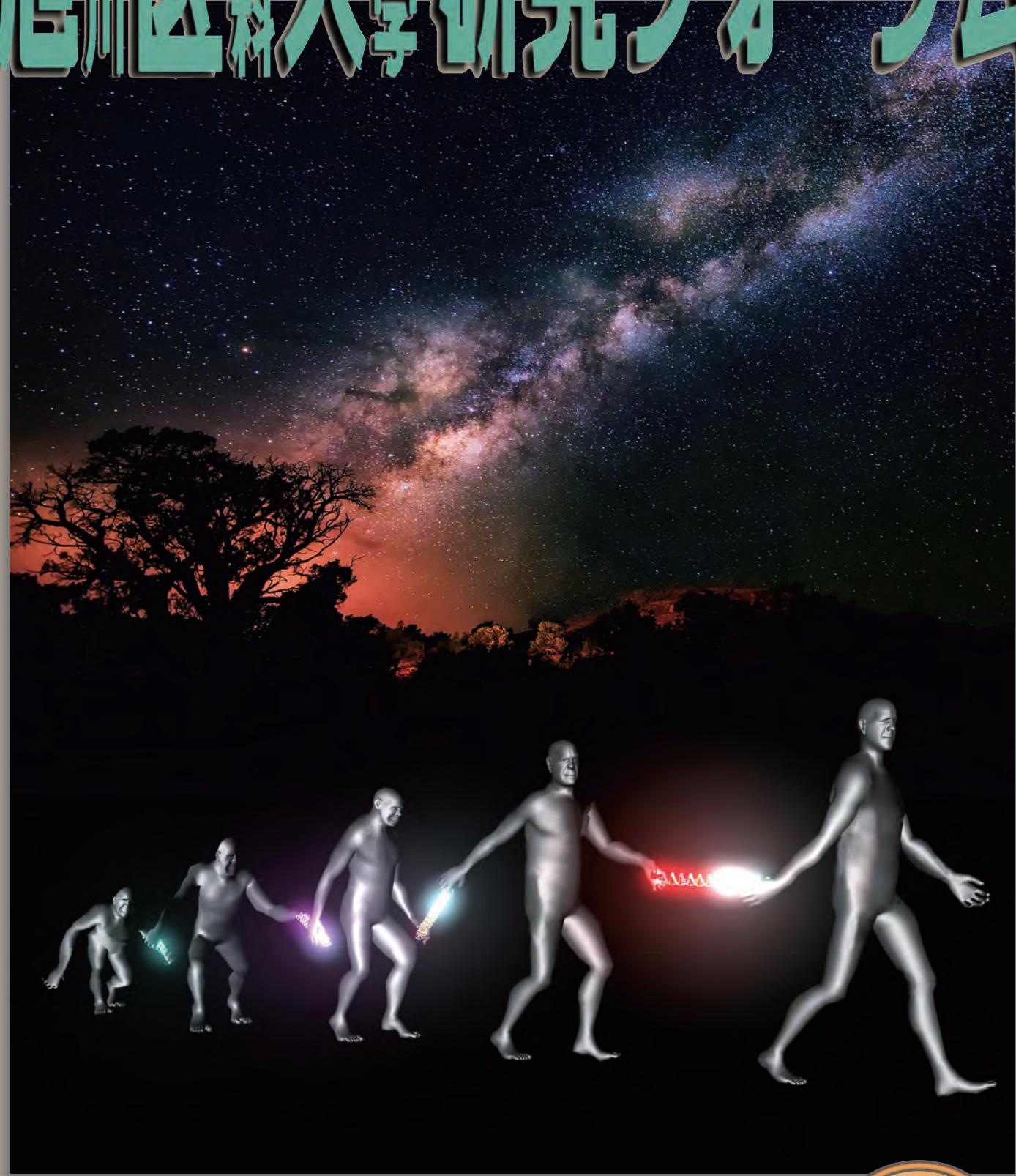


# 旭川医科大学研究フォーラム



Asahikawa Medical University Research Bulletin

2016  
Mar.  
Vol.16

# 旭川医科大学研究フォーラム 第16巻(平成28年刊) 目次

## 投稿論文

Prosody and Subject Ellipsis in <i>It Turns Out That</i> -Clause Construction.....	KUWANA Yasutomo	2
--	-----------------	---

## エッセイ

クロード・ベルナールと私.....	黒島晨汎	9
-------------------	------	---

## 依頼稿(報告)

### 平成25・26年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題

1) 新生児糖尿病における網羅的原因遺伝子検索.....	古谷曜子	11
2) ROTEMと一般凝固検査との比較検討.....	黒澤温	12
3) 骨髄由来血管内皮前駆細胞(EPC)の制御による肺癌肺転移の制御.....	南幸範	13
4) パーキンソン病薬物治療における薬物動態関連遺伝子情報応用の検討.....	山本譲	15
5) 多発性硬化症における再髓鞘化療法を目指した基盤研究.....	板東良雄	16
6) LH/FSH産生細胞における細胞内蛋白分解系制御システムの解明.....	暮地本宙己	17
7) TRPCノックアウトマウスを用いた瞳孔括約筋収縮機構の解明.....	金子智之	18
8) 新規抗不安薬の恐怖情動に対する定量的評価系の確立.....	宮園貞治	19
9) 生殖腺体細胞の性差構築の分子機構の解析.....	矢澤隆志	20
10) プロスタグランジンF <sub>2</sub> αによるヒト血小板の機能調節に関する研究.....	柏木仁	21
11) 解糖系制御によるマウス肝細胞の分化調節メカニズムの検討.....	藤井清永	22
12) 好中球、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージにおけるMDL-1の機能と役割について.....	青木直子	24
13) 胎生期における、自然免疫分子コレクチンCL-K1の形態形成における機能解析.....	森健一郎	25
14) 食品中に含まれるホルムアルデヒドが消化管粘膜免疫機構に及ぼす影響.....	中木良彦	26
15) マタニティヨガの周産期予後改善効果に関する研究.....	川西康之	28
16) 多包虫がもつ宿主補体活性からの逃避機構の解明.....	佐々木瑞希	28
17) 膵癌浸潤、転移における長鎖ノンコーディングRNAによる制御機構の解明.....	高橋賢治	29
18) マウス脂肪肝の肝内鉄蓄積における鉄代謝調節因子ヘプシジン発現異常のメカニズムの解明.....	長谷部拓夢	31
19) MRエラストグラフィーを用いた先天性心疾患術後の肝硬変の評価.....	杉本昌也	34
20) フラクタル理論を用いたマイクログリア形態解析による糖尿病網膜症の超早期診断法の確立.....	下内昭人	36
21) IgA腎症扁桃におけるCX3CR1の検討.....	大高隆輝	38
22) ヒト男性不妊症と習慣流産の原因遺伝子同定および臨床医学への応用.....	上田寛人	40
23) PET-Tなどの医用画像における次世代の部分容積効果補正効果付き解像度増加アルゴリズムの開発.....	沖崎貴琢	41
24) 脂肪組織由来幹細胞を用いた低浸襲細胞治療に関する研究.....	岡久美子	42
25) 近赤外分光法を用いた注意欠如/多動性障害の診断補助法の確立.....	池上将永	45
26) 骨梁微細構造解析への計算ホモロジーの展開.....	寺本敬	47
27) カルシウムイオノフォア処理によるマウス未熟精子の生理的機能獲得.....	日野敏昭	48
28) オゾン水による抗がん薬の不活化・除去効果の検討.....	小野尚志	50

### 平成25・26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

ウェラブル空中超音波連続波ドプラを用いた新規尿流測定装置の有用性と実用化.....	松本成史	52
---	------	----

脳信号解読による運動・言語機能検出/刺激による脳疾患治療/代替法の開発.....	鎌田恭輔	57
--	------	----

アジアにおける人獣共通寄生虫感染症対策:迅速診断・蔓延度推定の技術確立と感染撲滅に向けた国際保健医療貢献.....	迫康仁	68
---	-----	----

長鎖ポリリン酸の鎖長解析技術および腸溶剤化技術の開発.....	藤谷幹浩	72
---------------------------------	------	----

旭川医科大学におけるアートインホスピタルの試み.....	服部ユカリ・菊地まり子・上田順子・守屋潔・大坪智美	77
------------------------------	---------------------------	----

旭川医科大学教育研究推進センター動物実験技術支援部門と熊本大学CARDとの連携した生殖工学技術研修の報告.....	清水範彦	80
---	------	----

2015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	82
--	----------------------	----

## 学会の動向

第24回(一社)日本有病者歯科医療学会総会・学術大会開催のご報告.....	松田光悦	94
---------------------------------------	------	----

第119回日本眼科学会総会を終えて.....	石子智士輔	96
------------------------	-------	----

第30回日本生体磁気学界を終えて.....	鎌田恭輔	99
-----------------------	------	----

## 本学教室員執筆書籍の紹介

「こんなに役立つ!肺エコー」.....	鈴木昭広	101
---------------------	------	-----

「救急エコースキルアップ術」.....	鈴木昭広	102
---------------------	------	-----

## 旭川医科大学回顧資料(17) 平成元(1989)年度

旭川医科大学同窓会創立10周年.....	藤尾均	103
----------------------	-----	-----

投稿規程.....		108
-----------	--	-----

編集後記・表紙解説.....		109
----------------	--	-----

## 投稿論文

# Prosody and Subject Ellipsis in *It Turns Out That*-Clause Construction

KUWANA Yasutomo \*

### 【Summary】

This paper discusses the prosody of what is called *it turns out that*-clause construction. It has been observed that while the construction typically has the formal subject *it* that refers to the following *that*-clause, it can also appear without the subject, and the two versions, *it turns out that*-clause construction (the full version) and the one without the formal subject *it* (the elliptical version), have been described and analyzed in semantic terms. The question to be addressed is whether they differ prosodically. The results of the analyses of pitch and pauses in the spoken data reveal that, in the elliptical version, the downward pitch movement from *turns* to *out* is greater and the pause duration between *out* and its following word are longer than those of the full version. It is argued that, in terms of prosody, the phrasal verb in the elliptical version is more like a compound serving as a comment clause. Prosodic variations observed in the data of the full version are also discussed.

**Key words** *it turns out that*-clause construction, subject ellipsis, pitch, pause

### Introduction

This paper discusses the prosody of *it turns out that*-clause construction, as is called in Otake (2013b). This construction contains the phrasal verb *turn out*, which is syntactically classified as the same group of verbs and phrasal verbs as *seem*, *appear*, *happen*, and *come about* in that they may be followed by a *that*-clause, or an extraposed subject.

(1) It seems that you are mistaken.

(Quirk *et al.* 1985: 1183)

While this type of *that*-clause is cataphorically referred to by the formal subject *it* that usually appears as the sentential subject, the formal subject in *it turns out that*-clause construction can be replaced by other nominals and it can be deleted without any nominal occupying that position:

- (2) a. Forrest reports enemy have burned Chattanooga & fled—the truth turns out that he has never been within three miles of the place & the enemy are still there ...  
b. First thing of course was to find the dogs. Which turns out, they were holed up back of the—the place where the little kids go, ...  
c. And that adjustment is really hard, especially for those who have post-traumatic stress disorder or traumatic brain injury. That turns out that one unfortunately common result is suicide.  
d. 'Course, we found out what was going on in the end. Lee Jordan's dad had had a bit of trouble getting money off Bagman as well. Turns out he's in big trouble with the goblins.

(Otake 2013a: 10-14; underlines in original)

Otake (2013a: 4) claims that, in spite of its high fre-

\*旭川医科大学 英語

quency in use<sup>1</sup>, previous studies of *it turns out that*-clause construction have been inadequate in that they fail to describe its actual usages, and he attempts to provide a semantic explanation to the construction and consider the mechanism of the ellipsis of the formal subject. He argues that the subject can be deleted if the semantic cohesion between the preceding sentence and the one of the construction is reinforced by such discourse markers as *weird thing is* and *the long and short of it* intervening the two sentences<sup>2</sup>:

- (3) a. “We inspected the car, but it contained no bomb or weapons,” Marine Sgt. Michael Shahinian, 25, said.  
“Weird thing is, turns out the call came from this guy Bobby Adcock, who was two grades above me at Bakersfield High School.”
- b. So when I saw a BBC headline about a ‘tipsy gene’ protecting against alcoholism I had to learn more.  
The long and short of it: turns out my being a light-weight could be a good thing.

(Otake 2013a: 19-20; underlines in original)

However, it is not clear why this is so, considering the fact that, as Otake (2013a) himself notes, these types of discourse marker can also appear in cases where the formal subject *it* actually occurs in this construction.

In terms of prosody of *it turns out that*-clause construction, there seem to have been few studies. As for the stress assignment of phrasal verbs composed of a verb and particle in general, it is pointed out that the primary stress is assigned on both of the elements (Watanabe 1994: 95). In case of *turn out*, however, the description of its stress assignment varies among linguists:

- (4) a. túrn óut      b. túrn óut

Konishi and Minamide (2001: 2308) assign the primary stress on the second element and Takebayashi(2002: 2649) on both of the elements. Indeed, Inoue and Yagi (2008: 56) argue that the descriptions of stress assignments on idiomatic expressions in English-Japanese dictionaries may be inconsistent and inaccurate, and that, for English language teaching in Japan, more descriptive prosodic analyses of the

current English are necessary.

Reviewing the previous studies concerning *it turns out that*-clause construction, I would like to address the question whether the two versions, *it turns out that*-clause construction (the full version) and the one without the formal subject *it* (the elliptical version) differ prosodically. The purpose of this investigation is twofold. One is to describe prosodic properties of each version, and the other is to discuss the results of the prosodic analyses in detail.

The organization of this paper is as follows. Section 2 describes the method of data collection and its analyses. Section 3 shows the results of the analyses and illustrates a representative example of each version. Section 4 discusses of the results in detail. Section 5 summarizes the discussion and concludes the paper.

## Method

In order to investigate the prosody of the two versions of *it turns out that*-clause construction, I collected a total of 30 pieces of spoken data (a half of them contains the full version and the other half the elliptical version) at *Scientific American*, an American science magazine, whose website offers podcasts that report scientific articles. Using a speech analysis software, *Praat*, I judged the pitch (Hz) of *turn* and *out* and calculated the pitch difference between them. I also measured the pause duration (second) between *out* and its following word. I analyzed the results by *t*-test to see if there is any statistically significant difference between the two versions in pitch and pause.

## Results

The results of the investigation are listed in Tables 1 and 2 below, which reveal that, in the elliptical version, the downward pitch movement from *turns* to *out* is greater and the pause duration between *out* and its following word are longer than those in the full version ( $t=2.01$ ,  $df=28$ ,  $p<.05$  and  $t=2.79$ ,  $df=28$ ,  $p<.01$  respectively). The typical example of each version, No. 13 and No. 18, is shown along with its linguistic context in (5) and (6) and their pitch analyses in Figures 1 and 2 below.

**Table 1**

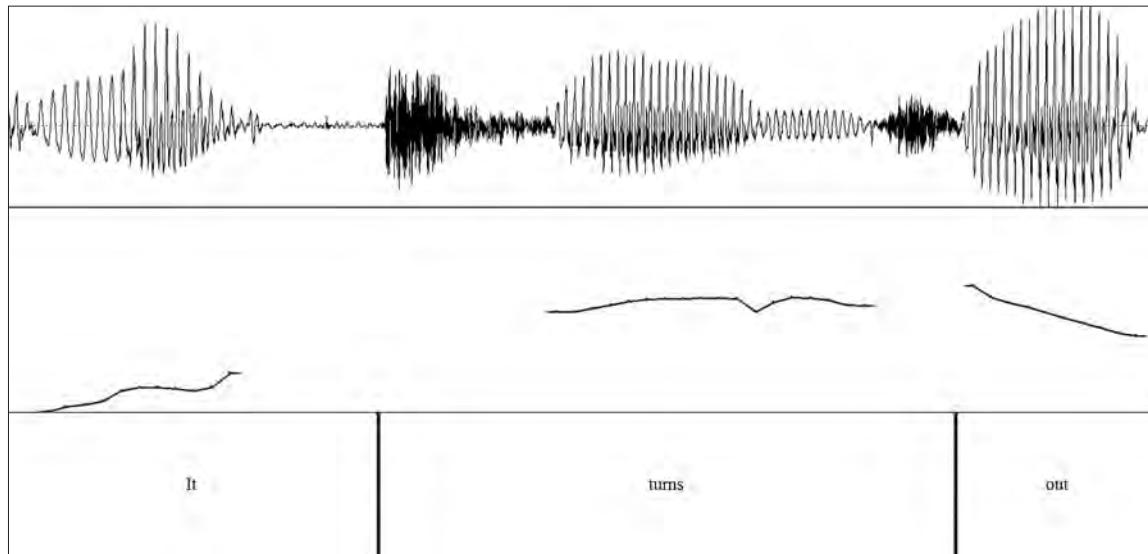
*Pitch of (A) Turns and (B) Out, Pitch Movement between (A) and (B), and Pause Duration between (B) and Its Following Word in the Full Version*

No.	Pitch (Hz)			Pause (Sec.)
	(A) turns	(B) out	(A) - (B)	
1	145.0	137.0	8.0	0.02
2	178.9	155.6	23.3	0.00
3	206.6	177.7	28.9	0.05
4	183.5	120.6	62.9	0.10
5	165.3	238.9	-73.6	0.07
6	204.7	191.0	13.7	0.00
7	231.1	174.6	56.5	0.00
8	101.0	72.6	28.4	0.05
9	151.1	247.5	-96.4	0.02
10	168.1	128.4	39.7	0.03
11	134.2	243.8	-109.6	0.09
12	136.2	131.6	4.6	0.00
13	175.6	173.8	1.8	0.00
14	227.7	210.3	17.4	0.00
15	221.1	218.2	2.9	0.05
Ave.	175.3	174.8	0.6	0.03

**Table 2**

*Pitch of (A) Turns and (B) Out, Pitch Movement between (A) and (B), and Pause Duration between (B) and Its Following Word in the Elliptical Version*

No.	Pitch (Hz)			Pause (Sec.)
	(A) turns	(B) out	(A) - (B)	
16	244.0	82.5	161.5	0.31
17	184.8	154.4	30.4	0.00
18	184.0	149.7	34.3	0.13
19	217.8	183.1	34.7	0.02
20	219.5	194.5	25.0	0.10
21	154.1	182.7	-28.6	0.12
22	146.8	130.2	16.6	0.00
23	226.8	192.7	34.1	0.08
24	187.0	122.0	65.0	0.11
25	180.5	79.1	101.4	0.08
26	86.9	137.3	-50.4	0.44
27	223.7	171.8	51.9	0.19
28	192.8	164.6	28.2	0.07
29	157.3	137.6	19.7	0.00
30	210.4	167.9	42.5	0.21
Ave.	187.8	150.0	37.8	0.12

**Figure 1** *Pitch Analysis of No. 13*

### (5) No. 13

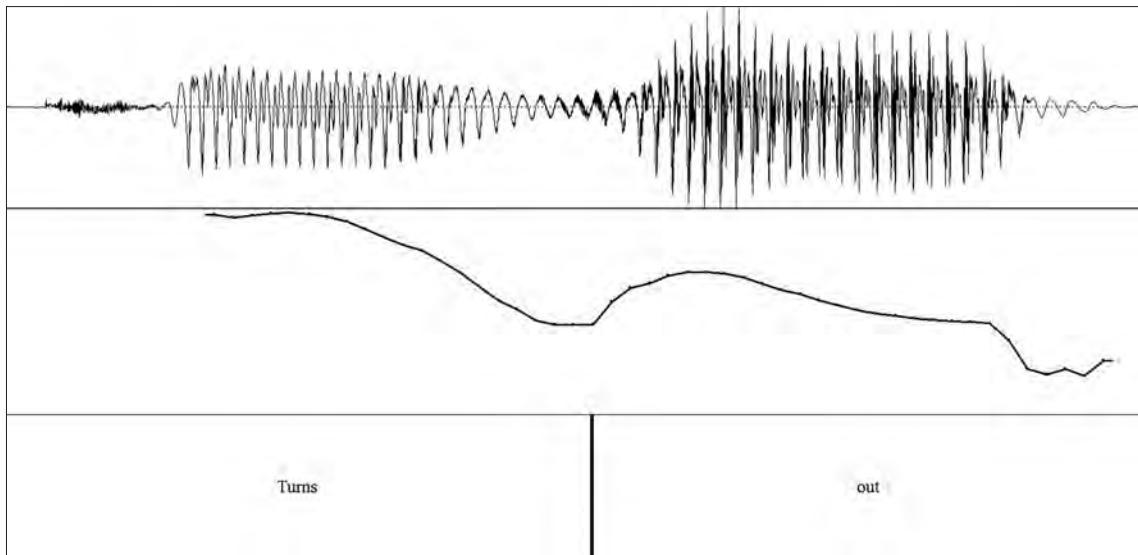
Now it's this latter muscle that's involuntary, so the crows feet smile is considered the real spontaneous emotion and is known as the Duchenne smile. It turns out the real thing has a lot of power.

(<http://www.scientificamerican.com/podcast/episode/what-makes-an-honest-smile-honest-10-12-11/>; underline added)

### (6) No. 18

And the type of plants that thrived after the impact were different as well. Blonder and his colleagues studied thousands of fossil leaves from North Dakota, spanning about a million years both before and after the impact. … Turns out that after the impact, the fossil record has more deciduous-looking leaves…

(<http://www.scientificamerican.com/podcast/episode/dino->

Figure 2. *Pitch Analysis of No. 18*

devastator-also-ravaged-veggies1/; underline added)

Based on the analyses in this section, it can be argued that, in the elliptical version, the stress assignment of *turns out* is characterized as the relatively high pitch on *turns* and the pause duration between *out* and its following word suggests the separation of *turns out* from the rest of the sentence, both of which are in sharp contrast with those of the full version.

In the next section, I discuss the results presented in more detail.

## Discussion

In this section, I discuss the prosodic differences observed in the previous section and argue that *turns out* in the elliptical version is more like a compound functioning as a comment clause as is defined by Quirk *et al.* (1985). I also discuss some specific examples of the full version that seem prosodically similar to those of the elliptical version and point out that their prosodic property is due to a rhythmic reason.

### 4.1 The status of *turns out* in the elliptical version

The results of the analyses show that there are prosodic differences between the two versions in the pitch movement and the pause duration. In the elliptical version, the pitch on *turns* is higher than that of *out*, and hence the downward

contour takes place, and the phrasal verb is separated from the rest of the sentence by a pause. These differences are most likely due to the possibility that, unlike the one in the full version, *turns out* in the elliptical version is more like a compound independent from the rest of the sentence serving as a comment clause. In what follows, I show the general characteristics of compounds and comment clauses, and discuss *turns out* in the elliptical in those terms.

First, it is well-known that, in a concatenation of two nouns, the positions of the primary and secondary stresses depend on whether it is a phrase or a compound; the former receives the primary stress on the second element and the latter on the first element.

#### (7) a. Phrase

blàck bòard dàrk róom

#### b. Compound

bláckbòard dárk ròom

*Turns out* in the two versions of *it turns out that*-clause construction can be considered parallel to the contrast between (7a) and (7b) above. In terms of the stress assignment, *turns out* in the elliptical version is similar to that in (7b) and hence the phrasal verb can be treated as a compound. Indeed, look at (8a) and (8b) below, in which the stress assignment of the concatenations of a verb and a particle and their corresponding compound nouns are shown<sup>3</sup>:

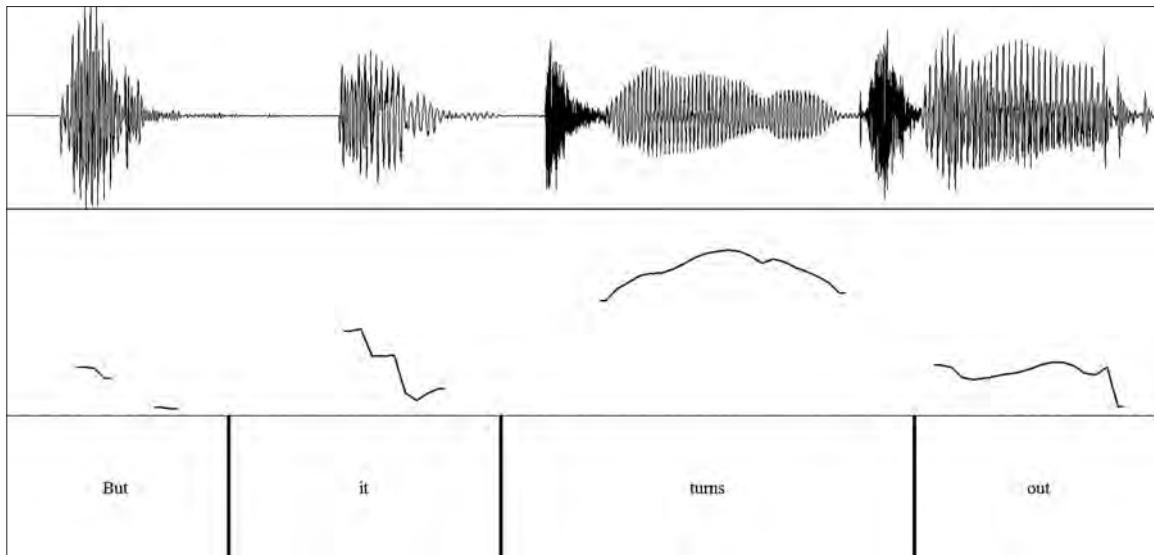


Figure 3 Pitch Analysis of No. 4

## (8) a. Verb and Particle

bréak dòwn stànd bý tåke óff  
 (Konishi and Minamide 2001)

## b. Compound Noun

bréak dòwn stándbý tåke óff  
 (Namiki 1985: 92)

Therefore, *turns out* in the elliptical version can be said to be compound-like.

Second, the pause between *out* and its following word in the elliptical version shows the detachment of *turns out* from the rest of the sentence. That further implies that *turns out* can be considered a comment clause, not a main verb of the sentence. Quirk *et al.* (1985: 1112) define a comment clause as a parenthetical disjunct that may appear at various positions with a separate tone unit. Consider (9) below, in which the thin vertical lines and the thick vertical lines represent the beginning and the end of the tone unit respectively:

## (9) a. You |know (that) I think you're WRÖNG|.

[*You know* is a matrix clause]

## b. You KNÖW, |I think you're WRÖNG|.

[*You know* is a comment clause]

(Quirk *et al.* 1985: 1113)

*Turns out* in the two versions of *it turns out that*-clause

construction can be considered parallel to the contrast between (9a) and (9b) above. In terms of the pause duration forming tone units, *turns out* in the elliptical version can be seen as a comment clause.

## 4.2 Variations in the full version

Although the difference between the average of the pitch movements in the full version and the elliptical version is statistically significant, a careful look at Tables 1 and 2 suggests that the former contains more inconsistent data than the latter. That is, some of the data in the full version are opposite to its general tendency. Here, I discuss why that is the case.

Consider the data of No. 4 in Table 1. Its pitch movement and the pause duration are 62.9 Hz and 0.10 seconds, which means a downward movement with a longer pause duration. This may be due to a rhythmic reason. Look at the sentence and its linguistic environment in (10):

## (10) No. 4

Take, for example, bees. These flying foragers are renowned for their ability to remember which flowers are best and where to find them. But it turns out bees can be boggled. (<http://www.scientificamerican.com/podcast/episode/animals-can-be-given-false-memories/>; underline added)

In No. 4, the construction in question is preceded by the

**Table 3**

*Pitch Movement between Turns and Out, Pause Duration between Out and Its Following Word, and the Words Preceding the Full Version*

No.	Pitch Movement (Hz)	Pause(Sec.)	Preceding Word
2	23.3	0.00	<i>Well</i>
3	28.9	0.05	<i>But</i>
4	62.9	0.10	<i>But</i>
5	-73.6	0.07	<i>But</i>
6	13.7	0.00	<i>But</i>
7	56.5	0.00	<i>So</i>
14	17.4	0.00	<i>Because</i>
Ave.	18.4	0.03	—

conjunction *but*, which may lead to the succession of the two function words, *but* and *it*, neither of which is stressed. Rhythmically, in that case, *turns* rather than *out* is predicted to be stressed. If *out* were to be stressed instead of *turns*, there would be a series of three unstressed words and it would be undesirable. Table 3 below lists the result of the analyses of the seven instances in which the construction is preceded by a function word. It shows that, with the exception of No. 5, the explanation above applies to all the instances<sup>5</sup>.

Given this argument is on the right track, it can be argued that the pitch of *turns out* in *it turns out that*-clause construction depends on the presence of its preceding words, or the formal subject *it* and a function word, and their realization in pitch<sup>4</sup>.

To summarize, the results of the prosodic analyses in this paper suggest that, in terms of the stress assignment of *turns* and *out* and the pause duration between *out* and its following word, the elliptical version is more like a compound and a comment clause detached from the subordinate clause. Prosodic variations observed in the full version may be due to the preceding word affecting rhythm.

## Conclusion

This paper discussed the prosody of the two versions of *it turns out that*-clause construction, the full version and the elliptical version. In order to answer the question whether they differ prosodically, the relevant pitch and pauses were analyzed. The results revealed that, in the elliptical version, the downward pitch movement from *turns* to *out* is greater

and the pause duration between *out* and its following word are longer than those of the full version, which implies that, in terms of prosody, the phrasal verb in the elliptical version is more like a compound and a comment clause which is separated from the rest of the sentence.

In conclusion, it must be reminded that a more sufficient amount of data is necessary to strongly support the argument of this paper. It is also important to discuss theoretical implications of this study. I leave these tasks for the future research.

## Acknowledgement

I would like to thank a reviewer for numerous helpful suggestions and comments. I am also grateful to Michael Skains for suggesting stylistic improvements.

## Notes

1. In order to investigate the frequency of phrasal verbs used in conversations by native speakers in the United States, Lee (2015) conducts a corpus-based study, the result of which shows that *turn out* is ranked as 13th among the top 25 phrasal verbs in an academic spoken corpus.
2. The other discourse markers Otake (2013a) notices are: *the funny thing is, anyway, in any event, and in the end*. In the present paper, however, neither of these nor any markers whatsoever are found preceding the construction in the elliptical version. In the full version, as is shown in 4.2, some examples have a conjunction and an interjection preceding the construction.
3. According to Takebayashi (2002: 311), the primary stress is assigned on both elements of the combination of the verb and particle, *break down*, which is the same kind of inconsistency as in (4) in Section 1.
4. The presence/absence of the conjunction *that* can affect the prosody of *turns out* in each construction, and it can be interrelated to the ellipsis of the formal subject *it*. While the conjunction *that* appears seven times out of the 15 examples investigated in the full version, it appears four times in the elliptical version. I leave these issues for the future research.

5. In No. 5, although the construction is preceded by *but*, the pitch movement between *turns* and *out* is upward. This might be attributable to the strong accent on *but* in this particular instance, which is not the case in the other six instances.

#### References

- Inoue, A. & K. Yagi (2008) “A problem of phonetic notation—Stress patterns of particles in phrases in English-Japanese dictionaries,” *The English Phonetics Society of Japan* 11:12, 55-69.
- Konishi, T. & K. Minamide (2001) *Taishukan's Unabridged Genius English-Japanese Dictionary*. Tokyo: Taishukan Shoten.
- Lee, J.-Y. (2015) “The use of English phrasal verbs in American spoken corpora,” *International Journal of Language Studies* 9 (2), 27-48.
- Namiki, T. (1985) *Go keisei (Word Formation in English)* . Tokyo: Taishukan Shoten.
- Otake, Y. (2013a) “The semantic properties of the S + *turn* + *out* (+ *to* + *be* + *that*) -clause construction,” *Universality and Individuality in Language* 4, 1-25.
- Otake, Y. (2013b) “A descriptive analysis of the it turns out that-clause construction with the simple present tense,” *Niigata Studies in Foreign Languages and Cultures* 18, 13-26.
- Quirk, R., S. Greenbaum, G. Leech, and J. Svartvik (1985) *A Comprehensive Grammar of the English Language*. London: Longman.
- Takebayashi, S. (2002) *Kenkyusha's New English-Japanese Dictionary*, 6<sup>th</sup> edition. Tokyo: Kenkyusha.
- Watanabe, K. (1994) *Eigo no rhythm/intonation no shido (Teaching English Rhythm and Intonation)* . Tokyo: Taishukan Shoten.

## エッセイ



### クロード・ベルナールと私

黒 島 晨 汎

昨年（2015年）12月、私は、此の度の叙勲を機に、かねてより敬愛して止まない「生理学の父」クロード・ベルナール（1813～1878）の全集（全19巻）、および彼に関する研究資料を、旭川医科大学図書館に寄贈した（写真）。そのほとんどが現在の日本では極めて手に入りにくい貴重書である。殊に全集の方は、現在、日本の図書館でこれを全巻揃って所蔵している大学は皆無と思われ、旭川医大の貴重な「お宝」となることは間違いない。

また、今回の寄贈に合わせ、本年（2016年）6月15日には、旭川医科大学フォーラム第100回記念の会において、「クロード・ベルナールと私～図書館へのベルナール全集寄贈を機に～」と題して講演することになった。

以下は、予定されているその講演内容のレジュメの一部である。



1848年ベルナールはコレージュ・ド・フランスでの最初の講義を“これから私がここで話さなければならない科学的医学はまだ存在しない”という言葉で始めた。それから1878年に没するまでの30年に亘るベルナールの生涯はまさしくそれまでの単に経験と観察に基づいていた医学（観察医学）を実験的探究に基づく科学的医学に変革するために捧げられたといえる。勿論ベルナールの展開した実験医学の世界がベルナールのみが主張した独創的なものと考えるのは正確ではない。ベルナールが説いた実験医学的方法論は、フランスでは彼の師マジャンディーが、またドイツではヨハネス・ミュラーとその門下のルドヴィヒ、ヘルムホルツ、デュボアーレイモン、ブリュッケら俊英たちによって相前後して推進されていた。しかしへルナールの自分自身の研究体験に基づく考察によって展開された議論はその後の医学の発展に大きな影響と有益な示唆を与えるものである。その主な思索の成果は次の2点にまとめられる。

#### 1 生理学、医学における研究方法の確立

『実験医学研究序説』（1865年）で研究における三段階の方法：「事実の観察—予備的説明（仮説）—仮説の検証」を具体的な研究で示し、生体の決定論的特性を明らかにした。

#### 2 生体の内部環境の認識の確立

最後の著作「動物および植物に共通の生命現象に関する講義」（1878年）のなかで次のように述べている。：“動物にとって実際には二つの環境、生体が置かれている外部環境と、組織の要素が生きている場である内部環境とがあるという考えを最初に主張したのは私である。”

“内部環境の定常状態が自由で独立した生命の条件である。”

“生命の機構はすべて、どのように変わっても、常に唯一の目的、すなわち内部環境のなかでの生命のための諸条件の統合性を維持するということにある。”

\* \* \*

私はこれまで、ベルナールの更なる理解に資するためにその足跡を辿ってみたいと、ベルナールの活動したフ

ランスの地を何度か訪ねてきた。以下は、かつて私が「北海道医報」第 500 号（1980 年 11 月 1 日発行）に寄稿した「クロード・ベルナールへの旅」と題するエッセイの全文である。ここに転載し上記講演の参考に供したい。

今年の 7 月 25 日、パリ・ペレティエ通りのシャモナール古書店でベルナール全集 19 冊を目にした時の感慨は終生忘却得ない。夢にまでみた瞬間であった。夢にまでみたベルナールとの邂逅であった。19 世紀の初めフランスは医学の分野で世界の先頭を切っていた。またフランスは現代医学の出発の地でもあった。現代医学は 19 世紀のパリを中心とした純粋に経験主義に基づく「病院の医学」と実験科学としての医学を目指す「研究室の医学」の統合の過程によって第一歩を踏み出した。このような医学の一大転換期の中心人物が「生理学そのもの」と言われた実験医学の祖、生理学者クロード・ベルナール（1813～1878）であることは彼の著書『実験医学研究序説』とともに良く知られている。彼の著作全集が没後 3 年を経て 1881 年に出版されてベルナール研究の基本的参考文献になっていることを知ったのは生理学の研究生活に入ってから間もなくであった。「科学は心を怠惰にさせる。どうか諸君、科学はもう少し少なく、技術はもう少し多く」と主張する人物が当時の医学界の大物として君臨し、観察と経験のみに基づく医学が主流であった時代に研究室の医学を主張し、現代医学の基盤を創りあげたベルナールは単なる優れた研究者であるばかりでなく医学の革新者として評価されるべきであり、この認識なしにベルナールを真に理解することはできないと考えられる。研究生活を通して段々とこのようなベルナールへの理解が深まるにつれて、彼の思索と業績を全体として追体験することが自分の選んだ道を進む上にどうしても必要なのだと思うようになってきた。そのためにはどうしてもベルナール全集を繙読しなければならない。しかし仄聞したところでは我が国ではベルナール全集は東北大学に所蔵されているのみで、個人の所有は分からぬという。以上のような理由でこの十数年間ベルナールの全著作を手にしてその息吹を汲み取り、この偉大な医学者の理解と自分の発展のための推進力にしたいと願ってきた。そして欧米の主な医学専門の古書店のカタログを取り寄せ探索を続けたが遂に見つけることができなかった。1978 年ベルナール没後 100 年記念シンポジウムが米国スタンフォードで開催されその記録単行本を手に入れて読むことができたが、やはり全集を持たなければ想いは募るばかりであった。

店主シャモネール氏と「自分は日本の生理学者で今ハンガリーの国際生理科学会議からの帰路であり、持ち合せが充分でない。しかしへルナールは私の敬愛して止まない人物でこの全集（165,000 フラン）は長年探していたものでは非欲しい。帰国してから工面をして送金するから待ってくれないか。」「よろしい、送料（480 フラン）はこちら持ちで航空便で送ってあげましょう」と交渉が成立した。9 月 3 日、待望のベルナール全集は無事届いた。この全集は全集のために再製版して印刷したものではなく、ベルナールの生前、没後に刊行された著作の初版を革装丁してそれに索引、評伝の一巻を加えて全集としてまとめたものである。手前に開いてあるのは『実験医学研究序説』の初版本（1865 年）である。従って一冊一冊からベルナールが生き生きと話しかけてくれるような思いがする。今ベルナール全集を手に、妻や子に理解されることのなかつた寂寥とした私生活を送ったが、医学界の巨匠として多くの人々から愛され、搖ぐことのない尊敬を勝ち得た我がベルナールの偉大な思索をどれ程わがものにできるであろうかと思い、心して励めと言い聞かせているところである。（1980.9.17 記）

（くろしま・あきひろ 旭川医科大学名誉教授 元生理学第一講座教授 元図書館長）

## 依頼稿（報告）

# 平成 25・26 年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題

### 1) 新生児糖尿病における網羅的原因遺伝子検索

研究代表者 古谷 曜子

#### 【目的】

新生児糖尿病 (NDM) は単一遺伝子異常により引き起こされる生後 6 か月以内に発症する糖尿病である。経過から一過性 (TNDM) と永続性 (PNDM) に分類される。本研究では、NDM 症例において既報の原因遺伝子を網羅的に検索することを目的とした。

#### 【方 法】

1987 年 12 月から 2013 年 1 月までに発症した NDM 71 症例を対象とした。TNDM の 51 症例については、6q24 領域のメチル化解析と pUPD、重複の解析を行った。陰性例、発症 6 か月以降の PMDM 症例は、*KCNJ11*、*ABCC8*、*INS*、*HNF1A*、*HNF1B*、*HNF4A* の解析を行った。また合併症、経過などから、*FOXP3* 遺伝子解析を 1 例、*GATA6* 遺伝子解析を 2 例行った。各遺伝子の解析は coding exon および exon-intron 境界部について PCR-ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

#### 【結 果】

71 例の発症日齢は中央値 13 (0-133)、在胎週数の中央値 38 週 3 日 (24 週 1 日 - 41 週 3 日)、出生体重は 2030.0±681.3g、発症時の血糖値は 574.7±345.3g であった。TNDM は 39 症例 (54.9%)、PNDM は 32 症例 (45.1%) であった。発症日齢、在胎週数、出生体重、発症時血糖とともに TNDM は PNDM と比較し有意に小さい結果であった。

71 症例中 52 症例 (73%) に遺伝子異常を認めた。*KATP* チャネル異常は 26 症例 (36.6%) であった。6q24 異常、*KCNJ11* 異常はともに 21 症例で最多であった。次いで *ABCC8* で、*INS*、*GATA6* は 2 例、*FOXP3* は

1 例であった。

TNDM では、6q24 異常が 21 例で最も多く、次いで *KCNJ11*、*ABCC8* の順であった。*KATP* チャネル異常は 22% を占めた。PNDM では、*KCNJ11* が 16 例と半数を占め、*ABCC8*、*GATA6*、*INS* が 2 症例であった。*KATP* チャネル異常 26 例中 18 例 (69%) が PNDM であった。

表 I NDM71 症例の概要

	TNDM	PNDM	p
性別 (M/F/NA)	22/16/1	17/9/6	
発症日齢 (day)	8.5(0-60)	45(8-133)	0.02
在胎週数 (wk)	36.5(23.5-41.3)	39.2(34.2-41.3)	0.001
出生体重 (g)	1810.6±681.4	2336.0±562.1	0.01
発症時の血糖 (mg/dl)	425.5±239.5	801.9±361.8	0.001

#### 【考 察】

6q24、*KCNJ11*、*ABCC8* は既報と同様の結果だった。*INS* については少なく、日本人の特徴であると考えられた。

表 II NDM の原因遺伝子の割合

	既報	本検討
6q24 (%)	22.0 1)	29.6
KATP チャネル異常 (%)	36.4 2)	36.6
<i>KCNJ11</i> (%)	26.2 2)	29.6
<i>ABCC8</i> (%)	10.2 2)	7.0
<i>INS</i> (%)	11.6 2)	2.8
<i>GATA6</i> (%)	No report	2.8
<i>FOXP3</i> (%)	No report	1.4

#### 【文 献】

- Chantal M et al.: *J Pediatr.* 2002;141:83-9
- Rubio-Castlo et al.: *Pediatric Diabetes* 2012;13: 322-325

## 2) ROTEM と一般凝固検査との比較検討

研究代表者 黒澤 溫

### 【はじめに】

手術中に大量出血が生じた場合、血小板や凝固因子の消費・喪失、希釆性凝固障害が起こり、凝固因子の補充として新鮮凍結血漿 (FFP)、フィブリノゲンの補充としてクリオプレシピテート (クリオ)、血小板などを輸血することがある。厚生労働省からの血液製剤の使用指針（平成 26 年 11 月一部改正）では、FFP の適正使用として、投与前にプロトロンビン時間 (PT)、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定し、大量出血ではフィブリノゲン値 (Fib) も測定すると記載されている。また、投与基準として、PT、APTT が延長している場合、PT-INR2.0 以上または PT % 30% 以下、APTT が、基準の上限の 2 倍以上または 25% 以下、低フィブリノゲン血症として 100mg/dL 未満と記載されている。

通常、一般凝固検査を中央検査室に緊急オーダーした場合、遠心分離などを行うため結果が出るまで 30 分から 1 時間程度かかる。手術中の大量出血の場合、刻々と凝固能・血小板数は変化しており、1 時間程度かかる従来の検査では、凝固因子の補充の目安としては適切ではない。そのため、迅速に結果が得られる凝固検査が必要と考える。

ROTEM® (フィンガルリンク) は、全血を用いて行う止血機能検査であり、ベットサイドで医療従事者が行い、検査時間の短縮が期待できる point of care test (POCT) である。手術室で採血を行い、その場で止血能 (フィブリノゲン不足、血小板不足、ヘパリンの影響、線溶系の亢進) を短時間で判定できる。

今回我々は、ROTEM の測定値と一般的な凝固検査とを比較検討し、血液製剤 (FFP、クリオ) の投与基準に対する ROTEM の POCT としての有用性について考察した。

### 【方 法】

周術期に大量出血、凝固異常を来し、クリオまたは FFP を投与した患者を対象とした。クエン酸ナトリウム採血管に採血を行い検討検体とした。測定項目は、一般凝固検査として、PT(%)、APTT(s)、フィブリノゲン値 (Fib, mg/dL) を測定 (coapresta 2000; 積水メディカル) した。ROTEM では、INTEM、EXTEM、

FIBTEM で測定し、それぞれ、CT (Coagulation Time、凝固時間、秒)、CTF (Clot Formation Time、血餅形成時間、秒)、 $\alpha$  ( $\alpha$  角度)、A10 (振幅が 2mm に達してから 10 分後の振幅、mm)、MCF (Maximum Clot Firmness、最大血餅高度、mm) を計測した。統計学的解析は、相関係数を求め、単回帰分析を行った。

### 【結 果】

対象症例は 17 例 (開心術 5 例、胸部大動脈手術 5 例、腹部大動脈手術 2 例、脳神経外科手術 2 例、肝切除術 1 例、前立腺全摘 1 例、前置胎盤による帝王切開術 1 例) で、34 検体得られた。性別は、男性 11 例、女性 6 例。平均年齢は 69 (39 – 88) 歳であった。

PT と EXTEM の各パラメータの相関係数は、CT、CFT、 $\alpha$ 、A10、MCF それぞれ、 $r = -0.30$ 、 $-0.50$ 、 $0.72$ 、 $0.70$ 、 $0.62$  であり、PT と EXTEM- $\alpha$ 、A10、MCF において相関があった。APTT と INTEM の各パラメータの相関係数は、CT、CFT、 $\alpha$ 、A10、MCF それぞれ、 $r = 0.71$ 、 $0.26$ 、 $-0.40$ 、 $-0.45$ 、 $-0.44$  であり、APTT と INTEM-CT において相関があった。Fib と FBTEM の各パラメータの相関関係は、CT、A10、MCF それぞれ、 $r = -0.39$ 、 $0.82$ 、 $0.85$  であり、Fib と FIBTEM-A10 において相関が、FIBTEM-MCF と強い相関があった。Fib と FIBTEM-MCF の回帰式は、 $y(Fib) = 72.4 + 12.4x(FIBTEM - MCF)$  であった。

### 【考 察】

FIBTEM-MCF で、FIB と強い相関関係を認め、EXTEM- $\alpha$ 、A10、MCF、INTEM-CT で相関関係を認めた。一般的に、EXTEM、INTEM の CT が PT、APTT を反映すると考えられているが、ROTEM は全血での凝固能の測定であり、PT、APTT と比べ、出血による血小板の減少の影響を受け、強い相関関係が得られなかつたと考える。また、今回の対象症例は、半数以上が心臓大血管手術であり、INTEM に関してはヘパリンの影響を受けていたと考えられ、HEPTEM も測定し、比較検討する必要もあったと考える。

PT、APTT に関しては、強い相関関係の ROTEM のパラメータはなかった。また、EXTEM-MCF は結果が表示されるのに、測定から 20 分程度時間を要していた。今回測定した EXTEM、INTEM のパラメータから、血液製剤を投与するための PT、APTT の値を推定

する有用性は少ないと考える。

FIBTEM – MCF は FIB と強い相関関係を示し、また、FIBTEM-MCF は、測定から 10 分以内にほとんど結果が表示された。FIBTEM-MCF は、手術室でのフィブリン値を推定できる POCT として有用であると考える。FIBTEM-MCF の回帰式より Fib 200mg/dL-FIBTEM-MCF10.3mm, Fib150mg/dL-FIBTEM-MCF6.3mm, FIBTEM-MCF2.2mm と求められ、FIBTEM – MCF が 2mm 以下の場合、クリオもしくは FFP の投与を行う基準となりえると考える。

### 【結 語】

FIBTEM-MCF は、Fib と強い相関を示し、また、迅速に結果が得られるため、周術期の凝固機能に関する POCT として有用である可能性が示唆された。

### 3) 骨髓由来血管内皮前駆細胞 (EPC) の制御による 肺癌肺転移の制御

研究代表者 南 幸範

#### 【目 的】

骨髓由来血管内皮前駆細胞 (EPC) は腫瘍の血管新生に重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究は、この細胞の機能を制御することで腫瘍血管新生を抑制する、というがん治療に対する新たなアプローチを検証するものである。

我々の知見に基づき、以下のような仮説を立てた。

**仮説 1** 腫瘍の転移巣の形成・増殖において EPC の PGI<sub>2</sub>-IP 系が重要な役割を担っている。

**仮説 2** EPC の PGI<sub>2</sub>-IP 系の活性化は、転移巣の抑制に有効である。

(PGI<sub>2</sub>; プロスタサイクリン、IP 受容体; プロスタサイクリンの特異的な受容体)

上記の仮説を証明するために以下の目的を掲げた。

**目的 1** 腫瘍の転移における「IP 欠損による EPC 機能低下」の効果を明らかにする。

**目的 2** EPC の機能及び腫瘍の転移におけるプロスタサイクリン誘導体とプロスタサイクリン受容体阻害薬の効果を明らかにする。

#### 【方 法】

【1】 骨髓移植ヌードマウスモデルの作成；骨髓選択的 IP 欠損マウスは、IP 欠損マウスの骨髄細胞を放射性照射済のヌードマウスに投与して作成した。

【2】 肺癌肺転移モデルの作成と転移の定量；骨髓移植したヌードマウスに肺癌細胞株を尾静脈より投与した。投与 3 週後に腫瘍組織の病理学的解析を行なった。

【3】 EPC の分離精製と細胞導入；骨髓移植ドナー群 (wild および IP 欠損) マウス骨髄細胞から磁気細胞分離システム (MACS) を用いて、Lineage (-), cKit + /Scal + 細胞 (= EPC) を分離精製した。

【4】 肺癌内血管新生度、EPC 同定と定量；腫瘍組織片を免疫染色し評価した。外因性 EPC の腫瘍内での局在および量測定のため、導入細胞は GFP 過剰発現マウス由来の EPC を利用し、免疫組織解析した。

【5】 PGI<sub>2</sub>誘導体 / 阻害薬投与実験；PGI<sub>2</sub>誘導体 (beraprost) は作用時間が短いため、osmotic pump を用いて腫瘍細胞移植翌日から持続的に皮下投与 (1 ~ 6 μg/kg/day) した。IP 受容体阻害薬 (CAY 10441) は疎水性であり、安定性・利便性に問題があったため、前立腺癌のホルモン療法にも使用されている Poly Lactic-co-glycolytic acid (PLGA) で修飾することによりそれらの問題を解決した。PLGA で修飾することにより徐放性を持たせたため腫瘍細胞移植翌日のみ皮下投与 (1 ~ 20mg/kg) した。

#### 【結 果】

Wild type (WT) マウスに GFP を発現している WT マウスもしくは IP 欠損マウスの骨髄を移植し、それぞれに LLC/DsRed (DsRed で標識したマウスの肺癌細胞) を肺転移させて比較したところ、IP 欠損群では肉眼上も切片上も明らかに転移を認め、WT 群より転移巣は増加した (図 1)。EPC は腫瘍の周囲に存在し、その全てが周細胞のマーカーを発現しているわけではなかった。以上から骨髓選択性 IP 欠損マウスでは腫瘍肺転移モデルにおける腫瘍増殖・転移が促進された。

次に上記 IP 欠損群に wild EPC を導入したが、腫瘍増殖・転移の促進は解除されなかった (図 2)。

次に WT マウスに GFP を発現している WT マウスの骨髄を移植し、LLC/DsRed を肺転移させ、それぞれにプロスタサイクリン誘導体もしくはプロスタサイクリン受容体阻害薬を投与したところ、プロスタサイクリ

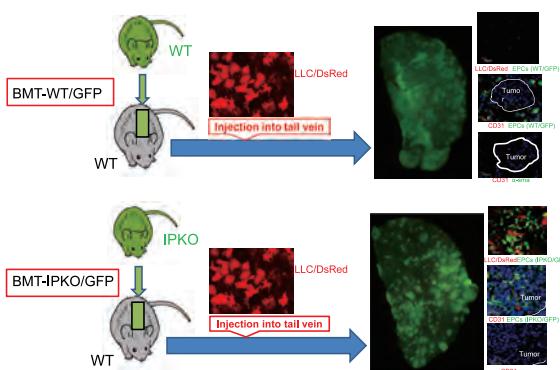


図 1

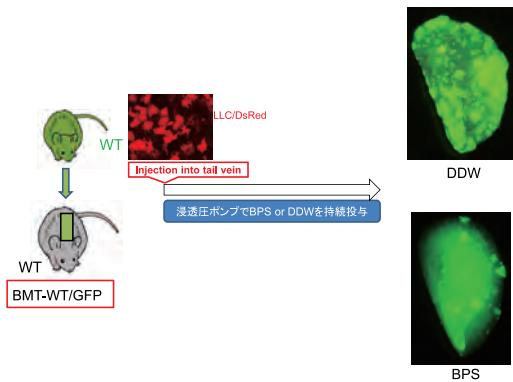


図 3

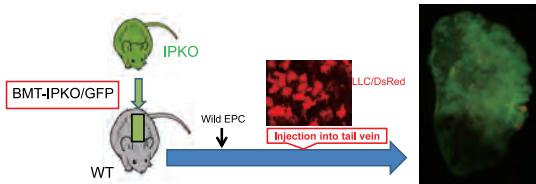


図 2

ン誘導体を投与した群は control と比較し、転移巣の大きさは小さくなり、その数も減少した (図 3)。一方、プロスタサイクリン受容体阻害薬を投与した群は control と比較し、転移巣の大きさは大きくなり、その数も増加した (図 4)。つまり、プロスタサイクリン誘導体は腫瘍転移モデルにおける腫瘍増殖・転移を抑制し、一方でプロスタサイクリン受容体阻害薬は同モデルにおける腫瘍増殖・転移を促進した。

## 【考 察】

以上の結果から、腫瘍の転移巣の形成・増殖において EPC の PGI<sub>2</sub>-IP 系が重要な役割を担っており、EPC の PGI<sub>2</sub>-IP 系の活性化は、転移巣の抑制に有効である可能性がある。骨髄選択性的な IP 欠損マウスの腫瘍肺転移モデルに wild EPC を導入しても腫瘍増殖・転移の促進は解除されなかつたが、その理由として次のことが考えられた。今回 wild EPC は肺癌細胞を尾静脈から投与する前日に 1 回だけ投与した。この前日の単回投与が十分な期間や量ではなかった可能性がある。また、EPC 以外の骨髄由来細胞の PGI<sub>2</sub>-IP 系制御による効果ではないことを証明するには、IP 欠損 EPC を導入しても腫瘍増殖・転移の促進が解除されないことを示す必要があると考える。また、詳細な差を見るためには腫瘍血管構成細胞における EPC 数と腫瘍血管形成

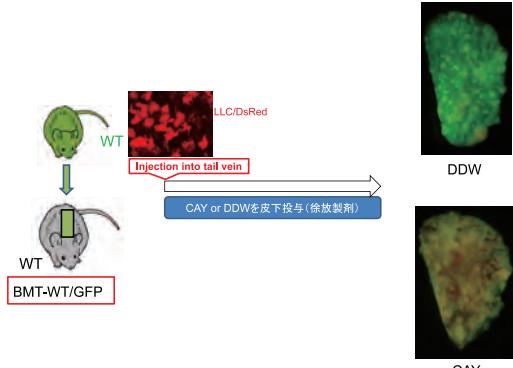


図 4

度について検討する必要があると考えられる。

プロスタサイクリン誘導体は腫瘍転移モデルにおける腫瘍増殖・転移を抑制し、一方でプロスタサイクリン受容体阻害薬は同モデルにおける腫瘍増殖・転移を促進したが、プロスタサイクリン誘導体は末梢血に動員している EPC の機能を促進させ、一方でプロスタサイクリン受容体阻害薬は EPC の機能を抑制させている可能性があり、EPC の遊走や接着に関するさらなる検討が必要と考えられる。さらに、骨髄以外の臓器の PGI<sub>2</sub> 制御による効果ではないことを確認するために、骨髄選択性的な IP 欠損マウスで、プロスタサイクリン誘導体と受容体阻害薬による追加効果を認めないとことを証明する必要があると考える。

## 【文 献】

- 1) Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, et al. Endothelial Progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 2008 Jan 11; 319 (5860) : 195-8.
- 2) Wickersheim A, Kerber M, de Miguel LS, et al.

Endothelial progenitor cells do not contribute to tumor endothelium in primary and metastatic tumors. Int J Cancer. 2009 Oct 15; 125 (8):1771-7.

3) Kawabe J, Yuhki K, Okada M, et al. Prostaglandin I2 promotes recruitment of endothelial progenitor cells and limits vascular remodeling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Mar;30 (3):464-70. Epub 2009 Dec 10.

#### 4) パーキンソン病薬物治療における薬物動態関連遺伝子情報応用の検討

研究代表者 山本 譲

##### 【目的】

パーキンソン病は、我が国において認知症に次いで発生頻度の高い神経変性疾患であり、黒質線条体におけるドパミン神経細胞の選択的な変性、脱落が原因と考えられている。近年、iPS細胞移植などの新技術の利用による根治治療が話題を集めているが、実現までにはまだ相当な年数を要する為、既存の薬剤を効率的に投与せざるを得ず、より適正な使用方法を検討し続けていく必要がある。現在、パーキンソン病治療の主流は、L-dopa やドパミンアゴニスト投与を中心とした薬物療法であり、病態の進行に応じて、ドパミン遊離促進薬、MAO-B 阻害薬、COMT 阻害薬、L-dopa 賦活薬等種々の薬剤が併用される。我々が現在進行している臨床研究においても、半数以上の患者が L-dopa 製剤と他剤を併用しているのが現状である。それらの投与量設定においてはガイドラインや経験則を基に処方され、患者の臨床症状改善状況や副作用発現状況を確認しながら投与量を調節し、投与薬剤の変更を行っているのが現状である。また 50 ~ 60 代で発症することから、薬物治療期間が長く、病態の進展に応じてさまざまな薬物治療における問題が生じてくることが特徴である。

パーキンソン病治療薬の体内動態においては個人差が大きいという報告が多く、我々のこれまでの研究もそれを示唆している。その原因として吸収や代謝に関する分子の遺伝子変異が挙げられる。パーキンソン病治療薬の中でも L-dopa は、現在においても中心的な役割を担っている。しかし、L-dopa を長期間使用することにより病態の進行と相まって薬効が減弱し、wearing-off の発現等が問題となってくる。近年本邦で

も使用されているエンタカポンは、末梢のカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) を阻害し、L-dopa の最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) に変化を与えるに、半減期 ( $t_{1/2}$ ) を延長させ、血中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) を増大させるという特徴を持ち、wearing-off の改善に有効とされている。しかし、臨床的にはエンタカポンが有効な例と無効な例が存在することが知られている。また、COMT は遺伝子変異 (Val158Met) により酵素活性が低下することが報告されている。そこで、L-dopa およびその代謝物である 3-O-methyldopa (3-OMD) の血中濃度に及ぼすエンタカポンおよび COMT の遺伝子多型の影響を検討することを目的とした。

##### 【方 法】

パーキンソン病患者 10 名、レビー小体型認知症患者 1 名を対象とした。内訳は男 8 名、女 3 名、平均年齢  $74.0 \pm 6.56$  歳、罹病期間 1 ~ 8 年、Hohen-Yahr 2-5、通常の L-dopa 内服量は 0 ~ 600mg/day であった。これらの患者に L-dopa (100mg) 単独または L-dopa (100mg) とエンタカポン (100mg) を同時に服用し、服薬前と服薬後に経時的に静脈血を採取し、L-dopa および血中濃度を HPLC-ECD により測定した。COMT の遺伝子多型は tetra-primer ARMS-PCR 法により調べた。本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

##### 【結果と考察】

COMT の遺伝子型は、高活性型の野生型 (H/H) が 6 例、ヘテロ型の変異 (H/L) が 4 例および低活性型のホモ型 (L/L) が 1 例であった。エンタカポンの投与による L-dopa の  $AUC_{0-4}$  の変化については、H/H 群で約 1.7 倍、H/L 群で約 1.3 倍の増加傾向が見られたが、L/L の 1 例ではほとんど変化が見られなかった。また、3-OMD の濃度增加 ( $\Delta C_{3\text{-OMD}}$ ) は、L-dopa 単独投与時は  $L/L < H/L < H/H$  の順で増加したが、エンタカポン併用時は、全ての遺伝子型で増加は抑制されていた。このことにより、エンタカポンが L-dopa および 3-OMD の血中濃度に及ぼす影響は、COMT 遺伝子多型により変動を受けることが示唆された。3-OMD は、血液脳関門 (BBB) において L-dopa と脳への輸送が競合するため、エンタカポンにより L-dopa から 3-OMD への代謝を阻害することは L-dopa の脳移行性を改善するとされている。遺伝型の違いにより代謝物の増加

抑制率が異なることから、COMT の遺伝子多型情報はパーキンソン病薬物治療における有用なバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

## 5) 多発性硬化症における再髓鞘化療法を目指した基盤研究

研究代表者 板東 良雄

### 【研究の背景と目的】

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は中枢性炎症性脱髓疾患であり、オリゴデンドロサイト (oligodendrocytes : OLs) が形成する髓鞘が炎症性に壊されることにより脱髓や2次的に軸索障害が生じると考えられている。本邦における罹患率は約10人/10万人とされており、北欧・北米といった高緯度地域ほど高い罹患率になる傾向がある。したがって、本邦では北海道（特に十勝・旭川地方）での罹患率が他の地域に比べて高いことが報告されている。本疾患に対する根治療法は現在のところ存在せず、対症療法が主な治療法となっている。一方、病理学的には脱髓を起こしている病変部位近傍にオリゴデンドロサイト前駆細胞が存在しているにも関わらず、髓鞘再生が起こっていないことも明らかとなっており、このような前駆細胞が何故髓鞘化しないのか、どのようにして髓鞘化に導くかが重要な問題となっている。さらに、ES細胞やiPS細胞を用いた分化誘導実験においても OLs を高純度に採取する方法は未だ確立されていない。そこで本研究では、生体内で髓鞘化を効率よく起こすための“質の良いオリゴデンドロサイト前駆細胞 (Oligodendrocyte Precursor Cells: OPCs)”を如何に作成するかについて検討を行った。

### 【研究方法】

ES細胞からOPCsへの分化誘導に関しては発生学に基づいた既存の方法 (Chandran et al., Development 2003; Bouhon et al., Stem Cells 2006) の一部を改良したものを用いた。具体的には、培地に含まれるinhibitorや栄養因子などの組成を随時変えながら、ES細胞から誘導した神経幹細胞を一度 olig1 陽性の運動神経分化に方向付けを行い、bFGF/PDGF-AA 添加によってOPCsへの分化を行った（脊髄の発生を模倣）。OPCsは一般的にPDGFR $\alpha$ を発現しているので、PDGFR $\alpha$ の

発現を指標にOPCsへの分化効率を評価した。

次にOPCsからOLsへの分化誘導実験を行った。分化誘導には一般的に良く用いられている甲状腺ホルモンT3を用いた（既存の報告の多くは～20%程度の分化効率）。OLsの特異的マーカー(O1, O4, MBPなど)の発現を指標に分子生物学および形態学的な検討により分化状態や効率を評価した。

### 【結果】

マウスES細胞(CMTI-1)を用いて検討したところ、20～24日でPDGFR $\alpha$ 陽性のOPCsに高純度に分化させることに成功した。このタイムスケジュールは胎児脳由来の初代培養OLsの場合とほぼ同様であった。しかしながら、CMTI-1は129Sv由来であり、DISC-1変異を持つことが知られており (DISC-1は統合失調症関連遺伝子)、最適な条件とは言い難い。そこで、次にC57Bl/6マウス系統のES細胞(DSファーマ社)に変更し、CMTI-1を用いた先行実験を元にOPCsの作成を試みた。これまでの検討からCMTI-1に比べて若干困難を伴うが、C57Bl/6マウス由来のES細胞でもOPCsまでCMTI-1とほぼ同様のタイムスケジュールで分化誘導を行えることを確認した（図1）。これらのOPCsは凍結ストックが可能であり、ES細胞からOPCsへの分化誘導に要する時間は短縮できることを確認した。

次に、成熟OLsへの分化効率や髓鞘化に関して解析・評価を行ったところ、T3 1-3 $\mu$ Mによる分化効率は免疫染色法による評価を行った限りではほとんどの細胞がMBP陽性細胞のOLsに分化していた。また、ウェスタンプロット法によってもMBPの発現を確認した。

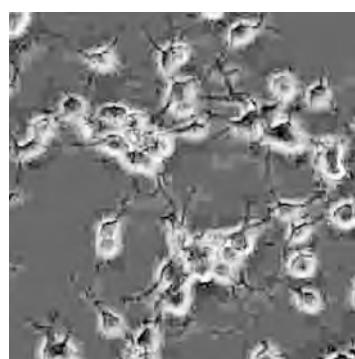


図1 ES細胞から誘導されたOPC  
(FGFによる分化誘導28日目)

### 【本研究の成果と将来性】

本研究では ES 細胞から高効率に OLs に分化誘導を行える方法を確立した。次のステップとして、生体内でこのような OPCs が髓鞘化を起こせるか否かを検討することを計画している。具体的には、生直マウスや髓鞘形成不全 shiverer マウスに移植を行い、in vivo でも髓鞘化が起こることを明らかにする。さらに、マウス多発性硬化症モデルなどの病態モデルへ細胞移植を行い、再髓鞘化療法を目指した基盤研究やこのような OPCs を用いた創薬への応用を検討していきたい。

また、本技術は iPS 細胞から OPCs を作成する際にも応用できる基盤的技術であり、将来的には MS 患者から iPS 細胞を樹立することを視野に入れつつ、産学連携プロジェクトに発展させていきたいと考えている。

### 【謝 辞】

今回、このような機会を与えていただきましたことをこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

### 6) LH/FSH 産生細胞における細胞内蛋白分解系制御システムの解明

研究代表者 暮地本宙己

#### 【目 的】

生体における性成熟および生殖機能は視床下部－下垂体－性腺系のフィードバック調節機構で制御されている。このフィードバック調節機構に位置する下垂体前葉性腺刺激ホルモン (LH/FSH) 産生細胞では GnRH 受容体への刺激を介して生理的機能が制御されている。これまでに私たちは GnRH agonist である酢酸リュープロレリンの徐放性製剤を投与したラットの LH/FSH 産生細胞において、タンパク質の品質管理や細胞内での分解に関わる分子シャペロンが集積する管状細網構造をとる特殊な小胞体 (ER patch) が出現することを報告した (Bochimoto et al. 2013)。本研究では、GnRH 受容体の刺激による LH/FSH 産生細胞の細胞内蛋白分解系の変化を細胞の機能状態に応じて形態学的に検討した。

#### 【方 法】

Wistar 系雄ラットの皮下に GnRH agonist の Leuproide acetate や buserelin、GnRH antagonist である Antide

などを生食に溶解し充填した浸透圧ポンプを埋め込んだ。その後、経時的に灌流固定し、O.C.T compound (光顕免染用)、Epon 樹脂 (光顕及び純形態電顕観察用)、LRW 樹脂 (免疫電顕用) に包埋した組織試料を作成した。また細胞内微細構造を立体的に観察するためオスミウム浸軟処理を施した走査電顕観察用試料を作成した。さらにホルモンアッセイを行うため血漿を採取し、光顕・電顕を用いた形態学的解析と機能的解析を併せて行った。

### 【結 果】

GnRH agonist の持続投与 4 時間後、血中 LH 濃度はピークに達し、その後速やかに低下した。一方で GnRH agonist の持続投与 8-12 時間経過後に LH/FSH 産生細胞において一過性に管状細網構造をとる特殊な小胞体 (ER patch) の出現が見られた。antide 投与後には ER patch の出現は見られなかった。ER patch には小胞体シャペロンである BiP や calnexin の強い集積が見られた。また、小胞体関連分解 (ERAD) に関わる E3 リガーゼ HRD1 が集積した。さらに GnRH agonist の持続投与後に LH/FSH 産生細胞ではオートファジー特異的分解蛋白である P62 の発現が一過性に増強しており、オートファゴソームの膜を形成する機能分子 LC3 も ER patch 近傍に集積した。走査電子顕微鏡では ER patch の近傍や内部に膜が重層した構造が出現していた (図)。

### 【考 察】

GnRH agonist による過度な刺激を受け、貯蔵されたホルモンが枯渇した LH/FSH 産生細胞では、GnRH 受容体を介したシグナル伝達系による同一のインプット

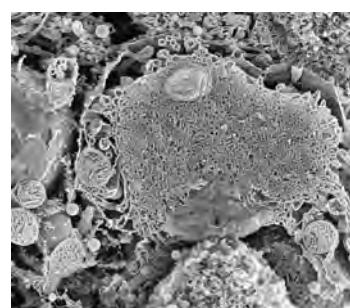


図 リュープロレリン投与 1 日後の LH/FSH 細胞の走査電顕像

膜が集積した管状細網構造をとる特殊な小胞体の内部や近傍に、膜が重層しテクスチャーが異なる構造物が出現している。

を契機として、異なった細胞内分解システムである小胞体関連分解系とオートファジー系が協調的に変化し、細胞内で機能を果たしている可能性が考えられた。

### 【文 献】

1) Bochimoto H, Koga D, Sakai Y, Hira Y, Hosaka M, Ushiki T, and Watanabe T (2013) Sustained treatment with a GnRH agonist (leuprorelin) affects the ultrastructural characteristics of membranous organelles in male rat pituitary gonadotropes. *Arch Histol Cytol*, 74, 41. 57.

### 7) TRPC ノックアウトマウスを用いた瞳孔括約筋収縮機構の解明

研究代表者 金子 智之

#### 【目 的】

眼内平滑筋の自律神経刺激に伴う収縮の持続相は、他の多くの平滑筋の場合と同様、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を必要とするが、その分子実体や作用機序に関してはいくつかの候補があるものの、詳細は分かっていない。これまでに本研究室では、ウシ毛様体筋（遠近調節のための眼内平滑筋）における実験により、持続相における  $\text{Ca}^{2+}$  流入が単位コンダクタンスの異なる 2 種類の非選択性陽イオンチャネル (NSCC) を介することを示した。それらの分子候補としての TRPC1、TRPC3、TRPC4、TRPC6 や Orai1 などの発現もすでに確認しているが、ウシ材料では遺伝子ノックダウンなどの適用が困難で、また遺伝子改変動物の利用は事实上不可能あるため NSCC との関連についての検討は行き詰まっている。そこで、血管平滑筋において NSCC との関連が注目されている TRPC3 と TRPC6 に着目し、これらのノックアウトマウスを用いた実験系の構築を進めており、現在までに非侵襲的に実験可能な対光反射による瞳孔収縮径の解析手法を確立し測定を続けている。本研究ではマウスの瞳孔括約筋という微小な平滑筋の持続相に TRPC3 と TRPC6 の遺伝子欠損が与える影響を詳細に調べることでその分子実体を明らかにすることを最終目標として研究を遂行した。

#### 【方 法】

8 ~ 12 週齢の雄の TRPC3 および TRPC6 ノックアウ

トマウスの四肢を固定し、暗闇で 30 分暗順応させた後、LED の光刺激を用いて対光反射を誘発させ、記録は赤外線から可視光まで記録可能な CMOS カメラに顕微鏡用の対物レンズを直結したものを用いて LED 照射前から記録し、その画像データから暗順応中の瞳孔経、縮瞳後の瞳孔経、収縮の時定数を求め、野生型と遺伝子改変マウスとで比較を行った。

ダブルノックアウトマウスの作製は 129Sv 系統の TRPC3 ノックアウトマウスと TRPC6 ノックアウトマウスを交配させて行った。まず両者の交配によって TRPC3 および TRPC6 ともにヘテロの個体を得た。交配によって得られた仔マウスは耳片をサンプルとした genotyping を KAPA MG KIT (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて行い、そこから得られた遺伝子型に応じて選別し、交配を繰り返し行うことで作製を進めた。

#### 【結果と考察】

TRPC3 および TRPC6、さらに野生型を加えた 3 系統での比較において、収縮前後における瞳孔径、および収縮速度において、今までに有意な差を確認することはできなかった。しかし眼内平滑筋を材料にしてはいないものの、TRPC3 と TRPC6 はそれぞれ単独のノックアウトでは野生型と有意な差は見られないが、両方をノックアウトすることではじめて影響が出るという報告<sup>1)</sup>もあることから、TRPC3 と TRPC6 は瞳孔括約筋においても相補的に働いている可能性が考えられ、このことを確かめるためにダブルノックアウトマウスを用いた検証が必須である。しかしながら、結果として TRPC3/6 ダブルノックアウトのマウスを得ることはできたものの、ヘテロマウスからのダブルノックアウトマウス産生は極めて効率が悪く、また設備の問題から繁殖が小規模にしか行えなかつたために、ノックアウトマウスを得るために予想以上の時間を要した。加えて少数の得られたマウスはすべて繁殖のために維持せねばならなかつたため、今までに実験遂行に必要な個体数を確保することはできなかつた。今回の研究期間内でダブルノックアウトマウスの測定結果を比較検討するには至らなかつたが、今後も交配による繁殖を進め、このダブルノックアウトマウスと TRPC3 および TRPC6 それぞれのノックアウトマウス、および野生型マウスを比較することによって、瞳孔括約筋収縮の持続相における TRPC チャネルの関与

が明らかになっていくと期待される。

## 【文 献】

- 1) Quick K, Zhao J, Eijkamp N, Linley JE, Rugiero F, Cox JJ, Raouf R, Gringhuis M, Sexton JE, Abramowitz J, et al (2012) TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells. *Open Biology* 2: 120068-120068

## 8 ) 新規抗不安薬の恐怖情動に対する定量的評価系の確立

研究代表者 宮園 貞治

### 【目 的】

恐怖情動はヒトや動物が外敵などの危険から身を守るために本能であるが、その情動の異常は恐怖症や心的外傷後ストレス障害(PTSD)などの不安障害の原因となる。不安障害の治療薬の開発には、実験動物に一定の恐怖情動を誘起し、その強度を定量的に評価する系が必要である。一昨年に我々は、オオカミの尿からマウスに対して強い恐怖情動を引き起す匂い物質ピラジン化合物(2, 6-dimethylpyrazine, 2, 5-dimethyl-3-ethylpyrazine, 2, 3, 5-trimethylpyrazine)を見出した<sup>1)</sup>。他の恐怖誘発物質と同様に<sup>2)</sup>、これら3種のピラジン化合物(pyrazine-analog mixture; P-mix)も、マウスに生得的な恐怖情動を誘起して様々な行動および生理的な反応をもたらすと予想される。本研究では、不安障害の原因となり得る恐怖情動に対する抗不安薬の候補物質の効果を定量的に評価する系を確立することを目的とした。まず、P-mixによって誘起される恐怖情動を定量的に評価した。そして、この評価系を用いて、現在日本で非常に多く処方されている抗不安薬のひとつであるエチゾラムの効果を検証した。

### 【方 法】

まず、P-mixにより誘起される恐怖情動を定量的に評価するために、マウス(BALB/c、オス、3~6月齢)をP-mix存在下に置き、行動(忌避・不動・危険確認・毛繕い・立ち上がり)および生理的変化(体表面温度・ストレスホルモン放出)について調べた。個々の行動解析は、マウスの行動を撮影した動画から各々

の指標を測定して行った。体表面温度の解析は、尻尾基部の表面温度をサーモグラフィーカメラで撮影して行った。ストレスホルモンの解析は、血漿コルチコステロン濃度をELISAで測定して行った。次に、抗不安薬エチゾラムの効果を検証するために、エチゾラムを経口投与(5mg/kg)したマウスにおける3つの恐怖反応(忌避・不動行動および体表面温度)を測定した。薬剤非投与マウスには溶媒のみを経口投与した。

### 【結 果】

P-mixにより誘起される恐怖情動を定量化するために、マウスをP-mixに暴露したところ、忌避・不動・危険確認行動の増加、毛繕い・立ち上がり行動の減少、体表面温度の低下、ストレスホルモン放出の増加が見られた<sup>3)</sup>。これらの恐怖反応は、P-mix非存在下の約3~8倍に変化した。次に、エチゾラムの効果の検討のため、エチゾラムを投与したマウスの恐怖反応を測定し、非投与マウスと比較した。その結果、投与マウスでは、匂い接近行動の減少は6分の1程度に抑制された。また、体表面温度の低下は見られなかった。これらの結果は、エチゾラムが恐怖反応を抑制したことを示唆した。また興味深いことに、投与マウスの不動行動は、P-mixに暴露していないくとも約4倍に増加し、P-mixによって半分ほどに低下した。このような不動行動の変化は、非投与マウスとは逆であった。以上より、エチゾラムの効果の評価において、不動行動は指標には向きであるが、匂い接近行動および体表面温度は指標に適することが示唆された。

### 【考 察】

本研究で扱った匂いによって誘起される生得的恐怖は、条件付けによって想起させる恐怖や高所等で生じる不安とは異なる性質を持つ可能性があるので、この先天的恐怖に関する研究は恐怖や不安といった情動の研究分野に新たな知見をもたらすと期待する。本研究では、7個の恐怖反応を指標として、恐怖情動を定量的に評価する系を確立した。7個の指標はP-mixによってP-mix非存在下の約3~8倍に変化するので、抗不安薬の効果の定量的評価は十分に可能であると考えられる。また、行動や生理的変化である体表面温度は生きた動物で非侵襲的に測定できるので、これらを指標とすることは実験動物を用いた研究倫理の観点から

も優れていると考えられる。今回見られたエチゾラムの投与のみによって大きく変化した不動行動は指標としては不適だが、この結果はエチゾラムの副作用である眠気や倦怠感を反映しているのかもしれない<sup>4)</sup>。他の薬物においても、投与のみで変化する評価指標も存在し得るので、複数の指標から総合的にその効果を評価することの重要性が示唆される。今後、エチゾラムについては他の指標の測定を行い、さらに近年 PTSD の新規薬剤としての可能性が期待されている Neuro-peptide Y や melanocortin 4 receptor antagonist (HS014)などの神経ペプチドについても、この系を用いて評価したいと考えている。

### 【謝 辞】

エチゾラムを提供していただきました田辺三菱製薬株式会社に感謝いたします。また、研究遂行に精力的に協力していただきました本学医学部学生の榎間光理さん、長谷川楓さん、宮崎世理さんに深謝いたします。

### 【文 献】

- 1) Osada K, Kurihara K, Izumi H et al.: Pyrazine analogues are active components of wolf urine that induce avoidance and freezing behaviours in mice. PLoS ONE 8, e61753 (2013)
- 2) Takahashi LK, Nakashima BR, Hong H et al.: The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. Neurosci. Biobehav. Rev. 29, 1157-1167 (2005)
- 3) 宮園貞治, 笹島仁, 野口智弘ほか：マウスにおける主嗅覚系および鋤鼻系を介した天敵臭ピラジン類に対する恐怖反応の制御. 日本味と匂学会第 49 回大会プログラム・予稿集 p129 (2015)
- 4) Lee-Chiong TL Jr: Sleep Medicine: Essentials and Review. USA: Oxford University Press (2008)

### 9) 生殖腺体細胞の性差構築の分子機構の解析

研究代表者 矢澤 隆志

### 【目 的】

哺乳類における性（男女・雌雄）は、胎児期に性染色体によって生殖腺が精巣になるか卵巣になるかによって決定される。生後、精巣と卵巣から産生される性

ステロイドを含む性特異的なホルモンにより、からだ全体の性分化が起こる。ゆえに、性差の構築は、精巣と卵巣が、性特異的なホルモンを产生するよう分化することであると言える。これら性の決定から分化に至る一連の過程を制御しているのは生殖腺の特定の細胞群（精巣のセルトリ細胞やライディッヒ細胞、卵巣の顆粒膜細胞や莢膜細胞）である。よって、ホルモン产生を行う生殖腺体細胞の性差を知ることは、性分化の本質を知ることになると考えられる。私は、過去の研究で成体幹細胞である間葉幹細胞から生殖腺体細胞を分化誘導する系を確立した (Yazawa et al., 2006, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2014, 2015)。そして、幹細胞由来の細胞を解析することにより、これまでに報告されていない性差を持って生殖腺に発現する遺伝子群を同定している。本研究は、これらの遺伝子のうち核内受容体のコアクチベーターとして知られる PGC-1  $\alpha$  の発現と機能を解析し、生殖腺体細胞の性差とその構築における役割を調べることを行った。

### 【方 法】

#### 1. 生殖腺における PGC-1 $\alpha$ の発現解析

ヒトの精巣や卵巣から抽出した RNA やタンパク質を用いて、Q-PCR やウエスタンブロッティングにより、生殖腺における PGC-1  $\alpha$  の発現量の解析を行った。また、免疫組織化学法により、生殖腺内における PGC-1  $\alpha$  の局在を調べた。

#### 2. 生殖腺体細胞における PGC-1 $\alpha$ の機能解析

セルトリ細胞由来の細胞株に PGC-1  $\alpha$  をレトロウイルスにより、過剰発現させた後に、細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により性分化関連遺伝子の発現変化を解析した。さらに、ルシフェラーゼベクターを用いたレポーターアッセイにより、PGC-1  $\alpha$  の性分化関連遺伝子の転写における機能を調べた。

### 【結 果】

ヒト生殖腺では、PGC-1  $\alpha$  遺伝子並びにタンパク質は、精巣で非常に高いレベルで発現していた。一方、卵巣においては、発現量は非常に低く、タンパク質レベルでの検出は困難であった。PGC-1  $\alpha$  の精巣内における局在は、セルトリ細胞であった。*in vitro* で分化させたセルトリ細胞由来の細胞株に、レトロウイルスに

より PGC-1 $\alpha$  を過剰発現させたところ、Anti-Müllerian hormone (AMH) や VANIN-1 といった精巣で高く発現し、性分化に関わることが知られている遺伝子の発現が、著しく上昇した。ルシフェラーゼベクターを用いたプロモーター解析により PGC-1 $\alpha$  は、AMH や VANIN-1 遺伝子の 5' 上流域の核内受容体・SF-1 の結合サイトに作用して、これらの遺伝子の転写を活性化することが分かった。SF-1 結合サイトに変異を入れた解析等から、PGC-1 $\alpha$  による転写活性化には、SF-1 が必須であった。

### 【考 察】

精巣のセルトリ細胞は、未成熟な生殖腺からの精巣の形成に必須であり、AMH の産生等により生殖器の雄性化にも重要な役割を果たす。本研究により、PGC-1 $\alpha$  は、セルトリ細胞に高いレベルで発現し、これらの過程に関わることが示唆された。この時、PGC-1 $\alpha$  は、多くの核内受容体のコアクチベーターとして作用しうるが、その中でも、SF-1 への作用が重要であると考えられる。SF-1 は、AMH を含むセルトリ細胞に発現する多くの性分化遺伝子の発現に必須であることから、PGC-1 $\alpha$  は、SF-1 の転写活性化能を上昇させることにより、性分化関連遺伝子の発現に関わることが示唆された。

### 【文 献】

- 1) Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, et al.: Regulation of Steroidogenesis, Development, and Cell Differentiation by Steroidogenic Factor-1 and Liver Receptor Homolog-1. *Zoolog Sci*, 32, 323-330 (2015)
- 2) Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, et al: Overviews of Stem Cells for Gonadal and Adrenal Steroidogenic Cells. *Am J Life Sci* 3, 58-64 (2015)

### 10) プロスタグランジン F $\alpha$ によるヒト血小板の機能調節に関する研究

研究代表者 柏木 仁

### 【目 的】

血小板は、生理的な止血機構や病理的な血栓形成過程において中心的な役割を果たす。従来、血小板の機能調節には、血小板活性化作用を示すトロンボキサン

(TX) A $_2$  とその抑制作用を示すプロスタグランジン (PG) I $_2$  のバランスが重要と考えられてきた。一方、研究代表者は、PGF $_2\alpha$  がアデノシン二リン酸 (ADP) により惹起されたマウス血小板の凝集を促進し、この作用が PGF $_2\alpha$  の受容体である FP 以外の受容体を介したものであることを見出した。本研究では、血小板における PGF $_2\alpha$  の標的受容体を同定し、PGF $_2\alpha$  がヒト血小板の機能にも影響を及ぼすか否かを検討した。

### 【方 法】

マウスおよびヒトの血液から多血小板血漿 (PRP) を調製し、ADP (0.8 ~ 1.2  $\mu$ M) で惹起した凝集（凝集率が 15% 程度となるように調整）が PGF $_2\alpha$  によりどの程度促進されるかを血小板凝集計で解析した。また、血小板における PGF $_2\alpha$  の標的受容体を同定するため、プロスタノイドの各受容体を欠損するマウスから PRP を調製し、PGF $_2\alpha$  の血小板凝集促進作用が減弱もしくは消失するかを検討した。

### 【結 果】

#### PGF $_2\alpha$ のマウス血小板凝集促進作用

PGF $_2\alpha$  は、単独では血小板凝集を惹起しなかった。そこで、ADP で弱い血小板凝集を惹起して検討した結果、PGF $_2\alpha$  は ADP による凝集を濃度依存的に促進し、その EC $_{50}$  値は 5.8  $\mu$ M であった。また、PGF $_2\alpha$  の濃度が 1  $\mu$ M より高濃度では、PGF $_2\alpha$  により血小板の形態変化が起きていることを示唆する凝集波形が認められた。

#### マウス血小板におけるプロスタノイド受容体の発現確認

マウス血小板から mRNA を調製し、プロスタノイド受容体の発現を RT-PCR により観察した。TXA $_2$  受容体の TP や PGI $_2$  受容体の IP に加え、PGE $_2$  受容体のサブタイプである EP $_2$ 、EP $_3$ 、EP $_4$  の発現は認められたが、PGF $_2\alpha$  の受容体である FP の発現は確認できなかった。

#### PGF $_2\alpha$ のマウス血小板凝集促進作用へのプロスタノイド受容体の寄与

前述のように、血小板の機能は主に TXA $_2$  と PGI $_2$  により調節されていることが知られているが、近年、PGE $_2$  がその受容体のサブタイプを介して血小板の機能調節に関与していることを当研究室より報告し

た<sup>1,2)</sup>。そこで、血小板における PGF<sub>2</sub>α の標的受容体を同定するため、これらプロスタノイドの各受容体欠損マウスの血小板を用いて PGF<sub>2</sub>α の凝集促進作用を検討した。その結果、FP もしくは IP を欠損したマウスにおいては、野生型マウスと比較して有意な差は認められなかった。一方、EP<sub>3</sub>もしくは TP を欠損したマウスにおいては、PGF<sub>2</sub>α の凝集促進作用は有意に減弱した。また、TP 欠損マウスにおいては、PGF<sub>2</sub>α による血小板の形態変化を示す凝集波形が認められなくなつた。さらに、EP<sub>3</sub>と TP の両欠損マウスにおいては、PGF<sub>2</sub>α の凝集促進作用がほぼ完全に消失した。

### PGF<sub>2</sub>α のヒト血小板凝集に対する作用

ヒト血小板を用いて検討した結果、マウス血小板同様、PGF<sub>2</sub>α は単独では血小板凝集を惹起しなかった。そこで、ADP で弱い血小板凝集を惹起して検討したが、PGF<sub>2</sub>α は ADP による凝集にほとんど影響しなかつた。

### 【考 察】

PGF<sub>2</sub>α は、マウス血小板の凝集を濃度依存的に促進したが、この促進作用は FP を介したものではなく、EP<sub>3</sub>および TP を介したものであることが示唆された。心疾患、脳血管疾患は、悪性新生物に次いで永らく日本の死亡率の上位を占めている。なかでも心筋梗塞や脳梗塞は高い割合を示しており、これら疾患の再発予防を目的に使用される抗血小板薬の重要性が高まっている。血小板の機能を調節している因子として新たに PGF<sub>2</sub>α を提案することにより、本研究が新規作用機序を持つ抗血小板薬開発の一助となることを期待していたが、PGF<sub>2</sub>α の凝集促進作用はヒト血小板においては認められなかった。PGF<sub>2</sub>α の血小板凝集に対する作用には、ヒトとマウス間で種差があることが示唆された。

### 【文 献】

- 1) Ma H, Hara A, Xiao CY, et al. Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub>. *Circulation* 104 : 1176-1180, 2001.
- 2) Kuriyama S, Kashiwagi H, Yuhki K, et al. Selective activation of the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtype EP<sub>2</sub> or EP<sub>4</sub> leads to inhibition of platelet aggregation. *Thromb Haemost* 104 : 796-803, 2010.

### 11) 解糖系制御によるマウス肝細胞の分化調節メカニズムの検討

研究代表者 藤井 清永

### 【目 的】

肝臓は全身の物質代謝の中心に位置する臓器であり、その代謝機能のほとんどは実質細胞である肝細胞が担っている。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。我々はこれまで、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検討してきた。プロテオミクスによる解析により初代培養肝細胞の代謝状態の全体像を把握することが可能であり、培養条件の違いに応じて代謝関連タンパク質の発現レベルが劇的に変動することが明らかになった。特に、通常の単層培養では解糖系に関わるタンパク質の発現が著明に減少するが、肝細胞の増殖が抑制され、分化形質が長期間にわたり維持されるスフェロイド（凝集）培養では、これらの多くのタンパク質の発現が保たれるか、亢進する傾向が見出された。そこで本研究では、解糖系の最終産物であり肝細胞機能に影響を与える可能性のあるピルビン酸を単層培養系に添加した場合におけるタンパク質の発現と分化状態の変化について調べた。

### 【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、I 型コラーゲンを塗布したコラーゲン塗布ディッシュ上で単層培養した。ピルビン酸は 30 mM の濃度で培地に添加した。経時的に回収した細胞から可溶性タンパク質と total RNA を調製し、可溶性タンパク質は酵素消化した後に、LC-MS/MS による定量プロテオーム解析を行った。Total RNA は cDNA に逆転写後、分化マーカー遺伝子類を対象に、定量 RT-PCR による発現解

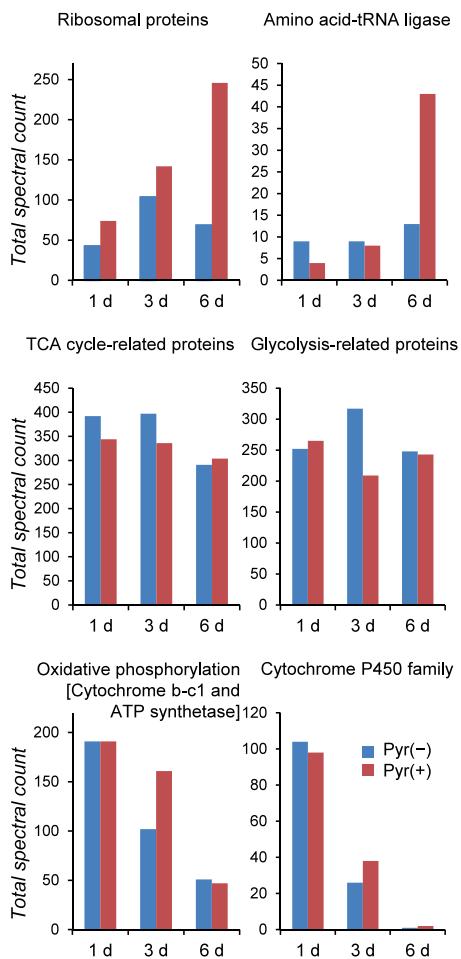


図 1 単層培養マウス肝細胞に対するピルビン酸添加の効果：機能分類されたタンパク質群の発現量変化

析を行った。

## 【結 果】

プロテオーム解析の結果、単層培養系にピルビン酸を添加すると、培養後 1 日目から 6 日目にかけてケン酸回路ならびに解糖系に関わるタンパク質の発現が全体的に低下する一方で、リボソームタンパク質、アミノ酸活性化酵素類および酸化的リン酸化に関わるタンパク質の発現が上昇した（図 1）。また、肝細胞マーカーである albumin (Alb) ならびに胆管上皮細胞マーカーである keratin 19 (Krt19)、osteopontin (Spp1)、SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox9) の mRNA の発現変化を調べたところ、ピルビン酸の添加により Alb の発現が軽度に抑制される一方、胆管上皮細胞マーカーの発現が培養後 3 日目から 6 日目にかけて有意に亢進することが判明した（図 2）。

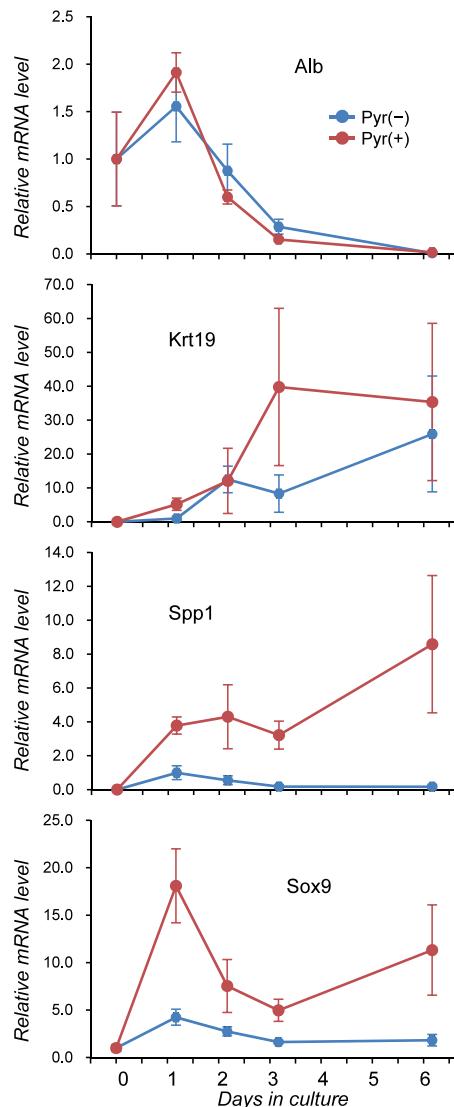


図 2 単層培養マウス肝細胞に対するピルビン酸添加の効果：肝細胞・胆管上皮細胞マーカーの mRNA 発現変化 (Reference gene, 18S rRNA)

## 【考 察】

以上の結果は、解糖系の制御がタンパク質合成やエネルギー代謝に影響を与える、肝細胞の分化や増殖の調節に関連している可能性が示唆している。最近、肝細胞と胆管上皮細胞の間には相互的な可塑性があることが明らかになってきたが、肝上皮系細胞の分化調節メカニズムに代謝制御が関与していることはまだ報告されていない。今回の結果に基づいて、肝細胞の分化調節に関わる代謝制御の役割について、特に解糖系に焦点を当て、さらに検討を進めたいと考えている。

12) 好中球、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ活性化におけるMDL-1の機能と役割について

研究代表者 青木 直子

【研究の背景と目的】

Myeloid DNAX activation protein 12 (DAP12)-associating lectin 1 (MDL-1, CLEC5A) は好中球やマクロファージに発現するレクチン型のII型膜タンパクである。ロングフォーム (MDL-1L) とショートフォーム (MDL-1S) の二種類のバリエントを有し、リガンドからのシグナルは会合分子であるDAP12のITAMモチーフまたはDAP10のYXXMモチーフを介して細胞質内へ伝達される。平成22年度、平成23年度、平成24年度旭川医科大学「独創性のある生命科学研究」のサポートを受け我々はMDL-1に対するモノクローナル抗体を樹立し、骨髄系細胞におけるMDL-1/DAP12シグナルに関する基礎的な検討を行った<sup>1,2)</sup>。その結果MDL-1は好中球やマクロファージに強く発現しており、DAP12のみならずDAP10にも会合することが明らかとなった。ケモカインの産生においてはToll-like receptor (TLR) がMDL-1シグナルにたいして相乗的に作用していることを見いだした。さらに、我々はマウス急性肺胞障害モデルを確立し、急性肺胞障害の治療ターゲット分子としてのMDL-1がTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン産生に重要な役割を担っていることを明らかにした<sup>3)</sup>。肺胞マクロファージにおいては、IFN- $\gamma$ とMDL-1刺激により相乗的にTNF $\alpha$ の産生が増強される。また腹腔マクロファージでは、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ によりMDL-1の発現量が増強し、IL-4では減弱する。これらのことより、MDL-1はM1マクロファージに強く発現している可能性があることが示唆された<sup>4)</sup>。今回我々はヒト肉芽腫性疾患を形成するマクロファージ系細胞についてMDL-1の発現を免疫組織化学にて検討した。

【方 法】

ホルマリン固定パラフィン包埋切片に脱パラフィン処理を行い、Target Retrieval Solution, pH 9.0 (DAKO) で免疫賦活化処理をおこなった。Cell tissue staining kit/HRP-DAB system (R & D) を使用し免疫組織化学を施行した。一次抗体としてanti human MDL-1/CLEC5A ポリクローナル抗体 1 $\mu$ g/ml を用い、4°Cで一晩反応させた。二次抗体として、ビオチン標識抗ヤギ抗体

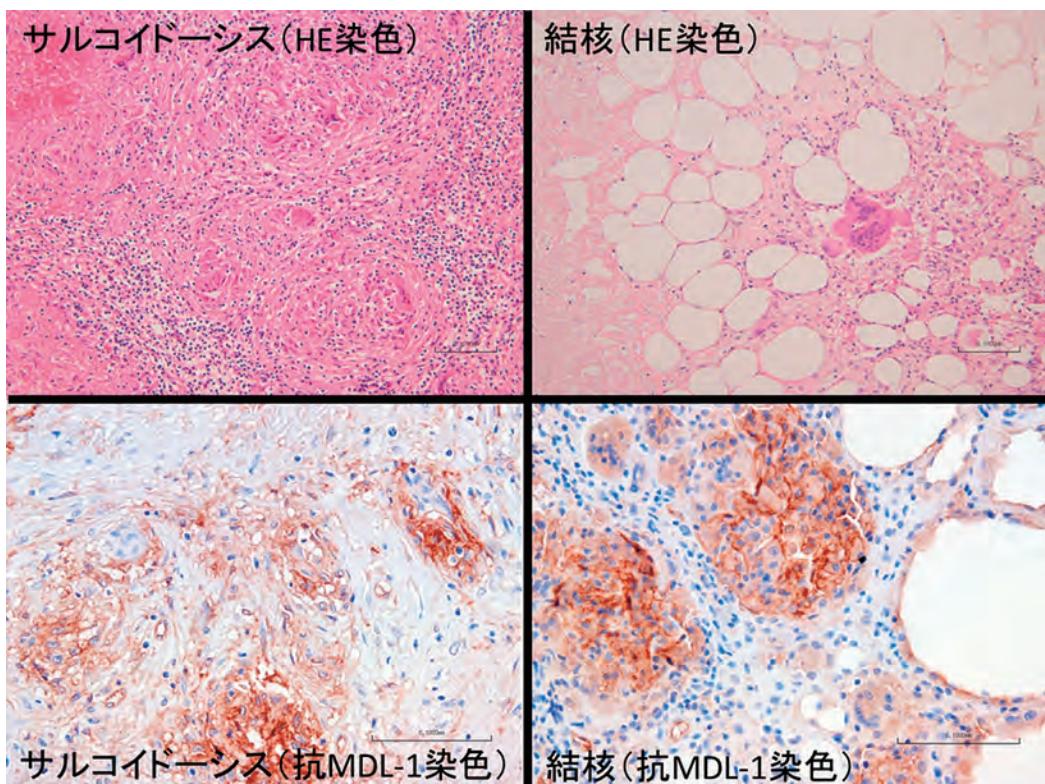
と30分反応させ、DAB 発色を三分間行いその後ヘマトキシリソで核染色を行った。

【結果と考察】

肉芽腫疾患の代表であるサルコイドーシス、結核、真菌症、また組織球性の腫瘍である巨細胞腫について検討をおこなった(図)。その結果、サルコイドーシスと結核において肉芽腫を形成する類上皮細胞に強いMDL-1の発現が認められた(図)。興味深いことにはサルコイドーシスにおいては多核巨細胞ではMDL-1の発現が認められないのに反して結核においては多核巨細胞においても強いMDL-1の発現が認められた。マクロファージはLPSやIFN- $\gamma$ により活性化されるM1型マクロファージとIL-4やIL-13により活性化されるM2型マクロファージの二種類に大別される。M1型マクロファージはIL-12やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生し、病原体の排除などに寄与すると考えられる。一方M2マクロファージはIL-10を產生し、寄生虫感染や創傷治癒、癌の転移などに関わっていると考えられる。近年サルコイドーシスに関しては、M2マクロファージが主体の反応ではないかという報告がなされている<sup>5)</sup>。それに対して結核はM1マクロファージが主体の反応と考えられている。今回多核巨細胞のMDL-1の発現がサルコイドーシスと結核で違ったことにより、これらの疾患における病態形成においてMDL-1の果たす役割が異なっている可能性が考えられる。今後さらなる検討を重ねていく予定である。

【文 献】

- 1) 旭川医科大学研究フォーラム 2009 Mar vol.9 p54-56
- 2) Aoki N, Kimura Y, Kimura S, Nagato T, Azumi M, Kobayashi H, Sato K, Tateno M. Expression and functional role of MDL-1 (CLEC5A) in mouse myeloid lineage cells J Leukoc Biol. 2009 Mar;85 (3):508-17.
- 3) 旭川医科大学研究フォーラム 2011 Feb vol.12 p71-72
- 4) 旭川医科大学研究フォーラム 2013 Feb vol.14 p54-55
- 5) Kempf W, Zollinger T, Sachs M, Ullmer E, Cathomas G, Dirnhofer S, Mertz KD. Granulomas are a source of



interleukin-33 expression in pulmonary and extrapulmonary sarcoidosis. Hum Pathol. 2014 Nov;45 (11) : 2202-10.

### 13) 胎生期における、自然免疫分子コレクチン CL-K1 の形態形成における機能解析

研究代表者 森 健一郎

#### 【目的】

コレクチンは、その内部構造にカルシウムイオン依存性の糖認識領域と、コラーゲン様領域を持つタンパクの総称であり、自然免疫分子として広く研究が進められている。新規コレクチン CL-K1 (*collectin kidney-1*) は、細菌、真菌などと結合し、補体活性化を誘導することが報告されており、従来のコレクチン同様、自然免疫に関わる分子であると考えられている。

CL-K1 と補体活性化因子 MASP-3 の遺伝子変異が口唇裂、口蓋裂、頭蓋骨癒合症、学習障害、生殖器や膀胱、腎臓の異常をきたす疾患である、3MC 症候群の原因であると 2011 年に報告された。これは、自然免疫に関与する分子が、器官形成に寄与していることを示す、初めての報告であった。我々は、CL-K1 ノックアウトマウスを作成し、器官形成期における、CL-K1 の

機能解析を行っている。CL-K1 ノックアウトマウスと野生型マウスとの交配で得られたノックアウトマウスは、同時期に誕生したワイルドマウス・ヘテロマウスと比較し、低体重であることを確認している。このことは、CL-K1 が哺乳動物の器官形成期において、自然免疫以外の機能を有していることを示唆している。

本研究では、胎生 15.5 日における胎仔体重の比較と胎生期の遺伝子発現検討、及び口蓋形成進捗の比較をすることで、胎生期における CL-K1 の機能解析の足掛かり的研究を行った。

#### 【方 法】

10 週齢 CL-K1 WT・KO 雌マウスに、妊娠清性性腺刺激ホルモン腹腔投与 48 時間後、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを腹腔投与し、交配能を確認した各遺伝子型の雄マウスと共に飼育した。12 時間後膣栓を確認し妊娠 0.5 日とした。妊娠 15.5 日に母獣を安樂死後、胎仔を摘出し、胎仔体重を測定、4% パラホルムアルデヒドで 48 時間固定した。脱水・脱脂、パラフィン包埋後、口蓋領域の薄切、伸展し、スライドガラス上に密着させた。ヘマトキシリソ・エオシン染色後、BIOREVO (キーエンス) で観察を行った。

胎生 7 日目、11 日目、17 日目のマウス CL-K1 mRNA

の発現を定量PCRにより検討した。定量PCRは、Premium Total RNA(タカラバイオ)からrandom hexamerを用いてcDNA合成後、TaqMan® Gene Expression Assaysを利用し、7500 Real Time PCR System(ライフテクノロジーズ)により行った。

### 【結 果】

胎生15.5日胚体重比較の結果、WT胚、平均0.423g、SD 0.061。KO胚、平均0.373g、SD 0.049、 $p < 0.01$ であり、KO胚がWT胚と比べ有意に軽く、成長遅延の表現型が認められた。また、口蓋形成比較ではKO胚で口腔前部領域の口蓋棚融合遅延が確認された。これは、同様に作成したWT胚では見られなかった。

定量PCRによる遺伝子発現検討の結果、CL-K1遺伝子は、胎生後期になるにつれ発現が高くなり、成獣肝臓においてさらに高値を示すことを認めた。また、CL-K1同様肝臓で合成され血中に分泌されるコレクチンMBLは胎生11日目にかけてCL-K1同様の発現増加が見られるが、それ以降の発現増加は見られなかった。

### 【考 察】

コレクチンCL-K1は、生体において様々な微生物と結合し、感染防御に関与することが示唆されているが、胎生期マウスは、無菌状態の母獣子宮内で着床後の原腸形成と器官形成を行うため、胎盤を通じて母獣免疫グロブリンの胎仔への移行はあるが、胎仔が積極的に免疫分子を発現することはないと考えられている。

しかし、マウスの胎生期におけるmRNA発現検討の結果、CL-K1遺伝子が胎生11日以降の器官形成期に発現していることが明らかになり、ヒトの遺伝子変異の報告同様、発生において器官形成に重要な役割を担う可能性が推測された。

胎生15.5日KO胚では、同腹WT胚と比較し、低体重の表現型を示し、さらに、ヒト3MC症候群で多く報告されている、口蓋形成不全の症例もKOマウスで高い頻度で見られたことから、マウスマルクは3MC症候群の発症機序解析に有用であると考えられた。

CL-K1はMASP分子と結合し、補体系を活性化することで、自然免疫に関与している可能性が報告されているが、器官形成期における機能は明らかになっていない。今後胎生期において、CL-K1が相互作用する分子の探索も含め、その役割を解明していきたいと考え

ている。

### 【参考文献】

- 1) Keshi H, et al. Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol. Immunol.* 50 : 1001-1013, 2006.
- 2) Hansen S, et al. Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunology.* 185:6096-6104, 2010.
- 3) Yoshizaki T, et al. Comparison of human blood concentrations of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin. *J Biochem.* Epub ahead of print, 2011.
- 4) Rooryck C, et al. Mutations in lectin complement pathway genes COLLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nature Genetics.* 43 : 197-203. 2011.

### 14) 食品中に含まれるホルムアルデヒドが消化管粘膜免疫機構に及ぼす影響

研究代表者 中木 良彦

### 【目 的】

近年、国内外で違法な食品添加物や食品の偽装表示などの問題が報道機関に取り上げられ、国民の食に対する安全性への関心が高くなり、消費者に食品の安全性を示す正確な情報提供が重要となっている。その中で、食品添加物としての使用が禁止されている劇物のホルムアルデヒド(FA)は、食材の育成や加工の際に様々な条件のもとで食品に含有する可能性があり、また、無添加の自然食品中にも含まれることから安全性の上で無視できない物質である。一方で、従来のFAの毒性評価は鼻咽腔がんやシックハウスシンドromeの危険因子として吸入曝露による研究が多く、他方で経口曝露による消化管等への影響の報告は少数であり、安全性の検証は不十分であった。

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が消化管細菌叢の構成菌の減少をもたらし、局所の粘膜免疫系に異常をきたす事を既に報告した<sup>1,2)</sup>。しかしながら、FAの経口曝露による詳細な腸内フローラの変化、結果として起こる免疫機構の影響の詳細なデータは得られていない。

以上のことから、FA 添加飼料を用いたマウスの経口曝露実験を行い、食品中に含まれるFAの消化管への影響について、免疫異常を中心に解析し、FA含有食品の摂取による危険性について検討した。

### 【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 100mg/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、安樂死処置後に胃の幽門部直下を切断し下部消化管を取り出し、小腸と盲腸の間を切断して小腸を摘出した。小腸をハンクス液で洗浄後、ポリエチレンチューブを用いて小腸を反転し、腸管腔側を露出し、5%FCS を添加したハンクス液 45ml の入ったチューブに入れて 45 分間振とう後、ガラスワールカラムに通し、接着性の細胞を除いた。カラムを通過した混濁液はパーコール液を用いて繰り返し遠心分離し、上皮間リンパ球を精製した。一方で脾臓および小腸パイエル板を切除し、脾細胞リンパ球とパイエル板リンパ球浮遊液を調整した。得られた各々のリンパ球は蛍光抗体で表面抗原を免疫染色し、フローサイトメトリーを用いてリンパ球のサブセットを解析した。また、helper T cell の type1/2 バランスについて上皮間リンパ球培養上清中の IL-4 および IFN- $\gamma$  を ELISA 法にて測定した。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。

### 【結 果】

各群の体重増加量には有意な差は認められなかつた。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つた。

脾細胞リンパ球の subpopulation 解析（リンパ球種類毎の分布数を調べる）では、CD4 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球、および CD4/CD8 比の何れもコントロール群、曝露群間に有意な差を認めなかつた。一方、小腸上皮間リンパ球およびパイエル板リンパ球の subpopulation 解析では、CD8 陽性リンパ球が曝露群で有意に減少し ( $p < 0.05$ )、CD4/CD8 比が曝露群で有

意に増加した ( $p < 0.05$ )。また、小腸上皮間リンパ球では有意ではないものの CD4 陽性リンパ球の増加傾向を認めた ( $p < 0.1$ )。B220 陽性リンパ球は何れのリンパ球でも両群間で差を認めなかつた。小腸上皮間リンパ球の mitogen 刺激後の培養上清中のサイトカイン分泌量は、曝露群で IL-4/IFN- $\gamma$  比は両群間に差を認めなかつた。

### 【考 察】

脾細胞のリンパ球 subpopulation では FA 曝露による変化を認めなかつたが、局所の粘膜免疫の最前線である小腸上皮間リンパ球とパイエル板細胞では、CD4/CD8 比の有意な高値を示した。FA 経口曝露による腸内細菌の減少による免疫系への影響は局所の粘膜免疫系で明らかとなつた。しかしながら粘膜免疫系は局所とはいえ、産生された免疫グロブリンは全身の血管系を通じて homing により再度粘膜に戻り分泌される。このことは FA 曝露による影響が、細菌の減少した下部消化管のみならず全身に及ぶ可能性を示唆するが、今回の脾細胞リンパ球の subpopulation 解析結果からはホルムアルデヒドの経口曝露による影響は認められず、消化管粘膜免疫機構への影響に限局する可能性が示唆された。

腸内細菌減少により即時型アレルギーが誘発されやすいと報告<sup>3)</sup> されているものの今回の研究では Helper T cell の Type 1/2 バランスには影響を認めなかつたため、FA 経口曝露による小腸上皮間リンパ球からのサイトカイン産生については今後の詳細な解析が必要である。

### 【文 献】

- 1) 吉田貴彦：食品中に残存するホルムアルデヒドが摂取されて発現する健康影響に関する研究、MOA 健康科学センター研究報告集 10, 69-77 (2005)
- 2) 中木良彦：食品中に含まれるホルムアルデヒドの腸内免疫系への影響、臨床環境医学 19, 136 (2010)
- 3) Bach J.-F.: The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases, N Engl J Med 347, 911-20 (2002)

## 15) 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、海外からは低出生体重児や早産の割合が少ない<sup>1)</sup>ことや、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<sup>2)</sup>との報告があるが、国内からはそのような報告は認められていない。そこで今回、環境省の「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)という出生コホート研究の北海道ユニットセンター(UC)において、マタニティヨガ実践妊婦の割合を調査し、エコチル全体調査で得られる周産期結果とデータを連結させ、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った。

### 【方 法】

本研究は「エコチル調査」北海道UCの独自追加調査として、北海道UC参加者を対象に、その出産後に、マタニティヨガ実践に関する自記式質問票調査を実施した。なお質問票において、他の代替医療（ラマーズ法、ソフロロジー法、アロマセラピー、マタニティスイミング、マタニティビクス、マッサージ、鍼灸、気功、太極拳、瞑想、催眠療法、自律訓練法のいずれか）の実践、ストレス処理能力<sup>3)</sup> (SOC-3; Sense of Coherence, 3-21 の値を示し、高いほどストレス処理能力が高い)、主観的幸福度 (0-10 の値を示し、高いほど主観的幸福感が高い) についても調査を行った。

### 【結 果】

調査は平成24年3月21日から平成27年7月7日まで行われた。エコチル調査北海道UC参加者8,362名の内、死産や流産、研究脱落その他の理由で調査が行われなかつたものを除く7,571名に質問票を配布し、5,470名より回答を得た（回答率72.2%）。

5,470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、3,850名(70.4%)が「あった」と回答した。マタニティヨガを実践していたのは1,137名(20.8%)で、その学習方法は685名(60.2%)が指導者に習い、446名(39.2%)が本・DVD等で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  $12.9 \pm 7.8$  週間、 $2.2 \pm 1.8$  回/週、 $54.7 \pm 29.8$  分で、実践内容として身体運動、呼吸法、瞑想を行った者は、1,110名(97.6%)、952名(83.7%)、468名(41.2%)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411名(36.1%)、621名(54.6%)、94名(8.3%)であった。

また12種類の代替医療のいずれかを実践していた者は、1,289名(23.6%)に認められ、その上位3項目はソフロロジー法468名(8.6%)、マッサージ354名(6.5%)、アロマテラピー301名(5.5%)であった。SOC-3の平均値は、 $16.0 \pm 2.9$ であり、また主観的幸福度の平均値は、 $8.8 \pm 1.3$ であった。

### 【考 察】

マタニティヨガ実践者は20.8%で、過去の途中集計とほぼ同じ割合(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。エコチル調査における周産期データの全固定が2015年末予定であり、周産期予後と連結させた解析を2016年度中に実施し、マタニティヨガ実践による周産期予後への影響を今後解析していく。

### 【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), 333-340 (2012)
- 3) Togari T: Development of a short version of the sense of coherence scale for population survey. J Epidemiol Community Health.61: 921-922 (2007)

## 16) 多包虫がもつ宿主補体活性からの逃避機構の解明 研究代表者 佐々木 瑞希

### 【目的】

多包虫は中間宿主の体内において、補体系による傷害機構を回避して増殖する。宿主の補体経路においては、

セリンプロテアーゼが重要な働きを担うことが知られている。古典経路を開始するC1rとC1s、代替経路におけるB因子およびD因子、レクチン経路におけるMASP 1および2は全てセリンプロテアーゼとして機能する。多包虫のセリンプロテアーゼインヒビター (serpin) ファミリー分子がこれらのプロテアーゼを阻害することで宿主の補体活性を抑制している可能性を検討した。

### 【方 法】

多包虫ゲノムならびにトランスクリプトームデータから、serpin ファミリー分子と相同な配列を探査したところ、既知の SerpinEmu (Merckelbach and Ruppel, 2007) に加えて 2 つの配列を見出し、Serpine2Emu および Serpin3Emu と名付けた。多包虫cDNAからそれぞれの分子のコード領域をクローニングし、His タグ付加タンパク質として大腸菌発現系を用いて発現させた。これらの組み換えタンパク質に対するウサギ抗体を作成し、ウエスタンプロットにより多包虫での発現を確認した。さらに、これらのタンパク質が虫体外に分泌されているか調べた。また、作成した組み換えタンパク質のうち、rSerpinEmu のみが可溶性となつたため、これについてトリプシン、キモトリプシン阻害活性を調べた。また、補体活性測定キットを用いて、各経路における活性阻害能を評価した。

### 【結 果】

それぞれの組み換えタンパク質に対するウサギ抗体を用いたウエスタンプロットの結果、SerpineEmu は細胞内に、Serpine2Emu および Serpin3Emu は細胞内および虫体外分泌フラクション中に発現が認められた。また、得られた組み換えタンパク質のうち、rSerpinEmu は大腸菌において可溶性タンパク質として発現した。これを精製し、トリプシン活性阻害能を有することを確認した。しかしながら、いずれの経路においても補体活性阻害能は確認されなかった。rSerpine2 および 3Emu については大腸菌が封入体を形成し、不溶性となつた。酵母による発現も試みたが、いずれの分子も可溶性の組み換えタンパク質は得られなかつた。

### 【考 察】

既知の SerpinEmu については、トリプシン阻害活性を有しているが補体活性阻害能を持たないことが分か

った。この分子は虫体細胞内に局在し、自身のプロテアーゼ活性を調節する役割を果たすと考えた。これに対して、新たに見出した多包虫 Serpin2 Emu および Serpin3Emu については虫体外への分泌が確認されたことから、宿主との相互作用に関与している可能性が示唆された。しかしながら、組み換えタンパク質が不溶性となり、機能解析には至らなかつた。今後、可溶性タグ付加タンパク質を作成することで、各種セリンプロテアーゼ阻害能および補体活性阻害能を調べたい。

### 【文 献】

Merckelbach and Ruppel. 2007. Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*. Mol. Biochem. Parasitol. 156. 84-88.

### 17) 膵癌浸潤、転移における長鎖ノンコーディングRNAによる制御機構の解明

研究代表者 高橋 賢治

### 【目 的】

近年、長鎖の機能性 RNA である long non-coding RNA (lncRNA) が、種々の疾患の病態成立に関わる事が明らかにされつつあるが<sup>1)</sup>、膵癌の発癌や進展と関連した lncRNA の報告は数少ない。一方、我々はこれまでに肝癌において lncRNA が細胞外小胞 (Extracellular vesicle (EV)) を介して細胞間情報伝達され、抗癌剤、低酸素抵抗性に寄与することなどを報告してきた<sup>2,3)</sup>。本研究では膵癌浸潤、転移に重要なプロセスである Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) に寄与する lncRNA を同定し、その核酸本体としての EMT 制御機構のみならず、EV を介した情報伝達機構を解明する事を目的とした。

### 【方 法】

膵癌細胞 (Panc-1) とそれから分泌される EV に高発現する lncRNA を、リアルタイム PCR 法を用いた lncRNA profiling によって発現解析し、同時に強力な EMT 促進サイトカインである TGFβ の投与により膵癌細胞、EV に誘導される lncRNA を分析した。また、膵癌細胞より超遠心法によって EV を抽出し、それら EV をレシピエント膵癌細胞へ添加する事によって、レシピエント細胞における浸潤能に与える影響につい

ての検討を行った。

## 【結 果】

LncRNA profilingにより発現解析を行った結果、HULC、linc-RoR、linc-VLDLR、HOTAIRの4種類のlncRNAが、膵癌細胞から分泌されるEVに特に高発現し、さらにTGF $\beta$ によって膵癌細胞内、EV内における発現が誘導される事が想定された。HULCはこれまでに肝癌進展との関連が報告されており<sup>1)</sup>、linc-RoRとlinc-VLDLRについては我々が、肝癌における低酸素抵抗性及び抗癌剤抵抗性に寄与する事を報告しているものの<sup>2,3)</sup>、膵癌の発癌、進展との関連については未だ報告がない。HOTAIRについては膵癌浸潤との関連が報告されているものの、その詳細な制御メカニズムは不明である<sup>4)</sup>。その後の検討で、これら4種類のlncRNAのうちHULC、linc-RoR、linc-VLDLRの3種類はEVによって細胞間伝達され、レシピエント膵癌細胞へ情報伝達されている事が示唆された。更にこれらEVを添加する事によってレシピエント膵癌細胞の浸潤能が増強された。これらの結果から上記3種類のlncRNAは、EVによる細胞間情報伝達を介し、膵癌細胞の浸潤能の制御に寄与している可能性が想定された

(図1)。

## 【考 察】

これまで膵癌においてはK-ras、p53、p16、SMAD4など多くの遺伝子異常が発癌に関わる事が報告されているが、膵癌におけるlncRNAを介したエピジェネティックな遺伝子制御機構についての報告は未だ数少ない。今回の結果からHULC、linc-RoR、linc-VLDLRの3種類のlncRNAがEMT誘導サイトカインであるTGF $\beta$ によって発現誘導され、EVを介した細胞間情報伝達を介して膵癌の浸潤能に影響を与える可能性が示唆された。今後これら3つのlncRNAが、実際にどのようなメカニズムでEMTシグナルを制御し、膵癌浸潤、転移に影響を与えているのか、更にはEVを介したlncRNAの情報伝達がこれらのプロセスに与える影響を詳細に解析する予定である。

## 【文 献】

- 1) Takahashi K, Yan I, Haga H, & Patel T (2014) Long noncoding RNA in liver diseases. Hepatology 60 (2) : 744-753.
- 2) Takahashi K, Yan IK, Haga H, & Patel T (2014)

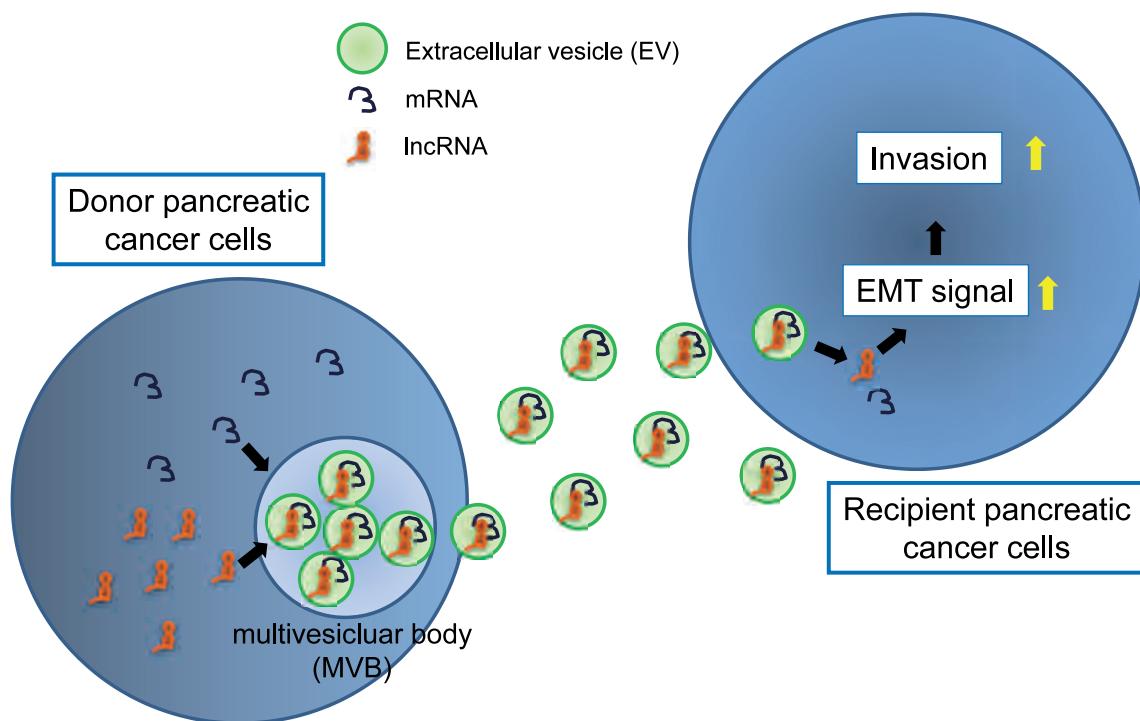


図1 EVによる細胞間情報伝達を介したlncRNAによるEMT制御機構；Linc-RoR、linc-VLDLR、HULCはEVによる細胞間情報伝達を介し、膵癌細胞の浸潤能の制御に寄与している可能性が考えられた。

- Modulation of hypoxia-signaling pathways by extracellular linc-RoR. J Cell Sci 127 (Pt7) : 1585-1594.
- 3) Takahashi K, Yan IK, Wood J, Haga H, & Patel T (2014) Involvement of extracellular vesicle long noncoding RNA (linc-VLDLR) in tumor cell responses to chemotherapy. Mol Cancer Res 12 (10) :1377-1387.
- 4) Kim K, et al. (2013) HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. Oncogene 32 (13) : 1616-1625.

### 18) マウス脂肪肝の肝内鉄蓄積における鉄代謝調節因子ヘプシジン発現異常のメカニズムの解明

研究代表者 長谷部 拓夢

#### 【目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は病態の進行に酸化ストレスが関わり、しばしば併発する鉄過剰症がその要因となる<sup>1)</sup>。鉄代謝は主に肝細胞で産生される鉄代謝調節分子ヘプシジンが中心的な役割を果たす<sup>2)</sup>。我々はこれまでに NAFLD モデルマウスにおいてヘプシジン発現が低下することを見出していた。しかし、鉄代謝は生体環境に応じて変化することが必要で複雑に調節されており、完全な解明はされていない。今回の研究では、肝脂肪化による肝内低酸素化の関与を想定し、肥満・脂肪肝モデルマウスの鉄関連分子およびヘプシジン制御系遺伝子の発現に着目して、ハイスクープットゲノムシークエンサーによる RNA シークエンシングを行い、背景の分子機構の探索を行った。

#### 【方 法】

##### 1. モデルマウスによる検討

NAFLD モデルマウスは 8 週齢の C57BL/6 マウスにラードを主とした高脂肪食を 16 週間投与して作成した。対照群として同期間通常食を投与した C57BL/6 マウスを用いた。低酸素環境での肥満マウスとして 12 週齢のレブチン欠損マウスである ob/ob マウスを用い、対照群としては同週齢の C57BL/6 マウスを用いた。肝細胞分離のためには通常食で飼育した C57BL/6 マウスを用いた。

#### 2. RNA シークエンシング

高脂肪食負荷マウス肝から抽出した RNA を用いてハイスクープットゲノムシークエンサー (IonTorrent) により発現解析を行った。解析ソフトとして Genomics Workbench (CLC bio) を用い、通常食群と高脂肪食群の発現量を比較して、発現比と t 検定による P 値を算出した。

#### 3. 低酸素環境下での検討

16 週間の食餌負荷を行ったマウス肝では、低酸素反応性の HIF-1 $\alpha$  蛋白発現を評価した。肥満状態での低酸素感受性を評価するため、ob/ob マウスと対照マウスを低酸素飼育器で飼育し 1 週間後に低酸素環境下で屠殺した。この際、屠殺直前に低酸素状態を評価するため Pimonidazole (Hypoxyprobe<sup>TM</sup> ; コスモバイオ) を腹腔内投与した。In vitro モデルとして C57BL/6 マウス肝からコラゲナーゼ灌流により分離した初代培養肝細胞もしくは非実質細胞の一つである類洞内皮細胞を用い、低酸素培養器で 24 時間培養して低酸素によるヘプシジン遺伝子 Hamp とその発現に関与する Gdf15 や Bmp4 の mRNA 発現に関して RT-PCR で検討した。

#### 【結 果】

高脂肪食負荷マウスによる mRNA シークエンシングでは表 1 に示す鉄関連遺伝子発現変動の結果が得られた。ヘプシジンをコードする Hamp の低下や Hamp シグナルを抑制する Bmp4、Gdf15 の発現亢進が見られ、エリスロポエチン (EPO) 受容体をコードする Epor mRNA も亢進していた。マウスの EPO シグナル評価のため、血漿 EPO 濃度を ELISA で測定すると、高脂肪食群で有意に高値を示した (図 1)。

マウス肝の HIF-1 $\alpha$  蛋白発現は肝組織全体で観察された (図 2a)。高脂肪食マウスの HIF-1 $\alpha$  発現も肝組織全体で観察されたが、高度の肝脂肪化のため蛋白発現量の多寡を評価するに至らなかった。低酸素で飼育したマウスでの Hypoxyprobe<sup>TM</sup> による低酸素状態の評価では対照マウスでも中心静脈域優位の陽性像を認めたが、ob/ob マウスでは肝全体に陽性像を認めた (図 2b)。

低酸素曝露に対する初代培養肝細胞と類洞内皮細胞の遺伝子発現評価を行った。肝細胞では低酸素曝露のみで Hamp mRNA 発現が抑制され、Hamp を抑制する Gdf15 の発現は亢進していた (図 3)。類洞内皮細胞で

表 1 mRNA シークエンシングの鉄関連遺伝子発現変動

	遺伝子	発現蛋白質	発現比	P値
Hepcidin	<i>Hamp</i>	Hepcidin anti microbial peptide	-3.322	0.027
BMP-SMAD シグナル	<i>Bmp4</i>	Bone Morphogenetic Protein 4	1.601	0.032
	<i>Bmp6</i>	Bone Morphogenetic Protein 6	1.039	0.788
	<i>Bmper</i>	BMP Binding Endothelial Regulator	5.242	0.035
	<i>Bmpr2</i>	Bone Morphogenetic Protein Receptor 2	1.331	0.007
	<i>Hfe2</i>	Hemojuvelin	1.88	0.011
	<i>Smad1</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 1	1.011	0.936
トランスフェリン 受容体シグナル	<i>Tfrc</i>	Transferrin Receptor Protein 1	1.195	0.25
	<i>Tfr2</i>	Transferrin Receptor Protein 2	-1.014	0.784
IL-6-STAT3 シグナル	<i>Il6</i>	Interleukin 6	1	1
	<i>Stat3</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	1.236	0.004
その他	<i>Epor</i>	Erythropoietin Receptor	2.303	0.047
	<i>Gdf15</i>	Growth Differentiation Factor15	4.226	0.015

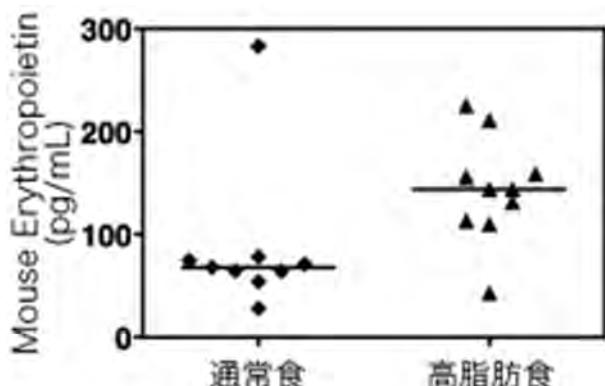


図 1 マウス血漿エリスロポエチン濃度 P = 0.025

は *Hamp* 抑制因子である *Bmper* と *Gdf15* の発現変化は認められなかった（図 4）。

### 【考 察】

EPO は低酸素により腎からの発現が誘導され、*Gdf15* は EPO による *Hamp* 抑制に関わるとされている<sup>3)</sup>。高脂肪食負荷マウスでは EPO 発現亢進があることから恒常に低酸素に曝露されており、肝内では *Gdf15* 発現低下があることから、低酸素がヘプシジン発現低下とそれに引き続く鉄過剰症の原因となることが示唆される。肥満マウスにおいて低酸素感受性が亢進していることからも、肥満と低酸素、ヘプシジン発現、鉄代謝異常が密接に関連すると考えられる。

初代培養肝細胞の検討では、肝細胞自体が低酸素に応答してヘプシジン発現を低下させており、肥満マウ

スにおける恒常的な低酸素がヘプシジン発現に影響していることがわかる。先に BMP シグナル発現低下がヘプシジン発現に影響している可能性を見出していたため、BMP シグナルに関連する類洞内皮細胞の低酸素に対する影響も検討したが、今回の検討では明らかな関連が指摘できなかった。これらの結果から、低酸素自体はヘプシジン主要調節系である BMP シグナルを介さず、ヘプシジン発現に影響を与えることが示唆された。

### 【文 献】

- Sorrentino P, et al. Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 2009 ; 50 : 351-357.
- Nemeth E, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science 2004 ; 306 : 2090-2093.
- Quingdu Liu, et al. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. J Clin Invest. 2012 ; 122 (12) : 4635-4644.

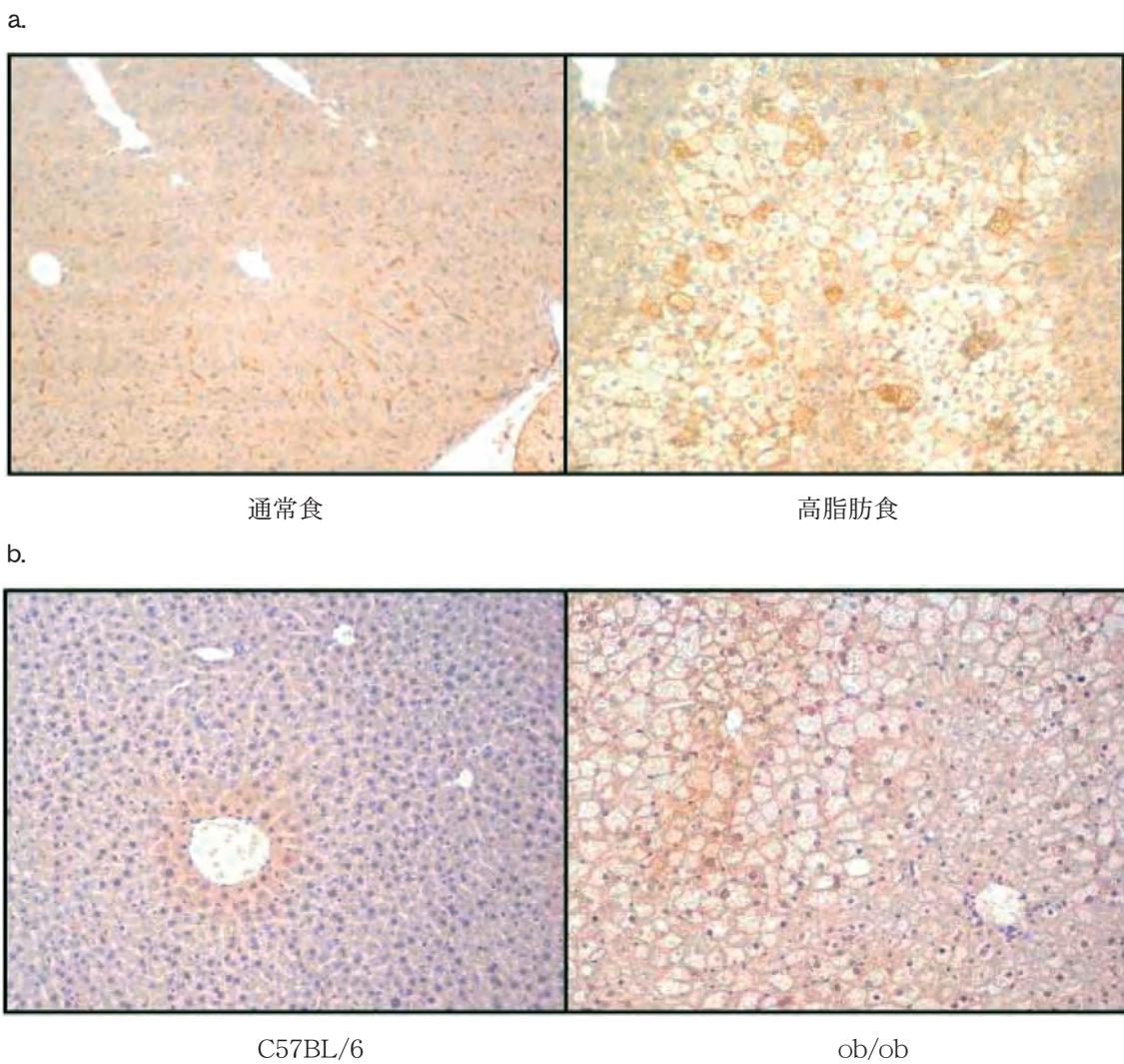


図2 マウス肝組織免疫組織化学染色像 HIF-1 $\alpha$  染色 (a; 200倍)、Hypoxyprobe 染色 (b; 200倍)

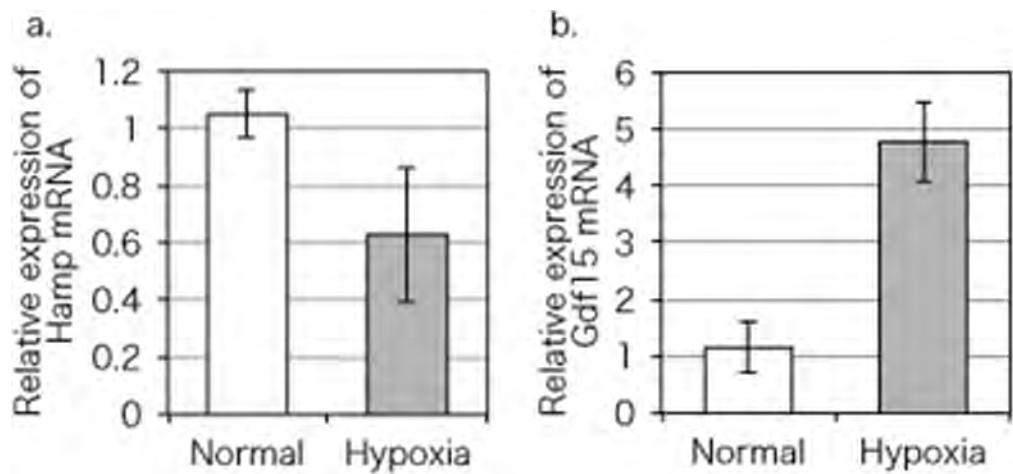


図3 初代培養肝細胞のRT-PCR結果 Hamp mRNA (a;  $P = 0.006$ )、Gdf15 mRNA (b;  $P < 0.001$ )

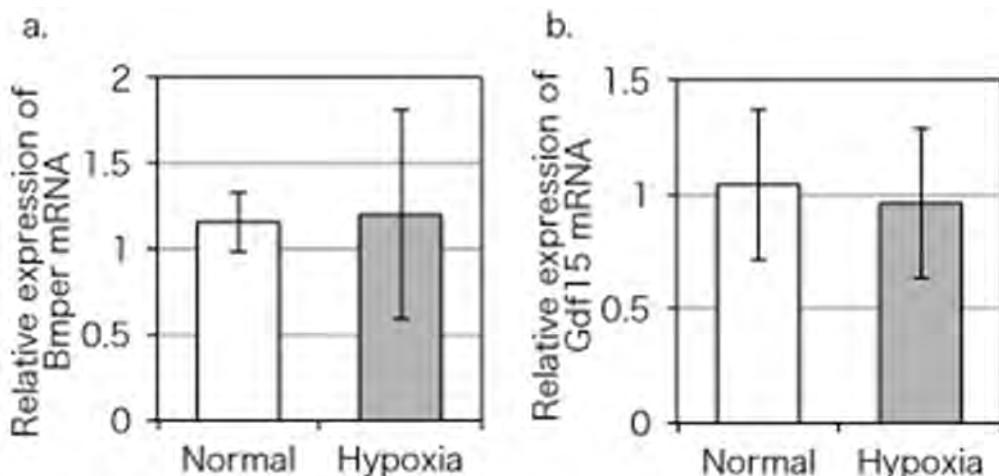


図 4 初代培養類洞内皮細胞の RT-PCR 結果 Bmpr mRNA (a)、Gdf15 mRNA (b)

#### 19) MRエラストグラフィーを用いた先天性心疾患術後の肝硬度の評価

研究代表者 杉本 昌也

##### 【背景と目的】

近年、先天性心疾患（CHD）の診断および心臓外科手術、内科治療の目覚ましい進歩により、複雑な先天性心疾患を含めた95%以上のCHD患者が救命されるようになった。また術後の経過も概ね良好であり、CHD患者の85%は思春期、成人期まで到達する事が可能になった<sup>1)</sup>。しかしながら小児期に順調に経過したCHD患者も、成人期に入り年齢を重ねるにつれ、遺残病変や続発症のために新たな様々な問題を引き起こしている。中でもフォンタン手術は、単心室型先天性心疾患の生命予後やQOLを著しく改善させたが、その特徴的循環のために、低心拍出・心不全、不整脈、血栓による塞栓症、蛋白漏出性胃腸症、肝機能障害、側副血行路や肺動静脈瘻の発達など、さまざまな長期合併症が報告され始めている（表1）<sup>2-4)</sup>。特に肝硬変は、非常に重篤な病態で、中心静脈圧の上昇や慢性的な静脈での血液うっ滞によって引き起こされた肝線維化が、高度に進展した末期像である。フォンタン術後患者の70～90%に肝線維化徵候がみられるという報告があるが、早期に発見することは難しい。

近年、国内初となる、非侵襲的な肝疾患の進行度診断を可能にするMRI用の肝臓エラストグラフィーが開発され注目を浴びている（図1）。この装置は、アクティブ・ドライバーと呼ばれる振動を発生させる外部加振装置と、パッシブ・ドライバーと呼ばれる振動を人体に伝播させるためのデバイスから構成され、これ

らの2つの装置を用いて、肝臓領域に対して振動を与えるながらMRIで組織の相対的な硬さ（弾性）を画像化する。肝疾患の進行度を、患者負担を減らしながらより高い精度で診断できると考えている。しかし小児CHDにおける肝硬度の詳細な検討は少ない。そこで、本研究はCHD術後の肝硬度をMRエラストグラフィーを用いて評価し、他の肝線維化マーカーと比較することを目的とした。

表1 Fontan手術術後の問題点

- 不整脈
- 蛋白漏出性腸症
- 肺動静脈瘻
- 血栓症
- 心機能低下
- 房室弁閉鎖不全
- 腎機能低下
- **肝機能障害・肝硬変**
- 喘息
- 消化管出血
- 大動脈解離
- 耐糖能異常
- プラスチック気管支炎



図1 MRエラストグラフィ（GE社製）

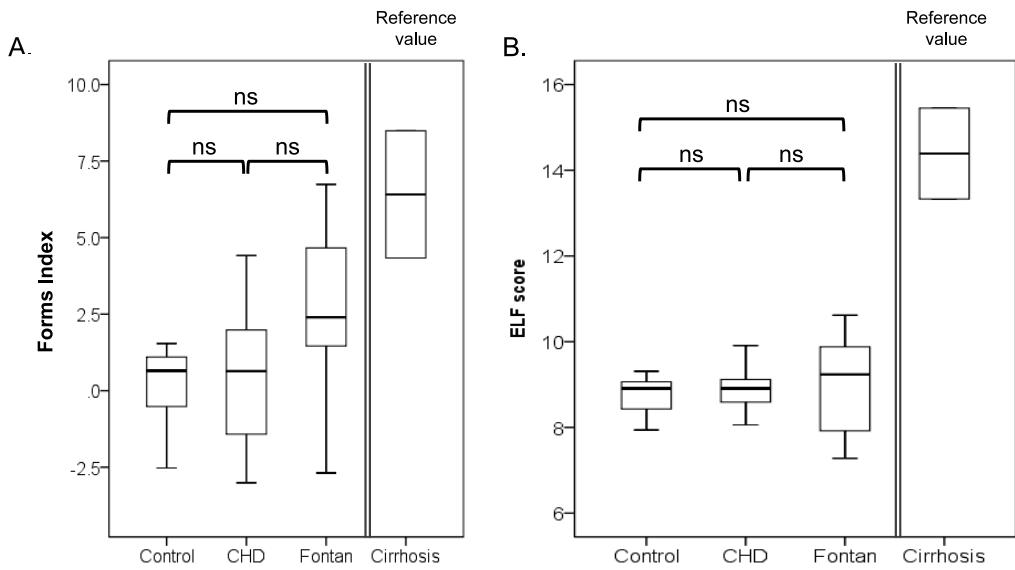


図 2 肝線維化バイオマーカーによる比較

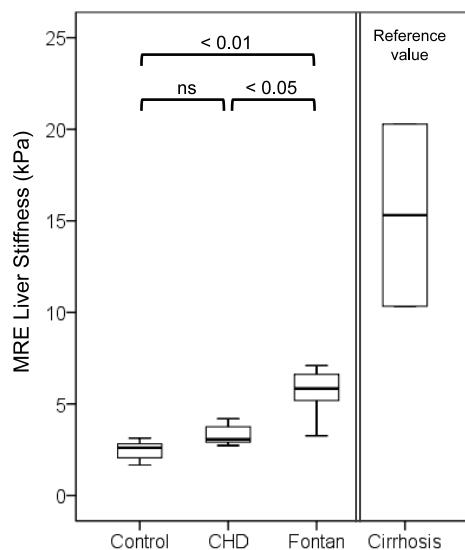


図 3 MR エラストグラフィーで求めた測定値による比較

## 【方 法】

45名の対象を3群に分け、心内修復術後のICR群(22名、中央値13.6歳)、フォンタン術後群(11名、15.4歳)、Control群(12名、16.7歳)とした。MRエラストグラフィーは肝中央の冠状断面にROIを3か所とり、その平均値をLiver stiffness value (LS)として求めた。心臓カテーテル検査による各種計測値[心筋数、体血圧、肺動脈圧、中心静脈圧(CVP)、体血管抵抗(SVR)、肝静脈楔入圧、動脈血酸素飽和度]および肝線維化生化学マーカー(PIHP、HA、TIMP-1)を測定し、各群間で比較検討した。

## 【結果・考察】

肝線維化マーカーは各群間に有意な差は認めず低値であった(図2A、B)。LSはフォンタン術後群で有意に高値であった(図3)。

## 【結 論】

MRエラストグラフィーは小児においても肝硬度を非侵襲的に評価できる有用なツールである。特にフォンタン患者ではバイオマーカーよりも鋭敏に肝線維化を評価することが可能である。

## 【参考文献】

- Shiina Y, Toyoda T, Kawasoe Y, Tateno S, et al. Prevalence of adult patients with congenital heart disease in Japan Original Research Article. Int J Cardiol 2011 ; 146 : 13-16.
- de Leval MR, Deanfield JE. Four decades of Fontan palliation. Nature reviews Cardiology 2010 ; 7 : 520-7.
- Ghaferi AA, Hutchins GM. Progression of liver pathology in patients undergoing the Fontan procedure: Chronic passive congestion, cardiac cirrhosis, hepatic adenoma, and hepatocellular carcinoma. J Thorac Cardiovasc Surg 2005 ; 129 : 1348-52.
- Kiesewetter CH, Sheron N, Vettukattill JJ, Hacking N, et al. Hepatic changes in the failing Fontan circulation. Heart 2007 ; 93 : 579-84.

## 20) フラクタル理論を用いたマイクログリア形態解析による糖尿病網膜症の超早期診断法の確立

研究代表者 下内 昭人

### 【目的】

糖尿病網膜症は、これまで血管障害として考えられてきたが、近年、慢性炎症がより早期に生じていることが示唆されている。しかし、血管障害が出現する前での早期診断法は確立されていない。マイクログリアは、網膜における免疫担当細胞である一方で、糖尿病網膜症などの慢性炎症を基盤とする疾患の病態に深く関与している。また、活性度によって形態を変化させる特徴があり、その形態解析が脳梗塞モデルで有用であることが報告されている<sup>1)</sup>が、網膜での有用性は明らかになっていない。本研究では、マイクログリア形態解析が網膜の炎症状態の評価に有用かを検討した。

### 【方 法】

C57BL/6Jマウスを用いて高酸素負荷網膜血管新生(OIR)モデルを作成し、日齢17(P17)で眼球を摘出した。また、コントロールマウスの眼球をP5、P17で摘出した。マイクログリアはIba1抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で撮影後、過去の報告<sup>1)</sup>を参考に以下の5項目を算出した。1) form factor (FF; 円形度)、2) branching density (BD; 分枝密度)、3) convexity (CON; 空間的密度)、4) solidity (SOL; 細胞体積)、5) fractal dimension ( $D_F$ ; 複雑性)

次に、エンドトキシン誘導ぶどう膜炎(EIU)モデルを作成し、リポ多糖(LPS)投与後6、12、24、36時間で眼球を摘出した。マイクログリア形態解析を行い、炎症性サイトカインをqRT-PCRで測定した。

### 【結 果】

正常血管新生期における血管領域(P5c)及び無血管領域(P5p)、OIRにおける病的血管領域(P17NV)及び無血管領域(P17AVA)に存在するマイクログリアは、コントロール(P17con)と比較して形態が活性型に変化し、形態解析ではFF、BD、SOLが有意に高く、 $D_F$ は有意に低かった(図1)。また、P5cにおいて、深層よりも浅層に存在するマイクログリアのほうが有意にその傾向を示した。さらに、同様の傾向を示していたP5cとP17NVを比較したところ、病的血管新生でのマイクログリアのほうがより顕著な変化であった(図

2)。

次にEIUモデルにおいて、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、iNOS)はLPS投与後6時間でピークに増加し、その後漸減した。一方、マイクログリア形態解析においても、各指標の値は投与後6時間から12時間で最も有意に変化していた(図3)。

### 【考 察】

本研究では、血管新生や無血管領域における活性化したマイクログリアでは、FF、BD、SOLが増加し、 $D_F$ が減少していた。したがって過去の脳梗塞モデルを用いた報告と同様に、網膜においてもマイクログリアの形態変化を定量化することが可能であった。

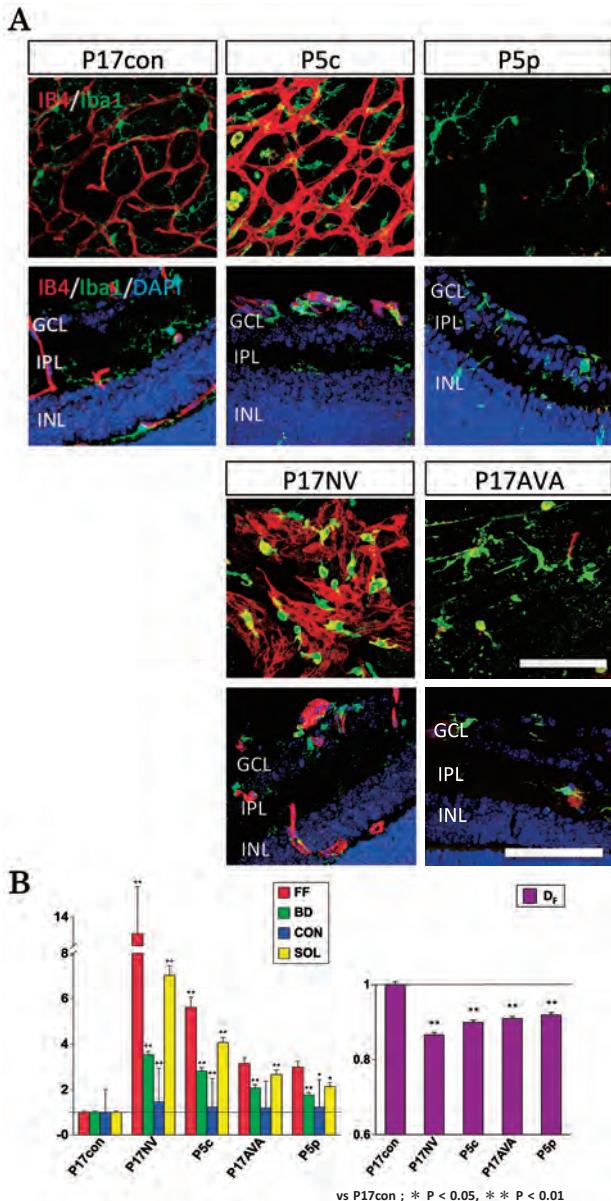
本研究では、正常血管新生において、深層よりも、血管新生が生じている表層のマイクログリアがより活性化していた。過去の報告では、浅層と深層でのマイクログリアの形態に差がなかったと述べている。しかし、過去の報告では、顕微鏡下での外見のみで区別しており、わずかな変化を捉えられなかつたと思われる。一方で、マイクログリア形態解析はわずかな変化を区別することができたと考えられた。さらに本研究では、正常及び病的血管新生におけるマイクログリアの形態のわずかな違いも区別することができる。

また、炎症性サイトカインの変化とマイクログリアの形態変化は連動している傾向があった。マイクログリア形態解析は半自動的に算出できる為、安定した結果が得られる。そして、これまで外見で判断していたマイクログリアの活性度を数値化し、定量化することができる。これらのことから、網膜の炎症状態の評価にマイクログリア形態解析は有用であると思われた。

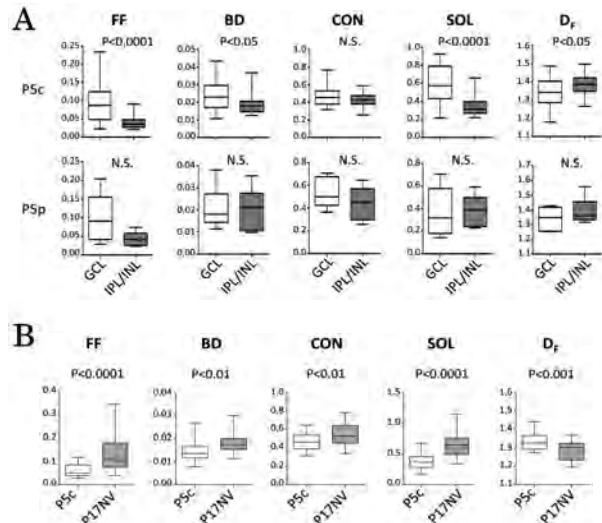
近年、画像診断技術の発達に伴い、生体内の視細胞を認めるようになった。今後マイクログリアを認めるようになれば、マイクログリア形態解析によって網膜の炎症状態を定量的にリアルタイムで評価することができるとなり、新たな治療薬の評価や糖尿病網膜症の超早期診断に応用できることが期待される。

### 【文 献】

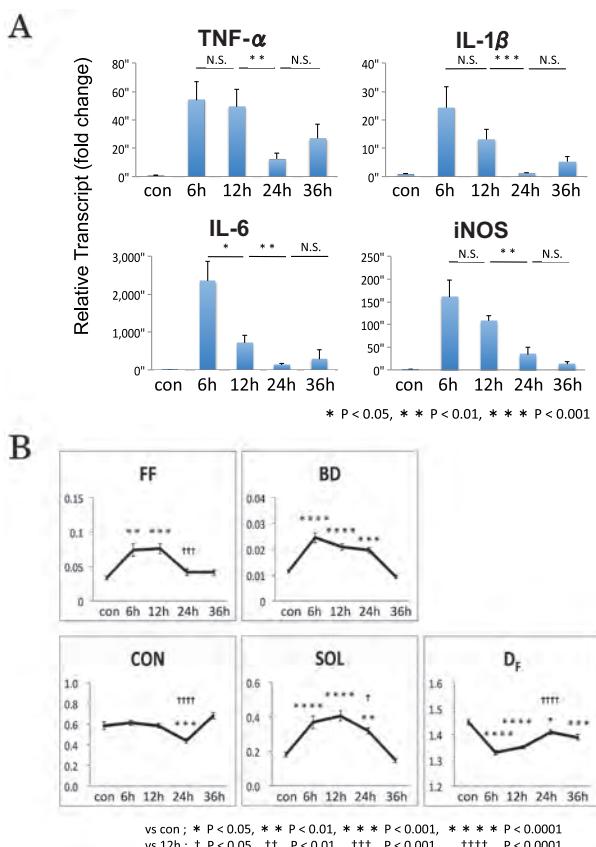
- Soltys Z, et al.: Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis. J Neurosci Methods 2005; 146: 50-60.



**図 1 各条件におけるマイクログリアの形態の違い**  
(A) 定常状態 (P17con) のマイクログリアは細胞体が小さく、足を長く伸ばした ramified 型である。一方、正常血管新生における血管領域 (P5c) 及び無血管領域 (P5c)、そして病的血管新生領域 (P17NV) 及び無血管領域 (P17AVA) に存在するマイクログリアは、細胞体が大きく、足も短く変化している。特に P5c と P17NV では活性型である amoeboid 型を呈している。上段：ホールマウント、Scale = 50  $\mu$ m、血管は IB4 (赤)、マイクログリアは Iba1 (緑) で染色。下段：凍結切片、Scale = 50  $\mu$ m。(GCL；神経節細胞層、IPL；内網状層、INL；内顆粒層) (B) マイクログリア形態解析における P17con を基準とした各群の比較

**図 2 OIR モデルでのマイクログリア形態解析**

(A) 正常血管新生での浅層 (GCL) と深層 (IPL/INL) の層別解析 (B) 正常血管新生 (P5c) 及び病的血管新生 (P17NV) の比較

**図 3 EIU モデルでの qRT-PCR 及びマイクログリア形態解析の結果**

(A) 炎症性サイトカインの経時的变化 (B) マイクログリア形態解析における各測定項目の経時的変化

## 21) IgA 腎症扁桃における CX3CR1 の検討

研究者代表 大高 隆輝

## 【目的】

IgA 腎症の病態は IgA を含む免疫複合体が腎糸球体に沈着し、炎症を起こすことが主体とされている。IgA 腎症の扁桃リンパ球では IgA 陽性 B 細胞が増加しており、マイトージェン刺激下で培養すると多量体 IgA の産生亢進がみられ<sup>1)</sup>、扁摘後血清 IgA 値の低下が認められることが報告されている<sup>2)</sup>。このように扁桃は IgA 腎症患者における血清 IgA の供給源となっており、IgA を介して扁桃が IgA 腎症の病態に関与している可能性は非常に高い。しかし、免疫グロブリン非存在下においても腎炎が発症し得る事も証明されており<sup>3)</sup>、実際に様々な表現形質を持つ T 細胞が IgA 腎症の病巣に浸潤していることが報告されている<sup>4-6)</sup>。

近年糸球体腎炎における浸潤細胞上に発現するケモカイン受容体として CX3CR1 が同定され、IgA 腎症での血尿の程度と末梢血 CD8 陽性 T 細胞の CX3CR1 発現に相関があったと報告されている<sup>7)</sup>。しかし、IgA 腎症扁桃における CX3CR1 を検討した報告はない。

今回我々は、IgA 腎症患者の扁桃単核球における CX3CR1 発現および各種マイトージェン刺激による発現変化、IgA 腎症患者の末梢血単核球における CX3CR1 の発現および口蓋扁桃摘出による変化を検討し、扁桃 CX3CR1 陽性 T 細胞の IgA 腎症の病態における役割について検討した。

## 【方 法】

対象は当科で口蓋扁桃摘出術を施行した IgA 腎症 20 名非 IgA 腎症 25 名である。摘出口蓋扁桃、腎生検の検体に CX3CR1 染色を行い、摘出扁桃、術前後の末梢血より単核球を分離し、ツーカラーフローサイトメトリーを施行し、CD8<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> 細胞数の発現を検討した。さらに扁桃単核球は各種マイトージェン刺激を行い、その発現の変化をツーカラーフローサイトメトリーにて検討し、リガンドである CX3CL1 への遊走能もミグレーションアッセイを施行し、検討を行なった。

## 【結 果】

扁桃・腎組織免疫染色にて、IgA 腎症患者扁桃濾胞間に CX3CR1 陽性細胞を多く認めた(図 1)。IgA 腎症患者腎組織でも糸球体、間質、尿細管に CX3CR1 陽性細胞

Fig. 1

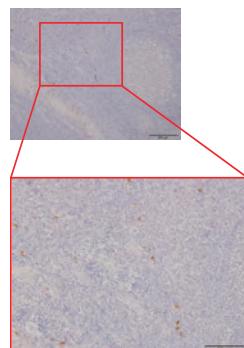


図 1

を認めた(図 2)。フローサイトメトリーの結果、IgA 腎症群にて有意に CD8<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> 細胞数の割合は増加していた(図 3)。また、各種マイトージェン刺激を施行した結果、非メチル化 CpG-ODN(細菌由来 DNA)刺激において、IgA 腎症群での扁桃単核球 CD8<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> 細胞数の割合は有意に増加していた(図 4)。末梢血では IgA 腎症患者単核球にて、CD8<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> 細胞数の割合が有意に増加し、扁摘後その割合は有意に減少していた(図 5)。

## 【考 察】

これまでの当科の研究成果から扁桃 T 細胞を中心とした IgA 腎症の発症機序を考察した(図 6)。IgA 腎症の扁桃では、パラインフルエンザ菌などの扁桃常在菌や細菌由来 DNA(非メチル化 CpG-ODN)に対する過剰免疫応答(免疫寛容の破綻)によって B, T 細胞上の TCRVβ6 や CXCR3, CX3CR1 が過剰発現され、体循環を経て腎へホーミングし、組織傷害に関与していると考える。IgA 腎症に対する扁桃摘出術の効果は明らかであるが、残念ながら否定的な意見も存在する。その理由の一つとして、扁桃と IgA 腎症の関連性を示す基礎的エビデンスが希薄であることが挙げられる。基礎的な検討を行いその結果を積み上げることは、新たな治療法の開発に繋がるだけではなく、他科医師へのより説得力のある啓蒙に役立つと考えられる。今後も検討を続けていきたい。

## 【文 献】

- Egido J, Blasco R, Lozano L, et al. Immunological abnormalities in the tonsils of patients with IgA

Fig. 2

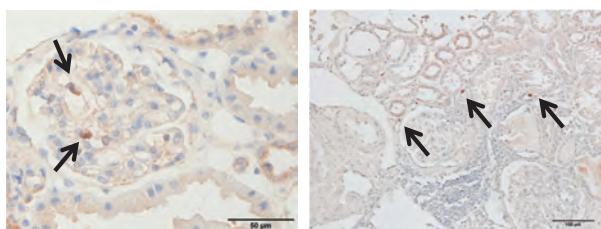


図 2

Fig. 3

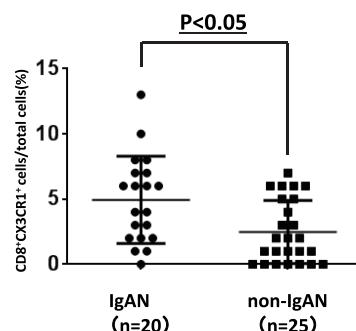


図 3

Fig. 4

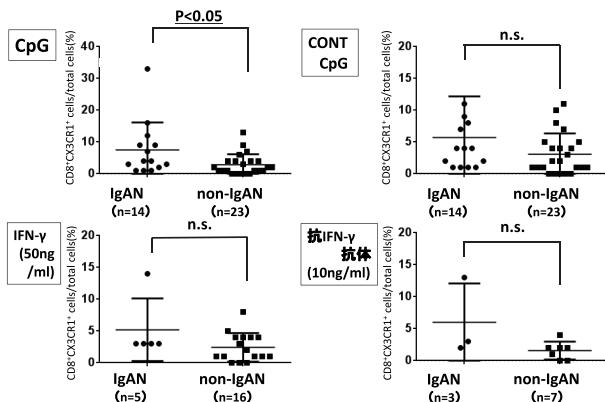


図 4

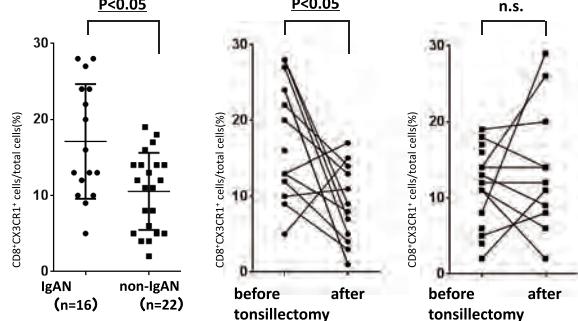
Fig. 5  
(a)扁桃摘出前末梢血  
(b) IgA腎症術前後  
(c)非IgA腎症術前後

図 5

Fig. 6

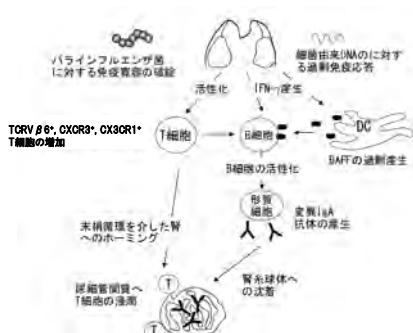


図 6

nephropathy: inversion in the ratio of IgA : IgG bearing lymphocytes and increased polymeric IgA synthesis. Clin Exp Immunol 1984 ; 57 : 101-106.

2) Masuda Y, Tamura S, Sugiyama N : The effect of tonsillectomy and its postoperative clinical course in IgA nephropathy with chronic tonsillitis. Galioto GB eds. Tonsils : a clinically oriented update, Basel, Karger;

1992, p.203-207.

- 3) Radeke HH, Tschernig T, Karulin A, et al. CD4+T cells recognizing specific antigen deposited in glomeruli cause glomerulonephritis-like kidney injury. Clin Immunol 2002 ; 104 : 161-173.
- 4) Wu H, Zhang GY, Clarkson AR, et al. Conserved T-cell receptor beta chain CDR3 sequences in IgA nephropathy biopsies. Kidney international 1999;55:109-119.
- 5) Segerer S, Hughes E, Hudkins KL, et al. Expression of the fractalkine receptor(CX3CR1)in human kidney diseases. Kidney international 2002 ; 62 : 488-495.
- 6) Segerer S, Banas B, Wornle M, et al. CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. Am J Pathol 2004;164:635-649.
- 7) Sharon N, Cox F, Sallustio F, Serino G, et al. Activated innate immunity and the involvement of CX3CR1-fractalkine in promoting hematuria in patients

with IgA nephropathy. *Kidney international* 2012 ; 82 : 548 560

## 22) ヒト男性不妊症と習慣流産の原因遺伝子同定および臨床医学への応用

研究代表者 上田 寛人

### 【目的】

現在非閉塞性無精子症患者のうちおよそ 20% が遺伝学的な素因が示唆されている<sup>1)</sup>。これらの遺伝学的要因には Y 染色体の微小欠失及びある種の遺伝子異常が含まれる<sup>2)</sup>。Sin3 蛋白は大きな Sin3A 蛋白とそれに極めて類似した Sin3B 蛋白から構成され、転写因子として重要な役割を担っている<sup>3)</sup>。2012 年 Sin3A 遺伝子のノックアウトマウスが報告されその表現型はオスでは無精子症に起因する男性不妊症を呈し、また組織学的解析においては germ cell を精巣内に全く有しておらず、ヒトにおける Sertoli cell only syndrome いわゆる SCOS を呈していた<sup>4)</sup>。

そこで今回私は SIN3A 遺伝子の異常がヒト SCOS の原因ではないかとの仮説のもとに解析を行った。

### 【方 法】

対象は文章によるインフォームドコンセントを得たのちに血液を採取した、組織学的に SCOS と診断された 80 名の日本人無精子症患者である。全ての患者において、精液検査は最低 2 回以上を行い、また閉塞性無精子症、下垂体機能不全、精巣の外的損傷及び感染症既往のある患者は除外された。全ての対象患者は染色体の核型は正常であり、また Y 染色体の微小欠失を伴っていなかった。対象患者から血液を採取し、Genomic DNA を抽出し、SIN3A 遺伝子の全ての coding region に隣接するイントロン部位に primer を設定し、coding region において PCR 法及びダイレクトシークエンス解析を行い、mutation 解析を施行した。

### 【結 果】

SIN3A 遺伝子の全ての coding region 及び隣接するイントロン領域は PCR 法により合計 20 個の PCR 産物が増幅され、PCR 産物はカラム精製法により精製されすぐさまダイレクトシークエンス解析が施行された。対象患者 80 名において、全てのシークエンス解析の結果を解析したところ、coding region のいかなる領域においても mutation あるいは遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) は認められなかつた。

### 【考 察】

80 名もの SCOS の日本人患者を解析したものの、mutation 及び SNP は全く検出されなかつた。この結果から、マウスにおいては Sin3A 遺伝子をノックアウトすると、そのオスのマウスは SCOS の表現型を呈するものの、その現象はヒトでは異なるのではないかと考えられた。しかしながら、今回の研究では SCOS による無精子症患者は極めてまれであり、よってその解析数が限られている点、および今日までヒト SIN3A 遺伝子の coding region における多型部位が検出されていないため今後さらなる検討が望まれる。これまでノックアウトマウスの解析により無精子症を呈する数多くの遺伝子がマウスにおいては報告されている。しかし、今までの研究においてそれらの遺伝子が必ずしもヒトにおいて忠実に再現されているわけではない<sup>5,6)</sup>。

本研究において、解析された 80 名の日本人患者においてはヒト SIN3A 遺伝子でいかなる mutation も SNP も検出することができなかつたが、本研究はヒト SIN3A 遺伝子とヒト男性不妊症における世界で最初の研究である。今後さらなる症例数を増やし再度解析するとともに、他の人種においても解析する必要があると考えられた。

### 【文 献】

- 1) Gianotten L, Lombardi MP, Zwinderman AH, Lilford RJ and van der Veen F: Idiopathic impaired spermatogenesis: genetic epidemiology is unlikely to provide a short-cut to better understanding. *Hum. Reprod. Update.* 10, 533-539 (2004)
- 2) Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H and Lamb DJ: Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet* 362, 1714-1719 (2003)
- 3) Ayer DE, Lawrence QA and Eisenman RN: Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80, 767-776 (1995)
- 4) Pellegrino J, Castrillon DH and David G: Chromatin

associated Sin3A is essential for male germ cell lineage in the mouse. *Dev. Biol.* 369, 349-355 (2012)

5) Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM and O'Bryan MK: Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum. Reprod. Update.* 16, 205-224 (2010)

6) Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, López CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG and Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program: Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 3507-3512 (2013)

### 23) PET-CTなどの医用画像における次世代の部分容積効果補正効果付き解像度増加アルゴリズムの開発

研究代表者 沖崎 貴琢

#### 【目的】

PETなどの核医学画像においては、一般に画像解像度が低く、1画素の大きさが比較的大きく、部分容積効果の影響がCTなどと比較して大きいことが知られている。このために小さな病変では、トレーサの集積の半定量指標である standardized uptake value (SUV) は過少評価され、視覚的にも病変の検出率が低くなる可能性がある。画像解像度を増加させる場合には、数学的な演算を用いて画素値の補間処理を行うことが多い。よく用いられる手法としては、ニアレストネイバー法、バイリニア法、バイキューピック法などが挙げられる<sup>1-2)</sup>。しかしながらいずれの方法も、視覚的な画像の品質向上が得られるものの、画像のコントラストの向上は期待できない。我々は、部分容積効果補正を演算中に組み込みながら画像解像度を増加する方法を考案しているが(2D-IBCI)<sup>3-4)</sup>、今回は更なる部分容積効果補正効果を実現するために以前開発した手法

を3次元的に応用し、新たなアルゴリズムを開発した(3D-IBCI)。今回の研究の目的は、この新しいアルゴリズムの部分容積効果補正効果を検討することである。

#### 【方 法】

悪性腫瘍が疑われてFDG PET/CTを施行した患者15名のデータを複数の核医学専門医が視覚的に評価した。また、Whole body用PETファントムにFDGをセットして得られたファントムデータに対しても解析を行った。具体的にはファントム内部の hot sphere の最大 SUV の値とセットした FDG の放射能濃度からリカバリ計数を算出し、hot sphere の直径との関係を観察した。この検討を部分容積効果補正なし(オリジナル)、2D-IBCI、3D-IBCIでそれぞれ行った。なお、PET/CTは当院に導入されているGE社製Discovery VCTを用いて3Dモード収集で撮像が施行された。スライス厚は3.3mm、マトリクスサイズは128x128であった。CTは吸収補正及び解剖学的な情報を付与する目的でPETの撮像直前に施行され、管球圧は120kV、50-100mAで撮像対象によって自動設定されたパラメータが使用された。撮像時のスライス厚は5.0mmで、PETに合わせてスライス厚3.27mmに再構成された。PET画像とCT画像はカメラに付属しているワープステーション上でfusionされた。画像再構成アルゴリズムは3D-OSEMを用いた。

#### 【結 果】

患者データに対する視覚的評価では、オリジナルと比較して2D-IBCI、3D-IBCIともに良好な結果が得られた(図1:p < 0.0001, Wilcoxon test)。2D-IBCIと3D-IBCIの間には有意な差は認められなかった。

ファントムデータの解析では、リカバリ計数はhot sphereの直径と相関していたが、直径が30mm以下のhot sphereに関してはいずれも3D-IBCI > 2D-IBCI > オリジナルの順となり、3D-IBCIのリカバリ係数が大きい結果となった(図2)。特に2D-IBCI及びオリジナルでは直径28mm未満のhot sphereでリカバリ係数が85%以下であるのに対して、3D-IBCIでは直径17mm以上のhot sphereでいずれも87%以上の値が観察された。

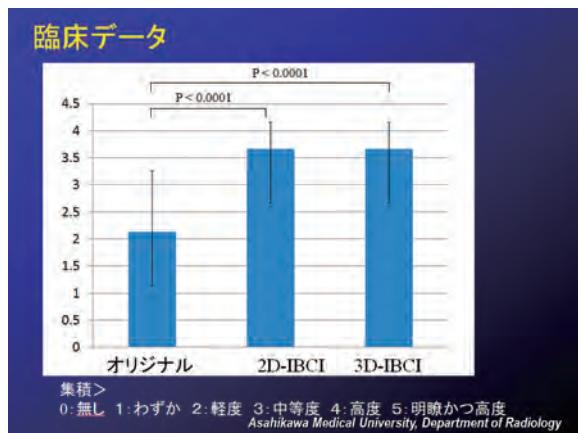


図 1 臨床データ

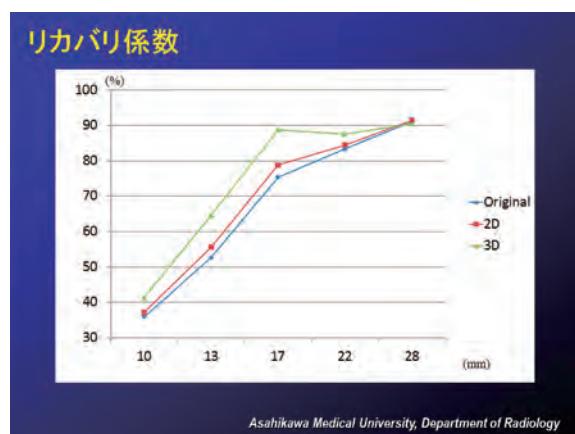


図 2 リカバリ係数

## 【考 察】

我々が考案した解像度増加アルゴリズムは、オリジナルと比較すると視覚的にも有効である結果が得られた。また、2D と 3D の比較では、視覚的には有意な差は認められなかつたが、ファントムデータからはリカバリ係数は 3D-IBCI で大きくなり、定量評価に関しては今回考案した手法が有効である可能性が示唆された。従来は小さな病変の評価に際しては SUV を過小評価している危険性があったが、3D-IBCI を応用することでより精度の高い SUV の測定が可能となるものと期待される。特に治療前後の効果判定や予後の評価には正確な SUV の測定は重要であり、このアルゴリズムは患者及び臨床医にとってメリットがあるものと考えられた。

## 【文 献】

- 1) R.Keys, (1981). "Cubic convolution interpolation for digital image processing". IEEE Transactions on

Acoustics, Speech, and Signal Processing 29 (6):1153-1160

- 2) <http://www.vision-systems.com/articles/print/volume-12/issue-10/departments/wilsons-websites/understanding-image-interpolation-techniques.html>
- 3) 沖崎貴琢、油野民雄、画像処理装置、画像処理方法、およびプログラム：特願 2012-104394
- 4) Atsutaka Okizaki, Tamio Aburano, Image processing equipment, image processing method and recording medium : PCT/JP2013/060451

## 24) 脂肪組織由来幹細胞を用いた低侵襲細胞治療に関する研究

研究代表者 岡 久美子

### 【研究目的】

細胞治療は骨再建・再生を低侵襲・効率的に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これまでに ADSCs の静脈内投与が骨創治癒を促進することを明らかにした。さらにトレーサー実験の結果、静脈内投与した ADSCs が新生骨形成部位に集簇して骨形成細胞や血管などに分化し骨創治癒を促進するという結果を得ている。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明らかにされていない。SDF-1/CXCR4 システムは血管傷害後の新生内膜形成に寄与し、血管新生や血管リモデリングにも寄与していることが報告されている。また、High Mobility Group Box1 (HMGB1) は強い PDGFR  $\alpha$  陽性骨髓間葉系幹細胞遊走活性を有し、障害部位や炎症部位で放出され損傷組織再生に関与していることが示唆されている。本研究ではこれらの幹細胞動員因子についてその ADSCs 静脈内投与による骨創治癒促進との関連性を明らかにすることを目的とし、①骨欠損部位への幹細胞動員因子の同定、② ADSCs の幹細胞動員因子発現の検討を行った。

## 【方 法】

### 1. 培養細胞における幹細胞動員因子の発現

In-vitroにおいて培養 ADSCs における SDF-1/CXCR4、

PDGF  $\alpha$ 、インテグリン  $\alpha$ 、 $\beta$  の発現を免疫組織化学および RT-PCR で検討した。

#### 1) 細胞培養

F344 ラットの脂肪組織から ADSCs を分離し 10% FBS 添加 DMEM により培養した。80% コンフルエントで継代を行い P2 とした。

#### 2) 免疫組織化学染色

1) で分離した ADSCs を蛍光抗体法および酵素抗体法により染色を行った。

加えて、組織障害部位でのフリーラジカルの細胞への影響を検討するため、ADSCs を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 24 時間処理後、免疫染色を行った。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は、10mM、10  $\mu$ M とした。

#### 3) 遺伝子発現解析

##### RNA 抽出

1) で分離した ADSCs から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出、RNase-Free DNase (Qiagen) を用いて DNase を分解した。High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。

##### RT-PCR

AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix (Applied Biosystems) を使用し RT-PCR を行った。PCR 産物は 2% アガロースゲルを使用し電気泳動を行った。

## 2. 骨欠損部位の幹細胞動員因子の発現

In vivoにおいて、ADSCs を静脈内投与したラットの頭頂部へ形成した骨欠損部位のケモカインの局在を検討した。

#### 1) 細胞培養

F344 ラットの脂肪組織から ADSCs を分離し 10% FBS 添加 DMEM により培養した。80% コンフルエントで継代を行い P2 とした。

#### 2) ADSCs の投与

F344 ラット頭頂骨に骨欠損を形成し、3 日後にラット尾静脈から  $5 \times 10^5$  の ADSCs を投与した。頭頂部に骨欠損を形成するが細胞の静脈内投与は行わないラットを対照とした。

#### 3) 免疫組織化学染色

ADSCs 投与後 4 日後に 4% パラホルムアルdehyd を用いて灌流固定し、頭部組織を摘出した。

10% EDTA 液で脱灰後、組織標本を作製、免疫組織化学的染色の手法を用いて骨創治癒部のケモカインの局在を観察した。

#### 4) 遺伝子発現解析

##### RNA 抽出

ADSCs 投与後 4 日後に組織を採取し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出、1. 2) と同様に cDNA を合成した。

##### RT-PCR

AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix (Applied Biosystems) を使用し RT-PCR を行い同部位での SDF-1/CXCR4 の遺伝子発現を検討した。組織は骨欠損部位、胸腺、脾臓とした。PCR 産物は 1. 3) と同様に泳動した。

## 【結 果】

### 1. 培養細胞における幹細胞動員因子の発現

#### 免疫組織化学的検討

ADSCs には、PDGFR  $\alpha$  および SDF-1 が強発現していた。また、CXCR4、インテグリン  $\alpha$  4、 $\beta$  2 の局在を検討したところ発現が見られた（写真 1）。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理後に 24 時間培養した ADSCs では CXCR4 の発現増強が見られた。10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> での処理後に最も発現増強したが、10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> では細胞死がみられた。

#### 遺伝子発現解析

SDF-1 は異なる継代数の ADSCs において発現が見られた。CXCR4 は BMSCs では前回報告したように発現が見られたが、ADSCs では継代数を変えても発現は明らかでなかった。

### 2. 骨欠損部位の幹細胞動員因子の発現

#### 免疫組織化学的検討

HMGB1 陽性部が骨欠損形成部周囲に見られ、その範囲は 3 日目に最も広く、その後減少した。HIF-1 および SDF-1 陽性細胞は術後 3 日目に骨欠損周囲の組織に多く見られ、1 週、2 週とその数は減少した。ICAM-1、VCAM-1 陽性部が血管およびその周囲組織に見られた（写真 2）。

#### 遺伝子発現解析

ADSCs の静脈内投与を行ったラットの骨欠損部の組織、胸腺、脾臓において SDF-1、CXCR4

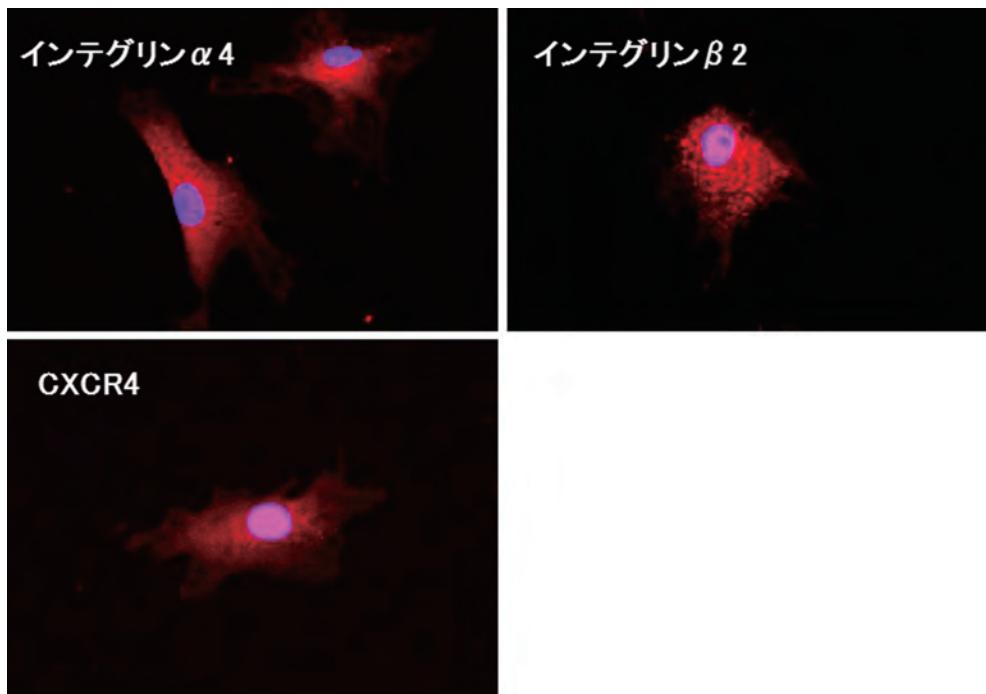
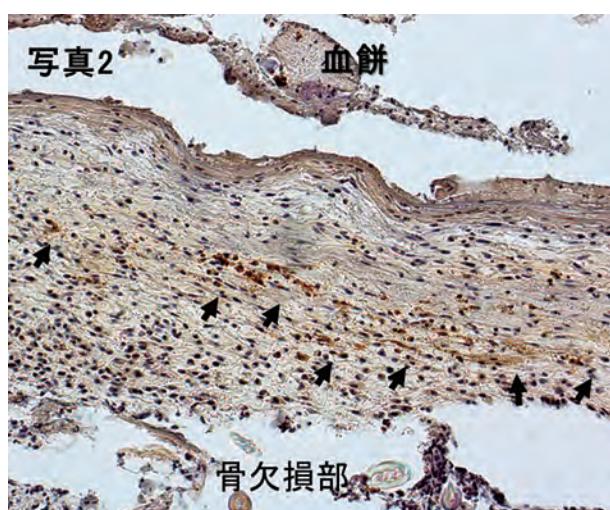


写真1 免疫組織化学

写真2 骨欠損形成後3日目 HIF-1 $\alpha$ の発現(矢印)

は共に発現がみられた(写真3)。

### 【考 察】

本研究では培養細胞(ADSCs)と、ADSCsを静脈内投与したラットの骨創治癒部における幹細胞動員因子の発現について免疫組織化学的、遺伝子解析を行い検討した。

本研究の結果から、ADSCsには接着因子としてのインテグリン $\alpha$ 4、 $\beta$ 2が発現しており、骨欠損形成部周囲の血管にICAM-1、VCAM-1の発現が見られるこ

とから、静脈内投与を行ったADSCsがICAM-1、VCAM-1を発現した部位に接着し、血管新生に寄与する可能性も考えられた。

SDF-1、HMGB1は全ての細胞、組織において強発現していたが、CXCR4はADSCsにおいて発現は低下しており、骨創治癒部の組織において発現が見られた。手術などの組織障害を生じた際に生じる低酸素状態や酸化ストレスを模した研究として、培養細胞をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理する方法がある。本研究ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理後に培養したADSCsでCXCR4の発現増強が見られた。

SDF-1/CXCR4システムは血管傷害後の新生内膜形成、血管新生に寄与するとされ、CXCR4の発現が亢進された場合にはより効果的に血管新生が誘導される。低酸素下での培養やH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いた前処理により細胞のCXCR4の発現を増強する方法が現在までに報告されている。低酸素下での培養におけるCXCR4の発現増強については、低酸素誘導因子であるHIF-1の関与が考えられている。本研究ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によりCXCR4の発現増強が見られたが、高濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>ではその効果が見られなかったことから、活性酸素、細胞の酸化ストレスが関与する可能性も考えられた。

今回の結果からはADSCsを静脈内投与した後、組織修復の際にCXCR4の発現が増強することが考えられたが、実際にADSCsに発現しているか、trophic効果

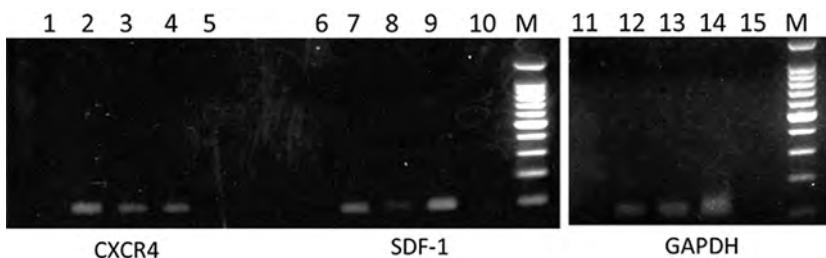


写真3 各組織における遺伝子発現

1, 6, 11: ネガティブコントロール  
2, 7, 12: 骨欠損部  
3, 8, 13: 胸腺  
4, 9, 14: 脾臓  
5, 10, 15: 小腸

等によるものかは不明である。今後は上記の方法で CXCR4 の発現を増強させた ADSCs を静脈内投与した場合の骨創治癒についても検討したい。

### 【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)
- 2) 金田安史: 体内細胞動員による再生治療. *Drug delivery system*. 27, 246-256 (2012)
- 3) Tang YL, Zhu W et al.: Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. *Circ Res*. 104, 1209-1216. (2009)
- 4) Akashi S, Miura T et al.: Superoxide stimulation enhances CXCR4 expression in heart muscle-derived stem cells via ASK1 activation. *Bull Yamaguchi Med Sch*. 60, 11-18. (2013)
- 5) Horiguchi et al.: Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in folliculostellate (FS) cells of the rat anterior pituitary gland: the CXCL12/CXCR4 axis induces interconnection of FS cells. *Endocrinology*. 153, 1717-1724 (2012)

### 25) 近赤外分光法を用いた注意欠如／多動性障害の診断補助法の確立

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、年齢に見合わない不注意、多動性・衝動性を特徴とする神経発達障害であり、学童期の子どもの約 5 %、成人の約 2.5 % に見られるとしている<sup>1)</sup>。ADHD では種々の実行機能課題で成績の低

下が認められ、課題の遂行に関する前頭前皮質の微細な機能不全が想定されている。

我々はこれまでに、近赤外分光法 (NIRS) を用いて、連続遂行課題 (continuous performance task:CPT) を遂行中の ADHD 児の前頭前皮質活動を測定し、NIRS による脳機能検査が治療薬の効果を把握するのに有用であることを示してきた<sup>2)</sup>。一方で、前頭前皮質活動の改善と行動指標の改善の間に明確な連関が見られないケースもあり、検査に用いる認知課題を対象者の症状や年齢に合わせて使い分ける必要性も示唆された。

そこで本研究は、ADHD の症状に関連した認知課題を複数作成し、被験者に合わせて適用することで、NIRS を用いた ADHD 診断補助法の妥当性をさらに高めることを目的とした。具体的には、持続的注意と反応抑制を要する連続遂行課題 (continuous performance task:CPT) を引き続き用い、加えて、作業記憶を検査するための n-back 課題を NIRS 検査に適合するように改変して用いた。本研究では、まず n-back 課題に関わる前頭前皮質の活動を明らかにするために、健常な大学生を対象とした測定を行った。次に、治療薬 (atomoxetine:ATX) の服薬停止前から停止後の ADHD の大学生を対象として、CPT および n-back 課題遂行中の NIRS 測定を行い、課題の適用可能性を検討した。

### 【方 法】

**実験参加者**：21-31 歳 ( $22.6 \pm 2.6$ ) の大学生 15 名 (男性 8 名、女性 7 名) を対象として、n-back 課題を遂行中の前頭前皮質活動を計測した。また、ATX の服薬を停止する ADHD の大学生 1 名 (18 歳) の経過観察に合わせて、CPT および n-back 課題遂行中の前頭前皮質活動を減量・服薬停止前、停止直後、停止 6 ヶ月後の 3 回の時点で反復測定した。ADHD の大学生の実験参加には、本学小児科の荒木章子医師 (現: 北海道こども心療内科氏家医院) および岡山亜貴恵医師の協力を得た。

**課題 :** n-back 課題は、ランダムな順で提示される 1 から 9 までの数字を用いた作業記憶課題である。被験者は、提示された数字が n 個前に提示されたものと同じと判断されたときに出来る限り素早くキーを押して反応することが求められた。n-back 課題では作業記憶負荷の異なる実験条件として 1-back 条件、2-back 条件、3-back 条件を実施した。コントロール課題として、作業記憶の負荷のない 0-back 条件（4 が提示されたときに反応キーを押す）を行った。CPT は以前の報告<sup>2)</sup>と同様の方法で行った。

**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、推定される大脳皮質上の測定チャンネル位置は図 1 の通りであった。n-back 課題における NIRS データは、3 ブロック分の時系列データを加算平均したのち、実験課題期間の開始直前 6 秒間と課題期間終了 15 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、実験課題遂行時の Hb 濃度変化をチャンネルごとに算出した。健常な大学生のデータ解析については NIRS 測定時に体動等による測定ノイズのなかった 10 名を対象に行った。

## 【結 果】

**行動指標 :** 健常な大学生において、n-back 課題の正答率は、0-back 条件 (99%) および 1-back 条件 (95%) に比べて、3-back 条件 (78%) で有意に低下した。2-back 条件の正答率は 87% であった。ADHD の大学生の減量・服薬停止前では、0-back、1-back、2-back 条件で健常な大学生と同等かそれ以上の正答率（すべて 100%）を示したが、3-back 条件では 66% とやや低かった。服薬中止直後および 6 ヶ月後の測定では 3-back 条件で正答率が 50% となり、服薬停止以降に正答率が低下する傾向が見られた。一方、CPT の遂行成績は 3 回の測定で変化はなく、服薬停止後も高く維持されていた。

**NIRS データ :** 健常な大学生では、2-back 条件では 24 の測定チャンネルのうち 21 チャンネルで有意な oxy-Hb 量の増加が認められ、前頭前皮質の広い範囲で課題遂行に伴う賦活が生じていた。3-back 条件では CH20 (右腹外側部) と CH24 (右前頭極) で oxy-Hb 量の有

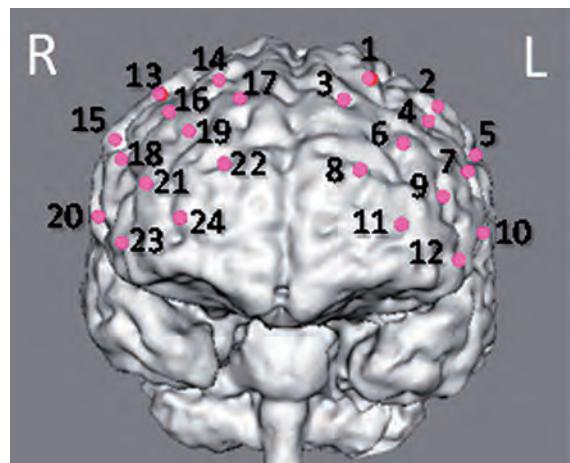


図 1 NIRS チャンネルの大脳皮質上の推定位置。  
数字は測定チャンネルを表す。

意な増加が認められた。1-back 条件では有意な増加は認められなかった。ADHD の大学生では、減量・服薬停止前では 1-back 条件において複数のチャンネル (CH7, 9, 10, 16, 19, 21) で oxy-Hb 量の増加が観察されたが、服薬停止後 2 回の測定では oxy-Hb 量の増加は見られなくなった。また減量・服薬停止前には CPT 遂行に伴い左右の背外側部から前頭極 (CH9, 11, CH21, 24) にかけて oxy-Hb 量の増加が観察されていたが、服薬停止後 2 回の測定では増加が見られなかった。

## 【考 察】

我々のこれまでの研究から、NIRS を用いた ADHD 診断補助の有用性が示唆されている<sup>2)</sup>。しかしながら、これまで持続的注意の課題のみを用いた検討であったため、本研究では作業記憶課題である n-back 課題を用いてさらに検討を行った。健常な大学生を対象とした結果、作業記憶負荷が中程度である 2-back 条件において前頭前皮質の最も広範囲な賦活が認められ、作業記憶負荷の高い 3-back 条件では賦活範囲が限定されるというパターンが得られた。課題難易度の上昇によって賦活の程度や範囲が減少する理由は現時点では明確ではないが、前頭前皮質の賦活検査として用いる場合、2-back 条件が適当であることが示唆された。

続いて、NIRS を用いた ADHD 診断補助法の妥当性を検討するために、n-back 課題および CPT を用いて、ATX の減量・服薬停止直前から停止後の ADHD 大学生の経過観察に合わせて NIRS 測定を行った。服薬停止前には、作業記憶負荷の高い 3-back 条件を除いて健常

な大学生と同程度の遂行結果を保っており、CPT および n-back 課題 (1-back 条件) の遂行中には複数のチャネルで oxy-Hb 量の増加が観察された。しかし、服薬停止直後および停止 6 ヶ月後では、n-back 課題の遂行成績の低下に加えて、CPT・n-back 課題のいずれにおいても oxy-Hb 量の増加が観察されず、服薬時とは異なる結果となった。このことは、NIRS による前頭前皮質活動のモニタリングが、治療薬の服薬や停止の効果を把握するのに有用であることを示唆している。

我々が従来用いてきた CPT は、主として持続的注意を要求する課題であり、ADHD の不注意や衝動性に対応していた。ただし課題の難易度の問題から、被験者の年齢が上昇するにつれ、天井効果によって ADHD 群と定型発達群を弁別するのが難しくなるという問題点もあった。今回新たに用いた n-back 課題は、持続的注意に加えて作業記憶の更新 (updating) を要求する課題であり、作業記憶負荷を変えることによって難易度を調節することも比較的容易である。今回のケースのように、CPT では行動的な問題が明らかにならない場合でも、n-back 課題では問題を検出できる可能性がある。NIRS を用いた ADHD 診断補助法の妥当性を高め確立していくためには、被験者の年齢や行動的な特徴によって課題を使い分けることが重要であることが示唆された。

## 【文 献】

- 1) American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed. (DSM-5). Washington, DC: American Psychiatric Association ; 2013.
- 2) Araki A, Ikegami M, Okayama A, Matsumoto N, Takahashi S, Azuma H, Takahashi M. Improved prefrontal activity in AD/HD children treated with atomoxetine: a NIRS study. Brain & Development 2015 ; 37 : 76-87.

## 26) 骨梁微細構造解析への計算ホモロジーの展開

研究代表者 寺本 敬

### 【背景と目的】

スポーツ選手における膝関節の外傷の中で、膝前十字靭帯損傷は膝半月板損傷に続いて多く、その再建術

は骨孔に遊離腱を移植する方法が一般的である。再建靭帯不全の主な原因の一つに骨孔拡大があり、矢状面での開口部の拡大は前方不安定を引き起こし、また再々建の際の骨孔作製や骨孔内への固定が困難となる。骨孔内へ腱を移植するモデルの実験において、骨粗鬆症治療薬アレンドロネートが骨孔周囲の骨梁の連結性を増加させ、骨孔拡大を抑制すると期待される。Kamiya らは、日本白色家兎を手術のみを行うコントロールC群とアレンドロネートを投与するA群に分け、術後の検体摘出により、骨孔周囲の骨梁を  $\mu$ CT 40 ( $30 \mu\text{m}$ , 400 枚) によって評価した。骨梁構造は複雑なスponジ状を成しており、その微細に張り巡らされた骨梁構造の連結性の減少は、骨量減少とは無関係に骨強度を弱めてしまうために、連結性は骨粗鬆症の有効な判定指標になりうる。本研究課題では、ウサギ腱移植モデルを対象として、それらの  $\mu$ CT データから骨梁構造の連結性（位相不变量、穴の数）を定量評価する。特に移植腱周囲に生じる骨吸収による骨孔拡大について、骨粗鬆症製剤投与による骨吸収抑制効果を検証した。

## 【方 法】

骨梁構造の連結性（トポロジー）を計算ホモロジー理論に基づいて定量評価するソフトウェアプログラムを作成した。 $\mu$ CT 3 次元像データを 8 ビットグレースケールビットマップデータに変換し、画像処理ライブラリを用いて、濃淡画像から適切な閾値を選定して二值化処理を行う。さらにモルフォロジー演算によってノイズ成分、及び画像縮小によって計算量を低減してから、空間構造の位相的不变量を計算トポロジライブラリを用いて計算する。これは、骨梁の連結成分、トンネル（開気孔）成分、ボイド（閉気孔）成分の数（それぞれベッチ数  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ）として表し、無限次元の立体構造データから 3 成分ベッチ数への連結性に関する精密な情報縮約を実現する。画像データを幾何学的実体として捉え、各空間次元ごとに代数化を行う。それから「穴」の情報を抽出したものがホモロジー群であり、代数化された対象間の準同型写像の核と像を用いて定義される。本手法は厳密な数学理論に立脚しており、骨梁構造  $\mu$ CT 3 次元像データのみに適用可能というわけではなく、平面的な病理画像を含む、任意次元の画像データに適用可能である。

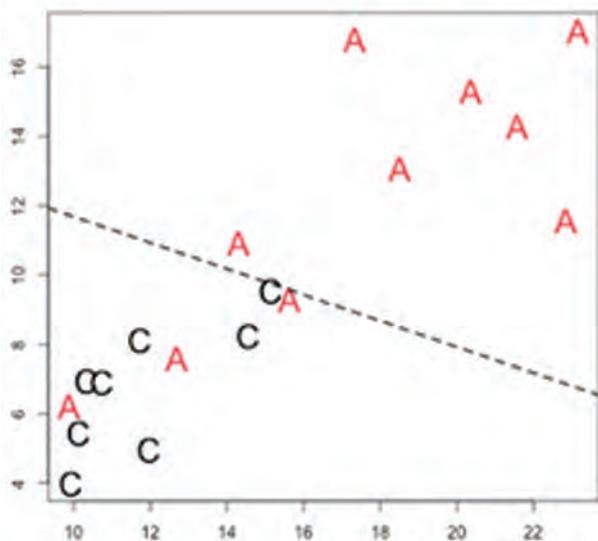


図 1 ベッチ数による 2 次元プロット：縦軸と横軸は開気孔と閉気孔それぞれの骨梁数との比である ( $p = 0.008$ 、判別分析)。

### 【結果と考察】

作成したソフトウェアプログラムをウサギ腱移植腱モデルのマイクロCTデータに適用した。図 1 は、トンネル数、ボイド数をドメイン数で規格化した値、 $\beta_2/\beta_0$  と  $\beta_1/\beta_0$  を縦軸、横軸とした 2 次元平面に射影して表している。C 群に比べて、A 群はトンネル数、ボイド数が増加し、骨梁のスponジ構造が回復して、ネットワークが複雑になったことを反映している。判別分析等の多変量解析によって、これら 2 つのデータ群について有意な差異が確かめられた。

近年はマルチコアを搭載した計算機が主流であるため、Multi-Processing ライブラリを用いた並列化による計算の効率化、またグラフィックライブラリを用いた 3 次元画像の描画機能を実装した。以上により、これまでの 3 次元画像診断において副次的な指標であった連結性を精密に評価し、ベッチ数指標による画像診断の有効性を示唆した。骨孔拡大の要因としては機械的要因と生物学的要因があり、特に後者では破骨細胞の活性化が関与するとされるが、詳細は解明されていない。病態診断には骨梁構造の形態計測だけでなく、病理組織学的な評価と合わせた総合的な診断が必要である。

### 【文 献】

- 1) Kamiya et al, Alendronate prevents bone tunnel enlargement, Ryukyu Med. J. 30 : 29-37, 2011

### 27) カルシウムイオノフォア処理によるマウス未熟精子の生理的機能獲得

研究代表者 日野 敏昭

#### 【目的】

カルシウムイオノフォア（イオノフォア）はマウス成熟精子に対して受精能力の獲得を促進することが知られている（文献）。一方、イオノフォアが、精巣や精巣上体に存在する受精能力に乏しい未熟精子に対しても同様の効果をもたらすかどうかは不明である。本研究では、イオノフォアで未熟精子を処理し、受精能力の獲得に必要とされる、精子内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度の上昇や、精子先体内部の膜構造の崩壊（先体反応）、非対称性に尾部を激しく動かす超活性化運動（ハイパーアクチベーション）の出現といった一連の変化に及ぼすイオノフォアの効果を調査した。

#### 【方 法】

8-16 週齢の B6D2F1 雄マウスの精巣（図 1Ⓐ）、精巣上体頭部（図 1Ⓑ）、精巣上体体部（図 1Ⓒ）から未熟精子を採取してイオノフォア ( $20 \mu\text{M}$ , 10 分) で処理し以下の検討を行った。

##### 1. 精子内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化

膜透過型カルシウム蛍光プローブ (Fluo4-AM) を未熟精子の細胞内に取り込ませて、イオノフォア処理前後における蛍光強度の変化を観察した。また、蛍光画像を ImageJ で解析して、イオノフォア処理前後における精子内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を測定した。

##### 2. 精子先体反応の有無

精子の先体内構造物に特異的に反応する FITC 標識 Soybean trypsin inhibitor を含む培養液で精子を 10 分間培養し、遠心・洗浄後、蛍光顕微鏡下にて先体反応の有無を判定した。

##### 3. ハイパーアクチベーションの有無

培養液中の精子の運動をスローモーション撮影し、ハイパーアクチベーションを起こした精子の割合を算出した。

##### 4. 体外受精による受精能力の判定

過排卵誘起した B6D2F1 雌マウスの卵管から卵子一

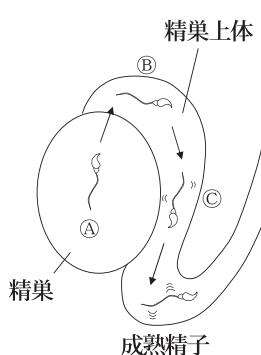


図1 精子成熟までの流れ  
(精子成熟は矢印の流れに沿って進む)

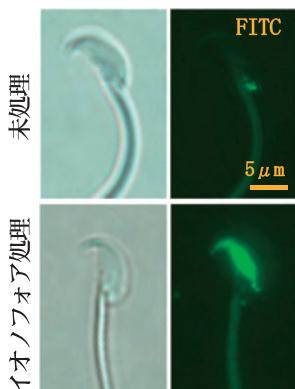


図2 精巢上体体部の未熟精子

卵丘細胞複合体(COC)を採取して体外受精に供した。また、COCをヒアルロニダーゼで処理して卵丘細胞を除去した卵子(卵丘除去卵子)や、卵丘除去卵子を酸性タイロードで処理して透明帯を除去した卵子(透明帯除去卵子)を作製して体外受精に供した。

## 【結 果】

### 1. 精子内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化

精巢と精巢上体体部の未熟精子をイオノフォア処理すると、精子内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が処理前の3.5～4.2倍まで上昇し、精巢上体頭部の未熟精子を処理した場合は34倍にまで上昇した。また、各部の未熟精子間でイオノフォア処理前の蛍光強度を比較したところ、精巢上体頭部の未熟精子における蛍光強度は精巢や精巢上体部の未熟精子に比べて極端に低かった(約1/17)。このことから、精巢上体頭部の未熟精子の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度はもともと他の部位の未熟精子よりも低く抑えられていることがわかった。

### 2. 精子先体反応の有無

精巢上体体部の未熟精子では、イオノフォア処理により83%の精子が先体反応を起こしていた(図2)。精巢と精巢上体頭部の未熟精子では、イオノフォア処理の有無に関わらず先体反応を起こした精子は観察されなかった。

### 3. ハイパーアクチベーションの有無

精巢上体体部の未熟精子では、培養液に導入された直後から、尾部の振幅の浅い直進性の運動パターンを示す精子が多数観察された。これらの運動精子を回収

してイオノフォアで処理し、遠心、洗浄後30分間培養したところ、88%がハイパーアクチベーションを起こしていた。イオノフォア未処理の場合には90%が直進性のままだった。精巢や精巢上体頭部の未熟精子は、イオノフォア処理の有無に関わらず運動性を示さなかつた。

## 4. 体外受精による受精能力の判定

イオノフォア処理した精巢上体体部の未熟精子の受精率は、COC、卵丘除去卵子を用いた場合には0%であったが、透明帯除去卵子を用いた場合は100%であった。イオノフォア未処理の未熟精子では、いずれの種類の卵子を用いた場合でも受精率は0%であった。なお、精巢と精巢上体頭部の未熟精子は、イオノフォア処理の有無に関わらず運動性を示さなかつたため体外受精は行わなかつた。

## 【考 察】

イオノフォアはどの部位の未熟精子においても強制的に精子内に  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させる効果をもつことが明らかとなった。精巢上体体部の未熟精子では  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇によって先体反応やハイパーアクチベーションが誘起され、卵丘細胞や透明帯の通過はできないものの、卵子細胞膜への融合能を獲得することが明らかになった。しかしながら、精巢や精巢上体頭部の未熟精子では、精子内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇しても先体反応やハイパーアクチベーションが起こらなかつたことから、これらの部位の未熟精子では生理的機能獲得のための機構が未完成であることが示唆された。今後は、イオノフォア処理によって卵子細胞膜への融合能を獲得した精巢上体体部の未熟精子におけるリン酸化の有無を調査する予定である。

## 【文 献】

Tateno H, Krapf D, Hino T, Sánchez-Cárdenas C, Darszon A, Yanagimachi R, Visconti PE,  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 18543-18548, (2013)

## 28) オゾン水による抗がん薬の不活化・除去効果の検討

研究代表者 小野 尚志

## 【目的】

抗がん薬は、変異原性、催奇形性、発がん性などの毒性を持つため、医療従事者の職業性曝露へは適切な対策が必要である。古くは1979年の医療従事者の尿中から抗がん薬が検出されたという報告<sup>1)</sup>以来、職業性曝露と健康への影響の関係は多数報告されている。近年になって発表された国内のガイドラインでも取りに関する推奨がされており、作業環境からの抗がん薬の除去については、水酸化ナトリウム水溶液または次亜塩素酸ナトリウム水溶液による清拭が一般的となっている<sup>2-4)</sup>。しかし、これらの除去剤は、作業が非常に煩雑であるうえ、除去剤そのものが人体に有害である。これらの問題を解決するべく、最近新たに抗がん薬の除去剤が開発されており、オゾン水も有望な除去剤の一つである。

オゾン水はその強い酸化力をを利用して、殺菌や消毒に用いられている。生成後は速やかに酸素と水に分解するため、保存には適さず、生成装置を設置する必要がある一方で、他の除去剤と比較して安全性は高い。抗がん薬の不活化作用については断片的な結果が販売業者の販促用資料に掲載されてはいるが、学術的な研究成果としては発表されていない。本研究は、抗がん

薬除去剤としてのオゾン水の効果を検討し、新たな標準法の候補を探索することを目的とした。

## 【方 法】

抗がん薬分解作用の基礎検討として、他の除去剤でも代替物質として用いられている<sup>5,6)</sup>メチレンブルーの分解試験を行った。精製水を対照として、4ppm オゾン水 (ChemO<sub>3</sub> 装置、日科ミクロン株式会社)、0.3M 水酸化ナトリウム水溶液、2% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液の3種の除去剤それぞれ 4.5mL を、メチレンブルー溶液 (100uM) 0.5mL に添加処理し、継時に溶液中の残留濃度を定量することでその分解能を測定した。メチレンブルーの定量には分光光度計を用い 620nm の波長にて測定した。

## 【結 果】

処理直後において 4ppm オゾン水の分解率は 99% 以上であり、最も高い分解能を示した。2% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液は 60 分後に分解率が 99% 以上となった。0.3M 水酸化ナトリウム水溶液は 4 時間後でも 90% に達しなかった (図)。

## 【考 察】

今回の試験により、オゾン水のメチレンブルー分解

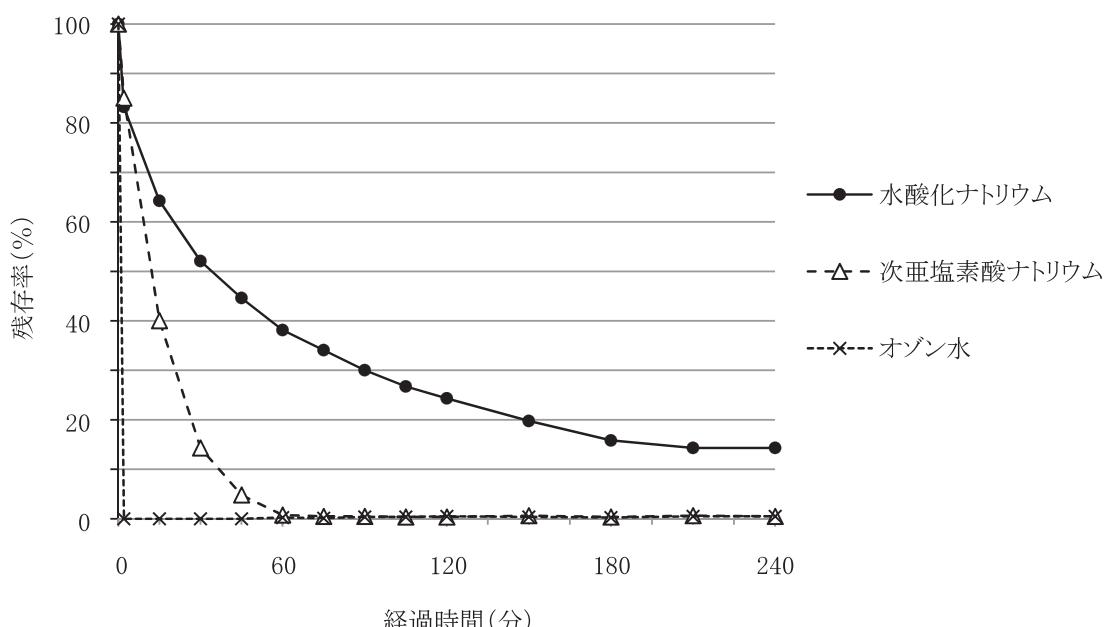


図 各除去剤で処理した後のメチレンブルー残存率の経時変化  
横軸は処理後の経過時間、縦軸は精製水を加えた直後のメチレンブルー濃度に対する比率で表示。

能は現在推奨されている除去剤である次亜塩素酸ナトリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液を上回り、特に分解速度は他の除去剤よりも極めて速いことが示された。

次亜塩素酸ナトリウム水溶液には、金属腐食性という欠点があり、安全キャビネット表面への適用においては、塗布後にはチオ硫酸ナトリウムで中和することが必要である。水酸化ナトリウム水溶液についても、塗布後に2回以上の水拭きが推奨されており、同様に作業は煩雑である。その点において、オゾン水は塗布することだけで作業が完結するため、使用が簡便であるという大きな利点も持っている。すなわち、オゾン水は有効性と安全性が高く、取り扱いも簡便であり、価値の高い除去剤であることが示された。

今回の検討の結果、抗がん薬への効果が期待できることが示されたため、今後はより実際の使用環境に近い、残留抗がん薬の拭き取り試験を行う予定である。

### 【文 献】

- 1) Falck K, Gröhn P, Sorsa M, Vainio H, et al.: Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. Lancet. 1, 1250-1251 (1979)
- 2) 日本病院薬剤師会監修：注射剤・抗がん薬 無菌調製ガイドライン，薬事日報社，pp.26-27 (2008)
- 3) 日本病院薬剤師会監修：抗がん剤調製マニュアル 第3版，じほう，pp.69-70 (2014)
- 4) 日本がん看護協会，日本臨床腫瘍学会，日本臨床腫瘍学会編集：がん薬物療法における曝露対策合 同ガイドライン 2015年版，金原出版，pp.35, 68- 69 (2015)
- 5) 株式会社 日本医科器械製作所  
(<http://www.nihonika.co.jp/chemo.html>) : ケモクリー シングカタログ, pp.2 (2014)
- 6) 小門 謙平, 中村 歩, 竹中 美樹ら：過酢酸系 消毒剤の安全キャビネット内残留抗がん剤分解にお ける有用性の基礎検討, 日本薬学会年会要旨集 132 年会4号, 167 (2012)

## 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 ウェアラブル空中超音波連続波ドプラを用いた 新規尿流測定装置の有用性と実用化

松本 成史\*

## 【要旨】

排尿障害の診断や治療法の選択に於いて、排尿機能検査の一つである尿流測定は、非常に簡易で非侵襲な検査であるが、普段の自然な排尿を反映しているとは言い難い。現行型尿流測定装置の「尿器（便器）の側にセンサー式を装備する」という思想を廃し、「排尿を行う人体の側に装備され得る、または独立した動作可能な非接触間接計測方式で測定でき、より自然な排尿を何時でも何処でも、的確に診断する」新規尿流測定装置の実用化を目的として、われわれは研究開発を進めてきた。この概念の確立のため、空中超音波連続波ドプラシステムを開発し、得られた超音波ドプラ信号を時系列周波数スペクトラムに変換することにより、現行型で得られるのと定性的に等価な尿流波形を得た。更に周波数スペクトラムの局所重み付け積分により、排尿量、尿流率等の現行型のパラメーターと同等の定量化も可能となった。

今回、トランスレーショナルリサーチとして、ウェアラブル空中超音波ドプラシステムを用いた新規尿流測定装置の実用化に至るプロジェクトとして、発案から試作品の製作、特許取得、競争的外部資金を得て、産学官協働による開発、製品化および薬事認可の取得まで到達した概要を紹介する。

## 【キーワード】

尿流測定、ウェアラブル、空中超音波連続波ドプラ

## 【はじめに】

高齢化社会の到来に伴い、泌尿器科臨床では排尿障害の患者が急増している。中高年男性の大半が何らかの症状を訴える前立腺肥大症や、多くの中高年女性が悩んでいる尿失禁などが代表的疾患である。その対策は急務となっており、的確な診断そして治療が必要である。排尿障害に関わる様々な自覚症状は、下部尿路症状 (Lower Urinary Tract Symptoms : LUTS) と呼ばれ、この中には蓄尿症状・排尿症状・排尿後症状等が含まれ、おもに下部尿路機能障害 (Lower Urinary Tract Dysfunction : LUTD) によって生じているとされている<sup>1~3)</sup>。これらの LUTS を呈する LUTD の診断や病態把握、治療法の選択には、ウロダイナミクス (尿流動態検査; Urodynamic Study : UDS) は必要不可欠の検査になっている<sup>4,5)</sup>。UDS には様々な種類があり、最も簡便な検査法が尿流測定 (Uroflowmetry : UFM) である。

## 【尿流測定検査の現状】

現行型 UFM 装置は、応力や重量などのセンサー式をつけた「尿を受ける容器（尿器・便器）」により計測が行われ、結果として“トイレのような物（採尿器）”に各種センサを配備した物（図 1A）となっており、被検者の尿流波形（排尿パターン）が把握でき、尿排出障害の有無や 1 回排尿量、最大尿流率等が測定出来る（図 1B）。工学技術の発展とともに装置も進化し、

\*旭川医科大学 腎泌尿器外科学講座

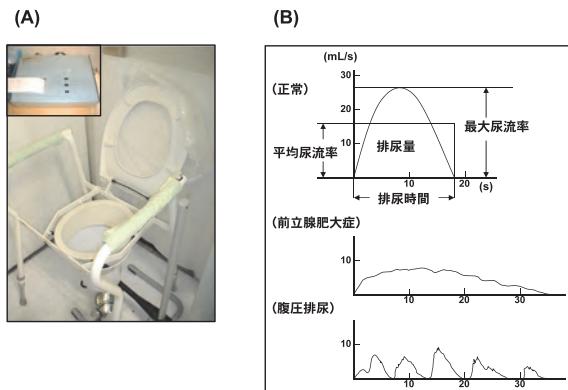


図1 (A) 尿流測定装置(一例)、(B) 尿流測定のパラメーターとその尿流波形

検査自体およびその所見の単純さ、患者への非侵襲性等から UFM は簡便な UDS の先駆けとして瞬く間に拡がり、全国の泌尿器科標榜施設に設置されているのが現状である。しかし、被検者にとっては泌尿器科施設内の特別な場所で実施する検査であり、必ずしも普段の自然な排尿を反映しているとは言い難い。実際に自宅での排尿を UFM 装置にて確認した場合は、泌尿器科施設内の UFM 装置で得られる結果とは差異があり、より多くの情報が得られることが報告されており<sup>6)</sup>、被検者にとっては、検査をする場所や環境という意識そのものが、UFM のデータに影響していることが示唆されている。そのため、現状では UFM の結果は LUTD に対する評価の一側面に過ぎず、診断や病態把握、治療法の選択に対する絶対的ではない多くの因子が関与する検査であり、尿流波形の経時的推移での評価やスクリーニングとして捉えるほうが良いとされている<sup>7,8)</sup>。

### 【空中超音波ドップラを用いた尿流計測システムの開発】

われわれは、現行型 UFM 装置の基本である“トイレの側にセンサー式を装備する”という従来の思想を廃し、「より簡単に、より自然に通常の排尿を何時でも何処でも繰り返し測定出来ないか?」と考え、排尿を行う人体の側に簡単に装備され得る、または独立して動作可能で、計測毎に後始末等の処置の必要な無い非接触間接計測方式の UFM 装置として、40KHz 空中超音波 continuous wave (CW) ドップラシステムを利用した新規 UFM 装置を研究開発してきた<sup>8-18)</sup>。

今回用いた空中超音波 CW ドップラ送受信器は、同じ原理や技術で動く他の領域のドップラ装置（例えば医用

超音波）、マイクロ波ないしミリ波まで含めると無数の類似先例が存在し、ドップラ計測は、投球の評価等に用いられている“スピードガン”、交通違反（制限速度超過）に用いられている“ねずみ取り”、“魚群探知機”等、われわれの日常生活において汎用されているものと同じ計測原理を採用しており、速度等の測定機器としての応用等、多用途の可能性が広がっている。しかし、被検者が保持ないし装着するセンサおよび支援電子システムという思想は未だかつて無かったもので、トイレの側に計測システムを装備するという現行（従来）型の思想とは本質的に異なる（図2）。この超音波ドップラの原理自体は公知であるも「被検者が尿流測定センサを身につける」という発想は未だかつて無く、本研究の最大の特徴かつ新規性であり、試作品にて得られたデータを基に特許出願し、平成 26 年 6 月 6 日に特許登録された<sup>19)</sup>。

送受信器は指輪のような構造（指嵌め式）とし、尿線の方向に向けて超音波を送受信し、無線レーメータにてその超音波信号を解析するものである（図3）。本装置による排尿データを採取・記録出来た一例を示す。本装置で得たドップラ信号（図4-1 A）をフーリエ変換により周波数スペクトラムに変換する（図4-1 B）。得られた周波数スペクトラムをコンピューターにて自動的に解析すると、超音波ドップラ法による尿流波形が得られる（図4-2 C）<sup>8,9)</sup>。

### 【新規 UFM 装置の定性・定量】

本装置試作品を用いて、まず現行型 UFM 装置との

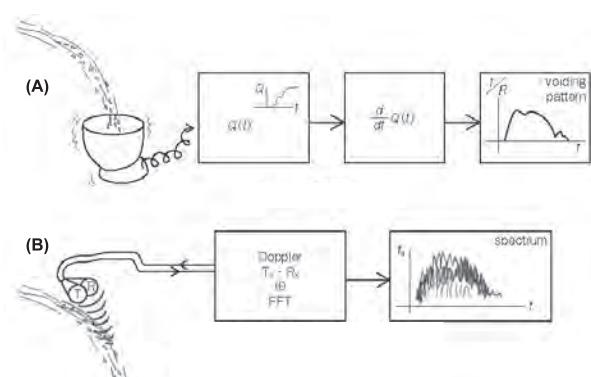


図2 診断プロセスのフローチャート：(A) 現行（従来）方式、(B) 本研究が主張する方式

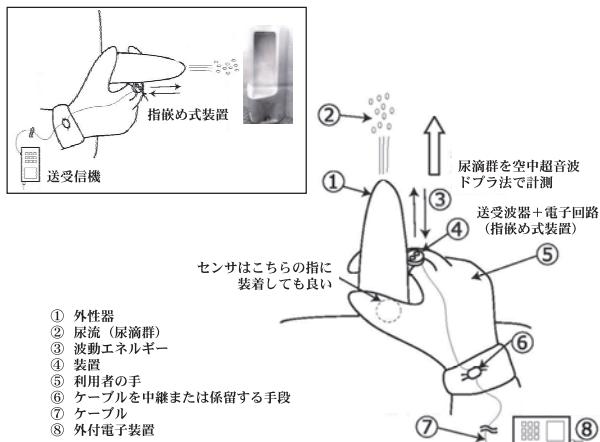


図3 空中超音波ドプラシステムを用いた尿流測定装置のコンセプト

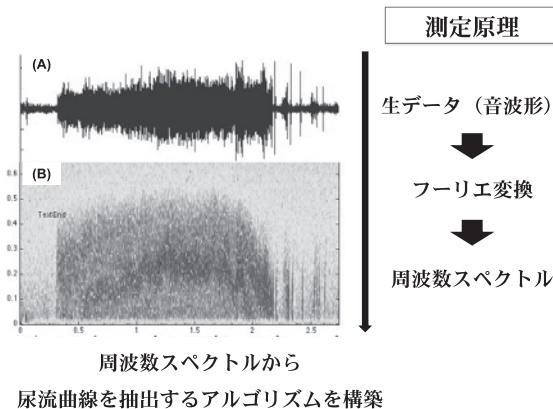


図4-1 健常人の排尿の一試行例における獲得された(A) ドプラ信号波形、(B) その周波数スペクトラム

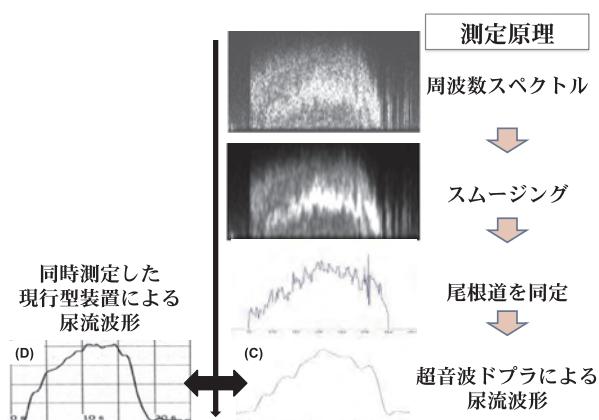


図4-2 (C) そのスペクトラム像からソフトウエア画像処理で稜線をたどって得た代用尿流曲線、(D) 同時に取得した現行型装置による尿流曲線

「定性」における検証を、旭川医科大学倫理委員会の承認を得て実施した。対象は成人ボランティア計22名（男性16名、女性6名）に総計31回、現行型装置（当院腎泌尿器外科外来に設置されているMedtronics；URODYN® 1000）でのUFM検査時に本装置試作品も併用して頂き、得られたデータを収集・解析し、比較検討した。本装置にて現行型UFM装置と同時にデータを採取・記録出来たのは、のべ27回分（87.1%）で、その全てにおいてドップラスペクトラムの時系列評価が可能で、かつ現行型（図4-2D）と同等の尿流波形（図4-2C）が得られ、「定性」に問題無いことが確認された。女性においても、単径部内側の尿道口付近に本装置を位置することで、測定が可能であることが分かった。記録出来なかった4回分（男女2名ずつ）に関しては、ボランティア本装置の指嵌め部分（センサ）が尿線方向から外れていたことが原因であった<sup>10~12)</sup>。

次いで、現行型UFM装置と同等の「定量」を取得出来るように研究開発を進めた。本装置で得られた周波数スペクトラムを、局所重み付け積分法を用いることにより、排尿量、尿流率等の現行型のパラメーターと同等の定量化も可能となり、本装置での定量化のためのソフトウェアも開発し、ファントムおよび成人ボランティアによる現行型との比較検証を実施し、同等であることを確認した。この技術は共同研究企業より特許出願中である。

また、本装置の有効感度領域を検討したところ、センサの正面方向に立体角66度と大変広角である（図

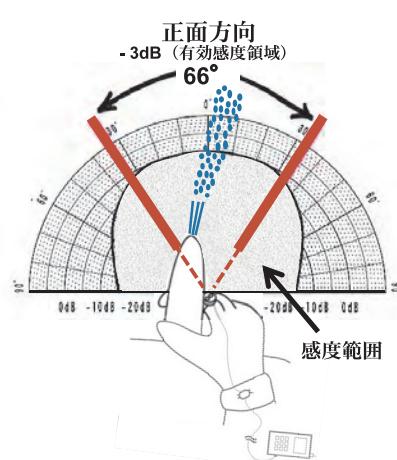


図5 本装置の有効感度領域（正面方向に立体角66°と大変広角）

5) が、この領域を外れると有効には計測出来ず、測定される尿流は少なくともこの立体面の中を走行していなければならないことが判明した<sup>13~15)</sup>。

### 【製品化（標準医療化）イメージ】

本装置の特徴は、まず特別な検査部屋を必要としないことで、自宅や病院施設外での測定も可能であり、現行型よりも、より手軽で、より非侵襲であり、より本来の排尿を反映しやすいことである。また、各種センサを配備した“トイレのような物”を必要とせず、より安価であること等があげられる<sup>16~18)</sup>。

以上の結果を、医薬品医療機器総合機構（PMDA）に医療機器としての申請相談したところ、「一般医療機器」（クラス1）と同等と裁可され、製品化への薬事申請に移った。最終的に、センサ部は「指嵌め式」ウェアラブル構造送受信および信号処理の電子回路部は現状では有線接続で独立したケースに収容した形態（図6）とし、共同研究企業からPMDAへ申請し、平成27年7月16日付で薬事承認された。

### 【まとめ】

今回の研究成果は「大学発のビジネス」として産官学連携で実施し、「ウェアラブル空中超音波連続波ドップラを用いた新規UFM装置」として、その有用性を検証し、実用化まで到達した。本装置は、非侵襲で何時でも何処でも日常的に繰り返しデータを取得出来る装置であり、UFM計測装置として標準機器になり得る可能性があり、従来のUFMの考え方を大きく変革する可能性が示唆された。また様々なヘルスケアや日



図6 PMDA申請製品

常の計測、遠隔医療等にも応用出来る可能性を秘めている。

### 【謝 辞】

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>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をこの場をお借りして御礼申し上げます。今回の一連の研究は、本研究助成以外にも独立行政法人科学技術振興機構（JST）・平成23-24年度「研究成果最適展開支援プログラム（A-STEP）探索タイプ」（AS232Z01208F）、ならびに文部科学省・平成25-26年度「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」の支援も得て実施し、本研究成果は、平成25年度北海道科学技術奨励賞（平成26年2月20日／北海道・北海道総合政策部）ならびに第103回日本泌尿器科学会総会・総会賞（平成27年4月19日／第103回日本泌尿器科学会総会・金沢）を受賞いたしました。

本研究を遂行するにあたり、ご支援、ご指導を頂きました関係各位に深謝申し上げます。

### 【参考文献】

- 1) Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn.* 21 (2) : 167-178, 2002.
- 2) 本間之夫、西沢 理、山口 優. 下部尿路機能に関する用語基準：国際禁制学会標準化部会報告. 日本排尿機能学会雑誌. 14 : 278-289, 2003.
- 3) 松本成史、柿崎秀宏. 排尿障害－最新診療動向1. 排尿障害（下部尿路障害）病態解説. 医学のあゆみ. 238 (4) : 291-296, 2011.
- 4) 松本成史. 第2章. 検査法. ⑪尿流动態検査. 泌尿器科診療ノート（金芳堂）. pp.44-46, 2011.
- 5) 松本成史. 特集：ここが聞きたい泌尿器科検査. ベストプラクティス. 臨床泌尿器科 増刊号（メディカルビュー社）. pp.149-154, 2004.
- 6) Boci R, Fall M, Waldén M, Knutson T, Dahlstrand C. Home uroflowmetry: improved accuracy in outflow

- assessment. *Neurourol Urodyn.* 18 (1) :25-32, 1999.
- 7) 後藤百万、吉川羊子、近藤厚哉、加藤範夫、小野佳成、近藤哲志、長井辰哉、榎原敏文、近藤厚生、三宅弘治. 前立腺肥大症における Conventional Urodynamic Study (尿流測定・残尿測定・膀胱内圧測定) の有用性と限界. *日泌尿会誌.* 87 (12) :1321-1330, 1996.
- 8) 松本成史、竹内康人、柿崎秀宏. 空中超音波ドップラーシステムのウロダイナミクス計測への応用. 日本超音波医学会基礎技術研究会資料. 2011 (2) : 20-25, 2011.
- 9) Matsumoto S, Takeuchi Y, Kakizaki H. Natural Urodynamics Measurement by Wearable Airborne Ultrasound Doppler System. *Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics.* 32 : 449-450, 2011.
- 10) 松本成史、柿崎秀宏. 空中超音波ドップラーシステムを用いた尿流測定器の開発とその有用性. *泌尿器科紀要.* 58 (9) : 465-469, 2012.
- 11) Matsumoto S, Takeuchi Y, Kakizaki H. Wearable airborne ultrasound Doppler device for natural urodynamics measurement. *Proceedings of SICE Annual Conference (SICE).* 1181-1183, 2012.
- 12) Matsumoto S, Takeuchi Y, Kakizaki H. Development and Utility Evaluation of New Uroflowmetry Device Using Wearable Airborne Ultrasound Doppler System. *J. Urol.* 189 ; e341, 2013.
- 13) 松本成史、竹内康人、柿崎秀宏. 尿流動態計測用空中超音波ドップラーシステムの校正のためのウォータージェットファントム. 電子情報通信学会技術研究報告. 113(107) :US2013-19 (2013-6) ;25-28, 2013.
- 14) 松本成史、竹内康人、柿崎秀宏. 適応ダイナミックフィルタによるドプラ信号の改質とその空中超音波ウロダイナミクス計測への応用(第2報). 電子情報通信学会技術研究報告. 113 (201) : US2013-19 (2013-6) ; 13-18, 2013.
- 15) 松本成史、竹内康人、柿崎秀宏. 適応ダイナミックフィルタによるドプラ信号の改質とその空中超音波ウロダイナミクス計測への応用. 日本超音波医学会基礎技術研究会資料. 2013 (2) : 1-4, 2013.
- 16) 松本成史、竹内康人、柿崎秀宏. 『パーソナル・ヘルスケア：ユビキタス、ウェアラブル医療実現に向けたヘルスケア・エレクトロニクス研究最前線－』 第2編第2章第4節「ウェアラブル空中超音波ドップラを用いたウロダイナミクス計測システムの開発」. 117-128, 2013. 株式会社エヌ・ティー・エス. 2013年10月23日初版第一刷発行.
- 17) 松本成史、竹内康人、柿崎秀宏. ドプラ外測ウロダイナミクス計測システムの実用評価について. 日本超音波医学会基礎技術研究会資料. 2014 (3) :17-21, 2014.
- 18) 松本成史. 空中超音波ドップラーシステムを用いた新規尿流測定装置の実用化. 臨床評価. 42 (suppl. 42) : 125-128, 2014.
- 19) 松本成史、竹内康人. 特許第5553315号：発明の名称「ドプラセンサー」、出願番号:特願2011-171217、出願日:2011年8月4日、登録日:2014年6月6日

## 依頼稿（報告）

# 平成 26 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 脳信号解読による運動・言語機能検出／ 刺激による脳疾患治療／代替法の開発

鎌田 恭輔\*

### 【要旨】

ALS 患者の終末期には意識が清明にもかかわらずコミュニケーションができなくなる。意志を伝える方法は、文字盤などの簡易的用具から、パソコンによる人工音声による手法がある。しかし症状が進行した患者に残された手段は、脳信号を解読する工学技術が唯一となる。しかし、いくつもある脳機能計測方法の信頼性、確実性は未だ確立していない。脳神経外科における脳機能マッピング法は病変を取り除く手術手技と並んで治療を根本で支える重要な技術である。高次脳機能である言語機能はその解剖学的基盤が不明確であり、個人差も大きい。言語野の同定には皮質電気刺激マッピングが必要であるが、検査自体の侵襲性が高いことが問題であり、より低侵襲な言語機能マッピング法が求められてきた。その一つに functional magnetic resonance imaging (fMRI) があるが、以下のような点で課題が残されている。① fMRI の信頼度の検証が不十分である、②背景にある神経活動との関連が未解明である。この点について以下の項目を検討した。皮質電気刺激マッピングと比較して fMRI の感度・特異度を算出した。また、BOLD 反応の背景神経活動として注目される高周波脳律動活動 (high gamma activity : HGA) との関係を調べた。更に、HGA の時空間動態を明らかにし fMRI による言語モデルとの整合性を検証した。（方法）難治性てんかんの治療を目的として硬膜下電極を留置した患者を対象とした。fMRI の賦活お

より HGA を検出するための言語課題は読字判別課題、物品呼称課題、動詞想起課題を用いた。電気刺激マッピングでは、自発語、物品呼称、読字、図形理解の 4 種類の言語課題を使用した。計測された皮質脳波に対してフーリエ変換を行い、HGA の定量化を行った。また、HGA の時空間動態を明らかにするために、時間周波数解析で得た HGA パターンを標準脳に投影した。（結果と考察） fMRI は読字判別課題で最も信頼度が高く、感度は 83%、特異度は 61% であった。脳回毎にみると、後部下前頭回で最も信頼度が高く（感度 91%、特異度 59%）、前部中前頭回は低い信頼度を示した（感度 80%、特異度 46%）。高感度、低特異度である fMRI は皮質電気刺激マッピングの代替とはなり得えないが、電気刺激マッピングの効率化に寄与すると考える。複数の言語関連領野で BOLD と HGA は有意な正の相関を示した ( $R = 0.57$ )。BOLD と HGA は、側頭葉において空間的な解離を示した。側頭葉の HGA は早期に減衰した一方で、前頭葉の HGA は、遷延した活動を示した。HGA の減衰が早いために、側頭葉の活動が BOLD に反映されない可能性を示した。（結論） fMRI は現状では独立した言語機能マッピング法として成立しえないが、皮質局所の神経活動を反映する HGA は BOLD とよく相関し、fMRI の背後にある神経活動の時空間動態を明らかにした。fMRI の時間分解能の改善によりマッピング精度の改善が得られる可能性がある。また HGA 自体による機能テンプレート作成、コミュニケーションデバイス開発に応用の可能性

\*旭川医科大学 脳神経外科学講座

を示した。

## 【はじめに】

脳外科手術において言語機能障害の出現を過度に恐れれば病巣の摘出は不十分となるが、摘出を重視すると言語機能障害が出現する確率が高くなる。したがって言語機能温存のための適切な手術方針を決定するためには脳における言語機能の分布を正しく見極めることが必要である。また、仮に言語機能障害を避けることができない場合にも、それを術前に予測し十分な説明をしておくことは、その後の治療を協力的に進める上で非常に重要である。このため言語機能マッピング法は病変を取り除く外科的手技と並んで脳神経外科手術を根本で支える重要な技術である。このような言語機能マッピングの目的は側性化と局在に大別される。

現状では、眞の言語機能局在には切除の影響を疑似的に再現する侵襲的検査が必須である。侵襲的検査を加えることにより最終的に当該部位に対する手術操作の可否が決定される。非侵襲的検査による言語機能の局在は未だ十分な信頼度に到達しているとは言えず単独で手術、コミュニケーションデバイスへの応用精度向上も大きな課題となっている。本研究では、言語機能局在・ダイナミクスに焦点を当てて、functional MRI (fMRI) の信頼度の検証と脳皮質の電気生理学的実体とされる高周波脳律動活動の詳細な検討を行った。

## 【本研究の目的 1】

コミュニケーションの基本となる言語機能の画像化とその信頼性の検証を行う。

この目的を達成するために、下記の 3 つの研究を行った。

**研究①** fMRI の信頼度を検証するために、皮質電気刺激マッピングと比較することにより、言語課題による fMRI の感度・特異度を算出した<sup>1,2,3)</sup>。

**研究②** 連合野における HGA-BOLD coupling を検証するために、言語課題による BOLD 反応とその背景脳活動とされる HGA の相関を調べた<sup>4)</sup>。

## 【方 法】

本研究は、上述した 3 つの研究で構成した。対象はすべて、申請者の施設で難治性てんかんの治療を目的として頭蓋内電極を留置した患者とした。頭蓋内電極

留置は、MRI 上器質的病変が明らかでない例の他、術前の非～低侵襲的検査ではてんかん焦点の同定に至らなかつた例で、てんかん焦点の同定を行う目的で行った。脳・脊髄・末梢神経疾患の臨床研究については当院倫理委員会審査で承認を受けている。頭蓋内電極留置後から焦点切除術を行うまでの 2 ~ 3 週間の間に、てんかん発作を補足するための長時間皮質脳波計測を行つた。更に、焦点切除術を安全に行うための言語機能局在を目的として頭蓋内電極を使用した電気刺激マッピングを行つた。さらに、本研究を目的とした言語課題による皮質電位計測を行つた。頭蓋内電極を用いた電気刺激、脳電位記録による機能的神経回路の研究に関しては当院倫理委員会審査で承認を受けている (# 178)。言語課題下の皮質電位計測は、最後にてんかん発作が起つてから 24 時間以上経過した後に行った。

## 【研究①の方法 : fMRI の信頼度の検証】

**対象** 2007 年 4 月（申請者の前任地）から 2015 年 9 月に難治性てんかんの治療を目的として頭蓋内電極を留置した 15 名の患者を対象とした。WAIS-R による言語性知能指数が 70 未満であった 1 名、電気刺激マッピングを施行しなかつた 4 例、言語優位半球の中・下前頭回に頭蓋内電極が留置されなかつた 2 例を除外し、結果として 8 例（男性 3 名、女性 5 名）について解析を行つた。表 1 に検討した患者の詳細を示した。

全例でてんかん焦点の切除術に先立つて和田テストを行い、言語優位半球の同定を行つた。7 例で左言語優位を示す結果が得られたが、1 例では両側性の言語機能分布が示されたため、両側を言語優位半球として扱つた。本研究では、単語レベルでの言語課題を使用したため、fMRI 賦活部位は前頭葉を中心に分布することが予想された。最終的に 9 大脳半球前頭葉に関して言語 fMRI と皮質電気刺激マッピングの比較を行つた。

## 【言語 fMRI】

3 テスラ頭部専用 MRI 装置 (GE Healthcare, USA) および phased-array コイルを用いた。fMRI の検査パラダイムは box-car design を用いた。各 fMRI セッションは、賦活ブロック 3 回と対照ブロック 4 回からなり、20 秒間の各ブロックで 5 イメージボリュームを取得した。撮像開始時の信号を安定化させるため最初の 3 スキャンは破棄した。したがつて 1 回のセッションは

表 1 患者情報の詳細

Patient	Age, y/Sex	Diagnosis	Language dominance	VIQ Score	Electrodes, n
1	50/F	Right TLE, cavernous malformation	Left	91	30
2	40/M	Left TLE	Left	85	24
3	33/F	Left FLE, left TLE	Left	94	32
4	40/M	Right TLE	Left	93	21
5	35/F	Left TLE	Left	107	20
6	21/M	Left TLE	Left	79	20
7	36/F	Left TLE	Left	72	29
8	31/F	Right TLE	Bilateral	86	Left 25, Right 21

FLE, frontal lobe epilepsy; TLE, temporal lobe epilepsy; VIQ, Verval Intelligence Quotient in the Wechsler Adult Intelligence Scale, revised;

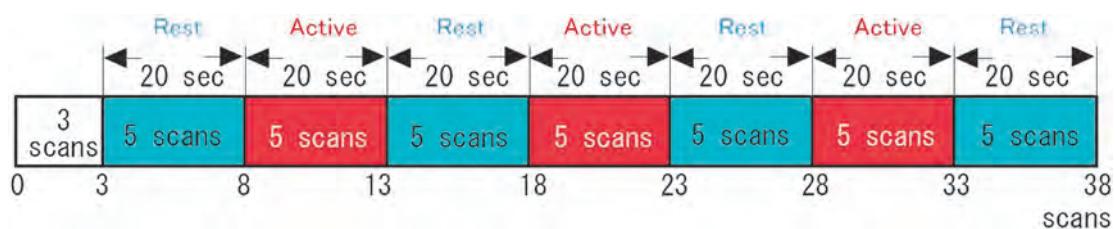


図 1 fMRI のタスクデザイン (box-car design)

5スキャン、20秒ごとに安静と課題を繰り返し行い、課題は3回繰り返し1回あたり2分32秒の検査時間とした。

2分32秒で終了し、38ボリュームが取得された(図 1)。

**動詞想起課題**：ヘッドフォンを使用して聴覚刺激を行った。賦活ブロックでは、簡単な具象名詞を提示した。患者は提示された単語と関連する動詞を想起することとした。対照ブロックでは、逆再生した単語を提示し、一次聴覚野の応答を相殺した。音声の提示は500ミリ秒以内とし、刺激間隔は1600～2400ミリ秒とした。

**読字判別課題**：ヘッドコイルに装着した鏡を通して患者の足元にある液晶モニターによる視覚提示を行った。賦活ブロックでは、3文字の平仮名からなる単語を提示し、その単語が具象語か抽象語かを判断するように指示した。対照ブロックでは、一次視覚応答を相殺すべく、全体の輝度を賦活ブロックの単語と合わせたランダムドットを提示した。刺激提示時間、刺激間隔はそれぞれ500ミリ秒、2000ミリ秒とした。

**物品呼称課題**：文字読み課題と同じセットアップで視覚提示を行った。賦活ブロックでは、ありふれた物品のカラーイラストを提示し、物品の名称を想起するよ

う指示した。対象ブロックでは、全体の輝度を賦活ブロックのイラストと合わせた無意味な画像を提示した。刺激提示時間、刺激間隔はそれぞれ500ミリ秒、2000ミリ秒とした。

得られた機能画像は、Dr View (AJS、日本) で解析を行った。賦活ブロックと対照ブロックのすべての画像からボクセル毎にZ値を算出した。Z値のカットオフ値を1.65、1.96、2.24、2.58（両側検定でそれぞれ0.1、0.05、0.025、0.01のP値に対応する）に設定し、それに対応する機能画像を作成した。

#### [皮質電気刺激マッピング]

使用した硬膜下電極は電極径3mm、電極間距離10mmのものを使用した(ユニークメディカル、日本)。電気刺激は、極性の反転する0.2ミリ秒の矩形波からなる50Hzの定常電流を用いて2つの電極間で行った。言語課題を開始して数秒の時点で電気刺激を開始し、言語機能の変化を観察した。刺激後に出現した発語停止、発語遅延、意味性錯語、保続、理解困難を刺激に

による言語機能障害と定義した。

#### [fMRI と電気刺激マッピングの比較]

fMRI の賦活部位と電気刺激マッピングの結果を比較するために、電極留置後の 3D-CT、電極留置前の 3D-MRI、fMRI 機能画像を融合して、検討した半球側面の 3 次元脳表面画像を作成した（図 2 A）。

同一患者のすべての MRI 画像は、xy 座標上の中心が揃えてあるため、fMRI 機能画像と 3D-MRI 解剖画像は z 軸上の座標を合わせることにより画像の位置合わせを行った。また、3D-CT と 3D-MRI のボリュームデータの相互情報量を最大化することにより、両画像の位置合わせを行った。このようにして位置合わせを行った機能画像と 3D-CT を 3D-MRI のボリュームデータに合わせてリスライスした。Dr View により 3D-MRI から半自動的抽出された脳表のボリュームデータと位置合わせを行った 3D-CT、fMRI 機能画像は digital imaging and communications in medicine (DICOM) 形式で RealIntage (KGT、日本) に取り込み、3D 融合画像を作成した。我々は、仮想的な電極の直径 (matching criteria) を 3mm、6mm として fMRI 賦活部位との一致の有無を評価した。仮想電極内に賦活部位が存在すれば、その電極は fMRI (+) とした。仮想電極内に賦活部位がなければその電極は fMRI (-) とした。全患者の電極を、fMRI 賦活の有無 (fMRI (+) か fMRI (-)) (図 2 B)、電気刺激による言語障害の有無 (ECS (+) か ECS (-)) (図 2 C) によって 4 群に分類し、各群の電極数により感度、特異度を算出した。

各 Z 値に対して感度、特異度を算出することにより receiver-operating characteristics (ROC) 曲線を得た。3 種類の言語課題、2 つの matching criteria の組み合わせにより 6 個の ROC 曲線を求め、感度・特異度の best tradeoff を与える条件を調べた。感度・特異度の合計から 1 を減じた値 (Youden Index) が最大になる ROC 曲

線上の点を best tradeoff とした。これは、図の対角線 (感度と特異度の和が 1 になる直線) と ROC 曲線上の点の最大距離に相当する。

#### [研究②の方法 : HGA-BOLD coupling]

##### 1. 対象

2006 年 12 月～2015 年 9 月に難治性てんかんの治療を目的として頭蓋内電極を留置した 23 名の患者を対象とした。13 例 (男性 5 例、女性 8 例) の検討を行った。表に検討した患者の詳細を示した。fMRI の susceptibility artifact の強い脳の底面は検討から除外し、言語優位側である左半球外側面のみを検討の対象とした。

##### 2. 言語 fMRI

研究①で記載した撮像条件、パラダイムを用いて fMRI を行った。最も多くの賦活が得られた読字判別課題のみを解析の対象とした。

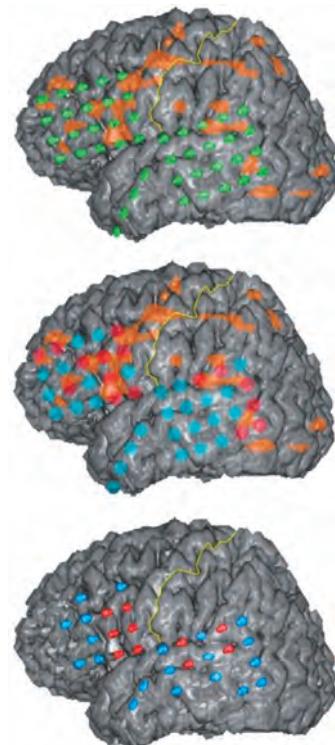


図 2 3 次元 MRI、fMRI および硬膜下電極の融合画像  
A. 読字判別課題による fMRI 賦活領域 ( $Z > 2.24$ 、橙色) と硬膜下電極 (緑) の融合画像。側頭葉と比較して前頭葉により広範な賦活領域が観察された。  
B. 6mm の matching criteria を用いて電極ごとに fMRI 賦活の陽性 (赤)、陰性 (青) を判定した。  
C. 電極ごとに皮質電気刺激に対する応答 (陽性:赤、陰性:青) を示した。

	ECS (+)	ECS (-)
fMRI (+)	A	B
fMRI (-)	C	D

$$\text{感度} = \frac{A}{(A + C)} \times 100 (\%)$$

$$\text{特異度} = \frac{D}{(B + D)} \times 100 (\%)$$

得られた機能画像の解析は数値解析ソフトウェアである MATLAB (The Mathworks, Inc.、アメリカ) 上で動作する SPM8 (Wellcome Department of Imaging Neuroscience、イギリス) にて行った。得られた画像パラメータから集団レベルでの統計画像を作成することが可能である。SPM8 を用いて機能画像の位置補正を行い、標準脳に合わせて座標変換を行った。更に半幅 8mm のガウシアンフィルタにより平滑化処理を行った。3D 標準脳表面画像の元となるボリュームデータは、fMRI 機能画像と合わせて撮像した 3D-MRI ボリュームデータを SPM8 により標準化して作成した。本研究では、電極と同じ位置に半径 10mm の ROI を設定した。ROI 解析は Mars-Bar region of interest toolbox にて行った (図 3)。

### 3. ECoG 記録

ベッド上に座った患者の 100cm 前方にモニターを設置した。視覚刺激は、ノート PC 型刺激装置 (Stimuli Output Sequencer, NoruPro Light Systems Inc.、日本) によってモニター上に提示された。ECoG は、128 チャンネルの脳波計 (BMSI 6000, Nicolet Biomedical Inc.、アメリカ) を使用してサンプリング周波数 400Hz、アナログフィルター 0.55 ~ 150Hz で記録した。課題のトリガーとして刺激開始と同時に刺激装置から矩形波が output され、脳波計の空きチャネルに記録されるようにした。基準電極は頭皮上 Cz (国際 10-

20 システム) の位置に刺入した針電極とした。

### 4. ECoG 解析

ECoG データの解析は、Matlab 上で作成したプログラムを用いて行った。刺激開始をゼロとして、背景脳活動を示す baseline を -600 ~ -100 ミリ秒、課題中の脳活動を示す task period を 0 ~ 750 ミリ秒と定義した。ウインドウ毎の PSD を平均し、データエポック全体の PSD を得た (図 4A)。本研究では、刺激開始前後 750 ミリ秒からなる 1500 ミリ秒のデータエポックから算出した PSD を用いて、baseline および task period の PSD の正規化を行った (図 4B)。この方法により、スペクトルの形状が平坦化し、正規化されたパワーの周波数帯域内の平均値をとることができた。Baseline と task period の high gamma 帯域 (60 ~ 120Hz) における正規化されたパワーの平均値を算出し、両者の差分を High gamma 帯域のパワー変化 (high gamma power change; HGPC) と定義した (図 4C)。

### 5. 統計解析

BOLD と HGA の相関について検証した。すべての HGA (+) の電極について BOLD-SC と HGPC を算出した。線形回帰モデル ( $Y = XB + U$ ) を適用し、F-test で検定を行った ( $P < 0.05$ )。ここで、Y : BOLD-SC、X : HGPC、B : 回帰係数、U : 残差とした。

### 6. 電極の標準脳への表示

標準化電極をモデル脳の表面に表示するために、モ

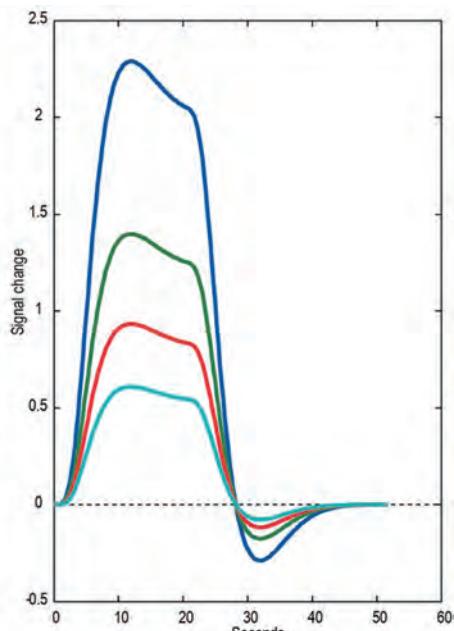
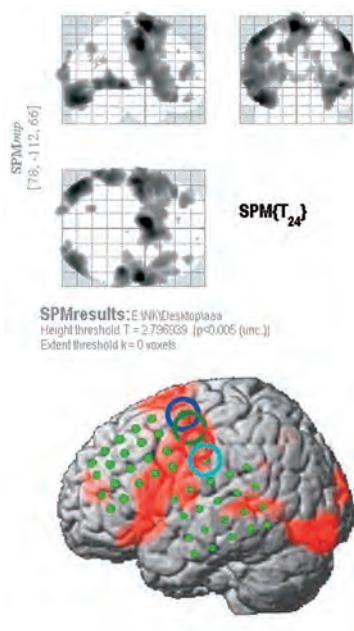


図 3 Mars-Bar による ROI 解析

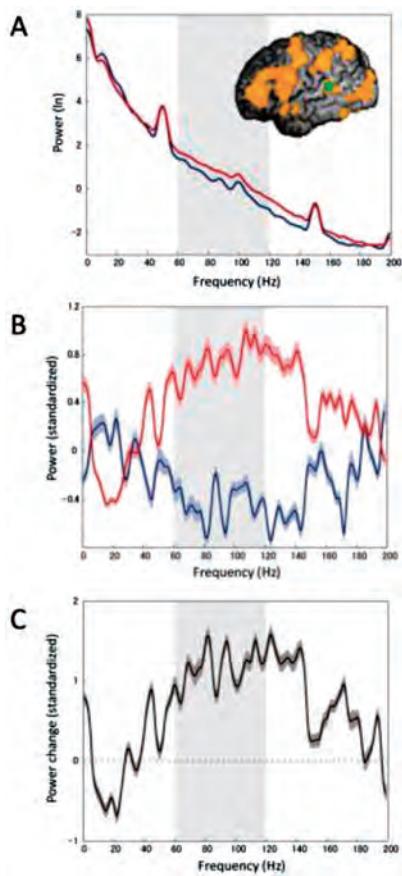


図4 スペクトル密度解析の例

左上側頭回の1電極について周波数解析を行った。淡灰色の領域は60-120Hzのhigh gamma帯域を示す。

- A. task period (赤)とbaseline (青)のスペクトル密度関数。task periodのスペクトル密度はhigh gamma帯域において上昇を示した。
- B. 正規化したスペクトル密度関数 (task period: 赤、baseline: 青)。色つき部分は平均の標準誤差を示す。
- C. task periodとbaselineの正規化スペクトル密度の差。色つき部分は平均の標準誤差を示す。

デル脳と標準化された電極のボリュームデータをEMSE (Source Signal Imaging, San Diego, CA、アメリカ)に取り込んだ。EMSEは脳波・MEGデータの解析コンポーネントと脳画像処理コンポーネントからなる汎用性の高い脳機能画像解析ソフトウェアで、解析結果を脳表に投影し時空間的脳機能動態を動画として表示することも可能である。頭蓋内電極をデジタル化し、対応するECOGデータを脳表に投影する機能を搭載している。各シート状電極は、数個の電極位置を指定するだけで、予め定義された電極のtemplateに合わせてデジタル化される(図5)。

## 7. 時間周波数解析

HGAの時空間的動態を前頭葉と側頭葉で比較するために、時間周波数解析を行った9-10。刺激開始を0として、-500ミリ秒から1500ミリ秒を解析対象とした。HGAの時間変化を定量化するために、60～120Hzにおける有意な周波数成分の割合を時間成分毎にカウントし、high gamma broadband index (HGBI)と定義した。HGBIをプロットすることにより、その電極におけるHGAの時間変化を知ることができる。

## 【結 果】

### 研究①の結果：fMRIの信頼度

#### 1. fMRIの結果

動詞想起課題と物品呼称課題は3例において優位側言語半球において優位な賦活を示さなかった。一方で、読字判別課題は全例において優位側言語半球でより広い賦活部位が観察され、その傾向は特に前頭葉で顕著であった。和田テストで両側性の言語機能が見られた1例においては、読字判別課題で両側前頭葉が側

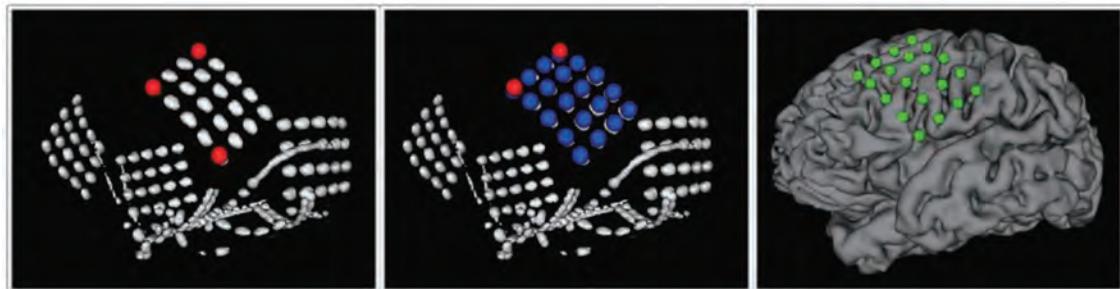


図5 電極のデジタル化

シート上に配列された電極のうち3点を選択することにより脳の曲率に合わせて変形したtemplateが適用される。

頭葉より広く賦活された。側頭葉、頭頂葉は、どの言語課題によっても前頭葉より賦活される部位が少ない傾向が見られた。読字判別課題と比較して動詞想起課題と物品呼称課題は賦活部位が少ない傾向が見られたため、検討に使用した Z 値は、読字判別課題では 1.96、2.24、2.58、動詞想起課題、物品呼称課題では 1.65、1.96、2.24 とした。

## 2. ECS の結果

9 個の大脳半球に留置された 107 個の電極について解析した。半球あたりの電極数は  $12 \pm 3.3$  (平均  $\pm$  標準偏差) であった。ECS (+) の電極は 44 個 (41%) あり、そのうち、物品呼称と自発語で陽性であったものは、それぞれ 40 個 (91%) と 30 個 (68%) であった。これらの課題は、読字および図形理解と比較して言語関連部位の検出率が高かった。時間的制約により、部位によっては読字および図形理解を省略した。読字および図形理解が特異的に障害される部位は認めなかつた。

## 3. fMRI と ECS の比較

異なる Z 値で、言語課題および matching criteria 毎の感度、特異度を算出した (表 2)。

横軸を偽陽性率 (1 - 特異度)、縦軸を感度として、すべての結果をプロットし、各条件に対応する 6 個の ROC 曲線を得た (図 6)。

読字判別課題は他の 2 つの課題と比較して一貫して感度、特異度が高く、ECS (+) を最も効率よく検出した。一方で、いずれの課題においても 2 つの

matching criteria に対応する ROC 曲線は、ほぼ同一の曲線上に位置しており、この範囲で matching criteria を変えることは、fMRI の信頼度に大きく寄与しなった。Youden Index の最大値 0.44 は、読字判別課題において、Z 値を 2.24、matching criteria を 3mm としたときに得られ、このときの感度は 83%、特異度は 61% であった。

## 研究②の結果 : HGA-BOLD coupling

### 1. HGA と BOLD 反応の分布の概略

合計 478 個の電極について解析を行った。図 7A にモデル脳の左半球外側面上に配置した電極を示した。その内 39 個が HGA (+) であった (図 11B)。

BOLD-SC は HGA (+) では 0.39、HGA (-) では 0.21 で、両者に有意差は認めなかった。

### 2. HGA と BOLD の相関

BOLD-SC と HGPC の回帰分析の結果、両者の間に有意な相関を認め ( $P = 0.0002$ )、相関係数は 0.57 であった (図 8)。

### 3. 前頭葉と側頭葉における HGA と BOLD の関係

HGA (+) の電極は、下前頭回、上・中側頭回、中心前回 (運動前野と顔運動野) 等に群を成して分布した (図 7B)。各部位には、複数の患者に由来する電極が含まれていた。fMRI の集団レベル解析の結果を図 7C に示した。図 7B において群を成した電極および図 7C を重ね合わせたものが図 9 である。

表 2 患者情報の詳細

	Matching criterion = 3mm				Matching criterion = 6mm			
	Z score				Z score			
	1.65	1.96	2.24	2.58	1.65	1.96	2.24	2.58
<b>読字判別課題</b>								
Sensitivity (%)	90	83	76		100	93	86	
Specificity (%)	52	61	68		31	47	56	
<b>動詞想起課題</b>								
Sensitivity (%)	64	39	33		76	55	42	
Specificity (%)	19	38	53		16	19	41	
<b>物品呼称課題</b>								
Sensitivity (%)	70	60	55		90	75	65	
Specificity (%)	41	53	53		26	44	47	

#### 4. 前頭葉と側頭葉における HGA の動態解析

時間周波数解析を用いて前頭葉と側頭葉における HGA の時間変化を調べた。HGA (+) の電極が複数集まって群を形成している部位に注目した。下前頭回、中心前回（運動前野と顔運動野）、中・後部上側頭回、後部中側頭回の 6 部位を選択し、それぞれに含

まれる電極の HGBI の平均をプロットした。各部位は、特徴的な HGA の時間変化を示した（図 9）。側頭葉の 3 部位では、HGBI は短い潜時で立ち上がり、持続時間が短く 500 ミリ秒以降急速な減弱を示した。一方、前頭葉の 3 部位では HGBI は立ち上がりがやや遅れるものの、500 ミリ秒以降も活動が遷延する傾向を

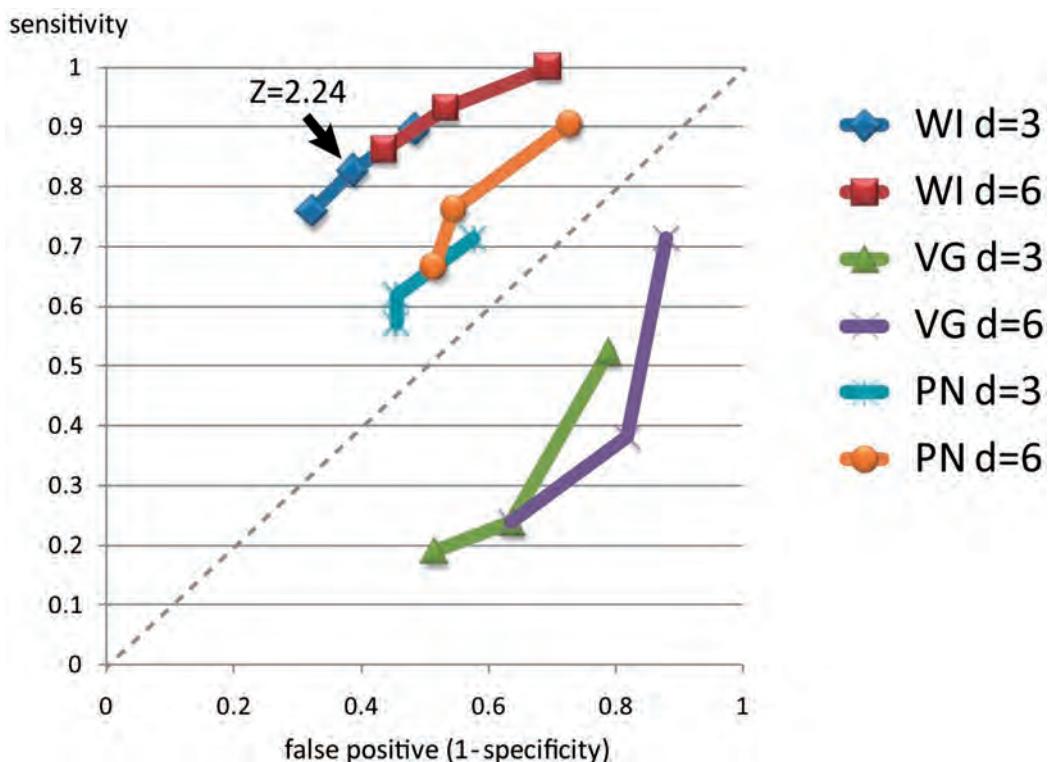


図 6 Receiver-operating characteristic (ROC) 曲線

3 つの言語課題（WI：読字判別課題、VG：動詞想起課題、PN：物品呼称課題）と 2 つの matching criteria ( $d = 3\text{mm}$ 、 $6\text{mm}$ ) の組み合わせからなる 6 つの ROC 曲線を示した。ROC 曲線は縦軸に感度を、横軸に偽陽性率（1 - 特異度）をプロットすることにより得られる。読字判別課題を用いて、matching criteria 3mm、Z 値 2.24 としたとき感度と特異度の best tradeoff が成立した（矢印）。尚、ここで感度、特異度を少数で表示した。

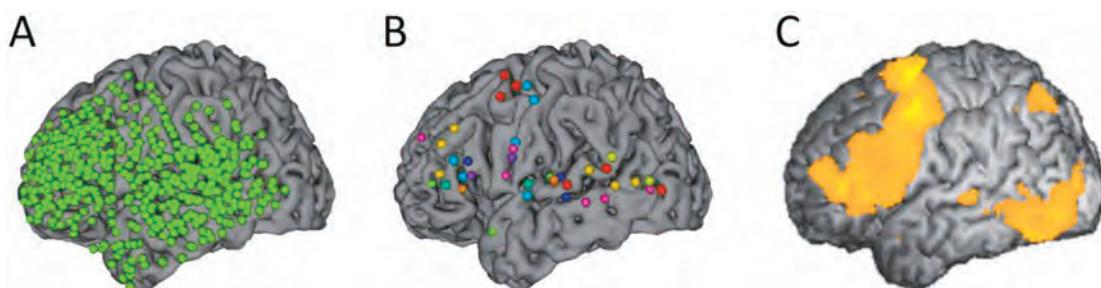


図 7 high gamma activity (HGA) と BOLD 反応のモデル脳における比較

- A. 検討したすべての電極（緑）をモデル脳上に表示した。電極は左前頭葉と側頭葉の外側面に広く分布した。
- B. 有意な HGA をモデル脳上に表示した。同じ電極の色は同一患者由来の電極であることを示す。HGA は下前頭回、上・中側頭回、中心前回（運動前野、顔運動野）に群を成して分布した。
- C. fMRI の集団レベル解析による T 統計画像をモデル脳上に表示した。BOLD 反応は下前頭回や中心前回を中心とした前頭葉で広く観察された。電極が留置されなかった下側頭回後方でも BOLD 反応が見られた。

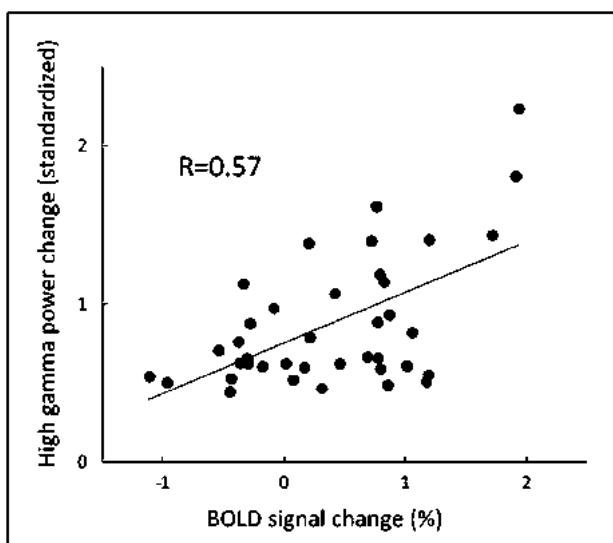


図 8 BOLD信号変化に対するhigh gamma power changeの散布図

回帰分析により正の相関が得られた ( $R = 0.57$ 、 $P = 0.0002$ )。

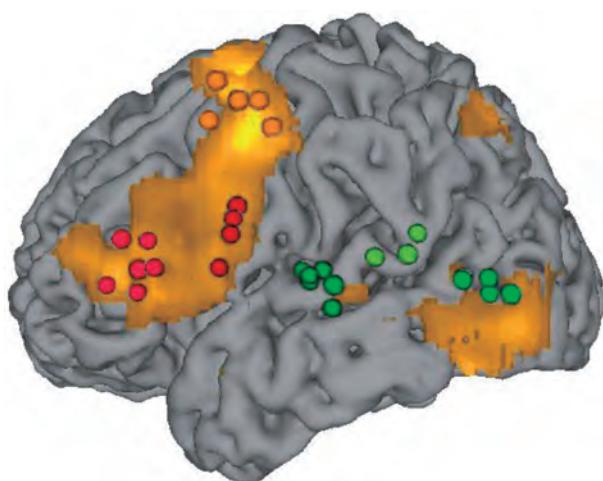


図 9 high gamma activity (HGA) と BOLD 反応のモデル脳における重畠表示

図 7 Bにおいて群を形成した電極と fMRI 集団レベル解析の T 統計画像をモデル脳上に表示した。前頭葉では HGA と BOLD 反応の分布は概ね一致した。しかし側頭葉では両者の分布は異なっていた。

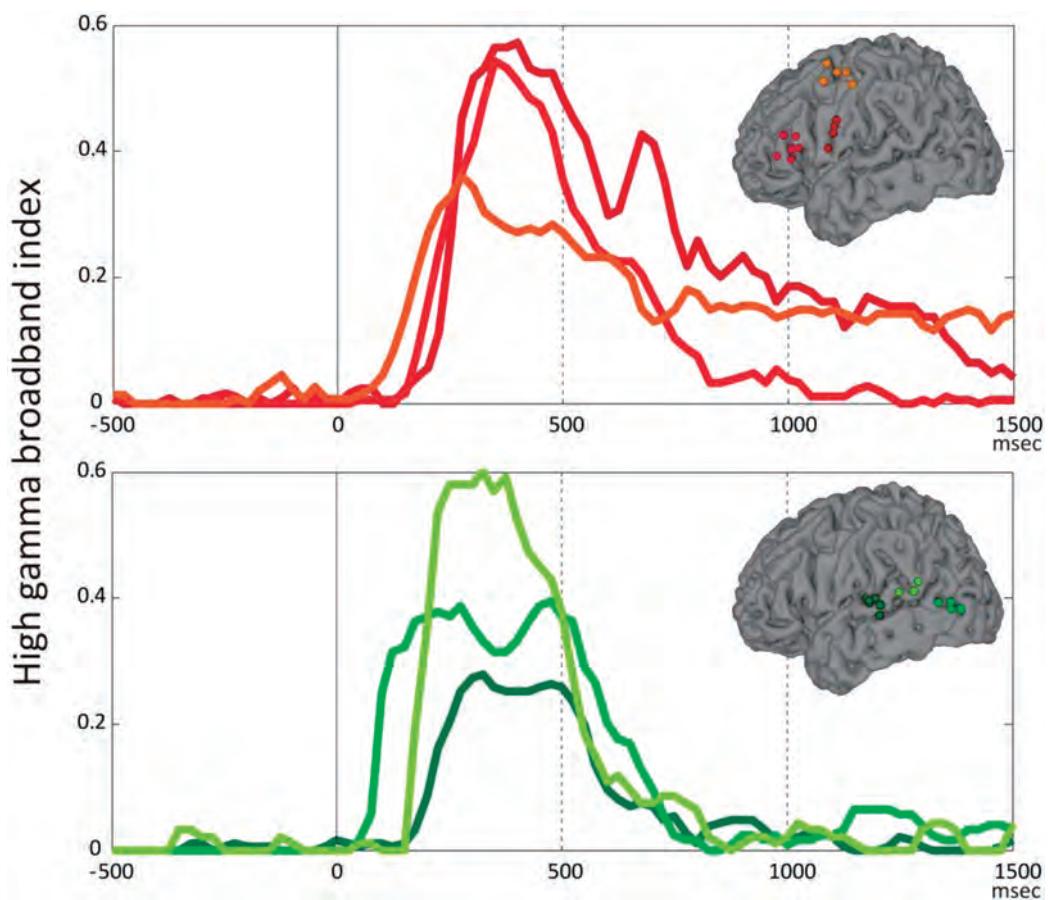


図 9 前頭葉および側頭葉における high gamma activity (HGA) の時間変化

有意な HGA を示した電極が、下前頭回、中心前回（運動前野、顔運動野）、上側頭回中部・後部、中側頭回後部で形成した群ごとに high gamma broadband index (HGBI) の平均値を時間に対してプロットした。前頭葉の各群における HGBI は 500 ~ 1000 ミリ秒以降も遷延した活動を示したが、側頭葉の各群における HGBI は 500 ミリ秒以降急速な下降を示した。電極の色と HGBI のプロットの色を対応させて示した。

示した。

## 【考 察】

本研究では、硬膜下電極を用いた電気刺激マッピングを基準として使用した。これにより、患者はより生理的な言語応答が可能な条件下で、複数の言語課題によるマッピングを行うことが可能となった。更に、3TMRI 装置は 1.5T 装置と比べて BOLD 反応の信号雑音比が高いとされる<sup>11,12)</sup>。そのため、より多くの言語関連部位を検出できるが、不適切なカットオフ値を設定することにより特異度を損なう恐れがある。我々は、ROC 曲線から適切なカットオフ値を求め、特異度を大きく損なうことなく、高い感度を得た。fMRI は、機能部位の賦活法という性質上、少なくとも単純化された言語課題を遂行する上では必ずしも必要でない部位も検出される。本研究における一貫した高い感度は、このような理論的考察ともよく一致している。したがって、fMRI で賦活されなかった部位は、皮質電気刺激を行っても言語障害が出現しない可能性が高く、刺激を行う優先順位を下げる有力な根拠となる。皮質電気刺激の回数を減らすことは患者の検査における負担を減らし、より重要な機能部位を詳細に調べることを可能とする。その意味で、最も重要な言語中枢である後部下前頭回において、感度 91%、特異度 59% という良好な信頼度が得られた意義は大きい。しかし一方で、fMRI の特異度は、最も高い脳回でも 70% に留まった。脳回毎に検討したとしても、皮質電気刺激マッピングを省略し、fMRI の結果のみに依存した手術を行うことは許容されない。

脳における語彙の認知を示す電気生理学的応答は、刺激が提示されてから 400-600 ミリ秒をピークとして観察される<sup>13)~16)</sup>。したがって、単語レベルの言語処理は概ね 1 秒以内に完結すると考えられる。この間に生じる、脳内に広く分布する言語関連領野のダイナミックな電気的活動を、時間分解能が 20 秒程度である box-car design の fMRI で分別することは難しいと考えられる。fMRI は脳活動の複雑な時空間的パターンを時間的に圧縮した静止画像として提供する。したがって fMRI の時間分解能を高めることができれば、刻々と変化する空間的特異性の高い脳機能部位を画像化し得る。Event-related design を用いることにより時間分解能は 3 ~ 4 秒まで改善することが可能である。

## 【結 論】

本研究は、電気生理学的手法を用いて fMRI の信頼度の検証と背景神経活動の詳細な検討を行った。

皮質電気刺激マッピングと比較することにより、読字判別課題を用いた fMRI の信頼度が最も高く、感度 83%、特異度 61% であることを示した。更に後部下前頭回で感度 91%、特異度 59% と最も高い信頼度が得られることを示した。fMRI は現状では皮質電気刺激マッピングの代替とはなり得ないが、電気刺激の効率化に寄与すると考えられる。

HGA と BOLD は有意な正の相関を示す一方で、側頭葉における空間的解離が見られた。側頭葉の HGA が前頭葉と比べ早く減衰することが空間的解離に寄与している可能性が示された。HGA と fMRI の関係が広い言語関連領野で明らかにされ、言語課題を用いた fMRI により側頭葉が賦活されにくい理由にもひとつ の可能性が示された。

広範囲に留置された過去最大級の数の電極を空間的に標準化し、言語課題による HGA の時空間動態を明らかにした。fMRI の背景となる脳活動の時間的変化は課題により特異的なパターンを示した。fMRI の背景脳活動の時空間動態を明らかにするとともに、機能情報をテンプレート化、脳領域別の電気生理学的なダイナミクスの違いを明らかにすることができた。機能テンプレートを用いた効率的な脳機能読み取り技術は今後コミュニケーションデバイスの発展に寄与するものと期待できる。

## 【引用文献】

- 1) Kamada K, Todo T, Masutani Y, et al. Combined use of tractography-integrated functional neuronavigation and direct fiber stimulation. *J Neurosurg.* Apr 2005 ; 102 (4) : 664-672.
- 2) Kamada K, Sawamura Y, Takeuchi F, et al. Expressive and receptive language areas determined by a non-invasive reliable method using functional magnetic resonance imaging and magnetoencephalography. *Neurosurgery.* Feb 2007 ; 60 (2) : 296-305 ; discussion 305-296.
- 3) Kunii N, Kamada K, Ota T, Kawai K, Saito N. A detailed analysis of functional magnetic resonance

- imaging in the frontal language area: a comparative study with extraoperative electrocortical stimulation. *Neurosurgery*. Sep 2011;69 (3):590-596; discussion 596-597.
- 4) Kunii N, Kamada K, Ota T, Greenblatt RE, Kawai K, Saito N. The dynamics of language-related high-gamma activity assessed on a spatially-normalized brain. *Clin Neurophysiol*. Jan 2013;124 (1):91-100.
  - 5) Kamada K, Ogawa H, Saito M, et al. Novel techniques of real-time blood flow and functional mapping: technical note. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014 ; 54 (10) : 775-785.
  - 6) Kunii N, Kamada K, Ota T, Kawai K, Saito N. Characteristic profiles of high gamma activity and blood oxygenation level-dependent responses in various language areas. *Neuroimage*. Jan 15 2013 ; 65 : 242-249.
  - 7) Ojemann G, Ojemann J, Lettich E, Berger M. Cortical language localization in left, dominant hemisphere. An electrical stimulation mapping investigation in 117 patients. *J Neurosurg*. Sep 1989 ; 71 (3) : 316-326.
  - 8) Ossadtchi A, Greenblatt RE, Towle VL, Kohrman MH, Kamada K. Inferring spatiotemporal network patterns from intracranial EEG data. *Clin Neurophysiol*. Jun 2010 ; 121 (6) : 823-835.
  - 9) Zygierek J, Durka PJ, Klekowicz H, Franaszczuk PJ, Crone NE. Computationally efficient approaches to calculating significant ERD/ERS changes in the time-frequency plane. *J Neurosci Methods*. Jun 30 2005 ; 145 (1-2) : 267-276.
  - 10) Makeig S. Auditory event-related dynamics of the EEG spectrum and effects of exposure to tones. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. Apr 1993 ; 86 (4) : 283-293.
  - 11) Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1990 ; 87 (24) : 9868-9872.
  - 12) Scarabino T, Giannatempo GM, Popolizio T, et al. 3.0-T functional brain imaging: a 5-year experience. *Radiol Med*. Feb 2007 ; 112 (1) : 97-112.
  - 13) Vartiainen J, Parviainen T, Salmelin R. Spatiotemporal convergence of semantic processing in reading and speech perception. *J Neurosci*. Jul 22 2009;29(29) : 9271-9280.
  - 14) Halgren E, Dhond RP, Christensen N, et al. N400-like magnetoencephalography responses modulated by semantic context, word frequency, and lexical class in sentences. *Neuroimage*. Nov 2002 ; 17 (3) : 1101-1116.
  - 15) Salmelin R, Hari R, Lounasmaa OV, Sams M. Dynamics of brain activation during picture naming. *Nature*. Mar 31 1994 ; 368 (6470) : 463-465.
  - 16) Kutas M, Hillyard SA. Reading senseless sentences: brain potentials reflect semantic incongruity. *Science*. Jan 11 1980 ; 207 (4427) : 203-205.
  - 17) Ogawa H, Kamada K, Kapeller C, Hiroshima S, Prueckl R, Guger C. Rapid and minimum invasive functional brain mapping by real-time visualization of high gamma activity during awake craniotomy. *World Neurosurg*. Nov 2014 ; 82 (5) : 912 e911-910.
  - 18) Buxton RB, Uludag K, Dubowitz DJ, Liu TT. Modeling the hemodynamic response to brain activation. *Neuroimage*. 2004 ; 23 Suppl 1 : S220-233.

## 依頼稿（報告）

# 平成 26 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 アジアにおける人獣共通寄生虫感染症対策：迅速診断・ 蔓延度推定の技術確立と感染撲滅に向けた国際医療貢献

迫 康 仁\*

### 【研究の背景と目的】

本研究課題では、有鉤条虫の幼虫（囊虫）ならびに多包条虫および単包条虫の幼虫（包虫）の寄生によって起こる人獣共通寄生虫症を対象としている。囊虫は脳内、筋肉内および皮下などに寄生し「有鉤囊虫症」を、包虫は主に肝臓に寄生し「エキノコックス症」を引き起こす。

有鉤条虫は、ヒトの消化管でのみ成虫に発育する寄生虫である。食物連鎖により、ヒトとブタの間でのみ生活環が完結しているため、「安全な食材提供」と「十分な加熱調理」により撲滅が可能である。しかしながら、地球規模で、特に経済的発展途上国で対策が遅れているため未だに蔓延している。有鉤囊虫症は、偶発的に経口摂取された虫卵（六鉤幼虫を包藏し、有鉤条虫感染者から排泄される）が、脳、筋肉内、皮下などで囊虫に発育分化し、寄生することにより引き起こされる<sup>1)</sup>。

一方、多包条虫および単包条虫は、キツネやイヌなどの消化管内で成虫となる。ヒトは、キツネならびにイヌ（成虫）とネズミ（多包虫）、イヌ（成虫）とヒツジ（単包虫）の感染循環において、キツネ、イヌから排出された虫卵（六鉤幼虫）を経口摂取することにより感染する。その後、六鉤幼虫は、主に肝臓内で包虫に発育分化し、ヒトはエキノコックス症（包虫症）を発症する<sup>2)</sup>。

本研究課題の最終目標は、テニア科に属する人獣共

通感染寄生虫症の対策に役立つ技術革新を行い、致死性の有鉤囊虫症および肝エキノコックス症を撲滅することである。そのために、コントロールモデルとして、バリ島（有鉤囊虫症）およびモンゴル（エキノコックス症）を対象地として対策研究を行う。

本研究では、ヒトならびに家畜の検査法の開発研究とポイント・オブ・ケア・テストとしての実用化に向けた評価研究を遂行し、同時にそれらを用いたフィールド調査を実施し詳細な流行地域の特定・感染者や感染動物の発見位置情報を利用した寄生虫感染伝播動向の解析・流行地域住民の感染リスク要因の推定をする。さらに、旭川医科大学が文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラムに採用され実施している「オール北海道先進医学・医療拠点形成」事業や文部科学省科学技術戦略推進費などのサポートを受け開発した、ヒト有鉤囊虫症およびエキノコックス症の迅速検査キットの円滑な臨床現場への導入や国際的な展開を実現するために必要な性能評価を実施する。

本稿では、ヒトならびに家畜の検査法の研究概要を紹介し、2015年にインドネシア共和国・バリ州で実施したテニア症および有鉤囊虫症の調査について報告する。

### 【ヒトの検査法】

有鉤囊虫症検査およびエキノコックス症（多包虫症、単包虫症）検査として、幼虫に対する特異抗体を検出する血清検査を開発してきた。有鉤囊虫症では囊虫液

\*旭川医科大学 寄生虫学講座

に存在する 10–26kDa の糖タンパク質を<sup>3,4)</sup>、多包虫症では多包虫細胞内タンパク質である約 60kDa の ezrin-radixin-moesin-like proteins (elp) 分子がシスティンプロテアーゼによる分解を受けた結果生じる 18kDa の Em18 分子を<sup>5–7)</sup>、単包虫症では包虫液に存在する約 8kDa の Antigen B1 分子を<sup>8)</sup>、種特異的検査用抗原として使用している。さらに、それぞれの組換え抗原を用いた ELISA 法、イムノプロット法ならびにイムノクロマトグラフィー法 (ICT) による検査法も開発されている<sup>7–11)</sup>。イムノクロマトグラフィー法を用いた検査法はキット化され、研究用試薬として市販されている(図 1)。本研究では、この迅速検査キットの性能評価を実施する。

ヒトテニア症の高感度特異的な検査として、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いたテニア条虫 DNA を検出する検査法を開発してきた<sup>12–14)</sup>。テニア症の検査は糞便検査により虫卵を検出する方法と排出された片節などの形態を観察する方法が一般的であるが、それらの方法は、感度が低くまた種特異的ではないという問題があるためである。しかしながら、LAMP 法を用いた DNA 検出法は高感度かつ種特異的であるが、1 種の条虫に対し 1 つの検査反応チューブを必要とするため、検体が多数の場合、操作が煩雑になるという問題がある。そこで本研究では、1 つの反応チューブで 3 種の条虫を検査できるマルチプレックス LAMP 法と各増幅 DNA 産物の選択的検出法を開発する。



図 1 研究用試薬として市販されている検査キット

## 【家畜の検査法】

有鉤囊虫症においては、ブタがヒトテニア症の感染源として重要である。つまり、ブタに寄生している有鉤囊虫をヒトが経口摂取することにより、テニア症が引き起こされてしまう。したがって、有鉤囊虫感染ブタを検出し排除することは、有鉤囊虫症のコントロールに必要不可欠である。我々は、ブタ有鉤囊虫症検査として、ヒトの検査に用いている抗原に対する抗体を検出する血清検査が極めて有用であることを見出した。しかしながら、この検査法は高感度であるが、特異性については十分な検証がなされていない。つまり、ブタは、有鉤囊虫以外にそれに近縁な細頸囊虫にも寄生されるが、それに対する抗体が有鉤囊虫抗原に対して交差反応を示すか明らかとなっていない。本研究では、交差性に関する詳細な解析を実施する。

## 【フィールド調査報告】

2015 年 9 月 17 日から 20 日にかけて、インドネシア共和国・バリ州・ギャニヤール県ならびにカラングスマスム県(図 2)で、テニア症および有鉤囊虫症の調査を、国際共同研究パートナーであるウダヤナ大学(インドネシア共和国・バリ州・デンパサール)を中心として実施した。

### 1. ギャニヤール県

ヒトの糞便の顕微鏡検査ならびに聞き取り調査を中心とした調査を Banjar Pamesan (Banjar とはバリ特有の村組



図 2 フィールド調査を実施した地域

織)で実施した。その結果、5名のテニア症疑診患者を見出しが出来た。その後、患者に対しインドネシア共和国側の医師から駆虫が施され、それぞれの患者から1虫体、合計5虫体を回収することが出来た。形態的に無鉤条虫と推察できたが、DNA検査による種同定作業を現在実施している。

## 2. カランガスム県

ヒトならびに家畜(ブタ、イヌ)を対象とした調査を実施した。また、調査フィールドとして、インドネシア共和国側研究者の事前調査(住環境、ブタの飼育形態など)の情報に基づき、新規の2村(Banjar Samuh/Pule, Banjar Ulun Desa)ならびに2013年と2014年に調査を実施した1村(Banjar Bahel)を選定した。

ヒトの糞便の顕微鏡検査ならびに聞き取り調査の結果、1名のテニア症疑診患者(Banjar Bahel)を見出しが出来た。その患者に対しインドネシア共和国側の医師から駆虫が施され、1虫体を回収することができた。形態的に有鉤条虫と推察できたが、DNA検査による種同定作業を現在実施している。

また、環境衛生状態の指標の1つである土壌媒介蠕虫(回虫、鞭虫、鉤虫)に関しては、住民の糞便から回虫虫卵および鞭虫虫卵が主に検出された。現在インドネシア共和国側の研究者による詳細な解析が実施されている。

家畜(ブタ、イヌ)に関しては、ヒト有鉤囊虫症の特異抗原を用いたELISA法により血清抗体調査を実施した。調査地では、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定し検査結果を判定することが困難であったため、目視による判定を行った。ブタ122検体ならびにイヌ14検体を検査した結果、ブタ6検体が極めて弱い陽性反応を示した。これまでの血清検査で得られた知見と照合すれば、これらの検体は有鉤囊虫症である可能性は極めて低いと考えられたが、他の寄生虫に感染している可能性を否定できないため、解剖による検査(弱陽性5検体および陰性1検体)を実施した。その結果、有鉤囊虫に感染しているブタはいなかつたが、弱陽性を示した2検体に有鉤囊虫に近縁な細頸囊虫が感染していたことが明らかとなった(図3)。有鉤囊虫非感染ブタから血清抗体の弱陽性反応が検出された原因として、細頸囊虫に対する抗体が有鉤囊虫抗原に交差反応を示した可能性、約8週間前後血清中に存在する初乳由来の移行抗体<sup>15)</sup>を検出した可能性、

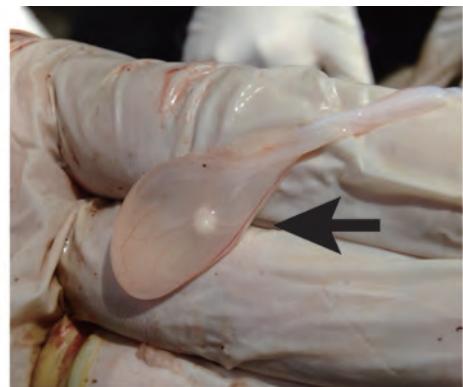


図3 剖検により見出された細頸囊虫

剖検による検査で検出不能な初期の感染を検出した可能性、過去の感染(治癒ケース)を検出した可能性などが考えられた。

## 【今後の展望】

有鉤囊虫症ならびにエキノコックス症のポイント・オブ・ケア・テストである検査キットの性能評価のために必要な検体を、日本国内で確保することは極めて困難である。したがって、今後、国際共同研究パートナーを中心とした流行地調査に、検査キットによる抗体検査を追加し、その結果と実際の罹患患者の相関を解析したいと考えている。加えて、有鉤囊虫症の感染源として重要なテニア症患者の簡便な検査法も開発し、また、家畜の血清検査に用いる抗原の特異性に関しても、有鉤囊虫ならびに細頸囊虫のブタ感染実験を実施し、感染ブタより得られる血清(標準血清)を用いて解析する予定である。

本研究の目的を達成するために必要な試料(ヒト血清や糞便、家畜血清、寄生虫)を確保するには、有鉤囊虫症やエキノコックス症流行国との国際共同研究を通じた密接な連携が必要不可欠である。今後も、日本側の技術を提供しながら共同研究を実施し、良好な関係を構築していきたいと考えている。

## 【参考文献】

- 1) Mahanty S, Garcia HH. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. Prog Neurobiol 2010; 91: 172-184.
- 2) McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. Lancet 2003; 362: 1295-1304.
- 3) Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY,

- Liu YH, Kamhawi S, Lightowers MW, Schantz PM. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. Am J Trop Med Hyg 1998 ; 59 : 291-294.
- 4) Sako Y, Itoh S, Okamoto M, Nakaya K, Ito A. Simple and reliable preparation of immunodiagnostic antigens for *Taenia solium* cysticercosis. Parasitology 2013;140: 1589-1594.
- 5) Ito A, PM Schantz, JF Wilson. Em18, a new serodiagnostic marker for differentiation of active and inactive cases of alveolar hydatid disease. Am J Trop Med Hyg 1995 ; 52 : 41-44.
- 6) Ito A, M Nakao, Sako Y. Echinococcosis: serological detection of patients and molecular identification of parasites. Future Microbiol 2007 ; 2 : 439-449.
- 7) Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Yamasaki H, Gottstein B, Lightowers MW, PM Schantz, Ito A. Alveolar echinococcosis: characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 2760-2765.
- 8) Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Sato N, Vuitton DA, Piarroux R, Lightowers MW, Craig PS, Ito A. Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 1082-1088.
- 9) Sako Y, Fukuda K, Kobayashi Y, Ito A. Development of an immunochromatographic test to detect antibodies against recombinant Em18 for diagnosis of alveolar echinococcosis. J Clin Microbiol 2009 ; 47 : 252-254.
- 10) Sako Y, Tappe D, Fukuda K, Kobayashi Y, Itoh S, Frosch M, Gruner B, Kern P, Ito A. Immunochromatographic test with recombinant Em18 antigen for the follow-up study of alveolar echinococcosis. Clin Vaccine Immunol 2011 ; 18 : 1302-1305.
- 11) Santivanez SJ, Rodriguez ML, Rodriguez S, Sako Y, Nkouawa A, Kobayashi Y, Sotomayor AL, Peralta JE, Valcarcel M, Gonzalez AE, Garcia HH, Ito A. Evaluation of a New Immunochromatographic Test Using Recombinant Antigen B8/1 for the Diagnosis of Cystic Echinococcosis. J Clin Microbiol 2015;53:3859-3863.
- 12) Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Wandra T, Swastika IK, Nakao M, Yanagida T, Nakaya K, Qiu D, Ito A. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans. J Clin Microbiol 2010 ; 48 : 3350-3352.
- 13) Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. J Clin Microbiol 2009 ; 47 : 168-174.
- 14) Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Giraudoux P, Raoul F, Nakaya K, Xiao N, Qiu J, Qiu D, Craig PS, Ito A. A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of *Taenia* tapeworms from human: Application to a field survey. Parasitol Int 2012; 61 : 723-725.
- 15) Gonzalez AE, Verastegui M, Noh JC, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, Garcia HH, Tsang VC, Gilman RH, Wilkins PP. Persistence of passively transferred antibodies in porcine *Taenia solium* cysticercosis. Cysticercosis Working Group in Peru. Vet Parasitol 1999 ; 86 : 113-118.

## 依頼稿（報告）

# 平成 26 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 長鎖ポリリン酸の鎖長解析技術および 腸溶剤化技術の開発

藤 谷 幹 浩\*

### 【研究の背景と目的】

哺乳動物の腸管には 2000 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いる。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<sup>1)</sup>。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、腸管炎症などによる様々な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を確立し<sup>2)</sup>、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。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<sup>3,4)</sup>（特許第 5526320 号）（特許第 5660508 号）。

この研究成果は、「プロバイオティクス由来の活性物質ポリリン酸を用いた新規炎症性腸疾患治療薬の開発」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 獲得および平成 27 年度内の臨床試験開始を目指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 以上のもののみが薬理作用（腸管障害改善効果）を発揮すること、胃酸などの低 pH によって分解されることを明らかにした。すなわち、この長鎖ポリリン

酸を新規薬剤として臨床応用するにあたり、鎖長解析技術、一定以上の平均鎖長を持つポリリン酸を製造する技術、胃酸に対して分解されずに腸管病変まで到達させる技術、の開発が必須である。そこで本研究では、①ポリリン酸の鎖長解析技術の確立、②一定の鎖長以上の長鎖ポリリン酸を製造する技術の確立、③腸溶化製剤の作成とその作用解析、を目的とした。

### 【方 法】

#### 1. ポリリン酸の鎖長解析技術の確立

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。解析は Toso 0008025 TSKgel GMPWXL (7.8x30cm) カラムを用いた。展開溶媒、流速、試料調整濃度が異なる条件で、HPLC による鎖長解析を行い、最適な測定条件を検討した。さらに、同時再現性や直線性についても検討した。

#### 2. 長鎖ポリリン酸の製造方法（ラージスケール）の検討

酵素法による長鎖ポリリン酸の製造方法について検討した（図 1）。ヒトへの臨床応用を視野に入れ、反応系に用いるものは全て非動物由来のものとした。また、非動物由来のポリリン酸合成酵素およびビルビン酸キナーゼは独自の合成系で作製した。

#### 3. 腸溶化長鎖ポリリン酸の作用解析

ゼラチンカプセルに長鎖ポリリン酸を封入し腸溶コーティングを行うことで長鎖ポリリン酸の腸溶化剤を作成した。ラット DSS 腸炎モデルに経口投与し、腸管

\*旭川医科大学 消化器・血液腫瘍制御内科学

改善作用を検討した。腸炎モデルは 6 週齢ラットに 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作成した。初日から 7 日間連日腸溶化ポリリン酸を強制投与し 7 日目に大腸を切除し、ホルマリン固定および蛋白、RNA の回収を行った。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、ホルマリン固定した大腸切片はヘマトキシリンエオジン (Hematoxylin-Eosin ; HE) 染色を行った。

## 【結 果】

### 1. ポリリン酸の鎖長解析技術の確立

Toso 0008025 TSKgel GMPWXL (7.8x30cm) カラムを用いて、種々の展開溶媒、流速、試料調整濃度にて鎖長解析を行った結果、以下のような最適条件が明らかになった。

カラム： Toso 0008025 TSKgel GMPWXL (7.8x

30cm)

展開溶媒： 10mM Acetate buffer pH6.0-0.5M NaCl

流速： 500 μl/min

検出： 260nm

試料調整： 20mg/ml (H<sub>2</sub>O) を 10 μl

同一サンプルによる同時再現性は極めて良好であった（表 1）。また、各濃度における測定の結果、R<sup>2</sup> = 0.9989 と極めて高い直線性を示し（図 2）、本条件がポリリン酸の鎖長測定に適していることが示された。

### 2. 長鎖ポリリン酸の製造方法（ラージスケール）の検討

酵素法による長鎖ポリリン酸製造プロトコールを検討した。反応系に用いられるポリリン酸キナーゼ、ピルビン酸キナーゼは独自の方法で製造を行った。また、材料としてアデノシン二リン酸、ホスホエノールピルビン酸 1 カリウム塩を用いた。いずれも非動物由来のものを用いた。反応は 50L タンクで行い、隨時攪



#### 【ポリリン酸合成反応工程】反応液200mlのケース

1. バッファーにホスホエノールピルビン酸1カリウム塩(Alfa Aesar社)を添加溶解する。
2. ATP2ナトリウム(オリエンタル酵母社)を添加溶解する。
3. リン酸バッファー、塩化マグネシウムを添加する。
4. 酢酸バッファーを添加する。
5. 精製水で200mlに調整する。
6. 溶液にPPK溶液\*、PK溶液\*\*を添加しスターーラーで攪拌する。
7. 40°Cで16時間加温反応させる(攪拌なし)。

\*PPK溶液 (組み替え菌を用いて独自の製造方法を確立した。)

\*\*PK溶液 (組み替え菌を用いた独自の製造方法を確立した。)

図 1 酵素伸長反応による長鎖ポリリン酸の精製方法の概要

表 1 同時再現性の検討結果（同一サンプルによる UV 値）

測定回数	UV 値
1	781319
2	785364
3	773401
4	791020
5	779530
Average	782126.8
SD	6578.449
CV(%)	0.8411

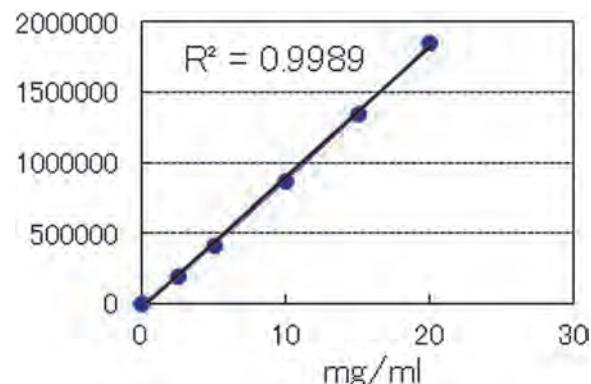


図 2 長鎖ポリリン酸の鎖長解析技術による直線性の検討

拌と氷冷を繰り返した。反応時間は 17 ~ 18 時間とした。その後、NaCl と中空糸型 UF 膜を用いて精製し、長鎖ポリリン酸を得た。3 ロット試作し HPLC で解析した結果、いずれも十分な鎖長で、同様の波形を示しており、再現性の高い製造方法であると考えられた(図 3)。

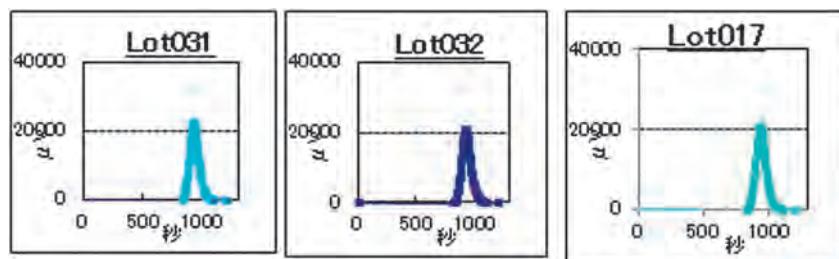


図 3 長鎖ポリリン酸のロット毎の鎖長分析結果

ポリリン酸 10mg/ml(精製水)溶液を調製、37°Cで人工胃液混和。

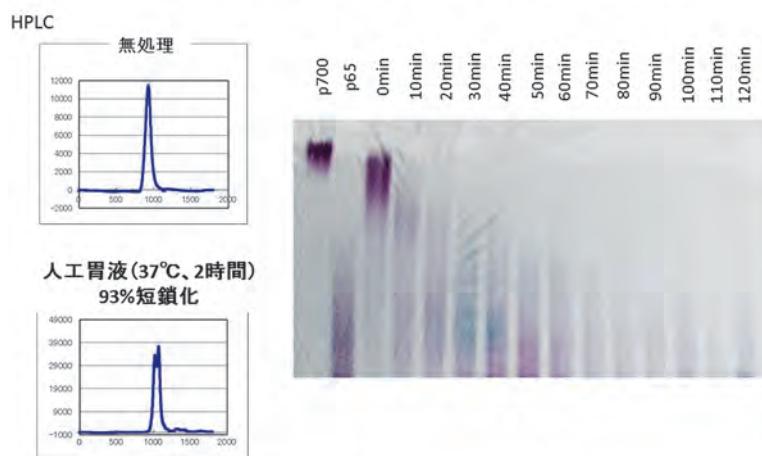


図 4 人口胃液によるポリリン酸の短鎖化

### 一腸管長一

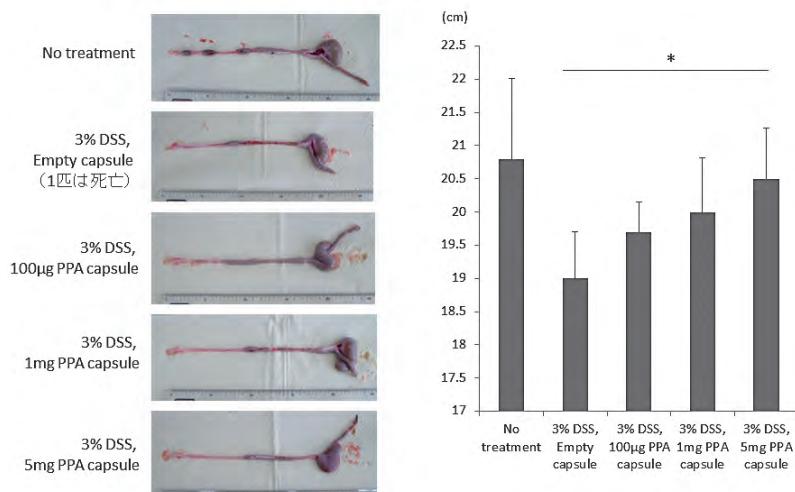


図 5 腸溶化長鎖ポリリン酸の経口投与による腸管長の変化(ラット DSS 腸炎モデル)

### 3. 腸溶化長鎖ポリリン酸の作用解析

長鎖ポリリン酸を人口胃液(塩化ナトリウム 2.0g + 塩酸 7.0ml + H<sub>2</sub>O 1000ml)に加え、HPLC および電気泳動にて鎖長解析を行った結果、短時間で短鎖化することが明らかになった(図 4)。そこで【方法】で述べたように腸溶化長鎖ポリリン酸を作製し、ラット腸炎

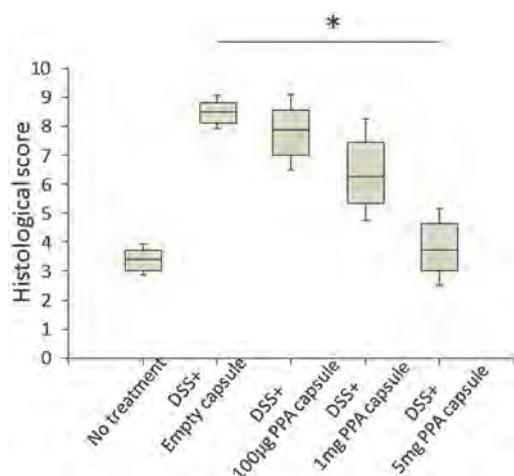


図 6 腸溶化長鎖ポリリン酸の経口投与による組織学的炎症所見の変化（ラット DSS 腸炎モデル）

モデルに 7 日間経口投与を行った。その結果、腸管長の短縮（図 5）および組織学的炎症所見（図 6）は濃度依存性に改善した。また、腸管組織中の炎症性サイトカイン（TNF  $\beta$ 、IL-1 $\beta$ ）の過剰発現も濃度依存性に低下した（図 7）。一方、腸溶化していない長鎖ポリリン酸を経口投与しても組織学的改善は得られなかった（図 8）。以上から、長鎖ポリリン酸の腸溶化経口剤はラット腸炎モデルの改善に有用であった（特許申請準備中）。

### 【考 察】

本研究によって、長鎖ポリリン酸の評価系が構築され、ラージスケールでの製造法が確立した。また、腸溶コーティングを用いて製造した腸溶化長鎖ポリリン

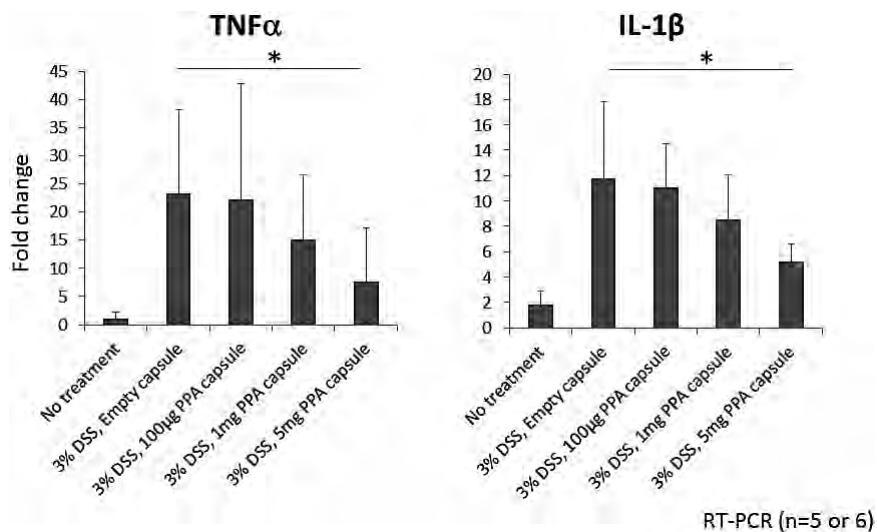


図 7 腸溶化長鎖ポリリン酸の経口投与による炎症性サイトカインの発現変化（ラット DSS 腸炎モデル）

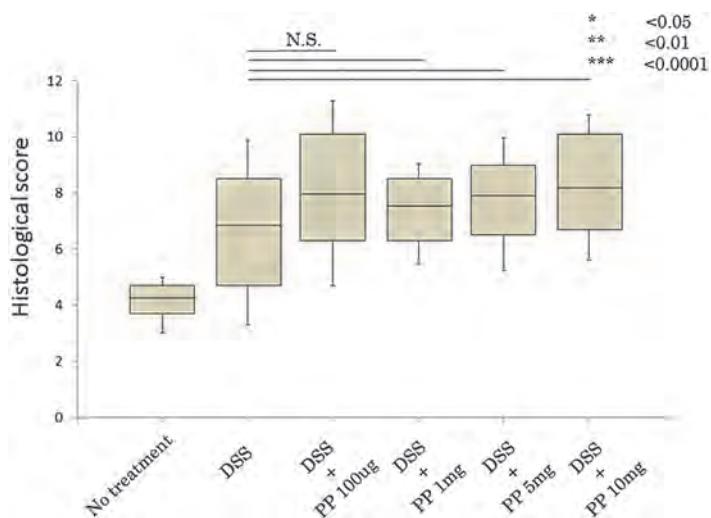


図 8 長鎖ポリリン酸（原薬）の経口投与による組織学的炎症所見の変化（ラット DSS 腸炎モデル）

酸の経口投与はラット腸炎モデルの腸管障害を有意に改善した。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いて大きなハードルであった原薬の製造や評価方法の確立、腸溶化経口剤の有効性検証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ない。活動期には炎症性サイトカインである TNF $\beta$ 、IL-1 $\beta$  の増加が認められ、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<sup>5)</sup>。本研究に用いたラット腸炎モデルでもこれらのサイトカインが過剰発現しており、炎症性腸疾患のよいモデルであることが示唆される。このモデルに対し腸溶化長鎖ポリリン酸の経口投与が腸管短縮や炎症性サイトカインの発現を強く抑制することが証明できた。よって腸溶化長鎖ポリリン酸は、炎症性腸疾患治療における新規の経口剤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、長鎖ポリリン酸の安定性、催腫瘍作用、体内動態についても検討を行っており、現在、信頼性基準での前臨床試験を行っている。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、出荷と保存の体制もほぼ構築で

きている。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) Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014 ; 14 : 329-42.

## 依頼稿（報告）

# 旭川医科大学におけるアートインホスピタルの試み

服 部 ユカリ\* 菊 地 まり子\* 上 田 順 子\*\*  
守 屋 潔\*\*\* 大 坪 智 美\*\*\*\*

病院環境にアートを取り入れる「アートインホスピタル」は、UNESCO プロジェクト・世界10年『Arts in Hospital』をきっかけとして、1990年代頃からスウェーデンなどヨーロッパやアメリカを中心に世界中に広がっている。日本では、1995年に亀田総合病院がそのコンセプトを取り入れた病院設計<sup>1)</sup>で注目された。また、銅版画家の山本容子氏が、殺風景な病室での父親の看取りをきっかけに、病院の天井に絵を描く試みを2005年に中部ろうさい病院で始め、その後も和歌山県立医科大学付属病院母子医療センターや高松赤十字病院の壁画などを描き、患者さんが自分の病室に掛ける絵を選ぶ「テイクアート」のための作品提供などの活動も行っている。その他にも、東京都済生会中央病院での「環境面でのホスピタリティを高めるために」病院所蔵の芸術作品を展示するプロジェクトや、西脇市立西脇病院での写真展の企画、筑波大学のプロジェクトなど多くの病院や機関がアートを病院の中に取り入れている<sup>2)</sup>。

また、病院環境にアートを取り入れるだけでなく、医療に積極的にアートを介在させて癒しや安らぎをもたらし、自然治癒力・回復力を高める活動も、欧米を中心に世界各地で行われている。日本でも、アートインホスピタルの理念に基づいた阪南病院の庭園療法<sup>3)</sup>や、神戸の震災被災者をきっかけとした北村らのフィーリングアーツ活動<sup>4)</sup>、森林療法と同様の体験を病院の屋上庭園で試みたもの<sup>5)</sup>などアートを介在させた様々な療法がある。

アートがもたらす効果に関する研究も進んでおり、不安・ストレスを軽減し、うつ状態を緩和させる、鎮

痛剤などの薬物の投与量を減少させる、入院期間を短縮する、患者と医療者のコミュニケーションを促進するなどの報告が多くある。

日本でも、ニューヨーク近代美術館が開発したアート鑑賞プログラムが高齢者の鬱状態の改善や認知症患者の記憶の再生に効果があるという報告がある。

本学の大学病院でも、2階から3階へのエスカレーター横の壁に楽しい絵が描かれており、食堂へ続く廊下にも同じ作者による絵が飾られている。私たちは、これらの取り組みを参考に、高齢者や患者にアートに触れてもらうことにより、楽しい時間を過ごしポジティブな感情体験をする機会を提供したいと考え、写真家が自らの芸術的風景写真を語りと共にスライドショーで示す試みを行った。提示される写真は、単に風景を撮影したのもではなく、国内外の写真展への出品や個展開催の実績があり、写真集も出版しているプロフェッショナルの写真家が撮影したアートであることが重要である。協力していただいたのは、アートインホスピタルに関心が深い、美瑛在住の写真家中西敏貴氏である。中西氏は、NPO法人「北海道を発信する写真家ネットワーク」会員「JNP日本風景写真協会」会員でフォトオフィス「アトリエ nipek」カフェ&ギャラリーを主宰し、各種メディアへの作品提供や執筆活動のかたわら、個人・団体の撮影講師としても活動中である<sup>6)</sup>。中西氏には、平成25年度・26年度に筆者らが旭川市と共同開催した介護予防教室「脳と体のはつらつ教室」<sup>7)</sup>で「写真を楽しむ暮らし」というテーマで、日常の風景を写真で撮ることの楽しさと撮影方法について自身の作品の紹介も交えて講義をしていただいていた。



図 1 「脳と体のいきいき教室」での様子

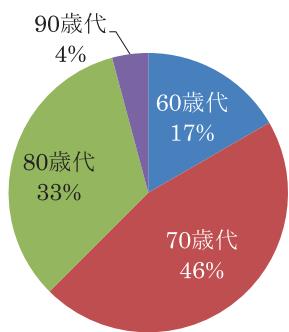


図 2 「脳と体のいきいき教室」での参加者の年齢構成

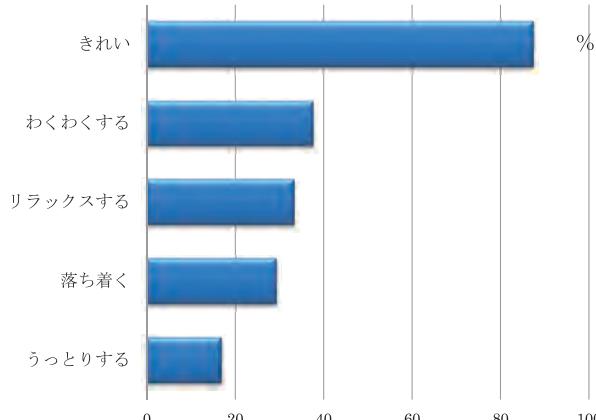


図 3 「脳と体のいきいき教室」での参加者の印象

今回は、平成 27 年 8 月 5 日に、筆者らが担当している本学主催の認知機能向上教室「脳と体のいきいき教室」の中で中西氏に、自身の作品を語りと共にスライドショーで約 40 分紹介してもらった（図 1）。参加者は熱心に鑑賞しており、ユーモアを交えた語りを聞き、時折笑い声も漏れ、終了後はいくつかの質問も出るなど、満足している様子がうかがえた。参加者は 24 人で、年齢は 60 歳代から 90 歳代であり、70 歳代・80 歳代が 8 割であった（図 2）。印象を複数回答の選択肢で尋ねたところ、「きれい」 21 人（87.5%）、「わくわくする」 9 人（16.7%）、「リラックスする」 8 人

入院されている方、通院されている方  
ひととき日常を離れて“アート”に  
ふれてみませんか？

## 写真家 中西敏貴 光の風景

美瑛在住の中西敏貴氏が、風景を光でとらえた  
自身の作品を TV 画面に映し紹介します

日時：H.27年11月26日(木)

14:30～15:10

場所：旭川医大病院2階

多目的室(中央採血室前の待合室横)

中西敏貴プロフィール  
フレーベルアート会員、カエモキヤリーチ主宰、各種メディアへの作品提供や執筆活動など  
を始め、個人・団体の撮影撮像とともに、活动中、AV法人として講演や発表する等多忙トキワーフ由由  
主な個展・展示会  
2013.12 東京文化キャラリーにて個展「WAKAMONO」  
2014.2 First Contact in Shanghai 展にて参加上場。  
2014.5 企画展「人のなし」HOKKAIDO 2014  
[ホームページ] [www.wakamono.com](http://www.wakamono.com)

主催：旭川医科大学病院 (問い合わせ先：旭川医科大学理事企画課営業課携帯(0168-69-3006))

図 4 「写真家中西敏貴光の風景」ポスター



図 5 「写真家中西敏貴光の風景」の様子

（33.3%）、「落ち着く」 7 人（29.2%）、「うつとりする」 4 人（16.7%）とすべて肯定的印象であり（図 3）、「イライラする」「不安になる」などのネガティブな印象は選択されなかった。

また、11 月 26 日に旭川医科大学病院主催で「入院されている方、通院されている方ひととき日常を離れて“アート”にふれてみませんか？」（図 4）と呼びかけ、中西氏自身の語りで風景写真作品をスライドショーで紹介する「写真家中西敏貴光の風景」と題した催しが開催された（図 5）。参加者は、入院患者さんなど 20 名前後で、中には持続点滴中の方、酸素吸入中の方、車椅子使用の方や、病棟の看護師が付き添って来てくださった方もあった。参加者の中からは、「それはどこですか？」と撮影場所を尋ねる質問や、「きれいだねー」という声があがるなど、和やかな雰囲気であった。アンケートに協力していただいた 13 名は、男性 3 人（23.1%）、女性 10 人（76.9%）で、年齢は 20 歳代から 80 歳代であった（図 6）。内容について「期

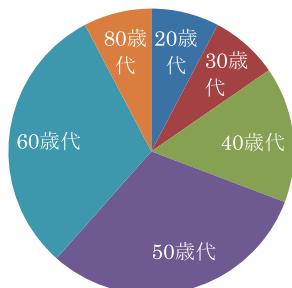


図6 「写真家中西敏貴 光の風景」回答者の年齢構成

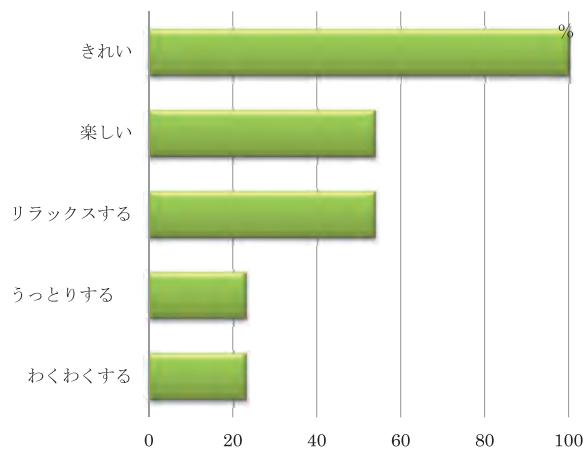


図7 「写真家中西敏貴 光の風景」の印象

待以上だった」10名（76.9%）、「期待どおりだった」3名（23.1%）と高い評価であり、今後もこのような催しがあれば見たいかとの問には、無回答1名を除く12名全員が「再度見たい」と答えた。印象について複数回答の選択肢で尋ねたところ、「きれい」13人（100%）、「リラックスする」と「楽しい」が共に7人（53.8%）、「うつとりする」と「わくわくする」が共に3人（23.1%）とすべて肯定的印象であり（図7）、「イライラする」「不安になる」などのネガティブな印象は全く選択されなかった。

持続点滴・酸素吸入を受けて車椅子で参加されていた高齢の患者さんが、ダイヤモンドダストが虹色に写っている1コマを見て、それまでややけだるそうな気配だったのに突然、「これは何？花？」と尋ねられた。ダイヤモンドダストだと知ると、「きれいだねー、こんなのは初めて見た。」と大きく目を開けてはっきりと言われたのが非常に印象的であった。

入院中の患者や家族は、痛み、悲しみ、不安、心配、苦しみを感じることが多く、また不自由さや不便さを日々体験している。そのような日常でたとえひとときでも、美しいものを見て、楽しい、わくわくするなど

ポジティブな気持ちになる機会があることは、少しでも患者さんに力をもたらすことになると思われる。

また、このような機会は、緊張が高く責任感が重く多忙な仕事をしている病院職員にも癒しと活力をもたらすといわれている。平成28年2月には、大学病院の看護部主催で看護師長研修「看護マネジメントリフレクション～今、あらためて光の風景から看護の本質を探る」として中西さんの講演とグループワークが、行われた。写真家と看護職と分野は異なってもプロフェッショナルとしての仕事の共通点があることや新たな物事のとらえ方の発見など多くの成果が得られた。今後も本学で多くの賛同者を得て、アートインホスピタルの活動が発展することを望みたい。

### 【引用文献】

- 1) 亀田総合病院：アートインホスピタルのメリットは何ですか？  
<http://www.kameda-nurse.jp/faq/index.html>
- 2) こいし歯科：アートインホスピタルとは？  
[http://www.834814.com/13\\_info\\_clinic/](http://www.834814.com/13_info_clinic/)
- 3) 医療法人社団杏和会 阪南病院 地域医療連携室 & 総務課広報「光・風・緑」チーム（編）：泉ヶ丘グリーンフェスタ2013、光風緑（2013年3月）、2013.  
<http://www.hannnan.or.jp>
- 4) 北村義博、吉岡隆之：フィーリングアーツとナラティブ、日本保健医療行動科学学会、22、77-91、2007.
- 5) 松永慶子、朴範鎮、宮崎良文：病院屋上森林が要介護女性患者に及ぼす主観的リラックス効果－簡易感情尺度を用いて－、日衛誌、66、657-662、2011.
- 6) 中西敏貴HP：<http://www.nipek.net/index.html>
- 7) 作並亜紀子、服部ユカリ：認知機能向上教室の効果に関する研究、日本老年看護学会第18回学術集会、2015、横浜

## 依頼稿（報告）

# 旭川医科大学教育研究推進センター動物実験技術支援部門と 熊本大学 CARD との連携した生殖工学技術研修の報告

清水範彦\*

動物実験技術支援部門では、マウス・ラットを中心とした生殖工学技術支援を精力的に行っている。近年では多くの貴重な遺伝子改変動物が研究に利用されており、これらの入手は往々にして手続に手間がかかり高額であることから、多くの利用者は一度入手すれば手元で維持しておきたいところである。しかし動物個体での維持は、飼育管理の手間や経費の負担・病原性微生物感染など多くの問題を抱えている。さらに動物個体での施設間移動には逃亡・死亡の危険性だけでなく、国外への移動では検疫の問題も生じる。そこで生殖工学技術を用いて、動物個体から卵子・精子または体外受精で胚の状態にして凍結保存することで、飼育管理の負担を軽減、感染動物をクリーン化することができる。また、凍結保存した胚などは必要な時に個体

復元を行い、実験用コロニーを回復することができる。移動時においては逃走・死亡などの問題を回避するため、動物個体ではなく胚・精子の状態での輸送が増加傾向にある。このように、生殖工学技術は動物実験を支援するうえで必要不可欠なものとなりつつあり、多くの動物実験を行う施設が生殖工学技術を導入している。

ここで問題となるのは各施設の技術を統一する必要性である。胚や精子でのやり取りが行われる場合、各施設が同等の技術を持って対応できなければ、個体復元を行うことができない。そこで我々は熊本大学生命資源研究・支援センター（CARD）と連携して、全国の研究者・技術者を対象に生殖工学技術研修 in 旭川を2007年より毎年開催し、CARDが推奨する技術の普

研修1日目	新鮮精子と凍結・融解未受精卵子の体外受精
	新鮮精子と新鮮卵子の体外受精
	キャピラリー作成と胚操作の練習
	精子の凍結保存
研修2日目	凍結精子の体外受精
	Jackson法凍結精子を用いた体外受精
	CARD超過剰排卵誘発法
	精巣上体尾部の冷蔵保存
	胚の冷蔵保存
研修3日目	胚の凍結・融解
	卵管内胚移植
	精管結紮雄の作製

## 1 生殖工学技術研修 in 旭川（2015年）研修内容

\*旭川医科大学 教育研究推進センター技術支援部

及を行っている。CARDは日本の代表的な生殖工学技術を有する組織で、日本各地だけでなく世界各国で技術研修を行っている。当研修では、体外受精・凍結保存・胚移植による個体復元など基本的な生殖工学技術の習得に加えて、精巣上体尾部の冷蔵保存や、超過剩排卵誘発法など最新技術の紹介も行う。ここに、本年

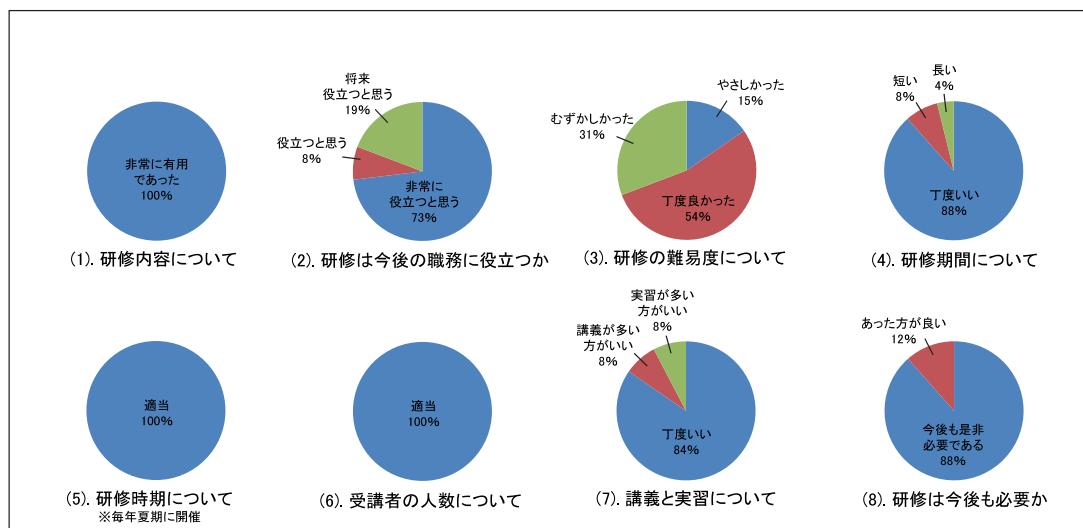
度の研修内容とこれまでの参加人数、参加者へのアンケート結果を報告する。

### 謝辞

当研修開催にあたりご協力いただいた生物学教室の関係者の皆さんに、この場を借りて深謝いたします。

所属	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
大学	4	6	6	10	3	5	4	7	7
企業	5	3	1	2	4	2	4	2	1
研究所	1	2	3	0	0	1	0	1	1
合計	10	11	10	12	7	8	8	10	9

2 生殖工学技術研修 in 旭川 (2007 ~ 2015 年) 参加人数



3 生殖工学技術研修 in 旭川 アンケート結果 (2013 ~ 2015 年 回答者 26 名)



4 研修風景

## 依頼稿（報告）

**2015 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、独立行政法人国際協力機構（JICA）のJICA北海道（札幌）と旭川医科大学が2008年度（平成20年度）から継続して行っている地域別研修事業である。本学では看護学科と健康科学講座の教員がコースリーダーを担当しており、昨年度までの7年間

で16ヶ国79名の研修生を受け入れてきた（表1）。研修参加を第1期から第3期まで期間別に分けて地図に示した（図1）。ナイジェリア、リベリアおよび南アフリカは第1期のみ、モロッコ、ジンバブエおよびレソトは第2期のみの参加である。シエラレオネとウガンダは第1と第3期に参加し、マラウイは2期から参加し3期も毎回参加している。ガーナ、エチオピア、ケニアおよびタンザニアは第1期から継続して参加して

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 地域	国名	第1期			第2期			第3期		計
		2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	
北アフリカ	スー ダン							2	2	4
	モロッコ				1	1				2
西アフリカ	ガーナ	3	2	2	3	2	2	3	1	18
	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		2
	エチオピア		1	2	2	2			1	10
	エリトリア							1		1
	ケニア		2	1		1	1	2	1	8
	ザンビア								1	1
	ソマリア								1	1
	タンザニア		1	1	3	2	2	2	1	12
	マラウイ				1	3	2	1	2	9
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	11	90
受入れ国数		4	6	8	5	8	8	8	9	18

\*旭川医科大学 \*看護学講座 \*\*健康科学講座 \*\*\*名誉教授

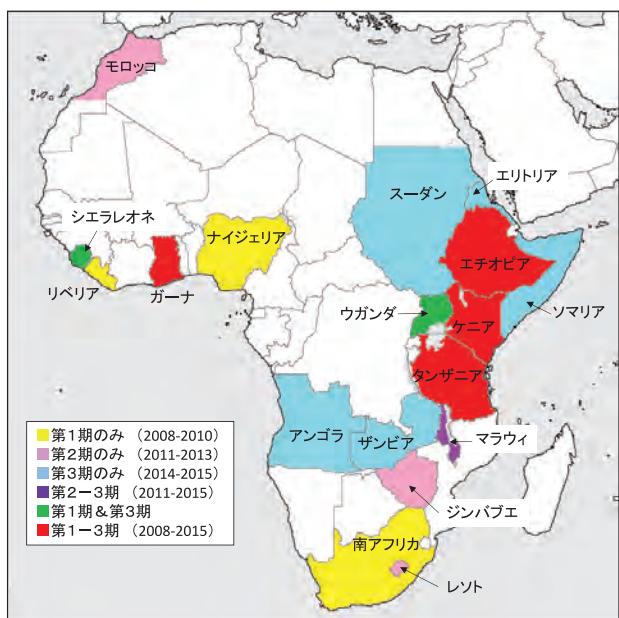


図1 第1期から第3期まで各期別にみた研修参加国

おり、特にガーナは第1回からすべての研修に参加している。このほかスー丹、エリトリア、ソマリア、アンゴラおおびザンビアは第3期以降の参加国である。

本年度の研修は、平成27年6月24日から8月7日の期間で行われたが、このうち本学が関わる技術研修は6月29日から8月6日までの39日間であった。研修員の出身国と人数は9か国11名で、内訳はエチオピア、ガーナ、ケニア、ソマリア、タンザニア、ザンビアおよびウガンダが1名ずつで、スー丹およびマラウィからは各2名の参加であった。研修員のうち女性はスー丹とザンビアの2名であった。研修員の職種は、11名のうち10名が医療職者（うち医師は9名）と保健行政サービス担当者である。

## II. 本年度の研修カリキュラムと研修結果の概要

研修カリキュラムは2008年の開始以来、研修員からの意見を参考に毎年改善を加えてきた。また、2014年度に英文コース名を変更して2年目となるが、基本的には第1期の方針をほぼ踏襲している。研修は、旭川医科大学及び北海道JICAセンターでの講義・演習と各現場を訪れての見学からなる研修を織交ぜることで理解の促進を図っている。こうした編成に対して研修員からは、「この研修は実践的で、レジャー（現場見学や学校訪問、健康増進運動の体験などを指すのかと思われる）と仕事（PCMなど演習や座学を指す

ものか）が双方織り込まれており、エビデンスベースの事例を用いて学ぶことができた。」とのコメントが寄せられるなど、座学と演習・見学実習といった、静・動が組合された研修プログラムは、全体的に高く評価され、好感をもって受け入れられてきた。一方で各研修員からコースの内容・期間をより充実させてほしい旨の要望が多かったことから2010年度以降、研修期間を1週間延長し、より多くの知識と現場での実務見学を充実するべく本研修カリキュラムを改善してきた。

本年度の研修スケジュールを表2に示す。研修は、最初にコースリーダーが概論の講義を行う。これは研修の中核となる「地域保健行政」、すなわち国民の健康に係る行政システムがアフリカと日本では大きく異なるため、はじめに日本の保健医療行政（中央—地方行政組織、包括的医療の提供サービス、健康保険・医療提供システムなど）の特徴を理解しておくことがその後の無用な混乱を避け、研修員の自国における地域保健医療行政に役立つ知識や技術の習得に必須であることによる。

「地域保健行政」は、保健所長による地域保健法に基づく地方保健行政の役割分担に関する講義と、北海道保健福祉部、地域保健行政の指導的役割を果たす道立保健所（上川保健所）および住民への保健サービス提供の場となる市町村保健センター（枝幸町、美瑛町）を訪問し、それぞれの地域保健医療行政の役割とそこで働く行政職や各種専門職の役割を系統立てて学ぶ機会とした。美瑛町では町立病院と地域の老人保健施設との連携活動を見学した。枝幸町において事務職の保健福祉課長より財政の仕組み、予算編成、町の保健師により地域の現状にあわせたより実践的な活動について学んだ。また、住民の健康づくり事業として遠隔システムを用いた健康運動指導について、札幌の発信元スタジオおよび受信側の枝幸町での住民の運動実践の双方の現場を見学することで繋がりを実体験することができた。

次いで「母子保健」、「精神保健」、「社会福祉」の講義を行い、保健福祉センター、介護施設の現場を訪問した。

「日本の医療提供体制」（病院・診療所等の治療を中心とする狭義の医療機関）についての講義・見学を実施した。「病院管理」領域について、アフリカでも展開中の医療現場での5S活動に基づく病院管理法、旭川医

表2 2015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	単元	研修担当者	場所
6月23日(火)	研修員来日、札幌移動	JICA札幌	* 札幌宿泊	
6月24日(水)	ブリーフィング、ガイダンス、健康診断、日本語研修	JICA札幌	JICA札幌センター	
6月25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)	JICA札幌	JICA札幌センター	
6月26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	JICA札幌	JICA札幌センター	
6月27日(土)	フリー		JICA札幌センター	
6月28日(日)	PM 札幌から旭川へ移動(バス)		* 旭川宿泊	
6月29日(月)	11:00~12:30 開講式 13:00~13:15 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) 13:15~16:20 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 16:30~ 万歩計配付、体組成測定 記録 17:30~ ウエルカムパーティ	JICA札幌 吉田貴彦・藤井智子 司会:JICA札幌 藤井智子・伊藤俊弘 伊藤俊弘・藤井智子	AMU大会議室 AMU大会議室 AMU臨床第1講堂 AMU6F実習室 AMU6F実習室	
6月30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 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 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 13:30~14:30 講義 日本の保健医療提供体制全般に対する質疑 地域保健活動に役立つ健康・保健データの活用 14:30~16:30 講義・演習 地域保健活動における保健データの解析手法	コーディネート 吉田 ① 吉田貴彦 教授 ① 中尾 稔 准教授 ③ 迫 康仁 教授 ② 伊藤俊弘 教授	小会議室 小会議室 小会議室	
7月1日(水)	感染性疾患の蔓延防止の対策を学ぶ 9:30~11:00 講義 感染症対策の基本 “Standard Precaution” 11:00~12:30 講義 感染症の基礎知識(寄生虫感染症対策) 13:30~15:00 講義 脳囊虫症・エキノコックス症 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 15:00~16:30 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)	コーディネート 吉田 ① 吉田逸朗 先生 ① 中尾 稔 准教授 ③ 迫 康仁 教授 ② 成田昭夫 病院経営企画課長	小会議室 小会議室 小会議室	
7月2日(木)	公衆衛生の第一線機関としての保健所の役割を学ぶ 9:30~11:00 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) 研修員相互の情報交換・討論 11:00~12:30 ディスカッションアワー 1 Immunization 公衆衛生の第一線機関としての保健所の役割を学ぶ 14:00~15:00 講義 保健所を中心とした地域の感染症対策 15:00~16:00 見学 上川保健所の見学 (主に健診機器・検査業務)	コーディネート 吉田 ② 杉澤孝久 旭川市保健所長 コーディネート 吉田 ⑤ コーディネート 吉田 ② 岡崎弘行 上川保健所長 ② 上川保健所	小会議室 小会議室 タクシー移動 上川保健所	
7月3日(金)	グローバルな視点から結核対策を学ぶ 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 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 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	コーディネート 吉田 ① 大角晃弘 先生 コーディネート 吉田・伊藤 黒崎明子副看護部長、辻崎ゆり子副看護部長、平瀬美恵子看護師長	小会議室	旭川大学病院 (集合場所:3階輸血部CR)
7月4日(土)	フリー			
7月5日(日)	フリー			
7月6日(月)	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。 9:30~12:30 講義・演習 PCMの手法① Overview / Stakeholder analysis 13:30~16:30 講義・演習 PCMの手法② Problem Analysis / Objective Analysis(part1) 国際保健に興味を持つ学生との交流(希望者があれば)	コーディネート 吉田 ④ 半田祐二朗 先生 ④ 半田祐二朗 先生	小会議室	
7月7日(火)	9:30~12:30 講義・演習 PCMの手法③ Objective Analysis (part 2) / Alternative Analysis 13:30~16:30 講義・演習 PCMの手法④ Objective Analysis (part 2) / Alternative Analysis	④ 半田祐二朗 先生 ④ 半田祐二朗 先生	小会議室	
7月8日(水)	日本の母子保健、小児保健の概要を学ぶ 9:30~11:00 講義 日本の母性看護の歴史と現状 11:00~12:30 講義 日本の児童看護の歴史と現状 日本における学校保健活動について現場で学ぶ 13:30~15:00 講義 学校保健 養護教諭の役割 15:30~ 旭川から札幌へ移動(バス)	コーディネート 藤井 ① 伊藤幸子 教授 ① 岡田洋子 教授 コーディネート 藤井 ① 渋谷和子 先生	小会議室 小会議室 小会議室 * 札幌宿泊	

月 日	研修内容		
7月9日(木)	<p>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）</p> <p>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～</p> <p>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～遠隔ICTを活用した保健指導</p> <p>12:45~13:30 見学 北海道におけるICTを活用した保健指導・運動指導 移動(大通り～JICA研修所)</p> <p>日本の社会福祉の概要について学ぶ</p> <p>15:00~16:00 講義 日本の社会福祉・介護保険制度①</p> <p>16:00~17:00 講義 日本の社会福祉・介護保険制度②</p>	<p>コーディネート 北村 北海道厅保健福祉部健康安全局地域保健課 立花八寿子主任 ③ ③ ③ ③ ③ ③ ① ①</p> <p>コーディネート 吉田 NPOスタッフ コーディネート 吉田・北村 永井順子 准教授 中村和彦 教授</p>	<p>道庁エントランス 9:15集合 北海道庁 北海道庁 NPO健康保養ネットワーク 札幌事務所 JICA札幌センター JICA札幌センター</p>
7月10日(金)	<p>9:30~11:00 講義 日本のハンセン病対策の変遷と人権侵害 Non-cominicable diseasesについて概観する</p> <p>11:00~12:30 講義 1型糖尿病の基礎知識 移動(バス、JICA札幌センター～結核予防会)</p> <p>日本の健康診断事業について学ぶ 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)</p> <p>14:00~16:00 見学 健診センター内の見学、健診車の見学</p>	<p>① ① ① ① ②</p> <p>北海道はまなすの里 平中忠信代表 コーディネート 北村 国際糖尿病支援基金 堀本綾織 先生 コーディネート 北村 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</p>	<p>JICA札幌センター JICA札幌センター JICA札幌センター 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</p>
7月11日(土)	フリー		
7月12日(日)	フリー		
7月13日(月)	<p>日本の精神保健について概観する</p> <p>9:30~11:00 講義 日本の精神保健の現状と課題 日本の疾病構造の変革、Non-cominicable diseasesについて概観する</p> <p>11:00~12:30 講義 日本の死因の変遷とNCD対策 地域における介護サービスについて学ぶ</p> <p>13:30~15:00 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 研修員相互の情報交換・討論</p> <p>15:00~16:30 ディスカッションアワー 2 Improved ART Care According Recent Guideline</p>	<p>① ① ② ⑤</p> <p>コーディネート 伊藤 長谷川博亮 教授 コーディネート 伊藤 西條泰明 教授 コーディネート 伊藤 ケアプラン相談所 中川雅子代表</p>	<p>小会議室 小会議室 小会議室 小会議室</p>
7月14日(火)	<p>日本における学校保健活動について現場で学ぶ</p> <p>9:00~11:00 見学 東光中学校 施設見学、生徒の授業など見学、保健室の見学</p> <p>11:30~16:30 見学 北海道教育大学附属旭川小学校 児童と教室で給食、施設見学、学童の授業・活動など見学</p>	<p>② ②</p> <p>コーディネート 塩川・吉田 中村校長、村田教頭 荒川副校長</p>	<p>東光中学校 タクシー移動 教育大学付属小学校</p>
7月15日(水)	<p>日本における公衆衛生看護の歴史・時代背景・役割を学ぶ</p> <p>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</p>	<p>① ① ③</p> <p>コーディネート 北村 北村久美子 教授 加藤 正子 元開拓保健師(元道保健師) 北村久美子教授</p>	<p>小会議室 小会議室</p>
7月16日(木)	<p>医師の人材育成について学ぶ</p> <p>9:30~11:00 講義 日本の医学教育と医師の需給バランスの問題 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</p> <p>11:00~12:30 講義・演習 PCMの手法④ Formulation of Project Design Matrix (Outline) / summary</p> <p>13:30~16:30 講義・演習 PCMの手法④ Formulation of Project Design Matrix (Outline) / summary</p>	<p>③ ④ ④</p> <p>コーディネート 吉田 井上裕靖 講師 コーディネート 吉田 半田祐二朗 先生 半田祐二朗 先生</p>	<p>小会議室 小会議室</p>
7月17日(金)	<p>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</p> <p>9:30~11:00 講義・演習 PCMの手法④ Formulation of Project Design Matrix (Outline) / summary</p> <p>11:00~12:30 講義・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</p> <p>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実例紹介 16:30～ 道北フィールドツアーガイダンス</p>	<p>④ ④ ④ ① ③</p> <p>コーディネート 吉田 半田祐二朗 先生 半田祐二朗 先生 コーディネート 吉田 半田祐二朗 先生 半田祐二朗 先生</p>	<p>小会議室 小会議室</p>
7月18日(土)	PM ホームパーティ		
7月19日(日)	フリー		
7月20日(月)	フリー		

月 日	研修内容		
7月21日(火)	<p>地域の結核治療について専門施設の場で学ぶ</p> <p>9:30~10:15 講義 旭川医療センター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</p> <p>10:15~11:15 見学 旭川医療センターにおける結核医療の現状視察</p> <p>北海道北部における地域保健・医療の実際について学ぶ</p> <p>講義 地域センター病院の役割(到着は13:00頃になるかと思います)</p> <p>講義 ITネットワークによる連携と支援</p> <p>14:30~16:00 見学 地域センター病院である名寄市立総合病院の視察 名寄から枝幸に移動(バス)</p>	<p>③ コーディネート 藤井 旭川医療センター 藤兼俊明 副院長、山崎泰宏 内科医長 コーディネート 藤井・伊藤・塙川・吉田</p> <p>③ 和泉裕一 院長 酒井博司 副院長</p>	<p>旭川医療センター</p> <p>名寄市立総合病院</p> <p>* 枝幸宿泊</p>
7月22日(水)	<p>9:00~11:30 講義 枝幸町の母子保健管理体制</p> <p>13:00~14:00 見学 ICTを活用した地域における住民の健康作り支援</p> <p>14:00~16:00 講義 枝幸町の保健福祉行政、財政のしくみ・予算編成等</p> <p>16:00~17:00 見学 地域病院での医療提供とサテライト診療</p>	<p>③ 植村由佳 枝幸町副主幹 NPOスタッフ</p> <p>② 佐藤祥人 保健福祉課参事</p> <p>③ 白井院長 枝幸国保病院</p>	<p>枝幸町役場 健康保養館(ニュー幸林)</p> <p>枝幸町役場</p> <p>枝幸国保病院</p> <p>* 歌登宿泊</p>
7月23日(木)	<p>9:00~12:00 講義・見学 枝幸町の保健師活動 枝幸から紋別に移動(バス)・ 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</p> <p>14:30~16:30 講義・見学 食品保健(衛生に配慮した食品加工) 北海道北部における地域保健・医療の実際について学ぶ</p> <p>16:45~17:30 見学 冬季の北海道の自然環境・暮らしの理解</p>	<p>③ 工藤裕子 元枝幸町主幹 非常勤保健師</p> <p>コーディネート 吉田 安中慎一 常務取締役</p> <p>コーディネート 藤井 北海道立オホーツク流氷科学センター</p>	<p>枝幸町保健センター</p> <p>マルカイチ水産</p> <p>北海道立オホーツク流氷科学センター</p> <p>* 紋別宿泊</p>
7月24日(金)	<p>北海道北部における地域保健・医療の実際について学ぶ</p> <p>9:00~10:00 見学 オホーツク圏における看護師養成機関の役割 日本における学校保健活動について現場で学ぶ</p> <p>11:00~12:30 見学 児童自立支援教育について学ぶ 乳幼児を中心とした住民の栄養指導について学ぶ</p> <p>14:45~16:45 講義・演習 乳幼児の栄養</p>	<p>③ コーディネート 藤井 品川由美子 教務主幹 コーディネート 吉田</p> <p>② 熱田洋子 理事 コーディネート 吉田</p> <p>② 豊島琴恵 教授</p>	<p>道立紋別高等看護学院</p> <p>北海道家庭学校</p> <p>旭川大学 17:30頃帰旭</p>
7月25日(土)	フリー		
7月26日(日)	フリー		
7月27日(月)	<p>日本の環境保健と産業保健の概要について学ぶ</p> <p>9:30~11:00 講義 日本の環境問題の歴史と環境保健の動向</p> <p>11:00~12:30 講義 環境保健行政の実務(上下水処理、廃棄物処理)</p> <p>13:30~15:00 講義 地域における産業保健活動の実際 研修員相互の情報交換・討論</p> <p>15:00~16:30 ディスカッションツアー 3 Community Mobilization / Flying Doctor 16:30~ 近隣の見学ツアーアの説明</p>	<p>① 吉田貴彦 教授 ① 伊藤俊弘 教授 ① 吉田貴彦 教授</p> <p>② 吉田、藤井、伊藤</p>	<p>小会議室</p> <p>小会議室</p> <p>小会議室</p> <p>小会議室</p> <p>小会議室</p>
7月28日(火)	<p>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</p> <p>9:00~11:30 見学 廃棄物処理施設</p> <p>13:00~15:00 講義・見学 近文清掃工場、リサイクルプラザ</p> <p>15:30~16:30 見学 旭川廃棄物処理センター(旭川振興公社)</p>	<p>② コーディネート:伊藤・中木 西野尾孝子 社長 近文清掃工場、リサイクルプラザ</p> <p>② 旭川廃棄物処理センター</p>	<p>バス ホテル出発8:15(旭川医大経由8:30)・ホテル帰着17:15 アンビエンテ丸大 近文清掃工場</p> <p>旭川廃棄物処理センター</p>
7月29日(水)	<p>地方における医療機関と地域保健業務の連携を学ぶ</p> <p>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</p> <p>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) 昼食</p> <p>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)</p> <p>14:00~15:00 見学 住民に対する保健サービス提供の実際</p> <p>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)</p> <p>16:45~17:30 総括講義 (味戸伸彦医師・藤原裕子看護師他)</p>	<p>③ コーディネート:藤井・吉田 味戸伸彦 先生 安倍信一 施設長 美瑛町民センター ③ 味戸伸彦 先生 美瑛町保健センター保健師 ③ 小規模多機能施設長 ③ 味戸伸彦 先生</p>	<p>バス ホテル出発8:00(旭川医大経由8:15)・医大18:15ホテル帰着 美瑛町立病院 特別養護老人ホーム 美瑛慈光園 美瑛町民センター 美瑛町立病院 美瑛町保健センター 小規模多機能施設 ひなた(美馬牛駅前) 美瑛町立病院</p>

月 日	研修内容		
7月30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 9:30~11:30 講義・見学 食品保健の現状:旭川市食肉衛生検査所(と畜場・食肉検査) 13:00~14:30 講義・見学 産業現場の現状:製紙工場 15:00~16:30 講義・見学 忠別川浄水場(旭川市水道局) 19:00~ 花火見学(希望者)	② ② ②	コーディネート:伊藤・中木 食肉衛生検査所 所長 向峯斉グループ長 忠別川浄水場 伊藤俊弘 教授
7月31日(金)	研修員相互の情報交換・討論 効果的な健康指導 9:30~11:00 ディスカッションアワー 5 11:00~12:30 講義・演習 住民教育の方法と、教育に役立つ資料作成 医学トピックス 13:30~15:00 講義 Life style related disease: What is Hypertension? 15:00~16:30 講義 Current Status of Organ Transplantation in Japan and Other Asian countries 地域交流会説明 16:30~ 地域交流会説明	⑤	藤井智子 教授 長谷部直幸 教授 古川博之 教授 伊藤俊弘 教授
8月1日(土)	PM 地域交流会(希望者)		
8月2日(日)	フリー		
8月3日(月)	9:30~10:00 市長表敬訪問 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る 11:00~12:30 アクションプラン作成 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 13:30~16:30 講義 保健システム強化とキャパシティー・ディベロップメント —アフリカの事例を中心に—		西川将人旭川市長 小会議室 杉下智彦専門官 小会議室
8月4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。 9:30~12:30 講義 保健システム強化とキャパシティー・ディベロップメント —アフリカの事例を中心に— 13:30~16:30 アクションプラン作成	④	杉下智彦専門官 小会議室 小会議室
8月5日(水)	遠隔ICTを活用した医療の均等化 10:00~11:00 講義 大学と地域・国際連携 11:00~12:00 ICT多地点会議システム		コーディネート 吉田貴彦 吉田晃敏学長 遠隔医療センター
8月6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。 9:30~12:30 アクションプラン・プレゼン 13:30~15:30 アクションプラン・プレゼン 15:30~16:30 評価会 17:30~ サヨナラ・パーティ		JICA札幌 JICA札幌 JICA札幌 田舎横丁
8月7日(金)	10:00~11:00 体組成測定 記録 11:00~11:30 閉講式 11:30~ フェアウェル・パーティ 旭川から札幌へ移動(バス)		藤井・塩川・伊藤 JICA札幌 AMU6F実習室 大会議室 小会議室

科大学病院での病院管理運営、地域支援病院の機能の講義を設定した。実地学習として、高度先進医療を担う旭川医科大学病院、感染症と難病対策に重点をおく国立病院機構旭川医療センター、地域支援病院である名寄市立総合病院とそのサテライト診療の場としての枝幸国保病院、整形外科の往診診療も行う美瑛町立病院を訪問視察し、それぞれの機能分担、病診連携等を学んだ。医療スタッフなどの人材養成と人材確保について、旭川医大での医師養成と地域で活動する医師確保の試み、紋別高等看護学校での看護師養成について教育現場を訪れて学んだ。

「環境保健領域」では講義に引き続き、浄水場、ゴミ焼却場、廃棄物最終処分場、医療廃棄物処理施設、食

品系・草木質系廃棄物からの堆肥化施設、BIN・缶・ペットボトルなどのリサイクル施設、古紙リサイクル施設を見学し、衛生確保の重要性と環境保護・資源の有効活用の必要性を学んだ。

「食品衛生管理」の一環として、上川保健所検査施設、食肉検査所と海産物加工食品製造現場を訪問し、食品の衛生・安全確保にかかる検査の見学、食肉の安全性の確保・担保の仕方についての講義とDVDによる屠畜場の衛生管理状況を学んだほか、衛生的な海産物加工場の現場を見学した。

「産業保健領域」では講義のほか製紙工場の見学を行ったが、作業現場での人間工学的な健康管理、安全配慮についてより時間をかけた講義の要望があった。

「学校保健」については、養護教員の講義を通して意義などについての知識を得たのち、中学校を訪れ現役養護教員から活動の実際について学んだ。さらに小学校を訪れ、給食の準備・片付けと清掃の時間を中心に見学することで、小児期から栄養と衛生を含めた健康習慣を身につける場としての学校教育の在り方を知る機会とした。また、研修員は小学校においてそれぞれ学級に配属され給食を児童とともに摂るなど交流の機会を作った。遠軽町の障害児童生徒の児童自立支援教育施設である北海道家庭学校を訪れることで、日本における地域社会での児童福祉の取組みを学ぶ機会とした。

研修員の地域の保健医療行政に関する問題点を分析し対策を立てる手段としての「PCM」は、戦略的計画策定・運営能力強化のために必要な知識・技術としての評価は高かった。また、参加型の演習を行ったことも評価が高かった。

アフリカで課題となるであろうと想定した疾病に関して、課題解決のための一助となるべく基礎的知識についての講義を設定している。具体的には感染症一般(院内感染制御を含む)、結核、マラリア等蚊媒介性疾患、条虫・包虫など寄生虫疾患、生活習慣病(non-communicable diseases)などで、トピックスとして1型糖尿病、高血圧、移植医療についての講義を組んだ。また、生活習慣病予防を念頭に置いた栄養指導(美瑛町保健センター)と乳幼児栄養と離乳食調理の講義も行った。

今年度は、話題提起とディスカッション、“Topic raising & discussion”について、来日前に各研修員が経験したGood practiceについての資料や写真をまとめて持参するよう募集要項に記載した。研修の冒頭でカテゴリー化し情報交換と討論の場を3回設けた。従来の形式(トピックスについて定義などを挙げることに終始した)に比べるとはるかに効果的であった。

2012年から実施している、研修員に毎日1名ずつ担当させた「daily report」は、学んだことの整理となり都合が良かったと好評であった。これは研修日に学んだ内容と意見などを原則として翌日までに電子メールにてコースリーダーへ提出するというものである。およそ1週間分をまとめてメールにて研修員や研修担当関係者に配信するようにした。本年度は、2010年度以降の研修員もメンバーに登録されているメーリン

グリストで配信し過去の研修員のモチベーションを高め、現研修員に対する刺激とした。

アクションプランについて、来日前に上司や同僚と討論し、テーマについて予め考えて来るべきことを募集要項に明記した。また、4週間が経過した時点でアクションプランの概要を提出させる事としたことで、作業の進度が昨年までと比べて早くなかった。研修員全員がPCを持参し、PC上でアクションプランを作成する者が殆どであり、ポストイット等を用いて作業を行うものは殆んどなかった。本研修の初期に比べ、研修員も全員PC操作に慣れ、電子メール等でのやり取り、「日報」や「アクションプラン」のファイルの送受信も可能であった。アフリカ諸国の社会状況も大きく変革しつつあることが実感された。

### III. 本研修の目標達成状況

#### 案件目標 :

本コースは、講義、演習、視察、総合討論を通して、我が国の保健医療行政に関する基本的理念について制度や組織の歴史的変遷と合わせて、国民の健康(保健医療)の課題に対して行われてきた地方保健医療行政(特にアフリカ地位と同様に医療サービスへのアクセスが容易でない問題を抱える北海道の実情に照らし)改善のための諸取組の変遷および現在の状況を把握・理解し、参考とすることにより、研修員出身国での健康医療問題解決の一助となることを目指す。

各自が作成した地域保健医療計画(アクションプラン)の構成と内容について、プレゼンテーションによる説明を受けて評価する。具体的には、以下に示すとくである。

- i) 自国や所属地域の保健医療にかかる現状分析ができるか。
- ii) 地域保健計画に必要な課題設定、課題解決の方 法、評価などの基本要素が理解できているか。

達成度：研修員11名全員が達成した。

#### 単元目標(表3) :

- ・ 単元目標①：日本の保健・医療・福祉の体制と制度について学ぶ。  
達成度：研修員11名全員が達成した。
- ・ 単元目標②：地域保健サービス提供計画の策定に必

**表3 達成度の測定結果**

	←←達成		未達成→→		無回答
	“4”	“3”	“2”	“1”	
案件目標	6	5	0	0	0
単元目標①	7	4	0	0	0
単元目標②	6	4	1	0	0
単元目標③	5	6	0	0	0
単元目標④	5	4	1	0	1
単元目標⑤	5	5	0	0	1

要な基本的な知識と技術を習得する。

達成度：研修員11名全員が達成した。1名はやや達成できなかつたと回答した。

・単元目標③：北海道の地域の健康課題への解決対策について事例から学ぶ。

達成度：研修員11名全員が達成した。

・単元目標④：国や地域の個別の健康課題を特定する技術を学ぶ。

達成度：研修員9名が達成した。1名はやや達成できなかつたと回答した。

1名は無回答であった。

・単元目標⑤：④の課題に基づく地域の保健活動についての企画の作成・上申と、地域コミュニティでの展開について学ぶ。

達成度：研修員11名全員が達成した。1名は無回答であった。

本年度は、医師の比率が高く、健康問題に関しての知識や技術を持つとともに、地域において責任を持つ立場の研修員が多かった事もあり、講義、演習、施設等訪問見学、総合討論時には質の高い質問・コメントも多いなど、研修員が積極的に学ぶ姿勢が見られ、また、互いの理解度を擧げるために研修員同士での補足討論がなされた。自己に対する評価にも厳しさが感じられるが、全ての単元において比較的高い達成度が得られた。

・案件目標に対する達成度は、4:6名、5:5名であり、11名全員が達成した。

#### IV. 研修員の特性

2014年度の本研修の英文コース名の変更と対象者

を本コースの本来の趣旨に厳密に合わせることを明記した募集要項の改善により、研修員全員が医療・保健を専門とし、地域のアクションプラン策定ないしその指導的立場にある者で構成されていた。今年度は、従来に比べて研修員の分析力やディスカッションへの参加の積極性、プレゼンテーション能力の高さが目立っていた。これは医師の比率が極めて高い(11名中9名)ことも関係しており、質問内容が医学的に高度なものが多い印象を受け、地域保健行政に携わる責任を担う人材を対象とするという本研修の目的は達成されているように思われた。

また、ここ数年研修員の年齢層が大幅に若くなっているが、この事は帰国後の各国での保健行政担当者としての活動期間が確保できる事や人材育成の機会を拡大するという面では有意義である。研修員は非常に熱心であり、講義や視察において良く理解することに積極的であり質問も多く、研修参加に意欲的であった。

例年、研修員の多くが肥満傾向にあることから、2013年から研修員全員研修初日と最終日に身長、体重、体脂肪等を測定し、その変化を記録し研修員に結果として返却した。また体重のコントロールや生活習慣改善のために万歩計と記録用紙を配布し、各自の日常生活を振り返るよう支援した。本年は、年齢層が若かったこともあり、肥満の程度は軽かった。ホテルから大学まで徒歩で通った研修員もあり、体重の軽減した者が多く見られた。帰国後の地域住民に対する生活習慣改善のための指導に役立たせる経験となったものと思われる。

#### IV. 最後に

本研修は、地域保健医療行政担当者としてアフリカ地域の実情に合わせて住民への直接サービスの在り方について精通し、地域保健医療行政全体を運営（財政的、人材的、物的に）し、さらには地域の健康課題を抽出し解決のための必要な保健医療計画（アクションプラン）を自國中央省庁に対して効果的にまとめて訴える交渉・連携に必要な知識と技能、同時に、地域住民に対する健康保持増進において有効な対策を企画・推進する能力、さらに地域保健医療の領域で同僚・部下に対して良き模範としてリーダーシップを発揮するといった地域保健医療行政担当者としての総合的な手

腕の修得を目指している。

日本とアフリカ諸国の国情の違いは大きなものであることから、日本の過去の経験や現在の状況を教える講義や最先端の施設や機器を見学するだけでは不十分である。過去の日本の状況がどのようにして現在の状況まで変わったかを学び、特に広大な土地の中に人々が点在し医療機関へのアクセス悪い北海道で学んだことを、吸収し各自が自分なりに応用して実践できるような態度の寛容が必要である。

本年度は、医師の比率が高く、健康問題に関しての知識や技術を持つとともに、地域において責任を持つ立場の研修員が多かった事もあり、講義、演習、施設等訪問見学、総合討論時には質の高い質問・コメントも多く、研修員が積極的に学ぶ姿勢が見られ、また、互いの理解度を挙げるために研修員同士での補足討論がなされた。自己に対する評価にも厳しさが感じられるが、全ての単元において比較的高い達成度が得られた。

本研修は、来年度（平成 28 年度）第 3 期の最終年度に当たるが、研修生の特性や彼らを取り巻く状況が研修初期の頃と比べて大きく変化しており、研修生が要求する内容の変化に合わせたカリキュラムの更なる修正が必要な状況ではあるが、本研修が来年度以降も継続し得ることを見据え、研修員にとってより良いものになるよう努めていきたいと思う。



開講式



カントリーレポート発表会 1



カントリーレポート発表会 2



ウェルカムパーティ



講義風景



上川保健所見学



PCM講義 1



PCM講義 2



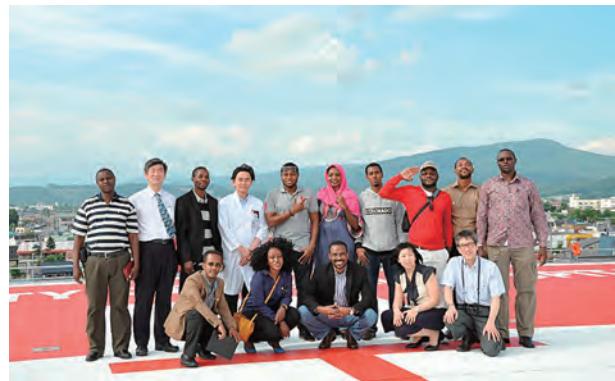
東光中学校見学



教育大附属小学校見学



旭川医療センター見学



名寄市立病院見学



旭川大学（講義：乳幼児の栄養）



アンビエンテ（産業廃棄物処理場）見学



旭川食肉検査所見学



遠隔医療センター見学



旭川市花火大会見学



吉田教授邸訪問

## 学界の動向

# 第 24 回（一社）日本有病者歯科医療学会総会・ 学術大会開催のご報告

松 田 光 悅\*

皆様には、ますますご健勝のこととお喜び申し上げます。

このたび、第 24 回（一社）日本有病者歯科医療学会総会・学術大会の大会長をご指名頂き、平成 27 年 3 月 20 日（金）から 22 日（日）の 3 日間、旭川市大雪クリスタルホールにおきまして本学会の総会・学術大会を開催いたしました。全国から約 600 名の会員の参加を頂き、全身的に基礎疾患有し、専門各科によって種々治療を施されている患者の、歯科および口腔外科治療についてのご発表と活発な討論が行われました。本学会会員の皆様や事務局の皆様からのご指導ご鞭撻を賜り、本学の先生方をはじめ、旭川市医師会、旭川歯科医師会そして北海道歯科医師会などの多くの皆様からご協力をいただき、お陰様で成功裡に終えることが出来ました。この場をお借りしまして、心より御礼申し上げます。

本学会はおよそ 1500 名の歯科医師によって構成されており、近年の超高齢社会を背景に会員数が増加の一途をたどっております。歯科衛生士の参加も、徐々に増えてきており、数年前より学術大会時に歯科衛生士セッションが開催されるようになってきております。

本学会名の『有病者』とは、全身的な基礎疾患有し、各専門科の医師による何らかの治療を受けている患者のことを指します。心・循環器疾患や抗血栓療法を受けておられる患者の歯科治療、特に口腔内局所麻酔を行い、何らかの歯科口腔外科的治療に際しては十分な注意が必要であり、また骨粗鬆症やガンの骨転

移などで用いられる薬剤（ビスホスフォネートなど）の服用患者では頸骨壊死の予防が話題になっております。その他がん治療、各種移植医療、心・血管外科治療時の病巣感染予防を主たる目的とした周術期口腔機能管理など、本学会は基礎疾患有患者の歯科・口腔外科治療について歯科医師をはじめ歯科医療従事者の知識・技術を広め、強固な医科歯科連携を構築していくことを目的としております。

2025 年以降、我が国では人口の 30% 以上が超高齢者となり、疾病構造も急性期から慢性期へとシフトしていくといわれております。また国の示すグランドデザインにおいても病院から居宅、在宅を中心とした地域包括ケアという方向へ移行し、病気とともに生活を送る人が多くなることが予想されます。このような時代に脳血管障害、心循環器疾患、抗血栓療法、糖尿病、各種がんなどの治療を受けている基礎疾患有患者に対しより安全、安心な歯科医療を提供することは、我々歯科医師の責務であり重要な課題でもあります。



\*旭川医科大学 歯科口腔外科学講座

このような観点から、本学術大会では、「有病者歯科医療の新たなる展開—高齢化社会における医療連携の強化を目指して—」というテーマを掲げさせて頂き、これまでの「基礎疾患保有患者の歯科治療をどのように行うか」から「担当医師の行う基礎疾患治療や患者の質の高い生活保持に貢献する歯科医療」を目指して開催いたしました。

そのためにこれから超高齢社会における歯科医師、歯科医療のあり方、疾患構造の変化や基礎疾患に対する治療の変化、進歩などについて特別講演、基調講演をはじめ、2題の教育講演、4つのシンポジウムを企画しました。特別講演は精神医学の観点から「超高齢社会とメンタルヘルス」と題し、いかに長生きするかだけでなく、いかに精神的に充実した人生を送れるかについて旭川医科大学精神医学講座教授の千葉茂先生に貴重なご講演を頂き、多くの会員が拝聴しておりました。さらに基調講演として北海道歯科医師会長で日本歯科医師会副会長の富野 晃先生に「医療連携を阻む要員とそれへの対応—歯科医師の超高齢社会での存在価値—」のタイトルで歯科医師にとって大変貴重なご講演を頂きました。また、本学会理事長の今井 裕先生には理事長講演として、今後本学会が果たすべき役割についてご講演を頂きました。教育講演では、旭川医科大学医学部内科学講座病態代謝学分野講師の安孫子亜津子先生に最近の糖尿病治療、特にインスリン治療と低血糖について、また同臨床検査医学座

教授の藤井 聰先生に新旧各種抗血栓薬についてのご講演を頂きました。会員にとって大変有意義かつ有益なものでした。この場をお借りし、改めて演者の皆様に御礼申し上げます。その他、歯科衛生士セッションをシンポジウム形式で企画し、ランチョンセミナー2題、学術教育研修会、ICD認定講習会が行われました。

一般演題の口演発表65題、ポスター発表70題を含め合計159題の発表とそれに活発な質疑応答が行われ、充実した3日間となりました。

3月中旬の旭川、学会開催に当たり天候が最も心配されましたが、今冬の旭川はいつもより少雪で、雪解けも早く進み、学会期間中はお陰様で晴天に恵まれました。学会の神様（？）が、味方してくれたのだと勝手に思っております。

このような学会が旭川市で開催されたことにより、この超高齢社会における歯科と医科との連携がいかに重要であるか再認識されたものと思います。私どもも今まで以上に、地域における患者に質の高い生活を保持して頂くために、歯科医療を通して貢献していくよう医科との連携を強化し努力して参ります。今後ともどうぞよろしくご指導をお願いいたします。

皆様方のご協力のお陰で、第24回（一社）日本有病者歯科医療学会総会・学術大会が盛会に終了いたしましたこと、改めて感謝を申し上げまして学会開催のご報告とさせて頂きます。



## 学界の動向

# 第119回日本眼科学会総会を終えて

石子智士\*

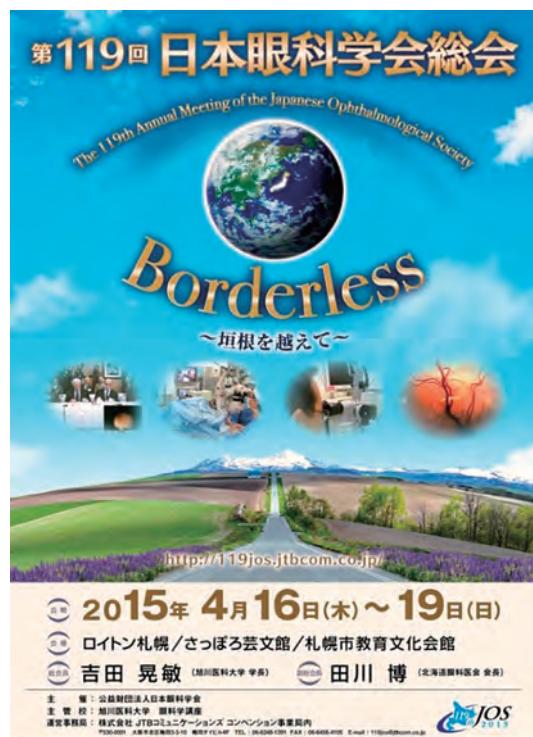
第119回日本眼科学会総会を旭川医科大学学長吉田晃敏総会長のもと旭川医科大学眼科学教室の担当で、平成27年4月16日(木)から19日(日)の4日間、札幌市においてロイトン札幌、さっぽろ文芸館、札幌市教育文化会館の3会場を使い開催致しました。北海道での開催ということもあり参加者の減少が危惧されていましたが、最終的に合計4,500名と盛会のうちに終了致しました。

学会のメインテーマは、「ボーダレス～垣根を越えて～」でした。さまざまな叡智がボーダレスに融合し、垣根を越えて、私たち眼科医がさらなる進化を遂げていければとの思いを託したものでした。ポスターは、目の形になるように学会名とメインタイトルを並べ、瞳の位置に日本が中心となる地球を配置しました。下方には、雪を冠した大雪山に続く一本道と、その両脇には北海道らしいラベンダー、大地は緩やかに湾曲して広大な地球の一部であることを示しています。その間には、スケペンス眼研究所との遠隔医療、吉田先生の手術、石子の外来、そして、基礎研究のイメージを配置し、これらがボーダレスに融合していくイメージを作り上げました。

日眼総会のプログラムは、各専門分野の関連学会から選出されたプログラム委員が中心となって立案と企画・構成を行う事になってますが、シンポジウムなど学会のメインである学術講演も、このテーマに沿ったものが多く企画されました。特別講演2名、招待講演2名、評議員指名講演3名、シンポジウム20テーマ、教育セミナー10テーマ、スキルトランステーブルセクション、サブスペシャリティサンダー12セクションと幅広い分野で講演が行われました。

特別講演1は、吉村長久教授(京都大学)による「日本人の加齢黄斑変性」で、日本人の加齢黄斑変性の特徴をコホート研究、最新の検査機器を用いた研究、そして遺伝子研究まで、幅広い観点からの講演でした。特別講演2は、飯島裕幸教授(山梨大学)による「ハンフリー視野計で見る網膜疾患」で、この装置を用いた長年に亘る研究から種々の網膜疾患への有用性とその病態について講演しました。

今回の招待講演1は眼炎症・感染関連学会プログラム委員推薦のJames T. Rosenbaum教授(Oregon Health & Science University)による Does the microbiome cause uveitis? と題した、HLA B27によるぶどう膜炎に関する



\*旭川医科大学 医工連携総研講座

る講演でした。

招待講演 2 は会長の推薦枠で、吉田学長の Schepens 眼研究所留学時代の友人で、現在眼科雑誌 Retina の Chief Editor をされている Alexander J. Brucker 教授



(University of Pennsylvania, Perelman School of Medicine) に、Clinical Trials for dry age-related macular degenerations. と題し、萎縮型加齢黄斑変性に関する講演をしていただきました。

評議員会指名講演は「次世代の眼科治療」の題目で、iPs 細胞の眼科臨床応用で注目が集まっている高橋政代先生（理化学研究所）の「iPs 細胞による網膜細胞治療」、西田幸二教授（大阪大学）の「角膜疾患に対する未来医療」、白井智彦講師（東京大学）の「角膜の透明性を守るために」という演題で、再生医療を中心に講演いただきました。

シンポジウムのうち、会長枠として、旭川医大眼科の特色である、「眼循環」、「遠隔医療」、「近視」、「画像



解析」の 4 つを企画しました。教室の長岡泰司准教授が眼循環のシンポジウム「眼微小循環研究の最前線－基礎から臨床へ－」で「網膜循環研究の最前線」と題

した講演を行いました。

石子は、遠隔医療のシンポジウム「眼科遠隔医療の



今後の在り方」で「旭川医大が行う眼科遠隔医療の取り組み」、近視のシンポジウム「近視のボーダレスアプローチ」で「強度近視とロービジョン」と題した 2 つ



の講演を行いました。

これに加えプロクラム委員企画のシンポジウムで、教室の高橋淳士先生が「OCT を用いた網膜硝子体界面の評価」と題した講演を行いました。





また、吉田学長はシンポジウム「眼光学と検査機器の進歩」、廣川博之教授はシンポジウム「眼科遠隔医療の今後の在り方」のオーガナイザーをそれぞれ担当しました。

さらに、これまでの日本眼科学会による国際化推進の流れを踏襲し、Best of AAO (American Academy of Ophthalmology) 7 セッション、International Symposium 4 セッションも行いました。海外からの演者に対しトラベルグラントを 12 名に支給し、最終的に合計 45 名の海外演者を招待しました。ランチョンやモーニングなど共催セミナーも合計 53 セミナーに上りました。

一般演題には、海外からの 20 演題を含め 650 もの演題応募があり、これは国際眼科学会と同時開催された昨年を除き過去最大の応募数でした。最終的に一般講演は 61 セッション 329 演題、学術展示は 51 セッショ

ン 295 演題としました。このため、当初予定していた会場では間に合わず、学術展示発表の形式を変更せざるを得ませんでした。

学会最終日の市民公開講座は「失明につながる二大疾患」のテーマで、2300 名を収容できるニトリ文化ホールにて、山下英俊教授（山形大）の「糖尿病で失明しないために」と、山本哲也教授（岐阜大）「失明原因第 1 位 緑内障 – 失明する人しない人 –」の 2 つの講演を行いました。この市民公開講座は、地元の北海道眼科医会ならびに札幌市眼科医会のみならず、日本眼科学会総会としては初めて日本眼科医会にも共催していただきました。本総会のメインテーマにあるように、眼科学会と眼科医会の垣根を越えての取り組みを象徴しているものだと思います。

さて、眼科の領域においては、旧帝国大学でもなく、歴史の浅い新設医大が、解剖学学会について日本で最も歴史の長い日本眼科学会総会を担当するという事は異例中の異例です。そのような伝統ある学会を主催するにあたり、吉田学長の意向どおり、総会の準備・運営を、旭川医科大学眼科医局員が一丸となって「おもてなし」の心で作り上げることができたと思います。参加していただいた会員の皆様からも、いろいろお褒めの言葉を頂き、医局員一同、大変うれしく思っています。

最期に、本総会の開催にあたり、皆様からの暖かいご支援、ご協力に心から感謝申し上げます。



## 学界の動向

### 第 30 回日本生体磁気学会を終えて

鎌 田 恭 輔 \*

本学会は柿木隆介理事長のもと、医学部と工学部が交互で大会長をするシステムになっていました。2年前に臨床系の大会長を選ぶ段階で突然かつての工学部の恩師から“旭川でやろう”との鶴の一声で、大会長に指名されました。この学会は脳磁図、心磁図、磁気計測デバイス、磁気の生体への影響、神経生理学など様々な分野が融合しているため、プログラムの作成が困難を極めましたが、なんとか 100 題ほどの演題が集まりました。今回のプログラムは事務局長の三井宣幸先生と、旭川医科大学教育研究推進センターの竹内文也先生の多大なる労力のおかげで、“生体磁気の新技術”、“可塑性と神経科学”、“心磁図の臨床応用”、さらに “てんかん診断への脳磁図応用 (English session)” を組むことができました。神経科学、臨床医学、工学のバランスのとれた内容となりました。ポスター発表も大変熱気に包まれ、参加者は 180 名ほどとなりました。今回私が旭川に赴任して初めての全国学会であったため、医局員一同暗中模索のなか準備をしてきました。



2015 年 6 月 5 – 6 日に大雪クリスタルホールにおいて、なんとか開催に至りました。完全な医学系の学会ではありませんでしたので、予算面での不安がありましたが、Leica 社、Infocom 社、インターリハ社、カントム・デザイン社、メディカライン社、Guger technology 社などの展示を始め、多くの医学関連会社から協賛をしていただきました。当日は旭川の 6 月では珍しい極寒の天候であり皆学会場にこもっていましたので、むしろ会場は熱気に包まれていました。

当日は私の研究の指導者である ATR フェローの川人光男先生による科学と倫理について、さらに Seoul National University 脳神経外科の Chun Kee Chung 先生から Chronic pain と脳内ネットワークのについて講演をしていただきました。さらに韓国からは 3 題のシンポジウム、教育講演、ドイツからのデバイス開発の大家である Luts Trahms 教授にも基調講演をしていただきました。国内学会でしたが、多くの外国のゲストを招くことができて、大変刺激的な内容になりました。



\*旭川医科大学 脳神経外科学講座

川人先生の講演で印象深かったことは、科学の進歩の速度と、それを使う科学者の倫理に解離に関する機会するメッセージがあつたことでした。我々は手柄を焦るあまりデータ取得、解析、結果の解釈を都合良く行つてしまふ危険が常にあります。これは医学者のみならず、科学を志しているものならば皆心の底に潜んでいる捻れた志です。川人先生は2年前に紫綬褒章を受章されている大変立派な功績を残され、今も精力的に研究を進めています。その先生から科学の進歩の行き過ぎと、超えてはいけない研究倫理について言及していただきました。この講演は大学人、かつ医師である私の心に突き刺さる重いメッセージでした。

さて、今回の学会で私が特にアレンジしたことは旭川医大的学生、近隣の医師には自由に聴講していただけるよう手配しました。そして最後に最も努力したのは一日の疲れを癒すためのレセプションでした。これには“町おこし”を兼ねて興部町（オコッペ）町長と話し合い、その町の名産である蟹、ホタテ、チーズ、ハム、ソーセージなどを大量に寄付していただきました。さらに会の始めに町の宣伝をしたいだいたいたところ、大量の食材は30分でなくなってしまいました。町おこしを兼ねた企画でしたが、皆が北海道の名産を堪能していました。また、旭川で6~7月しか手に入



らない男山酒造のお酒、ドイツからピルスナーとヴァイスという2種類のビールも輸入しました。最後はこれもありやらないのですが、全員でのジャンケン大会となりましたが、幸い韓国からきた女性の神経科学者に可愛いぬいぐるみがあつたことがなによりであったと思います。

学会は決して一人、医局のみで開くわけではなく、皆の協力、暖かいサポートと理解があってこそ、心に残る、皆が幸せになれる会にできあがるものだと感じました。皆の協力に感謝するとともに、大きな学会を良い思い出とともにおえることができて心から安心しました。



## 本学教室員執筆書籍の紹介

### 鈴木昭広編集 メジカルビュー 「こんなに役立つ！肺エコー」

鈴 木 昭 広

私が肺の超音波に興味を持ったのは、麻酔科から救急部に異動し、ドクターへり活動に従事し始めた頃であった。麻酔科医風情がなぜ救急やトドクターへりなどを行う必要があるのか？麻酔科医は手術室でおとなしく麻酔をしていればいいのでは？と思われる方も多いかもしれない。しかし、実は麻酔科医は日々手術麻酔を介して、5分で気道呼吸循環中枢神経系に異常をきたす患者を人為的に作り出し、対応する、いわば蘇生学のエキスパートでもある。救急生活5年間を経ても、意識レベルJCS = 0の患者が5分後に300になるような激変には遭遇したことはないが、手術室では毎日何例もの手術患者がそういう状況になっており、その貴重な体験を積める麻酔の場は、筆者にとって手術室の外の世界を見て初めて自覚できたことであった。

さて、地域での対応を余儀なくされる外傷患者の初期治療に関しては、近年、外傷初期診療ガイドラインが策定され、国家試験にも出題されるようになり、医師のみならず医学生にとっても常識となりつつある。外傷対応においては、まず見た目の怪我だけではなく生理的な異常に注目し、蘇生的介入を行うことになる。ABCDの対応スキルを備えている麻酔科医が、超音波による診断手法を併せ持つことで麻酔科医は手術室だけではなく、医療のあらゆるフェイズで役に立てるジェネラリストに変貌できる。そこで、筆者は全国

の麻酔・救急・集中治療医に呼びかけてABCD sonographyという教育団体を立ち上げ、急性期診療に役立つ様々な超音波手法の啓蒙にあたっている。中でも近年のホットトピックがこの肺エコーであり、出版社から企画を持ちかけられ仲間内で執筆して書籍化したのが本書となる。

実は、肺エコーの書籍はこれが本邦初ではないかと勝手に考えていたのだが、学会で講演活動を行っているうち、実はその歴史は古く、1950年代にAモードで日本人が最初に考案し、その後1960年台後半、筆者が生まれたころにBモードを札幌医大の名取名誉教授らが取組まれ、今の世界的なブームは第3次であることを名取名誉教授ご本人からお伺いすることになった。呼吸器超音波学として発展した肺超音波は、急性期診療ではあまりなじみがなかったため、検索に漏れて外国文献ばかりがヒットしていたのだが、日本人の先見性に驚かされ、また先達と巡り合う機会を得てうれしい限りである。本書はアマゾンのベストセラーで第1位を獲得し、すでに第3版を刊行するに至っている。こと急性期診療では新たなエビデンスが確立され、温故知新で学びなおすべきことが多い。気胸、肺水腫、片肺挿管、呼吸器からのウイニングなど応用は幅広く、先人の偉業を合わせて世に知らしめる一助となれば、と考えている。

## 本学教室員執筆書籍の紹介

鈴木昭広・松坂 俊 編集 羊土社  
「救急エコースキルアップ術」

鈴 木 昭 広

一昨年、麻酔・救急・集中治療などの急性期診療に役立つ書籍として「あてて見るだけ！劇的！救急エコ一術」を刊行したが、その書籍が2014年の社内新書ベストセラー賞を受賞したため。二四目のどじょうを狙って企画されたのが本書である。折しも筆者は救急生活5年を終え、麻酔科に戻っていたためなかなか新しい所見やアイデアを生み出す機会がなかったのだが、救急時代の仲間である松坂 俊先生を巻き込み、前著とは違う形で、急性期の超音波診断手法を麻酔・救急・集中治療だけではなく、総合診療的に広げられないかと試行錯誤して執筆したのが本書となる。

せっかくの機会なので旭川医大の存在感を全国に知らしめたい、との思いから、大学の仲間や同門のつてを頼り、「キヨクイ流」の書籍をつくることを心がけ

た。救急科 丹保亜希仁 先生、耳鼻科 片田彰博 先生、臨床検査部 赤坂和美 先生、同級生の第3内科 鈴木康秋 先生（現在名寄市立）、麻酔科 岸真衣 先生、柏木祐太先生 五十嵐浩太郎先生、産婦人科 小野方正 先生、旭川ペインクリニック病院 赤間保之 先生などのご協力を得て書籍は刊行され、好評を得ている。

筆者は大学卒業までの24年間と同じ24年間、干支2周分を旭川医大で過ごすこととなり、その節目となる年に一つの仕事として急性期超音波学に関わる業績を全国に先駆けて発信し、母校への恩返しの一環としてこれら計3部作を作り上げることができた。ひとえに大学の皆様のご指導ご鞭撻のおかげと考えており、ここに深謝いたします。誠にありがとうございました。

### 急性期超音波3部作一覧



## 旭川医科大学回顧資料（17） 平成元（1989）年度

### 旭川医科大学同窓会創立 10 周年

1989 年は、年明け早々の 1 月 7 日に昭和天皇が崩御し、翌 8 日に平成と改元された年である。2 月に新宿御苑で大喪の礼が行われ、世界 164 か国から元首級の要人ほか多数が列席した。

年度が改まった 4 月 1 日には、大型間接税たる消費税が創設された。税率は 3% であり、現在の 8%、さらに近い将来に予定されている 10% に比べると隔世の感があるが、それでも、野党の反対を押し切っての難産の末の船出であった。税の実施に伴い、釣銭の 1 円硬貨が各地で不足した。

4 月 25 日、ときの首相竹下登は、元秘書によるリクルートコスモス社からの未公開株譲渡（リクルート事件）などによって生じた国民の政治不信の責任をとるとして、辞任を表明した。6 月 2 日には宇野宗佑が首相に就任したが、7 月 23 日の参議院議員選挙で与野党の議席数逆転をゆるしたことに加え、自身の女性スキャンダルの発覚もあって、彼は 7 月 24 日に辞任を表明した。8 月 9 日には宇野に代わって海部俊樹が首相に就任した。

文化面での話題を拾うと、2 月 9 日には国民的漫画家として親しまれた手塚治虫が死去した。6 月 24 日には、歌謡界の女王と称され国民的歌手として親しまれた美空ひばりが死去した。9 月 12 日には札宮（のちの秋篠宮）文仁親王と川嶋紀子さんとの婚約が決定した。9 月 29 日には横綱千代の富士が国民栄誉賞を受賞した。

ほかに、任天堂から「ゲームボーイ」が発売されて一躍ヒット商品になったのも、東京モーターショーが幕張メッセで初開催されたのも、金融機関の週休 2 日制がスタートしたのも、新宿・渋谷駅にJR 初の発車メロディーが導入されたのも、NHK が衛生テレビの本放送を開始したのもこの年であった。

流行語には、「ハナモク」（木曜日が遊ぶには最もとてふさわしい日ということから）、「カイワレ族」（カイワレ野菜のように、管理社会の中でしか生きることが認められない中高生）、「5 時から男」（終業時間である 5 時になると元気になるサラリーマンのこと）、「ほたる族」（家族に敬遠されベランダに出て喫煙する男性）などがあった。ベストセラーには、吉本ばなな『TUGUMI』『キッチン』、村上春樹『ノルウェーの森』、藤村由加『人麻呂の暗号』などがあった。

国外に眼を転じると、6 月 4 日には中国で天安門事件が勃発した。天安門広場を占拠した学生・市民らを中国当局が「反革命暴乱」として装甲車・戦車で制圧したこの事件では、死者が数百名に及んだ。11 月 9 日には東西ドイツを隔てていた「ベルリンの壁」が取り壊され、急速に東西対立の戦後体制は崩壊していった。このように、平成元年度は国内外ともに政治情勢が目まぐるしい変動した時期であった。

さて、この平成元年度の旭川医科大学に目を転じると、内外情勢とは相違して比較的平穏な 1 年であった。4 月 1 日に入学定員が 20 名減により 100 名となった。当初の 100 名が、医師不足に対処するため 1979（昭和 54）年度に 120 名に増やされ、それが元に戻ったわけである。6 月 28 日には附属病院に輸血部が設置された。

この年の比較的大きな出来事といえば、旭川医科大学同窓会が創立 10 周年を迎えたことである。

第 1 期生の卒業を間近に控えた 1978（昭和 53）年 11 月、「大学に残るにしても外に出るにしても、旭川医科大学の卒業生として横と縦の連絡をもって相互の親睦をはかり、研鑽を積み、母校の発展に協力しよう」との大きな目標を掲げて、旭川医科大学同窓会の結成が 1 期生により決議された。そして、1 期生の卒業と軌を一にして翌 1979（昭和 54）年 4 月 1 日に同窓会は発足した。

発足当初の規程では、会員は名誉会員（学長・前学長）、特別会員（教授・助教授・前教授・前助教授）、正会員（本学卒業生・本学大学院卒業生）より構成され、発足時の会員は、第 1 期卒業生 78 名と名誉・特別会員 76 名の計 154 名であった。

役員として会長（1名）、副会長（2名）、幹事（各期2名）、常任幹事（幹事より互選された若干名）、会計幹事（2名）が置かれた。役員の任期は2年で、当初の役員は会長吉田晃敏・副会長斎藤達也・同鈴木保名でスタートした。第2期は会長斎藤達也・副会長秋山建児・同坂本尚志の構成となった。続く1年間は後任が選出されず、そのまま第2期の役員が職務を行ったが、1983年9月より吉田晃敏が再び会長に就任し、秋山・坂本は副会長に再選された。以降、第3期（1984～86年）、第4期（86～88年）、第5期（88～90年）と同じ会長・副会長体制で職務が続けられ、第5期の途中で創立10周年を迎えたわけである。

以上の記述は、創立11年目に旭川医科大学同窓会事務局によって発行された『同窓会誌』第8号（1990年発行、発行月日は不詳）所収の、坂本尚志氏（執筆当時は千葉大学医学部助教授、現在は旭川医科大学入学センター専任教授）執筆による「同窓会沿革」に準拠したものである。

さて、今回紹介する回顧資料は、同じ『同窓会誌』第8号に寄せられた、当時の下田学長（第3代学長）・山田守英元学長（初代学長）・黒田一秀前学長（第2代学長）の、同窓会創立10周年の祝辞である。いずれの祝辞も、成長した教え子たちに寄せる慈愛のこもった眼差しに満ち溢れている。この、3代にわたる元学長は、いずれも故人となってしまった。隔世の感を禁じ得ない。

（旭川医科大学 歴史・哲学 藤尾 均）

## =回顧資料=

### 十周年記念号に寄せて

学長 下田晶久

昭和54年3月24日土曜日、78名の卒業生とこれを送り出す教職員とは、仮校舎の入学式に始まった5年半の多端な歳月を振り返り、それぞれに深い感慨を抱いて第1回卒業証書授与式に臨んだ。北海道民の悲願に応えて設置された新設医科大学初の卒業式とあって、櫓を組んだテレビカメラが入るやら、式後数名の卒業生にインタビューのマイクが向けられるやら、ひととき式場の体育館は熱気を帯びた興奮に湧き立った。今なお鮮やかに眼に浮かぶ一昔前の光景である。

平成元年、旭川医科大学同窓会は十周年を迎え、その記念号が発行されると言う。会員数はすでに1,252名に達している。みごとに育った同窓会に心から祝福を贈りたい。古来卒業生と出身校との関係は、母校という言葉が示すように洋の東西を問わず親子に喻えられているが、英語圏の *an alumni association*（同窓会）とは、里子のラテン語 *alumnus* に由来すると言うから、さしづめ出身校は、育ての親の役割を担う事になるのであろうか。いずれにせよ、子の成長を願わぬ親はなく、一人前の相談相手に成って貰える日の、一日も早からん事を期待するのが世の常の親心であろう。

全国に散って診療の第一線や教育・研究の中堅として活躍する同窓生の数も年々増え続け、風の便りにその良い評判を耳にした日は一日中明るい気分に成る。母校に留まって教壇に立つ同窓生も現在既に10名を越えるに至った。最近になって英国留学中の第8期生から、目下熱帯病の研究に従事しており、将来はアフリカで診療に携わりたいとの便りが届いた。誠に頼母しく嬉しい限りである。同窓会誌は、たとえ住所録のみに留まる号であっても、各自の動静を伝え互いの励みになる点で、会員にとっては貴重な情報源である。その巻末に添えられた

日本地図を見る度に、全国に限なく分布する卒業生の健闘が伝わって来て、それぞれの多幸と発展を祈らずには居られない。2年前から学生課が入学志願者向けに発行するようになった大学案内の中に、この卒業生分布図を転載させて貰って居る。会員個人の活躍が立派に母校に貢献している一例である。

昭和59年秋、同窓会設立五周年を記念し併せて開学十周年を祝って母校に寄贈された時計塔は、烈日の夏や霧氷の厳冬にも毅然と耐えて、下を通る学生、教職員にキャンパスの時を告げ続けている。部屋の机に向かって居ると、この塔と競うように育った白樺の梢越しに窓外から語りかけてくれて、同窓会を身近に感ずるようになっている。このたびの十周年記念にも、附属病院の外来ホールに4枚組の「北海道の四季」と題する染織美術品が寄贈された。訪れる患者さんの心に同窓生の暖かい思いが伝わる何よりの贈り物と感謝している。それについても、毎年卒業生を送り出して同窓会員の数を増やしているのは大学自身であるが、一人一人の会員から見た本学は、人生の一時期の養い親に過ぎない。同窓会の真の発展を願うからには、会員諸氏から生涯母校と呼ぶに相応しい評価が得られるよう、大学は自らの充実と発展に努力し続けなければなるまい。頼母しく育ちつゝある旭川医科大学同窓会の十周年に当り、自戒を込めて更なる10年後の本会の一層の隆盛を願うと共に、会員各位の御健勝を心からお祈りする次第である。

## 旭川医科大学同窓会 10 周年に寄せて

初代学長 山田 守英

旭川医科大学同窓会は、今年発足10周年を迎えた。同窓会は昭和54年第1期生が卒業した年に設立された。当時卒業生の数は僅か78余名に過ぎず、しかも卒業後年月も浅く、それぞれ臨床研修に忙しく、あるいは専門の研究に着手したばかりで、同窓会設立を企図する余裕などない時期であったと思う。それにも拘らず、多くの困難を克服して、斯くも早期に同窓会を設立し、会誌創刊号を発行したことは、洵に驚嘆に値する。爾来年々会員数は増加し、同窓会誌も関係役員諸氏の努力によって漸次充実して今日に至っている。更に昭和59年には、同窓会設立5周年の記念事業として、母校に時計を寄贈された。それは大学キャンパスの管理棟前庭に建設された高さ10米ほどの時計塔で、日夜一瞬も休むことなく正確に時を刻んでいるが、今では大学キャンパスにおける1つのシンボルとして、在学の学生、職員にとっても馴染み深いものとなっている。

申すまでもなく、大学同窓会は、母校卒業生全員が自動的に会員となるので、卒業年次が重なると共に会員数は年々、ほぼ一定数ずつ増加する。旭川医科大学では、今年第12期生が卒業し、卒業生総数即ち同窓会会員数は1,250余名となった。斯くて同窓会は、大学が存続する限り、会員数は益々膨張し、繁栄することになるであろう。

今、本学の卒業生諸氏の動向を見ると、70%余は北海道内に定着し、特に母校旭川医科大学を中心として、多数が道北地域で活躍しているが、勿論広く道外の都府県にも進出し、遠くは沖縄にまで及び、医療に、そして研究に励んでいる。特に母校旭川医科大学では、現在各期の卒業生諸氏が多数、卒業年次に応じて臨床医学の各専門領域において医療の実践に当り、あるいは臨床研修に専念し、また専門研究の進展に若手の研究者として懸命に研鑽している。洵に頼もしい限りで、ご同慶に堪えない。

今年は恰も 1990 年で、10 年後には 21 世紀を迎えることになるが、惟うにわが旭川医科大学の卒業生諸氏は総べて 21 世紀の社会に生き活動する人々である。殊に第 1 ~ 5 期の先輩卒業生諸氏は、21 世紀の黎明には、既に不惑の齢を越え、経験豊かな然も実力もあり活動力の最も旺盛な時期で、それぞれの専門分野で中堅として更には先達として活躍することになるであろう。21 世紀における医学・医療の飛躍的進展は諸氏の活躍に負うところが大であると思う。

また母校旭川医科大学も、当然時の流れと共に世代は移り、21 世紀には本学の卒業生諸氏が中核となって大学は維持され発展することになるであろう。この意味において卒業生諸氏の責務は極めて重く、愈々精進研鑽されんことを希うものである。

同窓会は、卒業年次こそ異なれ、共に旭川医科大学を“学びの故郷”とした卒業生諸氏によって構成される。それ故卒業生諸氏は同窓会を通してお互いに相携え、激励し合い、友交を深めることができ、同時に母校と深く結ばれるであろう。この意味において同窓会誌は、会員相互、そして会員と母校を繋ぐ唯一の絆となるものである。

このたび旭川医科大学同窓会は設立 10 周年を迎え、これを契機に将来へ新たな飛躍を計画している。同時に同窓会誌“10 周年記念号”には、会の歴史、会員の消息、随想、更に母校大学及び病院における会員諸氏の活動状況などが詳細に盛られ、充実した意義深い会誌が刊行されることになっている。

ここに旭川医科大学同窓会 10 周年記念を祝し、その将来輝かしい発展と会員諸氏がご健勝で繁栄あらんことを祈念して止まないものである。

## 旭川医科大学同窓会十周年おめでとう

前学長 黒田 一秀

旭川医科大学が始まったのは昭和 48 年で学生は 100 人いるだけがありました。学生会とゆうものの発足を当然予測して、学生がクラブ活動をする費用に、すぐ間に合うようにと、おせっかいにも若干のお金を入学のときに学生から徴収していました。大学紛争の余燼くすぶるころでしたから、いわゆる自治会を主張する新入生諸君と学校側と、会則等についての折り合いがなかなかつかず、現在の学友会の発足には 3 回生の入学まで俟たなければならなかったのでした。1 期生、2 期生のかたがたは御存じであります。そんなことで苦労するなんて腕のない大学当局として恥じ入るばかりですが、とにかく結果として 3 回生までの会費がプールされたので、それはそれで良かったのかもしれません。同窓会とは余り関係のない話になりましたが、こんな時に古い大学なら同窓会とはいわなくとも有力な卒業生の一人や二人が相談に乗ってくれたかもしれないと思ったことありました。

そのような無の状態から、昭和 54 年に第 1 期の卒業生 78 名が社会人に仲間入りし同窓会を発足させ、いま 10 年を経て 1,200 名を超える組織に成長したのです。その間にも、キャンパス内に開学十周年的記念植樹をしたり、会設立 5 周年には管理棟前庭に高さ 10 m の時計塔を寄贈するなど、母校に対してそれなりの立派な貢献をしてきています。これまでに運営してこられた歴代の役員のかたがたのご努力を多としなければなりません。同窓会はもちろん同期会などでも、お世話を献身してくれる人がいなければ、活動は難しいものです。

一方、それにもまして何よりも嬉しいことは、本学の卒業生である会員のお一人お一人が自分の仕事を通してそれぞれの持ち場で良い働きをされていると聞くことがあります。どんな小さな働きでも値打ちに大小はないの

です。無限大の理想に繋がっているからだと思います。その全体が同窓会であると思います。

近頃は卒後 5 周年 10 周年を機会に同期会が開かれたり関東とか四国とか地区ごとの同窓会も持たれるようになった由ですが、まことにご同慶に堪えません。同窓の関わりは苦楽哀歎を共通して持った長い学園生活に基づいています。臨床医、医学研究者、医療行政官、勤務医、独立開業医、まれには医を離れた人も、本学で学んだ人は、みんな旭川医科大学卒を履歴とするわけです。これを返上することはできません。かけがえのない時を共にしたのです。そして卒業生に対する世の評価も悪くないようです。喜ばれています。医師過剰時代といいますが良い働きをする医師が捨て去られることはないでしょう。社会では同窓会の皆さんに大きな期待をかけているのです。

いま、会員の 70% が道内、30% 道外とほぼ全国各地にわたり、海外で研究診療に従事する人も増えてきました。母校の助教授、講師も生まれました。今までどんなにほめられても、それは経験を積んだ指導的立場のものではありませんでした。若者としての評価でした。これからは一人前かどうかが問われるでしょう。皆さん的眼前には新しい馳せ場が限りなく広がっています。過去の評判などに拘束されることはありません。お一人お一人が毎日新しく前進されればよいことがあります。活躍に期待致します。会も、毎年新会員を迎えて、いよいよ充実してくるでしょう。新規事業を計画して下さい。どうか好もしい圧力団体として、学生たちに良い刺激を与えて下さい。立派な同窓会の存在が、更に活力ある若者を牽きつけるのです。この 10 年がこのことを実証しています。旭川医科大学同窓会の次の 10 年を待ち望んでお祝い申し上げます。おめでとうございました。

# 『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・参照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)、頁一頁、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、頁一頁、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、頁一頁、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っては、上記の様式に合わせることが望ましいが、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 ||

最近、グーグルの研究者が作った人工知能が、囲碁の試合で世界最強の一人であるとされる棋士に勝利しました。囲碁は打ち方が複雑で、コンピューターが一流棋士を打ち負かすのはまだ相当先と考えられていたそうです。また、人工知能が書いた小説もクオリティーが非常に高く、小説家を驚かせているようです。近い将来、人工知能に研究方法や論文の書き方を学ばせ、人工知能が執筆した学術論文が出てくるかもしれません。そうなると、研究者はコンピューターが考えた実験をコンピューターの指示通りに行うだけになってしまいます。

さて、旭川医科大学研究フォーラム第16巻をお届けします。本号では投稿論文が1編、「独創性のある生命科学研究」報告が32編、依頼稿が3編、エッセイ、学界の動向、教員執筆書籍紹介、旭川医科大学回顧録など盛りだくさんの内容です。ぜひ、ご一読下さい。

末筆ながら、ご執筆下さった皆様に感謝申し上げます。

(H.H)

## 第16号 表紙解説

いよいよ、ヒト：ホモ・サピエンスの登場です。ヒト（人類）の祖先が、チンパンジー・ボノボの祖先と別れたのは、700～800万年前頃と言われています（東大総合研究博物館：2016）。では、ヒトとはなにか？外形的には、脳が大きい（体重比）、二足歩行ができる。犬歯が発達していない。また、他の特徴としては、火を使用する、複雑な言語を話し他者とコミュニケーションができる、などがあります。では、何故そのような発達が可能となったのでしょうか。人類が誕生したアフリカの乾燥化に伴い、森林の縮小、サバンナの拡大等の環境変化に適応していく中で進化してきたとの説が有力です。

また、人類進化の大きな流れとしては、猿人（アウルソラロピテクス）、→ 原人（ホモ・エレクトス：直立歩行するヒト）、→ 旧人（ホモ・ネアンデルタレンシスなど）、→ 新人（ホモ・サピエンス：考えるヒト）であろうと言われています。「人類は、どこで生まれたのか？」の問には、「母方からしか受け継がれない細胞内のミトコンドリアの突然変異を解析する手法」を用いることによって、どの系統とどの系統が近いか、またいつ頃分岐したかといった調査が可能になったようです。それによると、現生人類の祖先は約16万年前（14万年前～29万年前）にアフリカに住んでいたらしいことがわかり、この人類共通の祖先はイヴ（ミトコンドリア・イヴ）と名付けられました。

（参照URL：<http://www.s-yamaga.jp/nanmono/seimeijinrui-01.htm>）

そのような思いを抱きながら表紙に目をやると、137億年前とも言われている、遙か昔のビッグバンからみると、極く直近に誕生した人類の、祖先から次の世代、また次の世代へと繋がってきた、生命（DNA）のバトンは、しっかりとその眩いばかりの光彩を放っています。さて、この光の次には、何が待ち構えているのでしょうか？ 満天に広がる milky way（天の川）を仰ぎながら、しばし想いを巡らすのも私たち：ホモ・サピエンスに許されたひと時かもしれません。

整形外科 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）

日下部博一（生物学）

谷口 隆信（生化学講座）

平 義樹（看護学講座）

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16巻** (通算17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

発行 平成28年3月31日

---

# ASAHIKAWA MEDICAL UNIVERSITY

## RESEARCH BULLETIN

### VOL. 16

### CONTENTS

#### Submissions

Prosody and Subject Ellipsis in <i>It Turns Out That</i> -Clause Construction.....	KUWANA Yasutomo	2
Essay .....	KUROSHIMA Akihiro	9
<b>Commissions</b>		
2013/2014 Innovative Research in Life Science		
1) Analysis of the causative genes of neonatal diabetes mellitus.....	FURUYA Akiko	11
2) Comparison of ROTEM with standard coagulation testing.....	KUROSAWA Atsushi	12
3) Control of lung metastasis in lung cancer by controlling bone marrow-derived Endothelial Progenitor cells (EPCs) .....	MINAMI Yoshinori	13
4) Effect of COMT genotype and entacapone on L-dopa pharmacokinetics.....	YAMAMOTO JYOU	15
5) Basic Research for Remyelination therapy in Multiple Sclerosis .....	BANDOU Yoshio	16
6) A morphological approach to intracellular protein degradation systems in gonadotropes.....	BOCHIMOTO Hiroki	17
7) Investigation of pupillary sphincter contraction mechanism in TRPC knock-out mice.....	KANEKO Toshiyuki	18
8) Establishment of quantitative evaluation of a new anti-anxiety drug by measuring fear reactions .....	MIYAZONO Sadaharu	19
9) Analysis of molecular mechanisms on sexual differences of gonadal somatic cells .....	YAZAWA Takashi	20
10) The role of prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$ in the regulation of human platelet function.....	KASHIWAGI Hitoshi	21
11) Glycolytic metabolic status affects mouse hepatocyte differentiation in vitro.....	FUJII Kiyonaga	22
12) The functional role of MDL-1 in the activation of neutrophils, alveolar macrophages, and peritoneal macrophages.....	AOKI Naoko	24
13) Functional analysis of collectin CL-K1 in mouse embryonic stages.....	MORI Kenichirou	25
14) Formaldehyde exposure in food affected intestinal immune system .....	NAKAGI Yoshihiko	26
15) Effects of prenatal yoga on perinatal outcomes.....	KAWANISHI Yasuyuki	28
16) Echinococcus multilocularis metacestodes evade host complement system - the function of E. multilocularis serinprotease inhibitor family.....	SASAKI Mizuki	28
17) The functional roles of lncRNAs on tumor invasion and metastasis in pancreatic cancer .....	TAKAHASHI Kenji	29
18) Analyzing the Mechanisms of impaired iron regulator hepcidin expression and intrahepatic excessive iron in non-alcoholic fatty liver model mice. ....	HASEBE Takumu	31
19) Magnetic resonance elastography assessment of liver stiffness in children with congenital heart disease undergoing the Fontan procedure and intracardiac repair.....	SUGIMOTO Masaya	34
20) Establishment of early diagnostic method of diabetic retinopathy by microglial morphometry based fractal theory .....	SIMOUCHI Akito	36
21) Up-regulation of CX3CR1 on tonsillar CD8+ T cells in patients with IgA nephropathy .....	OOTAKA Ryuuki	38
22) Identification of the genes causing male infertility and habitual abortion and its application to the clinical medicine.....	UEDA Hiroto	40
23) A development of high-resolution and partial volume effect cancel algorithm for PET-CT. ....	OKIZAKI Atsutaka	41
24) The effect of bone repair by intravenous injection of adipose tissue derived stem cells .....	OKA Kumiko	42
25) Toward the establishment of NIRS based diagnostic aid system for ADHD. ....	IKEGAMI Masanaga	45
26) Quantification of connectivity of trabecular bone microstructure with computational topology .....	TERAMOTO Takashi	47
27) Effect of calcium ionophore treatment on acrosome reaction, motility, and fertilizing ability of mouse immature spermatozoa .....	HINO Toshiaki	48
28) A Study of Deactivation and Degradation of Antineoplastic Drugs by Ozonated Water .....	ONO Takashi	50
2013/2014 Innovative Research in Life Science		
New uroflowmetry measurement by wearable airborne ultrasound continuous wave Doppler System .....	MATSUMOTO Seiji	52
Brain signal decoding and real-time feedback for developing new Brain Machine Interfaces .....	KAMADA Kyousuke	57
Control of Zoonoses in Asia: Development of Rapid Diagnoses/Prevalence Estimation Methods and International Medical Contribution for the Eradication of Infectious Diseases .....	SAKO Yasuhito	68
Development of procedures measuring the chain length of polyphosphates (poly P) and making an enteric-coated poly P .....	FUJIYA Mikihiro	72
〔Arts in Hospital〕 at Asahikawa Medical University		
HATTORI Yukari, KIKUCHI Mariko, UEDA Junko, MORIYA Kiyoshi, OOTUBO Tomomi .....	77	
Training course of Reproductive Engineering Techniques for mice in Asahikawa 2015 .....	SHIMIZU Norihiko	80
JICA Training course JFY 2015 "Health System Management for Regional and District Health Management Officers for African Countries" .....	82	
News .....	MATSUDA Mituyoshi / ISIKO Satoshi / KAMADA Kyousukei	94
Books .....	SUZUKI Akihiro	101
Material .....	FUJIO Hitoshi	103
Editor's Note/Cover Story .....		108