、(B) LDH assays であり、5mM MPP⁺ 存在下は黒いカラム、非存在下は白いカラム。各化合物は 30μM で評価した。
データは、mean ± SEM; p<0.05 (*), p<0.001 (**), P<0.05 (+) は、有意な悪化を示す。
Tukey's test after ANOVA. (文献 12)

は、オキシカム系のみの 3 化合物であった。従って、meloxicam 以外のオキシカム系化合物（医薬品）でも同様の神経細胞死抑制が見られた（図 6）。さらに、meloxicam 以外の piroxicam、tenoxicam による神経細胞死抑制作用も PI3K/Akt 経路を介しているかを検討した。pAkt のタンパク量を Western blotting で検討したところ、meloxicam と同様に pAkt 量の保持作用が見られ、PI3K 阻害剤の LY294002 によりこれらの保持作用は消失した（図 7）。このように、オキシカム系骨格のみが、他の骨格では見られない細胞死抑制作用を持つことから、オキシカム系構造が作用発現に必須であると考えられた（図 8）。

6. MPTP 投与 in vivo 慢性パーキンソン病モデル動物における行動異常およびドパミン神経変性に対する meloxicam の保護作用¹³⁾

細胞培養系においては、上記のように PI3K/Akt 活性の保持作用によって meloxicam が神経細胞死を抑制

することが分かったが、in vivo においても同様のメカニズムで神経細胞死を抑制するかについて検討を行った。パーキンソン病モデルとしては、最もよく汎用され、実際のパーキンソン病の細胞死にも類似する慢性パーキンソン病モデルを用いた。このモデルは、C57BL マウスに MPTP 1 日 1 回 30mg/kg を 5 日間投与して作製するもので、このモデルにおいて meloxicam の有効性を検討した。方法は、行動薬理学的評価法として Pole test を用いた。この方法は、マウスにおけるパーキンソン病様症状を評価するもので、マウスを高さ 55cm、太さ 8mm のポールに上向きにつかまらせ、マウスが下へ行こうとして下へ向くまでの時間 (T_{turn}) とスタートから床まで到達する時間 (T_{LA}) を計測し、時間がかかるほど行動異常が大きいとするものである。また、ドパミン神経変性の評価には、ドパミン神経細胞のマーカーとして用いられる tyrosine hydroxylase (TH) 量をウエスタンブロットで定量した。定量した部位は、パーキンソン病で変性するドパミン神経が存在する黒質を含む中脳とその神経投射先の

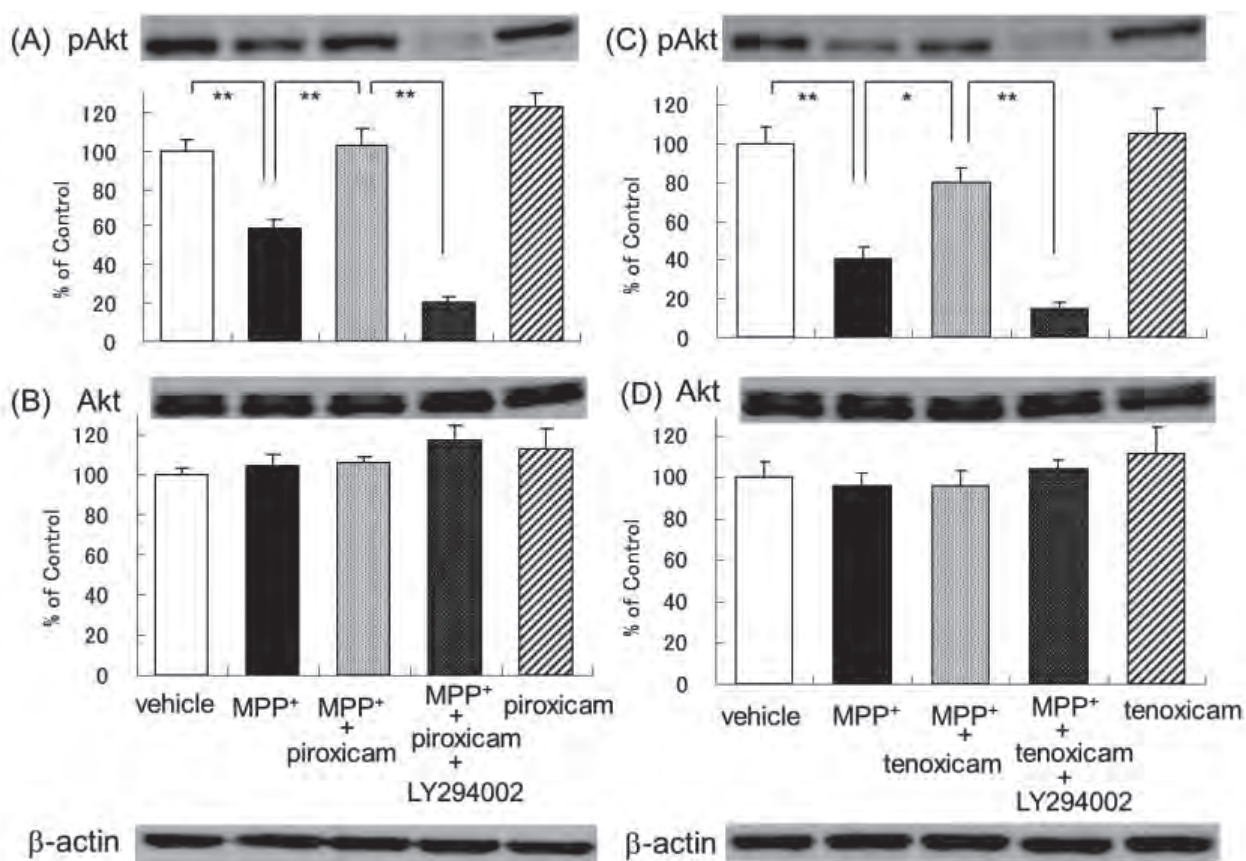


図7 piroxicam および tenoxicam の Akt リン酸化に対する影響

pAkt (Ser 473; A, C)、total Akt (B, D) および β-actin 量を Western blotting で定量した。インキュベーションは 4h、MPP⁺ (5 mM)、PI3K 阻害剤 LY294002 (10 μM)。データは、mean ± SEM (n=4); p<0.05 (*), p<0.001 (**) Tukey's test after ANOVA。(文献 12)

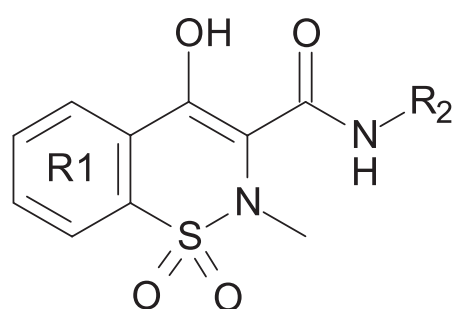


図8 MPP⁺ 毒性に対して神経保護作用を示す必須化学構造 (文献 12)

	R1	R2
meloxicam		
piroxicam		
tenoxicam		

線条体を測定した。また中脳においては、meloxicam が動物モデルにおいても PI3K/Akt 経路を介して神経細胞死を抑制しているかを検証するため、pAkt および Akt、β-actin 量も測定した。meloxicam は、MPTP

投与と同時に 1 日 1 回 10 mg/kg を 14 日間投与し、15 日目に Pole test を行い 16 日目に脳を部位分けして採取し、Western blotting 用のサンプル調製を行った。

その結果、meloxicam の投与により、MPTP 投与に

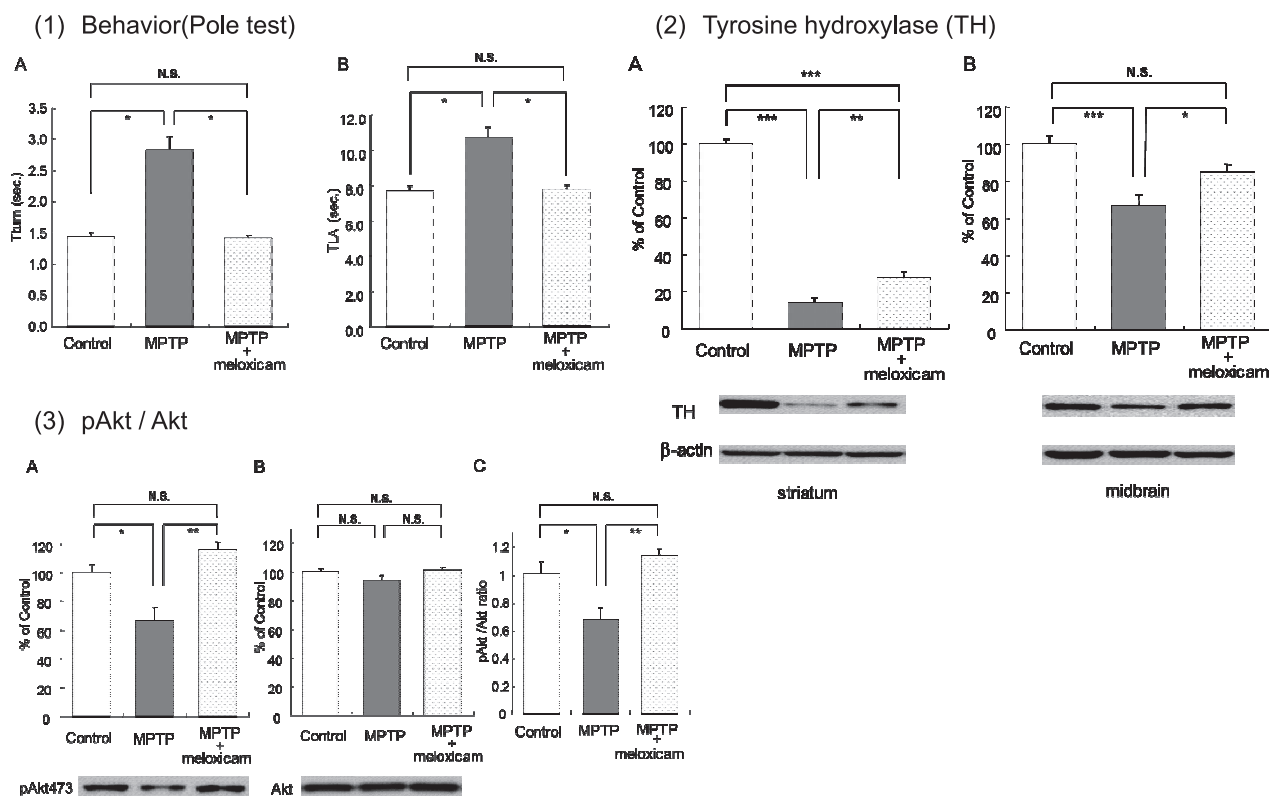


図9 MPTP 誘発慢性パーキンソン病モデルマウスに対する meloxicam の効果

(1) 行動異常評価の Pole test : A: Tturn, B: TLA (2) Tyrosine hydroxylase 量 ; western blotting による定量
A: 線条体, B: 中脳 (3) A: pAkt 量, B: total Akt 量, C: pAkt / Akt 比。 マウスには 30mg/kg MPTP 5 日間皮下投与および 10mg/kg meloxicam 14 日間腹腔内に同時投与。Control は、生理食塩水投与。(文献 13)

よる Pole test での時間遅延が有意に改善し、慢性パーキンソン病モデルにおいても行動異常を改善することが明らかとなった (図 9 (1))。また、脳の線条体および中脳における MPTP による TH 量の減少も meloxicam は有意に抑制した (図 9 (2))。したがって、黒質線条体系のドパミン神経が保護されていると考えられ、それにより行動異常も改善されたと考えられた。さらに、このドパミン神経の細胞体がある中脳においてリン酸化 Akt 量の保持作用も見られた (図 9 (3))。これにより、SH-SY5Y 細胞で見られた meloxicam の神経保護作用と同様に、MPTP 投与慢性パーキンソン病モデルにおいても、PI3K/Akt 保持作用を介して神経細胞死を抑制しているものと考えられた。

7. 今後の展望

以上より meloxicam を代表とするオキシカム系 NSAIDs は、パーキンソン病進行抑制薬としての可能性が考えられる。オキシカム系 NSAIDs は、すでに特

許の切れた薬剤ではあるが、すでに他の疾患では使用されている薬剤なので、倫理的問題がクリアされれば、試験的な治験や、レトロスペクティブな疫学研究によって、パーキンソン病に対する効果を明らかにできると思われる。また、現在、オキシカム系薬剤の誘導体を共同研究にて合成し、一部は、細胞で評価し有効性を示す化合物も見つかっている。今後は、化合物特許の取得できる薬剤を見出し、医薬品開発へとつなげていきたい。

本研究に関連する利益相反はありません。本研究は、JSHP 科研費 22590129 および 25460204 の助成を受けたものです。

参考文献

- 1) Sian, J., Gerlach, M., Youdim, M.B., Riederer, P., 1999. Parkinson's disease: a major hypokinetic basal ganglia disorder. J. Neural. Transm. 106, 443-476.

- 2) Marek, K., Jennings, D., Seibyl, J., 2002. Do dopamine agonists or levodopa modify Parkinson's disease progression? *Eur. J. Neurol.* 9 (Suppl 3), 15-22.
- 3) Fahn, S., the Parkinson Study Group, 2005. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? *J Neurol.* 252 suppl 4, IV37-IV42.
- 4) Koller, W.C., Tse, W., 2004. Unmet medical needs in Parkinson's Disease. *Neulorogy* 62, S1-8.
- 5) McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., McGeer, E.G., 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285-1291.
- 6) Whitton, P.S., 2007. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150, 936-976.
- 7) Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T., Torizuka, T., 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 57, 168-175.
- 8) Chen, H., Zhang, S.,M., Hernan, M.A., Schwarzschild, M.A., Willett, W.C., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Ascherio, A., 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 60, 1059-1064.
- 9) Hernan, M.A., Logroscino, G., Garcia Rodriguez, L.A., 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. *Neurology* 66, 1097-1099.
- 10) Ton, T.G., Heckbert, S.R., Longstreth, W.T., Jr., Rossing, M.A., Kukull, W.A., Franklin, G..M., Swanson, P.D., Smith-Weller, T., Checkoway, H. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Mov. Disord*, 21, 964-969.
- 11) Tasaki, Y., Omura, T., Yamada, T., Ohkubo, T., Suno, M., Iida, S., Sakaguchi, T., Asari, M., Shimizu, K., Matsubara, K., 2010. Meloxicam protects cell damage from 1-methyl-4-phenyl pyridinium toxicity via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 1344, 25-33.
- 12) Tasaki, Y., Yamamoto, J., Omura, T., Noda, T., Kamiyama, N., Yoshida, K., Satomi, M., Sakaguchi, T., Asari, M., Ohkubo, T., Shimizu, K., Matsubara, K. 2012. Oxicam structure in non-steroidal anti-inflammatory drugs is essential to exhibit Akt-mediated neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cytotoxicity, *Eur. J. Pharmacol.* 676, 57-63.
- 13) Tasaki, Y., Yamamoto, J., Omura, T., Sakaguchi, T., Kimura, N., Ohtaki, K., Ono, T., Suno, M., Asari, M., Ohkubo, T., Noda, T., Awaya, T., Shimizu, K., Matsubara, K. 2012. Meloxicam ameliorates motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration by maintaining Akt-signaling in a mouse Parkinson's disease model, *Neurosci. Lett.* 521(1), 15-19.

依頼論文

糖尿病網膜症の治療

大 前 恒 明*

【要 旨】

糖尿病網膜症は、慢性的な高血糖が原因で発症する細小血管障害の1つであり、長らく成人失明原因の第1位であったが、近年緑内障に次いで第2位になった。実際、臨床の現場では、重症の糖尿病網膜症に出会う機会はまだまだ多いが、網膜症の治療法の進歩が失明原因の第2位になった背景に寄与しているものと思われる。この稿では、糖尿病網膜症に対して、現在行われている治療について述べたい。さらに、われわれは網膜症の発症・進展に網膜循環の障害が関与していることを示しており、この網膜循環の観点で網膜症の治療の研究をしているので、網膜循環からの網膜症の治療の可能性について述べたい。

キーワード 糖尿病網膜症、眼循環

背 景

2007年度の糖尿病実態調査では、我が国における糖尿病患者数は890万人に達し、我が国における網膜症の有病率は、糖尿病患者の約30%で、約300万人と推測され、これに伴い糖尿病網膜症を合併している糖尿病患者数は増加していると考えられる。その反面、糖尿病網膜症が「成人の失明原因の第1位」であったが、2005年度の調査では、緑内障が第1位となり、糖尿病網膜症は第2位となった¹⁾。この背景には、糖尿病網膜症治療のめざましい進歩に寄与するところも大きいと考えられる。

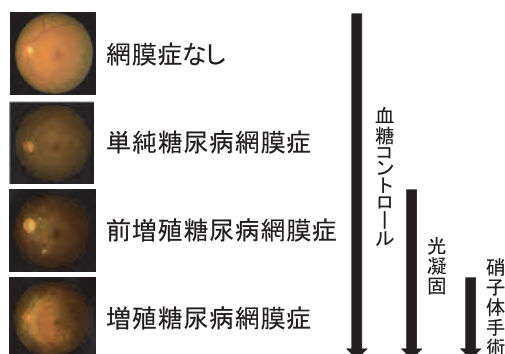


図1 網膜症の治療

現在の糖尿病網膜症に対する治療には、大きく内科的治療と外科的（眼科的）治療が行われている。内科的治療で代表的なものは、血糖と血圧のコントロールであり、網膜症の発症や進展の予防に重要である。前増殖糖尿病網膜症以降の病期には、網膜光凝固治療と硝子体手術などの外科的治療が行われる。

血糖コントロール

糖尿病網膜症は、慢性的な高血糖による細小血管障害であり、糖尿病発症からすぐに発症するものではなく、通常年余にわたる高血糖が網膜症を進展・発展させると考えられる。厚生省の平成3年度の糖尿病調査研究報告書によると1型糖尿病では、罹病期間5年未満で17%、15～19年で81%に糖尿病網膜症の合併が認められる。また2型糖尿病では罹病期間5年未満で14%、15～19年で57%に糖尿病の合併が認められ、罹病期間が網膜症の発症に大きな影響を及ぼす。さらに我が国の疫学研究で、糖尿病網膜症の発症・進展に影響を及ぼす主要なリスク因子として糖尿病罹病期間だけでなくHbA1cも示されている²⁾。血糖コントロールの良否や罹病期間が網膜症の発症・進展に大きな影

*旭川医科大学病院 眼科

響を及ぼすこと示している。つまり、糖尿病初期から良好な血糖コントロールを長期間保つことで、網膜症の発症・進展を抑制できると考えられる。しかし実際の臨床の場では、増殖糖尿病網膜症まで進行し、重篤な視力障害をきたす患者が後をたたない。これは、糖尿病自体の内科治療を怠ってきたことも原因であるが、網膜症の病期がすでに増殖糖尿病網膜症にまで進行しており、内科的治療のみで対応できる状態を越えていることを示しており、このことから糖尿病初期の内科的治療の大切さが示唆される。

厳格な血糖管理が網膜症の進展の抑制に効果的であることが、これまでの Diabetic Control and Complications Trial (DCCT)、United Kingdom Prospective Diabetic Study (UKPDS)、Kumamoto Study といった大規模研究で確認されている。

DCCT は、1 型糖尿病患者で、網膜症を有さないか単純糖尿病網膜症の症例を対象としたもので³⁾、従来療法群(1 日 1 回もしくは 2 回のインスリン注射治療)に比べてインスリン強化療法群(1 日最低 3 回のインスリン注射治療)で網膜症の発症危険度が有意に低下した。しかし、急激な血糖コントロールで網膜症が悪化する症例があり⁴⁾、特に前増殖糖尿病網膜症～増殖糖尿病網膜症の症例では、血糖コントロールは細心の注意を払う必要がある。

UKPDS は、2 型糖尿病患者で、血糖値の上昇や高血糖症状が出現したときに治療を開始する従来療法群とインスリンもしくは経口糖尿病薬でより厳しい血糖コントロールを行う強化療法群に分け経過観察を行った臨床研究である。強化療法群では、HbA1c は 7 % にコントロールされ、従来療法群の 7.9% より良好なコントロールとなり、糖尿病網膜症の発症が有意に抑制された⁵⁾。

Kumamoto study は我が国の 2 型糖尿病患者を対象とし^{6) 7)}、従来インスリン療法群 (conventional insulin injection therapy ; CIT 群) と頻回インスリン療法群 (multiple insulin injection therapy ; MIT 群) を比較検討した臨床研究であるが、MIT 群で網膜症の進行が抑制された。また、空腹時血糖値 < 110 mg/dL、食後血糖値 < 180 mg/dL、HbA1c (JDS 値) < 6.5 % の症例では、網膜症の発症・進展が認められなかった。つまり、網膜症の発症・進展阻止のための血糖コントロールの閾値として、空腹時血糖値 < 110 mg/dL、食後血糖値

< 180 mg/dL、HbA1c (JDS 値) < 6.5 % が示された。しかし、急激な血糖コントロール後に網膜症が悪化する症例があり、どの程度の血糖コントロールが適切かどうか結論は得ていない。以前の報告で⁸⁾、インスリン頻回注射療法により HbA1c 値を 1.0 ~ 1.3% / 月のペースで比較的急速にコントロールしたところ、網膜症を有さない症例や単純糖尿病網膜症の症例では、ほとんど増悪を示さなかったのに対し、前増殖糖尿病網膜症や増殖糖尿病網膜症で 30% 以上に増悪を認めた。さらにこれら前増殖糖尿病網膜症や増殖糖尿病網膜症で HbA1c 値 < 0.5% / 月のマイルドなペースで血糖コントロールすると網膜症の増悪が軽度だった。

以上の報告から、網膜症の有さないもしくは単純糖尿病網膜症の症例では、比較的急速な血糖コントロールは行ってもよいが、前増殖糖尿病網膜症や増殖糖尿病網膜症を有する症例では、HbA1c 値 < 0.5% / 月の比較的マイルドなペースで血糖コントロールすることがすすめられる。

血圧コントロール

UKPDS では、糖尿病に合併する高血圧の治療が網膜症の進行予防に有効であることが報告されている⁹⁾。 β 遮断薬であるアテノロール、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬であるカプトプリルを積極的に使用して血圧 150/85 mmHg 以下に管理する群では、9 年間の観察で平均血圧 144/82 mmHg となり、網膜症の悪化が 10 % 以下に抑えられた。一方、対照群は、平均血圧 154/87 mmHg で、網膜症の悪化が 23 % にみられた。このことから、血糖値と同様に、収縮期血圧の良好な管理が網膜症の発症・進展を抑制することが示された。

網膜光凝固

光凝固を用いた治療は、1960 年代後半に Meyer らに報告され¹⁰⁾ て以来、糖尿病網膜症のスタンダードな治療として今でも盛んに行われている。光凝固の有効性を確かめる目的で、米国で Diabetic Retinopathy Study (DRS) が行われ糖尿病網膜症に対する光凝固の有効性が確認された¹¹⁾。その後、Early Treatment Diabetic Retinopathy (ETDRS) によって、汎網膜光凝固 (黄斑部を除く部位の網膜に光凝固を行う) の最適施行時期について検討され、重症の非増殖糖尿病網膜

症もしくは早期の増殖糖尿病網膜症の時期に施行すべきという結果だった¹²⁾。我が国でも、日本糖尿病眼学会が主導して、前増殖糖尿病網膜症の段階で蛍光眼底造影の無灌流領域にのみ選択的光凝固（無灌流領域のみを主として光凝固を行う）を施行する研究が行われた。結果は、光凝固を施行していない群のうち41%が増殖糖尿病網膜症へ進行したのに対し、選択的光凝固を施行した群では、9%しか増殖糖尿病網膜症へ進行せず、前増殖糖尿病網膜症に対する選択的光凝固は増殖糖尿病網膜症への進行予防に有効であることが報告された¹³⁾。つまり、新生血管が認められる増殖糖尿病網膜症の時期に光凝固を行うことはもちろんだが、増殖糖尿病網膜症進行への予防という観点からは、前増殖糖尿病網膜症の段階で選択的光凝固を施行するのが、最もよい時期であると考えられる。

しかし、硝子体出血などの混濁で光凝固施行できない症例では、硝子体手術を検討する。

硝子体手術

増殖糖尿病網膜症に対する治療として、硝子体出血などで眼底がほとんど透見出来ない場合や、牽引性の網膜剥離が広範囲に生じていない限り、まず汎網膜光凝固が第1選択となる。吸収不良の硝子体出血や広範囲の牽引性網膜剥離が生じると、硝子体出血を除去するとともに硝子体出血や牽引性網膜剥離の原因となっている線維血管増殖膜を除去し、網膜を復位させる目的で硝子体手術を行う。しかし、近年では、手術機器や技術の進歩とともに病態の理解が深まり、手術の合併症や危険性が軽減したことも相まって、比較的早期の硝子体手術も施行されており、適応は広がっている。

以上のように、糖尿病網膜症の治療は、内科的治療や外科的治療の急速な進歩により、網膜症の発症・進展が抑制されたが、依然として年間3000人が失明している現状を考えると新たな治療法が必要である。最近、血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor : VEGF）に対する治療が、臨床で行われ、新たな網膜症治療の可能性を示している。糖尿病に罹患した眼において、網膜の毛細血管の閉塞により生じた無灌流領域から、血管内皮増殖因子が生成され、そのVEGFがもつ血管透過性の亢進作用により黄斑浮腫が生じ、新生血管形成作用により、増殖膜が形成され増殖糖尿病網膜症が生じる。つまり、VEGFは、糖尿病

黄斑浮腫や増殖糖尿病網膜症の病態において非常に重要な因子である。現時点で我が国では糖尿病網膜症には適応外使用である抗VEGF抗体を硝子体内に注射することでVEGFの作用を抑制し、網膜症の活動性を遅らせることができる。特に、血管新生緑内障を合併するような活動性が高い重症増殖糖尿病網膜症ではVEGFが上昇しているが、術前に抗VEGF抗体を投与しておく、一時的に網膜症の活動を抑制することで、安定した硝子体手術が行える。また、最近では、増殖糖尿病網膜症による視力障害だけでなく、糖尿病性黄斑浮腫による視力障害が問題となっており、血管透過性亢進により黄斑浮腫が生じている症例にも抗VEGF抗体は効果的である。最近わが国でも、抗VEGF抗体療法（ルセンチス）が糖尿病黄斑浮腫の適応となり、今後の治療成績の向上が期待される。しかし、糖尿病黄斑浮腫にはVEGFだけでなくさまざまなサイトカインも関与しているとされており、今後詳しい検討が必要である。

おわりに

網膜循環と糖尿病網膜症

糖尿病網膜症の病期と眼循環との関係について、これまで欧米を中心に数多くの報告がなされてきており、その大部分の対象は、他に全身合併症を有さない1型糖尿病患者を対象としており、罹病期間が短ければ網膜血流量は減少し、長くなるにつれ増加に転じるとされている¹⁴⁾が、反対に早期には網膜血流は増加しているという報告もある¹⁵⁾。これは、測定法の違いやさまざまな因子（網膜症の重症度、罹病期間、血糖値）などにより影響を受けている可能性がある。

一方、日本人の糖尿病患者の多くを占める2型糖尿病患者は、高血圧など他の全身合併症を有することが多く、これまで眼循環の詳しい検討はされていなかった。我々は、2型糖尿病患者を対象にして、レーザードップラー速度計を使用し、網膜動脈血流量を測定し、網膜症を有さないかあるいは早期の非増殖糖尿病網膜症の患者で、網膜血流量が健常人と比べ低下していることを報告している¹⁶⁾（図2）。つまり、この低下した血流を改善することで、網膜症の発症・進展を抑制できる可能性がある。さらに我々は、網膜の摘出血管の研究で、インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾン¹⁷⁾と脂質改善薬フェノフィブラート¹⁸⁾による血管

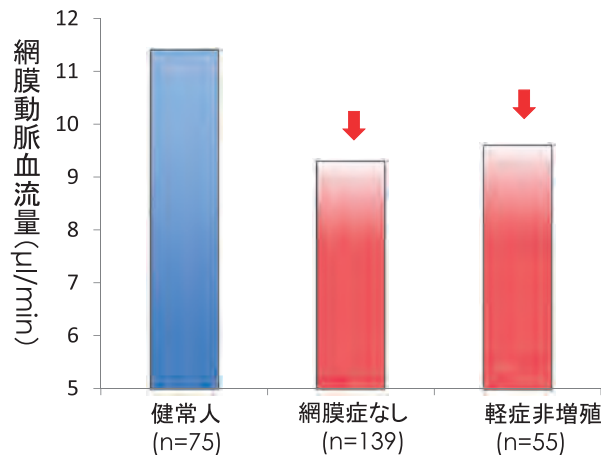


図2 2型糖尿病患者の網膜血流
(文献 14 より改変)

拡張作用を報告している。これらの血管拡張作用を有する薬剤により、網膜血流が増加して網膜症の発症・進展を抑制する可能性もあり、今後臨床研究において、その効果を検討する必要がある。実際、我々は、同様の網膜摘出血管の研究で、血管拡張効果を有する¹⁹⁾ことが示されている脂質改善薬であるシンバスタチンの内服により、健常人の網膜血流量が優位に増加することもレーザードップラー速度計で確認している²⁰⁾。ただ、他の全身因子を有さない健常人の検討であり、今後は2型糖尿病患者を対象に検討していきたい。

文 献

- 1) 中江公裕ほか：厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「網脈絡膜萎縮・視神経萎縮に関する研究」平成 17 年度総括分担研究報告書。2006
- 2) 田邊 祐資ほか：観察研究（横断・コホート研究）：舟形町スタディ。あたらしい眼科 26 : 39-44, 2009
- 3) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993 ; 329 : 977-86
- 4) The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group : Early worsening of diabetic retinopathy in the retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. Arch Ophthalmol 116 : 874-886.1998
- 5) UK Prospective Diabetes Group : Intensive blood glucose control with sulphonylurea or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patient with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 352 : 837-853, 1998
- 6) Ohkubo Y, et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus : a randomized prospective 6-year study. Diabetes Res Clin Pract 1995 ; 28 : 103-17.
- 7) 梯 彰弘 : 29 糖尿病網膜症の治療 .6 章 糖尿病合併症 糖尿病学 基礎と臨床 P1249-1253.
- 8) 七里元亮, 岸川秀樹ほか : 網膜症進展・増悪阻止のためのコントロール基準について . 糖尿病学の進歩 第 27 集 , 日本糖尿病学会編 , p114-116, 診断と治療社 , 1993
- 9) Meyer-Schwickerath RE, Schott K : Diabetic retinopathy and photocoagulation. Am J Ophthalmology 66 : 597 – 603. 1968.
- 10) Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes : UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. BMJ 1998 ; 317 : 703-13.
- 11) The Diabetic Retinopathy Study Research Group : Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy (DRS) findings, DRS Report Number 8. Ophthalmology 88 : 583-600.1981
- 12) Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group : Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Ophthalmology 98 : 766-785, 1991
- 13) The Japanese Society of Ophthalmic Diabetology, Subcommittee on Study of Diabetic Retinopathy Treatment : Multicenter randomized clinical trial of retinal photocoagulation for preproliferative diabetic retinopathy. Jpn J Ophthalmol 56 : 52-59, 2012
- 14) Konno S, Feke GT, Yoshida A et al. Retinal blood flow changes in type I diabetes. A long-term follow-up study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996 ; 37: 1140-1148.
- 15) Patel V, Rassam S, Newsom R et al : Retinal blood flow in diabetic retinopathy. BMJ 1992 ; 305 : 678-683

- 16) Nagaoka T, et al. Impaired Retinal Circulation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus : Retinal Laser Doppler Velocimetry Study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 ; 51 :6729-6734
- 17) Omae T, et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, induces dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and potassium channels. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 ; 52:6749-6756.
- 18) Omae T, et al. Fenofibrate, an Anti-Dyslipidemia Drug, Elicits the Dilation of Isolated Porcine Retinal Arterioles: Role of Nitric Oxide and AMP-Activated Protein Kinase. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 : 53: 2880-2886.
- 19) Nagaoka T, et al. Simvastatin elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and mevalonate-rho kinase pathways. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 : 48: 825-832.
- 20) Nagaoka T, et al. Effect of systemic administration of simvastatin on retinal circulation. Arch Ophthalmol. 2006: 124: 665-670.

投稿論文

卒乳・断乳の決定に影響を与える要因

笹 川 朝 子*・黒 田 緑**

【要 旨】

本研究は母親が卒乳・断乳を決める際に、どのような要因に影響を受けているのかを明らかにすることを目的とした。1歳6か月児を持つ母親のうち授乳を終了しているもの74人を対象とし調査した結果、卒乳群は21人(28.4%)、断乳群は52人(70.3%)であった。卒乳・断乳の理由と各因子間の関連における重回帰分析の結果、授乳終了には「子が自然に飲まなくなった」(標準偏回帰係数(以下、 β とする) = -0.87 , $P < 0.001$) 場合がもっとも大きな要因であった。次いで、母子間のコミュニケーションが機能し、母子間のみではあるが意志の疎通ができるようになったこと($\beta = -0.25$, $P < 0.001$)で、母子の間に信頼関係が築かれることが卒乳に影響を与えていた。一方、母親の因子である「乳房のトラブル」($\beta = -0.19$, $P < 0.001$)は断乳の決定に関与していることが明らかになった。

キーワード 卒乳、断乳、母乳育児、授乳

緒 言

授乳の終了について松永¹⁾は「断乳は、母親にとって子どもとの身体的分離であり、子どもとの新たな関係を形成する出発点である」、「その過程で母親の思いは常に揺らいでいた。」と述べている。授乳の終了時に母子は不安を抱いていると考える。母子の不安や授乳終了の際の苦痛や迷いを軽減し、母子にとって自然な形で授乳を終了することがその後の母子関係に良い影響を与えると考える。本研究は、卒乳・断乳の実態と、卒乳・断乳のどちらかを決める際の影響因子は何か、その後の母子の納得感等を明らかにすることを目的とした。

研 究 方 法

1. 研究方法：本研究は、授乳終了の決定に際して、母の要因として、精神的項目、社会的項目、身体項目、授乳項目、子の項目の5項目と、子の要因として、発達項目、コミュニケーション項目、摂食項目の3

項目を考えた。また、授乳終了後、母の身体的・精神的にどのような変化がみられたか、子に身体的ストレス、行動・摂食の変化がみられたかを明らかにすることを目的とした。(図1)

2. 研究対象：2008年6月から8月の3か月間に1歳6か月健診を受ける児を持つ母親を対象とした。

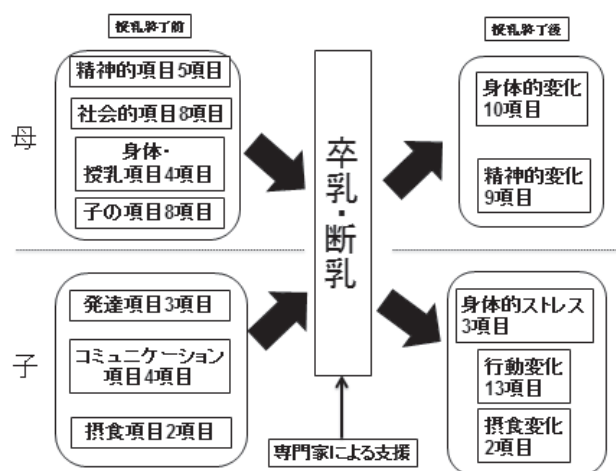


図1 研究概念図

*元旭川医科大学医学部 看護学講座 **旭川医科大学医学部 看護学講座

3. 調査方法：1歳6か月健診を受ける児を持つ母親への健診のお知らせ郵送時に母親への質問紙調査票を同封し、1歳6か月健診来所時に回収した。

4. 調査項目：対象者の属性、栄養方法・卒乳・断乳方法等基本的事項、および母親の授乳終了前は『精神的項目』5項目（4件法、得点範囲5～20点、高得点ほど授乳終了前に負の感情を感じていたことを意味する）、授乳終了後の『母の身体的変化』10項目（4件法、得点範囲10～40点、高得点ほど授乳終了後に身体的症状がみられたことを意味する）、『母の精神的変化』9項目（4件法、得点範囲9～36点、高得点ほど授乳終了後に負の感情を感じていたことを意味する）、『母親の納得感』について、各4件法にて調査した。次に、授乳終了の理由20項目の中から卒乳・断乳の決断に強く影響したもの3つを選択してもらった。授乳終了の理由20項目とは、母親の『社会的項目』8項目（2件法、得点範囲8～16点、高得点ほど授乳終了の理由に社会的影響を選択していたことを意味する）、『身体・授乳項目』4項目（2件法、得点範囲4～8点、高得点ほど授乳終了の理由に身体・授乳の影響を選択していたことを意味する）、母親が授乳終了の理由とした『子の項目』8項目（2件法、得点範囲8～16点、高得点ほど授乳終了の理由に子の状態を選択していたことを意味する）、とした。子の授乳終了前は、『子の発達項目』を3項目（2件法、得点範囲3～6点、高得点ほど子の発達がすすんでいる）、『コミュニケーション項目』4項目（2件法、得点範囲4～8点、高得点ほどコミュニケーションがすすんでいる）。「摂食項目」2項目（2件法、得点範囲2～4点、高得点ほど離乳が進んでいる）とした。子の授乳終了後について、「子の身体的ストレス症状」3項目（2件法、得点範囲3～6点、高得点ほどストレスがみられた）、『子の行動変化』13項目（4件法、得点範囲13～52点、高得点ほど授乳終了後にネガティブな反応がみられたことを意味する）、『子の摂食変化』2項目（4件法、得点範囲2～8点、高得点ほど授乳終了後の摂食に関して良い変化がみられたことを意味する）とした。また、専門家（医師、助産師、看護師など）による支援の有無・時期について調査した。

5. 用語の定義：子の出生後より生後5・6か月までの

間主に母乳により栄養を得ていたものを「母乳栄養」、母乳と人工乳により主な栄養を得ていたものを「混合栄養」、主に人工乳により栄養を得ていたものを「人工栄養」とした。

卒乳とは、子どもと相談して納得してやめた²⁾場合、または子どもから自然に飲まなくなった場合とし、断乳とは母親が意図的にあげなかった場合とした。また、母の「納得感」を母子が『これでよかったんだ』と承知すること、とした。

6. 分析方法：授乳終了方法において卒乳したもの（以下卒乳群）と断乳したもの（以下断乳群）に分け記述統計を行った後、調査項目ごとに平均点を算出し、Mann-Whitney 検定を行った。「母親の納得感」について、「納得している」と回答した群（以下納得群）と「納得していない」と回答した群（以下非納得群）に分け、各要件・変化について納得群・非納得群別の平均点を算出し、Mann-Whitney 検定を行った。卒乳・断乳の理由と各因子間の関連を明らかにするために、重回帰分析（変数減少法）を行った。統計解析にはSPSS12.0Jを用いた。有意確率は $P < 0.05$ （少数第3位以下切り捨て）とした。

質問紙の妥当性の検討は、事前にプレテストを行い、内容を再度検討した。また、要件ごとにクロンバックの α 係数を算出した。質問内容の妥当性の検討は、授乳終了前の母親の「子の項目」（クロンバックの α 係数=0.44）、授乳終了後の「母の身体的変化」（ α =0.88）、「母の精神的変化」（ α =0.74）、授乳終了前の「子の発達項目」（ α =0.46）、「コミュニケーション要件」（ α =0.50）、「子の摂食変化」（ α =0.75）、授乳終了後の「子の行動変化」（ α =0.73）の7項目の内的整合性を確認した。質問紙の妥当性は、低いものであった。

7. 倫理的配慮：1歳6か月健診対象児の母親に研究の目的と内容を記載した自記式質問紙調査票を郵送にて配布した。質問紙調査票には、研究への参加は自由意志によること、質問紙調査票は無記名とし、データ収集・分析、研究成果の公表・活用の何れの段階においても、個人が特定されることは無いことを明記した。質問紙調査票への記入をもって、研究参加の承諾を得ることを明記した。

結 果

1. 調査票の回収状況と研究対象の属性

対象者 368 人中、322 人から回答を得た（回収率 87.5%）。そのうち、母乳栄養 185 人（57.5%）、混合栄養 79 人（24.5%）、人工栄養 54 人（16.8%）、不明 4 人（1.2%）であった。また、母乳栄養であり、周産期の母体の健康状態、子の発達・発育に問題がない本研究の該当者 117 人のうち、有効回答は 111 人であった（有効回答率 94.8%）。そのうち授乳を終了しているものは 74 人（66.6%）、卒乳群 21 人（28.4%）、断乳群 52 人（70.3%）、不明 1 人であった。父母の年齢、児の出生体重、妊娠週数、体重、身長、出産方法、第何子か、児の性別に有意な差はみられなかった。（表 1）

2. 卒乳・断乳の現状

授乳終了時期は、全体（ $n=74$ ）で平均 13.6 ± 2.9 か月（以下、平均値 $\pm$ 標準偏差）、卒乳群（ $n=21$ ） 13.0 ± 2.3 か月、断乳群（ $n=52$ ） 13.8 ± 3.1 か月であった。2 群間に有意な差はみられなかった。

授乳終了直前の 1 日の授乳回数は、全体で 3.7 ± 2.4 回/日、卒乳群 2.4 ± 1.7 回/日、断乳群 4.2 ± 2.5 回/日であった。断乳群の授乳回数は有意に多かった（ $P < 0.05$, Mann-Whitney）。（図 2）

3. 卒乳・断乳前後の母子の身体面・精神面

1) 卒乳・断乳前後の母親の身体面・精神面

授乳終了前の母親は、授乳終了の負担感を表す「精神的項目」は全体の平均値 12.2 ± 2.8 点、卒乳群 11.1 ± 2.7 点、断乳群 12.7 ± 2.8 点で、断乳群では授乳終了前に負の感情を抱いている母親が多い傾向があった（ $P=0.05$, Mann-Whitney）。（図 3）

授乳終了の理由としての「子の項目」は全体の平均値 8.9 ± 0.7 点、卒乳群 9.6 ± 0.7 点、断乳群 8.5 ± 0.5 点であり、子の条件が授乳終了の理由に有意に影響を及ぼしていた（ $P < 0.000$, Mann-Whitney）。（図 4）

授乳終了後の「母の身体的変化」は全体の平均値 20.1 ± 7.0 点、卒乳群 17.5 ± 5.1 点、断乳群 21.5 ± 7.4 点で、断乳群の母親は授乳終了後に身体的症状がみられた（ $P < 0.05$, Mann-Whitney）。（図 5）

「母の精神的変化」は全体の平均値 20.0 ± 5.2 点、卒乳群 17.2 ± 4.5 点、断乳群 21.2 ± 5.2 点で、断乳群は授乳終了後に負の感情を抱いている母親が有意に多かった（ $P < 0.05$, Mann-Whitney）。（図 6）

2) 卒乳・断乳の前後の子の身体的・精神的変化

授乳終了前の子では、「摂食変化」は全体の平均値 3.4 ± 0.7 点、卒乳群 3.7 ± 0.5 点、断乳群 3.3 ± 0.8 点で、授乳終了前の卒乳群は離乳が進んでおり、断乳群の子

表 1 対象者の属性

項目	全体 $n=74^{1)}$	卒乳群 $n=21$	断乳群 $n=52$	Mann-Whitney 検定
母年齢(歳)	30.7 ± 4.6	31.8 ± 4.3	30.3 ± 4.8	0.34
父年齢(歳)	33.3 ± 5.7	31.9 ± 8.3	33.4 ± 6.1	0.93
出生体重(g)	3055.1 ± 393.5	3015.8 ± 407.5	3075.2 ± 392.9	0.61
妊娠週数(週)	38.9 ± 1.2	38.6 ± 1.2	39.1 ± 1.2	0.14
現在の体重(g)	10.4 ± 1.0	10.6 ± 0.9	10.3 ± 1.0	0.26
現在の身長(cm)	79.8 ± 2.7	79.9 ± 2.7	79.7 ± 2.7	0.87
カウプ指数	16.3 ± 1.1	16.6 ± 1.2	16.2 ± 1.1	0.14
出産方法 (人)	自然分娩	18(85.7%)	45(86.5%)	0.87
	その他の分娩	2(2.7%)	0	
	帝王切開	3(14.3%)	5(9.6%)	
第何子か (人)	第 1 子 ²⁾	10(50.0%)	28(53.8%)	0.73
	第 2 子			
	以降 ²⁾	10(50.0%)	24(46.2%)	
児の性別 (男/女) ²⁾	31(41.9%)/42(56.8%)	9(45.0%)/11(55.0%)	22(42.3%)/30(57.7%)	0.83

注) 1) 卒乳断乳方法不明者 1 名あり。

2) 卒乳群に不明 1 名あり。

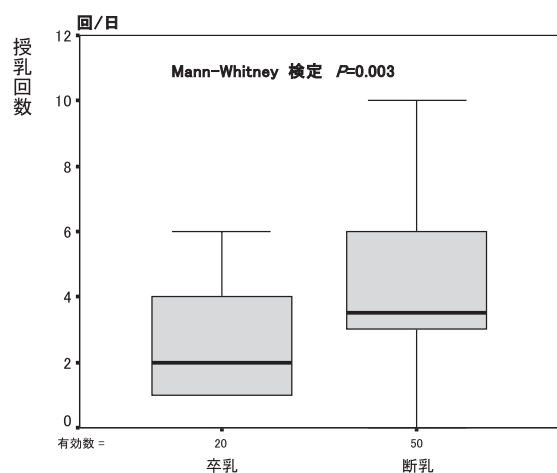


図2 授乳終了直前の1日の授乳回数

注) 1) 卒乳断乳方法不明者1名あり。
2) 欠損値3あり。

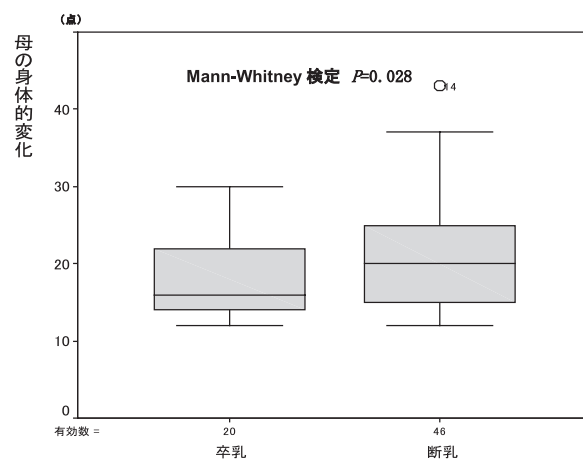


図5 授乳終了方法と母の身体的変化(授乳終了後)

注) 1) 卒乳断乳方法不明者1名あり。
2) 欠損値7あり。

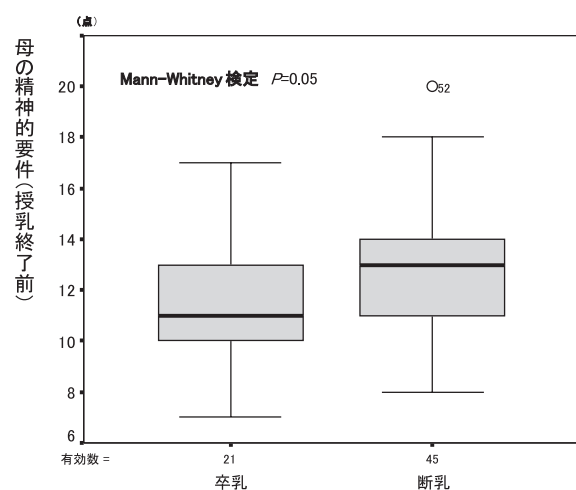


図3 授乳終了方法と母の精神的項目(授乳終了前)

注) 1) 卒乳断乳方法不明者1名あり。
2) 欠損値7あり。

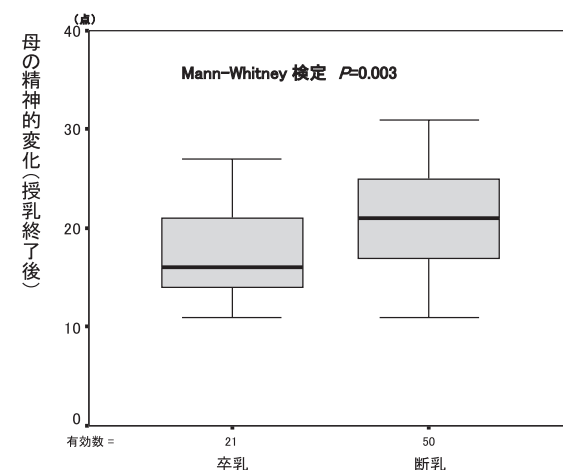


図6 授乳終了方法と母の精神的変化(授乳終了後)

注) 1) 卒乳断乳方法不明者1名あり。
2) 欠損値2あり。

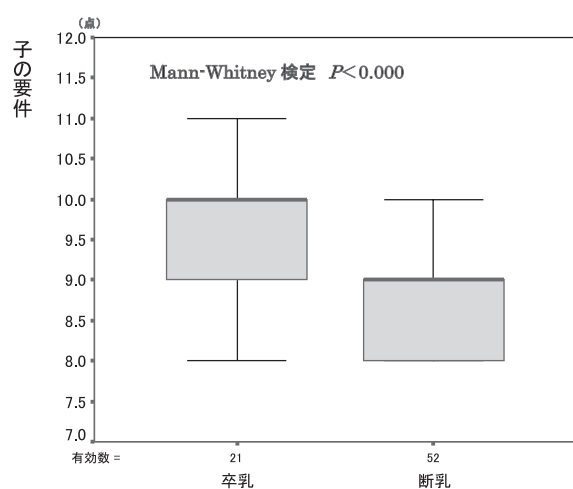


図4 授乳終了方法と子の項目

注) 1) 卒乳断乳方法不明者1名あり。

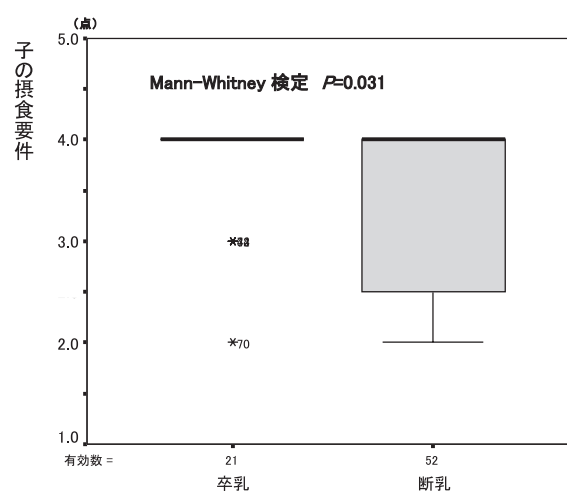


図7 授乳終了方法と子の摂食変化(授乳終了前)

注) 1) 卒乳断乳方法不明者1名あり。

は有意に離乳が進んでいなかった ($P < 0.05$, Mann-Whitney)。(図 7)

授乳終了後の子の変化は、「子の行動変化」は全体の平均値 23.1 ± 5.1 点、卒乳群 21.1 ± 4.6 点、断乳群 23.8 ± 5.1 点で、断乳群の子は授乳終了後にネガティブな反応が多くみられていた ($P=0.05$, Mann-Whitney)。(図 8)

4. 卒乳・断乳の理由

卒乳・断乳のきっかけと各因子間の関連において、最も影響を与えていたのは「子が自然に飲まなくなった」($\beta = -0.87$, $P < 0.001$)、次いで「子が大人の言う簡単なことばをわかるようになった」($\beta = -0.25$, $P < 0.001$)であった。母側の因子として影響を与えていたのは「乳房のトラブル(痛み・発赤など)がなかった」($\beta = -0.19$, $P < 0.001$)であった。また、調整済み R^2 乗は 0.77 であった。(図 9)

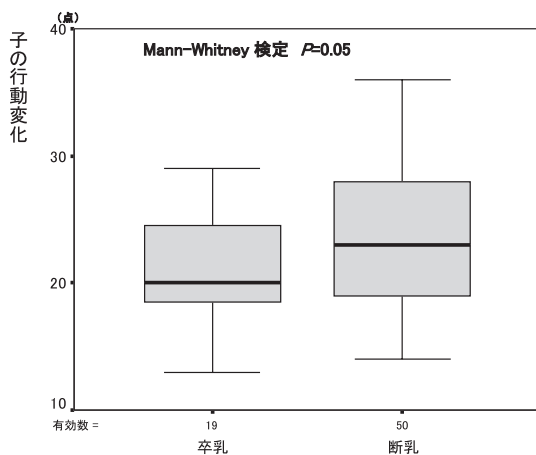


図 8 授乳終了方法と子の行動変化(授乳終了後)

注) 1) 卒乳断乳方法不明者 1 名あり。
2) 欠損値 4 あり。

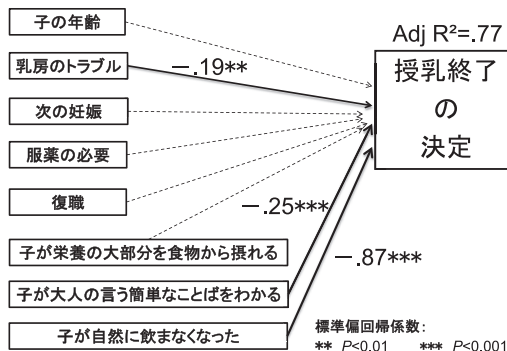


図 9 授乳終了の決定に影響を与える要因

5. 卒乳・断乳決定後の母子の納得感について

母親の「納得のいく形」での卒乳・断乳であったかについては、全体は納得群 65 人 (87.8%)、非納得群 8 人 (10.8%)、不明 1 人 (1.4%) であった。

納得群と非納得群の 2 群間比較では、授乳終了後の「母の精神的変化」は非納得群 24.5 ± 3.3 点、納得群の平均値 19.8 ± 5.5 点で、授乳終了後の母親が負の感情を抱いていると母親の納得感は低かった ($P=0.005$, Mann-Whitney)。(図 10)

母親の納得感と子の授乳終了前の「コミュニケーション項目」は非納得群 7.2 ± 0.9 点、納得群の平均値 6.4 ± 1.1 点で、両群間で有意な差が見られた ($P < 0.05$, Mann-Whitney)。(図 11)

また、「子の摂食変化」は非納得群 3.5 ± 1.0 点、納

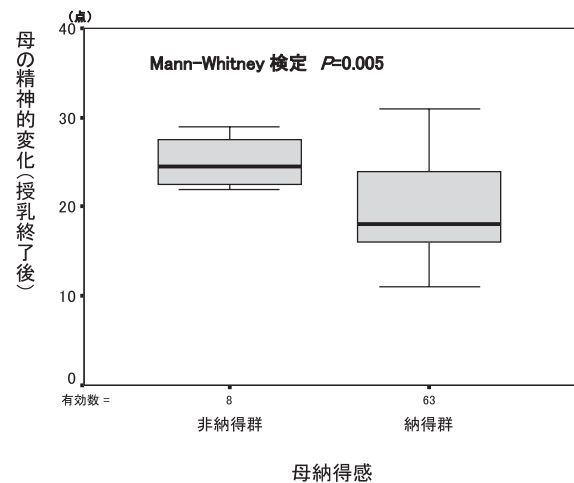


図 10 母の納得感と母の精神的変化(授乳終了後)

注) 欠損値 3 あり

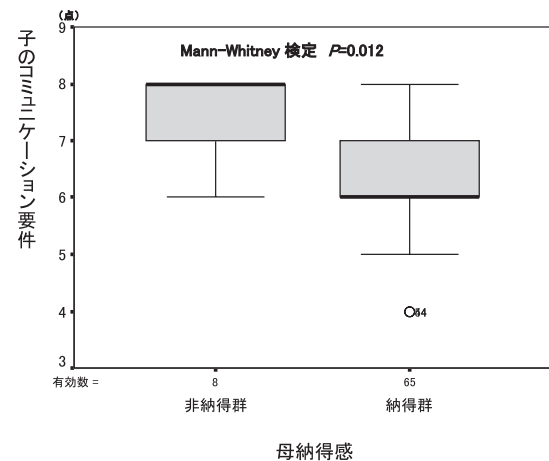


図 11 母の納得感と子のコミュニケーション項目

注) 欠損値 1 あり

得群の平均値 3.5 ± 0.7 点で、有意な差がみられた ($P < 0.05$, Mann-Whitney)。(図 12)

授乳終了後では、「子の行動変化」は非納得群 28.7 ± 6.1 点、納得群の平均値 22.4 ± 4.5 点で、授乳終了後の子がネガティブな反応をしていると、母親の納得感は低かった ($P < 0.05$, Mann-Whitney)。(図 13) 母の納得感と各項目・変化の関連について図 14 に示す。

6. 卒乳・断乳時の専門家の支援

卒乳・断乳に関する支援を受けたものは 19 人 (25.7%)、受けていないものは 48 人 (64.9%)、不明 7 人 (9.5%) であった。支援を受けた時期は、「その他」12 人 (断乳時 3 人、出産時以外の母親または子どもの入院時 3 人、定期的に 2 人、仕事復帰前 2 人など) が最も多く、次いで「1 歳時」5 人、「1 ヶ月健診時」2 人、「出産による入院中もしくは退院時」「3・4 ヶ月健診時」各 1 人であった。

考 察

1. 卒乳・断乳の現状

授乳を終了している母親のうち卒乳群 28.4%、断乳群 70.3% であり、龍ら³⁾の結果と同様に断乳群が卒乳群の 2 倍以上であり、本研究においても断乳を選択する母親が多いことがわかった。卒乳・断乳した時期は全体の平均は 13.6 ± 2.9 か月であった。これまでの「1 歳前後までに断乳する」という慣習と同様の結果であった。

卒乳群の授乳回数は、断乳群よりも有意に少なかった。卒乳群は授乳終了前に離乳が進んでいる傾向がみられ、授乳回数が少ないことから多くの栄養量を離乳食から得ていると考える。

2. 母子の身体面・精神面

1) 卒乳群の母子の身体面・精神面

卒乳群の母親は、断乳群に比べて身体的な症状が少なく、負の感情を抱いている母親が少なかった。また、「子が自然に飲まなくなった」などの子の様子を理由として授乳終了していることが示唆された。

卒乳群の子の卒乳直後の様子では、身体的ストレス症状はみられず、子の様子もネガティブな変化は少なかった。卒乳群の子は卒乳後のストレスが少なかったと考える。

2) 断乳群の母子の身体面・精神面

断乳群の母親は、「乳房の緊満感」などの身体的な

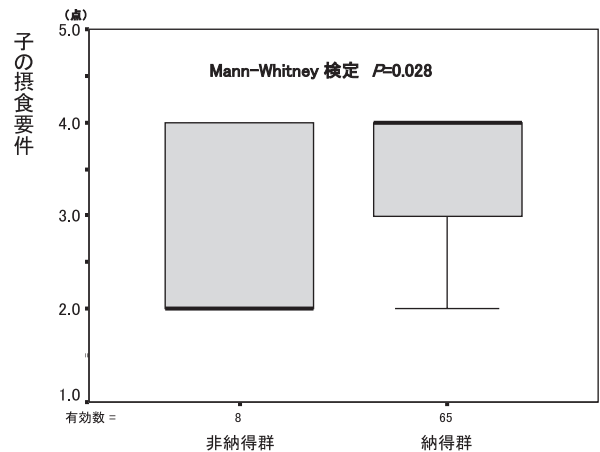


図 12 母の納得感と子の摂食変化
注) 欠損値 1 あり

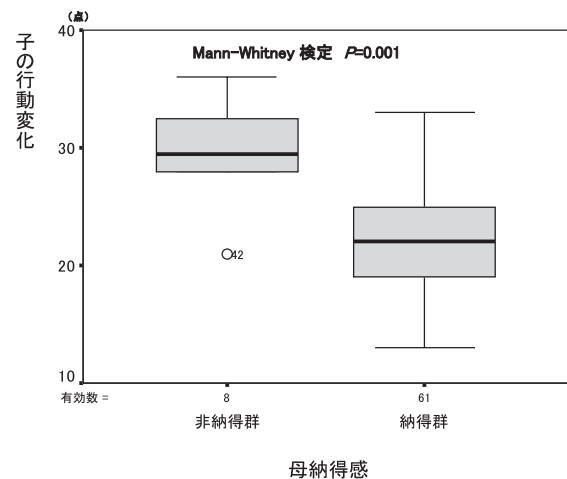


図 13 母の納得感と子の行動変化
注) 欠損値 5 あり

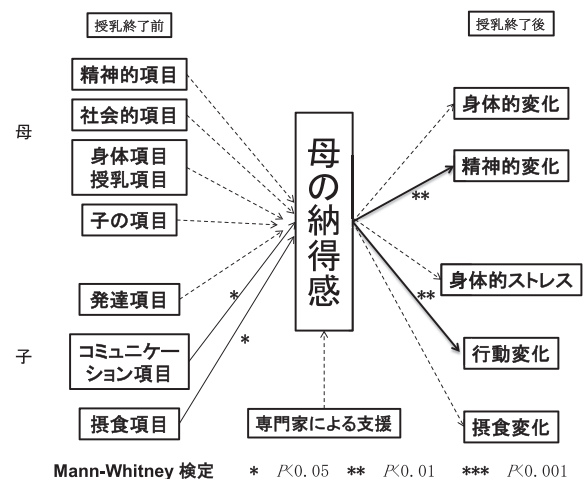


図 14 母の納得感と各項目・変化の関連

症状が多くみられた。断乳群は、授乳終了前の授乳回数が卒乳群よりも多かったため、身体的な症状が多く、辛い状況にあると考える。また精神面では、授乳終了前は「うまくいくか不安だった」などの負の感情を抱いており、授乳終了後は「後悔している」など負の感情を抱いていた。身体的につらい状況にある母親は、精神的な面でも負の感情に傾きやすく、その上断乳後の子のネガティブな反応を見ることにより、断乳群の母親は迷いが多く、気持ちが揺れ動きやすい状態にあると考える。

断乳群の子の離乳の特徴は、卒乳群より授乳終了前の離乳が進んでいなかった。これは、授乳回数と密接に関係していると考えられる。断乳群では多くの栄養量を授乳から得ていると考える。授乳終了後は、断乳群の子は卒乳群と比較して授乳終了後にネガティブな行動変化が多くみられる傾向があった。根ヶ山⁴⁾は「離乳課程とは、依存と自立の混在した過程」としている。このことから断乳後の子は、母親から一方的に子の主導性やレディネスを十分に考慮しないで行われる突然の授乳の終了に、子は自立を阻害されたと不全感やストレスを感じており、そのため断乳後にさまざまなネガティブな反応がみられていると考える。

3. 卒乳・断乳の決定に影響を与えている要因

授乳終了方法を決定する際には「子が自然に飲まなくなった」場合の影響がもっとも大きく、子の条件が非常に大きく影響したと考えられる。また、「子が大人の言う簡単なことばをわかるようになった」は、母子間のコミュニケーションが機能していることを示している。卒乳の決定には、子の条件が影響していると考えられる。

一方、「乳房のトラブル（痛み・発赤など）がつらかった」は、母の条件であり、断乳の決定に関与していると考えられる。

4. 卒乳・断乳と母の納得感

子が納得しないままに授乳を終了した場合、子とのコミュニケーションが機能している母親は、子の不満足を察知し、母の納得感を低下させたと考える。根ヶ山⁵⁾は「相互の主張を交わしつつ相手を尊重して調整・譲歩をし、妥協点を探りあっていくという体験の積み重ねは、親と子どもの双方に親業・子業をこなすという効力感と相手への信頼を培う過程となる。」と述べている。本研究では母子間のコミュニケーション

が機能し、母子の間でのみ伝わる方法などで相互に主張し調整・譲歩をし妥協点を探りあえるようになったことで、母子の間に信頼関係が築かれることが卒乳に影響を与えていたと考える。どちらか一方のみの主張で授乳を終了するのではなく、母子が相互に十分に主張し調整・譲歩し妥協点を探りあい、どちらも納得して授乳を終了するよう努力をしていくことが自然な形で授乳の終了であると考えられる。

また、授乳終了前の子の離乳が進んでいない場合、授乳回数が多く、その結果授乳終了後の母に身体的な症状があり、他方子にはネガティブな変化がみられる。授乳終了後の母の苦痛や子のネガティブな変化が、母の納得感をさらに低下させたと考える。授乳終了後では、子のネガティブな反応をみることは、母にとって授乳の終了に子が納得していないとの思いを抱かせ、母の納得感は低くなったと考える。またその結果、母親は授乳終了後に負の感情を抱き、さらに母の納得感を低下させたと考える。

5. 卒乳・断乳に関する支援

卒乳・断乳に関する支援を受けた母親は全体の1/4であった。また支援を受けた時期は不定期で母親が支援を受けるため自分から連絡等をしなければいけない現状が考えられる。

本研究では授乳終了時期は平均して13.6 ± 2.9 か月であった。市町村による乳幼児定期健康診査は3・4 か月健診以降、1歳6か月まで実施されておらず、その間は母親の任意受診となっている。この時期の全ての母親に支援を受ける機会が設けられていないことも支援を受けた母親が少なかった要因ではないだろうか。中尾ら⁶⁾は離乳の時期は「母乳育児を楽しむというよりは、『いつまでお乳を飲むのだろうか』と先の見えない不安と拘束感に悩まされる不安定な時期にいる」と述べ、離乳（卒乳・断乳）時期に育児不安が高まるとしている。授乳の終了を母子が対話し、お互いに納得して授乳を終了することができるよう望ましい授乳の終了についての経験者や専門家の支援が必要と考える。

6. 本研究の限界と課題

授乳終了の状況は、大変個人差の大きい状況であると考えられるが、本研究で利用した質問紙の妥当性が低いものであった点と、質問紙での回答であったため、個々の状況が把握しにくかったと考える。個別性が反映さ

れるよう今後研究方法を検討していく必要がある。

結 論

- 1) 卒乳・断乳の決定に影響を与えている要因は「子が自然に飲まなくなった」、「子が大人の言う簡単なことばをわかるようになった」、「乳房のトラブル（痛み・発赤など）がなかった」の3項目であることが示唆された。
- 2) 卒乳群の母子は、卒乳後の身体的・精神的ストレスが少なかった。
- 3) 断乳群の母親は、断乳後の身体的な症状が多く、負の感情を抱いていた。また、断乳群の子は、ネガティブな行動変化が多くみられる傾向があった。

（本研究は2008年度旭川医科大学医学系研究科修士課程修士論文の一部を加筆修正したものである）

謝 辞

本研究にご協力いただきました対象者の皆様と、市町村保健センターの皆様に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 松永佳子：断乳を受け入れるまでの母親のゆらぎ、日本助産学会誌、16 (1)、48-57、2002
- 2) 堀内勁：断乳と卒乳 2. 卒乳、周産期医学、35、348-351、2005
- 3) 龍美智子，渡辺香奈，西カンナ，ほか：授乳法による乳離れ形態と母役割達成感尺度との関連（第1報）－卒乳と断乳に焦点をあてて－、母性衛生学会誌、47 (1)、89-98、2006
- 4) 根ヶ山光一：離乳と母子関係：桶谷式断乳とラ・レーチェ・リーグ式卒乳の比較、行動科学、36 (1・2)、1-11、1997
- 5) 根ヶ山光一：〈子別れ〉としての子育て、日本放送出版協会、2006
- 6) 中尾優子，前田規子，宮原春美：「卒乳」乳離れ・離乳・断乳との概念関係に関する一考察、長崎大学医学部保健学科紀要、14 (2)、65-69、2001

Factors affecting the decision of Sotsunyu (child-initiated weaning) and Dannyu (mother-initiated weaning)

SASAKAWA Asako* KURODA Midori*

Summary

The objective of this study is to demonstrate factors that affect mothers in making decisions of weaning (SOTSUNYU/DANNYU). The results of the survey with 74 subjects who had an 18-month-old baby were classified into two groups: the SOTSUNYU group had 21 subjects (28.4%) and DANNYU group had 52 subjects (70.3%). We conducted a multiple regression analysis, focusing on the correlations between the reasons and factors of the weaning and termination of breast-feeding. As a result, it was found that “the child stopped breast-feeding in the course of nature” (standardised partial regression coefficient $\beta = -0.87$, $P < 0.001$) was the most frequent factor for the termination of lactation. As well, the factor that mutual trust has been built between mother and child because communications between them began functioning and they could canalize their will just between them ($\beta = -0.25$, $P < 0.001$) affected the weaning. In addition, “trouble with the breast”, which is a factor of the mother ($\beta = -0.19$, $P < 0.001$) was also found to have affected the decision of termination of breast-feeding.

Key words child-initiated weaning, mother-initiated weaning, lactation, breast-feeding lactation

* Asahikawa Medical University, Department of Nursing

博士学位論文

Species identification and strain typing of dermatophytes by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the ribosomal DNA and polymerase chain reaction analysis of subrepeat elements in the intergenic spacer region of *Trichophyton rubrum*

Ichiro Takahashi*, Kazutaka Fukushima**, Makoto Miyaji**,
Kazuko Nishimura**, Kazuhiro Asano*, Hajime Iizuka*

【要 旨】

The PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis is a rapid and convenient technique for the detection of mutations and allelic variants. We applied this technique for the identification of various dermatophyte species. We also examined genetic polymorphisms in intra-species of 2 major dermatophytes, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. The PCR products including internal transcribed spacer (ITS) 1 region of ribosomal DNA (rDNA) of *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. verrucosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Epidermophyton floccosum* were analyzed. Specific SSCP patterns for each species were obtained. This result indicated that the system is useful for species identification. SSCP analysis of the amplified products from the posterior part of the D1/D2 (5' end domain of the 26S rDNA) regions manifested the presence of 2 distinctive types of *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. The difference proved to be one nucleotide substitution, C → T. There was no clear correlation between the genotype patterns and morphological phenotypes of this fungus. On the other hand, no intra-species polymorphism was detected in *T. rubrum* by PCR-SSCP analysis using the region including ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 and D1/D2, totally spanning about 1.2 kbp. Subsequent PCR analysis of non-transcribed intergenic spacer (IGS) region of *T. rubrum* showed the occurrence of numerous intra-species polymorphisms. The system should be useful for epidemiological surveillance of dermatophyte infection and give us new insights into pathogenicity of dermatophyte species.

Key words Dermatophytes, Identification, SSCP, PCR, Polymorphism

INTRODUCTION

Dermatophytes are a group of closely related keratinophilic fungi capable of invading keratinized tissue (skin, hair and nails), causing dermatophytoses (commonly known as tinea or ringworm) in humans and animals.

Taxonomically, dermatophytes consist of three genera: *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton*. Except for *Epidermophyton* with one recognized species (*E. floccosum*), *Microsporum* and *Trichophyton* have various species, many of which are pathogenic for humans¹⁾. Although more than 40 dermatophyte species have been

* Department of Dermatology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Hokkaido, Japan

** Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, Chiba, Japan

accepted as pathogenic²⁾, less than 10 dermatophyte species are frequently isolated from humans. Accurate identification of these species is important clinically and epidemiologically, since the prognosis and therapy may vary depending on each species.

The conventional laboratory identification methods for these dermatophytes are based on the examination of colony appearance and microscopic morphology. These methods are occasionally time-consuming, as *in vitro* culture may require 2-4 weeks. Furthermore, due to atypical phenotypic isolates with unusual conidia formation or pigment production, the identification of each dermatophyte species is occasionally difficult, even by the use of nutritional requirement and mating tests. For example, *T. rubrum* without red pigment production can be easily confused with *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

On the other hand, identification methods based on the genotype analysis are considered to be more accurate and reproducible. Recently various molecular analyses based on PCR techniques, such as random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis^{3) 4)}, PCR fingerprinting method⁵⁾, arbitrarily primed PCR technique^{6) 7)} and direct sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region^{8) 9)} have been developed for the identification of dermatophyte species.

In eukaryotes, the genes for 18S (16S-like), 5.8S, and 26S (23S-like) rDNA are usually arranged as tandem repeats separated by a non-transcribed intergenic spacer (IGS). Two internal transcribed spacer (ITS) regions (ITS1 and ITS2) are located between the fungal genomic 18S and the 26S rDNA. The D1/D2 region is another divergent domain located within the 26S rDNA. As reported previously⁸⁻¹⁴⁾, these regions have been shown to be useful for phylogenetic analysis and species identification of various fungi. The IGS contains variable numbers of repetitive sequence motifs which are responsible for rDNA repeat length polymorphisms^{15) 16)}.

PCR-SSCP analysis is an electrophoretic technique that has been developed for the detection of mutations, mainly in human genetics^{17) 18)}. Under non-denaturing conditions, single-stranded DNAs will fold into secondary structures (conformations) according to their nucleotide

sequences and their physicochemical environment such as running temperature and pH of the gels. Because of distinctive electrophoretic mobility, different conformations can be separated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Recently, PCR-SSCP analysis has been applied for various clinically isolated pathogenic fungi¹⁹⁻²²⁾.

In this study, we amplified the ITS1 region of rDNA, and performed SSCP analysis to identify various clinically available dermatophyte species, such as *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. verrucosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*. We further examined intra-species polymorphisms of 2 major pathogenic dermatophytes for human, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* by using the PCR-SSCP technique. As no intra-species polymorphism was detected by SSCP analysis of *T. rubrum*, we amplified subrepeat elements in the IGS region for strain typing. Our results indicate that combination of these molecular techniques provide us useful information for species identification and intra-species polymorphisms of pathogenic dermatophyte fungi.

MATERIALS AND METHODS

Fungi used. Six dermatophyte species, *T. rubrum* (IFM 51254), *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (IFM 51256), *T. verrucosum* (IFM 51259), *M. canis* (IFM 51260), *M. gypseum* (IFM 47489) and *E. floccosum* (IFM 51261) were obtained from the Research Center for Pathogenic Fungi & Microbial Toxicoses, Chiba University (IFM culture collection). In addition, 87 strains of dermatophyte isolated from patients, *T. rubrum* (n=55) and *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (n=32) were examined. The strains of clinical isolates were identified by conventional methods, on the basis of their colony appearance and microscopic characteristics.

DNA isolation. A modification of the procedure described previously was used in extracting DNA from fungi^{23) 24)}. Briefly, all organisms were cultured on PDA (potato dextrose agar: Difco, USA) at 27 °C for 21 days. A small mount of fungi grown on PDA was suspended in 300μl of extraction buffer consisting of 200 mM Tris-HCl (pH 8.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA and 0.5% sodium

dodecyl sulfate. Then it was crushed with conical grinder and incubated at 100°C for 15 min and then placed on ice for 10 min. The supernatants collected after centrifugation at 13,000 rpm for 5 min was extracted once with equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and subsequently extracted once with equal volume of chloroform/isoamyl alcohol (24:1). The extract combined was mixed with 50 µl of 3.0 M sodium acetate and precipitated with 500 µl of isopropanol at room temperature for 15 min. And then the DNA was washed with 500 µl of cold 70% ethanol, dried, and suspended in 100 µl of sterile distilled water. Extracted DNA was diluted 1:100 in distilled water in preparation for use as a template in PCR.

PCR amplification for SSCP analysis. The following primers were used for the amplification of ITSs regions and D1/D2 domain. ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', ITS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3', ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3', and ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'¹⁴⁾ for ITSs, and NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3', NL2A: 5'-CTTGTTGCTATCGGTCTC-3', NL-3A: 5'-GAGACCGATAGCGAACAAG-3' and NL4G: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'^{12) 25)} for D1/D2, respectively. PCR was performed in a 0.5 ml microcentrifuge tube, with a total volume of 50 µl of the reaction mixture containing 25.75 µl of distilled water, 5.0 µl of each two primers (2.0 pmol/µl), 0.25 µl of Ex Taq polymerase (1.25 U) (Takara, Shiga, Japan), 4.0 µl of dNTP mixture (2.5 mM for each) (Takara), 5.0 µl of 10 × Ex Taq buffer (Takara) and 5.0 µl of genomic DNA samples. The amplification reaction were performed by a TM 3000 PCR thermal cycler (Takara) with the following cycling parameters; ITS regions: 1 cycle of 94 °C for 4 min, 35 cycles of 94°C for 2 min, 55°C for 2 min, 72°C for 2 min, and 1 cycle of 72°C for 10 min, D1/D2 regions: 1 cycle of 95 °C for 5 min, 36 cycles of 94 °C for 1 min, 52 °C for 2 min, 72°C for 2 min, and 1 cycle of 72°C for 5 min.

SSCP analysis. The gel was consisted of 2.5 ml MED gel solution (BioWhittaker Molecular Applications), 600 µl of 10 × Tris-borate-EDTA (TBE), and 6.9 ml of distilled water. The gel solution was degassed under vacuum

pump until no bubbles were visible. After the acrylamide solution was degassed, 40 µl of ammonium persulfate and 6 µl of N,N,N,N-tetramethylethylenediamide (TEMED) were added and mixed to induce gel polymerization prior to the gels being poured. The minislab gel system (gel size, 90 × 80 × 0.75 mm: ATTO Co., Tokyo, Japan) was used for electrophoresis. Gels were solidified for 3 h at room temperature. The solidified gels were set into the buffer chamber containing 0.6 × TBE buffer. Two µl of PCR products were mixed with 18 µl of loading dye (95% formamide, 0.5% bromophenol blue). Samples were heated at 95°C for 2 min and then cooled on ice till loaded onto gels. All electrophoresis were performed under the appropriate constant temperatures described at Results and Figures. Gels were pre-run at 250 V for 30 min. Then 6 µl of samples were loaded onto the gel and then electrophoresed at 75 V for 30 min to samples set into the gels, then electrophoresed at 250 V. Running times are depending on each running temperatures, which were also indicated at Result and Figures. On terminating electrophoresis, gels were stained with ethidium bromide and then photographed. Sequence analysis. The amplified PCR products were purified by using SUPREC-02 DNA purification cartridges (Takara) according to the manufacturer's instructions. Sequencing reactions were performed with the DNA Sequencing Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems Inc.) according to the manufacturer's instructions. Electrophoresis and automated analysis of sequence were performed with a model ABI prism 377 DNA sequencer. Alignment was performed using CLUSTAL W multiple sequence alignment programs.

PCR analysis of the IGS region of rDNA for *T. rubrum*. Two primers were designed from the sequence of *T. rubrum* in the GenBank/EMBL/DDBJ databases with the accession number AF222887. The primers for IGS region were IGS3F: 5'-TATCATCGCACCGACATCATAC-3' and IGS62R: 5'-TATGGGAGAGCTAGAGCCAGAT-3'. PCR was performed in a 0.2 ml microcentrifuge tube, with a total volume of 25 µl of the reaction mixture containing 0.25 µl of distilled water, 2.5 µl of each two primers (2.0 pmol/µl), 0.25 µl of LA Taq polymerase (1.25 U) (Takara, Shiga, Japan), 4.0 µl of dNTP mixture (2.5 mM for each) (Takara),

12.5 μ l of GCI buffer (Takara) and 3.0 μ l of genomic DNA samples. The amplification reaction was performed with the following cycling parameters: 1 cycle of 95 °C for 5 min, 28 cycles of 95°C for 1.5 min, 62°C for 1 min, 72°C for 1.5 min, and 1 cycle of 72°C for 10 min.

RESULTS

Species identification of dermatophytes. The universal primer pair, ITS5 and ITS2, drawn in Fig. 1 produced the amplified products with approximately 360 bp containing the ITS1 region for all dermatophyte species tested. The products were used for SSCP analysis. The PCR-SSCP patterns of six species of medically important dermatophytes at 35°C for 60 min are shown in Fig. 2. *M. canis*, *M. gypseum*, *T. verrucosum*, *E. floccosum* and *T. rubrum* showed characteristic two distinctive bands with different electrophoretic mobility, while *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* showed one band. A phenotypically atypical isolate of *T. rubrum*, IFM 51255, which produced brownish pigment and granular colony surface gave identical pattern as that of the typical strain of this species. These data demonstrated that SSCP analysis could be used as a sensitive and easily-performed method for the species identification of these dermatophytes.

Intra-species polymorphism analysis for dermatophytes. For this study, 32 strains of *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* were analyzed by using PCR-SSCP technique. The following four PCR fragments were amplified from different regions on rDNA. They are the fragments, Tm-I, Tm-II, Tm-III, and Tm-IV, which were amplified with the primer pairs of ITS5 and ITS2, ITS3 and ITS4, NL1 and NL2A, NL3A and NL4G, and included the regions of ITS1, ITS2, D1 and D2, respectively (Fig. 1). Fig. 3 shows the SSCP patterns for the four amplified fragments: A for Tm-I, B for Tm-II, C for Tm-III and D for Tm-IV. As can be seen in Figure 3 (A), (B) and (C), all of 32 strains gave identical SSCP pattern for the respective amplified fragment. This evidence revealed that the base sequence of the three regions are well conserved and then no intra-species polymorphism was found in *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. On the other hand, SSCP analysis of Tm-IV gave two different band patterns and separated this fungal

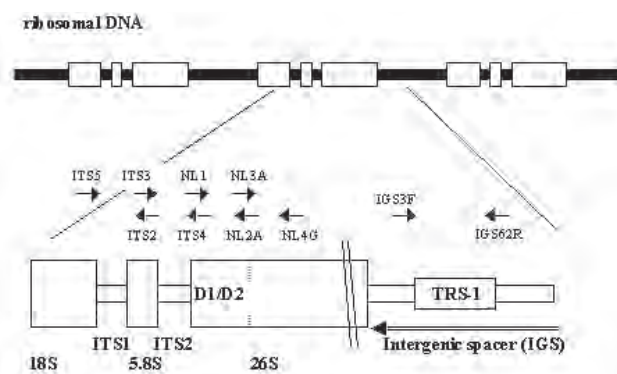


Fig 1. Scheme of the rDNA regions and the location of the primers. The primer pairs of ITS2 and ITS3, ITS4 and NL1, and NL2A and NL3A are complementary sequences, respectively. The scheme of IGS region, which contains TRS-1 with repeat sequences is shown according to the published of *T. rubrum*²⁶⁾.

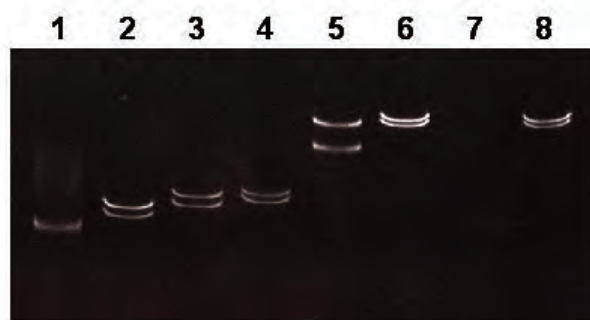


Fig 2. SSCP patterns of the fragments containing ITS1 region amplified with primers ITS5 and ITS2 from 6 species of dermatophytes. Electrophoresis was performed at 35 °C for 60 min. Lanes: 1, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*; 2, *M. canis*; 3, *M. gypseum*; 4, *T. verrucosum*; 5, *E. floccosum*; 6, *T. rubrum*. Lane 7 is blank and lane 8 is phenotypically atypical isolate of *T. rubrum* (IFM 51255).

species into two sub- groups, (a) and (b), as shown in Fig. 3 (D). To investigate the reason of this different pattern, base sequence of the amplified fragments, Tm-IV, obtained from *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* IFM 51257 and IFM 51258 which were selected as a representative strain form groups of the pattern (a) and (b) each, were compared as shown in Fig. 4. The difference between the two patterns was revealed to be one nucleotide substitution (C → T) at the position of 144.

Similarly, SSCP analysis of the four fragments, Tr-I, Tr-II, Tr-III and Tr-IV, amplified with the same primer pairs as described above was carried out against 55 strains of

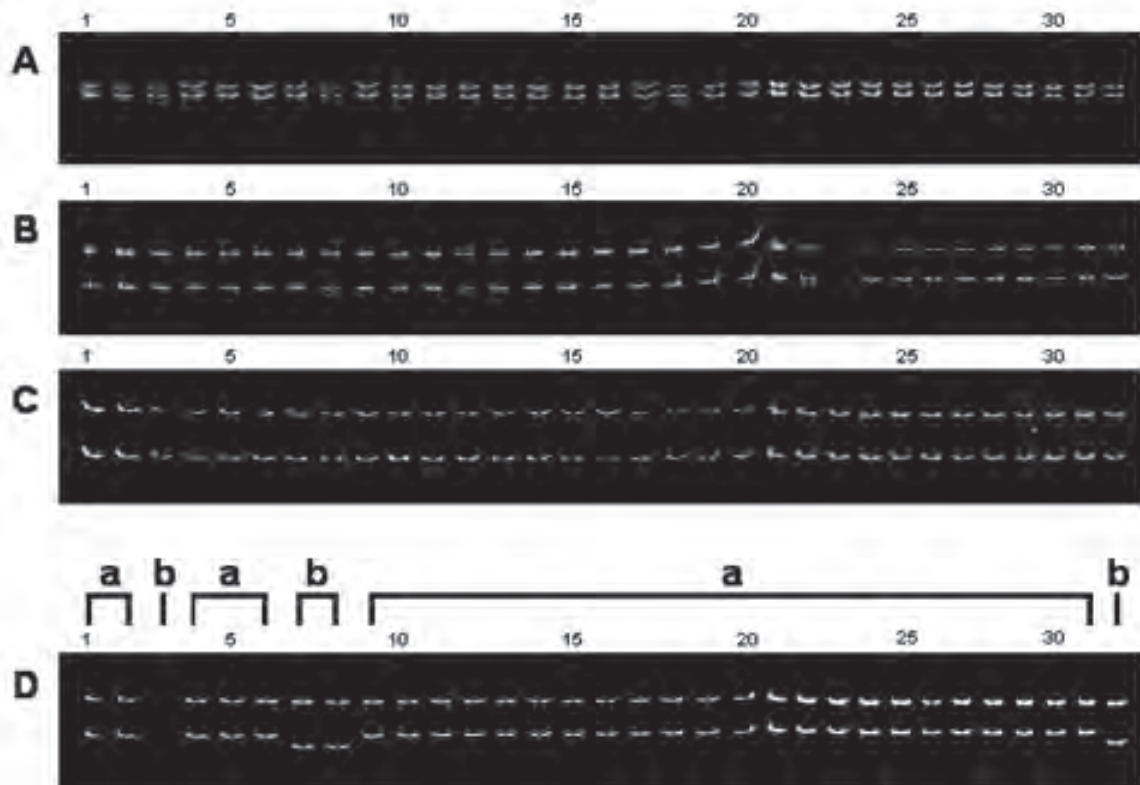


Fig. 3. SSCP patterns of the four amplified fragments on rDNA obtained from 32 strains of *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. A: Tm-I, electrophoresis condition at 35°C for 60 min ; B: Tm-II, at 30°C for 70 min ; C: Tm-III, at 10°C for 180 min ; D: Tm-IV, at 35°C for 40 min.

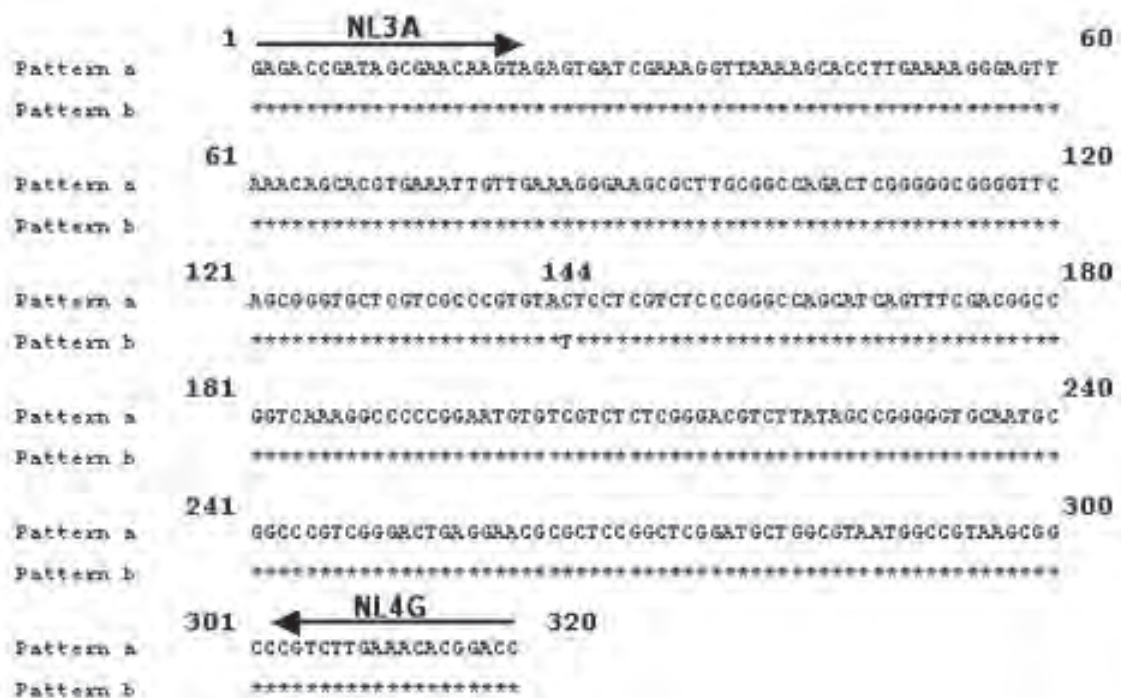


Fig. 4. Comparison of the base sequence of the fragments Tm-IV from *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* IFM 51257 and IFM 51258 which were selected as a representative strain of pattern (a) and (b) each. Asterisks indicate the same sequences between (a) and (b). Arrows indicate the location of primers, NL3A and NL4G.

T. rubrum. Fig. 5 shows SSCP patterns for Tr-I (A), Tr-II (B), Tr-III (C) and Tr-IV (D). The SSCP analysis afforded the completely identical pattern in every four fragments for all of the tested strains. This result suggested that no occurrence of intra-species polymorphism in ITS and D1/D2 regions of this fungal species (totally spanning about 1.2 kbp).

PCR analysis of the IGS region for *T. rubrum*. As no intra-species polymorphism was found in ITS and D1/D2 regions for *T. rubrum* by SSCP analysis, additional PCR analysis was performed in the IGS region for *T. rubrum*. Primers IGS3F and IGS62R were used to amplify the IGS region (Fig. 1). The amplified PCR products contained the recently-described²⁶⁾ subrepeat elements (TRS-1) of IGS region. The analysis of 15 strains of *T. rubrum* is shown in Fig. 6. The strains used in this analysis were the same examined for the SSCP analysis (Fig. 5: lanes 1 to 15). Any visible PCR products were not obtained from the strain of lane 13. *T. rubrum* strains isolated from 15 different samples represented distinctive 12 types; the two strains in lanes 2 and 3, 6 and 9, 7 and 11 showed every

identical PCR types, while all strains in other lanes showed distinctively different bands in the size of base pairs amplified. As expected, two *T. rubrum* strains isolated from the same patient showed the identical PCR type (lane 2: tinea pedis and lane 3: tinea unguium, respectively).

DISCUSSION

Trichophyton rubrum and *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* are the two major pathogenic dermatophyte species for human. About 80% of dermatophyte infection is caused by the two species. Accurate identification for the dermatophyte species is clinically important, because in recent years there has been progress toward the development of treatment strategies that target for each dermatophyte species. Many antimycotic agents have different spectra of activity. For example, the new azole compounds have been shown to exhibit different minimal inhibitory concentrations to dermatophyte species, such as *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*²⁷⁾.

Recently various molecular analyses based on PCR techniques have been developed for the identification of

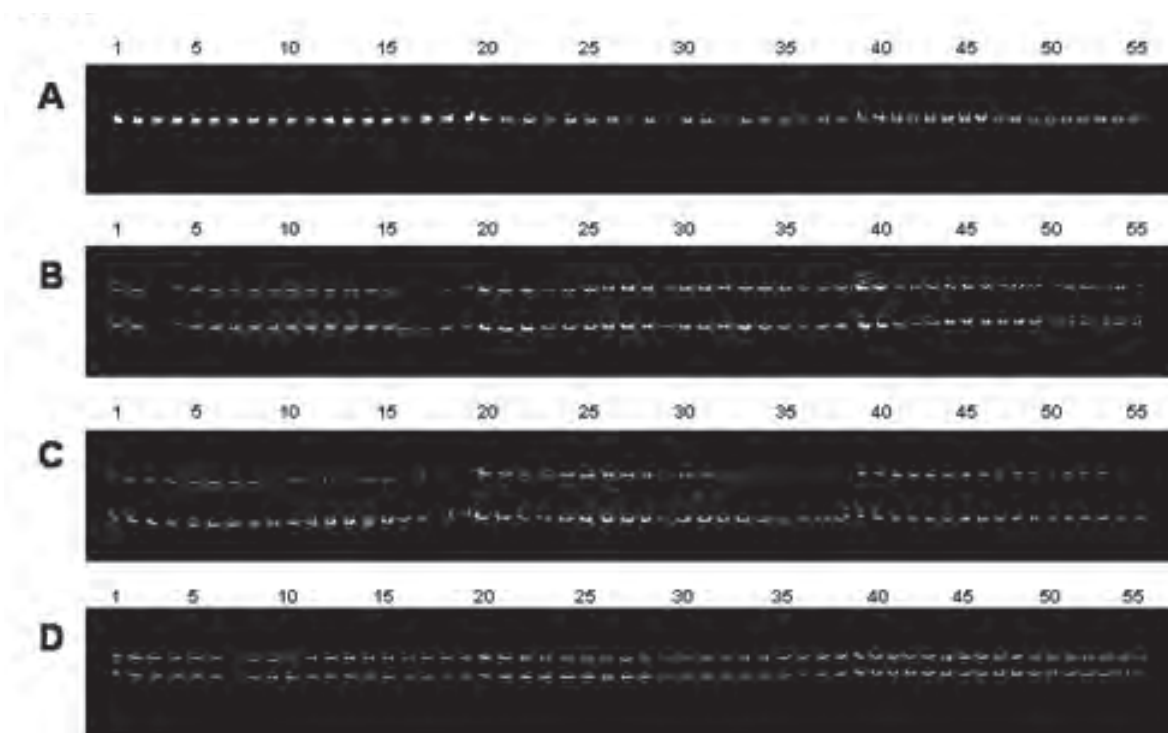


Fig. 5. SSCP patterns of the four amplified fragments on rDNA obtained from 55 strains of *T. rubrum*. A: Tr-I, electrophoresis condition at 35°C for 60 min ; B: Tr-II, electrophoresis condition at 30°C for 70 min ; C: Tr-III, at 10°C for 180 min ; D: Tr-IV, at 40°C for 50 min.

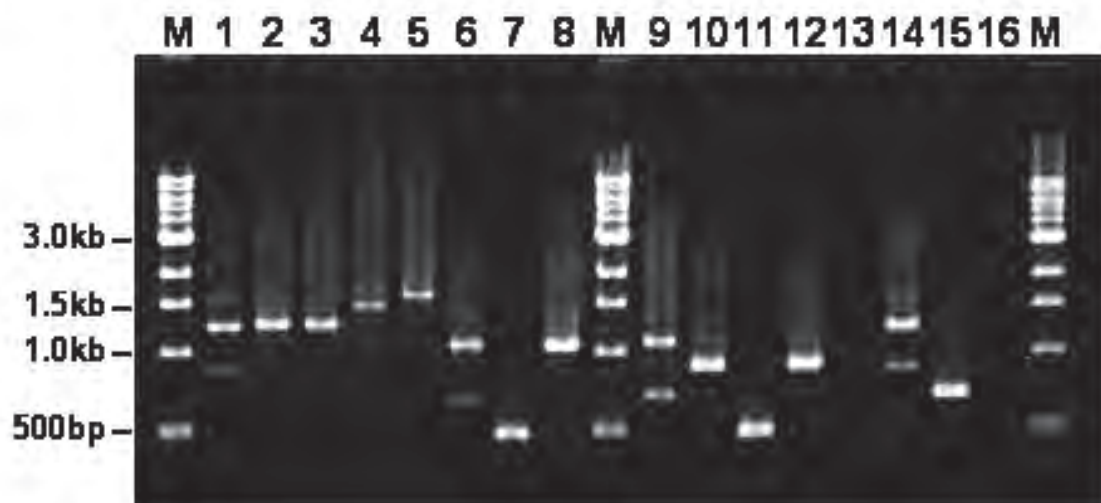


Fig. 6. Amplification of TRS-1 subrepeat element of IGS region. Lane 16: negative control ; M: molecular weight marker.

dermatophytes, such as random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis^{3) 4)}, PCR fingerprinting method⁵⁾, arbitrarily primed PCR technique^{6) 7)} and direct sequencing of the ITS region^{8) 9)}. Compared to these techniques, PCR-SSCP analysis is more sensitive, easily-performed and highly reproducible. In this study, by using PCR-SSCP analysis containing the ITS1 region, we could adequately distinguish major dermatophytes, such as *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. verrucosum*, *M. canis*, *M. gypseum* and *E. floccosum*. No intra-species polymorphisms in the ITS regions in dermatophytes against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, and *M. canis* (data not shown) made the PCR-SSCP analysis successful for species identification.

Recently, PCR-SSCP analysis has been applied for species identification of various pathogenic fungi other than dermatophytes¹⁹⁻²²⁾. The SSCP patterns of PCR fragments depend on the experimental conditions, particularly on the composition of the electrophoretic gels and running temperature. Glycerol added to change pH of the gels diminished the SSCP signals. Running temperature affected both the time of electrophoresis and SSCP patterns. As we could not obtain reproducible SSCP patterns under the electrophoresis at room temperature, SSCP analysis was performed under the defined temperature system. Since the time required for electrophoresis decreased at higher

running temperature, we selected the highest temperature, which could detect the specific band patterns. Conditions of electrophoresis including the running temperature should be optimized for the specific sequence of the PCR fragments derived from each fungal species. Contrary to the previous study²²⁾, lower temperature system was unsuccessful to detect the difference in a shorter time.

Strain typing based on morphological phenotypes of dermatophyte species is occasionally difficult because of a lack of reproducibility. The morphological differences in intra-species are often not stable on subculture or may simply be artifacts due to different growth conditions²⁸⁾. Strain typing methods based on fungal genotype is expected to be more useful for dermatophyte species. Although recent molecular analyses are adequate for the species identification, they are not sensitive enough for strain typing for dermatophyte. PCR-SSCP method can detect single nucleotide polymorphisms among hundreds of nucleotide sequences. We examined intra-species polymorphisms for two major dermatophyte species, *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* by using this technique. SSCP analysis of the amplified products, Tm-IV, from the posterior part of the D1/D2 regions disclosed 2 distinctive patterns of *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. The difference between the two patterns found to be one nucleotide, C → T substitution. On the other hand, no intra-

species polymorphism was detected for *T. rubrum* by using the products from ITS region including 5.8S rDNA and D1/D2 regions, totally spanning about 1.2 kb nucleotides. Preliminary SSCP analysis for multiple strains of *M. canis* (n=13) disclosed no intra-species polymorphism in the ITS and D1/D2 regions. (data not shown). These results support the previous study²⁹⁾, that ITS regions are conserved in intra-species for *T. rubrum*. Furthermore, the ITS regions of *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* and *M. canis* are conservative in intra-species. The D1/D2 regions are also conservative in *T. rubrum* and *M. canis*. Although we detected intra-species polymorphisms for *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* in the D2 region, the difference was only one nucleotide substitution. These results suggest that the ITS-D1/D2 regions are conservative in intra-species for these fungi.

As resistance to antifungal drugs continues to expand, elucidation of mechanisms of resistance becomes increasingly important screening for single nucleotide mutations of structural and regulatory genes by SSCP patterns may be a useful tool in understanding mechanisms of antifungal drug resistance. Such mutations have been identified by SSCP analysis in other pathogens. For example, single point mutations in RNA polymerase have been identified by this technique in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*³⁰⁾ and mutations in 14- α -demethylase (target enzyme encoding gene of azoles) have been detected in fluconazole-resistant *Candida albicans*³¹⁾. Recently, mutations of dihydropteroate synthase (DHPS) gene have been detected in sulfa-resistant *Pneumocystis carinii*³²⁾.

Recent molecular analyses of strain typing for *T. rubrum* have been mostly unsuccessful^{4) 28) 33)}. So far analyses of subrepeat elements in the nontranscribed spacer of *T. rubrum* are successful applications^{26) 29) 34)}. As there was no intra-species polymorphism in the ITS and D1/D2 regions, we examined PCR analysis of IGS subrepeat elements for clinically isolates of *T. rubrum* for strain typing. In this study, we detected 12 distinctive PCR types for 15 clinical-isolated strains of *T. rubrum*. In the previous study²⁶⁾, strain typing of *T. rubrum* isolated from European countries, such as United Kingdom, showed that 75% of

all isolates belonged to one of four patterns and 40% of strains belonged to a single pattern. However, the Japanese isolates demonstrated various PCR types. Our results also represented that the clinical isolates of *T. rubrum* in Japan are more variable in genetic types of subrepeat elements in the IGS.

In the previously reported paper²⁶⁾, the pattern of PCR analysis of subrepeat elements of IGS region showed ladder-like, multiple weak signal bands, besides one, two or multiple strong signal bands. The significance of these multiple, ladder-like bands pattern remains to be determined.

As discussed in the previous studies²⁶⁾, we could not mention clear relationships between the genotypes of dermatophyte species (e.g. SSCP types of *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* and PCR types of *T. rubrum*) and morphological phenotypes or clinical types (e.g., tinea pedis or tinea corporis or tinea unguium). In the future, easily-performed, reproducible strain typing methods based on molecular techniques, which reflect morphological phenotype or pathogenicity, should be applied for dermatophyte infection.

In conclusion, SSCP analysis of the PCR products including ITS1 region of fungal rDNA is useful for species identification for dermatophytes. Application of this analysis for *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, enabled us to detect the polymorphism due to one nucleotide substitution. In addition, we detected variable PCR types for the strains of *T. rubrum* by PCR analysis of IGS subrepeat element. Combining these techniques should make it possible to detect accurate species identification and strain typing of dermatophyte species.

REFERENCES

- 1) Weitzman I, Summerbell RC The Dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 240-259.
- 2) Kwon-Chung KJ Dermatophytoses. In the Medical mycology. Edited by KJ Kwon-Chung, JE Benett. Lea & Febiger, Pennsylvania; 1992: pp. 105-161.
- 3) Kim JA, Takizawa K, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M Identification and genetic homogeneity of Trichophyton tonsurans isolated from several regions by

- random amplified polymorphic DNA. *Mycopathologia* 1999; 145: 1-6.
- 4) Mochizuki T, Sugie N, Uehara M Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses* 1997; 40: 405-409.
- 5) Graser Y, El Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol* 1998; 138: 576-582.
- 6) Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 1997; 137: 351-355.
- 7) Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbiol* 2000; 49: 493-497.
- 8) Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 920-924.
- 9) Mochizuki T, Kawasaki M, Ishizaki H, Makimura K Identification of several clinical isolates of dermatophytes based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 1 (ITS 1) in nuclear ribosomal DNA. *J Dermatol* 1999; 26: 276-281.
- 10) Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Tallman AS Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50: 1351-1371.
- 11) Graser Y, El Fari M, Vilgalys R, Kuijpers AFA, De Hoog GS, Presber W, Tietz HJ Phylogeny and taxonomy of the Family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med Mycol* 1999; 37: 105-114.
- 12) Kurtzman CP, Robnett CJ Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1216-1223.
- 13) Kurtzman CP, Robnett CJ Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek* 1998; 73: 331-371.
- 14) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In the PCR protocols to methods and applications. Edited by MA Innis, DH Gelfand, J J Shinsky, TJ White. Academic Press, San Diego, Calif; 1990: pp. 315-322.
- 15) Fan M, Chen LC, Ragan MA, Gutell RR, Warner JR, Currie BP, Casadevall A The 5S rRNA and the rRNA intergenic spacer of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 215-221.
- 16) Wellauer PK, Reeder RH, Dawid IB, Brown DD The arrangement of length heterogeneity in repeating units of amplified and chromosomal ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J Mol Biol* 1976; 105: 487-505.
- 17) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-2770.
- 18) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-879.
- 19) Hui M, Ip M, Chan PK, Chin ML, Cheng AF Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 95-99.
- 20) Kumeda Y, Asao T Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2947-2952.
- 21) Rath PM, Ansorg R Identification of medically important *Aspergillus* species by single strand conformational polymorphism (SSCP) of the PCR-amplified intergenic spacer region. *Mycoses* 2000; 43:

- 381-386.
- 22) Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chanock SJ PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3216-3220.
 - 23) Ceniz JL Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 2380.
 - 24) Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 1994; 40: 358-364.
 - 25) O'Donnell K *Fusarium* and its near relatives. In the fungal holomorph: mitotic, mitotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Edited by DR Reynolds, JW Taylor. CAB International, Wallingford, UK; 1993: pp. 225-233.
 - 26) Jackson CJ, Barton RC, Kelly SL, Evans EG Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4527-4534.
 - 27) El Fali M, Tietz HJ, Presber W, Sterry W, Graser Y Development of oligonucleotide probe specific for *Trichophyton rubrum*. *Br J Dermatol* 1999; 141: 240-245.
 - 28) Summerbell R, Kane J Physiological and other special test for identifying dermatophytes. In the Laboratory handbook of dermatophytes. Edited by J Kane, R Summerbell. Star Publishing Co., Belmont, Calif; 1997: pp. 45-79.
 - 29) Jackson CJ, Barton RC, Evans EG Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 931-936.
 - 30) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Shopfer K, Bodmer T Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341: 647-650.
 - 31) Wang W, Li R, Wang D, Li S, Zhu L, Wang X, Wan Z, Zhai W Resistant mechanisms of *Candida albicans* to fluconazole. *Chin Med J (Engl)* 1999; 112: 466-471.
 - 32) Ma L, Kovacs JA Rapid detection of mutations in the human-derived *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene associated with sulfa resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 776-780.
 - 33) Zohng Z, Li R, Li D, Wang D Typing of common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. *Jpn J Med Mycol* 1997; 38: 239-246.
 - 34) Jackson CJ Molecular identification and strain typing of dermatophyte fungi. *Jpn J Med Mycol* 2001; 42: 7-10.

Acknowledgement

-This study was performed as the program "Frontier studies and international networking of genetic resources in pathogenic fungi and Actinomycetes (FN-GRPF)" through the special coordination funds for promoting science and technology from the Ministry of education, culture, sports, science and technology, the Japanese Government in 2001.

依頼稿（報告）

旭川医科大学と地元小・中・高との連携事業 ヒトの体を見る、知る、学ぶ ～中学生のための基礎医科学実習～

春 見 達 郎*

最近の旭川医大に入学してくる学生を観察すると、将来、健康や病気を問わず「人間」と関わる職業に就くにも関わらず、人体に対する知識が極端に不足しているだけでなく、そもそも人体や生命に対する関心が低い学生が増加していると感じられる。講義や実習などを「そつなくこなす」ことにだけ集中し、「ヒトの体って面白い」と本当に実感している学生は少ないのではないだろうか？

これらの背景の一つには、受験科目として「生物」を必ずしも選択しなくても良い入学試験制度が関わっているのかもしれない。また、「生物」を入試科目として選択して入学してきた学生であっても、高校時代に受験勉強として学んだ「生物」がまさに書物や写真を中心とした学習であったためと考えられる。実験や観察を中心とした、実際の生物に触れる理科教育が欠如しているとすれば、自らの身体の構造や機能に興味をもつことなく、それぞれの分野に進学することも当然のことといえよう。

もしこのような状況を生み出す教育環境が、ゆとり教育時代だけでなくその後の教育でも続いているならば、将来、医学やライフサイエンス関連の分野に進む学生には、少なくとも身体に興味や関心を持ってもらう動機づけが必要である。しかも、より早い時期（例えば、中学時代）にライフサイエンス実習に触れる経験が望まれる。このような教育は、単に実習の受講生徒だけでなく理科教育を担当する教員の経験を広げる機会ともなる。ヒトを対象とした教育・研究を行っている旭川医科大学の教員が生命科学系の実習を継続的に行うことにより、中学・高校の教育現場を変えてい

く波及効果も期待される。

そこで、平成 23 年度より中学生を対象とした「ヒトに視点を置いた生命科学実習」を行うプログラムを企画し、サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト（SPP）等の支援を受けながら出前理科教室を実施してきた^{1), 2)}。それより以前に行ってきた、高大連携による高校生を対象とする生命科学実習の経験をもとに^{3) ~ 5)}、後述するような中学生を対象とした実施テーマを考案した。本プロジェクトを開始した平成 23 年度には、実施中学校は旭川市内 2 校で、実施テーマも 3 テーマであったが¹⁾、平成 26 年度には実施中学校は旭川市周辺校も含め 5 校にまで増加し、実施可能テーマも 11 テーマにまで拡大している。参加生徒数も平成 23 年度は延べ 100 人弱であったが、平成 26 年度は延べ 250 人を超える参加生徒数を得るに至った。

本プロジェクトは、中学生が対象であること、そして、まずヒトの体に興味を持ってもらう、そして多くの中学生に参加してもらう、という目的から、①生き物を殺さない、②血液を使ったり痛みを伴ったりしない、非侵襲的な実験を行う、③中学校の理科室や教室で実施する、などの観点を原則とした。組織解剖学、生理学および生化学など基礎医学の分野から、以下の 11 種のテーマを実施希望中学校に提案した（表 1）。中学校側の開催日時や期間の制約から全ての実習を行うことが難しいため、中学校および参加生徒の希望に合わせて、その実習の中から中学校が指定したものを実施した。本企画は、講義によって知識の取得を目指すというより、実習への参加により、実際に体を動か

*旭川医科大学 解剖学講座 顕微解剖学分野

して実験し内容を理解することを主体とした。そして、参加生徒全員が実験を行うような実習を企画した。

平成 26 年度の事例では、実施中学校の希望により、その実施時間や実施実習に多くの違いが認められた(表 2)。午前に講義を行い、午後に実習を行う(緑が丘中)、あるいは午前か午後に集中して実習を行う(常盤中、東川中、神楽中、富良野中)学校に分かれた。また開催期間も、1 日(常盤中、神楽中、中富良野中)と複数日(東川中、緑が丘中)実施に分かれた。参加生徒に関しても、全校生徒参加(常盤中、中富良野中)と、希望者のみ参加(東川中、緑が丘中、神楽中)があった。さらに、実施対象学年も、全学年(常盤中、

東川中、中富良野中)、1, 2 年生(神楽中)、1 年生(緑が丘中)と、各中学校の希望に応じた。

参加生徒は、いずれの学校でも熱心の実験に取り組んでいた(図 1)。各実習終了後にアンケートを行った結果の一部を図 2 に示した。「実習が楽しかったか」との質問に対し、いずれの学校でも 9 割以上の生徒が「楽しかった」との答えを得た。「また参加したいか?」「科学への興味は高まったか?」との質問に対しても、ほとんどの学校で 9 割以上の生徒がそれぞれ「参加したい」「高まった」との答えており、本年度の実習は参加生徒に受け入れられたと考えられる。本年度の実習では、希望者のみの参加の学校だけでなく、全校生徒参加の中学校が 2 校存在した(常盤中、中富良野中)。このような中学校生徒の中には文系志望の生徒も少なからずいる筈にもかかわらず、アンケート結果では、希望者のみ参加の中学校での結果と同じく、9 割以上の生徒から好意的な反応が得られた。座学ではなく、体を動かす、あるいは自分の体を知る実習や実験は文系理系を問わず興味を持ってもらえたと考えられる。さらに、本年度の特徴として、女子生徒の参加が多かったことが挙げられる。希望者のみ参加の中学校において、女子の割合は、東川中 54%、緑が丘中 81%、神楽中 48%と、約 5 割あるいはそれ以上の割合であった。これは、近年の「リケジョ」ブームの影響かもしれない。参加女子生徒に参加理由を尋ねると、「理科が好き」「将来看護師になりたい」との話を多く聞いた。このようなリケジョ予備群に対し、私共の実習はより強い動機づけを与えることが出来たかも知れない。高校生に対する実習と異なり、より若い世代へ行う私共の実習は、数年でその結果が明らかにな

表 1 実習テーマ一覧

感覚の理解

- ① 2 点弁別実験による皮膚表面の感覚の鋭敏さの部域差の存在の理解
- ② 味覚攪乱物質を用いた味覚実験による自分の舌の働きの理解
- ③ サーモグラフィーによる体温や赤外線理解

「学習」の理解

- ④ 迷路実験 (Morris water maze) による「学習」の理解
- ⑤ 種々のテストによる図形記憶と文字記憶の相違の理解

自分の体のしくみの理解

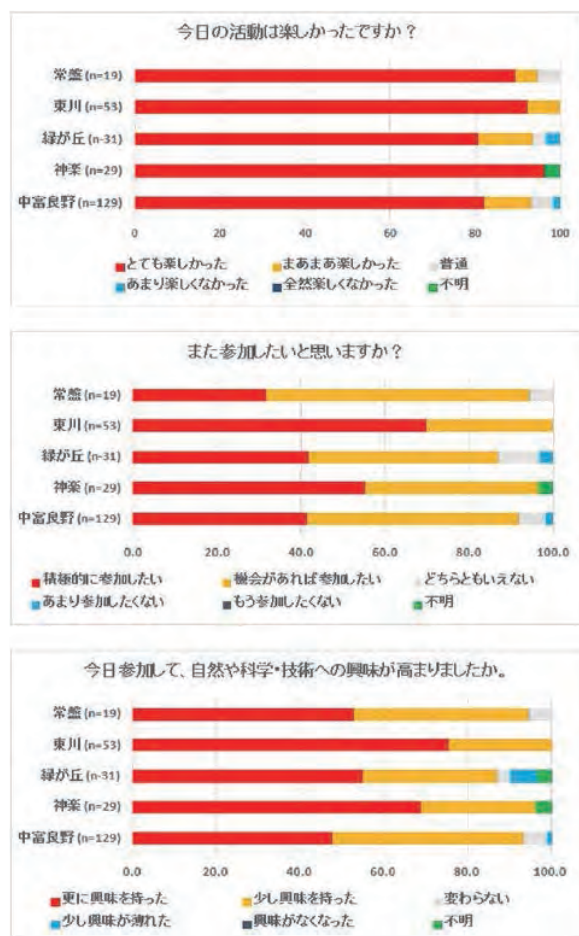
- ⑥ 自分自身の口腔内上皮細胞の観察および細胞の理解
- ⑦ 骨模型標本を用いた関節の観察および反射実験による体の動きの理解
- ⑧ DNA の抽出とその定性および定量実験

ヒトを取り巻く環境や物質の体や健康への影響の理解

- ⑨ 種々の香りの身体生理に及ぼす影響の理解
- ⑩ 北海道産針葉樹芳香物質の身体生理に及ぼす影響の理解
- ⑪ ビタミン C の働きの理解

表 2 平成 26 年度実施実習概要

学校名	旭川市立 常盤中学校	東川町立 東川中学校	旭川市立 緑が丘中学校	旭川市立 神楽中学校	中富良野町立 中富良野中学校
実施日	6 月 12 日	7 月 31 日～8 月 1 日	8 月 5 日～8 月 7 日	12 月 14 日	12 月 18 日
実施時間 (各日当り)	午前 2 時間	午前 3 時間	午前 1 時間 午後 2 時間	午前 3 時間 30 分	午後 2 時間 30 分
参加学年	1, 2, 3 年	1, 2, 3 年	1 年	1, 2 年	1, 2, 3 年
延べ参加生徒数	19	53	31	29	135
実施場所	理科室、教室、 生徒会室	理科室	理科室	第 1, 2 理科室 特活室	体育館
実施テーマ (表 1 より)	①②④⑧⑩	①②④⑧⑩⑪	①②④⑩	①②③④⑧	①②③⑦⑪

図 1 実習の様子

図 2 参加生徒のアンケート結果

るものではない。本実習を体験した中学校生徒が、生命や人体の面白さを記憶に残し、将来の職業選択時に幾ばくかの影響や効果を与えることを願う。次年度以降は、より多くの中学校での実習開催を目標とする。さらに、実施可能テーマを増やし、旭川医大という生命科学をバックボーンとする大学の特徴を表す実習を考え、実施希望中学校の要望に合わせて行いたいと考えている。

本プロジェクトは、旭川医科大学派遣講座「中学生のための生命科学実験」の一環として行っており、その参加教員は、春見達郎（解剖学講座（顕微解剖））津村直美（化学）、林要喜知（生命科学）、および中村正雄（旭川医科大学名誉教授）である。さらに、本年の実習においては、TAとして医学科2年石原洋、筑摩雅彦および看護学科1年佐藤奏、流割萌衣、藤波香史、吉田咲妃の諸君の協力を得た。最後に、実習参加希望中学校が増えつつある現在、実習費用の増大の問題が生じている。今回学長裁量経費の支援により、参加希望校すべてにおいて滞りなく本年度の実習を実施することができた。本年度の支援に感謝するとともに、高（中）大連携事業の継続のためにも、今後もこのような実習事業への支援をお願いしたい。

参考文献

- 1) 春見達郎、津村直美、林要喜知、中村正雄. 中学生を対象とした平成 23 年度サイエンスパートナーシッププロジェクト (SPP) の実施、旭川医科大学紀要 (一般教育). 28(1),45-71. 2012.
- 2) 林要喜知、春見達郎、津村直美、中村正雄. サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト支援による中学生のための基礎医科学実習の評価、旭川医科大学紀要 (一般教育). 30(1),57-74. 2014.
- 3) 佐藤裕基、萬木貢、林要喜知. 旭川医科大学と地元高校による SPP 高大連携理科教育の取り組みとその有効性の評価. 旭川医科大学紀要 (一般教育). 25(1). 61-84. 2009.
- 4) 佐藤裕基、萬木貢、林要喜知. 旭川医科大学と地元高校による SPP 高大連携理科教育と生徒の動機づけを高めるための改善策. 旭川医科大学紀要 (一般教育). 26(1). 17-34. 2010.
- 5) 佐藤裕基、萬木貢、春見達郎、林要喜知. 3 年間の SPP 高大連携理科教育の総評と提言、旭川医科大学紀要 (一般教育). 27(1). 43-58. 2011.

依頼稿（報告）

旭川医科大学と地元小・中・高との連携事業 —「自然科学実験教室：色と波長の関係」の実施報告—

稲垣 克彦*

はじめに

物理学教室では、旭川市内の高等学校と連携して、医療を支える物理現象を中心に実験を通して高校生に物理学に触れてもらう事業を行ってきた。特に人間の感覚では直接捉えることができない実体、たとえば放射線、赤外線、超音波、大気圧などについて、実験を通してその存在を理解できるような独自の実験テーマを JST サイエンスパートナーシッププロジェクト (SPP) 事業を利用して提供してきた。今年度は本学の支援を受け、「自然科学実験教室：色と波長の関係」という実験テーマで連携事業を行ったので、以下にその概要を報告する。

方 針

可視光は電磁波の一種で、波長の違いによって異なる色に見える。可視光を波長が長いものから順に並べると、赤、橙、黄、緑、青、藍、紫になることはよく知られている。さらに、可視光の範囲の外側には、赤外線や紫外線のような目に見えない光が存在する。色という感覚的な理解から、波長という定量的な理解に至るまでに大きなギャップがある。このギャップを超えるきっかけになるよう、以下の3種類の実験を高校生に提供した。

実験内容

1) 光学フィルターを用いた実験

白黒フィルムで写真を撮る際に、画像のコントラストを強めるため短波長の光を遮断する光学フィルターを用いることがある（図1）。この光学フィルターを

通して様々な波長の光を観察すると、光が見えたり見えなかったりする。そこで、光源として波長が異なる5色の発光ダイオード（赤、橙、黄、緑、青）を用意し、これらの光が3種類の光学フィルター（赤、橙、黄）を通してどのように見えるか観察する実験を行った。発光ダイオードの色と、フィルターが通す波長の範囲に明確な規則性があることを認識させた。

2) 回折格子を用いた実験

白色光はすべての波長の光が重なった光であり、プリズムや回折格子などの分光素子を通すと波長に応じた色（スペクトル）に分かれる。発光ダイオードを光源とする白色光を回折格子で観察しながら光学フィルターの影響を調べた。図2のように光学フィルターを通すと、スペクトルのうち波長が長い光（赤色側）が見え、短い光（青色側）が見えなくなることで、さらに、フィルターを通す光の波長帯が、赤フィルター、橙フィルター、黄フィルターの順に広がっていくことを観察させた。この結果から、光の色の順番が波長の大小によって決まることが理解できる。

3) 赤外線の実験

サーモグラフィーは、放出される赤外線の強度が物体の温度によって異なることを利用して、物体の表面温度分布を可視化する装置である。図3のように、サーモグラフィーで温度の違いが画像化できることを観察させた。次に、金属板と半導体（シリコン）板で対象を覆った場合の画像の変化を観察させた。サーモグラフィーが検出する赤外線は金属を透過しないが、半導体を透過する。光学フィルターの実験結果から類推

*旭川医科大学 一般教育 物理学教室

し、この現象が可視光と赤外線の波長の違いとして理解できる。

最後に、家電製品のリモコンから出る信号の正体を探る実験を行った。まず、リモコンの送信部を観察して、信号を送っているとき光を発していないことを観

察させた。次に、リモコンの送信部を光学フィルターで覆っても機器が操作できることを確認させた。今回用いた光学フィルターの性質（図1）から、可視光よりも波長が長く、見えない光、つまり赤外線によって信号を送っていることが理解できる。

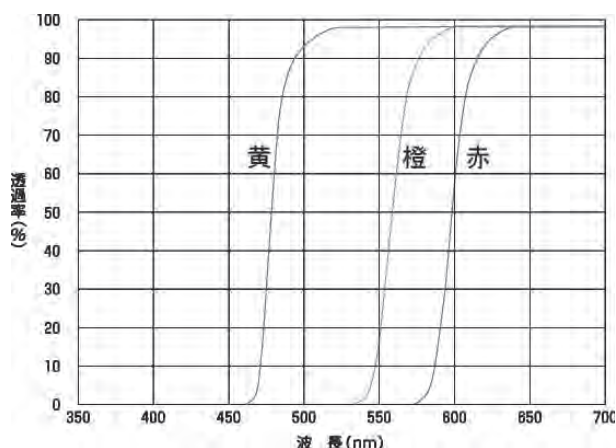


図1 この実験で用いた3種類の光学フィルター（赤、橙、黄）の特性。透過率0%は、光を完全に遮断することを意味する。黄フィルターの場合、470 nmより波長が短い光は遮断し、520 nmより波長が長い光はほぼ完全に透過する。100%にならないのはフィルター表面の反射による。

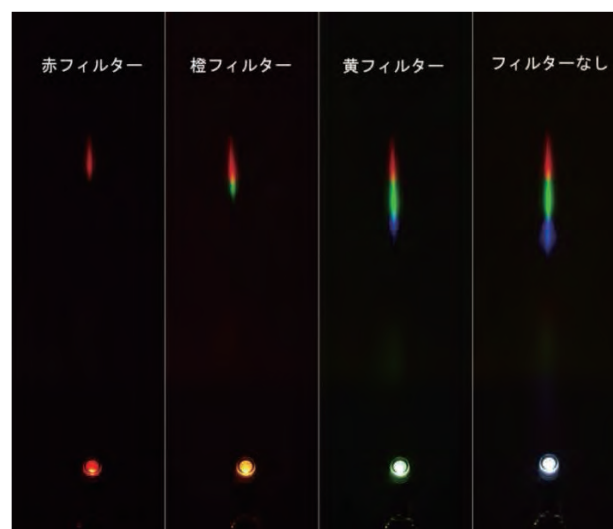


図2 光学フィルター（赤、橙、黄）の働きを回折格子を用いて観測した様子。比較のため、フィルターを通さない場合の結果も示す。

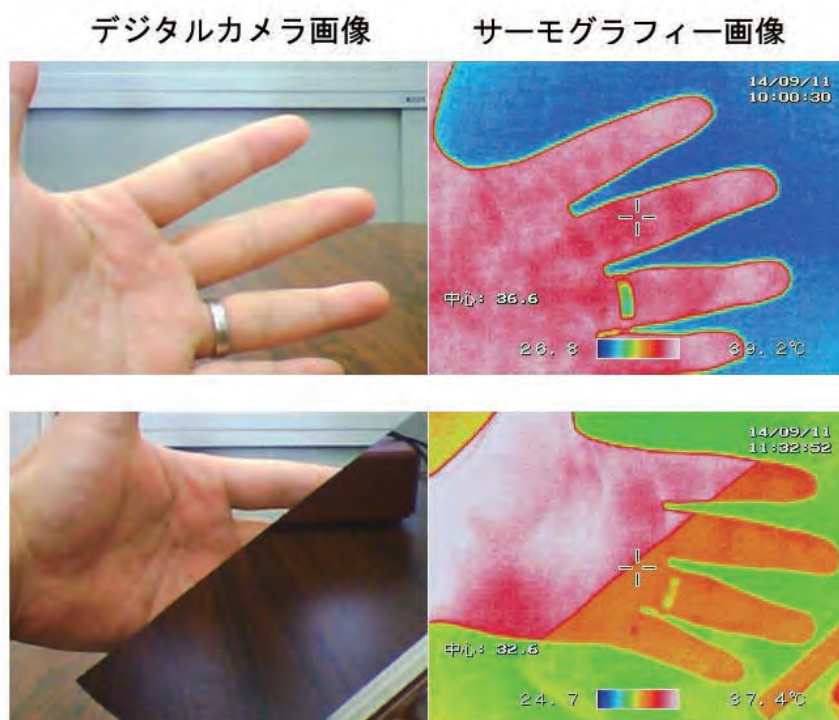


図3 サーモグラフィーによる表面温度分布測定。（上）手の表面温度分布がわかる。（下）半導体（シリコン）板で覆っても温度分布が透過して見える。

実験教室の様子

平成 26 年 11 月 13 日に旭川南高等学校の生徒 12 名を、また、12 月 15 日旭川東高等学校の生徒 10 名を迎えて実験教室を行った（図 4）。事前準備として両高等学校の担当の先生と打ち合わせを行い、高校での授業の進捗と実験内容との整合性を確認し、あらかじめ内容の調整を行った。折しも、2014 年度ノーベル物理学賞が青色発光ダイオードの発明に対して授与されたので、この概要についての解説も加えた。

当日は、講義実習棟 3 階第 5 実習室（旧：物理学実習室）に設置した光学実験エリアですべての実験を行った。外乱光の影響を避けるために暗幕で囲うことで、特に回折格子によるスペクトル観察が容易になる。生徒は 4 班に分かれ、班ごとに本学医学科 1 年生もしくは教員が TA として実験補助についた。実験は光学フ

ィルターによる透過不透過の観察から始めた。結果を議論し、そこから得られる規則性を発表させた。白色光を回折格子で分光する実験では、回折格子によって得られたスペクトルがフィルターを通すことで変化していく様子を興味深く観察していた。最後に、サーモグラフィーを使って赤外線の実験を行った。温度の違いが画面に表示されることから赤外線が物体から放射されていること、そして金属板と半導体板を用いた実験から赤外線は可視光と波長が異なることを理解させた。後日、実験教室の参加者には学長名の修了証を発行した。

参加した生徒の反応を知るために、前回 2012 年度 SPP 事業で行ったものと同形式のアンケートを実施した（表 1）。今回の結果を前回と比較すると、全体として参加者の満足度は高い中、今回の実験教室はより高い評価を得たことがわかる。

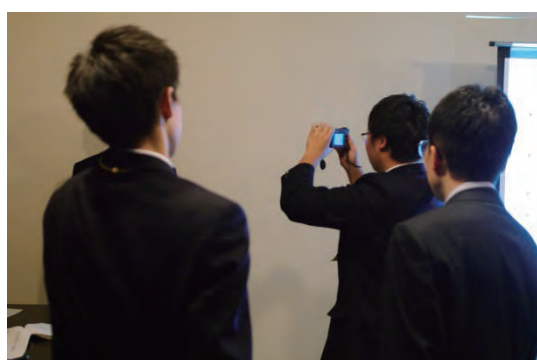


図 4 実験教室の様子。（左）生徒がサーモグラフィーを使用している。（右）生徒が回折格子を用いてスペクトルを観察している。

表 1 アンケートの結果。各質問は「そう思う」「どちらかと言えばそう思う」「どちらかと言えばそう思わない」「そう思わない」から回答させた。それぞれ、4、3、2、1 点として参加者の平均値を示す。

質問	2012 年度 SPP 事業	2014 年度 高大連携事業
今回の講座は、おもしろかったですか。	3.8	3.9
講座の「内容」はわかりましたか。（理解できましたか。）	3.4	3.6
今回のような講座があったら、「参加したい」とおもいますか。	3.8	3.9
参加人数	24 名	22 名

まとめ

自然科学を理解するためには、理解する対象となる自然現象について興味を持ち、素朴な実体験を理論に基き体系的に理解するという過程が必要になる。大学における実習も高校生に対する実験教室もその方針は変わらない。たった数時間の実験教室ではあったが、色という経験的に誰もが知っている知識を波長の違いという概念に結び付け、そして可視光の範囲外に目に見えない光が存在することを理解させるまでに発展させることができた。参加した高校生が将来自然科学を

学ぶ上で、今回の経験が何らかの形で生きてくることを期待している。

謝辞

本事業を実施するにあたり、旭川南高等学校および旭川東高等学校の先生方、ならびに本学関係者の多大なるご協力に感謝申し上げます。特に、学長裁量経費より「高大連携事業：色と波長の関係」として援助をいただきました吉田晃敏学長にはこの場をお借りしてお礼申し上げます。

依頼稿（報告）

旭川医科大学と地元小・中・高との連携事業 — 高校生実験体験講座 2014 を開催して —

平 義 樹*

はじめに

旭川医科大学の高大連携事業の一環として市内の2つの高等学校と連携して高校生実験体験講座 2014（講座 14）を開催した。この講座は平成 16 年度より開催しており、本年度で 11 回目を迎えることとなったが、本稿執筆時には全ての講義実習を終了していない状況のため途中経過となるが、主に平成 26 年 10 月 30,31 日実施した旭川東栄高等学校との実験実習講座についてこの紙面を借りて報告させていただく。

連携高等学校

講座 14 では北海道旭川東栄高等学校と北海道旭川南高等学校の 2 校と連携した。この 2 校はここ数年に渡って連携しているため、両校とも高大連携を行うための具体的かつ十分なノウハウを持っている。本年度は昨年度までのサイエンス・パートナーシップ・プロジェクト (SPP) とは異なる事業となり、幾つかの点で変更を余儀なくされたが、大きな混乱もなく適切な対応をしていただき、これまでのところ問題なく実施できている状況である。

目 的

講座 14 の目的を下記に示す。

- 1) 旭川医科大学の地域貢献として本学の研究資産を活用し次世代を担う高校生に科学の面白さを知ってもらうこと。
- 2) 医学研究機関としての旭川医科大学を認識してもらうこと。
- 3) 実験実習を通して高校生に高度な生命倫理観の醸

成を行うこと。

- 4) キャリア教育を通して医学・医療分野への進学、就職を促すこと。

上記目的は講座の開始以来一貫して掲げているものである。開始当初は医科大学の講座として当然の目的と考えていたが、昨今の生命科学や地域医療を取り巻く状況を鑑みると目的に掲げた内容の重要性を改めて認識している。

内 容

高校生実験体験講座の内容は「顕微鏡でみる生命のかたち」をタイトルとして掲げ、生命現象を可視化しそれを実際に観察することを中心としている。本事業では 10 年以上に渡る実施から①事前講義、②ワークショップ、③免疫染色実習（光学顕微鏡レベルでの実習と解説講義）、④電子顕微鏡観察実習、⑤キャリア教育の為の講義、⑥参加生徒によるプレゼンテーションとその準備、⑦学外講師による統括講義、の 6 つの内容を一つのパッケージとしてフォーマットを作成し、年度ごとのテーマに沿って実施しているが、講座 14 では特別にテーマ設定は行わず純粋に免疫染色の実験と顕微鏡による細胞の観察を楽しんでもらうこととした。また本年度は④キャリア教育のための講義は特別に実施せず下記の内容で現在実施中である。

1. 事前講義

実習の基礎となる組織学について講義を実施している。組織学的な考え方は動物の身体を理解する上で大変有効なものであるため、従来は生物の教科書から一歩進んだ内容を紹介し動物の身体を総合的に理解させ

*旭川医科大学 解剖学講座 顕微解剖学分野

る事を目的として講義を行ってきた。しかし近年の教科書の改訂により高校の生物の教科書から組織学がなくなってしまうっており、大学教育においても医学医療系を除いて十分に扱われているとは言い難い現状である。これらの現状を少しでも改善すべく積極的に取り入れている。

2. ワークショップ

ワークショップは電子顕微鏡観察実習についての仮想実習としての役割を持たせている。大学で行う電子顕微鏡観察実習は10数名程度を対象とせざるを得ない。またいきなり電子顕微鏡画像を提示しても十分な理解を得るのは難しい。そこで、精密な細胞の模式図を提示し、細胞内小器官の形態や働きを理解させつつ提示した細胞の働きについて議論し考えさせるワークショップを行っている。

これにより実習に参加する生徒にとっては実習の事前訓練になり、実習に参加しない生徒にとっては実習参加に近い体験をすることを期待する。

3. 免疫染色実習

蛍光抗体法を用いた免疫染色法を行わせた。本実習は2日間で行うことができれば余裕をもった実習となるが、本年は残念ながら時間的な余裕を持たせることができなかったため、1日（実質的には半日）で実施することにした。そのために凍結切片の使用など実習内容の改革を行った。また、実習の対象が高校生であるため、本実習では有機溶媒などの比較的危険な薬剤を使用しない等の配慮を最大限行っている。

染色が完了した後は共焦点レーザー顕微鏡で観察し染色画像の撮影を行わせた。

4. 電子顕微鏡観察実習

電子顕微鏡観察実習では、透過型電子顕微鏡を用いて1つの細胞を2000～3000倍で10数視野に分割して撮影させた。次に印刷した写真をつなぎ合わせ大きなパノラマ写真をつくらせ、これを用いて細胞の内部構造を観察させ、生徒同士のディスカッションを介して細胞の機能を考察させた。

5. プレゼンテーションの準備と発表会

実験実習で行った内容について撮影した写真をもと

にして内容を発表させる。そのための準備を連携校の担当教員の指導のもとに行わせる。

6. 学外招聘講師による講演

ミクロの世界の面白さを知ってもらうために、走査型電子顕微鏡でみる世界についての講演を行う。講師は例年大変好評を得ている新潟大学の甲賀大輔博士にお願いする予定である。

評価方法

講座14の評価は各講義、実習ごとと最後に全体に対するアンケートを実施しそれを解析する事によって行う。具体的なアンケートの質問項目と解析方法は文献1)に従った。本稿では「面白さ」「難易度」「理解度」「関心度」の4項目について到達指数として数値化し、昨年度の東栄高等学校のデータと比較した。

結 果

本稿執筆時は東栄高等学校での発表会が終了した段階であるため、この段階での講座14の中心的な実験実習である免疫染色実習とその説明講義および電子顕微鏡観察実習のアンケート結果を示す（図1）。

アンケート結果

東栄高等学校の免疫染色実習と電子顕微鏡観察実習のアンケート結果から到達指数を算出し解析した。両実習とも面白さ、理解度、興味関心度がほぼ4点以上を示し満足のいく結果となった。昨年度と比較してやや低下の傾向が見られたが、統計的には有意差はなく変化はなかった。

実施状況

実験実習の様子については図2として写真を掲載する。実験実習への参加生徒は2つの連携校とも高等学校内での公募で集まった生徒であるため、実習に対するモチベーションは高く、東栄高等学校の実習を終えた段階ではこの点で指導者側が苦勞する事は全くなかった。

実習内容について免疫染色実習は時間短縮のため、幾つかの実験過程を割愛し実施者側で既に用意したものをを用いた。そのため参加生徒自身が実験の手技を行うステップがこれまでに比べ少し減少した。時短の為にトレードオフであり致し方ないとも言えるが、なるべく生徒には手を動かしてもらいたいため、今後の改

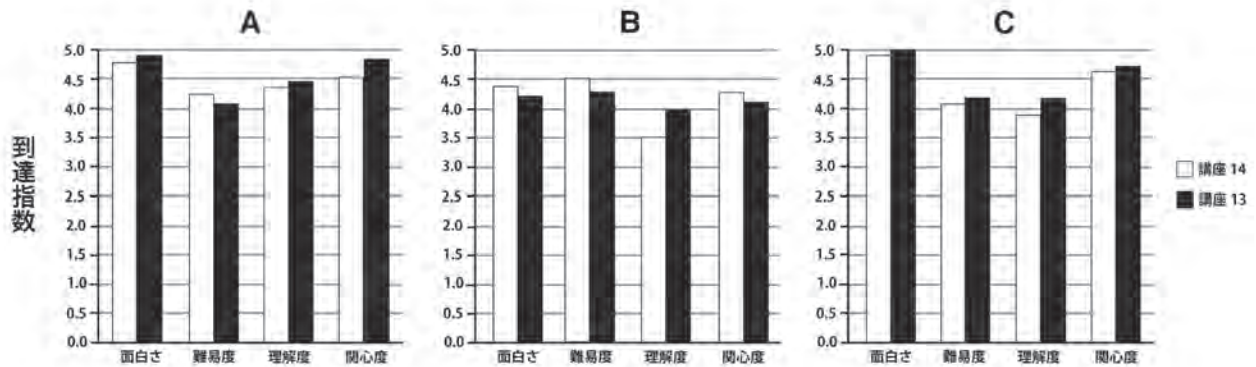


図1 電子顕微鏡観察実習 (A)、免疫染色法説明講義 (B)、免疫染色実習 (C) の到達指数。到達指数は高い程、達成度が高い事を示す。(ただし難易度は高い程難しかった事を示す。) 白棒は本年度 (講座 14) 黒棒は昨年度 (講座 13) の東栄高等学校の結果である。全項目で年度間に有意差はない。



図2 免疫染色実習の実習風景

善点に挙げておきたい。

考察とまとめ

本稿執筆時は全ての実験実習が終了していない段階ではあるが、現段階では SPP と異なる事業への変更による経費削減、実習時間の短縮等のマイナス要因が参加生徒に与えた影響はほとんどなく、実習についてはこれまでと変わらない成果が得られており、実施者としては満足のいく結果となった。免疫染色については実験や説明講義の内容の理解度が他の電子顕微鏡観察実習に比べて低い、この点についてはここ数年に渡る課題であり、得点として4点を大きく超える事がない状況である。ただし理解度が低い即ちわかりにくい事で実験実習に対して不満がある状況ではない事は面白さが高得点を示している事から明らかである。今後も改善の必要な案件であるが、何らかの抜本的な改

革、例えばきっちり理解させるのではなく、理解した気にさせるというレベルを目指すなど主催者として考え方を変える必要があるのかもしれない。

生徒の保険等の実習外の費用は連携校に負担してもらわざる得なかった。応分の負担とも言えるが、適切な対応をいただいた連携校には感謝の意を表したい。

その他、実習において次年度以降の内容を見越した実験をもち込む事ができなかった。本年度においても新規の内容は多くはもち込めなかったため、今後どのように実験実習の内容を発展させていくかは大きな課題となった。

今後の展望と課題

生命科学を形態学の側面から実験実習を実施する方法については一つのフォーマットを作り上げたと自負しているが、さらに発展させるためには新たなフォーマットの開発が必要となってくる。そのためには人材、予算等が必要となってくるが、SPP においては経費の削減傾向にあり今後はこれまで以上に経費の獲得が難しい状況になってくると考えられる。本年度は幸い本学等の支援を受ける事ができ、実験実習講座の実施が可能となった。今後とも支援の継続をお願いしたいが、実施者としても新たな経費の獲得、また逆に経費のかからない実験実習の開発等が必要となってくると考えられる。

高大連携事業は本学の中期目標にも掲げられている重要な事業である。この事業の一端を担っている一人として今後も継続・発展させていきたいと考えている。

謝 辞

本事業を実施するにあたり旭川医科大学から経費支援をいただいた。また旭川ウェルビーイング・コンソーシアムからは共催という形で経費の支援をいただい

た。この場を借りて改めて支援に感謝の意を表したい。

参考文献

- 1) 旭川医科大学研究フォーラム 12:12 ~ 22 2011

依 頼 稿 (報告)

平成 24・25 年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題

1) 造影剤腎症におけるメトホルミン効果についての検討 (その2)

研究代表者 滝山 由美

【目 的】

造影剤腎症は、造影剤投与後3日以内に血清クレアチニンが25%以上、あるいは0.5 mg/dl以上の増加を引き起こす腎機能障害である。尿細管に取り込まれ濃縮された造影剤による直接的細胞毒性と、生理的低酸素状態にある腎髄質の血流減少による尿細管再吸収能低下に引き続き、糸球体濾過が減少し、急性腎障害となる。我々は、最近メトホルミンが糖尿病腎症尿細管細胞の低酸素状態を回復し、腎保護的に作用することを明らかとした¹⁾ (Diabetes 60, 2011)。そこで、造影剤腎症においてメトホルミンが尿細管細胞の低酸素耐性を誘導し、腎保護的に作用するという仮説を立て、前年度はStreptozotocin誘発1型糖尿病モデルラットを用い、造影剤腎症に対するメトホルミンの腎保護効果について確認した²⁾。

本研究では、日常診療において、メトホルミン投与適応症例となる2型糖尿病における造影剤腎症に対するメトホルミンの腎保護効果について、Zucker diabetic fatty(ZDF)ラットを用い検討した。

【方 法】

1. 動物: 2型糖尿病モデルラットとして、7週齢雄ZDF ratを用いた。2. メトホルミン治療: 7週齢ZDF ratに対して、2週間metformin (300mg/kg/day) 混餌投与した。3. 造影剤腎症の作成: 9週齢ZDF ratの無治療群とメトホルミン治療群に対して、indometacin (10mg/kg)、L-NAME (10mg/kg)、造影剤Ioversol (2.9g/kg) を投与し、24時間後の腎機能、腎組織学的検討を行った。

【結 果】

1. ZDF rat メトホルミン治療群は、無治療群に比較し、随時血糖 (358.5 ± 27.42 vs. 208.5 ± 93.19 , $p<0.01$)、HbA1c (4.35 ± 0.38 vs. 3.48 ± 0.39 , $p<0.01$) ともに有意に減少した。2. ZDF rat メトホルミン治療群では、造影剤投与前血漿クレアチニン値が非投与群に比し、高めの傾向が認められた (0.494 ± 0.064 vs. 0.553 ± 0.144) (図1A)。3. ZDF rat 無治療群では、造影剤投与後血漿クレアチニンは上昇したが有意差は無く、またメトホルミン治療群では上昇は認められなかった (図1A) が、造影剤投与前後でのクレアチンの上昇率はメトホルミン治療群で小さい傾向が認められた (0.111 ± 0.119 vs. 0.057 ± 0.152) (図1B)。4. ZDF rat メトホルミン治療群では、尿中アルブミン排泄量の減少傾向が認められた (図1C)。5. ZDF rat メトホルミン治療群では、低酸素マーカーpimonidazole 染色が軽度であった (図2)。

【考 察】

本研究では、糖尿病治療薬メトホルミン治療群において、造影剤投与による血清クレアチニン値の有意な上昇は認められず、更にメトホルミン治療群においては尿中アルブミン排泄も減少しており、メトホルミンが腎保護的に作用することが明らかとなった。また、1型糖尿病モデルマウスであるStreptozotocin誘発糖尿病マウスに比較し²⁾、ZDFラット無治療群においても、造影剤腎症は明らかではなかった。この理由としては、ZDFラット無治療群では既に存在する尿細管低酸素状態が、'preconditioning ischemic condition' として、腎保護的に作用している可能性も示唆される。

日常臨床では、メトホルミンは造影剤投与時、造影剤腎症による急性腎不全から乳酸アシドーシスを起こす危険性を考慮し内服中止となるが、メトホルミンに

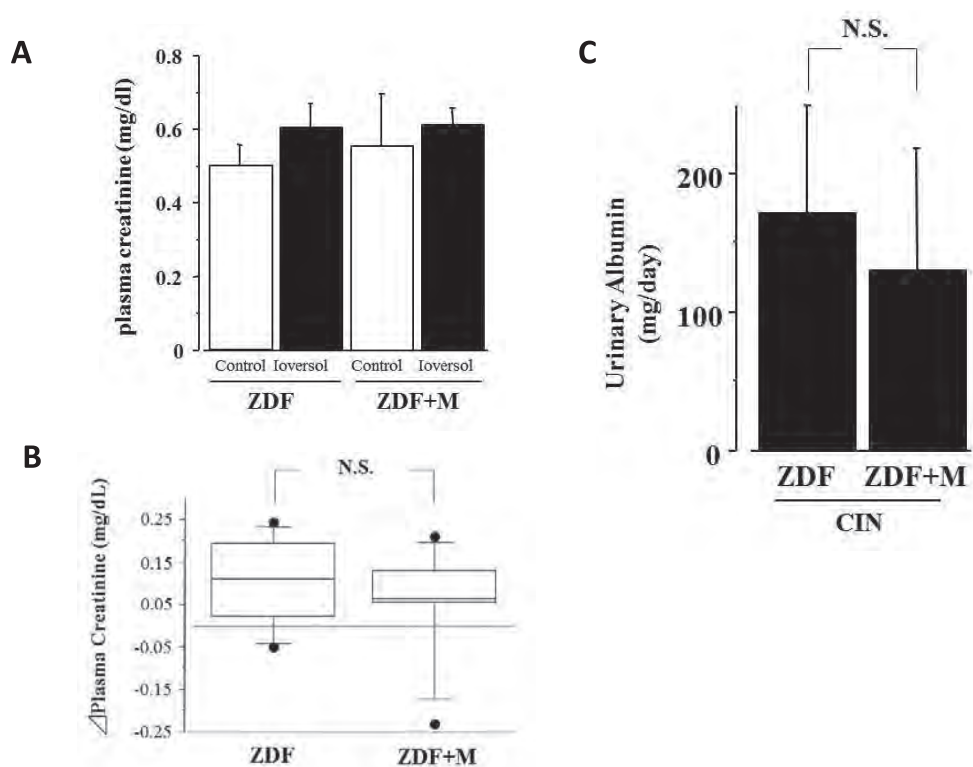


図1 2型糖尿病モデル ZDF ラットにおける造影剤腎症に対するメトホルミンの効果
ZDF ラットでは、造影剤投与による血清クレアチニン値の上昇は有意ではなく (A)、またメトホルミン治療群 (+ M) では造影剤投与前後でのクレアチニン上昇値 (B)、また尿中アルブミン (C) は無治療群に比較し、減少傾向にある。

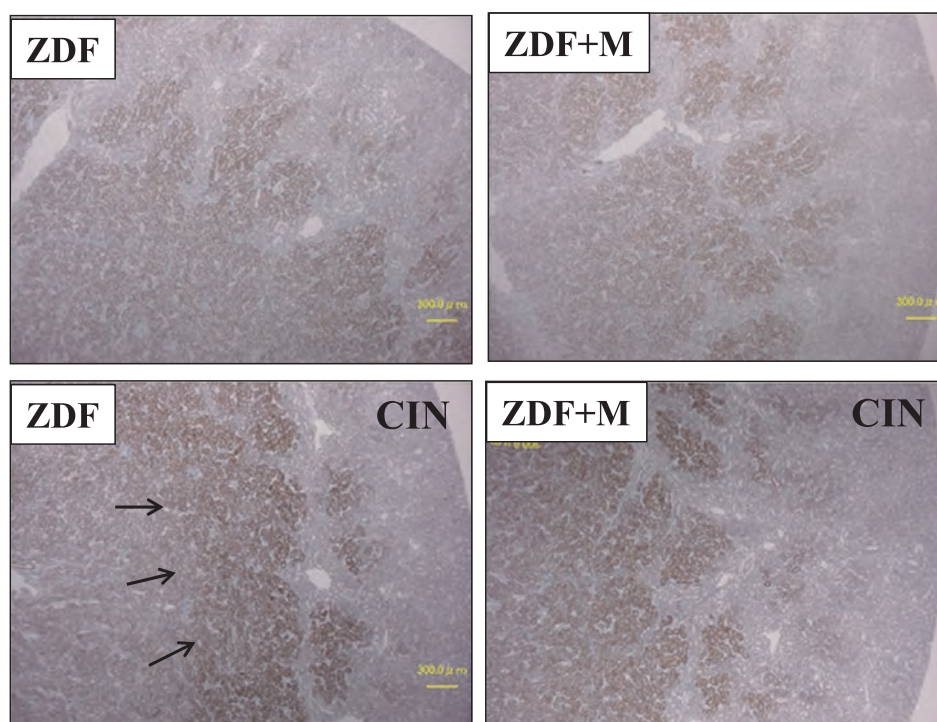


図2 ZDF ラットにおける腎臓低酸素状態に対するメトホルミンの効果
造影剤腎症 (CIN) 群では、低酸素マーカー pimonidazole の皮髄領域の染色増強 (↑) が認められるが、メトホルミン治療群 (+M) では減少している (3,3'-Diamino Benzidine 染色)。

による乳酸アシドーシス発症の危険性については、その発症頻度が他の抗糖尿病薬と差が無いことから、いまだ明らかとはなっていない³⁾。一方、メトホルミン投与が種々の臓器の虚血性病態に対し、多面的な効果を介し、保護的に作用することが明らかとなりつつある。心筋虚血に対しては、メトホルミンがFOXO3を抑制し、活性型Caspase 3であるcleaved typeを減少させ、アポトーシスを減弱することにより保護的に作用し⁴⁾、また、メトホルミン、AICAR、運動などAMPK活性作用を有する治療後のラット心臓を用いたmicroarray analysisでは、心保護的経路に参与する遺伝子の変化が報告されている⁵⁾。更に最近、SDラットにメトホルミン50mg/kgを3週間腹腔内投与後、中大脳動脈永久的閉塞時には、治療群では脳梗塞巣が小さく、また神経障害の改善が良好であり、その作用機序としてNF- κ Bを介した炎症機構の抑制が報告されている⁶⁾。更にメトホルミンによるNitric Oxide依存的な皮膚移植片生着率の改善作用なども知られている⁷⁾。今回の結果より、現医療現場とは相反し、造影剤腎症保護を目的としたメトホルミン治療の可能性が示唆される。現在、その臨床応用のため、糖尿病状態での造影剤腎症発症機序とメトホルミンのpleiotropic effectsについての詳細な検討を進めている。

【文 献】

- 1) Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, Fujita Y, Honjo J, Shimizu N, Makino Y, Haneda M. Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin: a possible role of HIF-1 α expression and oxygen metabolism. *Diabetes* 60, 981-992 (2011).
- 2) Takiyama Y. Effects of Metformin on Contrast-Induced Nephropathy. *Asahikawa Medical University Research Bulletin* 13, 61-62 (2013).
- 3) Richy FF, Sabidó-Espin M, Guedes S, Corvino FA, Gottwald-Hostalek U. Incidence of lactic acidosis in patients with type 2 diabetes with and without renal impairment treated with metformin: a retrospective cohort study. *Diabetes Care* 37: 2291 – 2295 (2014).
- 4) Elmadhun NY, Sabe AA, Lassaletta AD, Chu LM, Sellke FW. Metformin mitigates apoptosis in ischemic myocardium. *J Surg Res* 192,50-58(2014)
- 5) Solskov L, Magnusson NE, Kristiansen SB, Jessen N,

Nielsen TT, Schmitz O, Bøtker HE, Lund S. Microarray expression analysis in delayed cardioprotection: the effect of exercise, AICAR, or metformin and the possible role of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Mol Cell Biochem* 369, 353-362(2012).

- 6) Zhu XC1, Jiang T, Zhang QQ, Cao L, Tan MS, Wang HF, Ding ZZ, Tan L, Yu JT. Chronic Metformin Preconditioning Provides Neuroprotection via Suppression of NF- κ B-Mediated Inflammatory Pathway in Rats with Permanent Cerebral Ischemia. *Mol Neurobiol* 2014 A [Epub ahead of print]
- 7) Taleb S, Moghaddas P, Rahimi Balaei M, Taleb S, Rahimpour S, Abbasi A, Ejtemaei-Mehr S, Dehpour AR. Metformin improves skin flap survival through nitric oxide system. *J Surg Res* 2014 [Epub ahead of print]

2) 癌微小環境における腫瘍血管、リンパ管の調節

研究代表者 齊藤 幸裕

【背景と目的】

癌の早期発見や手術成績の向上により局所治療に関する成績は向上してきたが、癌の治療成績全体を向上させるには血行性転移やリンパ節転移に関する新たなブレイクスルーが必須であることが明らかとなってきた。Folkman らが癌に対する血管新生抑制療法を提唱して以来いくつかの分子が報告された¹⁾。臨床応用されている bevacizumab の治療成績の報告では無病生存期間を延長し患者 QOL を改善するものの5年生存率には寄与しないことが明らかとなり、単独での血管新生抑制療法の限界も見えてきている。そこで我々は癌の増殖、転移には血管新生のみならず、リンパ管新生も関与するため、これら両者を同時に制御することが予後向上のための治療標的となるのではないかと考えた。そこで本研究の目的は以下の3点とした。1, 血管、リンパ管新生を同時に抑制しうる遺伝子を同定する。2, 候補遺伝子の作用機序を明らかにする。3, 動物モデルで治療効果を評価する。

【方法と結果】

マウス肺癌 LL/2 細胞の cDNA ライブラリーを High Throughput Functional Screening して、増殖抑制候補遺伝子 Y box protein 3 (Ybx3) を特定した。Ybx3 は血管、

リンパ管内皮細胞両方の増殖能を抑制した。Ybx3 は転写因子に拮抗して CT rich な遺伝子配列に結合し、その部位の転写を抑制することが知られている。このことから増殖抑制の作用機序として、既報の HRE の転写抑制に加えて、CT rich な配列である SRE と NF κ B にも結合し抑制することを確認した。これにより図 1 に示すように、腫瘍からの血管、リンパ管新生因子の分泌を抑制するとともに、血管、リンパ管内皮細胞内のシグナル伝達を阻害することが確認できた。生体での Ybx3 の作用を確認するために、マウス背部皮下に LL/2 細胞を移植した担癌マウスモデルに Ybx3 を遺伝子導入すると、腫瘍周辺の血流低下と腫瘍増殖抑制、血行性、リンパ行性転移減少を認め、組織染色から血管、リンパ管新生が抑制されていた (図 2)。

【考察とこれからの計画】

Ybx3 は血管、リンパ管新生を同時に抑制しうる新規の制御遺伝子であり、癌治療の次世代の治療戦略となりうることが示唆された。癌微小環境を標的とした場合、癌への流入路である動脈の制御は癌そのものの増殖を抑えることを目的としているが、全体像をとらえた場合には静脈やリンパ管といった出口に対する制御が転移を抑制することにつながると考える。したがって今後の抗血管新生療法は動脈、静脈、リンパ管を総合的に調節する治療法の開発が必須と思われる。また癌微小環境を誘導し構築する因子が何でどこから来るのかを検討する必要がある。一つの考えとしては

癌の多様性からそのような特性を持った癌細胞が発生することが考えられる。これまでの検討から Ybx3 は癌細胞においても NF κ B や SRE、p53、Rb などの分子を調節することがわかっており、癌の多様性、分化と Ybx3 の役割を解明していく予定である。本研究の一部は以下の論文に掲載された。1) Saito Y, et al. *Oncogene* (2008) 27, 1821–1833. 2) Matsumoto G, Saito Y, et al. *Clin Exp Metastasis*. 2010 Oct;27(7):539–47. 3) Saito Y, et al. *Antioxidants & Redox Signaling*; 15, 2109–2120, 2011.

【文 献】

- 1) Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182–6.

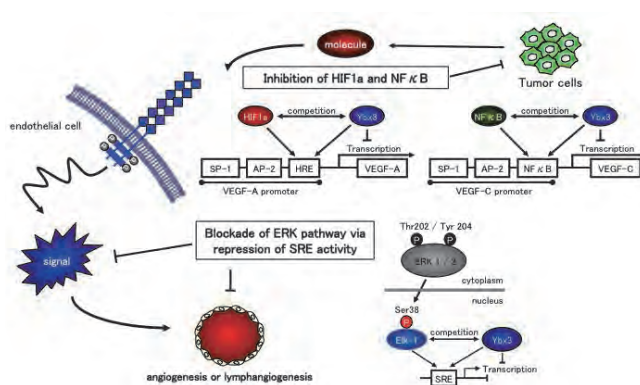


図 1 Ybx3 の作用機序

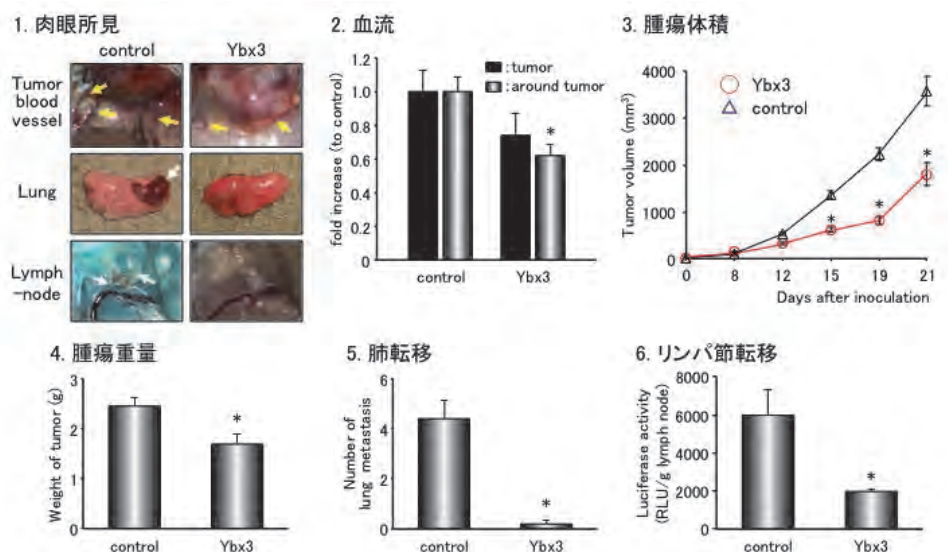


図 2 Ybx3 導入による癌増殖、転移抑制効果

3) 臼蓋形成不全に対する骨切り手術前・後の応力解析—恥骨・後柱骨折発生要因の検討—

研究代表者 佐藤 達也

【目的】

臼蓋形成不全に対する治療法の一つである寛骨臼回転骨切り術は、荷重部の面積を広げ、荷重ストレスを軽減させる方法で、その良好な成績が報告されている。一方で、本術式後の恥坐骨の疲労骨折を起こす合併症が知られているが、そのメカニズムに関しては不明である。今回、骨折の発生リスクとなる肢位を予測することを目的に、坐位・立位における寛骨臼回転骨切り術前後の骨盤内応力の解析を行ったので報告する。

【方法】

24歳女性の臼蓋形成不全股の寛骨臼回転骨切り術前・後に撮影された骨盤CT画像より左寛骨を皮質骨・海綿骨のそれぞれを輪郭抽出し、三次元モデルを作成した。三次元モデルを有限要素解析ソフトANSYS上で、六面体要素でメッシュ分割した。皮質骨の物性値は、ヤング率17000MPa・ポアソン比0.3、海綿骨は同70MPa・0.2と設定した。片脚立位・坐位ともに恥骨結合・仙腸関節面を完全拘束とした。本モデル患者の体重50kgより、坐位モデルでは坐骨結節より垂直方向に160N荷重し、片脚立位モデルでは関節面に1500N、腸骨中臀筋付着部に300Nを負荷した。4モデルに対し、恥骨下枝・恥骨上枝・後柱部分に着目し、それぞれにかかる応力を解析した。

【結果】

術前・後モデルの要素数はそれぞれ20484、24398であった。坐位のモデルでは、恥骨上枝・恥骨下枝・

後柱にかかる負荷は、術前それぞれ1.4、2.2、4.1MPaから術後0.04、7.4、5.9MPaに変化し、術後、恥骨下枝にかかる負荷が有意に増加した。立位のモデルでは、同様に、術前それぞれ3.8、2.5、6.3MPaから術後0.03、3.4、13.5MPaに変化し、術後、後柱にかかる負荷が有意に増加した。(図)

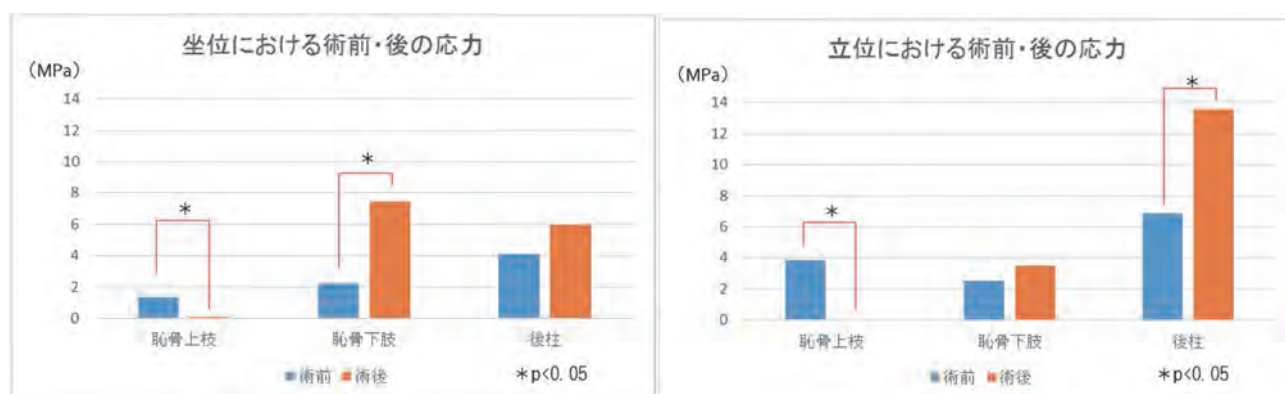
【考察】

寛骨臼回転骨切り術後の恥骨下枝骨折には坐位による負荷、後柱骨折には立位による負荷が寄与していると考えられた。

今井ら¹⁾は、骨切りによって発生する骨盤輪破綻による荷重分散の不均衡が重要な要因であるとしているが、その詳細については検討されていなかった。今回の研究からは、坐位・立位とも恥骨上枝が切離され応力が低下するなか、坐位では恥骨下枝、立位では後柱への応力が増加しており、術前モデルに比べ応力の不均等が生じており、今井らの主張を裏付けるものであった。術後療法において、後柱の骨折が疑わしい場合、立位動作は極力避けた方が望ましく、また、恥骨下枝の骨折の際には、坐位を制限することで、骨折予防あるいは骨折早期治癒が得られる可能性があると考えられた。

【文献】

今井教雄ほか：有限要素法を用いたCurved periacetabular osteotomy 関連恥骨下枝および坐骨骨折例の検討．Hip Joint 38: 571-574. 2012



4) 前立腺肥大症に対するデュタステリドのテストステロン上昇による副次効果—骨密度への影響

研究代表者 和田 直樹

【目 的】

5 α 還元酵素阻害薬であるデュタステリドは、テストステロン (T) がジヒドロテストステロン (DHT) に変換されることを阻害することで前立腺を縮小させ、下部尿路の閉塞を軽減させる¹⁾。その結果、前立腺肥大症 (BPH) 患者の下部尿路症状 (LUTS) を改善させると考えられている。一方、デュタステリド投与による T の上昇が LUTS 改善に関与していることも示唆されている²⁾。男性におけるテストステロン作用は骨代謝をはじめとする様々な生理反応に影響を与える。そこで BPH 患者に対するデュタステリド投与が骨密度 (BMD) に与える影響を検討した。

【方 法】

既に3ヵ月以上デュタステリド以外の薬物治療を施行しており、国際前立腺症状スコア (IPSS) が8点以上かつ前立腺体積 (PV) が30ml以上のBPH患者17名を対象とした。デュタステリド1日0.5mgを上乗せ投与し、投与前および投与後1年でIPSS、PVおよび血清T値を計測し、さらにDEXA法にて大腿骨および腰椎のBMDを測定した。

対象患者は研究期間中、下部尿路機能やBMDに影響を与えうる薬剤を投与されないものとした。

【結 果】

対象患者の平均年齢は78歳 (64 ~ 88歳)、平均PVは50ml (30 ~ 97ml)、平均IPSSは15.1 (8 ~ 35)であった。デュタステリド投与1年でPVは有意に縮小 ($50 \pm 24\text{ml} \rightarrow 34 \pm 18\text{ml}$, $P < 0.01$) し、IPSSは有意に改善 ($15.1 \pm 9.8 \rightarrow 11.7 \pm 10.6$, $P < 0.01$) した。また血清T値は有意な変化を示さなかった ($428 \pm 134\text{ng/dl} \rightarrow 462 \pm 168\text{ng/dl}$, $P = 0.22$)。

デュタステリド投与1年で腰椎におけるBMDおよびYAM (young adult mean) 値に有意な変化を認めなかったが、大腿骨のBMDでは有意な改善を認めた ($0.77 \pm 0.17\text{g/cm}^2 \rightarrow 0.82 \pm 0.17\text{g/cm}^2$, $P < 0.01$)。デュタステリド投与後1年で血清T値が上昇した9名では腰椎 ($1.18 \pm 0.26\text{g/cm}^2 \rightarrow 1.22 \pm 0.26\text{g/cm}^2$, $P < 0.01$)

および大腿骨 ($0.76 \pm 0.14\text{g/cm}^2 \rightarrow 0.84 \pm 0.14\text{g/cm}^2$, $P < 0.05$) とともにBMDの有意な上昇を認めた。

【考 察】

男性におけるTの骨塩に対する作用機序は不明な部分も多く、アンドロゲン受容体を介した直接作用とエストロゲン受容体を介した間接作用があると考えられている。男性では女性と比べると骨粗鬆症やそれに伴った骨折の頻度は少ないものの、男性では大腿骨々折後の死亡率が女性よりも高いといった報告もあり、男性では骨粗鬆症や骨折の予防が重要と考えられる。

今回の検討では対象患者数も少なく、全体におけるT値の有意な変化は認めなかったが、デュタステリド投与後のT値の変化は一律ではなく、投与前のT値が低値である群で有意にT値上昇を認めるとされる。低T値であるいわゆるLOH症候群 (加齢男性性腺機能低下症候群) におけるデュタステリド投与ではT値の上昇とともにBMDの改善を認めるといったわれわれの検討と類似した結果も報告されている³⁾。

結論として、BPH患者に対するデュタステリドの投与は血清T値の上昇に伴ってBMDの改善にも寄与すると考えられた。

【文 献】

- 1) Wada N, Kita M, Hashizume K, et al: Urodynamic effects of dutasteride add-on therapy to alpha-adrenergic antagonist for patients with benign prostatic enlargement: prospective pressure-flow study. *Neurourol Urodyn* 32, 1123-1127 (2013)
- 2) Wada N, Hashidume K, Tamaki G, et al: Add-on effect of dutasteride in patients with benign prostatic hyperplasia treated with alpha blocker : its effect on overactive bladder. *Hinyokika Kiyo* 58, 475-480 (2012)
- 3) Shigehara K, Koh E, Sakamoto J, et al: Effects of dutasteride on lower urinary tract symptoms and general health in men with benign prostatic hypertrophy and hypogonadism: a prospective study. *Aging Male* 17, 51-56 (2014)

5) 肝培養細胞を用いたピオグリタゾンのインスリン および脂質代謝シグナルに対する薬理作用の解析

研究代表者 飯田 慎也

【目 的】

本邦においても生活習慣病の増加にともない、non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) の患者数は増加している。NAFLD のうち肝硬変、肝臓に進行する可能性のあるものが nonalcoholic steatohepatitis (NASH) と呼ばれ、アルコール性肝炎、ウイルス性肝炎、薬剤性肝障害が否定される肝炎の多くが NASH と推定されている。NASH の発症には、肥満、糖尿病に付随するインスリン抵抗性が関与しているとの報告があるが、様々な発症機序が想定されており治療法については不明な点が多い。インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン (PGZ) は、抗糖尿病薬としてだけでなく NASH の治療にも有効である。PGZ は転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) のアゴニストであるが、PGZ の肝臓における詳細な作用メカニズムはいまだ不明である。肝細胞においても PPAR γ のサブタイプの 1 つである PPAR γ_1 の発現が確認されており、PGZ が肝臓において PPAR γ_1 の活性化を介して、インスリンシグナル伝達系や脂質代謝系に作用している可能性も考えられる。

本研究は、インスリンシグナル系の主要因子である Akt、糖新生や脂肪酸分解に関与することが知られている PKA、グリコーゲン合成、脂肪酸合成に抑制的に作用すると考えられている GSK-3 β に対する、PGZ の薬理作用を解析することを目的としている。

【方 法】

Akt, GSK-3 β , PKA の転写量とリン酸化蛋白量の検出

ヒト肝細胞由来 HepG2 細胞に PGZ を 25 μ M 添加し 72 時間培養後、各遺伝子の転写量をリアルタイム PCR 法で相対定量した。次に、PGZ 添加 48 時間後の Akt, PKA のリン酸化と、GSK-3 β の蛋白量をウェスタンブロット法で検出した¹⁾。

HepG2 細胞内の脂質量

培地にクロロキン (CQ) を 6.25, 12.5, 25 μ M 添加し、72 時間培養することで HepG2 細胞に脂質蓄積を誘導した。PGZ(25 μ M) を CQ と同時に添加した場合の細胞内脂質を oil red O を用いて染色し、細胞内脂質量

を吸光度 (540nm) で定量した²⁾。

【結 果】

PGZ の作用による Akt, GSK-3 β , PKA の転写量とリン酸化の変動

PGZ を 72 時間作用させた HepG2 細胞において、PKA の mRNA 量はコントロールの約 60%、GSK-3 β では約 75% に減少していた。一方、Akt の mRNA 量に変動は見られなかった。

PGZ 作用 48 時間後のリン酸化 Akt, PKA 蛋白量とともに微量であり、PGZ によるリン酸化への影響を検出できなかった。また、GSK-3 β の蛋白量に変動は見られなかった。

CQ により誘導される細胞内脂質蓄積に対する PGZ の効果

CQ により HepG2 細胞内に蓄積される脂質量は微量であるが、PGZ の作用により減少傾向を示した。

【考 察】

PGZ の作用により PKA, GSK-3 β の転写量に減少傾向が見られた。この結果は、肝細胞中で糖新生が抑制され、グリコーゲン合成や脂肪酸合成が活性化されている可能性を示唆している。一方で Akt, PKA のリン酸化蛋白量や GSK-3 β 蛋白量の有意な変動は検出されなかった。1 点のサンプリングでは、遺伝子の転写量、蛋白量、細胞内シグナル伝達にともなうリン酸化蛋白量の継時的変動が検出できていない可能性がある。

CQ はライソゾーム機能を傷害することで細胞内に脂質を蓄積させると考えられている³⁾。本実験から、PGZ が CQ による細胞内脂質蓄積を阻害する可能性が示唆された。PGZ の肝細胞内脂質代謝系への薬理作用を解析するためには、安定した微量脂質量系の確立が必要である。今後は CQ による脂質蓄積誘導のほか、オレイン酸によるものなど、他の細胞内脂質蓄積誘導系の検討を通して、最適な評価系の確立を進めていく必要がある⁴⁾。

【文 献】

- 1) Zhang L.H., Kamanna V. S., et al. :Pioglitazone increases apolipoprotein A-I production by directly enhancing PPARE-dependent transcription in HepG2 cells. J.

Lipid Res. 51, 2211-2222 (2010)

- 2) Yan F., Wang Q., et al. :Peroxisome proliferator-activated receptor α activation induces hepatic steatosis, suggesting an adverse effect. PLoS one. 9(6), e99245 (2014)
- 3) Park S., Choi Y.J., et al. :In vitro validation of drug-induced phospholipidosis. J. Toxicol. Sci. 37(2), 261-267 (2012)
- 4) Cui W., Chen S. L., et al. :Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. Am. J. Transl. Res. 2(1), 95-104(2010)

6) ミクログリアの活性化を調節する内在性制御因子の同定

研究代表者 田中 達英

【研究の背景と目的】

中枢神経は神経細胞と3種類のグリア細胞で構成されている。グリア細胞の一つであるミクログリアは、脳内の主要な免疫担当細胞であり、脳細胞の10%程度を占める細胞である。活性化ミクログリアは組織傷害性細胞（以下、M1と呼ぶ）として作用する一方、保護性細胞（以下、M2と呼ぶ）としても作用する。この二面性は細胞内でどのように制御されているのかは不明である。本研究は、ミクログリアの持つ二面性はM1ミクログリアとM2ミクログリアを変換させる内在性因子（switch因子）が存在するという仮説に基づいてM1ミクログリアとM2ミクログリアのswitchingを制御する内在性因子を同定することを目的とした。

【結 果】

1. ミクログリアのフェノタイプは細胞外の刺激に応じてシフトする

ミクログリアをLPS（リポ多糖）で処理すると傷害性因子であるTNF- α やIL-1 β 、また、M1フェノタイプのマーカーであるCD86、iNOSの発現量が上昇するのに対して、IL-4で処理すると保護性因子であるNGFやBDNFなどの神経栄養因子、また、M2フェノタイプのマーカーであるArg1、CD206の発現量が上昇することをqRT-PCR、免疫染色法で確認した。

続いて、M1ミクログリアとM2ミクログリアは細胞外の刺激に応じてシフトするのかを検討するため、ミクログリアをLPSまたはIL-4で18時間処理した後、

mediumを交換し、更に刺激する試薬もIL-4またはLPSに交換して、各フェノタイプのマーカー発現を調べた。その結果、LPSで刺激後、mediumを交換してIL-4で刺激すると時間依存的にM1マーカーの発現量は減少し、M2マーカー発現は時間依的に上昇した（図1）。また、IL-4でミクログリアを刺激した後LPS刺激に変換するとM1マーカーは上昇し、M2マーカーは減少した（図1）。以上の結果から、M1とM2ミクログリアは細胞外の刺激に応じてフェノタイプがシフトすることが示唆された。

2. ミクログリアの内在性因子IRF7はミクログリアのM1へのシフトに関与する

では、ミクログリアに発現するどのような因子がフェノタイプのswitchingに寄与しているのであろうか。最近になり、マクロファージやミクログリアにおいてInterferon Regulatory Factor（IRF）が細胞の活性化を制御していることが報告されている。本研究では、M1やM2ミクログリアの性質を制御している内在性因子として、転写因子であるIRFファミリーに着目した。IRFは1-9までが知られており、その中でもLPS刺激で発現量が顕著に亢進するIRF7に着目した。ミクログリアをLPSで刺激するとIRF7の発現量が上昇するが、IL-4刺激によってM2へシフトさせると、IRF7の発現量は時間依的に減少した。一方でM2からM1にシフトさせるとIRF7の発現量は時間依的に上昇した。

IRF7は*in vitro*においてM1、またはM2からM1

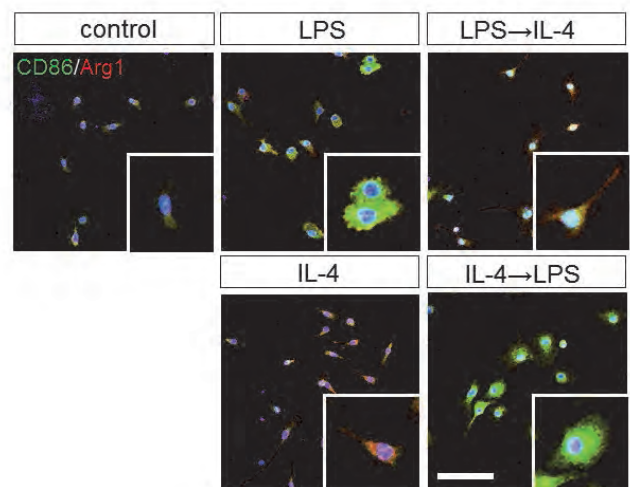


図1 各刺激に応じたM1マーカー（CD86）、M2マーカー（Arg1）発現変化

にシフトさせた時に発現が上昇することから、IRF7 の M1 マーカーに及ぼす影響について検討した。IRF7 の発現を siRNA でノックダウンすると LPS 誘導性の M1 マーカーの発現量は抑制された (図 2)。さらに ミクログリアを M2 から M1 にシフトさせた時の M1 マーカー発現量も IRF7 の発現を siRNA でノックダウンしたもので抑制された (図 2)。これらのことから、IRF7 は M1 マーカーの発現を制御していることが明らかになった。

【まとめ】

M1 と M2 ミクログリアが細胞外の刺激に応じて フェノタイプがシフトし、ミクログリアの傷害的性質の決定には IRF7 が関与することが示唆された。

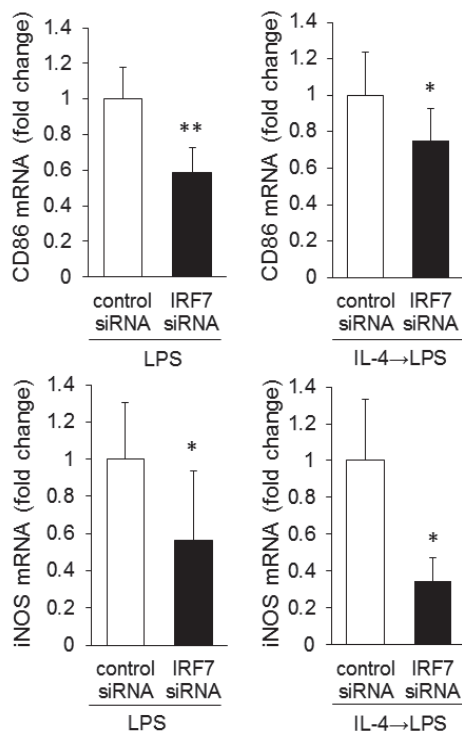


図 2 IRF7 siRNA 導入時の M1 マーカー発現

【文 献】

Interferon regulatory factor 7 participates in the M1-like microglial polarization switch. GLIA in press.

7) 精子ミトコンドリア機能の種特異性の解析

研究代表者 春見 達郎

【目 的】

精子は、卵との受精のために運動性を持つ非常に特化した細胞である。細胞質をほとんど持たず、頭部に凝縮した核が、核の後部にはミトコンドリアを含む中片が、中片の後部には運動装置である鞭毛が、動物精子の共通の構造である。これまでの筆者らの研究結果から、ラット精子はその遊泳時に非常に高い呼吸活性を示すとともに、非常に強い活性酸素種 (ROS) の消去機構を保持していることを明らかにした。これは呼吸で生じる ROS を強力に消去するためであると考えられる。一方、マウス精子は ROS に弱く、低濃度の過酸化水素処理でも精子 DNA に障害が認められることが報告されている。このように、動物種によって、精子の代謝活性に違いがあることから、精子の代謝機能を理解するためには、幅広く種々の動物を用いて、個々の動物精子の特徴を調べることが必要であると考えられる。本研究では、北海道沿岸域に生息し捕獲が容易でしかも多くの種が得られる魚類を用い、その精子の代謝機能の種特異性を解析した

【方 法】

精子は北海道沿岸域から捕獲される海産硬骨魚類 *Pleuronectes obscurus*、*Verasper moseri*、*Clupea pallasii*、*Scomberomorus niphonius*、*Takifugu niphobles* および *Gadus macrocephalus* から採取した。精子の呼吸活性は、酸素電極を用いたオキシメーター (東亜 DKK) により、精子懸濁液中の溶存酸素濃度の変化を測定した。ROS の消去活性は、Amplex Red を用い、過酸化水素の分解活性を指標として分光光度計を用いて測定を行った。

【結 果】

精子の呼吸活性は種により大きく異なり、*S. niphonius* や *C. pallasii* のように高い呼吸活性を示すものから、*P. obscurus* や *T. niphobles* のように呼吸活性をほとんど示さないものも存在した (図 1)。組織学的な観察からも、*C. pallasii* 精子のミトコンドリアは非常に大きく、しかも密で細かいクリステ構造が存在したのに対して、*P. obscurus* 精子ミトコンドリアは小さくクリステ構造も非常に疎であった。

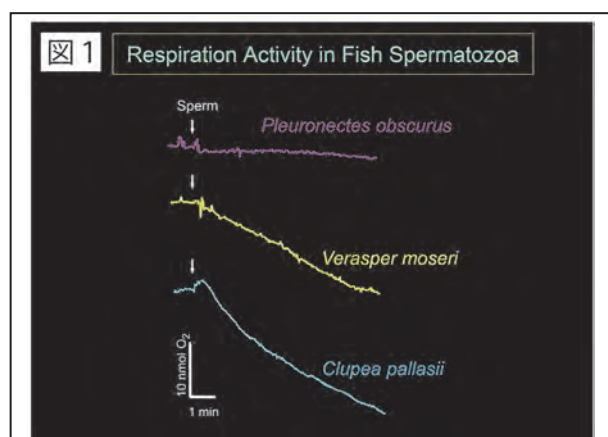


表 1		Respiratin Activity	
		Low	High
ROS Elimination Activity	Low	<i>Pleuronectes obscurus</i>	<i>Gadus macrocephalus</i>
	Inhibitors (Aminotriazole, PCMB)	<i>Takifugu niphobles</i>	<i>Verasper moseri</i>
	Sensitive		<i>Clupea pallasii</i>
	High		<i>Scomberomorus niphonius</i>
	Insensitive		

精子の ROS 消去活性もまた、種により大きく異なっていた。呼吸活性と合わせて表 1 にまとめた。ROS 消去系には酵素系と非酵素系が存在し、前者の阻害剤としては 3-Amino-1,2,4-triazole が、後者の阻害剤としては p-[Chloromercurio(II)]benzoic acid (PCMB) が知られている。ROS 消去活性を持つ種であっても、*T. niphobles* や *V. moseri* のようにこれらの阻害剤でその消去活性が阻害される種や、*S. niphonius* のように阻害されない種が存在した。

【考 察】

種々の動物種精子の代謝活性を呼吸と ROS 消去活性の両面から比較した。その結果、これらの代謝活性は種ごとに大きく異なり、広く多様性が存在していることが明らかになった。これまでの筆者らのラットを用いた研究で、呼吸活性が高いことは ROS の大きな産生が生じ、その結果、高い ROS 消去活性の存在につながると考えてきた。しかしながら、今回の結果から、*S. niphonius* のように、高い呼吸活性を持ちながら低い ROS 消去活性を持つ種や、反対に、*T.*

niphobles のように、呼吸活性は低いのに高い ROS 消去活性を持つ種が存在することが明らかになった。これらの結果は、精子の呼吸活性と ROS 消去活性の間には平行な関係が存在するのではなく、種ごとに異なる大きな多様性が存在することを示している。筆者らは、魚類の受精機構に大きな多様性があることを報告してきた¹⁾。今回の結果は、精子の代謝機構が、受精機構の多様性と関連する可能性を示唆する結果であった。ただ、現在のところ、精子の代謝機構の多様性が何に基づくのかは明らかではない。系統的位置関係や受精環境の違いと表 2 の多様性は一致しない。個々の動物において精子の代謝機構がどのように決定され、そして受精にどのように関わっているのかは今後の課題である

【文 献】

- 1) Yanagimachi R, Cherr G, Matsubara T, Andoh T, Harumi T, Vines C, Pillai M, Griffin F, Matsubara H, Weatherby T, Kaneshiro K, Biol Reprod. 2013 88:47. doi: 10.1095/biolreprod.112.105072.

本助成によって得られた研究成果の一部は、12th International Symposium on Spermatology, New Castle, Australia, 2014 において Harumi, *et al* “Validation of the Role for Species Identity of Sperm Entry into Micropyle in Fish Fertilization” として発表された。

8) ミトコンドリア阻害による新規中枢性嗅覚障害モデルマウスとドパミン神経変性の評価

研究代表者 笹島 仁

【研究目的】

鼻腔内に投与された化学物質は、鼻粘膜から血流を介して全身をめぐるとともに、嗅神経—嗅球間の接続を介して血液脳関門を経ることなく、直接、嗅球および脳脊髄液へ送達されることが知られている。そのため、環境化学物質への吸入暴露では、この嗅覚輸送経路を介して中枢神経に与える影響が懸念されている。ドパミン神経細胞は、農薬としても使用されるミトコンドリア阻害性の化学物質に対して感受性が高く、ミトコンドリア呼吸鎖阻害による活性酸素増加により細胞死が誘導される。この種の農薬を使用する農業従事

者では、黒質ドパミン神経細胞脱落によるパーキンソン病発病率が高いことが報告されており、環境化学物質と中枢神経変性との関連が疑われている (Tanner et al., *Environ. Health Perspect.*, 2011)。

我々はこれまでの研究から、ミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iを阻害するロテノンをマウスの鼻腔内に反復投与すると、酪酸臭に対する忌避行動の低下、嗅球ドパミン神経細胞の消失ならびに嗅球萎縮を呈することが明らかになった。また、片側鼻腔内投与にもかかわらず、嗅球での作用は両側性に現れることから、ロテノンの影響範囲は拡大することが示唆された。そこで本研究では、ロテノンの嗅覚輸送を介して表出する脳の脆弱性に関して検討した。

【研究方法】

マウス（雌、BALB/c、3-6 か月齢）の右側鼻腔内に、ロテノン（0.35 mg/kg）を一日一回、反復投与した。麻酔下にて PBS 灌流後、RNAlater (QIAGEN) あるいは 4 % パラホルムアルデヒドを灌流、抜脳し、RNA 抽出あるいは免疫染色に用いた。リアルタイム PCR による各種マーカー遺伝子発現動態の解析は、KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS) ならびに LightCycler 480 (Roche) を用いて行った。脳内のドパミン神経細胞の分布は、抗 TH 抗体を用いた蛍光組織免疫染色あるいは ABC 増感 DAB 染色により観察した。

【結果および考察】

これまでの研究からマウス鼻腔内へのロテノン反復投与を 14 日間行くと、嗅球の有意な萎縮、ドパミン神経細胞マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の免疫染色像の消失が両側性に観察されている。また、Y 字迷路を用いた嗅覚機能評価では、ロテノン投与マウスは、7 日間投与群において 25% 酪酸に対する忌避行動を、14 日間投与群においては 25% ならびに 100% 酪酸に対する忌避行動を消失することを見出している。さらに、RT-PCR による遺伝子発現動態の解析では、投与 3 日目より、TH 発現の減少とミトコンドリアストレスマーカーである PARK2 の発現増強が認められた。

本研究では、リアルタイム PCR により遺伝子発現動態の定量的解析を行い、ロテノン鼻腔内投与群の

嗅球における TH 発現減少ならびに PARK2 発現増加が、投与 3 日目以降に有意であることを確認した ($n=6$, $p<0.005$ by Welch's t test)。さらに、PARK2 同様のミトコンドリアストレスマーカーである PINK1 の有意な発現増強、アポトーシス因子である Bax の発現増強を投与 3 日目より認めた ($n=6$, $p<0.001$ by Welch's t test)。ミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iの阻害は、不完全な呼吸鎖反応による活性酸素を増大し、活性酸素により傷害されたミトコンドリアはミトコンドリア特異的オートファジーにより分解されることが知られている。PARK2 および PINK1 はミトコンドリア特異的オートファジー誘導因子であることから、鼻腔内に投与されたロテノンは、嗅覚輸送を介して嗅球に到達し、過剰なミトコンドリアストレスを誘導することで、アポトーシスを引き起こすことが示唆された。

14 日間のロテノン投与によって、嗅球における TH 陽性細胞が消失した一方で、線条体においても抗 TH 抗体に対する免疫原性も低下していた。線条体における抗 TH 免疫原性は、黒質緻密部 (SNc) ドパミン神経細胞の axon に由来する。広範に及ぶ線条体におけるドパミン神経 axon の詳細観察は困難であることから、同じく黒質緻密部ドパミン神経細胞が dendrite を伸展する黒質網様部 (SNr) において、抗 TH 抗体染色を行った。その結果、対照群に比して、14 日間ロテノン投与群では、黒質緻密部より伸展する dendrite の退縮を認めた。従来報告では、マウスあるいはラットの鼻腔内へロテノンを投与しても、黒質ドパミン神経細胞への影響は無いとされている (Rojo et al., *Experimental Neurology*, 2007)。しかし本研究では、従来研究に比して投与量 1/7 かつ投与期間 1/2 の条件において、黒質ドパミン神経細胞における神経突起縮退という影響を見出しており、環境毒性物質への暴露に嗅覚輸送が介在した場合の、中枢神経変性の危険性を示すものと考えられる。

9) プロテオミクスによる肝細胞の増殖・分化制御機構の機能形態学的検討

研究代表者 藤井 清永

【目的】

肝細胞はきわめて高度に分化した複雑な細胞機能を持ちながら、必要に応じ幹細胞に匹敵する増殖能を示すユニークな細胞である。一方で、肝細胞の増殖・分化の異常はさまざまな非腫瘍性および腫瘍性肝疾患の病態に関わっていることが知られている。肝細胞の増殖と分化の間には密接な関連があるとされているが、これらの制御機構についてはまだ不明の点が多く残されている。

初代培養肝細胞は、肝臓の機能や薬物代謝の研究に実用的な研究材料として広く用いられており、肝細胞の増殖・分化のダイナミクスを検討する上で有用なモデルである。しかし、分離肝細胞は、培養初期には多くの生理的機能を維持しているが、培養の経過に伴って形態や分化状態が劇的に変化する。したがって、初代培養肝細胞を研究に適用する際に、その分化状態や機能的な変化を把握しておくことは重要である。本研究では、初代培養に伴う肝細胞の機能的な変化を体系的に捉えるため、プロテオミクスの手法を用いて、マウス肝細胞の培養後のタンパク質発現の変化を解析した。加えて、通常用いられる単層培養と肝細胞の分化状態を保つのに有利とされるスフェロイド培養の違いによる変化について検討した。

究では、初代培養に伴う肝細胞の機能的な変化を体系的に捉えるため、プロテオミクスの手法を用いて、マウス肝細胞の培養後のタンパク質発現の変化を解析した。加えて、通常用いられる単層培養と肝細胞の分化状態を保つのに有利とされるスフェロイド培養の違いによる変化について検討した。

【方法】

肝細胞は、C57BL/6J マウスの肝臓よりコラゲナーゼ灌流法を用いて単離した後、EGF と insulin、nicotinamide を添加した無血清 Williams' E 培地に懸濁し、単層培養は I 型コラーゲンを塗布したコラーゲンコート ディッシュ上で、スフェロイド培養はプライマリア ディッシュ上で培養した (図 1)。経時的に回収した細胞から可溶性タンパク質を抽出した後に、トリプシンを用いて酵素消化してペプチド混合物とした。得られた試料は LC-MS/MS (液体クロマトグラフィータンデム質量分析法) によるプロテオーム解析に供し、含有するタンパク質を一齐同定するとともに、スペクトルカウント法を用いて試料間における発

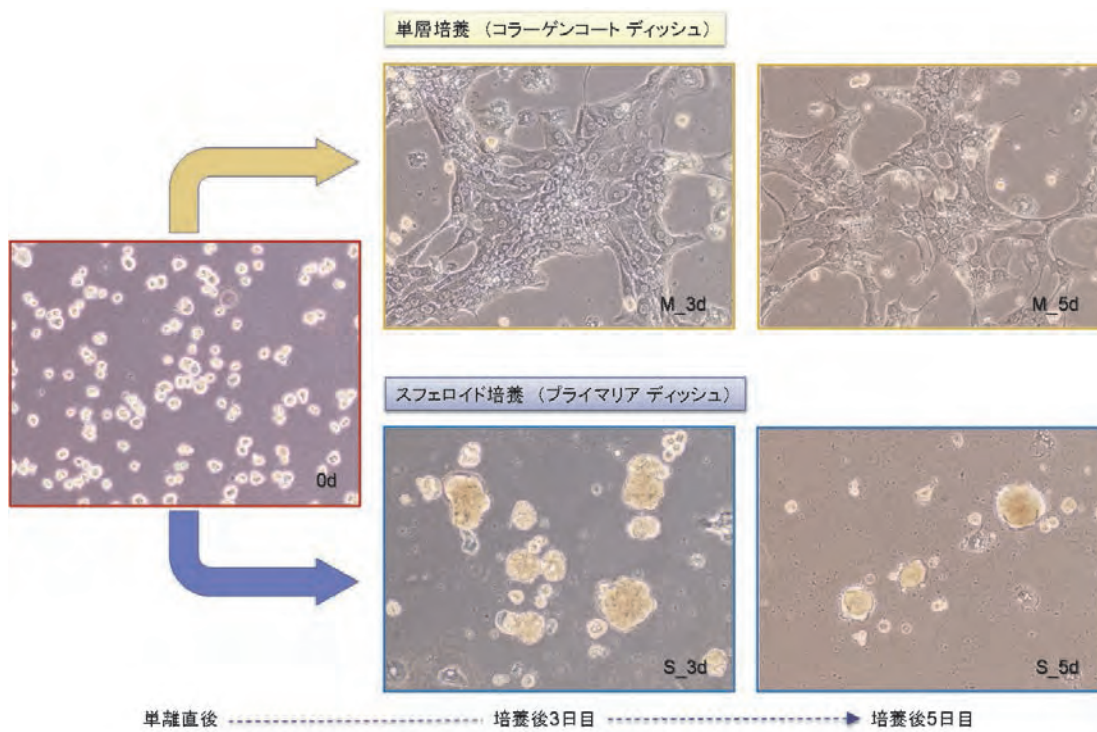


図 1 単層およびスフェロイド培養による形態の変化

単層培養では、分離肝細胞はすみやかにディッシュに接着し、その後はシート状もしくは索状の細胞集団を形成する。一方、スフェロイド培養では、一度弱くディッシュに接着した後に、球状凝集塊 (スフェロイド) を形成し、次第にディッシュから遊離して浮遊する。

現変動を解析した。

【結 果】

プロテオーム解析の結果、約 900 種類のタンパク質が同定され、約 700 種類の定量評価可能なタンパク質を用いて継時的な発現変動を調べたところ、マウス肝細胞の培養後のタンパク質発現は劇的に変化することが明らかになった。単層培養後 1 日目において、多くのタンパク質の発現が一過性に低下する一方、ミトコンドリア関連タンパク質の発現亢進が認められた。大部分のタンパク質の発現は培養後 2 日目、3 日目で種々の程度に回復するが、薬物代謝酵素（CYP 類）の発現量は培養後に低下し続けた。また、細胞骨格系タンパク質の発現は培養後半に著明に増加したが、これは同時期の形態変化と関連するものと考えられた。さらに、単層培養とスフェロイド培養では、肝細胞のタンパク質の発現量も大きく変化することが明らかになっ

た。特に、単層培養では、脂肪酸代謝・合成やアミノ酸代謝に関わるタンパク質の発現量が維持される一方、スフェロイド培養では、解糖系・糖新生や糖代謝に関わるタンパク質の発現量が亢進・維持される傾向が認められた（図 2）。

【考 察】

マウス肝細胞は培養によって、その形態とともにタンパク質発現が大きく影響されることが明らかとなった。プロテオーム解析は特に培養肝細胞の代謝状態を調べる上で有用であると考えられる。今回の検討に基づいて、増殖性の異なる培養条件下や肝細胞分化を誘導させる条件下などで、肝細胞の増殖・分化に関わるタンパク質群の同定を試み、肝細胞の増殖・分化制御機構メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

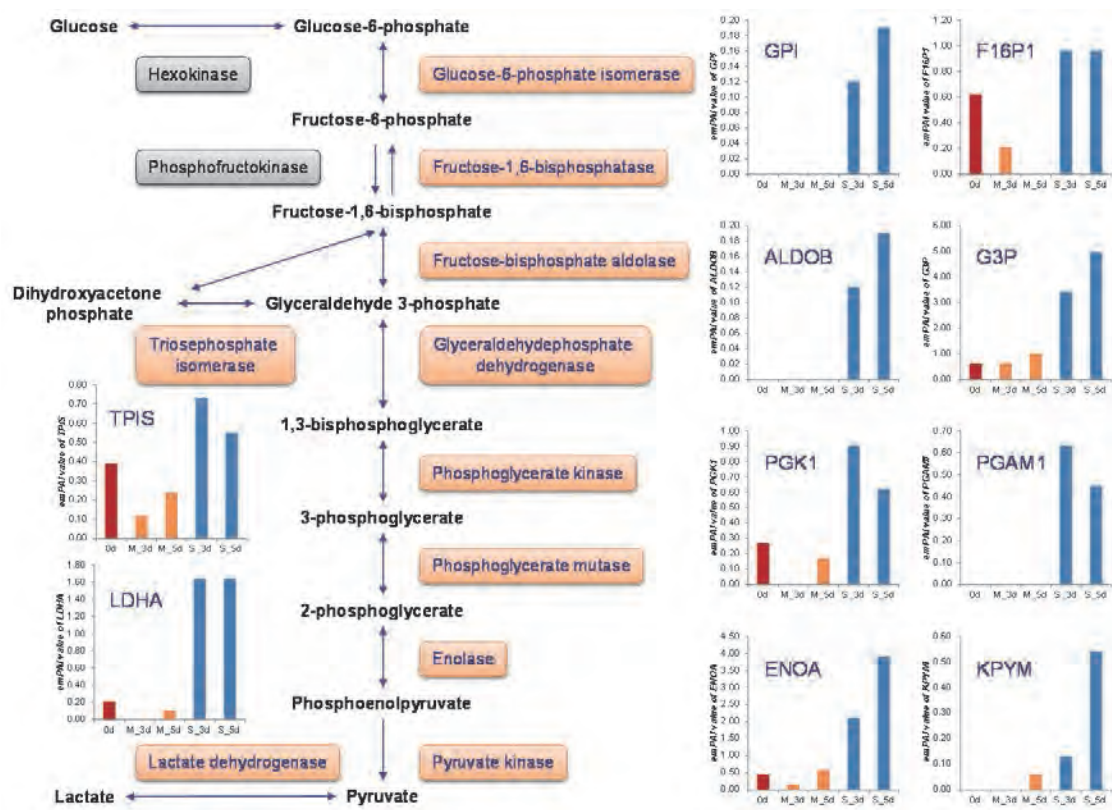


図 2 解糖系・糖新生に関わるタンパク質と発現量の変化

糖代謝の経路とそれに関わるタンパク質の定量値（emPAI 値）を示す。スフェロイド培養において糖代謝に関わる機能が維持・亢進していることが示唆される。

10) 肝細胞の再生性および腫瘍性増殖における MKK7 の機能解析

研究代表者 大塩 貴子

【目 的】

肝臓は再生能力の高い臓器として知られているが、様々な肝疾患においてその能力は障害される。肝疾患を治療する上で、肝再生のメカニズムを正確に把握することは重要であるが、肝細胞の増殖制御については不明な点が多く残されている。JNK-c-Jun 経路は細胞外からのストレスや炎症性サイトカインに応答し、細胞の増殖・生存・分化などを制御する。JNK の活性化には上流キナーゼである MKK7 と MKK4 が必須であり、これらのいずれかをマウスでノックアウト (KO) すると、肝発生不全により胎生致死となる^{1,2)}。昨年、MKK4 発現をノックダウンすると肝傷害後の肝細胞増殖が著明に促進されることが報告されたが、この効果は MKK7 の活性化を介していると推定されている³⁾。本研究では、肝再生や組織修復における MKK7 の役割を検証するため、肝細胞特異的な MKK7 コンディショナル KO マウスを用いた解析を行った。

【方 法】

MKK7 flox マウスと Mx1-Cre マウスを交配し、control マウス (MKK7^{flox/+}, Mx1-Cre^{-/-} もしくは MKK7^{flox/flox}, Mx1-Cre^{-/-}) と MKK7 KO マウス (MKK7^{flox/flox}, Mx1-Cre^{+/+}) を作製した。これらのマウスに poly(I:C) (250 μ g) を 3 回ずつ隔日腹腔内投与することにより肝細胞特異的に MKK7 をノックアウトし、以下の実験を行った。control および MKK7 KO マウスの肝組織から RIPA buffer で抽出した蛋白質を電気泳動し、抗 MKK7 抗体および抗 β -Actin 抗体を用いて Western blotting を行った。初代培養肝細胞の増殖や 70% 部分肝切除 (PH) による肝細胞増殖を Ki-67 染色によって検討した。また、急性肝傷害に対する反応を調べるために、control および MKK7 KO マウスに四塩化炭素 (CCl₄, 1 mL/kg) を皮下投与し、経時的に血漿中の alanine aminotransferase (ALT) の測定や肝組織の抗 phospho-c-Jun (Ser73) 抗体および抗 Ki-67 抗体による免疫染色と HE 染色を行った。

【結 果】

poly(I:C) 投与後の control および MKK7 KO マウス

の肝組織を Western blotting で検討し、MKK7 KO の肝臓において MKK7 が効率よく KO されているのを確認した (図 1A)。MKK7 KO は健常で、肝組織像も control と同様であった。

In vitro での肝細胞増殖能を調べるために肝細胞を分離し、培養 1 日目から 4 日目における Ki-67 陽性細胞の割合を測定した。培養 2 日目から肝細胞の著明な増殖が見られ、3 日目にピークを迎えたが、その程度や経時変化に関して MKK7 KO マウスと control マウスの間に明らかな差は認められなかった (図 1B, C)。

In vivo での増殖能を検討するために 70% 部分肝切除を行い、その後 1 日目から 3 日目の体重当たりの肝重量 (図 1D) および Ki-67 陽性肝細胞の割合 (図 1E) を測定したが、MKK7 KO による影響は見られなかった。

急性肝傷害に対する反応を調べるために四塩化炭素を投与した。経時的に血漿中の ALT 活性を測定したが、MKK7 KO と control の値は同様であった (図 2A)。四塩化炭素投与による JNK-c-Jun 経路の活性化を調べるために抗 phospho-c-Jun 抗体を用いて免疫染色を行った。control 無処置肝では陽性肝細胞は見られなかったが、四塩化炭素投与 6-24 時間後に小葉中心部において多数の肝細胞に陽性像が観察された (図 2B)。MKK7 KO でも陽性細胞が小葉中心部に出現したが、染色の程度は control に比べ弱かった (図 2B)。Ki-67 陽性肝細胞の割合は、MKK7 KO と control で有意差は見られなかった (図 2C)。しかし、四塩化炭素投与 4 日目において、MKK7 KO 肝では control 肝に比べ小葉中心部の壊死組織がより多く残存する傾向が見られた (図 2D)。また、8 日後では control 肝は完全に修復されたが、MKK7 KO 肝では小葉中心部に炎症巣が散見された。

【考 察】

Wuestefeld らは、MKK4 をノックダウンすると肝細胞の増殖が亢進することを見出し、そのメカニズムとして MKK4 の発現低下による MKK7 の活性化が重要であると報告している³⁾。しかし、我々の研究により、成体マウスにおいて MKK7 KO は肝細胞の増殖に影響しないことが明らかとなった。MKK4 ノックダウンによる肝細胞増殖亢進の原因は不明だが、我々の結果は MKK4 ノックダウンが JNK 以外の他の経路 (たと

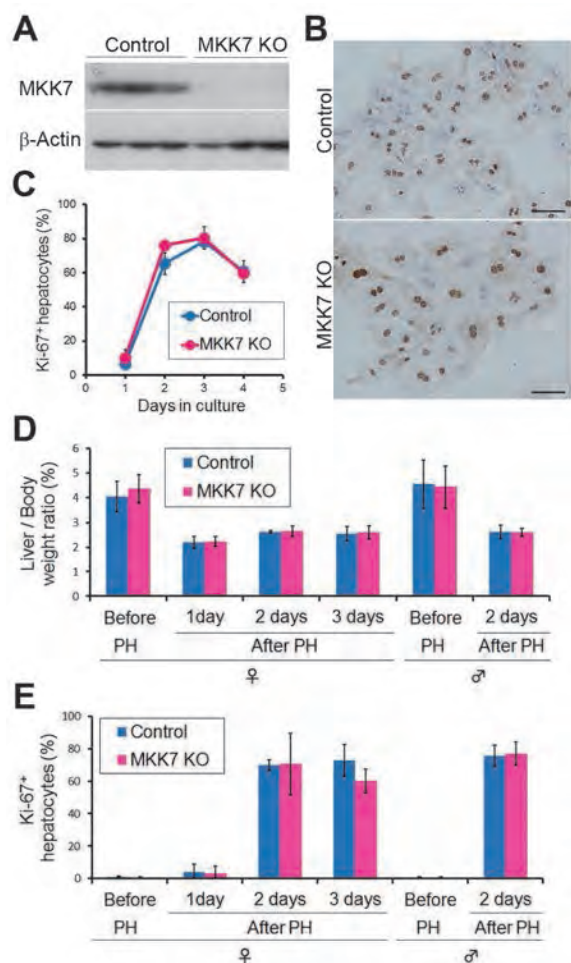


図1 肝細胞の増殖に MKK7 KO は影響しない。

(A) 肝から抽出した蛋白質液 (20 μg) の Western blotting. (B) 初代培養肝細胞の Ki-67 染色 (培養 2 日目)。Scale bar: 50 μm. (C) 初代培養肝細胞の Ki-67 陽性細胞の割合。(D) 70% 部分肝切除後の体重あたりの肝重量。(E) 70% 部分肝切除後の Ki-67 陽性肝細胞の割合。

例えば p38 経路) を介して肝細胞増殖を促進した可能性を示唆している。また、MKK7 KO マウスは胎児肝細胞の増殖が顕著に抑えられることによって肝臓形成が阻害され、発生過程の肝細胞増殖には MKK7 が必須であることが報告されている²⁾。したがって、同じ肝細胞増殖でも、胎児期と成体期では、MKK7 に対する依存度が大きく異なることが明らかとなった。

これまでの embryonic stem cells や mouse embryonic fibroblasts を用いた解析において、MKK4 もしくは MKK7 のどちらかを KO すると JNK-c-Jun 経路が著しく阻害されると報告されていたが⁴⁾、四塩化炭素投与時の肝細胞 MKK7 KO による JNK-c-Jun 経路抑制効果

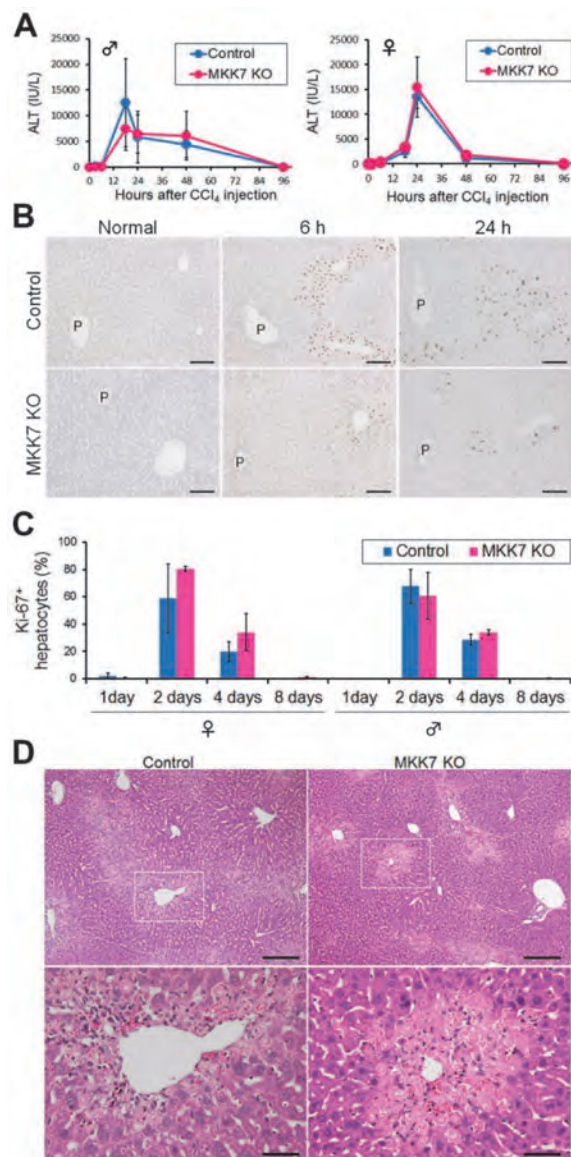


図2 MKK7 KO では四塩化炭素投与後の肝修復が遅延する。

(A) 四塩化炭素投与後における血漿中の ALT 活性。(B) 四塩化炭素投与後の phospho-c-Jun 染色。P: 門脈、Scale bar: 100 μm. (C) 四塩化炭素投与後の Ki-67 陽性肝細胞の割合。(D) 四塩化炭素投与 4 日目の肝組織像 (HE 染色)。下段は、上段の白枠部を拡大したもの。Scale bar (上段): 200 μm, (下段): 50 μm。

は弱かった。これは細胞の種類によって JNK-c-Jun 経路活性化に対する MKK7 の影響度が異なることを示唆しており、肝細胞において強力なストレス刺激が入ると、MKK7 以外のキナーゼが代償的に JNK をリン酸化し、MKK7 が無くても JNK-c-Jun 経路が活性化されると推察された。

今回の研究により、MKK7は肝傷害に対する肝組織修復に関与していることを見出した。肝傷害後の肝再生には、肝細胞の再生性の増殖だけではなく、炎症、死細胞の除去、細胞外マトリックスの再構築、肝細胞の移動など多くのステップが関与していると推察される。興味深いことに、神経特異的にMKK7もしくはMKK4をKOすると、大脳皮質ニューロンの移動能が低下するとの報告がある^{5,6)}。また、我々はMKK7 KO肝細胞凝集塊をコラーゲングル内に包埋し、胆管上皮様に分化させると、樹枝状の細胞突起形成がcontrolに比べて抑制されることも明らかにしている。MKK7 KOにおける肝修復の遅延は、生き残った肝細胞の傷害部への移動が抑制されるためである可能性を考慮し、*in vitro*での創傷治癒アッセイやマトリゲル浸潤アッセイを行い、MKK7が肝細胞の運動能に寄与しているのかを検討したい。さらに、四塩化炭素やチオアセトアミドの連続投与によって肝線維化や肝硬変と共に肝腫瘍を誘導し、MKK7 KOが腫瘍形成や肝腫瘍増殖に影響するかも明らかにしていきたい。

【文 献】

- 1) Ganiatsas S et al.: SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 6881-6886 (1998)
- 2) Wada T et al.: MKK7 couples stress signaling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol*. 3, 215-226 (2004)
- 3) Wuestefeld T et al.: A direct *in vivo* RNAi screen identifies MKK4 as a key regulator of liver regeneration. *Cell*. 153, 389-401 (2013)
- 4) Asaoka Y et al.: Diverse physiological functions of MKK4 and MKK7 during early embryogenesis. *J Biochem*. 148, 393-401 (2010)
- 5) Yamasaki T et al.: Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 31, 16872-16883 (2011)
- 6) Wang W et al.: Targeted deletion of the mitogen-activated protein kinase kinase 4 gene in the nervous system causes severe brain developmental defects and premature death. *Mol Cell Biol*. 27, 7935-7946 (2007)

11) Visinin-like protein subfamily と microsomal cytochrome b5 との親和性についての研究

研究代表者 及川 賢輔

【研究の背景と目的】

Visinin like protein-3 (VILIP-3)は、小脳のプルキンエ細胞に発現するカルシウム結合蛋白であるが、その細胞生理学的機能あるいは標的蛋白に関しては不明であった。我々はマウス VILIP-3の標的蛋白が小胞体シトクロム b5に結合することを見出した (*J Biol Chem*, 2004. 279(15): p.15142)。

VILIP-3はhippocalcin、neurocalcin- δ 、VILIP-1、VILIP-2などと共に、visinin-like protein subfamily (VILIPs)に属している。VILIPs内では、組織発現パターンが異なるもののアミノ酸配列相同性は65~94%と高い。従ってVILIPsに属するVILIP-3以外の蛋白質も、VILIP-3のカルシウム依存性標的分子であるシトクロム b5に親和性を示す可能性が高いと考えられた。今回われわれは、マウスのVILIPsをクローニングし、各蛋白のシトクロム b5への結合能力を、免疫沈降法を利用して明らかにした。

【研究方法】

マウス脳のtotal RNAを用いて、VILIP-3、hippocalcin、neurocalcin- δ 、VILIP-1およびシトクロム b5をRCR法にてクローニングし、それらを293T細胞に遺伝子導入し、tag融合蛋白質を共発現させた。tagを利用した共沈実験を行い、シトクロム b5との親和性をウエスタンブロット法にて解析した。

【結 果】

VILIPsのうち、VILIP-3、hippocalcin、neurocalcin- δ の3者は、シトクロム b5にカルシウム依存性の結合を示したが、VILIP-1は結合を示さなかった。さらにシトクロム b5に結合を示した3者の中で、VILIP-3が最も強い親和性を示した(下図)。

C末端FLAGタグを融合したVILIPs各蛋白とN末端にmycタグを付加したシトクロム b5 (Cyb5)を、

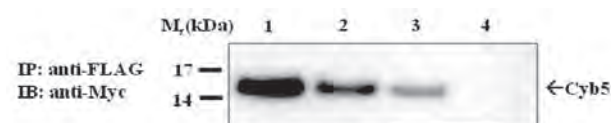


図 シトクロム b5 に結合する VILIPs

293T 細胞に共発現させ、カルシウム存在下で細胞を融解し共沈実験を行った。抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 Myc 抗体でプロットしている。共沈される蛋白は Cyb₅ であり、各免疫沈降蛋白は以下の通りである。lane 1, VILIP-3; lane 2, hippocalcin; lane 3, neurocalcin- δ ; lane 4, VILIP-1.

【考 察】

VILIPs におけるアミノ酸配列相同性は、VILIP-3 に対して、hippocalcin は 94 %、neurocalcin- δ は 90 %、VILIP-1 および VILIP-2 はそれぞれ 66 %、65 % である。このアミノ酸配列相同性に基づいて VILIP-3、hippocalcin および neurocalcin- δ を一つのグループ (A)、VILIP-1 と VILIP-2 をもう一つのグループ (B) に亜分類することができる。今回我々が共沈実験から得た結果は、このアミノ酸配列解析に相関しており、グループ A はシトクロム b_5 に対する親和性を示すが、グループ B に属する VILIP-1 は親和性を示さなかった。また VILIP-3 との相同性に相関して、シトクロム b_5 への親和性の強さも変化していることがわかった。

以上のことよりシトクロム b_5 は、グループ A のカルシウム依存性標的蛋白であり、VILIP-1 はグループ A とは別の標的蛋白および機能を有する蛋白であることが推察された。

これらの結果は、VILIPs に属する蛋白質間の生理学的機能の差異を類推する上で、重要な知見であると考えられた。

12) コレクチン CL-L1 の分子構造と組織局在に関する解析

研究代表者 松田 泰幸

【目 的】

コレクチンは、その分子内部にコラーゲン様領域とカルシウムイオン依存性の糖認識領域 (CRD) を持つ分子の総称である。コラーゲン様領域は三重螺旋構造を形成することによって、多量体形成に関与している。一方、CRD は細菌表面の構成成分である糖鎖を認識することで、1) 補体の活性化、2) 細菌のオプソニン化、3) 細菌の凝集、といった感染防御機能に寄与することが知られている。また、コレクチンは、一部を除き大半が分泌型であり、血液中や肺に存在している。

当研究室で同定した新規コレクチン CL-L1 (collectin liver 1) について、これまで我々は、*in vitro* において CL-L1 の CRD 領域が糖鎖へ結合することを明らかにしたが、未だ生体内における CL-L1 の高次構造や局在について不明な点が多く、CL-L1 の生理的役割の解明には至っていない。

そこで、CL-L1 の分子構造や発現様式を明らかにするために、ウェスタンブロットおよび免疫組織染色により検討した。

【方 法】

1) 培養細胞への遺伝子発現による分子構造および発現様式の検討

培養細胞に CL-L1 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養した後、4% パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。浸透化処理を行った後、蛍光抗体を用いて CL-L1 を検出し、共焦点顕微鏡により細胞内での局在を観察した。また、MERCK の ProteoExtract SubCellular Proteome Extraction Kit を用いて、培養細胞の細胞分画 (細胞質、膜&オルガネラ、核、細胞骨格の 4 画分) を行い、ウェスタンブロットより各分画サンプルからの CL-L1 の検出を行った。さらに、CL-L1 を発現させた培養細胞を無血清培地で 3 日間培養し、細胞、培養上清を回収した。還元状態と非還元状態での SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロットより CL-L1 の多量体形成について検討を行った。

2) 免疫組織染色による組織局在の検討

ヒト組織における局在を明らかにするため、パラフィン包埋切片を Super Bio Chips Laboratories より購入した。CL-L1 の検出には、一次抗体としてウサギ抗 CL-L1 ポリクローナル抗体を、二次抗体として Alexa488 conjugated goat anti-rabbit 抗体を用いた。核染色は TO-PRO-3 により行い、共焦点顕微鏡により蛍光観察を行った。

【結 果】

培養細胞を用いた蛍光観察の結果、CL-L1 は、細胞質あるいは小胞体やゴルジ体と考えられる領域が染色されており、核領域は染色されなかった。また、培養細胞の細胞分画 (細胞質、膜&オルガネラ、核、細胞骨格の 4 画分) を行い、各分画から CL-L1 の検出を試みたところ、CL-L1 は膜&オルガネラ画分から

検出されたが、細胞質画分からは検出されなかった。さらに CL-L1 を遺伝子発現させた際の培養上清から CL-L1 が検出された。このことから分泌タンパク質であることが明らかとなった。非還元状態でウェスタンブロットを行ったところ、CL-L1 はジスルフィド結合を介して高次構造を形成していることがわかった。抗 CL-L1 抗体を利用したヒト組織の免疫組織染色の結果、CL-L1 は肝臓で発現が高く、また、胃、小腸、大腸、肺などの器官で発現していることが明らかとなった。

【考 察】

培養細胞で遺伝子発現させた CL-L1 は、ジスルフィド結合を介して高次構造を形成していた。このことから、生体内において、CL-L1 は他のコレクチンと同様に多量体を形成し、生理的役割を果たすと考えられた。また、顕微鏡観察や細胞分画の結果から CL-L1 の細胞内局在がオルガネラ画分であることがわかり、さらには培養上清中から CL-L1 が検出されたことから、CL-L1 は生体内において分泌型タンパク質として機能している可能性が推測された。

CL-L1 は、分泌型コレクチンとして報告されている CL-K1 と遺伝子構造が類似しており、CL-K1 は、*in vitro* において補体系を活性化するなど自然免疫に関与している可能性が示されている。このことから CL-L1 は、肝臓や消化器、肺などの各器官で合成、分泌され、CL-K1 と同様に感染防御に関与している可能性が考えられた。今後は、CL-L1 が感染微生物に対して、どのような感染防御機能を果たしているのか、その機能を解明していきたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Ohtani K, *et al.* Molecular cloning of a novel human collectin from Liver (CL-L1). *J. Biol. Chem.* 274: 13681-13689, 1999
- 2) Kawai T, *et al.* Molecular cloning of mouse collectin liver 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2134-2145, 2002
- 3) Axelgaard E, *et al.* Investigations on collectin liver 1. *J. Biol. Chem.* 288: 23407-23420, 2013
- 4) Henriksen M L, *et al.* Heteromeric complexes of native collectin kidney 1 and collectin Liver 1 are found in the

circulation with MASPs and activate the complement system. *J Immunol.* 191: 6117-6127, 2013

13) 食品に含まれるホルムアルデヒドが消化管免疫および発がんに及ぼす影響

研究代表者 中木 良彦

【目 的】

ホルムアルデヒド (FA) は単純な構造を有し、土壌や水からも検出されるなど自然界に広く分布する物質である一方、化学工業において各種有機物質の合成の際の原料として用いられる物質でもある。また、蛋白質との結合力が強い性質があることから、古くから生物学、医療の現場に於いて組織の固定や消毒剤として用いられてきた。また、FA は劇物であるために食品添加物としての使用が禁止されている。しかしながら FA は蛋白質と結合しやすいことから様々な条件のもとで食品に残留している可能性があり、また、自然食品中にも含まれる安全性の上で無視できない物質である。また、2012 年 5 月には利根川系の浄水場で取水した水から工場排水と塩素が反応して発生したと考えられる FA が検出され、意図しない FA の産生による生体への曝露の危険性の考慮が必要となった。

一方で、従来の FA の経口曝露による毒性に関する研究は、急性中毒に関する報告が中心であったが、我々は低濃度 FA を添加した飼料を実験動物に与えた時に消化管、特に下部消化管において消化管内残渣から高濃度の遊離 FA を検出し、さらに遊離した FA が下部消化管の大腸菌の減少をもたらす事を既に報告した。他方で、FA の発がん性に関する研究は、吸入曝露による鼻咽腔がんの危険因子として注目されている反面、経口曝露による消化管やその他の臓器の発がん性についての検証は不十分であった。

以上のことから食品中に含まれる FA の消化管への影響について、免疫異常および発がん性の 2 点について、FA 添加食品を用いた経口曝露実験から FA の安全性を評価すること目的に研究を実施した。

【方 法】

B6C3F1 雌性マウスを FA 曝露群とコントロール群各 8 匹にランダムに分け、FA 曝露群には曝露量が 100 mg/kg/day になるように調整した FA 添加飼料を、コントロール群には通常飼料 (FA 無添加) を与えた。

曝露期間は50日とした。FA投与実験期間終了後、屠殺1時間前に2mg/kg lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与したマウスから肝臓を摘出し、M.I.Luster等¹⁾の肝薄切培養法に基づき摘出した肝臓を直径8mm、厚さ約200 μ mに薄切した。薄切肝2切片を、25mM - HEPES、10%非働化牛胎児血清、10 μ g/dl牛膵臓インシュリン、100U/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加したRPMI1640培養液2ml中にて、酸素95%二酸化炭素5%の雰囲気、37℃で1時間回転培養を行った。培養後、培養上清中のTNF- α をELISAにて測定し、肝でのエンドトキシン誘発性のサイトカイン応答を調べた。サイトカイン応答を誘導しない対照群には事前に生理食塩水を腹腔内に投与し、同様の操作を行い培養上清について測定した。

一方で、FAの長期経口曝露による発がんへの影響をみるためにB6C3F1雌性マウスをFA曝露群とコントロール群に各8匹にランダムに分け、FA曝露群には同様のFA添加飼料を6か月および12ヶ月与えた。曝露期間終了後、マウスを安楽死させ脾臓の摘出を行い、摘出した脾臓から脾リンパ球を抽出し、PI染色後にフローサイトメトリーを用いて細胞周期の解析を実施した。各々の結果はFA曝露群、コントロール群間で、Mann-Witney U検定を行い、検定において $p < 0.05$ を有意な差があると判断した。また、消化管、肝臓等の器官について肉眼的、および組織標本で観察した。

【結 果】

各群の体重増加量には有意な差は認められなかった。その他、飼育期間中における行動等に注目すべき変化は無かった。また、肉眼的に外表に特記すべき変化は見られなかった。各群のLPS投与マウスから肝臓を得て作成した薄切肝の培養上清中のTNF- α 濃度(pg/ml)は、非LPS投与マウスに比べてそれぞれ高値を示し(Control: 39.2 ± 17.0 , 106.5 ± 18.0 , FA: 45.1 ± 18.1 , 75.7 ± 9.0) エンドトキシンによるサイトカイン応答が惹起されている事が確認された。LPS投与によって誘導され培養上清中に産生放出されるTNF- α はFA曝露群で 75.7 ± 9.0 pg/mlとコントロール群 106.5 ± 18.0 pg/mlより有意差がないものの減少傾向を示した。

FA添加飼料による6ヶ月間の長期曝露では、Peyer

板を中心とした小腸および大腸のHE染色による組織像では、今回の曝露条件では明らかながん細胞や異型細胞を認めなかった。電顕像ではFA曝露群では、コントロール群と比して、腸絨毛の表面が滑らかな構造を呈した。さらに、Peyer板の微細構造を観察するとFA曝露群では、コントロール群と比して、リンパ球の密度が低くなり、アポトーシスを呈する細胞が数多く観察できた。脾細胞リンパ球の細胞周期の解析では、DNA aneuploidyと考えられる2つの独立したG0/1ピークが観察された。FA添加飼料による12ヶ月間の長期曝露については研究期間内で曝露が終了しないため結果は別途報告とする。

【考 察】

肝臓でのエンドトキシン誘発性のサイトカイン応答においてTNF- α 濃度は、ホルムアルデヒドの慢性曝露により減少傾向を示した。腸内細菌と肝臓でのエンドトキシン誘発性のサイトカイン応答の間に密接な関係があり、腸内に存在する大腸菌が少ない状況では肝臓でのサイトカイン応答が低くなることが報告されている。今回LPS投与により誘発されたサイトカイン応答がホルムアルデヒドの投与により抑制された事は、大腸菌等の腸内細菌の減少が惹起された為と考えられた。

電子顕微鏡像でPeyer板リンパ球のアポトーシスを示唆する変化が認められた。一般に消化管細胞のアポトーシスの制御(抑制)には酪酸の存在が関与していると考えられ、酪酸は経口摂取された食物繊維が腸内細菌により産生されることから、FA曝露による下部消化管の大腸菌などの減少による腸内細菌叢の変化、つまり酪酸を産生する細菌類が増加した可能性が考えられた。脾リンパ球の細胞周期の解析においてDNA aneuploidyが観察されたことはFAの発がん性を示唆するものであった。我々が意図しない高濃度のFAを含有する食品の摂取を想定した動物実験において腸内細菌を介した粘膜免疫系への影響が示唆された。今後は従来の報告を含めて腸内細菌が産生する物質と消化管の粘膜免疫機構との関連の精査に加えて、12か月曝露マウスの細胞周期および組織標本の結果から発がん性について再度確認が必要である。

【文 献】

- 1) M.I.Luster, et al:Endotoxin-induced Cytokine Gene Expression and Excretion in the Liver. HEPATOROLOGY 19: 480-488,1994.

14) マタニティヨガの周産期予後改善効果に関する研究

研究代表者 川西 康之

【目 的】

マタニティヨガ実践の効果について、海外からは周産期予後と関連するとの報告がある。具体的には、ヨガ実践群で対照群と比較し低出生体重児の割合が少ないことや、早産の割合が少ないといった報告¹⁾、また妊娠高血圧症候群、子宮内胎児発育遅延の予防効果があるとの報告²⁾が認められるが、国内からはそのような報告は認められていない。日本人を対象として、その実践により周産期予後が改善する可能性が本研究により確認された場合、その積極的な介入により、さらに周産期予後を改善する効果が将来的に得られる可能性がある。

環境省が行っている「子どもの健康と環境に関する全国調査」(以下エコチル調査)は、全国10万組の親子を対象とし、胎児期から13歳になるまで子供の健康状態を追跡し、妊娠中の環境要因が子どもたちの成長・発達に与える影響を明らかにすることを目的としている。現在旭川医科大学の産婦人科学講座、小児科学講座、健康科学講座において北海道ユニットセンターの旭川地区を分担し研究を行っている。

今回、エコチル調査北海道ユニットセンターにおいて、マタニティヨガ実践妊婦の割合を疫学的に調査し、エコチル全体調査で得られる周産期結果と連結させ、その周産期予後への影響を明らかにすることを目的として調査を行う。

【方 法】

本研究は「エコチル調査」北海道ユニットセンターの独自追加調査として行っている。北海道ユニットセンター参加者を対象に、マタニティヨガ実践について出産後に自記式質問票調査を実施している。調査対象をマタニティヨガ実践群と非実践群とに分け、エコチル全体調査にて得られる周産期予後(出生体重、分娩週数、子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群といっ

た妊娠合併症の割合等)について検討し、その周産期予後への影響を明らかにする事を予定している。

【結 果】

エコチル全体調査における周産期データの固定が行われていないため、周産期予後と連結させた解析は実施できていないが、平成26年10月17日までに得られた調査結果を以下に示す。

エコチル調査北海道ユニットセンターにおいて、平成22年2月1日より平成26年5月31日までに、合計8,362名の参加者を得た。本研究では、平成26年9月30日までに出産が確認された妊婦7,226名に質問票を配布、5,067名より回答を得た(回答率70.1%)。そのうちデータ入力完了した4,635名分の途中集計結果を報告する。

4,635名のうち、「妊娠15週前後までにマタニティヨガについて、やってみたいという気持ちはありましたか?」という質問に対し、3,281名(70.8%)が「あった」と回答した。また、マタニティヨガを実践していたのは958名(20.7%)であった。学習方法としては、582名(60.9%)が指導者に習い、366名(38.2%)が本・DVDなどによる自習をしたと回答した。平均実践週数、一週間平均の実践回数、一回の平均実践時間はそれぞれ 12.6 ± 7.9 週間、 2.1 ± 1.7 回/週、 55.2 ± 29.9 分で、実践内容として身体運動、呼吸法、瞑想を行った者は、934名(97.5%)、797名(83.2%)、405名(42.3%)であった。「マタニティヨガを経験して、今回出産されたお子様に対し愛情が深まったと感じますか?」という質問に対し、「はい」「どちらともいえない」「いいえ」と回答した者はそれぞれ353名(36.8%)、514名(53.7%)、84名(8.8%)であった。

【考 察】

マタニティヨガ実践者は20.7%で、過去の途中集計とはほぼ同じ割合(20.2%:平成25年10月18日時点、19.6%:平成24年8月31日時点)を示した。今後エコチル調査では参加者の全出産終了(平成26年末予定)後に一部データ固定が予定されている。本研究では今後も調査を続け、固定後のデータと連結させ、マタニティヨガ実践による周産期予後への影響を解析していく事を予定している。

[文 献]

- 1) S. Narendran : Efficacy of yoga on pregnancy outcome. J Altern Complement Med 11, 237-244 (2005)
- 2) Rakhshani A: The effects of yoga in prevention of pregnancy complications in high-risk pregnancies: A randomized controlled trial, Prev Med 55(4), 333-40 (2012)

15) 孤発性筋萎縮性側索硬化症における神経細胞死のメカニズムの解析と新規治療薬の探索

研究代表者 澤田 潤

【研究成果の概要】

[研究目的]

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体 (GluR) のうち AMPA 受容体のサブユニットである GluR2 のグルタミン (Q)/アルギニン (R) 部位の RNA 編集率が疾患特異的・部位選択的に低下していることが報告された。AMPA 受容体は4つのサブユニットからなる4量体で、その構成サブユニットに少なくとも1つの編集型 GluR2 が存在しなければ、 Ca^{2+} 流入が上昇し、細胞死に至ることが知られている。従って、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の低下が ALS の運動ニューロン死の病態へ深く関与していると考えられている。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は主に、adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) によって行われ、ADAR2 活性を上昇させる薬剤は ALS における運動ニューロン死を阻止しうる可能性があると考えられる (図1)。現在まで、抗うつ薬が GluR サブユニットの遺伝子発現

量及び RNA 編集率を変化させることが報告されている。そこで、GluR2 Q/R 部位の編集率測定系を確立し、抗うつ薬を含めた複数の薬剤の同部位における RNA 編集率及び RNA 編集に関わる遺伝子の発現への影響を検討し、ALS 治療薬となりうる薬剤のスクリーニングをすることを目的とした。

[研究方法]

スクリーニングに用いる培養細胞として、スプライシングが行なわれる前の GluR2 Q/R 部位のみを含むミニ遺伝子 (preGluR2) を HeLa 細胞に導入し、人為的に同部位の RNA 編集率を 50% 程度に調節した Tet-on HeLa G2m 細胞を作成した (図2)。抗うつ薬や降圧剤や抗生剤、免疫抑制剤、抗てんかん薬などの複数の薬剤を $10 \mu\text{M}$ 以下の濃度で 24 時間負荷した。

GluR2 RNA 編集率の測定に関して、薬剤負荷後、培養細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作製し、Nested PCR 法を用いて cDNA の GluR2 Q/R 部位を含む領域を増幅させた後、DNA 精製を行い、制限酵素 (Bbv I) による酵素処理を行った。未編集型の GluR2 が存在する場合、編集型 GluR2 では出現しない切断断片が出現することを利用し、その比を測定し、同部位の RNA 編集率を算出した。

mRNA 発現量の測定に関して、GluR2 編集率の有意な上昇を認めた薬剤に関して、Real-Time PCR 法によって、ADAR2 酵素活性を意味する基質に対する酵素の相対発現量比として、ADAR2/preGluR2 比を測定した。

Therapeutic strategy targeted to ADAR2 in sporadic ALS

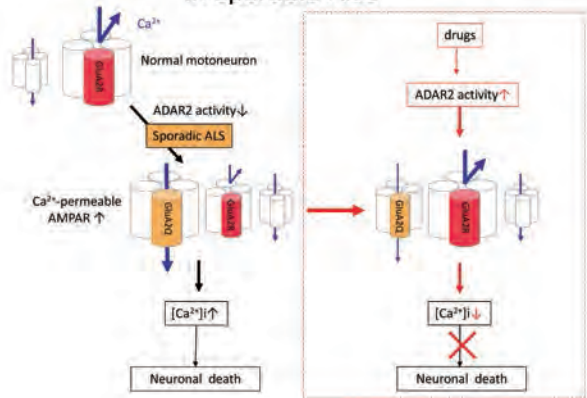


図 1

Tet HeLa G2m cell

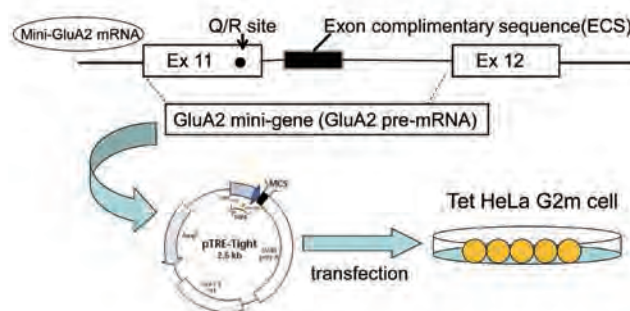


図 2

[結果と考察]

1) GluR2 編集率変化

10 μ M 以下の paroxetine、fluvoxamine、milnacipran、amitriptyline、desipramine、imipramine で control に対して有意な GluR2 編集率の上昇を認めた (図3)。同様に、降圧剤では furosemide や spironolactone、losartan、抗生剤では suramine や lomefloxacin、cephalothin、cloxacillin、抗真菌薬では ciclopirox、clotrimazole、免疫抑制剤では azathioprine、抗てんかん薬では topiramate、他では sparteine、hydrastinine、mitomycin の投与で GluR2 編集率の有意な上昇を認めた (図5-8)。

Editing efficiency at GluA2 Q/R site (antidepressants)

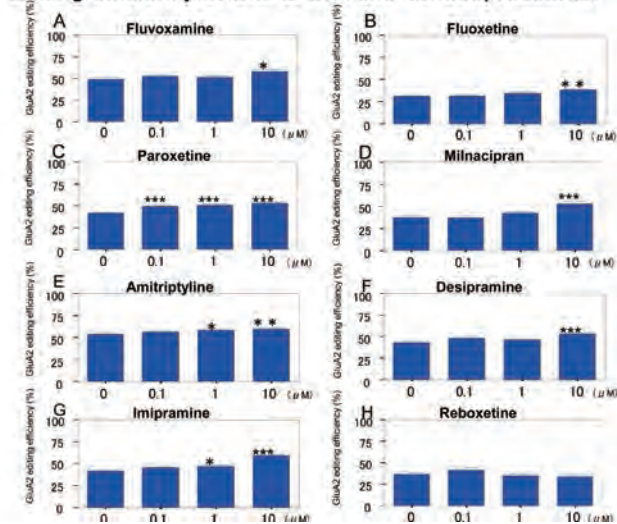


図3

mRNA expression (antidepressants)

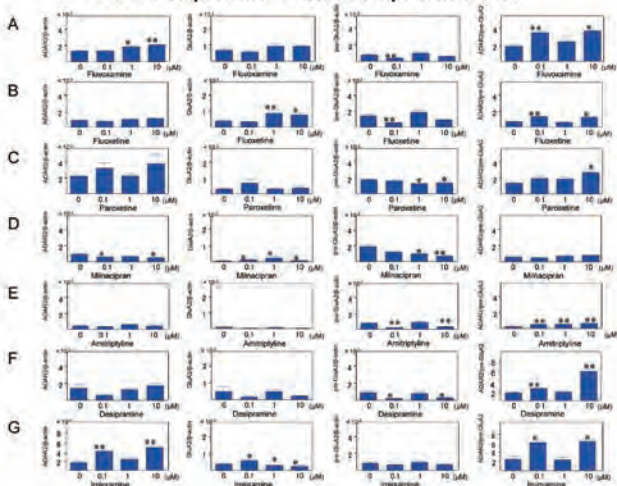


図4

2) mRNA 発現量定量

ADAR2 酵素活性を意味する ADAR2 の preGluR2 に対する mRNA 相対発現量比に関して、milnacipran 以

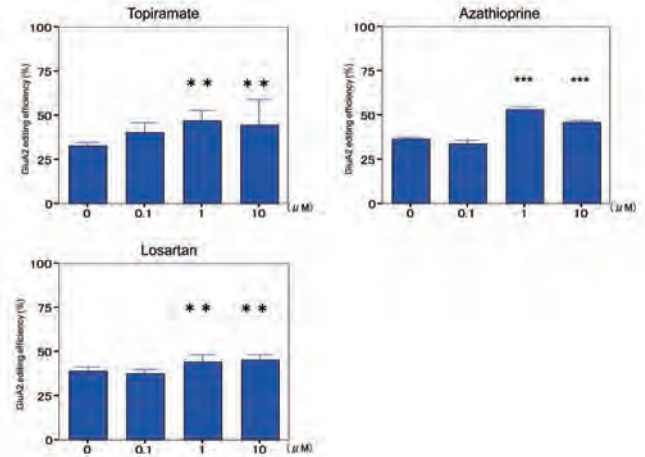


図5

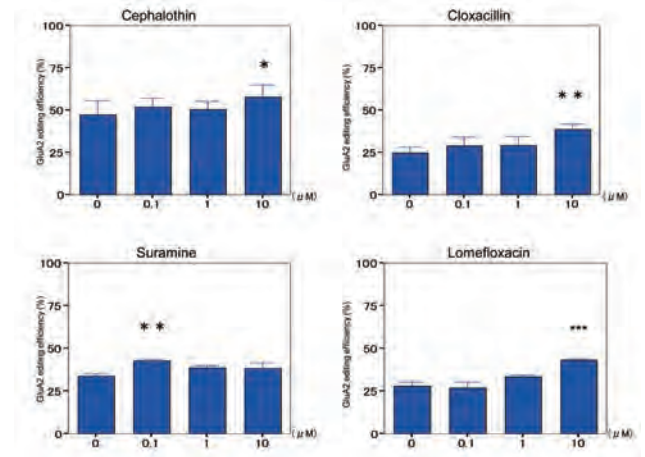


図6

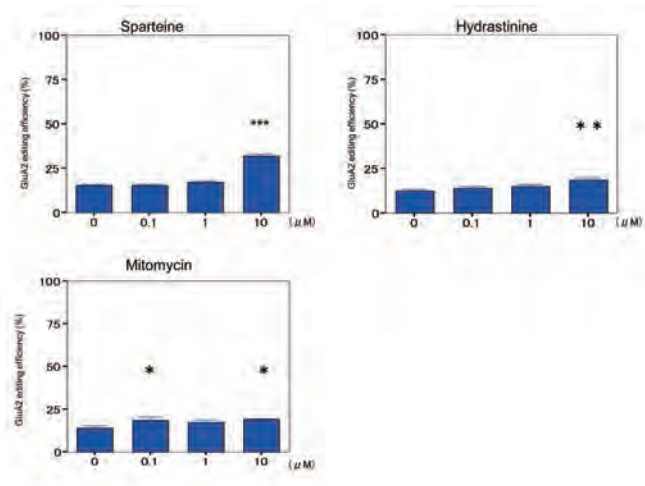


図7

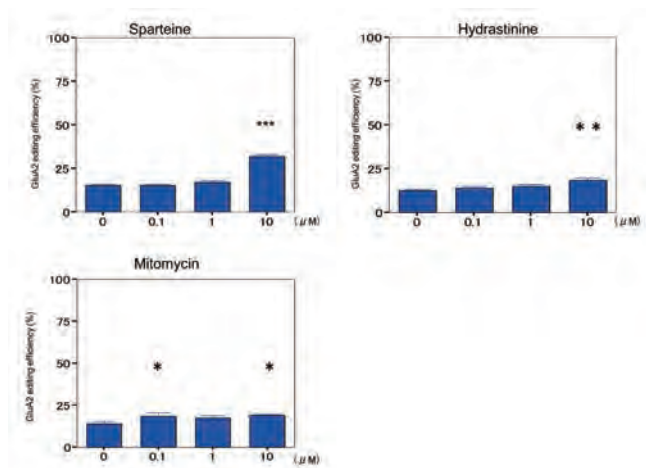


図 8

外の薬剤で、すべての濃度ではないが、その相対発現量比の有意な上昇が認められた (図 4)。

Tet-on HeLa G2m 細胞の GluR2 Q/R 部位の編集率を上昇させた薬剤のうち、fluvoxamine、paroxetine、amitriptyline、desipramine、imipramine で、すべての濃度ではないものの ADAR2/preGluR2 の mRNA 発現比の有意な上昇を認め、このうち paroxetine 及び amitriptyline では濃度依存性の傾向を示し、その GluR2 編集率上昇作用は主に基質に対する酵素の発現量比の上昇が関与していると思われる。その他の薬剤の GluR2 編集率上昇作用は基質に対する酵素の相対的発現量比のみでは説明できないため、それ以外の要素が関与している可能性が考えられた。

[まとめ]

Tet-on HeLa G2m 細胞を用い、抗うつ薬や抗生剤、降圧剤などによる GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の変化についてスクリーニングした。Fluvoxamine、fluoxetine、milnacipran、amitriptyline、desipramine、imipramine、furosemide、spironolactone、losartan、suramine、lomefloxacin、azathioprine、topiramate、sparteine、hydrastinine、mitomycin に GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の上昇作用を認めた。その機序については不明な点はあるが、今後 ALS の治療薬としての臨床応用の可能性が考えられた。

16) 半導体マイクロチップ型シーケンサー対応 original custom panel 導入による本邦ヘモクロマトーシス新規感受性遺伝子の探索研究

研究代表者 土岐 康通

[背景・目的]

鉄過剰症は、本邦では大部分が輸血後鉄過剰症と考えられてきた。平成 22 年 (2010 年) 度「ヘモクロマトーシスの実態調査および診断基準作成」班 (班長: 高後裕) の全国調査¹⁾ から原因が特定できない鉄過剰症が 1089 症例中 76 症例 (7.0%) で、予想以上に多いことが判明した。しかし、2011 年 11 月までに、これまでに報告されてきた遺伝性ヘモクロマトーシス (hereditary hemochromatosis: HH) の責任遺伝子群である *HFE*、*HFE2*、*HAMP*、*TFR2*、*SLC40A1*、*FTH1* のサンガー・シーケンス解析を実施した 12 例においては、それら HH 責任遺伝子上に特徴的な変異は確認されず、病態原因診断がついていないのが現状である。このような原因不明のヘモクロマトーシスに対して、ゲノムワイドの探索を目的とした次世代シーケンサーを用いた大規模解析は大変有望である。ただし、膨大な情報量のゲノムからの読取り (whole genome sequencing: WGS) には大型次世代シーケンサー専用オペレーターの常駐が必須であり、かつ 1 ランあたりの高額な費用とデータ取得まで長時間を要するという問題があり、これまで誰もが簡便に取り扱うことができなかった。そこでこの問題を克服すべく、近年開発されたパーソナル・タイプの次世代シーケンサーを導入し、WGS に代わる whole exon sequencing を行うことで、蛋白質の機能や発現に影響を与える一塩基変異 (SNVs) や小さな挿入/欠損 (InDels) を信頼性の高いデータとして抽出することとした。さらに、次世代シーケンサーのハイスループット能力を最大限に発揮する手法として custom panel による ampli sequencing が有効な解析手段であると考えられることから、本研究では、鉄代謝関連遺伝子を含めた original custom panel による網羅的遺伝子解析法のパイプ・ラインを構築し、原因不明のヘモクロマトーシス症例に対する鉄過剰症関連新規感受性遺伝子を探索した。

[材料・方法]

1. 次世代シーケンサー

センサーウェル数が 1.65 億ウェルの Ion Proton I

チップに対応した半導体マイクロチップ型シーケンサー Ion Proton (Ion Torrent/Life Technologies) を使用した。

2. 標的遺伝子探索用パネル

鉄代謝関連遺伝子 65 種類に、糖代謝関連遺伝子、癌関連遺伝子などを含めた 1,031 遺伝子を対象とし、約 12,000 箇所を標的としたプライマーペアによるオリジナル・カスタム・パネルを設計・構築した。全プライマーペアが 5 種類のプール済みセットに分けられ、5 プール・1 セットとなっている。

3. 網羅的遺伝子探索

末梢血単核球を分離後、Genomic DNA を抽出し、100 ng の genomic DNA から Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Ion Torrent/Life Technologies) および 5 種類のプール済みプライマーペアを用いてターゲット領域の PCR 増幅を行い、ライブラリーを調製した。ここで得られた 5 種類のライブラリーのそれぞれの DNA 濃度が同等になるよう調整したのち、5 種類のライブラリーを 1 本のチューブにまとめた。Ion OneTouch 2 Instrument (Ion Torrent/Life Technologies) を用いて、ライブラリーをビーズに固定化した後、エマルジョン PCR にて増幅を行った。Ion One Touch ES (Ion Torrent/Life Technologies) を用いて、ビーズの濃縮と精製を行い、シーケンス用テンプレートとした。このテンプレートを Ion Proton I チップにロードし、Ion Proton シーケンサーで塩基配列を解読した。Torrent Suite 解析ソフトを用いて、ベースコールを行い、得られた全データから有効なシーケンス・データを取り出し、1,031 遺伝子のリファレンス・データにマッピングした。

4. データ解析ソフト

1,031 遺伝子のリファレンス・データにマッピングされた遺伝子情報から、一塩基変異 (SNVs) や小さな挿入 / 欠損 (InDels) の効率良い絞り込みと様々な条件下でのこれら変異の評価を行うため、3rd Party ソフトウェアとして Genomics Workbench (CLC bio) を導入した。

5. 倫理面への配慮

旭川医科大学倫理委員会の承認を得たのち、イン

フォームド・コンセントを取得した患者および健康人ボランティアを対象とした。

[結果・考察]

オリジナル・カスタム・パネルを構成する 1,031 遺伝子のうち、本研究の対象遺伝子である鉄代謝関連遺伝子 65 種類について、その gene symbol とコードされるタンパク質の情報を表 1 に示した。

3 例の鉄過剰症患者に対して、それぞれ Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 を用いてオリジナル・カスタム・パネルに対応したライブラリーを作製し、シーケ

表 1 鉄代謝関連遺伝子の遺伝子名とコードされるタンパク質名

Gene symbol	description
ABCB7	ATP-binding cassette, sub-family B, member 7
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G 2
ACO1	IRP1
ALAD	aminolevulinic acid dehydratase
ALAS1	aminolevulinic acid, delta-, synthase 1
ALAS2	aminolevulinic acid, delta-, synthase 2
BMP2	bone morphogenetic protein 2
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BMP6	bone morphogenetic protein 6
BMPRI1	bone morphogenetic protein receptor, type IA
BMPRI2	bone morphogenetic protein receptor, type IB
CACNA1F	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1F
CACNA1S	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S
CP	ceruloplasmin
CPOX	coproporphyrinogen oxidase
CYBRD1	cytochrome b reductase 1
EPO	erythropoietin
EPOR	erythropoietin receptor
EXOC6	exocyst complex component 6
FDX1	ferredoxin 1
FDX1L	ferredoxin 1-like
FDXR	ferredoxin reductase
FECH	ferrochelatase
FLVCR1	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor 1
FTH1	ferritin H
FTL	ferritin L
FTMT	ferritin mitochondrial
FURIN	furin
FXN	frataxin
GDF15	growth differentiation factor 15
HAMP	hepcidin
HBA1	hemoglobin alpha1
HBA2	hemoglobin alpha2
HBB	hemoglobin beta
HEPH	hephaestin
HFE	hemochromatosis
HFE2	hepcidin
HMBS	hydroxymethylbilan synthase
HMOX1	heme oxygenase1
HMOX2	heme oxygenase2
HPX	hemopexin
HRG	histidine-rich glycoprotein
IREB2	IRP2
LCN1	lipocalin 1
LCN2	lipocalin 2
NEO1	neogenin 1
NFS1	nitrogen fixation 1 homolog
PCSK1	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1
PCSK2	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2
PCSK4	proprotein convertase subtilisin/kexin type 4
PCSK5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
PCSK7	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7
SLC11A1	NRAMP1
SLC11A2	DMT-1
SLC25A37	mitochondrial iron transporter
SLC39A14	ZIP14
SLC40A1	ferroportin
SLC46A1	folate transporter 1
STEAP3	Six transmembrane epithelial antigen of prostate protein 3
TF	transferrin
TFR2	transferrin receptor 2
TFR3	transferrin receptor 1
TMPS6	Transmembrane protease, serine 6
TWSG1	twisted gastrulation homolog 1
UROS	uroporphyrinogen III synthase

ンス解析を行った。表 1 に示した 65 種類の鉄代謝関連遺伝子上の SNVs および InDels 結果を表 2-4 にまとめた。

表 2 に示した症例 1 の鉄過剰症患者では、*SLC39A14* 遺伝子上の missense mutation は、コードされる ZIP14、亜鉛トランスポーターの 304 番目のアミノ酸がリジンからグルタミン酸に置換されることを示唆するものである。この変異はこれまで報告がなく、

今回新たに発見されたものである。一方、*SLC40A1* 遺伝子上の deletion を図 1 に示した。3 塩基の欠失は、コードされる ferroportin 1、細胞外鉄汲出し輸送体の 162 番目のアミノ酸であるバリンの欠失を示唆するものである。この欠失はフェロポルチン病の原因因子として報告があり、ヘテロ接合性であってもフェロポルチンの機能不全を誘導するハプロ不全である^{2,3)}。

表 3 に示した症例 2 の鉄過剰症患者では、*ACO1*

表 2 症例 1 における鉄代謝関連遺伝子上の変異情報

Gene symbol	Type	Reference	Allele	Length	Variation ID	Zygosity	Amino acid change
<i>SLC39A14</i>	SNV	A	G	1	(-)	heterozygous	p.Lys304Glu
<i>SLC40A1</i>	Deletion	CAA	(-)	3	(-)	heterozygous	p.Val162_Ala163delinsAla

表 3 症例 2 における鉄代謝関連遺伝子上の変異情報

Gene symbol	Type	Reference	Allele	Length	Variation ID	Zygosity	Amino acid change
<i>ACO1</i>	SNV	C	T	1	rs150373174	heterozygous	p.Thr318Met
<i>ALAS1</i>	SNV	G	A	1	rs201359123	heterozygous	p.Arg490Gln

表 4 症例 3 における鉄代謝関連遺伝子上の変異情報

Gene symbol	Type	Reference	Allele	Length	Variation ID	Zygosity	Amino acid change
<i>ACO1</i>	SNV	C	T	1	rs150373174	heterozygous	p.Thr318Met
<i>EPOR</i>	SNV	C	G	1	(-)	heterozygous	p.Val182Leu
<i>PCSK7</i>	SNV	C	T	1	(-)	heterozygous	p.Arg254His

表 5 健常人 31 名を対象とした鉄代謝関連遺伝子上の変異出現頻度

Gene symbol	Amino acid change	Frequency
<i>SLC39A14</i>	p.Lys304Glu	0/31
<i>SLC40A1</i>	p.Val162_Ala163delinsAla	0/31
<i>ACO1</i>	p.Thr318Met	1/31
<i>ALAS1</i>	p.Arg490Gln	0/31
<i>EPOR</i>	p.Val182Leu	0/31
<i>PCSK7</i>	p.Arg254His	0/31

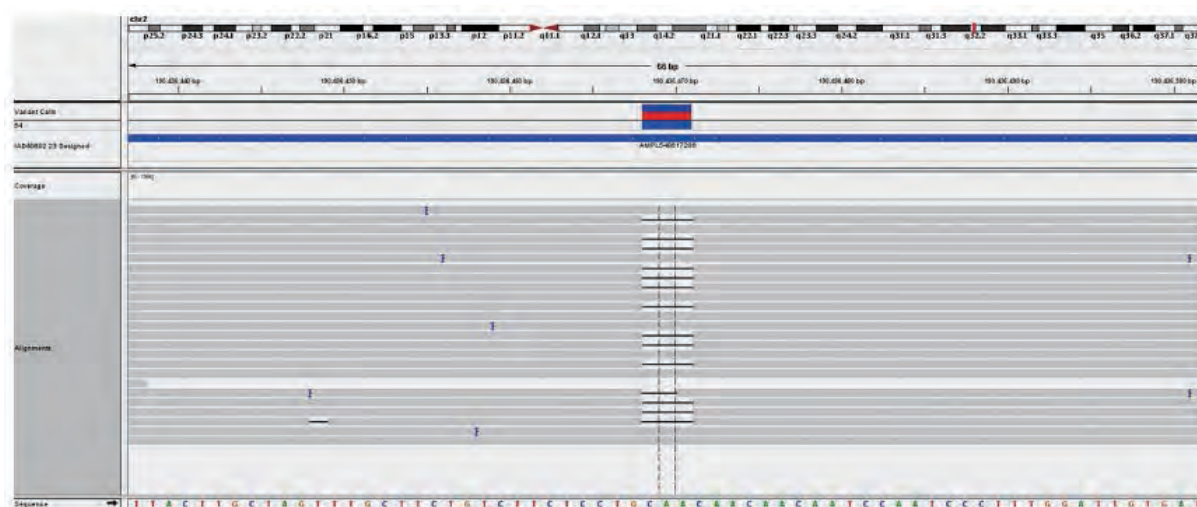


図 1 *SLC40A1* 遺伝子上のヘテロな 3 塩基欠失を示すアライメント情報

遺伝子上の missense mutation は、コードされる aconitase、クエン酸脱水酵素の 318 番目のアミノ酸がスレオニンからメチオニンに置換されることを示唆するものである⁴⁾。この missense mutation は variation ID:rs150373174 としてすでに登録されている polymorphism であった。さらに、*ALAS1* 遺伝子上の missense mutation は、コードされる aminolevulinate, delta-, synthase、デルタアミノレブリン酸合成酵素の 490 番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンに置換されることを示唆するものである。この missense mutation は variation ID:rs201359123 として登録済みの polymorphism であった。

表 4 に示した症例 3 の鉄過剰症患者では、症例 2 で検出された同じ *ACO1* 遺伝子上の SNV が確認された。加えて、症例 1 および症例 2 では存在せず、症例 3 で確認された SNVs として *EPOR* 遺伝子と *PCSK7* 遺伝子が挙がってきた。*EPOR* 遺伝子上の missense mutation は、コードされる erythropoietin receptor、エリスロポエチン受容体の 182 番目のアミノ酸がバリンからロイシンに置換されること、*PCSK7* 遺伝子上の missense mutation は、コードされる proprotein convertase subtilisin/kexin type 7、前駆タンパク質転換酵素 7 型の 254 番目のアミノ酸がアルギニンからヒスチジンに置換されることをそれぞれ示唆するものである。これら 2 種類の変異はこれまで報告がなく、今回新たに発見された SNVs である。今回、鉄過剰症患者で検出された SNVs について、健常人における出現頻度を表 5 にまとめた。*SLC39A14*、*SLC40A1*、*ALAS1*、*EPOR* および *PCSK7* においては 0/31 で、変異は全く検出されなかった。*ACO1* に関しても 31 例中 1 例と極めて低い頻度であった。このように、鉄過剰症患者で発見された新規の SNVs が、健常人では検出されなかったことを考え合わせると、当該 SNVs が病態の表現に何らかの関連性を有していると考えられる。

これまでに登録されていない新規 SNVs が検出され、アミノ酸置換による当該タンパク質の機能がどのように変化し、表現型の変異に影響を及ぼすか否かは、今後の研究課題である。今回は、鉄代謝関連遺伝子 65 種類についての遺伝子変異探索であったが、糖代謝関連遺伝子や癌関連遺伝子など、他の遺伝子上の変異も検出されていることから、相互の関連性による

鉄代謝関連遺伝子の表現型に変化を及ぼす可能性もあり、本研究の継続が必須である。また、今回の研究から、将来、臨床現場への応用を考えた場合、custom panel 解析は広く導入可能なシステムであることが明らかになった。

[謝 辞]

平成 25 年度の“独創性のある生命科学研究”に採択して頂き、このような研究機会を与えて頂きましたこと、この場を借りて心よりお礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、本学消化器・血液腫瘍制御内科学分野の生田克哉講師、ならびに消化管再生修復医学講座田中宏樹特任講師に多大なご指導を頂きましたことを心より感謝申し上げます。

[文 献]

- 1) 高後裕「ヘモクロマトーシスの実態調査と診断基準作成」研究報告書 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 2011 年 3 月
- 2) Wallace DF, et al., Novel mutation in *ferroportin1* is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood*, 2002;100:692-694.
- 3) Devalia V, et al., Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the *ferroportin 1* gene (*SLC11A3*). *Blood*, 2002;100:695-697.
- 4) de Ligt J, et al., Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*, 2012;367:1921-1929.

17) 術前 modified Glasgow Prognostic Score(mGPS)

は大腸癌患者の予後を決定する一因子である

研究代表者 谷 誓良

【目 的】

日本において大腸癌による死亡数は増加しており、癌死亡の第3位を占めるまでになっている。大腸癌の治療を行うにあたっては、その予後を予測することがますます重要課題となってきた。これまで、大腸癌患者の予後予測因子として、腫瘍因子である進行度、深達度、組織型、リンパ管侵襲、静脈侵襲などが挙げられてきたが、近年、全身炎症反応の指標が予後不良因子として注目されている¹⁾。

今回、我々は大腸癌患者の腫瘍因子に加えて、全身炎症性因子(modified Glasgow Prognostic Score(mGPS)や好中球/リンパ球比(NLR)、血小板/リンパ球比(PLR))、栄養学的因子(Prognostic Nutritional Index(PNI))の重要性²⁾を検討するため、予後予測因子の分析を行った(表1)。

【対象と方法】

2006年1月1日から2010年12月31日まで当科で手術を施行した結腸癌・直腸癌の初回の待機手術症例460例うち、mGPS、NLR、PLR、PNIが判明している340例を対象とした。ただし、Stage IVや術前化学療法を施行した症例は除外した。手術前のHb、Ht、白血球数、好中球数、リンパ球数、好酸球数、血小板数、CRP、Alb、CEA、CA19-9や、腫瘍因子として所在(結腸/直腸)、Dukes分類、組織型、リンパ管侵襲、静脈侵襲、全身炎症性因子としてmGPS、NLR、PLR、栄養学的指数としてPNIに対し、それぞれを予

後予測因子としての検討を行った。

全生存率(OS)、無病生存率(DFS)はKaplan-Meier法で算出し、有意差はLog Rank検定で判定した。また、予後に関する多変量解析はCox比例ハザードモデルを用いて検討した。いずれの場合も $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計にはIBM SPSS Statistics 21を使用した。

【結 果】

単変量解析ではDukes分類、リンパ管侵襲、静脈侵襲、Alb、CRP、mGPS、PNIがOS、DFSで有意差を認めた(いずれも、 $p < 0.001$)。

また、多変量解析では、OS、DFSともに、Dukes分類、静脈侵襲、mGPSが独立した予後因子であった(いずれも、 $p < 0.001$)。

【考 察】

全身の炎症状態を表す術前mGPSは腫瘍因子に加えて、大腸癌の再発と生存の独立した予後予測因子であった。mGPSはCRPとAlbから容易に導き出すことができ、しかも、CEAやCA19-9以上に再発と生存に関係していた。これらの結果から術前mGPSが臨床的に重要なバイオマーカーとして利用できることが示唆された。

全身の炎症状態がどのように大腸癌の予後に影響するかは未だ不明であるが、腫瘍組織周囲の局所のリンパ球浸潤などによる炎症所見が、予後と相関するという報告もあり³⁾、これら癌周囲の炎症とmGPSの関係が解明できれば、そのメカニズムを明らかにすることができる可能性がある。

臨床場で測定可能な術前mGPSが大腸癌の再発と生存に関与することから、術後の治療方針を左右する重要な因子となる可能性があり、今後、症例の蓄積が待たれる。

【文 献】

- 1) Donald C. McMillan: The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: A decade of experience in patients with cancer. Cancer Treatment Reviews. 39(5), 534-540(2013)
- 2) S.R. WALSH: Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Factor in Colorectal Cancer. Journal of Surgical

表 1

modified Glasgow Prognostic Score (mGPS)	
CRP $\leq$ 1.0 mg/dl	Score 0
CRP > 1.0 mg/dl and Alb $\geq$ 3.5 g/dl	Score 1
CRP > 1.0 mg/dl and Alb < 3.5 g/dl	Score 2

Prognostic Nutritional Index (PNI) = $10 \times \text{Alb (g/dl)} + 0.005 \times \text{末梢リンパ球数 (/mm}^3\text{)}$	
PNI $\geq$ 45	腸管切除・吻合 可能
$45 > \text{PNI} \geq 40$	腸管切除・吻合 注意
$40 > \text{PNI}$	腸管切除・吻合 禁忌

Oncology.91,181-184(2005)

- 3) Campbell S.D.Roxburgh:The Relationship Between the Local and Systemic Inflammatory Responses and Survival in Patients Undergoing Curative Surgery for Colon and Rectal Cancers. Journal of Gastrointestinal Surgery.13,2011-2019(2009)

18) 甲状腺癌放射性ヨード内用療法における新たな予後評価因子の有用性

代表研究者 中山 理寛

【目 的】

放射性ヨード (I-131) 内用療法 (IAT) は、分化型甲状腺癌 (DTC) 術後の再発・転移巣に対し唯一有効な治療法である。IAT の施行の有無は有意に予後に影響を与え、IAT 施行群では再発性甲状腺癌の予後を改善する¹⁾。

IAT は非密封線源治療病室を保有する施設に限られるため、治療までの待機時間が延長することも問題となる (全国平均で約 5 ヶ月)。そのため、治療適応や再治療の有無をより正確に決定し、再発率・死亡率の低下を目指す必要がある。

血清サイログロブリン (Tg) は甲状腺濾胞細胞で合成される蛋白質であるが、DTC 全摘術後の評価や転移・再発マーカーとして非常に有用とされ、今日広く用いられている²⁾。

現在の IAT の治療効果判定は US や I-131 シンチ等の通常の画像所見に加え、Tg 値により総合的に判断している。しかしながら Tg 値が高値を示しても、視覚的に病巣を捉えられない場合も少なくない。

無機ヨウ素は腎より尿中に排泄されるが、有機ヨウ素は肝で代謝されるため³⁾、IAT 後に撮像する全身像 (WBS) で肝集積を認める場合には、有機ヨウ素の存在が示唆され、甲状腺由来組織が残存することになり、

再治療の適応となり得る。

しかしながら、現状は肝集積陽性とする基準は医師個人の経験によるところが多く、結果が一定しない。そこで肝集積度の定量的評価により、IAT の客観的な治療効果判定を行うことを目的とした。

【方 法】

甲状腺全摘後に IAT を施行した 557 症例 (平均 56 歳、標準偏差 ± 5 歳) を対象とした。従来の画像診断と Tg 値により、臨床的に要再治療群 (RR)、治療完了群 (TC) の 2 群に分類した。I-131 投与後 3-4 日後に WBS を撮像し、WBS の前面像で肝臓と、バックグラウンド (BG) として骨髄や軟部組織の影響を受けにくく、個人差が少ないと考えられた頭部に関心領域 (ROI) を設定した。各々の放射線量を測定の上、下式により肝集積比 (H/B ratio) を求めた。

$$H/B \text{ ratio} = (\text{Hepatic uptake counts}) / (\text{BG counts})$$

なお、肝臓の位置は CT にて確認した。Tg 値と H/B ratio から RR と TC の有意差を Wilcoxon 順位検定にて評価した。また、Tg 値と H/B ratio における至適カットオフ値を ROC 曲線より求め、その値の感度、特異度及び陽性 / 陰性的中率を算出した。さらに各々の指標の ROC 曲線下面積 (AUC) の有意差を評価した。

【結 果】

データ破損や腸管の集積により定量評価困難であった 23 例を除いた 534 例で検討を行った。H/B ratio の至適カットオフ値を 1.5 とした場合、再治療となる診断能の感度は 98.4%、特異度は 98.1%、陽性的中率は 99.2%、陰性的中率は 96.2% となり、Tg における AUC と比較した場合 $P < 0.00001$ と非常に高い有意差 (表 1) を認めた。

表 1 H/B と Tg における再治療診断能評価

	Cut-off value	Sensitivity/Specificity (%)	PPV/NPV (%)	Accuracy (%)	AUC
H/B	1.5	98.4/98.1	99.2/96.2	98.3	0.984*
Tg	47.2	58.7/75.0	85.1/42.9	63.5	0.718

PPV : Positive predictive value

NPV : Negative predictive value

AUC: Area under the curve

* $P < 0.00001$

【考 察】

H/B ratio の至適カットオフ値を 1.5 とした場合。治療完了群の 11 例で値を上回ったが、その後の経過観察にて 9 例でリンパ節転移による再発を認めた。残りの 2 例のうち、1 例は肺炎による集積が肝集積と重なっており、もう 1 例は甲状舌管遺残が疑われ、それによるヨードの有機化が原因の可能性を考えた。この 2 例はその後、無治療で再発は認めていない。要再治療群の 2 例で値を下回ったが、2 例ともに頸部に集積を認め、診断には影響がなかった。原因としては 2 例とも夏期に撮像されており、頭部の発汗によるバックグラウンドの上昇が疑われた。

肝の深さ方向の積分値を見ている planar 画像上の最大の RI 量は、単位体積あたりのトレーサー量と肝臓の深さ方向の 2 つによって規定されている。肝臓体積と単位体積あたりの放射エネルギーのその双方と正の相関があるパラメーターが、肝の集積の最大値にあると考えられる。消化管の影響も考慮されるが、I-131 の肝内分布は比較的均一であり、仮に完全な ROI が設定されなかったとしても、最大値には影響しないと考えられる。本来であれば、三次元的に評価するものであり、吸収散乱補正や肝の形態による影響も無視されている可能性がある。しかしながら、それによる誤差を無視してもインデックスとして使う分には非常に簡便で十分な結果が得られていると考える。

抗 Tg 抗体陽性の患者等、Tg 値が治療効果判定に用いることができない場合や視覚的に肝集積の評価が困難な場合、H/B ratio は客観的に治療効果を判定することで、初期の再発・微小な残存を早期に診断しうる可能性があると考えられた。

【文 献】

- 1) Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med*, 97:418-428 (1994)
- 2) Pacini F, Mariotti S, Formica N, et al. Thyroid auto-antibodies in thyroid cancer: incidence and relationship with tumor outcome. *Acta Endocrinol*. 119:373-380 (1988)
- 3) Visser TJ. Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem Biol Interact*. 92:293-303 (1994)

19) 悪性神経膠芽腫における IndoCyanin Green の有用性についての研究

研究代表者 三井 宣幸

【はじめに】

我々は、術中のリアルタイムイメージングとそれが意味する臨床的意義の探求を主にテーマとしている。本研究では、悪性神経膠芽腫の病理組織学的特徴の一つである“新生血管の増生”に着目した、術中イメージングの解析を目的とした。術前検査での新生血管の増生所見は、造影 MRI 検査で不整な“ring like enhancement”として表現され、脳血管造影検査では腫瘍内で生じる動静脈シャントにより“腫瘍膿染”として表現される。このような術前の検査所見を、簡便で再現性を持って術中にリアルタイムに可視化する事は、手術成績や Maximum resection, 治療予後の向上が期待できる。近年、手術室内に MRI 装置を整備して術中 MRI を導入したり、ハイブリットオペルールの開発により術中造影が行えるようになって来ているが、煩雑な装置や費用及び人員を要する事から、限られた施設でしか行われていないのが現状である。そこで、従来の脳神経外科手術で ICG(IndoCyanin Green)を用いて行う術中蛍光血管造影法の応用として、悪性神経膠芽腫の術中蛍光造影検査を行う事で“新生血管の増生”を可視化する事が可能ではないかと発案した。これは、細胞レベルで浸潤する境界部での残存腫瘍と脳組織の浮腫性変化の判断や、血流量・血液通過時間等を解析する事で腫瘍の特異性をリアルタイムに評価する事を期待し研究を推進したので報告する。

【研究方法】

当科での日常診療で、摘出術の適応と判断した脳腫瘍の患者さんを対象とした。摘出術を行う際に、腫瘍摘出前と摘出した cavity の ICG による術中蛍光血管造影検査を撮像して PreICG, PostICG とし ICG の血流量、血流量、平均通過時間を解析。撮像条件は、顕微鏡の焦点距離を 200mm、倍率は 2 倍で ICG25mg を 10ml の生理食塩水に溶解して 0.2mg/kg を末梢静脈から急速静注しその後に生理食塩水を 20ml でボラス投与して 2 分間の撮像とした。得られた動画情報は、インフォコム社製の Flowinsight で解析し rBF(regional blood flow), rBV(regional blood volume), MTT(mean transit time), TTP(time to peak), AT(arrival time), rTTP(re-

gional time to peak), Grad (gradient) を算出して検討する。

【結 果】

当初は、悪性神経膠芽腫に限定して検討する予定であったが、他腫瘍病変との比較対象や腫瘍特異性を検討するには、ICG 蛍光造影検査が可能な症例に行う方針とした。対象は8例で、Glioma 3例, Meningioma 2例, Cavernoma 1例, Hemangioblastoma 1例, Metastatic brain tumor 1例であった。摘出前と摘出した Cavity の撮像を行えたのは2例だけであった。実際には、摘出中の出血量の程度や止血が困難な症例、硬膜を翻転した時点で脳浮腫が強く迅速な摘出が必要な症例など、手術加療を安全に確実に終えるために予定する撮像条件を十分に満たす症例を得る事が困難であった。

【代表症例】

症例 1

78 歳 男性。活動性の低下を主訴に近医受診し左前頭葉の腫瘍性病変を指摘。摘出術を施行し、永久病理標本は、Glioblastoma Multiform (WHO Grade IV) であった。摘出前の脳血管撮像は (fig.1 A)、びまん性新生血管を示唆する腫瘍膿染像が見られている。造影 MRI は、不整形な ring like enhancement を呈する病変を白質に認めている。脳表の ICG を用いた術中蛍光血管造影の輝度解析では (fig.2 A)、明らかな局所的な血流量や血液量の高値を認めなかった。しかし、周辺脳組

織と比べて腫瘍部位の Gradient が意味する輝度変化率が高い事が確認された (fig.2 B)。実際には、腫瘍主座は白質に存在するため、ICG の組織透過性等を考慮すると、脳表の輝度変化から算出する血流量や血液量は、腫瘍内の新生血管の増生を反映する事が困難であったが、輝度変化率の傾きが示唆する結果となった。腫瘍摘出腔で撮像した ICG 蛍光血管造影は (fig.2 C)、まだら状の輝度が高くなる部位が確認された。摘出腔内を観察すると、一部 oozing していたり止血後の微小血管の断端が露出しており ICG が一部摘出腔内に流出していた事が考えられ、残存する腫瘍の新生血管の増生を反映する結果とは言い難い結果であった。

症例 2

23 歳 男性。頭痛精査で指摘された小脳虫部の多房性病変、永久病理標本は血管芽腫であった。MRIGd 造影検査 (fig.1 D) では、嚢胞性病変と造影される結節成分が見られた。脳血管造影は強い腫瘍膿染像を認めた。摘出前の ICG 蛍光造影検査では、腫瘍は輝度が高く局所の血液量や血流量が非常に高値である事が示唆された (fig.3 A,B)。実際の手術治療でも易出血性で、血管性に富んだ腫瘍であった。

症例 3

48 歳 女性。Incidental に指摘された、左頭頂葉の腫瘍性病変。永久病理標本は海綿状血管腫であった。MRI Gd 造影検査 (fig.1 F) では、皮質下に ϕ 2cm 大の

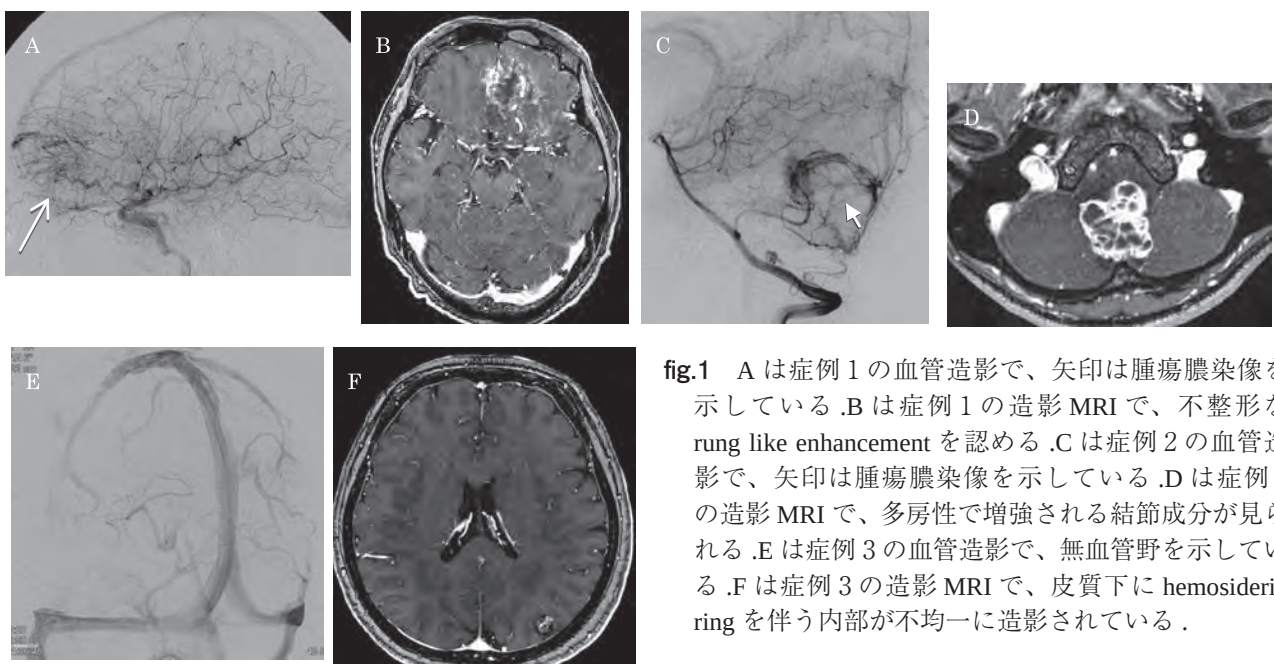


fig.1 A は症例 1 の血管造影で、矢印は腫瘍膿染像を示している .B は症例 1 の造影 MRI で、不整形な ring like enhancement を認める .C は症例 2 の血管造影で、矢印は腫瘍膿染像を示している .D は症例 2 の造影 MRI で、多房性で増強される結節成分が見られる .E は症例 3 の血管造影で、無血管野を示している .F は症例 3 の造影 MRI で、皮質下に hemosiderin ring を伴う内部が不均一に造影されている .

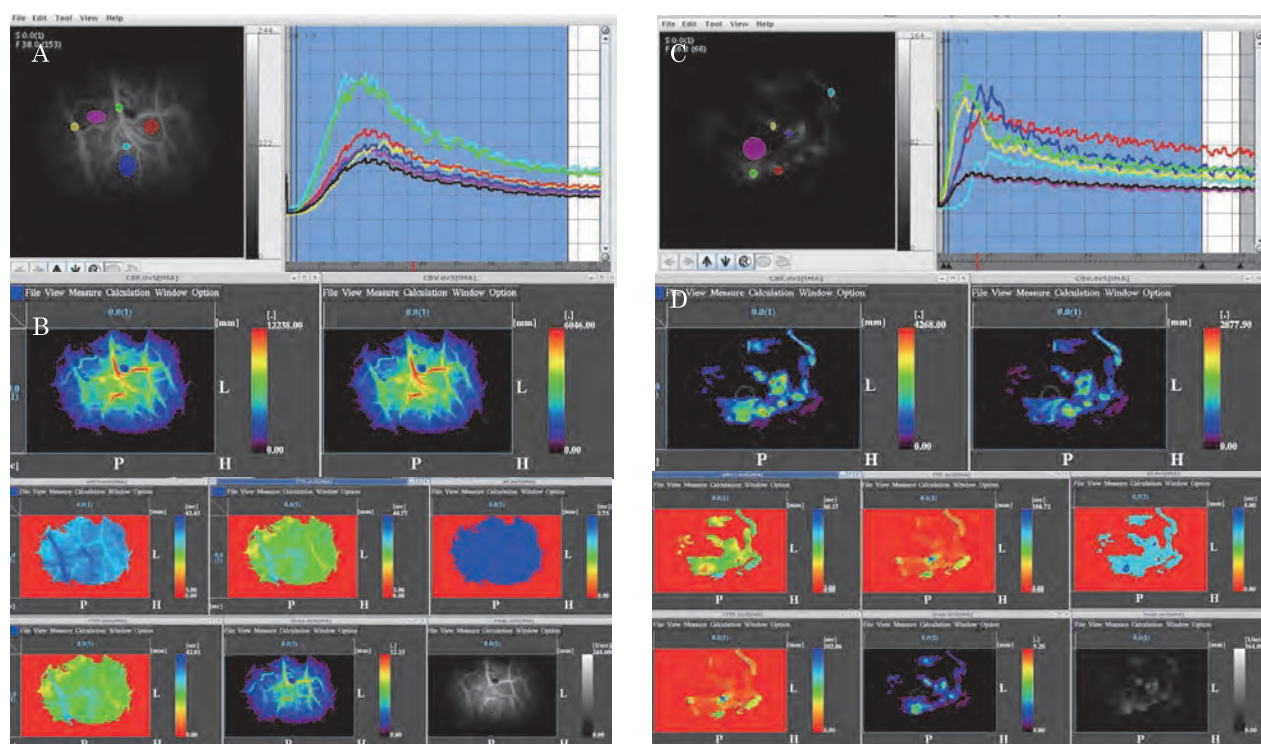


fig.2 A は症例 1 の摘出前の脳表蛍光血管造影の輝度変化を、横：時間軸、縦：輝度変化としてグラフ化した .B は A で得られた輝度変化をもとに解析ソフトである Flowsight で rBF(regional blood flow), rBV(regional blood volume), MTT(mean transit time), TTP(time to peak), AT(arrival time), rTTP(regional time to peak), Grad(gredient) を算出しカラーバーで画像化した .C は摘出後の蛍光血管造影の輝度変化をグラフ化した .D は C の輝度変化をもとにパラメーターを算出し画像化した .

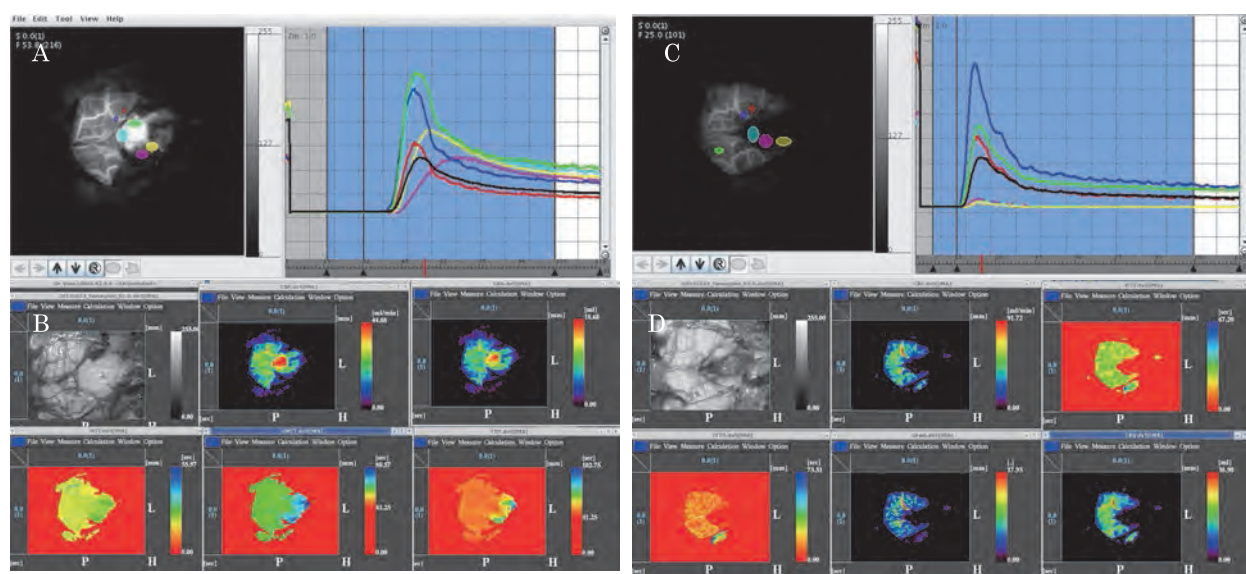


fig.3 A は症例 2 の摘出前の蛍光血管造影の輝度変化をグラフ化した .B は A の輝度変化をもとにパラメーターを算出し画像化した .C は症例 2 の摘出後の輝度変化をグラフ化した .D は C の輝度変化をもとにパラメーターを算出し画像化した .

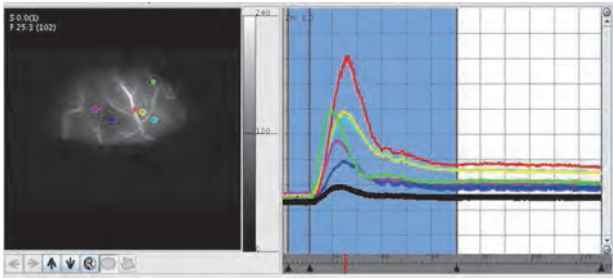


fig.4 症例3のICG蛍光血管造影を示す。矢印は、周囲組織と比べ輝度の低下を呈している。

中心部は造影剤に染まる腫瘍性病変を認めており、血管造影では無血管野であった (fig.1 E)。摘出前のICG蛍光血管造影検査では無血管野を呈していた (fig.4)。

【考 察】

代表症例を検討すると、造影MRIで増強される部位が必ずしも術中ICG蛍光血管造影で反映できるものではなく、術前脳血管造影で見られた腫瘍腫瘍所見が局所の血液量や血流量の増加として示す事は出来なかった。その要因は、蛍光するICGの透過性によるものと推察される。皮質下病変や脳表病変であれば容易に反射光として視認できるが、深部白質病変はやはり病変部のICGの蛍光輝度変化を脳表で捉える事は困難である。しかし皮質下もしくは脳表病変であれば、新生血管増生を反映していると思われるこれらの所見は、血流量変化率として捉える事が出来たといえる。臨床的意義に関しては症例数が少なく評価する事は出来ないが、新生血管増生による血液量が要因になるのか、A-Vシャントによる周囲組織より速いPhaseでの輝度上昇を反映しているのか、検討すべき事項と考える。摘出腔の残存腫瘍の評価に関しては、oozingや凝固止血した血管断面の露出が問題となり、今のところ解決策を講じられていないのが現状である。今後の症例数の積み重ねと検討が必要と考えられた。

20) 脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与による骨再生の研究

研究代表者 吉田 将亜

【目 的】

細胞治療は骨再建・再生を低侵襲で効率良く行うために有用である。近年、脂肪組織に含まれる体性幹細胞 Adipose derived stem cells (ADSCs) が骨形成細胞、

軟骨形成細胞、脂肪細胞に分化することが報告されている。歯科口腔外科学講座では、低侵襲骨再生を目指した細胞移植方法を開発するために、ADSCsの静脈投与が骨創治癒に与える影響についての検討を行っており、これまでADSCsを静脈内投与すると骨欠損部の新生骨形成が旺盛になることを明らかにした。またADSCsの静脈内投与による細胞の骨創局所への分布を検討したところ、新生骨形成部においてADSCsの局在が確認され新生骨形成に直接的に関与していることを明らかにした。さらに投与した細胞は直接的に骨形成や血管形成に関与し骨創治癒を促進していることを示唆する結果を得ている。しかし、静脈内投与したADSCsが骨の障害部位に集簇するメカニズムは依然不明のままである。そのため、静脈内投与したADSCsが骨の障害部位に遊走し集積するメカニズムを解明し、その機能分化を検討することは細胞投与の条件を決定する根拠となると考えられる。そのため、本研究はADSCsを骨再生部へ遊走させる因子を検索し、その関連性を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

研究1：骨欠損形成部位への幹細胞動員因子の検討
ラット頭頂骨に骨欠損を形成しF344ラット由来ADSCsの静脈内投与を骨欠損形成3日目に行った。評価は静脈内投与後1週および2週目に行った。ラット頭頂部に形成した骨欠損部でのHMGB1、SDF-1、HIF-1、PDGFR- α の局在を経時的に免疫組織学的に検討した。コントロールはADSCsの静脈内投与を行わないものとした。

研究2：ADSCsの幹細胞動員因子発現に関する検討
培養ADSCsおよび骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) のPDGFR- α 、CXCR4およびSDF-1の免疫組織染色を行った。さらに、培養ADSCsおよびBMSCのCXCR4、SDF-1(CXCL12)の遺伝子発現をRT-PCR法により検討した。

【結 果】

組織学的検討ではADSCs静脈投与群は対照群と比較して骨欠損形成1週目、2週目において新生骨形成は旺盛であった。骨欠損形成部位への幹細胞動員因子の検討では、HMGB-1は手術後1週目にはADSCs

静脈投与群および対照群とも皮下および骨欠損形成部に陽性部を認めたが両者に差は見られなかった。2週目には ADSCs 静脈投与群では陽性部が見られなかったが、対照群では骨欠損部に陽性部が見られた。PDGFR- α 陽性細胞は手術後1週目および2週目には ADSCs 静脈投与群および対照群ともに新生骨形成部、骨欠損形成部および皮下に多数見られた。HIF-1 に関しては、手術後1週では ADSCs 静脈投与群は対照群に比較して骨欠損部の広い範囲で陽性細胞がみられた。手術後2週目には骨欠損部の HIF-1 陽性細胞は1週目に比較して多く認められ、ADSCs 静脈投与群および対照群に明らかな差はみられなかった。SDF-1 に関しては手術後1週目では新生骨形成部および骨欠損形成部の血管周囲に多数の陽性細胞が見られた。2週目では SDF1 陽性細胞は両群ともに骨欠損形成部の血管周囲に認められたが1週目と比較して陽性細胞数は減少していた。CXCR4 に関しては手術後1週目には陽性細胞が骨形成部および骨欠損形成部に見られたが対照群は ADSCs 静脈投与群に比較して陽性細胞数が多数見られた。2週目にはこの傾向はさらに顕著であった。

培養細胞の幹細胞動員因子発現に関する検討では、免疫組織化学では PDGFR- α および SDF-1 に関して ADSCs は BMSC と同様に強陽性に染色されたが、CXCR4 では ADSCs は BMSC に比較して弱陽性であった。RT-PCR 法では SDF-1 は ADSCs、BMSCs 同様に発現がみられたが、CXCR4 の発現は BMSCs のみにみられた (写真1)。以上の結果から SDF-1 は ADSCs、BMSCs 同様に発現がみられるが、CXCR4 の発現は両者で差があることが示された。



写真1 RT-PCRの結果。

Lane 1-4: CXCR4 (99bp). Lane 5-8: SDF-1 (99bp).

Lane 9-12: GAPDH (116bp).

CXCR4 の発現は BMSCs のみにみられ (矢印)、SDF-1 は ADSCs、BMSCs 同様に発現がみられた。レーン1, 5, 9はネガティブコントロール。レーンMはDNAマーカーを示す。

【考 察】

High mobility group box 1 (HMGB1) は、強い PDGFR- α 陽性骨髄間葉系幹細胞遊走活性を有することが知られている。HMGB1 は障害部位や炎症部位で放出されることが知られており損傷組織再生に関与していることが示唆されている。今回の免疫組織化学の結果から、骨創への ADSCs の集簇する機構は、骨創部における HMGB1 の発現が PDGFR- α 陽性細胞である ADSCs を遊走させたことが示唆された。また、CXCR4 のリガンドである SDF-1 は骨折部位での遺伝子発現が高いことが知られており、異所性骨化部位、骨折部や骨再生部位に骨形成前駆細胞 (OPC) を集積させ骨芽細胞を供給していることが示唆されている。この OPC は骨髄由来の CXCR4 陽性細胞であることが知られている。このことから、ADSCs の静脈内投与においても同様の機構が作用しているのではないかと仮説に基づき研究を行った。しかし、免疫組織化学および遺伝子発現の検討から、静脈内投与を行った ADSCs が骨欠損部に集簇する機序において CXCR4/SDF-1 の関与には疑問が生じる結果となった。SDF-1 の受容体である CXCR4 はおもに骨髄に存在する造血幹細胞や末梢血中の白血球において発現が認められることから、今回は BMSCs にその成分が多く含まれていることが影響した可能性が考えられる。

SDF-1/CXCR4 システムは血管傷害後の新生内膜形成、血管新生に寄与していることや、CXCR4 の発現が亢進された場合に、より効果的に血管新生が誘導されることが明らかになっている。今後は本研究で検討した遺伝子の発現量の検討、CXCR4 発現を誘導する因子、また、HIF-1 との関連性や PDGF- α 、HMGB-1 等について、さらに検討していく必要があると考えられた。

【文 献】

- 1) Otsuru S, Tamai K et al. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by CXCR4/SDF1 pathway. Stem Cells. 26, 223-234 (2008)

21) 近赤外分光法を用いた注意欠如／多動性障害の診断補助システムの開発

研究代表者 池上 将永

【目的】

注意欠如／多動性障害（attention-deficit/hyperactivity disorder : ADHD）は、不注意、多動性・衝動性を中核症状とする発達障害であり、学童期の3 - 7%が罹患していると見積もられている¹⁾。ADHDの症状は前頭前皮質の微細な機能不全と関連していると想定されており、中枢刺激薬のメチルフェニデート（methylphenidate : MPH）、および非中枢刺激薬のアトモキシチン（atomoxetine : ATX）の服用が代表的な治療手段となっている。治療薬に対する反応は、通常、行動評価によって検証されるが、特にATXはMPHに比べて症状の有意な改善が認められるまでに時間を要するため^{2,3)}、行動評価に加えて脳機能計測による評価が投薬効果の判定に寄与すると考えられる。

非侵襲的な脳活動の計測方法にはEEGやfMRIがあるが、ADHD児は多動症状のために長時間の拘束を伴う検査が困難なことも多く、検査時間が短く拘束性が少ない方法がより望ましいとが考えられる。近赤外分光法（near-infrared spectroscopy : NIRS）による脳機能計測は、完全非侵襲で拘束性が少なく、計測の準備も簡便なため検査時間の大幅な短縮が可能であり、ADHD児に特に適していると考えられる。

そこで本研究では、NIRSを用いてADHD児の前頭前皮質活動に及ぼすATXの効果を中心に検討した。行動課題には、持続的注意と反応抑制を要する実行機能課題である連続遂行課題（continuous performance task : CPT）を用い、投薬治療前後における課題遂行中の前頭前皮質の血流動態反応、行動評価尺度（ADHD-RS）およびCPTの遂行成績の変化を検証した。

【方法】

実験参加者：旭川医科大学小児科外来通院中で、DSM-IV-TRに拠って診断されたADHD児12名（男児6名・女児6名、平均年齢9.8歳）、および統制群として定型発達児14名（男児5名・女児9名、平均年齢9.7歳）を対象として行った。研究協力をお願いするADHD児は本学小児科の荒木章子医師より紹介を受けた。実施に先立ち、児童と保護者に検査の趣旨

を説明し承諾を得た。ATXによる治療開始前（治療前条件）および治療開始後6ヶ月以上経過した時点（治療後条件）の2回の検査を行った。ATXの平均維持量は1.6mg/kgであった。

NIRS計測：光トポグラフィ装置（ETG-100, 日立メディコ）を用いて行動課題遂行中の酸素化ヘモグロビン（oxy-Hb）と脱酸素化ヘモグロビン（deoxy-Hb）の濃度変化を計測した。計測プローブは左右の前頭部を覆うように設置した（図1）。5ブロック分の時系列データを加算平均したのち、課題期間の開始直前6秒間と課題期間終了12秒後からの6秒間のデータを用いて直線回帰によりベースラインを推定し、課題遂行時のHb濃度変化をチャンネルごとに算出した。

【結果】

行動指標：ADHD-RS得点は治療後条件で有意に低下した。一方、CPTにおけるヒット率、反応時間、false alarm生起率に関しては、統制群と有意な差はなく、また治療前後で有意な変化は認められなかった。

NIRSデータ：課題期間におけるoxy-Hbの濃度変化について、統制群ではoxy-Hb量の有意な増加が見られ、課題遂行によって右背外側前頭前皮質を中心とした明瞭な賦活パターンが認められた。対照的に治療前条件のADHD群では、安静時ベースラインと比べていずれの部位でもoxy-Hb量の増加は認められず、左の腹外側前頭前皮質ではoxy-Hb量の有意な減少が認められた。一方、治療後条件では右背外側部でoxy-Hb量の有意な増加が見られ、課題遂行に伴う賦活パターンが認められるようになった（図2）。また、治

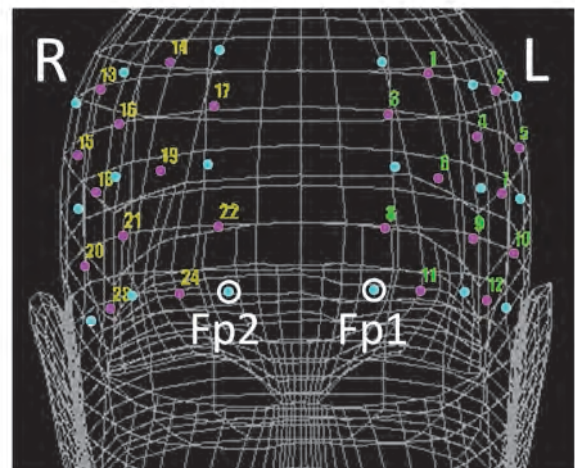


図1 計測プローブの配置

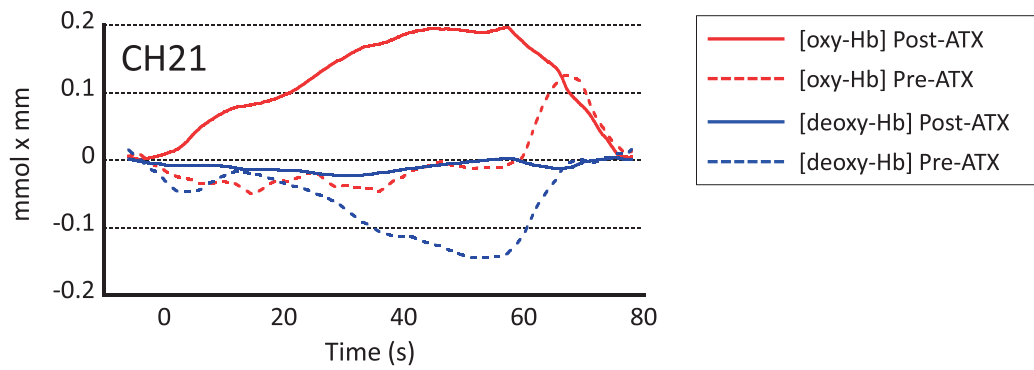


図2 右背外側前頭前皮質における Hb 量の変化

療前条件で認められた左腹外側部の活動の低下は消失した。

【考 察】

先行研究³⁾と一致して、6ヶ月以上のATX内服によってADHD-RS得点は有意に改善された。一方、本研究ではNIRSの計測時間に合わせてCPTを短時間のブロックに分割して実施したため、ADHD児にとっても遂行が容易であった。そのため、治療前後におけるCPT遂行成績に有意な差が認められなかったと考えられる。今後、行動検査課題としてCPTを用いる場合には、課題難易度の調整が重要であることが示唆された。NIRS計測の結果、ATX治療後では課題遂行に伴う前頭前皮質の賦活が認められ、前頭前皮質の機能改善が示唆された。ATXによる行動症状の改善は漸進的であるため^{2,3)}、前頭前皮質の機能検査を合わせて行うことはATXの投薬効果を評価する際に有用であると考えられる。

本研究の結果は、NIRSによる前頭前皮質の機能検査が、ADHD児の脳機能不全や治療反応についての客観的指標を得るために有用であることを示しており、NIRSを用いたADHD診断補助システムの発展可能性を示唆するものと思われる。今後の課題として、ADHD症状の構成ドメインとして想定される複数の認知機能（実行機能系、報酬系）⁴⁾に検討対象を広げ、個々のADHD児の病態により見合った検査課題が使用できるようにシステムを構築していく必要がある。そのことによって、個々の病態理解や合理的な薬剤選択にいつそう寄与できるものと思われる。

【文 献】

- 1) American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed. Text revision (DSM-IV-TR). Washington, DC: American Psychiatric Association; 2000.
- 2) Newcorn JH, Kratochvil CJ, Allen AJ, Casat CD, Ruff DD, Moore RJ, et al. Atomoxetine and osmotically released methylphenidate for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder: acute comparison and differential response. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 721-30.
- 3) Dickson RA, Maki E, Gibbins C, Gutkin SW, Turgay A, Weiss MD. Time courses of improvement and symptom remission in children treated with atomoxetine for attention-deficit/hyperactivity disorder: analysis of Canadian open-label studies. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health* 2011; 5: 14. Doi: 10.1186/1753-2000-5-14.
- 4) Sonuga-Barke, EJS. The dual pathway model of ADHD: an elaboration of neuro-developmental characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 2003; 27: 593-604.

22) 断片文字認知メカニズムのモデル化

研究代表者 高橋 龍尚

【研究の背景と目的】

ヒトは、図形の一部が他の物の陰になっていたり、図形の一部が欠けていたりした場合でも、その図形や文字を認知・識別する能力を有する。このような断片的な視覚情報の認知を“視覚補間”と呼ぶことにする。この視覚補間能力は、脳の視覚情報処理の重要な特徴と考えられる（Changizi, 2009）。

断片的な視覚情報の認知、本研究では断片文字の認知、は図形の情報量だけではなく断片化の様式（モー

ド)にも影響されることを先行研究で報告した(Jiang ら, 2010)。断片文字は、完全文字を構成している要素(ピクセル)からドットや長方形型のピクセルをランダムに削り、コンピュータディスプレイに表示される。消去率を段階的に変化させ被験者の正解率を調べたところ、情報の削除量(断片化率)が増すに従い正解率は低下した。図1には、一例を示す。断片化の際、ドットあるいは長方形のモード(形状)で情報を削除していくと、ピクセル(情報)消去量が同じでもドットモードに比べ長方形モードによるピクセル消去の場合に文字の読み取りが困難になることがわかる。長方形モードの消去による文字読み取りの困難さは、文字を構成しているピクセルが根こそぎ奪われ特定の文字として成立し得なくなるからである。図1の長方形モードによる0.92断片化の“R”は、“K”や“B”のようにも見える。

このように断片化された文字や図形を読み取る際には、失われた情報を補完し本来の文字や図形を構築し記憶から想起される文字や図形との一致をみなければならぬと考えられる。これらのプロセスを網膜の視細胞以後の視覚系機構、一次視覚野、視覚連合野および高次視覚野を通してどのようになされるかについての十分な理解は得られていない。

先行研究において、断片文字の消去モードと消去率と正解率の関係を示す実験データから、断片文字を読む際の視覚補間、言い換えると文字構成ピクセル間の補間には何らかの規則があるのではないかと考察に至った。そこで我々は視覚補間のメカニズムとして次の仮説を設け、文字構成ピクセル間の補間には最短距

離のピクセルを連結するモデル——最短距離連結モデル——の妥当性について検討した。このモデルを証明するための実験として、三点を提示された被験者がどのような線の結び方をイメージしたか調査した。また、このモデルの妥当性を示す実験としてコンピュータシミュレーションも行った。

【実験方法】

被験者

Y大学の健常男子大学生(年齢21歳—23歳)10名。彼らの視力は正常であった。実験実施者は被験者に対してタスクの手続き、危険性、利益などについて十分な説明を行い、全員から同意書を得た後に実験が実施された。また、本実験は、大学倫理委員会の承認を得て行われた。

実験手順

パソコンのモニター上に3点の黒丸(●)を表示する(図3のA0)。表示時間は200ミリ秒である。次に、図3の下段のようにA1、A2、A3の並びの画面が表示されるので、被験者は黒丸が表示された際に自身がイメージした線の結び方と同じ図形を指示する。同様の実験を図4のB0でも行った。A0とB0における黒丸3点は直角三角形の頂点に位置し、直角を挟む辺の関係は $S_2 = 2 \times S_3$ と定義される(図2)。また、B0はP3を中心にA0を120度回転したものである。

実験を行う前には次のような説明を被験者に行った：『モニター上に点が3つ表示されます。3点が表示されている間に、頭の中でそれらの点を線で結ぶイメージを記憶して下さい。その後に表示される3つの選択肢の中から自分のイメージした結び方と同じもの

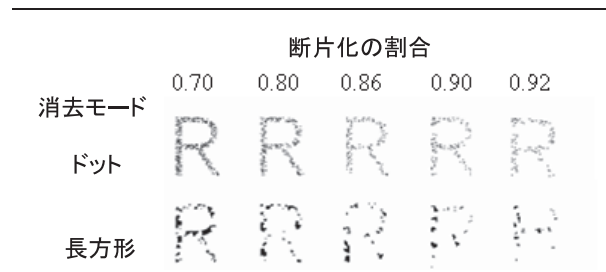


図1 ピクセル表示による文字(アルファベット)からピクセルをランダムに消去し文字を断片化する。ランダムに消去されたピクセル量に比例して文字を読むことの難易度は増加する(情報理論に基づく「Jiang ら, 2010」)。消去の形状(モード)はドットと長方形による。断片化の割合が進むとドットモードに比べ長方形モードは難しくなる。

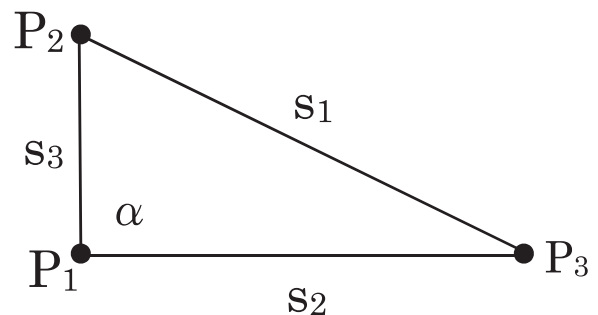


図2 3点の関係を定義する直角三角形

を選んで下さい。深く考えず直観で行って下さい』。

【結果と考察】

図3のn値は、その図形（線の結び方）をイメージした人数を示している。8人がA1を選択した。同様に、図4では7人がB1を選択した。A1とB1の図形は三点の結び方としては最も短い距離と2番目に短い距離を結ぶ線からなる。A2やB2にも最も短い辺S3があるためA3やB3よりも選択者が多くなることを予想したが、結果は、B3はB2よりも1人多くなる結果となった。これは、イメージする線の傾きの影響が考えられる。これらの結果を統計でみると、A1とB1、A2とB2、A3とB3をセットにした3グループの選択される比率を1:1:1と仮定すると、カイ2乗適合度検定の結果は、統計的に有意な差($P < 0.05$)を検出した。すなわち、統計学的にはA1とB1が75%も選ばれる（イメージ）されるのは、偶然ではないことが示唆される。

コンピュータシミュレーション

人の実験では、複数の点を見た際に最短の点から優先的に線が結ばれる傾向があることを示した。はたして断片化された文字を見た際にも近接の点を結ぶ補間イメージによって正しい文字として読めるだろうか？このモデルは近接の点を結ぶだけの単純なアルゴリズムからなり、これを最短距離連結モデルと呼ぶことにする。コンピュータシミュレーションによって断片化

された文字の近接するピクセルを直線で結んだ結果が正しい文字として再現されるかをテストすることにする。図5に結果の例を示す。例では断片文字AとKが示されている。本来の文字を構成するピクセルから90%のピクセルを消去している。ピクセルの消去は、ドットモード、長方形モード共にランダムに行われた。ドットモードの場合、文字を構成するピクセルが一樣に消去されているため残されたピクセルを最短線で結ぶことで、本来の文字が表現されている。一方、長方形モードでは、残されたピクセルの距離が大きいために最短のものを結んでも本来の文字に再構築されていない。

以上より、最短の情報（ピクセル）を結ぶ補間機能によって断片文字を読んでいるという仮説は支持されたことになるが、実際に脳のどの部位で、あるいはどのような細胞の反応によってその補間機能が働くのかを考察してみたい。

視細胞、双極細胞、網膜神経節細胞、外側膝状体、視放線、これら一連の信号伝達系での機能貢献について、研究文献からヒントが見出される。神経節細胞の電気活動記録の研究から、中心 - 周辺拮抗型の受容野特性により白（背景）と黒（文字構成要素）の強調がもたらされる（Schiller, 1992）。一次視覚野（V1）では方位選択性ニューロンのモジュール活動と水平的に連絡する同方位性反応モジュールの相互強化による

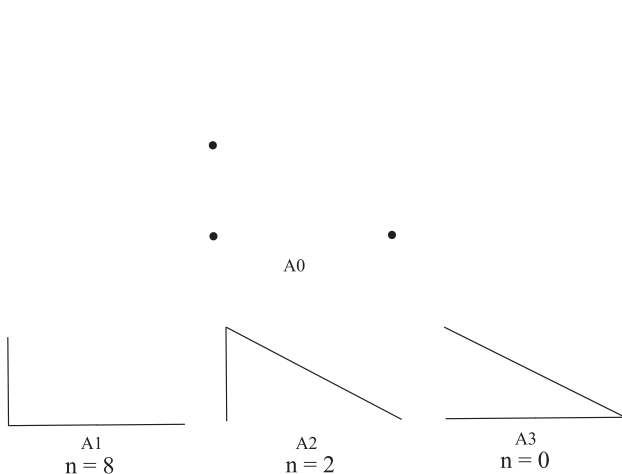


図3 実験とその結果。パソコンによるモニター上の3点の表示（上段A0）。3点表示後のイメージ（A1, A2, A3）と被験者10名による選択結果（nは人数）。A1から順に結合線の合計は長くなる。

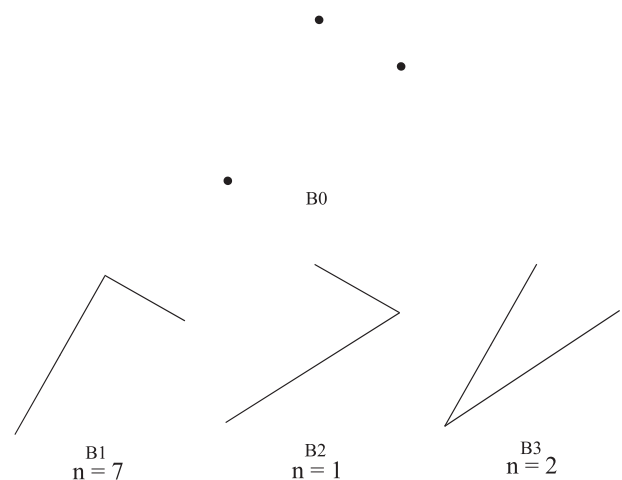


図4 実験とその結果。パソコンによるモニター上の3点の表示（上段B0）。3点表示後のイメージ（B1, B2, B3）と被験者10名による選択結果（nは人数）。B1から順に結合線の合計長さは大きくなる。

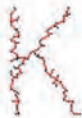
消去モード	文字 A (消去率 90%)		文字 K (消去率 90%)	
	ドット	赤線	ドット	赤線
ドット				
長方形				

図5 最短距離連結モデルによるシミュレーション結果の例。文字 A と K を断片化した後、各ピクセルについて近接するもの同士を赤線で結んでいる（各右側文字）。最短距離連結モデルによって、ドットモードで断片化された文字は読めるが長方形モードのそれらは読むことが困難である。

効果が考えられる (Stettler ら、2002)。一方、一次視覚野および V1 に隣接し V1 からの出力の先である視覚前野の一部 V2 ニューロンでは、Illusory contours に反応することが電気生理学的にサルで調べられている (von der Heydt と Peterhans, 1989 ; Grosf ら、1993)。V1 には網膜上の画像に対してモノ (object) の線や面の方向性の処理を担当する方位選択性のニューロンがある (Hubel と Wiesel, 1968)。また、その情報は方位選択性を示す V2 のニューロンに送られる。少なくとも V1 と V2 段階で実際には存在しない Illusory の線がそれらのニューロン活動から存在することの証拠となっている。この Illusory の線の存在は、他ならぬ断片文字を読む際の補間機能なのではないかと推測される。

【謝 辞】

本研究は、平成 25 年度“独創性のある生命科学研究”研究費助成を頂いた。此に心より感謝申し上げます。

【文 献】

Changizi M. The vision revolution. BenBella Books, Inc. Dallas, 2009.

Grosf DH, Shapley RM, Hawken MJ. Macaque V1 neurons can signal “illusory” contours. Nature 365: 550–552, 1993.

Hubel DH, Wiesel TN. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. J Physiol 195: 215–243, 1968.

Jiang Y, Ikegami M, Yanagida H, Takahashi T, Wang S. Quantification of the capability of human visual interpolation for identifying fragmented letters. Trans Jpn Soc Med Biol Eng 48: 369–376, 2010.

Stettler DD, Das A, Bennett J, Gilbert CD. Lateral connectivity and contextual interactions in macaque primary visual cortex. Neuron 36: 739–750, 2002.

Schiller PH. The ON and OFF channels of the visual system. TINS 15: 86–92, 1992.

von der Heydt, Peterhan E. Mechanisms of contour perception in monkey visual cortex. I. Lines of pattern discontinuity. J Neurosci 9: 1731–1748, 1989.

23) 健康人に対する膝関節疾患モデルの姿勢制御の研究と転倒予防への展開～臨床的関節角度計算方法の提案と考察～

研究代表者 小原 和宏

【目 的】

膝関節疾患モデルの作成と解析を行うにあたり、三次元動作解析装置を用いる必要がある。三次元動作解析を臨床分野で利用する時、関節角度や関節モーメントを自動で計算してくれるソフトが存在するが、関節

角度はオイラー角を用いて算出され広く研究に利用されている¹⁾²⁾。オイラー角は、剛体の姿勢を表現する手法の一つであり、航空機や船舶そして地球の姿勢に利用されてきた。ある座標系に対し、もう一つの座標系を各座標軸周りに回転させ一致するまでの角度をいい、回転行列を用いて算出する。回転順序依存性であり、三つの軸全てを用いると計算方法は6通り(XYZ XZY など)となり、計算結果は異なる。基準座標系を入れ替えるとさらに6通り、同じ軸を二度使う方法(例:XYX, ZXZ など)を含めると更に増える。オイラー角にて臨床的な関節角度を求めるとき、どの回転順序を選択すべきかは決定されていないため研究者が選択するが³⁾、臨床的な角度概念とどの順序が符合するのかわかりにくい。そこで、臨床的な膝疾患モデルを確実に作成・解析するためには、関節角度の計算方法は医療関係者が普段関節角度を計測する方法と似ている必要がある。今回は、疾患モデルの作成に先立ち、主に膝関節における臨床的関節角度計算方法の確立を目指し、オイラー角によって算出された結果と比較し検討するのを目的とした。

【方 法】

両側の大転子(GT)、右脚の膝関節内・外側(MK・LK)、足関節内・外果(MA・LA)を目印とし反射マーカーを貼付した。三次元動作解析装置にて歩行などの日常生活動作のデータを取得した。股関節中心は、左右のGTに付けたマーカーの距離の0.18倍各々のマーカーから内側に入れた点(CH)と定義した⁴⁾。大腿局所座標系は、原点をLKとMKの中点(CK)としZ軸はCKからCHに向かう直線で上方向を正とした。Y軸はZ軸とLKとMKを結ぶ直線に垂直な直線で前方方向を正とし、X軸は右手の法則で残った軸とした。下腿局所座標系は、原点をLAとMAの中点(CA)としZ軸はCAからCKに向かう直線で上方向を正とした。そして、Y軸はZ軸とLAとMAを結ぶ直線に垂直な直線で前方方向を正とし、右手の法則で残った軸をX軸とした(図1)。

臨床的関節角度計算方法であるが、以下の計算式を用いた。

ベクトルA(ax, ay, az)とベクトルB(bx, by, bz)

$$\cos \theta = |A \times B| / |A||B|$$

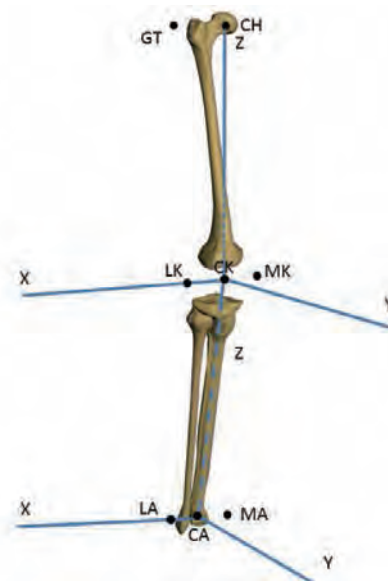


図 1

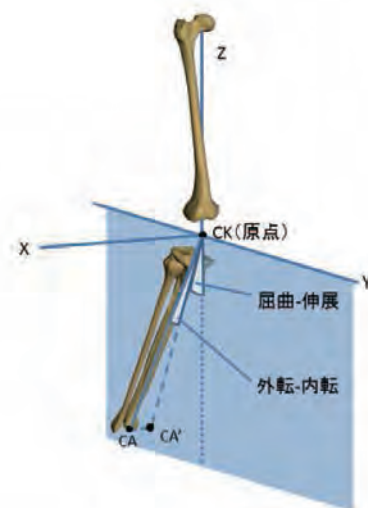


図 2

$$= (ax*bx + ay*by + az*bz) / ((\sqrt{ax^2+ay^2+az^2}) * (\sqrt{bx^2+by^2+bz^2}))$$

より θ をdegreeで求めた。まず、大腿局所座標系を基準座標系とする。

屈曲—伸展：Y-Z平面に、直線CK-CAを投射し、その直線を直線CK-CA'とする。Z軸と直線CK-CA'の角度を式①を用いて算出した。屈曲を正、伸展を負とした。(図2)

外転—内転：直線CK-CAと直線CK-CA'の角度を式①を用いて算出した。外転を正、内転を負とした。(図2)

回旋：直線CK-CAにLAから下ろした垂線を直線P、

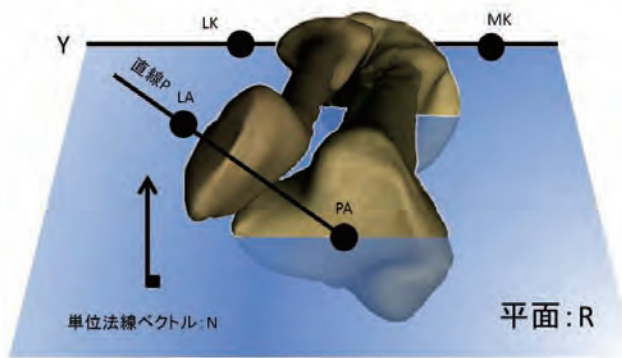


図 3

交点を PA とする。LK と MK と PA の三点を含む平面を平面 R、その平面の単位法線ベクトルを N とする。直線 P と単位法線ベクトル N の角度を式①を用いて算出した。外旋を正、内旋を負とした。(図 3)

オイラー角と臨床的関節角度は、動作解析ソフト BodyBuilder (OXFORD Metrix 社製) を用いて計算した。6 通りの軸周り順 (XYZ、XZY、YXZ、YZX、ZXY、ZYZ) で算出した。

【結 果】

臨床的関節角度計算方法と 6 通りのオイラー角の結果を示す。オイラー角の XYZ 順の X, Y, Z の絶対値と臨床的関節角度計算方法の屈曲—伸展、外転—内転、外旋—内旋の絶対値がそれぞれ一致した。

【考 察】

三次元動作解析装置を用いて関節角度を計算するときオイラー角を用いるのが一般的である。オイラー角は、計算が複雑であり結果が複数通りあるため、算出された結果がどのような角度を表しているのかを理解するのは困難であり、関節角度を計測する際に医療関係者が用いる計測方法とは大きく異なる。よって、医療関係者がイラー角を用いて任意の回転順序を選択しオ計算した結果を用いて研究するのは注意を要するが、今回の臨床角度計算方法とオイラー角の XYZ の軸周り順のみが同じ値になることがわかった。これにより、オイラー角を利用して作成された既存のコンピュータの動作解析ソフトを用いる際、XYZ の軸周り順を選択し符号を整えれば、今回提案して臨床関節角度計算方法と同等の結果を得ることが出来る。

【文 献】

- 1) Wren, T.A.L., Mitiguy, P.C., 2007. A Simple Method to Obtain Consistent and Clinically Meaningful Pelvic Angles From Euler Angles During Gait Analysis. Journal of Applied Biomechanics 23, 218-223.
- 2) Wong, Y., Kim, W., Ying, N., 2005. Passive motion Characteristics of the talocrural and the subtalar joint by dual Euler angles. J.Biomech. 38, 2480-2485.
- 3) Euler, L., 1776. FORMVLAE GENBERALES PRO TRNSLATIONE QVACVNQVE CORPORVN RIGIDORVM. Novi Commentarii academiae scientiarum Petropolitanae. 20, 189-207
- 4) 倉林準, 持丸正明, 河内まき子, 2003. 股関節中心推定方法の比較・検討. バイオメカニズム学会誌. 27(1), 29-36.

24) 高齢者の認知機能向上プログラムの効果に関する研究

研究代表者 作並 亜紀子

【目 的】

我々、老年看護学領域（教授：服部ユカリ）では、平成 23 年 6 ～ 10 月に地域住民を対象として、週 1 回全 18 回の認知機能向上教室（内容：ウォーキングと知的活動）を開催し、介入前後の認知機能及び社会活動に関連する過ごし方満足度の比較を行ったところ、注意分割機能が介入前に比べて介入後が有意に上昇した。今回は、旭川市の介護予防事業の一環として実施した。認知機能向上プログラムが、認知機能・生理的コスト指数・社会活動に関連する満足度の向上に効果があるかを明らかにする。

【方 法】

1. 対象

要介護認定を受けていない 65 歳以上の高齢者

2. 期間

平成 25 年 5 月 22 日～11 月 14 日、(平成 26 年 5 月～11 月予定)

3. 認知機能向上教室の内容

ウォーキングは、東京都老人総合研究所開発の地域型認知症予防プログラム¹⁾に基づき実施し、知的活動は、参加者同士で決めたテーマを基に各自で写真を撮りプリントアウトし、文章を付けて写真集を作成す

るプログラムであり、次の2点が特徴である。①認知機能の低下の予防効果が明らかなウォーキングと知的活動を組み合わせたこと、②参加者が楽しみながら実施でき習慣化が期待できる活動であり、教室終了後も参加者が生活の中で継続できる活動である。

4. 効果およびプログラム評価の方法

介入前後の2時点でファイブ・コグ等を集合調査法で実施し、評価する。

5. 調査内容

- 1) ファイブ・コグ：一般高齢者用の集団式認知機能検査で、5つの認知機能（記憶、注意、言語、視空間認知、思考）を測定する検査で、加齢関連認知低下のスクリーニングに用いられる。
- 2) Simple Cognitive test：軽度認知障害（MCI：mild cognitive impairment）をスクリーニングする。
- 3) 主観的健康観：現在の健康状態を主観的に評価する。
- 4) 老研式活動能力指標：地域で独立した生活を営む上で必要とされる活動能力を測定する。
- 5) いきいき社会活動チェック表：高齢者を対象とした社会活動レベルを評価する。
- 6) 社会活動に関連する過ごし方満足度尺度：高齢者の社会活動全般の過ごし方の満足度を把握する。

6. 分析方法

統計ソフト IBM SPSS Statistics20 を使用する。得点の前後比較はファイブ・コグは対応のあるt検定、その他はWilcoxon 符号付き順位検定により分析する。有意水準5%未満とする。

7. 倫理的配慮

対象者に文書と口頭で研究の趣旨や個人情報への厳守について説明後、調査への同意を確認し同意書に署名を得た。また、同意撤回書を対象者に渡し、同意の撤回も受け付けた。本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認（承認番号1471）を受けた。

[結 果]

認知機能向上教室は、平成25年度2教室実施し、平成26年度2教室を平成26年10月17日現在実施中である。本報告書では、平成25年度に実施した教室参加者の結果を報告する。

対象者は、要介護認定を受けていない65歳以上の

表 認知機能・活動能力・社会活動の教室前後の比較

項目	介入前	介入後	t 値 / z 値	
	平均 ± SD	平均 ± SD		
ファイブ・コグ [#]				
運動	21.8 ± 7.1	24.8 ± 6.7	1.003	
文字位置照合	20.3 ± 9.5	22.4 ± 8.0	0.408	
手がかり再生	14.8 ± 5.7	17.4 ± 6.8	2.409	*
時計描画	6.9 ± 0.4	6.9 ± 0.5	-1.597	
動物名想記	16.3 ± 4.3	17.5 ± 4.6	0.739	
共通単語	10.7 ± 3.6	10.9 ± 3.5	-0.191	
SC-test [#]	27.4 ± 15.8	33.2 ± 14.4	-4.074	***
老研式活動能力指標 ⁺				
手段の自立	4.9 ± 0.3	5.0 ± 0.2	-1.342	
知的能動性	3.7 ± 0.7	3.9 ± 0.3	-1.809	
社会的役割	3.5 ± 0.8	3.8 ± 0.6	-2.236	*
合計	12.1 ± 1.2	12.6 ± 0.7	-2.870	**
いきいき社会活動チェック表 ⁺				
個人活動	7.8 ± 1.6	8.0 ± 1.7	-0.940	
社会参加・奉仕活動	2.3 ± 1.5	2.8 ± 1.5	-2.680	**
学習活動	1.2 ± 1.1	1.4 ± 1.0	-1.018	
仕事	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	-0.447	
合計	11.4 ± 3.1	12.3 ± 3.2	-2.084	*

[#]：t 検定 ⁺：Wilcoxon 符号付き順位検定

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

出典：日本老年看護学会第19回学術集会抄録集：159, 2014.

高齢者を広報等で募集し、本教室に参加し、研究に同意が得られた58名（中途脱落者含む）のうち介入前後のテストを受けた42名（男性18名、女性24名）であった。平均年齢は76.0 ± 6.0歳であった。

ファイブ・コグの手がかり再生課題、SC-test、老研式活動能力指標の社会的役割と合計、いきいき社会活動チェック表の社会参加・奉仕活動と合計は介入後が有意に高かった。主観的健康観は介入後に「非常に健康だと思う」、「まあ健康な方だと思う」と回答した割合が有意に高かった。ファイブ・コグの文字位置照合課題、動物名想記課題、共通単語課題、老研式活動能力指標の手段的自立、知的能動性、いきいき社会活動チェック表の個人活動と学習活動、社会活動に関連する過ごし方満足度尺度の他者・社会への貢献に関する満足度と学習に関する満足度と健康・体力に関する満足度と合計は介入後が高かったが、有意ではなかった。

[考 察]

大藏ら²⁾の要介護認定に該当しない地域在住高齢者（介入群：平均年齢71.6 ± 5.5歳）を対象とした研究の介入群と比べて、本研究では、平均年齢が4.4歳高く、ファイブ・コグのうち介入後の手がかり再生課題、共通単語課題は大藏ら²⁾の方が高く、その他は

本研究の方が高かった。

介入後に有意に上昇していた手がかり再生課題は、エピソード記憶を測る課題であり、MCI の段階で特に低下しやすい¹⁾。矢富³⁾は、MCI を含む地域の高齢者に地域型認知症予防プログラムを行ったところ、1年後、手がかり再生課題と文字位置照合課題が対照群と比べて改善したと報告している。本研究でも手がかり再生課題が改善しており、同様の結果である。SC-test の得点も介入後が高かったことと合わせて考えると、このプログラムにより認知機能が向上した可能性が示唆された。しかし、対照群を設定していないことと、平成 25 年度だけでは、対象数が少ないため、当初に計画した通り、平成 26 年度の認知機能向上教室実施後に、その対象者を含めて再度分析する。

なお、本研究は、日本老年看護学会第 19 回学術集会にて一部を発表した。

[文 献]

- 1) 矢富直美, 宇良千秋 (2009): 「地域型認知症予防プログラム」実践ガイド, 中央法規.
- 2) 大藏倫博, 尹智暎, 真田育依, 他 (2010): 新転倒・認知症予防プログラムが地域在住高齢者の認知・身体機能に及ぼす影響 - 脳機能賦活を意図した「スクエアステップ」エクササイズの検討 -, 日本認知症ケア学会誌, 9(3), 519-530.
- 3) 矢富直美 (2006): 認知症予防, 総合リハビリテーション, 34(11), 1047-1053.

依頼稿 (報告)

平成 25 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 Vogt-小柳-原田病で増加する CD4 陽性 T 細胞クローンの検 索とその抗原ペプチド同定による診断法・治療法の研究

木ノ内 玲 子*

はじめに

フォクト・小柳・原田病（原田病）はメラノサイトに対する自己免疫と考えられている全身疾患であり、眼・皮膚・内耳・髄膜などに炎症を起こす。特徴的な漿液性網膜剥離を伴うぶどう膜炎と、身体の随伴症状を示した場合は容易に診断できるが、典型的でない所見を呈したり、他のメラノサイトを有する臓器の症状を呈していなかったりした場合は診断が難しく、診断法の確立がのぞまれる。

原田病の患者のほとんどが HLA-DR4 (HLA-DRB1*0405) を有し¹⁾、これに結合した特定の自己抗原ペプチドが疾患発症に関わっている可能性が考えられ、特定の病因抗原ペプチドを結合した HLA-DR を認識する抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンが増えていると推測される (図 1)。

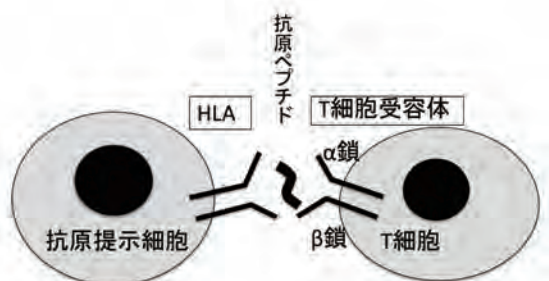


図 1 T 細胞受容体による自己の HLA と抗原ペプチドの認識

T 細胞受容体が自己の HLA とそれに接着する抗原ペプチドを同時に認識する。T 細胞受容体は抗体と同様に多様性がある。

研究目的

原田病患者の末梢血で増えている CD4 陽性 T 細胞クローンを T 細胞受容体 β 鎖の相補性決定領域 3 (CDR3: 最も多様性に富む領域) のシーケンスから明らかにし (図 2)、典型的でない所見を呈する原田病の診断法として確立可能か検討する。この CD4 陽性 T 細胞クローンの認識する抗原ペプチドの同定をはかる。

対 象

当院ぶどう膜炎外来を受診し、インフォームドコンセントを得た原田病患者 17 例と対照とし原田病以外のぶどう膜炎患者 12 例を対象とした。原田病患者 17 例のうち 10 例は治療後の検討も行った。

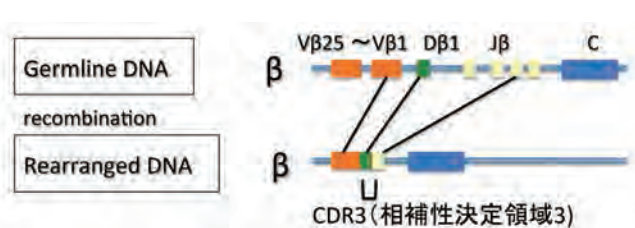


図 2 T 細胞受容体の遺伝子

T 細胞受容体は遺伝子再構成により多様性を生み出している。もっとも多様性のある部分が相補性決定領域 3 (CDR3) であり、V β と C 領域の配列でプライマーを作成し、この部分の配列を検討した。

*旭川医科大学 医工連携総研講座

方 法

cDNA の作成

末梢血 10cc を採取し（当院倫理委員会承認済み）、フィコール・コンレイ比重遠心法で単核球を分離した。一部を CD4 Microbeads® (MACS) で CD4 を発現する単核球として選別した。単核球全体と CD4 陽性単核球それぞれから RNA を抽出し、cDNA を作成した（NucleoSpin®RNAII: Macherey-Nagel、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit®: Roche を使用）。

CD4 陽性単核球の T 細胞受容体の V β 1 から V β 25 のプライマーで PCR したものを GeneScan で分析

T 細胞受容体 V β 1 から V β 25 でサブタイプを合わせて、31 種の PCR 用プライマーを作成した。Reverse プライマーはひとつ C 領域の配列から作成した。上記方法で作成した原田病患者 3 例の CD4 陽性単核球からの cDNA を試料として PCR を実施し、各々の PCR 産物を GeneScan にかけた。

原田病の患者末梢血で増加している CD4 陽性 T 細胞のクローンの検討

GeneScan の結果、共通クローンの疑わせるパターンがあった V β で CDR3 領域のシーケンスを検討した。FastStart High Fidelity PCR System® (Roche) を用いて、cDNA サンプルから V β と C 領域の PCR プライマーで増幅した。PCR 産物を 1.6% アガロースゲルに流し精製した後、TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen) を用いベクターに組み込み、Jet Competent Cell (BioDynaics Laboratory Inc.) に Transform した。LB プレート培地にまき培養後コロニーを拾い、クローニングされたベクターから FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack® (Roche) を用いてベクターに組み込んだ部分を PCR で増幅した。サンプルをファスマックシーケンスサービスに送付し、塩基配列を決定した。

原田病で共通に見られた CDR3 領域の配列からプライマーを作成し、定量 PCR

CDR3 領域の塩基配列を決定したところ、原田病で共通で見られた配列があり、これを参考に定量 PCR 用にプライマーを作成した。定量 PCR は LightCycler 480 Probes Master (Roche, 4707494) を用いて LightCycler® 480 リアルタイム PCR システム (Roche)

にて測定を行った

結 果

genescan

原田病患者 3 例の末梢血中の CD4 陽性細胞の mRNA から RT-PCR を行い、TCR の V β 1 から V β 25 のプライマーを用いて増幅したそれぞれのサンプルを geneScan にかけたところ、V β 11 と V β 21 で共通して増えているようにみられるピークがみられた。

CD4 陽性単核球の T 細胞受容体 β 鎖の CDR 3 のアミノ酸配列解析

V β のプライマーで増幅した CD4 陽性単核球の T 細胞受容体 β 鎖の塩基配列から CDR 3 のアミノ酸配列を決定した。原田病患者 17 例中 13 例の CDR 3 の配列で、共通なものが認められた。この配列は治療後 10 例と原田病以外のぶどう膜炎患者 12 例では認められなかった。

定量 PCR

原田病 13 例で共通で認められた CDR3 の配列からプライマーを作成した。原田病患者 17 例のうち 14 例の CD4 陽性単核球からの cDNA を用いて、定量 PCR で確認したところ、14 例中 8 例でこの配列が確認できた。原田病治療後 10 例と原田病以外のぶどう膜炎 5 例での定量 PCR ではこの配列は増幅されなかった。

考 察

自己抗体の検出は自己免疫疾患の診断に有用であるが、疾患特異的に増加する T 細胞クローンの同定による診断法はまだ確立されていない。近年、T 細胞受容体や B 細胞受容体の CDR3 の配列の検討は進められてきているが²⁾、疾患特異的と周知されるに至るものはない。今回、原田病患者の末梢血の CD4 陽性単核球を用いて、T 細胞受容体の CDR3 の配列から、患者で多く見られるクローンが見つかった。このクローンの CDR3 の配列で定量 PCR をおこなったところ、原田病患者で多く確認できた。現在、CDR3 の配列からの定量 PCR が診断に有用か、新規原田病患者で検討中である。今回、CDR3 の配列を解析したのは、GeneScan で原田病患者間での共通クローンの存在を疑われた V β のプライマーで増幅したもののみである。これ以外の V β を持ち、原田病患者の多くに見

られる共通のクローンが他にある可能性は残っており、今後、次世代シーケンス分析など新しい技術を使用して、解析を続ける必要があると考えられる。また、今回認められたクローンが原田病に特異的なものであるか、あるいは、新規発症の原田病の診断に利用できるかは今後まだ検討していかなければならない。

このクローンからの抗原ペプチド解析については、他の増加クローンがないか、新規発症患者でもクロー

ンの存在を確認してから、できるだけ新しい技術を応用して行う必要があると考えている。

文 献

- 1) 大野重昭, 他: 日眼雑誌 96:1558-1579, 1992.
- 2) Krell PF, Reuther S, Fischer U, et al. *Haematologica*. 2013;98(9):1388-1396.

依 頼 稿 (報告)

平成 25 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 毛細血管幹細胞 (Capillary Stem Cells) の再生医療応用 プロジェクト創生にむけた包括的研究活動

川 辺 淳 一*

はじめに

我々の講座 (心血管再生先端医療開発講座) と、本学の 4 つの基礎講座と 4 つの臨床講座に所属する脈管研究に携わる研究医と共に、講座の垣根を越えた共同・連携研究活動を行ってきた (旭川医科大学・脈管研究クラスター活動)。本活動は、本学の独創性のある生命科学研究グラントの支援をうけ、研究シーズの創生と外的研究資金獲得の上での研究プロジェクトを展開している。

脈管研究クラスター活動から、①独自に樹立したマウス毛細血管細胞株の中に多分化機能をもつ幹細胞 (毛細血管幹細胞) を見出した (特許申請中)。②本細胞株を用いた網羅的アレイ解析により、血管新生を制御する新規因子や、毛細血管幹細胞を同定するマーカーを同定することに成功してきた。毛細血管の形成や機能を調節する新規因子・細胞の同定は、循環器だけでなく様々な疾患病態解明に応用できる点が、大きな魅力である。平成 25 年度独創性のある生命科学研究 (プロジェクト型研究) で採用された課題目標は、これらの新規因子や幹細胞の臨床応用にむけたプロジェクトへの発展に向けての基盤づくりである。本稿では、これらの研究プロジェクトの概要と、これまでの研究成果と今後の展望について報告する。

本プロジェクトの概要

1. 高齢化社会で重要性の増している老化関連難治性

疾患と毛細血管研究

毛細血管は、体内の隅々に分布する生体最大の臓器であり、その存在は多細胞生物にとって各細胞が正常な機能を維持するために本質的なものといえる。毛細血管の機能異常や、脆弱化、消失などの形態異常は、癌や網膜症に加えて、動脈硬化や慢性心不全といった、老化に関連する多くの難治性慢性疾患の病態に深く関与することが明らかになってきた。また、慢性疾患を背景とする臓器障害の共通終末病態である線維化においても、毛細血管由来細胞が重要な役割をもつことが報告されている。したがって、毛細血管研究は、高齢化社会で直面している多くの老化関連の難治性疾患の治療開発の上で、非常に期待される新興研究分野である。

2. 毛細血管研究の問題点と毛細血管細胞株の樹立

これまでの血管新生に関する研究対象は、内皮細胞が中心であった。しかし、生体内における微小血管のほとんどが、内皮細胞によるチューブ構造に周細胞が覆う「毛細血管」として存在している。周細胞は血管の透過性や収縮性に重要な役割をもつ。また内皮細胞との相互作用は、血管機能だけでなく、血管の形態、すなわち毛細血管として維持するか、消失するのか、あるいは、さらに大きな血管に成熟するかを規定している。さらに、最近では周細胞の中に幹細胞様の細胞の存在が明らかになり、毛細血管は血液を循環させる「導管」だけでなく、組織再生やリモデリングにも直接関わる「再生システム」としての役割をも担う可能

*旭川医科大学 心血管再生・先端医療開発講座

性が示唆されている。

今後、血管周細胞、さらに内皮細胞との相互作用の解明が、臨床応用に繋がる血管新生研究において重要なターゲットとなってくる。しかし、内皮細胞に比べ、周細胞の調整が難しく、これが同研究の進展を大きく妨害している。我々は、微少な細胞から不死化を可能にする SV40 温度感受性 T 抗原発現マウスを用いて、独自の方法で調整した組織サンプル¹⁾ から、毛細血管由来細胞株を樹立することに成功した²⁾。本細胞を利用することにより、毛細血管形成に関わる新たな機序解明の糸口が見えてきた。

3. 毛細血管の維持・形成を制御するための新規因子および細胞の発見

毛細血管内皮細胞と周細胞との三次元ゲルにおける共培養下で、毛細血管様構造を再構成するシステムを開発した²⁾。本システムにおいて、異なる蛍光発光する内皮、周細胞を利用することにより、新生血管内皮と接触することによって周細胞あるいは内皮細胞ごとに変化する遺伝子を抽出することができる。抽出された候補遺伝子の中から、血管新生を調節する新規の分子 Nxxx を見いだすことに成功した（次項 2 参照）。

また、毛細血管周細胞株の中で間葉系幹細胞様の多分化能を示す細胞を見いだした。これまで、分化能を有する周細胞を特定するマーカーは発見されておらず、分化能を持たない他の周細胞と区別・分離することができなかった。我々は、多分化能の程度の異なる周細胞株を用いた網羅的遺伝子解析から、周細胞の多分化能と関連する遺伝子を抽出した。これらの候補因子は、多分化能周細胞の機能を司る可能性がある。現在、この候補因子の中から、多分化能周細胞に密接に関係する二つの因子を見いだすことに成功した。一つは、細胞表面に局在する分子 Exxx で、これに対する特異的抗体を用いることにより、「細胞マーカー」として正常組織から多分化能周細胞を同定、精製することに成功した（次項 1 参照）。もう一つは、同細胞の多分化能を制御する新規の因子 Sxxx である（次項 3 参照）。（知財保護の関係で、現時点で特定因子名を公表できない点をご了承ください）

研究成果と今後の展望

1. 毛細血管幹細胞（Capillary Stem Cells）の発見

独自の細胞マーカー Exxx に対する抗体を用いて、マウス皮下脂肪および骨格筋組織などの正常組織から多分化能をもつ新規の毛細血管幹細胞を同定、単離することに成功した。独自の標識マーカーで同定された毛細血管幹細胞は、自ら血管構成細胞（内皮および周細胞）となり成熟安定した血管網を構築し、さらに、間葉系中胚葉細胞にとどまらず神経系外胚葉細胞への分化能をもつユニークな特性を有している。さらに、生体組織内導入により毛細血管とともに組織実質細胞へ分化し、従来の組織幹細胞にない高い組織再生能を示した。そこで、本細胞は、新規の組織幹細胞として毛細血管幹細胞 (Capillary stem cells; CapSCs) と命名した（特許申請および論文投稿中）。

(1) ヒト CapSCs の分離および機能解析（心血管再生先端医療開発講座（川辺、竹原有史先生）、第一外科講座（齋藤幸裕、宮本和俊、東 信良先生）、解剖講座（平義樹、板東良雄先生））

すでに開発したマウス CapSCs 分離法を応用して、ヒト組織からの CapSCs 分離を試みた。宮本先生（小児外科）のご協力により、小児（一か月年齢）の皮下脂肪組織から Exxx 陽性周細胞を分離培養に成功している。同細胞の増殖性は高く sphere 形成能をもち、血管、脂肪や神経細胞への多分化能を保持していることを確認している。同細胞の画像解析および神経分化評価においては、平義樹および板東良雄先生（解剖学講座）の協力を得ておこなっている。

(2) CapSCs の下肢虚血改善効果（心血管再生先端医療開発講座（川辺）、第一外科講座（齋藤幸裕先生））

正常マウス皮下脂肪組織から分離した CapSCs(NG2+Exxx+ cells) を、ヌードマウス大腿動脈を全摘出した重症下肢虚血モデルの虚血組織へ導入することにより、対照周細胞(NG2+Exxx- cells)に比べて、高い虚血下肢還流改善効果を示すことを確認した（図 1 A）。

(3) CapSC s の骨格筋再生効果（心血管再生先端医療開発講座（川辺）、第一内科・神経内科（斉藤

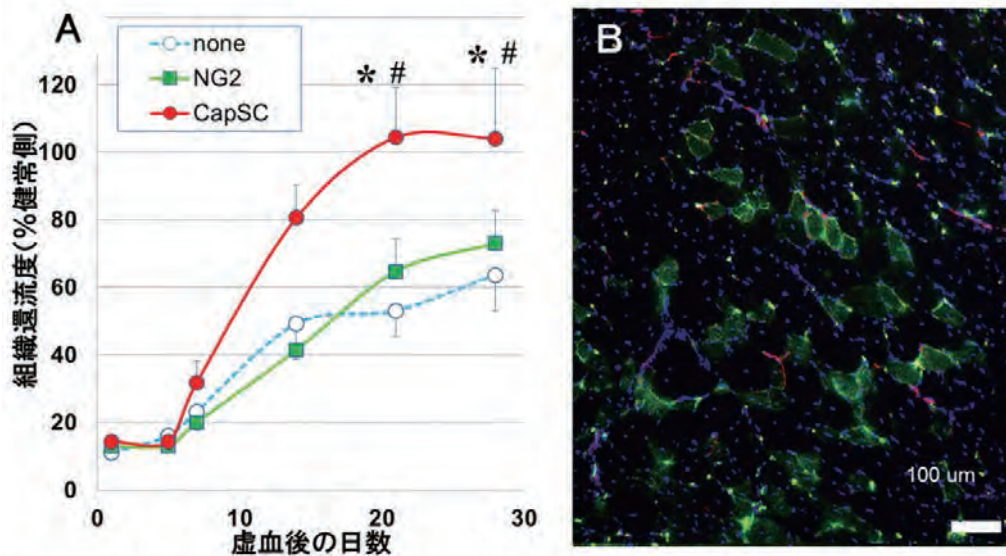


図1 マウスCapSCsの下肢虚血改善効果および骨格筋組織再生能

A マウス大腿動脈結紮モデルにおいて、虚血部位にCapSCおよび対照周細胞(NG2+細胞)を局所導入し、その後の組織還流をドップラー血流計で評価した。

B マウス腓腹筋をcardiotoxinで挫滅させた後、GFP発光CapSCを導入した。3週間後、循環血管をL-ectin-DsRed(赤)で染色した後、導入細胞(緑)の局在を観察した。

司先生))

免疫不全 SCID マウス腓腹筋を cardiotoxin により挫滅させた後、蛍光物質 GFP 発現するマウス皮下脂肪由来の CapSCs を導入し、骨格筋再生能を評価した。対照周細胞にくらべ、著明な骨格筋再生効果を確認することができた。GFP 陽性 CapSCs は、組織導入後も GFP 陽性として存在し、組織内局在を観察することができる。導入した CapSCs は、効率よく骨格筋繊維および血管に分化し、組織内に生着していることが確認できた(図 1 B)。CapSCs の高い骨格筋再生能を確認できたので、今後、デュシェンヌ型筋ジストロフィー動物 (mdx / nude マウス) を用いて、CapSCs 導入の治療効率を評価していきたい。

(4) CapSCs の異常網膜血管改善効果 (眼科講座 (横田陽匡、長岡 泰司先生))

広範な低灌流領域から病的な網膜血管新生が起きる酸素誘導網膜血管新生 (OIR) モデルを作成し、眼球への細胞導入法を確立した。OIR モデルマウスにおいて CapSCs 細胞を導入する事により病的な網膜血管新生を抑えて、さらに正常な毛細血管網の構築を促すことが観察された(図 2)。今後、さらに実験数をかさね、併せて、導入細胞の網膜内局在など観察していく。また、レーザーにより網膜色素上皮とブロッック膜を傷害

することにより脈絡膜血管新生を誘導するモデル (加齢黄斑変性症モデル) を用いて、CapSCs 導入の有効性を確認していきたい。

(5) CapSCs の末梢神経障害における効果 (解剖講座 (坂東良雄先生))

上記 (1) の結果、調整された primary CapSCs 細胞を用いて、本研究室で確立している脱髄多発性硬化症疾患マウスモデルにおいて、細胞導入療法の効果を評価する予定である。脱髄、神経変性および軸索変性の分子機序の全貌解明ならびに神経再生を目指す上で再髄鞘化における効果的な作用点を探り、本研究で得られた基礎研究成果を土台とした CapSCs を用いた炎症性中枢神経疾患の治療戦略を確立する。

2. 血管新生を制御する新規因子の同定

周細胞の中で、新生血管内皮との接触で上昇する遺伝子群の中から、血管新生に関与する新規因子 Nxxx を同定した。同因子は、血管内皮および周細胞に発現しており、細胞表面に局在し、接着因子として作用する。Nxxx の発現抑制 (knock-down) や過剰発現 (over-expression) 細胞を用いた実験系により、内皮細胞によるチューブ形成には影響しないものの、内皮・周細胞間の接着に作用し、安定した毛細血管形成に重要な役

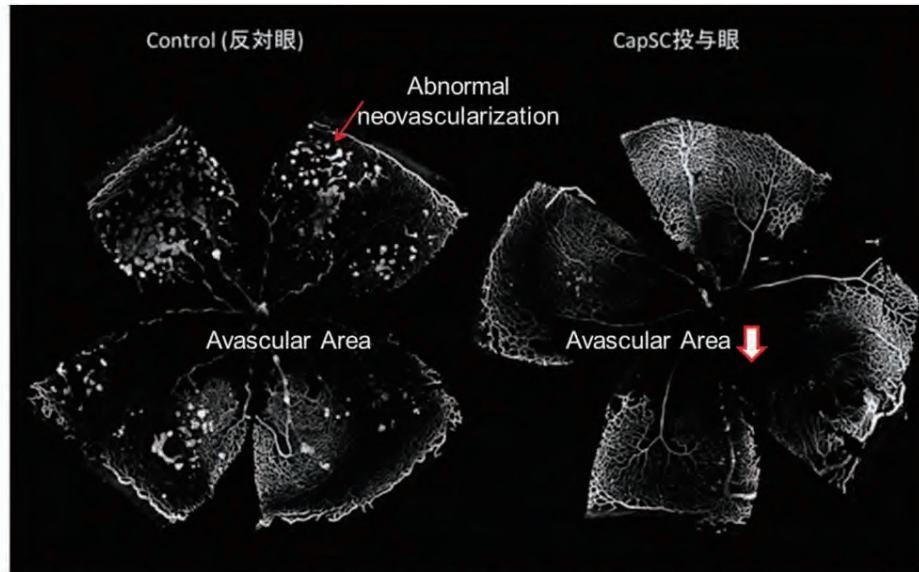


図2 酸素誘発網膜血管新生(未熟児網膜症モデル)におけるCapSCsの効果
 新生仔マウスを高酸素(75%)に曝露すると、いったん形成された網膜血管網が退縮し、引き続きマウスを大気中に戻すことにより相対的に低酸素に陥った網膜において血管網が再生すると同時に、一部の新生血管が網膜外に逸脱する。大気中戻す際に、硝子体側からCapSCsを導入した後、異常血管形成抑制および無血管領域の改善が観察された。(対照は、同一マウスにおいて体側眼球へvehicle導入)

割をもつことを確認している(論文投稿中)。

内皮細胞を標的とした血管新生に作用する薬剤は多く開発されている。今回の知見から、新生血管維持に関わる内皮・周細胞相互作用を制御する新しいタイプの血管新生の調節薬剤の開発が期待される。今後、様々な疾患モデルでのNxxxの役割解明にむけて、周細胞特異的にNxxx遺伝子を必要時にノックアウト誘導できるマウスを作成中である。現在、本研究シーズを基に、心血管再生先端医療開発講座、血管外科講座および眼科講座から、それぞれ独自の研究プロジェクトが誕生し、平成26年度以降の外的資金獲得の動きに繋がっている。

3. CapSCs 幹細胞能を制御する新規因子の発見

多分化能を持たない周細胞との比較で、CapSCsに特異的に強く(あるいは低く)発現している因子を、網羅的アレイ解析で抽出し、さらに一連の細胞機能スクリーニングの結果、CapSCs分化能に影響する因子Sxxxの同定に成功した。Sxxxは、多分化能が高い細胞ほど発現量が低く、CapSCsにおいて、Sxxxの発現を抑制すると、その分化能が、さらに亢進することを確認している。現在、本因子がCapSCsに特異的なものか、低分化能周細胞でのSxxx機能低下で多分化

能を獲得するのか詳細に検討している。

組織の再生・リモデリングに深く関与することが考えられているCapSCsの機能を制御する因子の発見は、CapSCsそのものを利用する臨床応用プロジェクト(上記2項参照)とは別に、生体内のCapSCsを標的とする薬剤の開発に結びつく。本研究シーズも複数の研究グループと連携しながら、魅力ある研究プロジェクトに育てていきたい。

最後に

本年度は、マウスおよびヒト組織からprimary CapSCsの分離法の確立と特性解析実験を進め、本学の知財構築および関連論文の発表に繋げることができた。次年度以降、ひきつづき各種疾患病態モデルにおける役割を評価し、CapSCsを用いた臨床応用の可能性を多角的かつ効率的に検討し、Proof of Concept構築させていく予定である。

「CapSCs細胞導入療法」とは別に、「毛細血管形成やCapSCsの制御因子の発見」は、組織再生やリモデリングに関与する老化関連慢性疾患や慢性炎症性疾患など様々な疾患病態の解明や治療薬開発の糸口になることが期待できる。今後も、脈管研究に限らず、臓器や講座間の垣根を超えた連携研究活動を展開してい

たい。本稿を読まれ、興味を持たれる研究者がおりましたら、ぜひ研究参画を願っている。

本研究クラスター活動の代表研究者と共に、本研究を精力的に進めている大学院生（下内昭人、鹿原真樹、松木孝樹、青沼達也）、研究医スタッフ（暮地元宙己、蓑島暁帆、島村浩平、西村正人）、医学部学生（北川拓、吉村昭人）、そして研究を補助していただいている機器センターの篠河栄利子、各講座の研究助手（松本千恵美、高橋宗乃子、官野香、小田麻美、堀川陽子）のみなさんに深く感謝いたします。また、本研究活動は、旭川医科大学の「独創性のある生命科学研究グラント」支援のもと、現在のような研究シーズの創生と他大学も含め複数講座との研究連携活動につながっております。文末になりましたが、吉田晃敏学長はじめ、研究支援していただいている本学の諸関係者の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Asanome A, Kawabe J, Matsuki M, Kabara M, Hira Y, Bochimoto H, Yamauchi A, Aonuma T, Takehara N, Watanabe T, Hasebe N. Nerve growth factor stimulates regeneration of perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery. *BiochemBiophys Res Commun*. 2014, 443; 150-5.
- 2) Kabara M, Kawabe J, Matsuki M, Hira Y, Minoshima A, Shimamura K, Yamauchi A, Aonuma T, Nishimura M, Saito Y, Takehara N, Hasebe N. Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. – A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration -. *Lab Invest*. 2014, 94 ; 1340-50.

依頼稿 (報告)

平成 25 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 長鎖ポリリン酸の精密鎖長解析技術の開発と 腸炎改善作用の解析

藤 谷 幹 浩*

【研究の背景と目的】

哺乳動物の腸管には 800 種類以上の細菌が共生し腸管の恒常性維持に必須の役割を担っており、これら腸内細菌叢の異常は、潰瘍性大腸炎やクローン病を含む炎症性腸疾患の発症や重症化と深く関係している¹⁾。細菌の中でも乳酸菌やビフィズス菌、バシラス菌などの宿主に有益なものはプロバイオティクスと呼ばれ、腸管炎症による腸管障害を改善することが知られている。我々は、これらの菌から分泌される生理活性物質を同定する技術確立²⁾、乳酸菌由来の腸管保護活性物質が長鎖ポリリン酸であることを世界で初めて明らかにした (特許第 5190849 号)。さらに、この長鎖ポリリン酸には、腸管バリア機能を増強し、炎症性腸疾患モデルにおける腸管障害や過剰な腸管の線維化を著明に改善する作用があることを証明した^{3,4)} (特許第 5526320 号) (特願 2010-089469、PCT/JP2011/057689)。

これらの研究により、乳酸菌由来の長鎖ポリリン酸を用いた新規炎症性腸疾患治療薬開発への基盤的成果が得られた。この研究成果は、炎症性腸疾患に対する新規治療薬開発プロジェクトとして文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラム シーズ B に採択された。現在、3 年以内の非臨床 POC の獲得および平成 27 年度内の臨床試験開始を目標としてプロジェクトが進行中である。一方、その後の研究により、長鎖ポリリン酸の中でも、平均鎖長 100 以上のもののみが

十分な薬理作用 (腸管障害改善効果) を発揮することを明らかにした。したがって、この長鎖ポリリン酸を GMP 基準に準じた新規薬剤として臨床応用するにあたり、一定の鎖長の範囲に限定した長鎖ポリリン酸を、再現性を持って製造することが必須である。そこで本研究では、ポリリン酸の合成方法や鎖長解析技術確立し、各鎖長のポリリン酸の腸管障害改善作用について明らかにすることを目的とする。

【方法】

1. 長鎖ポリリン酸の精製

ポリリン酸の合成方法として菌体成分から精製する方法と酵素伸長反応により化学的に合成する方法がある。この両者について、純度、合成ポリリン酸の鎖長を比較検討した。

2. ポリリン酸の鎖長解析技術の確立

1. で合成した長鎖ポリリン酸および各鎖長のポリリン酸 (Bioenex, JP) の鎖長解析を行った。解析方法として、電気泳動法および HPLC を用い、その精度や再現性について検討した。

3. 長鎖ポリリン酸の腸管障害改善作用の解析

1. で合成した長鎖ポリリン酸および各鎖長のポリリン酸を用いて腸管障害改善作用を検討した。
①マウス摘出腸管を用いた ex vivo のマンニトール漏出試験 (腸管バリア機能試験)
マウスの小腸を摘出し、腸管内にポリリン酸を投与して両端を結紮し、37℃、2 時間、RPMI 中でインキ

*旭川医科大学 消化器・血液腫瘍制御内科学

ュベートした。その後、腸管内のポリリン酸を洗浄して、モノクロラミン (NH_2Cl) および ^3H 標識マンニトールを腸管内に注入し、同様に RPMI 中でインキュベートした。経時的に腸管外 (培養上清中) に漏出する ^3H 標識マンニトールを測定した。

②マウス DSS 腸炎モデルによる肉眼的、組織学的な変化

6 週齢の C57Bl/6 マウスに DSS 溶液 (3%) を 5 日間自由飲水させ、その後 20 日間通常の水を飲水させることで DSS 慢性腸炎モデルを作成した⁵⁾。このモデルでは、19 日目以降に線維化が完成されることが示されている⁶⁾。実験開始後 25 日目より 10 日間連日 $100 \mu\text{g/ml}$ のポリリン酸溶液 $100 \mu\text{l}$ または $100 \mu\text{l}$ のリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) を経肛門的に注腸投与し、35 日目で蛋白と RNA を回収した。蛋白発現の解析には western blotting を、RNA の解析には RT-PCR を用いた。また、切除した大腸切片をホルマリン固定し、ヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin; HE) 染色と蛍光免疫染色を行った。

【結果】

1. 長鎖ポリリン酸の精製

菌体成分からポリリン酸を精製する方法 (図 1) および酵素伸長反応により化学的に合成する方法 (図 2) を確立し、両者について比較検討した。その結果、菌体成分からの抽出方法ではポリリン酸の純度が低く、臨床応用は困難であることが明らかになった。一方、酵素伸長反応による合成方法では高純度で長鎖のポリリン酸が合成できることを突き止めた。さらに、独自

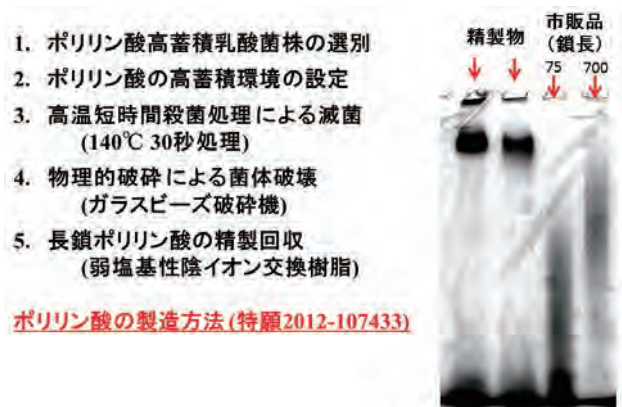


図 1 菌体成分からの長鎖ポリリン酸の精製方法

のポリリン酸合成酵素の精製方法を確立し、その後のポリリン酸の合成に用いた。

2. ポリリン酸の鎖長解析技術の確立

ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法によるポリリン酸の鎖長解析結果を示す (図 3)。鎖長の差によって、明らかにことなったバンドを認める。また、合成したポリリン酸の鎖長は幅広く分布している可能性が示された。

分子量カラムを用いた HPLC による鎖長解析を行った (HPLC の解析条件については後日公表する予定である)。HPLC では、波形やリテンションタイムによりポリリン酸の平均鎖長や分布を定量的に解析できることが明らかになった。本研究で開発した方法を用

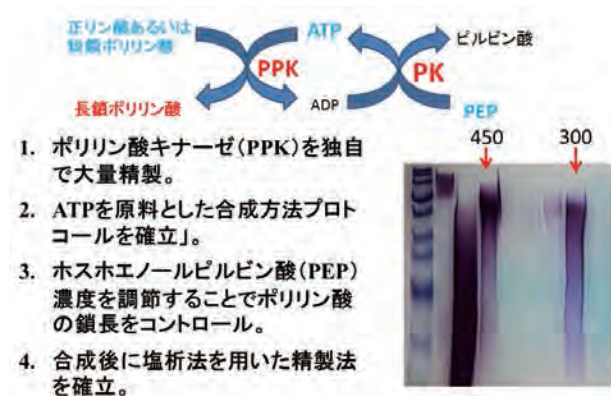


図 2 酵素伸長反応による長鎖ポリリン酸の製造方法

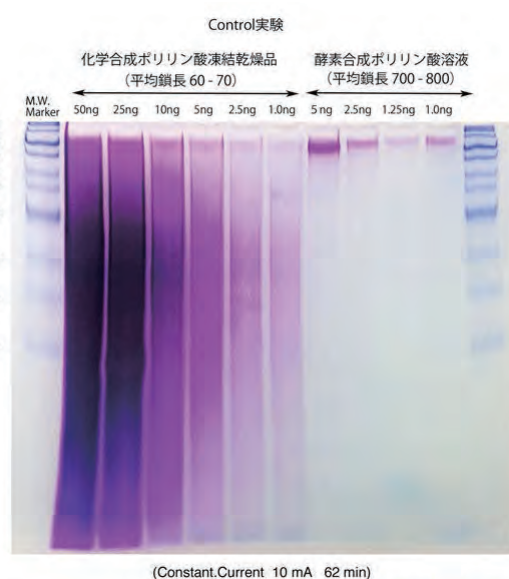


図 3 ポリアクリルアミドゲルを用いたポリリン酸の電気泳動

いて合成した6ロットの長鎖ポリリン酸を解析した結果、全ロットのUVスペクトル、HPLCの波形およびリテンションタイム、はほぼ同じであった。よって、本研究で開発した合成方法を用いると、非常に高い再現性をもって長鎖ポリリン酸が合成できるものと考えられた。

3. 長鎖ポリリン酸の腸管障害改善作用の解析

長鎖ポリリン酸の腸管バリア機能に対する作用について、*ex vivo*のマニトール漏出試験を用いて検討した(図4)。4ロットの長鎖ポリリン酸およびPBSにて前処理した腸管をNH₂Clによって酸化ストレス下に置き、経時的に腸管外漏出マニトール量を測定した。その結果、コントロールと比較して、全てのロットの長鎖ポリリン酸において、漏出マニトールの量が有意に減少していた。したがって、長鎖ポリリン酸は腸管バリア機能を増強する作用を持つことが明らかになった。

DSS慢性腸炎モデルに対して長鎖ポリリン酸を投与した結果、腸管の短縮は軽減され、組織学的な炎症所見は改善し、線維化の程度やコラーゲンの発現も減少した。コントロール群で増加していた炎症性サイトカインTNF α 、IL-1 β 、IFN γ の発現は、長鎖ポリリン酸の投与によって減少した。同様に線維化関連メディエーターであるTGF β やCTGFも長鎖ポリリン酸によって減少した。

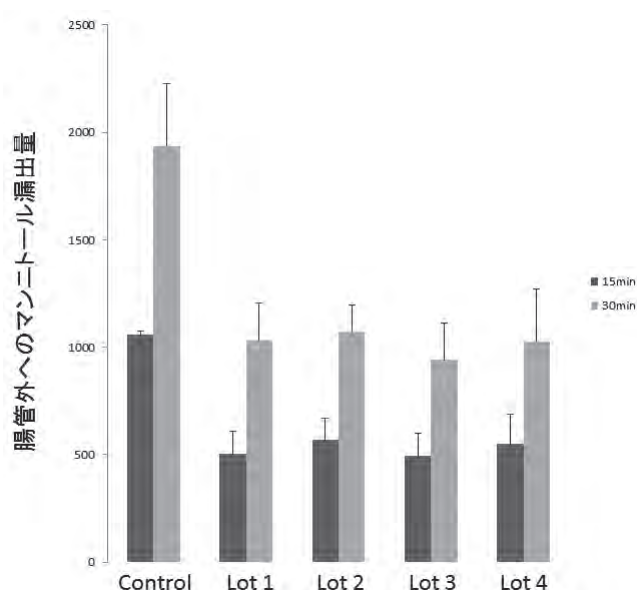


図4 長鎖ポリリン酸のUVスペクトル(本研究で合成した6ロットの検討)

【考察】

本研究によって、長鎖ポリリン酸の安定した合成方法が確立し、HPLCによる評価にて合成物の再現性が証明された。また、これら長鎖ポリリン酸は腸管バリア機能の改善作用、慢性腸炎に対する抗炎症作用、線維化改善作用などの薬効を持つことが明らかになった。以上から、長鎖ポリリン酸を用いた新規炎症性腸疾患治療薬の開発プロジェクトにおける、GMP準拠の原薬製造や評価方法に関する基盤的な研究成果が得られた。

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患は、原因不明の難治性疾患であり、根治治療は確立されていない。炎症の活動期には、炎症性サイトカインであるTNF α 、IL-1 β 、IFN γ の増加が認められ、炎症の程度と一定の相関があることが知られており、これらのサイトカインは本疾患の治療標的と考えられている⁷⁾。本研究に用いたマウス慢性腸炎モデルでは、炎症性腸疾患患者と同様にこれらのサイトカインが過剰発現しており、長鎖ポリリン酸によってこれらの発現が強く抑制されることが証明できた。同様に炎症性腸疾患患者で増加している線維化関連メディエーターについても抑制されることから、長鎖ポリリン酸は炎症性腸疾患における抗炎症、抗線維化薬として臨床応用が可能であると考えられる。

長鎖ポリリン酸を臨床応用するにあたって、薬剤としての安定性や安全性、体内動態について明らかにする必要がある。本研究と並行して、人工胃液や腸液、高温環境に対する長鎖ポリリン酸の安定性、催腫瘍作用の有無の検証、³²P標識ポリリン酸を用いた長鎖ポリリン酸の体内動態の検討を行っており、信頼性基準での前臨床試験に向けた準備を行っている。また、GMP準拠を原則とした、ポリリン酸製造ラインの確保や製剤化、出荷と保存の体制を整備中である。今後、医薬品医療機器総合機構(PMDA)との薬事相談および臨床試験計画の承認へ向けて、本研究成果を発展させて行きたい。

【文献】

- 1) Devkota S, Wang Y, Musch MW, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice. Nature 2012;487:104-8.

- 2) Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, et al. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 2007;1:299-308.
- 3) Ueno N, Fujiya M, Segawa S, et al. Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:2235-50.
- 4) Segawa S, Fujiya M, Konishi H, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One* 2011;6:e23278.
- 5) Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1328-38.
- 6) Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, et al. Irsogladine maleate ameliorates inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. *Med Mol Morphol* 2012;45:140-51.
- 7) Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014;14:329-42.

依 頼 稿 (報告)

2013 年度 JICA「アフリカ地域 地域保健担当官のための保健行政」コース

伊 藤 俊 弘* 吉 田 貴 彦** 藤 井 智 子* 北 村 久美子***

I. はじめに

本研修コース「アフリカ地域 地域保健担当官のための保健行政」は、2008 年度（平成 20 年度）から独立行政法人国際協力機構（JICA）の JICA 北海道（札幌）が本学に委託し、看護学科と健康科学講座教員がコースリーダーを務めて実施してきた地域別研修事業である。昨年度（2013 年度）2 期 6 年間の研修を終え、13 ヶ国 66 名の研修生が本学での研修を修めた。研修後に行われた参加各国の評価において本研修コースは非常に高い評価が得られ、研修コースの継続が強く求められたため今年度から 3 年間の研修継続が決定した。本稿は、はじめに本研修コースで行われた 2 期 6 年間の研修内容と研修後に行われた研修員の単元目標に対する達成度から本研修の特徴や課題を明らかにし、次いで本年度実施された研修成果を報告する。

JICA は、政府が開発途上国に対して行っている経済協力の一つである政府開発援助（ODA）の実施機関である。ODA の事業は二国間協力と多国間協力に大別され、二国間協力はさらに「無償資金協力」、「有償資金協力」および「技術協力」等に分けられる。JICA はこれら二国間協力事業のほとんどを担当しているが、本研修は「技術協力」事業の集団研修による研修員受入れ事業として行われてきた。

本研修コースの 6 年間の経緯について概観する。はじめに本研修が開始されるまでの経緯を要約すると、本学では本研修とは別に 2003 年度から JICA 委託研修「母子保健人財育成」コースが行われていた。2007 年 7 月に JICA 札幌から看護学科の北村久美子教授に

西アフリカ地域との二国間協力の受入れ要請がなされた。北村教授は「地域別各研修（西アフリカ地域）新設案件提案書」を提出してこの要請に応じた。これが第 3 者評価委員会で正式に認められ、2008 年度から 3 年間の研修を受入れが決定した。

本研修の対象者（参加資格要件）は、アフリカ地域の英語圏諸国で公衆衛生分野の知識を持ち地域保健行政分野の実務経験を有し地域保健管理の実務を担当する地域行政官かそれに準ずる者、または地域保健管理計画の立案に係る行政官かそれに準ずる者である。各国からの応募に対し JICA 札幌と本学研修コーディネーターによる人選を経て受入れ者が決定される。

本研修の各年度における受入れ国および受入れ人数を表 1 に示す。初年度（2008 年度）の研修員受入れは西アフリカ地域の英語圏諸国を対象とし、ガーナ 3 名、ナイジェリア 2 名、リベリア 2 名およびシエラレオネ 1 名の 4 か国 8 名を受入れた。2 年目以降は、他のアフリカ地域からの強い要望により受入れ対象が全アフリカ地域の英語圏諸国に拡大し、研修員の受入れ国・人数とも増加していった。各研修期間における受入れ国は、第 1 期が 2 年目からシエラレオネを除く西アフリカ地域の国々に加えて東アフリカ地域 4 か国（ウガンダ、エチオピア、ケニア、タンザニア）と南アフリカ地域から南アフリカ共和国を受入れた。その結果、第 1 期における総受入れ人数は西アフリカ地域 18 名、東アフリカ地域 9 名、南アフリカ地域 1 名となった。

2011 年度に開始した第 2 期は、西アフリカ地域からの受入れがガーナ（7 名）1 国のみだったのに対し、

*旭川医科大学 看護学講座 **健康科学講座 ***名誉教授

表1 各年度における研修員の受け入れ国および人数

研修期間 年度	第1期			第2期			第3期	計
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
北アフリカ								
スーダン							2	2
モロッコ					1	1		2
西アフリカ								
ガーナ	3	2	2	3	2	2	3	17
シエラレオネ	1						1	2
ナイジェリア	2	2	1					5
リベリア	2	1	2					5
東アフリカ								
ウガンダ			1					1
エチオピア		1	2	2	2	2		9
エリトリア							1	1
ケニア		2	1		1	1	2	7
タンザニア		1	1	3	2	2	2	11
マラウイ				1	3	2	1	7
南アフリカ								
アンゴラ							1	1
ジンバブエ				3	1	1		5
レソト					1	2		3
南アフリカ			1					1
受入れ人数	8	9	11	12	13	13	13	79
受入れ国数	4	6	8	5	8	8	8	16

東アフリカ地域から4か国（エチオピア6名、ケニア2名、タンザニア7名、マラウイ6名）、南アフリカ地域から2か国（ジンバブエ5名、レソト3名）、さらに北アフリカ地域から1か国（モロッコ2名）を受入れた。その結果、第2期の総受入れ人数は西アフリカ地域7名、東アフリカ地域21名、南アフリカ地域8名、北アフリカ地域2名となり、東アフリカと南アフリカ地域からの受入れ人数が拡大した。

本研修プログラムは、講義・演習・視察から構成される。本研修の目的（到達目標）はこれらを通して、日本の保健行政に関する基本的理念や歴史、制度、現状を理解し、自国や所属地域の地方保健行政にかかる現状分析と改善に必要な知識と技術を修得して自国の地域保健計画の策定に必要な課題の設定、解決方法や評価を行ない、地域における基礎的保健医療サービスの改善に繋げることを目指すことである。また、本研修には以下に示した5つの単元目標が設定されており、各プログラムはこれらの単元目標に沿って進められる。

1) 日本の保健・医療・福祉政策の内容と関連行政の体制と役割を理解し参考とすることによって、自国における効果的な保健医療政策を考える素地を形成する。

2) 地域保健計画の策定に必要とされる知識と技術を修得する。

3) 北海道における地域保健医療に関する課題解決の取組みの歴史と現状について事例から学び、自国で実施可能な解決策の策定に反映することができる。

4) 研修員の担当地域における住民の健康に関する諸状況を把握し解析することで、解決すべき健康課題を抽出できる。

5) 自国の現在の地域保健活動における問題点を踏まえ、課題を解決するための地域保健計画（アクションプラン）を作成するとともに、帰国後に関係する保健医療者や地域住民に対する効果的なプレゼンテーションを含めた啓発方法について実践することができる。

研修プログラムは、研修員の意見やニーズがプログラムに反映されるため毎年のように新規の科目が追加されてきた。各年度のプログラム項目及び科目時間を図1に示す。研修開始年度（2008年度）は、「我が国における感染症対策と地域保健行政のしくみ、および保健行政官の機能と役割」を理解し、これらを研修員のアクションプログラム作成に活かすことを目指してプログラムが作成された。主な講義内容と履修時間は、感染症29.5時間（感染症一般10時間、結核対策15.5時間、予防接種1時間、ハンセン病3時間）、衛生行政9時間、地域保健活動16.5時間、疫学・保健統計7.5時間、保健福祉11時間、母子保健4.5時間、環境

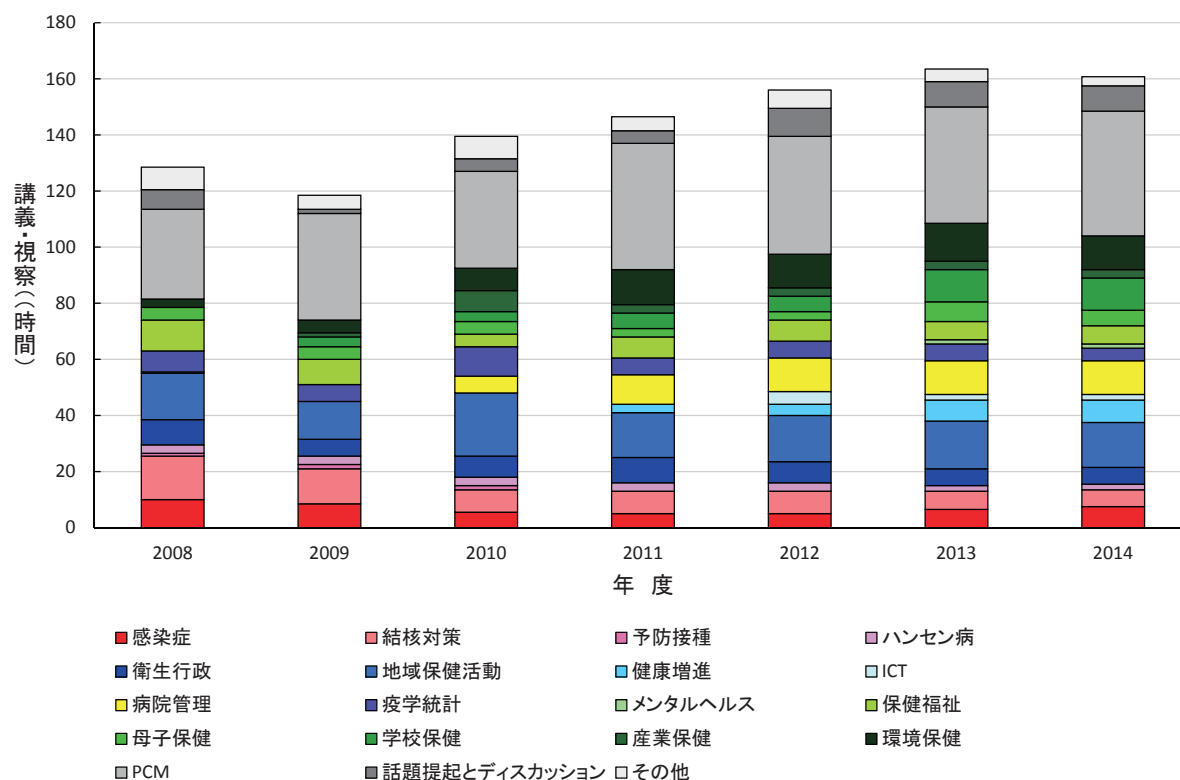


図1 各年度における研修プログラムの内容と時間

研修プログラムは、以下のとおり項目ごとにまとめて表示している。赤系：感染症対策、青系：衛生行政・地域保健・健康増進等、黄色：病院管理、緑色系：各種保健対策、白黒系：PCM およびアクションプラン・ディスカッションなど。

保健3時間、PCM (Project Cycle Management) およびPCMを用いたアクションプランの作成32時間、施設見学等が8.5時間である。地域保健活動に関するプログラムは、北海道庁と上川支庁のほか、鷹栖町、西興部村、紋別市の保健福祉行政や保健所等を視察し、講義・見学を行った。2009年度は、プログラムに学校保健の講義と市内にある公立中学校の視察が追加され、2010年度にはプログラムの大幅な変更が行われた。この理由はアフリカ諸国では国民に対する保健サービスの提供体制が専門化・細分化されている我国とは異なり、保健分野のほぼ全ての領域にわたって地域保健体制が一元的に対応している。そのためアフリカの地域保健担当官は地域保健行政全体にわたり必要な知識を総合的に把握する必要があると各国の研修員から強い要望が示されたことによる。研修プログラムに産業保健領域と環境保健領域の現場訪問・視察が追加され、さらに病院管理および医療科学領域の講義と病院視察も追加された。また、研修員には交代で毎日の研修内容を「日報」"Daily report"としてコースリー

ダーにメールでの提出を課すことと、研修員たちが研修内容から選択されたトピックスについてディスカッションを行い、各国の状況を情報交換する「問題提起とディスカッション」"Topic raising & discussion"の時間も取り入れた。これらの追加により前年度まで5週間で行われていた研修プログラムの時間が不足したため、2010年度から研修期間が6週間に延長された。

研修第2期の開始年度である2011年度は、感染症以外の問題として肥満等による生活習慣病 (Non-communicable Disease, NCD) がアフリカ諸国で広く蔓延している現実から健康増進対策に関する講義に加えてICT (Information and Communication Technology、情報通信技術) を活用した運動指導等の視察が追加された。そして2013年度にはメンタルヘルスが追加されたことで、地域保健行政に必要な内容がほぼ盛り込まれた。

本研修開始時における研修プログラムの主要目的である「感染症」と「地域保健行政」の項目についてみると、初年度は講義と視察が約55時間行われ、プロ

グラム全体に占める割合も 42.8% を占めていたが、講義や現場視察で重複していた内容の科目を減らすなどして調整を行ってきた結果、これらの時間と割合は、2013 年度にはそれぞれ 38 時間、23.3% まで減少した。

JICA では研修終了後、各研修員による評価を行なっている。研修員は单元ごとに 1 ～ 4 点の 4 段階で研修の達成度を評価する。各年度における单元目標の達成度を表 2 に示す。各单元目標とこれらを合わせた達成度を得点の平均値で評価すると、すべての单元を平均した総合的な達成度はいずれの年度も 3 点以上であり、研修員の達成感が満足できる内容だったことが示されてきた。各单元の達成度については、单元 1 から单元 4 はいずれの年度もすべての研修員が 3 点以上の評価だった（2008 年度は、1 名の研修員が途中で帰国したために单元 4 と单元 5 が無回答になっている）。一方、单元 5 は 2011 年度までは全員が 3 点以上を選択したのに対し、2012 年度から無回答を選択する者がみられるようになった（2012 年度は 13 名中 1 名、2013 年度は 13 名中 7 名が無回答）。2013 年度の評価集計表によると、他の質問項目（質問 2：各单元目標は案件目標を達成する上で重要であると考えるか、質問 4：講義は明確に理解できるような良い質の講義だったか、質問 5：講義テキストや研修材料は満足するものであったか）についても質問 1 の「各单元目標の達成度」と同様に单元 5 のみ 7 名が無回答であり、单元 5 を適切に評価することに強い迷いが生じていることがうかがえた。单元目標の達成が難しい理由としては、「日本の経験が自国の状況と相違している」ことや「必要とする予算の確保が容易でない」ことを選択する者が多かったことに加えて、質問 3 の自由記載欄に「单元 5 を達成するための研修時間が不十分であった」などが記載されていたことから、一部の研修員、特に医学的知識が乏しい研修員には研修プログラム全体に対する負担が大きかったのかもしれない。

Ⅱ. 2014 年度の研修について

1. 研修タイトルの変更

2014 年度は第 3 期目の研修開始年であるが、昨年度までは” Health Administration for Regional Health Officer for African Countries” のタイトルで受入れ国に対し募集を行っていた。しかし、このタイトルにある Regional Health Officer は、本研修の目的にある「ア

表 2 各年度における研修員の評価
(各单元目標の達成度)

2008 年度						
	← ←	達 成	未達成	→ →		
得 点	4	3	2	1	無回答	平均点
单元 1	4	4	0	0	0	3.50
单元 2	6	2	0	0	0	3.75
单元 3	5	3	0	0	0	3.63
单元 4	5	2	0	0	0 (1)	3.71
单元 5	5	2	0	0	0 (1)	3.71
全单元の平均						3.66
2009 年度						
	← ←	達 成	未達成	→ →		
得 点	4	3	2	1	無回答	平均点
单元 1	10	1	0	0	0	3.91
单元 2	6	5	0	0	0	3.55
单元 3	10	1	0	0	0	3.91
单元 4	10	1	0	0	0	3.91
单元 5	10	1	0	0	0	3.91
全单元の平均						3.84
2010 年度						
	← ←	達 成	未達成	→ →		
得 点	4	3	2	1	無回答	平均点
单元 1	7	2	0	0	0	3.78
单元 2	6	3	0	0	0	3.67
单元 3	6	3	0	0	0	3.67
单元 4	6	3	0	0	0	3.67
单元 5	5	4	0	0	0	3.56
全单元の平均						3.67
2011 年度						
	← ←	達 成	未達成	→ →		
得 点	4	3	2	1	無回答	平均点
单元 1	6	6	0	0	0	3.50
单元 2	7	5	0	0	0	3.58
单元 3	5	7	0	0	0	3.42
单元 4	7	5	0	0	0	3.58
单元 5	8	4	0	0	0	3.67
全单元の平均						3.55
2012 年度						
	← ←	達 成	未達成	→ →		
得 点	4	3	2	1	無回答	平均点
单元 1	12	1	0	0	0	3.92
单元 2	8	5	0	0	0	3.62
单元 3	10	3	0	0	0	3.77
单元 4	9	4	0	0	0	3.69
单元 5	9	3	0	0	1	3.46
全单元の平均						3.69
2013 年度						
	← ←	達 成	未達成	→ →		
得 点	4	3	2	1	無回答	平均点
单元 1	10	3	0	0	0	3.77
单元 2	9	4	0	0	0	3.69
单元 3	11	2	0	0	0	3.85
单元 4	10	3	0	0	0	3.77
单元 5	3	3	0	0	7	1.62
全单元の平均						3.34
2014 年度						
	← ←	達 成	未達成	→ →		
得 点	4	3	2	1	無回答	平均点
单元 1	11	2	0	0	0	3.85
单元 2	11	2	0	0	0	3.85
单元 3	9	4	0	0	0	3.69
单元 4	11	2	0	0	0	3.85
单元 5	8	4	0	0	1	3.38
全单元の平均						3.72

フリカ諸国に対する保健医療分野の人材、特に地方在住の住民への保健サービス提供の最前線に立つ地域保健業務に携わる担当官」よりも病院などに勤務する人事管理担当者などの事務職員に近いことが本研修に携わる JICA 専門職員の指摘で明らかになった。そのため 2014 年度は、研修員募集のタイトルを ” Health System Management for Regional and District Health Management Officers for African Countries ” と改めて募集を行なった。

2. 研修対象者と研修期間

1) 研修員の参加国および人数

2014 年度の研修員は、エリトリア（男性 1 名）、ガーナ（男性 2 名、女性 1 名）、ケニア（男性 1 名、女性 1 名）、マラウイ（女性 1 名）、シエラレオネ（男性 1 名）、スーダン（男性 1 名、女性 1 名）、タンザニア（男性 1 名、女性 1 名）、アンゴラ（男性 1 名）からの計 13 名で、このうち女性は 4 名である。医療職者は医師 6 名、看護師 1 名、検査技師 1 名、薬剤師 2 名で、他 3 名は保健行政サービス担当者であった。

2) 研修期間・研修目標

本年度の研修は、2014 年 6 月 24 日から 8 月 8 日（技術研修期間：6 月 30 日から 8 月 8 日）まで実質 6 週間にわたり実施された。本研修の研修項目および目標（到達目標・単元目標）は前年度までと同様である。

3. 研修内容

研修プログラムは、2013 年度とはほぼ同様の内容であるが、日本の社会福祉・介護保険制度と 1 型糖尿病に関する講義が新規に追加された（表 3）。研修カリキュラムは、旭川医科大学の施設で行う講義・演習と道内各地での現地視察や見学による実地研修を行うことで研修員の理解促進に役立てる内容になっている。2012 年度から講義への理解をより深めるために研修員に交代で 1 日毎の研修内容と考察を日報（Daily Report）として提出を義務付け、さらに研修内容から 6 つのトピックスを取り上げ、各国の状況について情報交換と総合討論を行う話題提起とディスカッション（Topic raising & discussion）を本年度も行った。

本研修コースの特徴は、第一に研修の初期に講義時間を配置して日本の衛生行政体系や保健対策等に関する知識について理解を促すように努めていることである。前述のごとくアフリカ諸国では衛生行政の組織体系が日本とはかなり異なっていて、疾病予防、保

健、医療、福祉、学校保健、産業保健、環境衛生等のサービス提供体制が分化しておらず、地域保健行政がこれらのサービス全てを一元的に行っている。そのため、最初に各研修員が自国の地域保健行政体系との違いを十分に把握することが研修全体の理解に不可欠である。第二に、衛生行政と感染症対策の講義に続いて行われる各研修項目（感染症対策、母子保健、小児保健、学校保健、生活習慣病予防・健康増進対策、産業保健、環境保健、病院管理）に対して、講義の後に実際の現場視察を行い研修員の理解を深めるように配慮している。本研修で行った現場視察は、地方における衛生行政については北海道庁保健福祉部および上川保健所の訪問と、枝幸町、紋別市および美瑛町の各保健センターの見学を通して地域保健における住民サービスの現場を理解した。旭川医療センターでは結核病棟を訪問して患者のケアから感染症対策の実際を学び、母子保健は紋別市保健センターで子育て支援センターの見学から母子保健サービスの現場を理解するとともに旭川大学で離乳食の試食を体験して小児期における栄養補給の意義を学んだ。旭川市内の小・中学校訪問では現場の養護教員から学校保健活動の実際を学ぶとともに遠軽町の障害児自立支援施設である北海道家庭学校を訪問して児童福祉の取組みについても学んだ。また、紋別市にある地域の看護師養成機関である道立紋別高等看護学院を訪問し、看護実習現場を見学するとともに地方における看護師の需要の高さや卒業後の就職状況等について学んだ。生活習慣病対策・健康増進活動については札幌市の健康診断事業施設で実際の健康診断を見学する一方、ICT 遠隔保健指導システムを活用した地域住民への運動指導について発信元である札幌市内の NPO 法人と受信側である枝幸町での現場の双方を視察することで地域における健康増進を実感する機会を得た。高齢者等に対する介護サービスは、実際に家庭を訪れ、サービスを利用する高齢者との交流を通して居宅介護支援事業者によるケアプランの実際を学んだ。産業保健は、旭川市内の製紙工場を視察して、施設内の安全管理や 5 S 活動（整理・整頓・清潔・清掃・しつけ）の実際を学んだ。環境保健分野は、浄水場、産業廃棄物処理場、廃棄物最終処分場、ごみ焼却場・リサイクルセンターの各施設を見学した。廃棄物処理施設では廃棄物が資源として有効利用されていることを学んだ。食品衛生は、旭川市の食肉衛生検査

所を視察して食肉の安全管理について学んだ。病院管理と医療科学は、旭川医科大学病院において先端医療の現場を視察し、旭川医療センターで感染症・難病対

策を学ぶとともに地域医療の中核病院である名寄市立総合病院と枝幸町国民保健病院で実施されている脳神経外科のサテライト診療と美瑛町立病院が行っている

表3 2014年度 アフリカ地域 地域保健担当官のための保健行政 研修 日程

月 日		研修内容	担当者	場 所	
札幌市	6月24日(火)	研修生来日、札幌移動	JICA札幌	JICA札幌センター	
	6月25日(水)	ブリーフィング、ガイダンス、健康診断、日本語研修			
	6月26日(木)	ジェネラルオリエンテーション(日本の歴史・文化、社会・教育、政治・経済・行政)			
	6月27日(金)	プログラム・オリエンテーション、日本語研修、健診結果説明、自習			
	6月28日(土)	フリー		JICA札幌センター	
	6月29日(日)	PM 札幌から旭川へ移動		* 旭川へバス移動	
旭川医科大学	6月30日(月)	11:00 開講式	JICA札幌	AMU大会議室	
		13:00 オリエンテーション(共通テーマ紹介グループ分け・Today's summary担当決め)	吉田貴彦・藤井智子・北村久美子		
		13:15 カントリーレポート発表会(国ごと) 看護学科1,2年生 聴講	司会: JICA札幌	AMU 第5講義室	
		17:00 ウェルカムパーティ 万歩計配付、測定 記録	伊藤俊弘、藤井智子	AMU6F実習室	
	7月1日(火)	日本における人の健康にかかわる行政の体制と活動概要について学ぶ	コーディネート 吉田貴彦		
		9:30-11:00 講義 日本の衛生行政・労働行政・環境行政の体制と概要	吉田貴彦 教授	小会議室	
		11:00-12:30 講義 日本の国民健康増進対策・疾病対策の変遷と概要			
	7月2日(水)	地方における公衆衛生の向上と増進の活動について学ぶ	コーディネート 吉田貴彦	タクシー移動	
		13:30-15:00 講義 地域保健行政の役割(保健所・保健センターの業務分担)	杉澤孝久 旭川市保健所長	旭川市職員会館3階6号室	
		15:30-16:00 市長表敬訪問	西川将人 旭川市長	旭川市役所	
	7月3日(木)	感染性疾患の蔓延防止の対策を学ぶ	コーディネート 吉田貴彦		
		9:30-11:00 講義 感染症対策の基本 “Standard Precaution”	吉田逸朗 先生	小会議室	
		11:00-12:30 講義 感染症の基礎知識(寄生虫感染症対策)	中尾 稔 准教授		
		公衆衛生の第一線機関としての保健所の役割を学ぶ	コーディネート 吉田貴彦	タクシー13:30発	
	7月4日(金)	14:00-15:00 講義 保健所を中心とした地域の感染症対策	竹内徳男 上川保健所長	上川保健所	
		15:00-16:00 見学 上川保健所の見学(主に健診機器・検査業務)	上川保健所		
		PCM(プロジェクト・サイクル・マネジメント)の手法を学び担当地区の問題を分析すること に役立てる。	コーディネート 吉田・藤井	台北医科大学学生9名 参加	
	7月5日(土)	9:30-12:30 講義 PCMの手法① Overview / Stakeholder analysis	半田祐二郎 先生	大会議室	
		13:30-16:30 講義 PCMの手法② Problem Analysis / Objective Analysis(part1)			
		9:30-12:30 講義 PCMの手法③ Objective Analysis (part 2) / Alternative Analysis		大会議室	
	7月6日(日)	フリー ホームステイ・ホームビジット(予定)	JICA旭川デスク(大西)		
	旭川医科大学	7月7日(月)	グローバルな視点から結核対策を学ぶ	コーディネート 吉田貴彦	
			9:30-12:30 講義 結核対策における技術支援・人材育成・対策立案	財団法人結核予防会結核研究所 大角晃弘 先生	小会議室
			日本の医療提供施設およびその提供サービスについて学ぶ	コーディネート 吉田貴彦	
13:30-15:00 講義 旭川医大病院における病院管理(財政・人事、物品・医療情報)			成田昭夫 病院経営企画課長	小会議室	
7月8日(火)		感染性疾患の蔓延防止の対策を学ぶ	コーディネート 吉田貴彦		
		15:00-16:30 講義 脳囊虫症・エキノコックス症	迫 康仁教授	小会議室	
		16:30～ 話題提起とディスカッション①			
7月9日(水)		日本の母子保健、小児保健の概要を学ぶ	コーディネート 吉田貴彦		
		9:30-11:00 講義 日本の出産の歴史と現状	黒田 緑 教授	小会議室	
		11:00-12:30 講義 日本の小児看護の歴史と現状	岡田洋子 教授		
旭川医科大学	7月10日(木)	日本の医療提供施設およびその提供サービスについて学ぶ	コーディネート 藤井・吉田		
		見学 旭川医大病院の院内見学 感染症対策(清潔・不潔)、外来・入院 患者の流れ、入退院センターの機能、医療廃棄物の処理、スタッフのため の厚生施設、意見箱、給食システム、外来ブース・病棟の配置など	黒崎明子副看護部長、辻崎ゆり子 副看護部長、平瀬美恵子看護部長	旭川大学病院 (集合場 所:3階輪血部CR)	
		地域保健活動に役立つ健康・保健データの活用	コーディネート 吉田貴彦	小会議室	
	7月11日(金)	9:30-11:00 講義・演習 地域保健活動における保健データの解析手法	伊藤俊弘 准教授		
		地域における介護サービスについて学ぶ	コーディネート 藤井智子		
		11:00-12:30 講義 住民にあったケアプランの作成方法とコーディネーターの役割	指定居宅介護支援事業者ケアプラン 相談所	小会議室	
	7月12日(土)	日本における学校保健活動について現場で学ぶ	コーディネート 藤井智子		
		13:30-15:00 講義 学校保健 養護教諭の役割	渋谷和子 先生	小会議室	
7月13日(日)	15:30～ 旭川から札幌へ移動		* 札幌へバス移動		

月 日		研修内容	担当者	場 所
札幌市 内	7月10日(木)	日本の地域保健・医療における行政機関の役割(地域医療保健福祉に関わる法規、政策、行政組織)	コーディネート 北村久美子	ホテル8.45道庁エントランス9:15
		9:30-10:30 講義 北海道における保健行政の政策・財政 ～感染症対策～	北海道庁保健福祉部健康安全局 地域保健課 丸子利彦主幹	北海道庁
		10:30-11:30 講義 北海道における保健行政の政策・財政～がん対策・健康づくり～	北海道庁保健福祉部健康安全局 地域保健課 田中研伸主幹	北海道庁
		遠隔ICTを活用した保健指導	コーディネート 吉田貴彦	
		13:00-14:00 見学 北海道におけるICTを活用した保健指導・運動指導	健康保養に関するNPO	健康保養に関するNPO札幌事務所
	7月11日(金)	日本の社会福祉の概要について学ぶ	コーディネート 北村久美子	札幌アспен・ホテル
		14:30-16:30 講義 日本の社会福祉・介護保険制度	橋本伸也 教授 藤女子大学	
		9:30-11:30 講義 日本のハンセン病対策の変遷と人権侵害	北海道はまなすの里 平中忠信代表	札幌アспен・ホテル
		日本の健康診断事業について学ぶ	コーディネート 北村久美子	
		13:00-15:00 講義 日本の健康診断事業(結核予防会・複十字総合健診センターの役割、地域との連携) 見学 健診センター内の見学、健診車の見学	結核予防会北海道支部複十字総合 健診センター 北谷涼子 保健師	公益法人結核予防会 北海道支部複十字 総合健診センター
	Non-communicable diseasesについて概観する	コーディネート 北村久美子		
	15:30-17:00 講義 1型糖尿病の基礎知識	国際糖尿病支援基金 堀本緑織	札幌アспен・ホテル	
	7月12日(土)	フリー		
	7月13日(日)	札幌から旭川へ移動		* 旭川へバス移動
旭川市 名寄市	7月14日(月)	地域の結核治療について専門施設の場で学ぶ	コーディネート 藤井	バス9:00ホテル発
		9:30-11:30 講義・見学 道北病院における結核医療の変遷と現在の治療、病院と地域の連携・役割	旭川医療センター 藤兼俊明 副 院長、山崎泰宏 内科医長	旭川医療センター 窓口 総務課 武田
		過疎地域における市町村レベルの医療および保健活動について学ぶ	コーディネート 吉田	
旭川市 内	7月15日(火)	13:00-16:00 講義・見学 名寄市立総合病院	和泉裕一院長 名寄市立病院	名寄市立総合病院
		日本における学校保健活動について現場で学ぶ	コーディネート 藤井・吉田	
		9:00-11:00 見学 旭川市立東光中学校 施設見学、生徒の授業など見学、保健室の見学	中村日出元 校長先生他	旭川市立東光中学校
旭川医大	7月16日(水)	11:30-16:00 見学 旭川市立緑ヶ丘小学校 児童と教室で給食、施設見学、学童の授業・活動など見学	佐藤校長、玉井教頭先生	* タクシー移動 旭川市立緑ヶ丘小学校
		日本における公衆衛生看護の歴史・時代背景・役割を学ぶ	コーディネート 藤井智子	
		9:30-11:00 講義 日本の公衆衛生看護の歴史① 11:00-12:30 講義 日本の公衆衛生看護の歴史② 13:30-16:30 講義 日本の1950～1970年代に活躍した開拓保健師の軌跡	北村久美子 教授 加藤 正子 元開拓保健師(元道立 保健所保健師)北村久美子教授	小会議室
旭川市 内	7月17日(木)	地域保健関連施設(食品保健・環境保健・産業保健)の実務を学ぶ①	コーディネート 吉田貴彦	ホテル玄関前集合:8時10分、バス出発:8時15分(旭川医科大学8時30分出発)
		9:00-11:00 廃棄物処理施設 見学 地域における介護サービスについて学ぶ	コーディネート 藤井智子	
		13:00-16:00 見学 ケアプランに基づく家庭訪問(旭川市永山地区)	指定居宅介護支援事業者ケアプラン 相談所	
旭川医科大学	7月18日(金)	PCM(プロジェクト・サイクル・マネジメント)の手法を学び担当地区の問題を分析することに役立てる	コーディネート 吉田貴彦	
		9:30-11:00 講義 PCMの手法④ Formulation of Project Design Matrix (Outline) / summary	半田祐二郎 先生	小会議室
		11:00-12:30 演習 アクションプラン作成に向けて		
		地方中規模病院の管理運営の実際	コーディネート 吉田貴彦	
		13:30-15:00 講義 病院管理学・医療科学の基本 15:00-16:30 講義 病院管理学・医療科学のアフリカにおける事例紹介	半田祐二郎 先生 半田祐二郎 先生	小会議室
		16:30～ 話題提起とディスカッション② 17:00～ 道北フィールドツアー ガイダンス	吉田、藤井 吉田、藤井、伊藤、塩川	
	7月19日(土)	フリー		
	7月20日(日)	フリー		
枝幸町	7月21日(月)	旭川から枝幸に移動 14:00頃、旭川出発	バス移動	* 枝幸町宿泊
	7月22日(火)	北海道北部における地域保健・医療の実践について学ぶ	コーディネート 藤井・北村・伊藤・吉田	
		9:00-11:30 講義 枝幸町の保健福祉行政、財政のしくみ・予算編成等	田中喜二 保健福祉課長	枝幸町役場
		11:30-13:00 見学・講義 サテライト診療(脳神経外科)	佐古和廣 先生	枝幸国保病院
		14:00-14:30 見学 ICTを活用した地域における住民の健康作り支援		健康保養館(ニュー幸林)
		14:30-17:00 講義・見学 枝幸町の保健師活動	工藤裕子 主幹	枝幸町役場
		枝幸から紋別へ移動(バス)		* 紋別市宿泊

月 日	研修内容	担当者	場 所
紋別市	7月23日(水) 9:00-10:00 講義 母子保健活動の実際	高橋明美 保健指導係長	バス8:30発
	10:00-12:30 子育て支援センター ミニ講話など見学	紋別市保健センター	紋別市保健センター
	13:30-14:30 講義 過去の結核対策、保健推進員(住民)とともに作りあげる健康地域	阿部秀子 元保健所保健師	道立紋別高等看護学院
	15:00-16:30 見学 オホーツク圏における看護師養成機関の役割	道立紋別高等看護学院 品川由美子 教務主幹	* 紋別市宿泊・バス
遠軽町 旭川市	7月24日(木) 9:00-10:15 見学 冬季の北海道の自然環境・暮らしの理解	北海道立オホーツク流水科学センター	バス8:30発
	日本における学校保健活動について現場で学ぶ	コーディネート 藤井	北海道家庭学校
	11:00-12:30 見学 児童自立支援教育について学ぶ	北海道家庭学校(遠軽町) 熱田洋子 施設長	
	乳幼児を中心とした住民の栄養指導について学ぶ	コーディネート 藤井	
旭川医大	14:30-16:30 講義・演習 乳幼児の栄養	豊島琴恵 教授 (旭川大学短期大学部)	17:00頃帰旭
	7月25日(金) 日本のメンタルヘルスの概要について学ぶ	コーディネート 吉田貴彦	小会議室
	9:30-11:00 講義 日本の自殺の現状と対策(メンタルヘルス)	吉岡英治 准教授	
	日本の環境保健と産業保健の概要について学ぶ	コーディネート 吉田貴彦	
	11:00-12:30 講義 日本の環境問題の歴史と環境保健の動向	吉田貴彦 教授	
	13:30-15:00 講義 地域における産業保健活動の実際	吉田貴彦 教授	
	15:00-16:30 講義 環境保健行政の実務(上下水処理、廃棄物処理)	伊藤俊弘 准教授	
	16:30~ 話題提起とディスカッション③		
	7月26日(土) PM ホームパーティ		吉田宅
	7月27日(日) フリー		
旭川医科大学	7月28日(月) 地域保健活動に役立つ健康・保健データの活用		小会議室
	9:30-10:30 講義 地域保健活動に役立つ健康データの種類と収集方法	西條泰明 教授	
	Non-communicable diseasesについて概観する	コーディネート 藤井智子	
	10:30-11:30 講義 生活習慣病の基礎	西條泰明 教授	
	11:30-12:30 講義・演習 住民教育の方法と、教育に役立つ資料作成	藤井智子 教授	
	医師の人材育成について学ぶ	コーディネート 吉田貴彦	
	13:30-15:00 講義 日本の医学教育と医師の需給バランスの問題	教育センター 間宮敬子准教授	
	15:00-16:00 話題提起とディスカッション④		
旭川市内	16:00~ 近隣の見学ツアーの説明	吉田、藤井、伊藤	
	7月29日(火) 地域保健関連施設(食品保健・環境保健・産業保健)の実務を学ぶ②	コーディネート 吉田貴彦	ホテル玄関前集合:8:15、出発:8:20 (医大8時出発) ホテル17:00着
	9:00-12:00 見学・講義 旭川市食肉衛生検査所(と畜場・食肉検査)		旭川市食肉衛生検査所
	13:00-15:00 見学 近文清掃工場、リサイクルプラザ	吉田貴彦・伊藤俊弘・中木良彦	近文清掃工場
美瑛町	15:30-16:30 見学 旭川廃棄物処理センター(旭川振興公社)		旭川廃棄物処理センター
	7月30日(水) 地方における医療機関と地域保健業務の連携を学ぶ	コーディネート 吉田貴彦	バス8:00ホテル発
	9:00-10:00 講義 町立病院と町保健センターが連携した地域住民の健康管理	吉田貴彦・藤井智子	美瑛町(美瑛町保健センター、美瑛町立病院、美瑛町内各施設)
	10:00-12:30 見学 地域内訪問診療の実際 (市街地域、高齢者施設・福祉住宅・個人宅)		
旭川市内	13:30-14:00 講義 美瑛町における整形外科訪問診療(味戸伸彦医師)		
	14:00-15:00 見学 美瑛町保健センター		
	15:30-16:30 見学 地域内訪問診療の実際 (遠方地域、居宅介護施設)		
	16:45-17:30 総括講義 (味戸伸彦医師・藤原裕子看護師他)		
旭川市内	7月31日(木) 地域保健関連施設(環境保健・産業保健)の実務を学ぶ③	コーディネート 吉田貴彦	ホテル玄関前集合:8:25、出発:8:30 (医大8:45出発)
	9:00-10:00 見学 忠別川浄水場(旭川市水道局)	吉田貴彦、伊藤俊弘、中木良彦	フィール旭川 旭川リペラインパーク
	10:30-12:00 見学 製紙工場		
	アフリカにおける保健強化・キャパシティデベロップメント実践に学ぶ①	コーディネート 吉田貴彦	
旭川医科大学	14:00-16:30 講義 保健システム強化とキャパシティディベロップメント	杉下智彦専門官	
	19:00~ 地域交流 旭川夏祭り花火大会(希望者)	有志	
	8月1日(金) アフリカにおける保健強化・キャパシティデベロップメント実践に学ぶ②	コーディネート 吉田貴彦	小会議室
	講義 Health system management with whole systems approach	杉下智彦専門官	
	保健システム強化とキャパシティディベロップメント		
	ーアフリカの事例を中心にー	杉下智彦専門官	
	13:30-16:00 講義 保健システム強化とキャパシティディベロップメント		小会議室
	ーアフリカの事例を中心にー		
	16:00-16:30 話題提起とディスカッション⑤		
	16:30~ 地域交流会説明	吉田貴彦	
	8月2日(土) フリー/ タ方 地域交流 旭川夏祭り(希望者)	有志	市内中心部
	8月3日(日) フリー		
旭川医大	8月4日(月) 住民に合わせた啓発方法、組織へのプレゼンテーションを考え実施する。		小会議室／多目的室／情報処理室
	9:30-12:30 各自アクションプラン作成	吉田、藤井、伊藤、塩川、中木	
	13:30-16:30 各自アクションプラン作成	吉田、藤井、伊藤、塩川、中木	
	16:30~ 話題提起とディスカッション⑥		

月 日	研修内容	担当者	場 所
旭 川 医 科 大 学	8月5日(火)	住民に合わせた啓発方法、組織へのプレゼンテーションを考え実施する。 9:30～ 各自アクションプラン作成 12:00 13:00～ 各自アクションプラン作成 16:00	吉田、藤井、伊藤、塩川、中木 小会議室／多目的室／情報処理室
	8月6日(水)	9:30～11:00 各自アクションプラン作成 遠隔ICTを活用した医療の均等化 11:00～12:00 講義 大学と地域・国際連携 13:00～16:00 各自アクションプラン作成	吉田、藤井、伊藤、塩川、中木 コーディネート 吉田貴彦 遠隔医療センター 小会議室／多目的室／情報処理室
	8月7日(木)	保健福祉計画(アクションプラン)のアピール方法、組織上層部へのプレゼンテーション方法を考え実施する。 9:30～ プレゼンテーション 12:30 13:30～ プレゼンテーション 16:30 意見交換・講評 17:30～ フェアウェル・パーティ	全員 大会議室 全員
	8月8日(金)	11:00～11:30 閉講式 11:30～ サヨナラパーティ 旭川から札幌に移動	全員 大会議室 小会議室 *札幌へバス移動

整形外科の訪問診療の見学から僻地における医療活動を学んだ。我が国の保健衛生分野の各施設を視察して学んだ多くの事例が必ずしも研修員の自国におかれている状況の改善に結びつくとは限らないが、地域住民がおかれている状況に即した対策の立案には少なからず貢献し得ると期待している。第三の特徴は、課外活動として希望者を対象に旭川市民の自宅へのホームステイ・ホームビジットや旭川夏まつり等のイベントへの参加、花火大会の見物などを通して旭川市民との交流を行っていることである。これらの行事は、コースリーダーである吉田貴彦教授が各研修員に地域住民との交流から日本の文化や風習を体験してもらうと企画したもので、2010年度から毎年行っている。吉田教授はさらに自宅でホームパーティを開催して、研修員どうしやコーディネーターとの交流促進を図るなど、各研修員が日々の研修に取り組みやすい環境づくりも行っている。

本研修コースは、各研修員が帰国後に実施することを想定した地域保健計画(アクションプラン)を作成し、研修の最終日に行われるプレゼンテーションの発表をもって研修効果を判定している。アクションプランの作成には、疫学調査研究の手法や健康問題の課題抽出と分析、および地域保健計画策定の手法であるProject Cycle Management(PCM)の技術が必須であることから、PCMに関する講義・演習を15時間、アクションプランの作成支援としてアフリカ地域における保健強化・キャパシティデベロップメント実践に関する講

義を7時間行った。研修の最終週は、各研修員が自国の担当地域における保険問題を抽出し、これを解決するための地域保健計画アクションプランの作成に取り組んだ。アクションプラン作成のために3日間、演習時間として16.5時間を確保しているが、研修員の多くは宿泊先のホテルでもアクションプランの作成に取り組み、作成過程においてコースリーダーにメールで何度も確認を行うなど十分な時間をかけて発表準備を行った。研修の最終日は、アクションプランの発表を行った。アクションプランの発表会は、各研修員が交代で司会・進行係を務めて進められ、研修の発表中に質問や意見も多数みられ活発な討論が行われた。

4. 研修員の評価

本研修コースの終了後に行われた各研修員の評価は、質問1の「単元目標の達成度」については例年と同様に各単元とも3点以上で、概ね目標が達成されたとの回答であったが、単元5では無回答とした者が1名いた。単元目標の達成度の平均点は3.72点で、2011年以降では最も高い点数となった。

単元5が無回答だった者は、講義の科目数が増加した2012年度から認められているが、この理由については既に記述しているように、研修科目の増加が研修員(特に医療職以外)の負担になっていると思われる(研修員に占める医療職者と単元5を未回答とした者の割合はそれぞれ、2012年度が70%と8%、2013年度が30%と54%、2014年度が70%と8%であり、医療職者の参加が少ない年での未回答率が際立ってい

る)。各単元に対する自由記載欄ではいずれの単元においても有益であったとの意見が多数みられたが、反対に不必要な科目に対しては記載がなく、本年度の研修に対する評価は非常に高いことが示された。以上より、本年度の研修は研修コースのタイトル変更により本来の目的に合致する研修員の割合が高くなったと考えられるが、次年度以降も効果的な研修になることが期待できる結果が得られたことは私達にとっても大きな収穫であった。

5. 終わりに

本研修コースは、アフリカ地域における保健問題である感染症対策を目的として開始されたが、アフリカの保健行政は保健、医療、福祉、環境等を扱う機関が独立しておらず、すべて地域保健行政の管轄にある。研修員の要望を取り入れる形でプログラムの内容が年々増加し、研修期間も 2010 年度から 1 週間延長さ

れた。また、2013 年度には研修コースのタイトルがアフリカの地域保健行政担当者以外の行政官も対象になり得ることが指摘されるとともに本研修の講義内容についていけないと思われる状況も認められたことから、本報告では第 1 回目の研修から本年度までのプログラムと各年度の研修に対する評価について分析を試み、その結果を次年度以降の研修に役立てることを目的とした。本研修に対する評価は、いずれの年度も研修員からは高い評価が得られているが、JICA 北海道には講義が過密であるとの意見も寄せられており、講義に対する量的負担についても検討する時期に来ているのかもしれない。

本研修コースにおきまして多くの関係機関・施設の皆様に多大なるご協力を賜りましたことを深謝致します。研修は来年度以降も継続されますが、今後ともご協力の程よろしくお願い申し上げます。



ウェルカムパーティーにて



旭川医大病院 院内見学



上川保健所にて竹内徳男先生の講義



北海道庁 地域保健課の講義



PCM 半田祐二郎先生の講義



ICT を活用した保健指導 NPO 見学 (札幌)



旭川医療センターにて



ICT による運動指導 2 (枝幸町)



東光中学校訪問



サテライト診療の講義 (枝幸国保病院)



廃棄物処理施設にて (アンビエンテ丸大)



紋別市保健センター 阿部秀子先生の講義



紋別高等看護学院での実習風景



美瑛町の高齢者施設にて



離乳食の試食 豊島琴恵先生（旭川大学）



吉田晃敏学長 講義後の記念撮影



食肉衛生検査所 検査室にて



閉校式後の記念撮影

学界の動向

第 11 回 日本口腔ケア学会総会・学術大会開催のご報告

松 田 光 悦* 竹 川 政 範**

去る6月27日(金)から6月29日(日)の3日間、旭川市市民文化会館において第11回日本口腔ケア学会総会・学術大会を開催致しました。全国から、会員、非会員合わせて約800名の参加をいただき、口腔ケアに関する活発な議論が繰り広げられました。旭川医科大学職員の皆様、旭川医師会、旭川歯科医師会を始め多くの皆様のご支持、ご援助を賜り、お陰様で成功裏に終了できました。この場を借りまして、心より御礼申し上げます。

本学会は、看護師、歯科衛生士をはじめ医師、歯科医師、介護士、言語聴覚士、栄養士など多職種から構成されており、現在4000名を超える会員から成り立っています。近年、「口腔ケア」の社会的認識度が、にわかに高まってきており、2011年における「歯科口腔保健の推進に関する法律」の制定以来、「周術期口腔機能管理」の保険導入、また「チーム医療の推進」や「医科歯科連携の強化」など「口腔ケア」に関わる多くの重要な課題が提供されてきました。さらに2014年の保険改訂に伴う「周術期口腔機能管理」のさらなる充実、口腔ケア学会の果たすべき役割、責任をより明確なものとし、エビデンスに基づく口腔ケア理論の確立と実践が求められております。しかし、口腔ケアの実情において、「口腔ケアの必要性」ということは広く認識されておりますが、エビデンスを提供する論文に乏しく、いわゆる『標準化』はいまだ達成されておられません。そこで今回の学術大会では、学会として推薦する「口腔ケア理論と実践について」の内容をまとめることを目標に、1.「ICUにおける口腔ケア」、2.「がん化学療法と口腔ケア」、3.「放射線治療と口腔ケア」、4.「ターミナルケアと口腔ケア」、

5.「言語療法士の行う口腔ケア」の5つのテーマに関し、コンセンサスカンファレンスを開催致しました。コンセンサスカンファレンスで行われた議論の概要を紹介させていただきます。

「ICUにおける口腔ケア」は「ICUで経気管挿管中の患者に対する口腔ケアの方法」に関して討論が行われました。国指定のがん診療拠点病院計397施設のICUを対象にアンケート調査を行い口腔ケアの実施状況とVAPの発生率について報告されました。その後、発表者からVAP予防のためには「汚染物の回収」を意識した口腔ケアが必要である旨の報告がされ、さらに口腔ケアの有効性を示す研究における問題点について言及されました。旭川医科大学集中ケア認定看護師上北真理さんは、口腔の清潔保持だけでなく口腔機能



写真 1

*旭川医科大学 歯科口腔外科学講座 教授

**旭川医科大学 歯科口腔外科学講座 准教授

の維持回復を目的とした口腔ケアの実施が今後の課題であることを示しました。指定発言として旭川医科大学医師小北直宏氏は、ICU で看護師が口腔ケアを実施しやすい環境にするための課題について、長崎大学林田 咲先生から気管挿管されている患者の唾液中の細菌数を減らすために 200ml の水で洗浄することが有効であると報告がありました。「がん化学療法と口腔ケア」のテーマでは「化学療法の合併症である口腔粘膜障害をいかに防ぐか—最近の知見を踏まえて考える—」と題してカンファレンスを開催しました。化学療法薬の投与による口腔粘膜障害は副作用なのでその発症を防御することはできないが、この合併症を最小限に抑えるには、口腔ケアの方法をいかに行っていくかに関して討議されました。「放射線治療と口腔ケア」に関しては、「頭頸部がん放射線療法を支える歯科口腔管理のエビデンス、コンセンサス」と題して議論がなされました。口腔機能管理には統一された具体的な対応方法はガイドライン等も無く経験的に培われた施設独自の管理が行われているのが現状であることが報告されました。本カンファレンスでは、現在の頭頸部放射線治療における口腔機能管理（口腔ケア）の共通項を整理した上で、その問題点・疑問点を明確にする議論がなされました。終末期患者の口腔ケアに関して「ターミナルケアにおける口腔ケア」と題して多職種の発表者にお集まりいただきコンセンサスカンファレンスが行われました。終末期患者にとって「人間らしく人生を全うする」という意味で摂食を含めた口腔ケアは非常に重要なケアであります。また患者は常に孤独であり、他者に口腔の世話をしてもらうことが大きな救いとなります。そこで、重病患者や終末期患者

が人間らしく生きると同時に医療従事者や介護家族らの不安や労働負荷を軽減するために、摂食や心のケアも含めた口腔ケアについて各職種から先進的な取り組みをされている方々の報告を中心にコンセンサスカンファレンスが進められました。「言語聴覚士が行う口腔ケア」のコンセンサスカンファレンスでは、指定発表者から急性期リハ、回復期リハ、認知症リハなど、それぞれの場で、摂食・嚥下リハビリテーションを進める際に、ST として抱える問題と「口腔ケア」を実施する目的、方法、問題点が示され、ST が「口腔ケア」を実施する際の基本的な目的と意義、さらに禁忌事項を挙げ、「ST は口腔ケアをどこまでできるか」について議論されました。本コンセンサスカンファレンスは学会として初めての試みではありましたが、どのテーマにおいても多くの参加者が有り、ある程度のコンセンサスが得られたもの、またコンセンサスを得るには至らなかったものの課題が明確になったものと、一定の成果は得られたものと思われます。学会として、さらに努力し口腔ケアの標準化を目指したいと思います。

本学術大会では、コンセンサスカンファレンスの他に特別講演 1 題、教育講演 2 題、シンポジウム 2 テーマが行われ推薦発表 9 題、一般講演 73 題、ポスター発表 77 題の学術講演が行われました。その一部を紹介させていただきます。

シンポジウムは「在宅療養と口腔ケア」、「口腔ケアの職種間および地域連携」の 2 テーマについて行われました。シンポジウム 1 では医療、歯科医療、看護、介護、行政、教育の視点から「在宅療養と介護・・・口腔ケアの関わる現状と課題」に関して幅広い議論を行うために、北海道で活躍されている方々をシンポジストとしてお願いしました。中でも北海道医療大学石垣靖子先生からは、看護師およびご家族としての経験から「終末期の方が口から食べること」の意義、医療・介護職および家族が病人の「食べること」を支え、病人の状況に合わせた口腔ケアができるようにサポートすることの意義についての講演は参加者に深い感銘を与えるものでありました。シンポジウム会場は 308 名の収容人員でしたが、シンポジウム開演前から満席となり終了まで着席できない参加者が多数出るほどの盛況でした。シンポジウム 2 では「口腔ケアと地域連携」について議論を行いました。内容は、院内での他

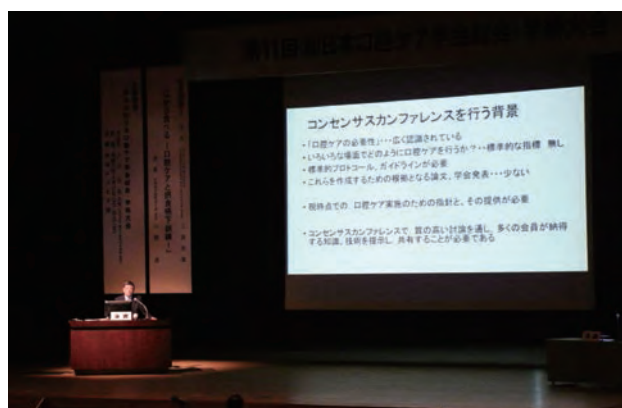




写真3 コンセンサスカンファレンス

職種連携とプロフェッショナルケアの意義、地域における医科歯科連携、病院と歯科医院連携についてシンポジストから発表があり活発な討議が行われていました。その中で、北海道がんセンター佐々木 由紀子さん、都立駒込病院 茂木 伸夫先生の発表から口腔ケアの地域連携が進んできていることの実感が得られるシンポジウムでありました。

教育講演1では、北海道医療大学 古市 保志先生から「歯周病と全身の健康状態との関連性 - up to date -」と題して歯周病と全身疾患との関連性について最近の知見が紹介されました。歯周病と糖尿病、動脈硬化症とそれに続く虚血性疾患、誤嚥性肺炎、早産・低体重児出産さらに、関節リウマチ、すい臓癌などとの関連性および両者の関連性発現のメカニズムについて解説がありました。さらに歯周病治療による血糖コントロール、動脈硬化症、そして早産・低体重児出産などへの改善効果について最近の知見を解説頂きました。また北海道言語聴覚士会 小橋 透先生から「口

から食べる 口腔ケアと摂食嚥下訓練」と題して教育講演2が行われました。現在、重度の嚥下障害者の誤嚥を完全に防ぐことは困難であり、誤嚥性肺炎予防に最も有効とされるのは口腔ケアであること、口腔ケアの目的は誤嚥予防だけではなく、たとえ誤嚥しても肺炎を生じさせないことであり、摂食・嚥下障害をもつ患者さんは病期にかかわりなく一貫してリハビリテーションが行われるべきであるとの観点から、急性期から在宅期までの口腔ケアと摂食嚥下訓練について講演頂きました。

またCaféのような親しみやすい雰囲気の中で、多職種がケアについて語りあうという旭川発祥の取り組みである「ケア・カフェ」の併催も、コンセンサスカンファレンス同様、本学会では初めての試みでありましたが、「口腔ケア」をテーマに、多くの会員に経験して頂きました。機会があるごとに、各地域で継続して頂ければと思っております。

旭川市旭山動物園の板東 元園長にお願いした特別講演は大変好評で、講演後、多くの参加者が旭山動物園に向かい、会場が一時閑散となるハプニングもありましたが、このようなことも含めて盛会であったと感じております。

この学会が旭川市で開催されたことにより、近隣、市内の看護師や歯科衛生士をはじめ多くの医療従事者の方々に参加していただき、この地域における口腔ケアへの意識がいっそう高まったものと思います。私どもも今まで以上に、地域医療連携を強化し、地域住民の健康のために努力して参ります。今後ともどうぞよろしくお願いいたしまして、第11回日本口腔ケア学会総会・学術大会開催のご報告と致します。

学界の動向

第36回 日本手術医学会総会を終えて

平 田 哲*

第36回日本手術医学会を札幌（ホテルロイトン札幌）で開催いたしました。学会テーマは「北の街で語ろう！さらなる周術期医療の質向上を目指して」としました。医学、医療は日進月歩で進化し、手術室を取り巻く環境も急激に変化しています。周術期医療の質の向上とそこで働く先生・スタッフの満足感をあげる方法が何か、語り合っていました。近年の手術部で行われる手術は、内視鏡外科手術、MRI・CTなどを利用した手術、ナビゲーション手術などコンピュータ技術により支援される手術、放射線診断装置を用いたハイブリッド手術、ロボット支援手術などなど大きく変化してきており、より患者さんにとって低侵襲で、より安全な手術をとというのが主流をなし、これまでとは全く次元の異なった新しい手術術式の開発が進められています。

今回の学会では、14年間手術部教員をしてきた私の経験より、会長講演は「手術部マネジメントで大切なものは何？」という題で、結論として「人」「教育」「連携」「中立性」がマネジメント上、重要であるとお話しました。特別講演は、大久保憲先生（東京医療保健大学）に「手術部診療の歩んできた道と将来ー感染制御を踏まえてー」という題でご講演をいただきました。日本の江戸時代後半からの手術室での外科治療の歴史から今後のこの学会の歩むべき方向性を示唆いただきました。また、教育講演（安全管理：大阪大学

中島和江先生）、（感染対策：東京医療保健大学 尾家重治先生）、（麻酔：旭川医科大学 岩崎寛先生）、（看護：東京女子医科大学 諏訪茂樹先生）、（臨床工学：大阪大学 高階雅紀先生）と5人の日本の各分野の第一人者の先生にお話していただきました。特別企画と

して旭川を代表するガーデンデザイナーの上野ファームの上野砂由紀さんに「生命の輝き『北海道ガーデン』」の題でご講演いただきました。北海道ならではの庭づくり、麻酔科の岩崎教授もドラマ制作に関係したフジテレビの「風のガーデン」の舞台となった風のガーデンの庭づくりなどのお話しをしていただき、会員に癒しの時間を与えてくださいました。また「手術室で輝くチームの笑顔」というテーマで写真を公募し、優秀作品（神戸大学手術部）には記念品を贈呈しました。大学病院や地域基幹病院では10年間で約1.8倍の手術件数増加となりました。国立大学病院でも法人化の大波と包括医療費制度導入（DPC）が職員の意識を大きく変えました。地域医療、救急医療の社会的問題もあり、医育機関の大学でも手術件数は大きく増加し、



学会ポスター

*旭川医科大学病院 手術部

手術診療報酬の改訂が2年毎に計られことにより、手術室は病院の中でもっとも経営に影響を与える部署として病院の中での重要性が再認識され、効率的な運用が強く求められてきました。

経済性については、学問的なエビデンスを作ることが難しい分野ですが、今回は経済性と運用の質の向上を意識したシンポジウムを組みました。特にシンポジウム1では「手術部が求める運営体制の充実が経営にも貢献しているか」、シンポジウム2「質の向上を目指した手術部運営の工夫」としました。安全性と効率

化は経済性と相反するテーマのように感じますが、実際は並行して進めなければならない重要な点であると考え、熱心なディスカッションが繰り広げられました。

直前に台風16号が関東地区を横切り、参加者はどうなるか心配しましたが、全く問題なく、晴天の2日間でした。大通り公園ではオータムフェストも開かれて、参加者も気分転換に行かれたかもしれません。秋の北海道らしい美味しい季節での学会を無事終え、ほっとしています。



会場：ホテルロイトン札幌

本学教員執筆書籍の紹介

高橋雅治、D. シュワープ、B. シュワープ著 心理学のための英語論文の基本表現

朝倉書店 2013 年 11 月 10 日出版 194 ページ 3,240 円

高 橋 雅 治

1. 本書の特徴

本書は、心理学論文で使われる英語表現を集めた英語表現集である。執筆では、心理学関連分野で使われる英語表現を中心に収録することを心がけた。その結果、研究参加者の表現が 24 個、分散分析の表現が 16 個収録されるなど、心理学のみならず行動科学全般の執筆に役立つ表現集になった。

執筆の要は、出来る限り質の高い例文を収集することであった。試行錯誤の末、以下の方法を採用した。まず、私が収録すべき例文の内容を決め、それに基づいて、共著者のシュワープ夫妻が一流誌の論文から質の高い例文を選び出す。次に、私がそれを日本語に直した後でシュワープ夫妻が誤りをチェックし、さらに、私がそれらを原稿としてまとめるのである。これにより、質の高い例文を収録することができたと自負している。

本書を最初に構想したのは、30 年以上も前のことであった。当時院生であった私は英語で出版する必要に迫られて、論文英語の例文集を探していた。あちこちを探しまわった末、役に立ちそうな自然科学系の例文集をなんとか見つけることができた。だが、行動科学関係の例文集はひとつも見つからなかった。いつかこの分野で例文集を出版したい。それが、英作文の不得手な院生が当時抱いた夢であった。それから 10 年以上たってから、米国人の発達心理学者であるシュワープ夫妻と 2 冊の本¹⁾²⁾を出版することになり、その過程で築いた夫妻との信頼関係が今回の出版につながった。

2. 例文参照と剽窃

本書でも触れているように、第二言語教育の現場では、例文参照による執筆と剽窃の問題についてさまざ

まな議論が行われている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。たとえば、ノン・ネイティブの研究者は、ネイティブの書いた論文を参考にしながら執筆することが多く、その結果、手本にした例文と似たような文章を書いてしまいがちであることが指摘されている⁵⁾。いわゆる「切り貼り著者(patchwriter)」の問題である。さらに、同様の議論において、「日本人は概して剽窃の問題に鈍感である」という主張も広く認識されている³⁾⁶⁾。中には、日本人の剽窃に対する認識の甘さを、個人の功績や責任が二の次に扱われるいわゆる「甘え」の構造⁷⁾に帰属する研究者さえ見受けられる(Wheeler⁶⁾の評論を参照)。

執筆の初心者がこのような剽窃の問題を避けるためのひとつの方法は、少数の例文を手本にするのではなく、多数の例文に共通して含まれている文章パターンをあらかじめ身につけておき、執筆に際しては、それらを適切に運用することにより常に独自の文章を書くことである。そこで、本書では、多数の例文に共通する文章パターンを実際の例文とペアにして提示した。執筆の初心者は、それらを見比べて各文章パターンの使い方を体得することから始めて欲しい。

おわりに

本書では、英語表現を論文の各節ごとにまとめて示し、さらに、各節を執筆するためのポイントと APA スタイルの概要を加筆した。英語論文に初めて取り組む場合は、それらを参考にして研究のアウトラインを少しずつ作っておき、ついでに、それらを英語に訳しておくといよい。これにより、投稿原稿の主要な部分は完成したことになる。本書が、この分野の将来を担う若手研究者の一助になれば幸いである。

引用文献

- 1) D. シュワープ, B. シュワープ, 高橋雅治. 初めての心理学英語論文. 北大路書房, 1998.
- 2) D. シュワープ, 高橋雅治, B. シュワープ, D.A. シュワープ. 心理学者のためのネットスキル・ガイドブック. 北大路書房, 2005.
- 3) Dryden, L. M. A distant mirror or through the looking glass? Plagiarism and intellectual property in Japanese education. In L. Buranen & A. M. Roy (Eds.), *Perspectives on plagiarism and intellectual property in a postmodern world*. Albany: State University of New York Press, 1999.
- 4) Howard, R. M. *Plagiarism: What should a teacher do?* Paper presented at the Confer. on Col. Compo. & Commu., Denver, CO, 2001.
- 5) Pecorari, D. Good and original: Plagiarism and patchwriting in academic second-language writing. *J of Sec Lan Writ*, 12, 317-345, 2003.
- 6) Wheeler, G. Plagiarism in the Japanese universities: Truly a cultural matter? *J of Sec Lan Writ*, 18, 17-29, 2009.
- 7) 土居 健郎. 「甘え」の構造. 弘文堂, 1971.

本学教員執筆書籍の紹介

鈴木昭広 (麻醉科 准教授) 編集

「あてて見るだけ！ 劇的！ 救急エコー塾」

羊土社 2014 年 2 月 A5 版 189 ページ 価格 3600 円 + 税

鈴木 昭 広

編者は 17 年間の麻醉科生活の中で、医療過疎地への麻醉出張などを行っていた。ある日の午前、出張先病院で患者熱発の為手術が中止となり、医局で新聞や雑誌を読んでいたのんびりと過ごしていたのだが、のちに、その時間帯に常勤の外科医が急患対応のために外来を止め、来院済みの患者を 50 名近く待たせながら、救急車で運ばれてきた院外心肺停止患者の対応を行っていた事実を聞いた。この一件は私にとって、「医療過疎地に出張に来たのであれば、専門業務としての麻醉だけではなく、現地の患者と常勤医師のために、一人の医者としてもっとできることがあるのではないか？」と自問自答するきっかけとなった。麻醉科医は麻醉中に各種の急変対応スキルを実践しており、その技術は術前や術後の世界に幅広く役立てられるはず、との思いから、医局に無理を言って 5 年間の救急集中治療に専従する機会を得ることとなった。本書は、お世話になった医局と救急集中治療部への感謝をこめ、40 過ぎてから救急武者修行を行わせていただいた仕事の集大成といえるものである。

救急部配属後の生活の中では救命センターの立ち上げ、DMAT 隊員の登録と各種演習活動、東日本大震災での災害医療派遣など、まさに“タイミング”、としかいいようのないほど貴重な経験を数多くさせていただいた。中でも、道北ドクターヘリ活動は、麻醉科に戻った今も継続させていただいているライフワークであるが、ヘリで駆け付けた現場で、X 線も CT もとれない環境では超音波でいかに情報をとるかが患者の生死を分ける。そこで麻醉科時代に心臓麻醉で培った経食道超音波の資格を眠らせることなく新たな分野を切り開こう、との思いで、①救急外来ですぐに役立つ超音波テクニック、②日本ではまだなじみのない利用法や、③だれもやっていないような超音波の新しい使い方を模索し続け、麻醉科医が得意とする気道、呼吸、

循環、意識変容などの急変事態を超音波で解決する方法を見出す、探し出すことを自分の臨床テーマに日々のセンター業務に従事した。センタースタッフと共に救急外来常設の超音波装置を使い続けた 5 年間は、そのハードディスクを画像データでいっぱいにするのに十分な時間であった。

せっかくのアイデアと貴重な映像データを自分たちだけで使うのはもったいない、との思いから雑誌社に掛け合い、研修医向けに毎月 15000 部の発行部数を誇る「レジデントノート」に特集号を掲載する機会をいただいた。卒後臨床研修医の採用が 10 人を割る“どん底”の状況にあった当時、この企画で編者が最も強く意識したのは、“**Not from Tokyo, but Asahikawa**”であった。なんとなく都会を向いている若者の目を旭川に向けさせるためには、全国に 800 以上ある研修病院の中で旭川医大を目立たせる必要がある。そこで特集号では当時救急部にご協力いただいていた科の中から、総合診療部の野津先生（虫垂炎）、第 3 内科長谷部先生（胆石胆のう炎）、救急部稲垣先生（中心静脈穿刺）、麻醉科田中先生（肺エコー）にも執筆協力を仰ぎ、また旭川医大の卒業生である沖縄の岩永先生、野崎先生（水腎症）にも参加いただき、旭川医大カラーを強く打ち出すことを意識した。さらに、雑誌に単発の特集記事ではインパクトが大きいことから、継続的な読者への意識づけのために、その後の連載記事の掲載にこぎつけた。連載では、気道のエコー、胃のエコー、軟部組織、骨折エコー、下肢静脈血栓やお手軽心エコーなど、現在世界中で注目されている Point of Care ultrasound に類するものを取りあげ、足掛け 3 年を経て 1 冊の本としてまとめることができた。

幸いにも本書は好評なようで、研修医サイト M2plus の電子書籍部門では発売以来ベストセラーに選出され、Amazon.co.jp でも臨床医学一般で「今日の

治療薬」に次ぐ売り上げ第2位を獲得した（←おそらく瞬間風速的なものですが）。また、本書籍の発刊を契機とし、医療情報サイト m3.com の医療クイズへの出題、雑誌「救急医学」への超音波プロモーション記事の定期掲載などの依頼もいただき、微力ながらメディアを利用した旭川医大の知名度向上に貢献できているものとする。さらに全国の有志を募って ABCD sonography という団体を立ち上げ、2014 年秋より全

国でお手軽超音波を広めるワークショップの展開を開始している。

本学は先輩方の苦勞を経て設立から 40 年を迎えた。数ある地方医科大学の中から頭ひとつ抜け出す起爆剤のひとつとして本書をご紹介いただき、初期・後期研修医の希望者増加の一助となれば、と目論んでいる次第です。

旭川医科大学 回顧資料 (16) 昭和 63 (1988) 年度

臨床検査医学講座の誕生

昭和 63 (1988) 年。今にして思えば、この年は実質的に昭和最後の年であった。なにしろ昭和 64 年はわずか 7 日間しかなかったのだから。「年度」という概念で語るならば昭和 63 年度が昭和最後の年度である。

既に昭和 62 年の半ば以降、昭和天皇の体調不良は進行していて、同年 9 月には開腹手術が行われ、宮内庁は病名を「慢性膵臓炎」と発表した。昭和 63 年後半ともなると病状はかなり悪化し、連日、吐血・下血の状況がマスコミで報道された。それに伴い全国各地で、歌舞音曲を伴う派手なイベントが自粛の方向に進んでいった。テレビ・ラジオ界の年末恒例行事である紅白歌合戦 (NHK) やレコード大賞の発表音楽会 (TBS) は例年通り行われたが、日本歌謡大賞の音楽祭 (TBS を除く在京民放キー局の持ち回り) は中止された。今でも紅白歌合戦の常連となっている演歌歌手の坂本冬美がデビューしたのは前年の昭和 62 年であった。彼女のデビュー曲「あばれ太鼓」(たかたかし作詞・猪俣公章作曲) は、歌詞に「どうせ死ぬときゃ裸じゃないか」とあって、天皇の病状にかんがみて縁起が悪いということで放送を自粛するテレビ局・ラジオ局が相次いだ。同じ作詞・作曲者による 2 曲目の「祝い酒」は、今でも結婚式によく歌われているが、これも時節がら不謹慎ということで自粛の対象となった。

この年度直前の 3 月 13 日には、北海道の知内町湯の里と青森県の今別町浜名を結ぶ全長 53.85 キロメートルの青函トンネルが開通し、本州と北海道が陸続きになった。建設開始が昭和 36 年であるから 27 年の歳月を要したことになる。その苦難のプロセスは、森谷司郎監督・高倉健主演の映画「海峡」(昭和 57 年) や三田英彬のドキュメンタリー小説『青函隧道』(平成 11 年) などで紹介されてきた。やはり年度直前の 3 月 17 日には、日本初の全天候型野球場である東京ドームの落成式が行われた。

年度が始まって早々の 4 月 10 日には瀬戸大橋が開通し、本州と四国が陸続きになった。こうして昭和の終焉を前にして、本州および北海道・四国・九州という日本の 4 つの大きな島がすべて陸続きとなったわけである (ちなみに本州と九州は、すでに第二次世界大戦中の昭和 19 年に関門海底トンネルによって陸続きになっていた。) 9 月 17 日にはオリンピックソウル大会が開幕している。この大会により韓国は、日本に次いでアジアで 2 番目の夏季オリンピック開催国となった。この大会で日本は、金 4・銀 3・銅 7、計 14 個のメダルを獲得した。

政官界では 6 月以降、大規模な贈収賄が発覚していった。戦後最大の贈収賄事件とされるリクルート事件である。リクルート社の関連会社で未上場の不動産会社リクルートコスモス社の未公開株が賄賂として譲渡され、贈賄側のリクルート関係者と収賄側の政治家や官僚らが次々に逮捕され、大スキャンダルとなった。90 人を超える政治家がこの株の譲渡を受け、中には 1 億円もの売却益を得ていた者もいた。

そして年明け早々の昭和 64 年 1 月 7 日、昭和天皇が崩御され、翌 8 日、平成と改元されたわけである。

流行語には、中井貴一主演の大河ドラマ「武田信玄」の中でナレーション担当の若尾文子が発した決め台詞「今宵はここまでにいたしとうござりまする」、リクルート事件で指弾された政治家たちが責任回避のために発した言葉に由来する「妻が…、秘書が…」のほか、「5 時から男」「むかつく」「しょうゆ顔/ソース顔」などがあった。ヒット曲には「パラダイス銀河」(光 GENJI)、「乾杯」(長渕剛)、「人魚姫～ mermaid ～」(中山美穂)、「DAYBREAK」(男闘呼組)、「ANGEL」(氷室京介) などがあった。映画では「敦煌」(佐藤純彌監督)、「優駿」(杉田成道監督)、「となりのトトロ」(宮崎駿監督)、「火垂るの墓」(高畑勲監督)、「ベルリン・天使の詩」(仏独合作映画)、「芙蓉鎮」(中国映画)、「遠い夜明け」(イギリス映画)、「八月の鯨」(アメリカ映画) などがヒットした。

さて、この昭和 63 年度の旭川医科大学に目を転じると、5 月 25 日付けで臨床検査医学講座が開設されたことが特筆される。講座の新設は、昭和 60 (1985) 年 3 月に歯科口腔外科学講座が開設されて以来、4 年振りのことであった。既に昭和 51 (1976) 年 5 月には、附属病院設置準備の段階で中央診療施設の一つとして検査部が置かれており、内科学第二講座の石井兼央教授 (当時) が初代の検査部長を併任していたが、同年 10 月、北海道大学医学部附属病院検査部から牧野幹男氏が専任の部長・教授として着任し、その 1 か月後に附属病院が開院した。昭和 53 年 4 月には病理部が検査部から分離・独立した。さらにそれから 10 年を経て、検査部を母体に臨床検査医学講座が発足したわけである。初代教授には牧野教授が就任した。

講座発足に伴って牧野教授が広報誌「かぐらおか」第 57 号 (昭和 63 年 9 月 10 日発行) 誌上で抱負を語っている。今回はそれを紹介しよう。抱負のほか、講座名の命名の経緯、日本におけるこの種の講座の開設の歴史など、あまり知られていない興味深い話題がいろいろ提供されている。

(旭川医科大学 歴史・哲学 藤尾 均)

＝回顧資料＝

臨床検査医学講座の開設

臨床検査医学講座 教授 牧 野 幹 男

本年、昭和 63 年 5 月に本学に臨床検査医学講座が設置されることが決定された。これは長年にわたる歴代の学長、副学長さんの御努力によるのであるが、また各講座の先生方の御理解と御支援の賜物であり、深く感謝している。

講座の開設が決ったばかりで、その研究室等の場所、スタッフの構成も未定であり (来春、移動の予定)、目下の所従来のように病院検査部に同居して、開講のため準備を行っている状態である。

臨床検査を基礎にした講座は、日本では昭和 36 年に順天堂大学医学部に臨床病理学講座が置かれたのが最初であるが、以後私立大学ではそのほとんどに設置されている。国立大学ではそれより遅れて昭和 55 年に大阪大学に開講されたのが最初であった。次いで新潟大学、東北大学と続き、その後毎年数大学ずつ認められ既設の大学ではほとんどすべてに置かれている。本年いわゆる新設医大として最初に本学と愛媛大学に認められた訳である。

講座名については、私立および公立大学では「臨床病理学講座」とする所が大半であるが、中には病態診断学、検査診断学講座とする所もある。“Clinical Pathology”の日本名として臨床病理学の名がもっとも普遍的と思われるが、それは基礎医学の病理学講座と混同されやすいという議論があり、国立大学では当初病態診断学、臨床検査診断学の名を冠するものが多かった。しかしその後いろいろな議論の末、臨床検査医学という名称が次第に定着してきており、本学でもそれにならうこととなった。

以上の過去からの経過から理解されるように、本講座の基本的な目的は臨床検査技術を基盤に、従来の“内科診断学”を拡充・体系化し、それを診療面において実践することにある。本講座は当然のことながら、臨床講座の一つという認識の上に立っている。

医療の進歩は、

1) 治療法・治療技術の新しい発展、

- 2) より確実な病態診断をうるための臨床検査法の開発・発展、および、
- 3) 各種疾病予防法の確立、

の3本柱から成立している。臨床検査はそのいずれにも関与しているが、とくに2)と3)の分野で重要な役割を果たさなければならない。

近年でのX線CT、超音波断層法、NMR等の画像診断の華々しい登場が、医療の進歩に衝撃と加速を与えたことは記憶に新しいが、その他のいわゆる検体検査の領域でも発展が著しく、多様化と高度化が進んでいる。現在、検査項目数は約800種と算定されているが、年々約30～40種が増加するものと予想されその対応はますます困難な状況となっている。情報の多様化・複雑さは一方では統合的な解析による単純化を必要としている。

現在、診療科では領域別、臓器別の専門化が進行し、総合的な診断技法はともすれば忘れがちな傾向がある。そのためいくつかの大学では総合診療科(部)、プライマリ・ケア科などが置かれ活動を開始しており、その傾向は徐々に一般化してきている。

長い陣痛期を経てこの世に生を享けた臨床検査医学講座は将来に向って次の事項を目標にしている。

- 1) 新しい検査法・技術の開発と臨床的適用における問題点の解明：

これは従前から主として検査部において行なわれて来たことであるが、各診療科および検査部との連携のもとにさらに努力を傾けなければならない。個々の検査法についてだけでなく、多変量解析的手法や人工智能的アプローチが重要性を増してくるものと思われる。

- 2) 臨床予防医学的实践：

予防医学といえは特定の集団を対象とし、特定の疾患を念頭に置いて推進されて来た公衆衛生学的立場を想起されるかも知れない。臨床予防医学はそれに対し、個々の患者あるいは人を対象に、早期診断・早期治療、予知診断・発症予防・健康増進の理論的体系化を目的とするものである。他大学の同種講座では、すでに健康管理科、プライマリ・ケア科として実践している所もある。

以上の目標の発展のためには、各診療科の支援と若い医師の参加が必要である。若く活力のある医師の参加を切望している。

『旭川医科大学研究フォーラム』 投稿規程

平成12年 5月25日
平成13年 2月 5日
平成21年 2月 9日
平成21年 4月28日
平成24年 9月 5日
改正 平成24年 9月21日

投稿資格

1. 投稿者は、本学教員及び本学教員から推薦され編集委員会の承認を受けた者とする。

投稿原稿

1. 投稿原稿は、未発表の原著論文（事例・症例・調査報告等も含む）及び研究報告とし、それぞれの内容は以下のとおりとする。
 - ①原著論文：研究論文のうち、研究そのものが独創的で、新しい知見が論理的に示されており、医学・看護学等の知識として意義が明らかであるもの。
 - ②研究報告：資料的価値が高く、研究結果の意義が大きく、医学・看護学等の発展に寄与すると認められるもの。
2. 著作物の内容をデジタル化してハードディスク等の記録媒体に蓄積することにより、インターネット上で公開する。

原稿の提出

1. 図表を含めてオリジナル原稿1部、コピー2部を編集委員会に提出する。
2. 原則として12月発行の年1回とし、締め切りについては当該年度の第1回編集委員会で決定する。

原稿の掲載

1. 原稿の採否は、編集委員会が選んだ、査読員（レフェリー）による査読の結果を踏まえ、編集委員会が決定する。査読員は原則として学外者とする。
2. 平成16年度以降に博士の学位を授与された者における、当該博士論文掲載の可否については、大学院博士課程小委員会の議に基づき、編集委員会が決定する。

執筆要領

1. 原稿は、日本語又は英語で書かれ、研究目的・方法・結果・考察など、論文としての体裁が整っているものでなければならない。
2. 原稿は、原則としてパソコンによって作成し、日本語の場合は400字詰原稿用紙に換算して30～35枚程度、英語の場合はほぼそれに匹敵する情報量を目安とする。投稿の際には、定められたフォーマットで印字した原稿にCD、USBメモリー等を添える。
3. 原稿には、原則として、500字以内の和文抄録、200語以内の英文の抄録、5個以内のキーワード（和英併記）を付ける。
4. 原稿の記載順序は原則として、表題（和英併記）、著者名、所属部局名、要旨（和英）、キーワード（和英）、緒言、素材及び方法、結果、考察、総括又は結論、謝辞、注及び参考文献、図表説明とする。
5. 数字は算用数字を用い、単位は原則としてCGS単位による。特殊な単位を用いるときは、簡単な説明を加える。
6. 図表は本文とは別に1枚ずつ作成し、そのまま印刷可能なように明瞭に描く。写真は、原則としてモノクロで鮮明に紙焼したものに限る。図表・写真とも、番号と表題を付け、裏には論文名・著者名を明記する。また、本文中の挿入すべき箇所の右欄外にその位置を指定する。
7. 前項の規定にかかわらず、カラー写真の掲載が論文としての価値を著しく高めると著者が判断した場合は、当該写真のカラー掲載を申し出ることができる。
8. 人名・地名に原語を用いるほかは、文中の外国語にはなるべく訳語を付ける。
9. 引用・参考文献とその記載方法は次の基準による。
 - ① 主要文献のみを、本文中の引用・参照順に1)、2)、3)のように番号を付したうえで示し、対応本文の右上に同一の番号を記す。
 - ② 雑誌については、著者名：論文題名、雑誌名、巻（号）、頁－頁、年号（西暦）の順に書く。Index Medicus 所載の雑誌については、その慣用略称を用いる。
 - ③ 単行書については、著者名：論文題名、書名、編集者名、版、発行所、頁－頁、年号（西暦）の順に書く。
 - ④ 訳本は、原著者名：原書名（版）とその発行年次、訳者名、書名、頁－頁、発行所、年号（西暦）の順に書く。
 - ⑤ 著者複数の場合は、主著者を含め3名までを記載し、その他の共著者は‘et al’または‘ほか’として取り扱う。
10. 人文・社会科学あるいは語学関係の論文にあつては、上記の様式に合わせる事が望ましいが、各分野の慣例に従うことでも良い。

校 正

1. 校正は、著者が行う。校正に際しては編集委員会が認めたものを除き、原稿の改変を行ってはならない。
編集委員会

編 集 後 記

2014 年は、一流と言われている研究所や大学に所属する日本人研究者による捏造あるいはその疑いか濃い論文内容がいくつか報道されました。これほど多くの不正があちこちで行われていることが明らかになった年はなかったように思います。不正の検証作業が継続されているようですが、不正がなぜ起きたのか、その背景を知り、不正を撲滅するために検証結果をぜひとも公表してほしいと思います。

さて、旭川医科大学研究フォーラム第 15 巻をお届けします。本号では投稿論文が 1 編、依頼論文が 2 編、博士学位論文が 1 編、「独創性のある生命科学研究」報告が 27 編、「旭川医科大学と地元小・中・高との連携事業」報告が 3 編、「JICA 研修」が 1 編、エッセイ、学界の動向、本学教員執筆書籍紹介、旭川医科大学回顧資料などこれまでと同様、盛りだくさんの内容になっています。ぜひ、ご一読ください。

末筆ながら、大変お忙しい中、執筆、査読して下さい皆様にお礼申し上げます。

(H.H)

表紙解説

日本語で「恐竜」、英語で「dinosaur」と呼ばれてきた古代生物名の語源は、deinos「恐ろしい」と sauros「トカゲ」の合成語であるといい、命名者のリチャード・オーウェンは、「恐ろしいほど大きなトカゲ」の意味で用いたといっています。

恐竜の祖先が、地球上に最初に現れたのは、2億 8000 万年前であり、初期のものは比較的小型だったらしいのですが、特に草食性の恐竜はどんどん巨大化（24m, 80トン）していきます。その原因として考えられているのは、哺乳類の横隔膜を使った肺呼吸よりも、さらに高効率な酸素交換法：気嚢を獲得したこと（骨格の軽量化）により、恐竜は高い運動能力を獲得したことと、裸子植物が餌だったためとされています。この裸子植物は、食物としては分解されにくいものです。炭素と窒素の割合で炭素が高く分解されにくいのです。この分解しにくい裸子植物を餌として生活するには、長期間かけて多量の餌を消化管内で分解するために大型になりました。まさに、恐ろしいほど大きくなっていったのです。

その後、6600 万年前に絶滅したと言われています。原因としては、諸説あるのですが、現在最も有力なのは、隕石衝突説です。1991 年、メキシコ・ユカタン半島に直径 180km の巨大クレーターが発見され、岩石調査の結果、隕石特有のイリジウムが存在が認められました。この説では、地球規模の大火災で生態系が破壊され、衝突後に生じた塵埃が大気中に舞い、日光を遮断することで起きた急速な寒冷化が原因となり、恐竜を含む大型爬虫類をはじめとする多くの生物が絶滅したと主張されています。(Wikipedia 参照)

表紙をご覧ください。2億数千万年に渡って、闊歩してきた恐竜達に向かって、今まさに、巨大隕石が襲いかかろうとしています。そして、沢山の生物種が消えていくのですが、また、新たな生命誕生の期待も膨らんでいきます。

整形外科学講座 今井 充

本誌の刊行目的と編集方針

〈刊行目的〉

旭川医科大学の教官・研究生・大学院生等の学術研究の成果を広く公表するとともに、これを他大学・研究機関等が刊行する類誌と積極的に交換することにより、学術交流を推進し、本学の発展に寄与することを目的とする。

〈編集方針〉

投稿論文の採否は、編集委員会が委嘱した学外の審査員による査読の結果を踏まえ、同委員会が決定する。このほか、医学医療従事者等の生涯学習に資するため、編集委員会が執筆を依頼した論文等を、同委員会で点検のうえ掲載する。刊行は原則として年1回12月とする。

なお、編集委員会は、刊行後すみやかにインターネットの本学ホームページ及び学術成果リポジトリ AM CoR に本誌全文を掲載する。

平成13年7月（制定）

平成19年7月（一部修正）

平成21年4月（一部修正）

旭川医科大学研究フォーラム編集委員会

編集委員（五十音順）

伊藤 幸子（看護学講座）

柏柳 誠（生理学講座）

寺本 敬（数 学）

廣川 博之（経営企画部／副委員長）

藤尾 均（図書館長／委員長）

旭川医科大学研究フォーラム 第15巻（通算16号）

編 集 者 旭川医科大学研究フォーラム編集委員会
発 行 者 国立大学法人 旭川医科大学 代表 吉田 晃敏

〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1番地1号

TEL 0166-65-2221

FAX 0166-68-2229

印 刷 平成27年2月22日

発 行 平成27年2月22日
