

2009年度
共同研究等助成事業報告集

財団法人 日中医学協会

2009年度共同研究等助成事業報告集目次

1. 調査・共同研究

金子	修	ヒト感染性マラリア原虫中国流行地株の分子疫学	1
吉田	弘	広東省における環境水調査によるポリオウイルス検出法の研究	6
大坂	巖	終末期がん患者の苦痛症状に対する鍼治療の有用性に関する研究	12
村松	正明	中国漢民族におけるCIDEA遺伝子多型と肥満との相関に関する研究	17
渡邊	泰男	神経因性疼痛における一酸化窒素の分子病態 カリウム受容キナーゼの調節機構	22
塚本	徹哉	スナネズミモデルにおけるグリチルリチン酸のH.pylori感染胃発癌への予防効果	29
井内	康輝	アスベスト(石綿)曝露による健康障害に関する日中共同研究	35
川上	和義	肺炎球菌ワクチンに対する免疫応答性の日中間における比較に関する研究	39
馬	峰	iPS細胞を利用した先天性骨髄不全症候群の病態解析と治療法の開発	44
江頭	健輔	単球選択的ナノDDS技術を基盤とする急性心筋梗塞症(不安定化プラークの破綻による血栓形成)	49
川野	仁	脊椎損傷の治療のための損傷後の中枢神経系における神経再生に関する研究	55
福永	浩司	神経変性疾患治療薬のトランスレーショナルリサーチの基盤形成	59
許	煥麗	先進的スクリーニング技術を導入したウイルス性肝炎に対する新規治療薬の開発	65
酒井	郁子	四川大地震被災住民のリハビリテーション看護に関するニーズに応じた看護現任教育プログラムの開発	68

2. 中国人研究者・技術者招聘

中尾	稔	中国四川省における囊虫症流行に関する免疫・分子疫学研究	73
菱田	明	シスラプチン誘発急性腎不全の抵抗性獲得におけるNFκB活性化の役割の検討	77

3. 在留中国人研究者

朱	海雷	Nav1.6をコードする遺伝子欠損マウスを用いた平滑筋型電位依存性Na ⁺ チャネルの生理学的役割の解明	82
王	洪輝	新しく見つけた血管平滑筋収縮制御の解析	88
路	平	アルツハイマー病動物モデルを用いたsilibininの薬効評価	94
黄	岩杰	高塩分摂取による腎線維化の進行における腎組織受容体随伴プロレニン系と尿細管レニン発現	100
王	璋	宿主由来HGFによる変異型EGFR陽性肺癌のゲフィチニブ耐性機構解析とその克服	109
漆	智	豚島の長期保存及び皮下移植におけるpolyvinyl alcohol(PVA)マクロカプセル化豚島の応用	114
王	麗楊	前立腺がんの造骨性骨転移のメカニズム解明	120

4. トラベルグラント

森山	紀之	第32回 日本呼吸器内視鏡学会学術集会	124
武田	卓	仙台中西医学研究会	125
戴	昭宇	中医診断学日中フォーラム	126

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

平成 22 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 金子 修 
所属機関名： 長崎大学 熱帯医学研究所
所属部署名： 原虫学分野 職名： 教授
所在地： 長崎県長崎市坂本 1 丁目 12-4
電 話： 095-819-7838 内線： 7838

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

ヒト感染性マラリア原虫中国流行地株の分子疫学

3. 成果の概要

三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられ、ヒト免疫と思われる選択圧がかかっている多型抗原 PvSTP1 について、①4 年間でアミノ酸アレルが変化するか、②アレル頻度分布は 4 年間で一定か、③特定の型が病原性と関連するかについて解析した。2004 年の 21 配列、2008 年の 13 配列を用いて解析を行ったところ、4 年間で有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルが 21 あった。また、アレル頻度分布は、4 年間でシステインに富む CRD と呼ばれる領域は多型の VAR 領域と比較して有意に変化が少なかった。①CRD が平衡淘汰にさらされている可能性、②宿主免疫を逃れるために VAR の多型性による抗原変異を起こしている可能性、の二点の可能性が考えられた。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 金子 修	職名：教授
所属機関名：長崎大学 熱帯医学研究所	部署名：原虫学分野
中国側研究者氏名： 曹 雅明	職名：教授
所属機関名：中国医科大学 基礎医学院	部署名：抗感染免疫研究室

ヒト感染性マラリア原虫中国流行地株の分子疫学

研究者氏名	金子修
日本研究機関	長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野
中国共同研究者	曹雅明、王各各、朱晓彤
中国研究機関	中国医科大学基礎医学院抗感染免疫研究室

要旨：

中国南部では依然として三日熱マラリアが流行し問題となっている。三日熱マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、ロゼット形成や細胞接着現象を起こし、病原性との関連が予想されるが詳細はあきらかでない。そこで、三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられ、ヒト免疫と思われる選択圧がかかっている多型抗原 PvSTP1 について、2004 年と 2008 年に収集した原虫を用いて、①2004 年に見られたアミノ酸アレルが 2008 年にも存在するか、②アレルの頻度分布は 4 年間で一定か、③特定の型の PvSTP1 が三日熱マラリア原虫の病原性と関連するかについて解析した。2004 年の 21 配列、2008 年の 13 配列を用いて解析を行ったところ、2004 年に見られ 2008 年では有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルが 21 ある一方、2004 年に見られず 2008 年にみられるようになったアミノ酸アレルが 4 つあった。さらに、2004 年と 2008 年の間に GRD ではアレル頻度が VAR と比較して変化が少ないことが分かったため、①GRD が平衡淘汰にさらされている可能性、②宿主免疫を逃れるために VAR の多型性を用いて抗原変異を起こしている可能性、の二点の可能性を考えた。これを明らかにするために中立遺伝子のアレル頻度の変化の解析を行うことが必要と考えられる。また、特定の PvSTP1 アレルと病原性との関連は見られなかったが、さらに多くの塩基配列を加えて解析を行う必要がある。

Key Words 三日熱マラリア、抗原、多型性、

緒言：

中国の南部では依然として三日熱マラリアが流行し、他の感染症との合併による間接的な死亡や体力低下に伴った生産性の低下による経済的損失が問題となっている。三日熱マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、感染赤血球が非感染赤血球に接着するロゼット形成と呼ばれる現象を起こし、病原性との関連が予想されているが、詳細はあきらかでない。我々は最近、熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球表面に発現する SURFIN という分子を同定したが、その三日熱マラリア原虫の相同体である PvSTP1 は三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられる[1]。このような分子は、マラリア病原性の解析のカギとなるのみならず、ヒト免疫にも直接さらされるワクチン候補と考えられるため、PvSTP1 の解析は重要な課題である。

現在までに、我々の教室では抗 PvSTP マウス抗体をすでに作成し、分子レベルでの基礎的解析を行っているが、同時に、曹博士が 2004 年に収集し、保管していた中国の雲南省、浙江省、湖北省の 3 つの異なる地区の三日熱マラリア原虫 DNA (各地区 20 標本ずつ) について PvSTP の塩基配列を決定した。その結果、PvSTP は非常に多型で、多くのアレルが存在することがわかった。また、集団遺伝学的統計解析により、ヒト免疫によると思われる淘汰圧を検出することができた。

そこで、本研究では PvSTP1 のアレル頻度が経年的に変化するのかどうかを、2004 年と 2008 年に収集した原虫を用いて、①2004 年度に見られたアレルがまだ存在するかどうか、②アレルの頻度分布は安定して存在しているのか(抗原変異を起こすか)、③特定の型の PvSTP1 が三日熱マラリア原虫の病原性と関連するかを解析することで、将来、この分子を標的とするコントロール戦略を立てる基礎情報を得ることを目的として行った。

対象と方法：

A. 三日熱マラリア患者からのマラリア原虫の採取

三日熱マラリア原虫標本は、2008年、中国国内の雲南省のマラリア流行地において患者の同意を得た後にマラリア感染血液を濾紙に採取することで曹雅明により集められた。

B. DNA抽出とPCR増幅、塩基配列決定（図1）

濾紙からのマラリア原虫DNAの抽出を市販のDNA抽出試薬（EZ1 DNA Tissue Kit; Qiagen）を用いて行った。抽出したDNAを鋳型として、KOD-Plus- DNA polymeraseを用いてPvSTP1の細胞外領域をコードするDNA断片のPCR増幅をおこなった。PvSTP1にはSalI型とIVD10型があるため、5'側プライマーはSalI型特異的プライマー（TTTCATTTCAAAAATATGTATTACTCTTG）とIVD10型特異的プライマー（TTTCATTTCAAAAATATGTATTACTCTTG）、3'側プライマーは共通プライマー（AAGAAGGAAAA TAAATGTGATAAAGCC）を用いてInitial PCRを行い、このPCR産物を鋳型として、SalI型Nested用プライマー（GAAAACAAACTTATAATATAATGCA）もしくは、IVD10型Nested用プライマー（ACATAGTACTAT GTGTCTTGAAATATG）とInitial PCRに用いた3'側プライマーを用いてSeminested PCRを行った。塩基配列決定はPCR産物を鋳型とする直接シーケンス法により行った。反応は2回に分けて行い、一つは5' primerにより、もう一つは3' primerによりシーケンス反応を行うことにより、PCR増幅反応中のエラーが入らないように注意した。

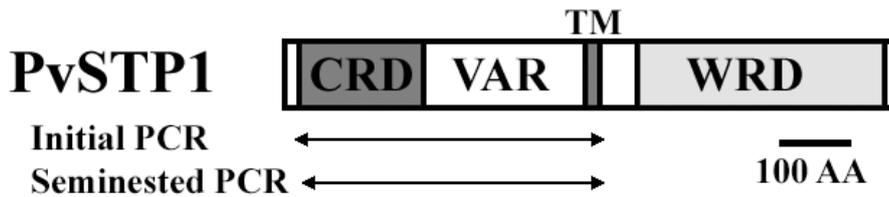


図1. PvSTP1の模式図。細胞外領域にあるCystein-rich domain (CRD)とVariable domain (VAR)、細胞内領域にあるTryptophan-rich domain (WRD)、および膜貫通領域(TM)を示す。図の下に、Initial PCRとSeminested PCRにより増幅される部位を示す。スケールバー=100アミノ酸。

C. 統計学的解析

得られた塩基配列より、予想アミノ酸配列を決定し、2004年度に雲南省の三日熱マラリア原虫から得られたPvSTP1のアレルと比較した。多型を示す全てのアミノ酸部位について、アミノ酸の頻度分布が2004年と2008年の群で有意に異なるかどうかをFisher's exact testにより検討した。また、PvSTP1の二つの領域、①種々のマラリア原虫の相同体間において保存されているシステインが豊富なCystein-Rich Domain(CRD)と②種々のマラリア原虫の相同体間において非常に多型性に富むVariable Domain (VAR)の間で、頻度分布が変化しているアミノ酸部位の数が有意にことなるかどうかをカイニ乗検定で検討した。P<0.05を有意に異なるとした。

結果：

顕微鏡検査にて三日熱マラリア原虫と診断された52標本について、IVD10型プライマーを用いてPCR増幅をおこなったところ、27標本についてPvSTP1遺伝子断片をPCR増幅することが出来た。残りの25標本についてSalI型プライマーを持ちいてPCR増幅をおこなったところ、25標本すべてについて、PvSTP1遺伝子断片の増幅ができた。これらのPCR産物の直接塩基配列決定を行ったところ、IVD10型プライマーにより増幅された27のPCR産物のうち、18が重複感染で9つが単一アレル優位であった。SalI型プライマーにより増幅された25のPCR産物のうち、21が重複感染で4つが単一アレル優位であった。そこで単一アレル優位の合計13の塩基配列を用いて2004年度に15標本から得られた21の塩基配列と比較解析することとした。

①2004 年度に見られ 2008 年度では有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルがある。

2004 年標本にみられたが、その頻度が有意に減少して 2008 年標本では検出されなかったアミノ酸は SalI 株のアミノ酸配列を基準として、N²⁸、I³⁵、N¹³⁸、A¹³⁹、P¹⁴¹、K¹⁴³、S²⁸³、N²⁹⁸、E³¹⁸、T³²²、P³²⁵、D³³⁰、P³³⁷、A³³⁸、A³⁴⁰、D³⁴¹、I³⁵⁰、L³⁵¹、H³⁸¹、A³⁹⁵、H³⁹⁶ の 21 アミノ酸あった。逆に、2004 年標本には見られなかったが、その頻度が有意に増加して 2008 年標本で検出されたアミノ酸は同様に、T¹⁴³、E²³⁵、Q²⁶³、K²⁶⁶ の 4 アミノ酸であった。

②VAR と比べて CRD ではアレル頻度分布は比較的安定していた。

2004 年と 2008 年の間で頻度分布が変化していた個所は、CRD (アミノ酸部位 23-199) で見つかった 75 の多型部位中 15 個所であった、また、VAR (アミノ酸部位 200-416) で見つかった 91 の多型部位中 35 個所であった。CRD と VAR において比較したところ、有意に CRD の方が、頻度分布が安定して存在していることがわかった (P < 0.01)。

PvSTP1 細胞外領域	100 AA	
	CRD	VAR
頻度分布が 変化した部位	15	35
多型部位	75	91 (P < 0.01)

図 2. PvSTP1 細胞外領域 Cystein-rich domain (CRD) と Variable domain (VAR) における頻度分布の変化した部位の程度。スケールバー = 100 アミノ酸。

③特定の PvSTP1 アレルと発熱の有無や原虫感染率との関連は見られなかった。

2004 年と 2008 年の全てのサンプルをまとめた 34 塩基配列と患者発熱の有無および感染率との相関を検討したが有意な関連を見出すことはできなかった。

考 察：

本研究では PvSTP1 のアレル頻度が経年的に変化するのかどうかを中心に解析を行ったところ、2004 年と 2008 年の間に、CRD ではアレル頻度が VAR と比較して変化が少ないことが分かった。CRD はシステインに富んだ領域で種々のマラリア原虫間で保存性が高く、三日熱マラリア原虫では 300 ものメンバーを持つ VIR と呼ばれる多重遺伝子族にドメイン・シャッフリングにより使用されるようになっており、未同定ではあるが重要な機能を有すると考えられている。4 年間の年月にもかかわらず、この領域の多くの多型部位のアミノ酸アレル頻度が一定であること、VAR ではアレル頻度が多い多型部位で変化していることは、CRD が平衡淘汰にさらされているか、あるいは逆に VAR が多型性により抗原変異を起こしているかの可能性があると考えられる。マラリア原虫抗原に対する平衡淘汰については、熱帯熱マラリア原虫の主要抗原である MSP1 について解析が行われ、第二領域と呼ばれる多型部位が異なる地域間でもアレル頻度が一定であることが報告されている [2]。熱帯熱マラリア原虫の MSP1 については、さらにアレル頻度は経年的には変化しないことが報告されており、熱帯熱マラリア原虫と三日熱マラリア原虫と言う差はあるものの、VAR のアレル頻度の経年変化はさらなる検討を要する。そのためには、中立遺伝子に関するアレル頻度の変化の解析と、さらに後年の標本を用いてこの点を確認することが必要である。また、2008 年に解析した配列数が少ないため、各種の関連解析の検出感度が低くなっている。そのため、

重複感染がみられた標本について大腸菌を用いたクローニングを行って、さらに多くの塩基配列を加えて解析を行う必要がある。

参考文献：

1. Winter G, Kawai S, Haeggstrom M, Kaneko O, von Euler A, Kawazu S, Palm D, Fernandez V, Wahlgren M. "SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes." *J Exp Med* 201(11):1853-63 (2005).
2. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola AM, Kremsner PG, Arnot DE, Greenwood BM, McBride JS. "A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses." *Nat Med* 6(6):689-92 (2000).

作成日：2010年3月14日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2010 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 吉田 弘 
所属機関名：国立感染症研究所
所属部署名：ウイルス第二部 職名：主任研究官
所在地：東京都武蔵村山市学園 4-7-1
電 話：042-561-0771 内線：3358

1. 助成金額：1, 000, 000 円

2. 研究テーマ

広東省における環境水調査によるポリオウイルス検出法の研究

3. 成果の概要

広東省広州市をパイロットエリアとして、ポリオウイルスを検出すべく環境ウイルスサーベイランスを行った結果、①AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランスと比べ、ウイルス分離頻度が高いこと、②ポリオウイルスは 1-3 型ともコンスタントに分離されており、VP1 領域における塩基置換は生ワクチン株と比較して 1%未満であることから、OPV 定期接種のアセスメントツールとして有用であることを示した。このことは広東省のような流動人口を多く抱える省において、従来の AFP サーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

※発表論文等：なし

4. 研究組織

日本側研究者氏名：吉田 弘
所属機関名：国立感染症研究所
中国側研究者氏名：郑焕英
所属機関名：広東省 CDC

職名：主任研究官
部署名：ウイルス第二部
職名：副主任技師
部署名：ポリオ実験室

広東省における環境水調査によるポリオウイルス検出法の研究

研究者氏名	吉田 弘
日本研究機関	国立感染症研究所 ウイルス二部主任研究官
共同研究者氏名	郑 煥英
中国所属機関	広東省CDCポリオ実験室 副主任技師

研究要旨

広東省広州市をパイロットエリアとして、ポリオウイルスを検出すべく環境ウイルスサーベイランスを行った。2008年4月から2009年11月までの流入下水調査の結果、①AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランスと比べ、ウイルス分離頻度が高いこと、②ポリオウイルスは1-3型ともコンスタントに分離されており、VP1領域における塩基置換は生ワクチン株と比較して1%未満であることから、OPV定期接種のアセスメントツールとして有用であること、を示した。このことは広東省のような流動人口を多く抱える省において、従来のAFPサーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

Key words : ポリオ根絶計画、環境サーベイランス

緒言

ポリオ根絶計画では、生ポリオワクチン(OPV)投与によりヒト集団中の野生株ポリオ(PV)ウイルスの消失を、AFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランス下の実験室診断で確認をしている。中国は10年以上野生株フリーの状況であるが、近隣のパキスタン、インド等で流行しているため野生株の輸入のリスクは依然として存在する。これはPV感染の多くが不顕性であり健常者がリザーバーになるためである。

OPV接種後、ワクチン株はヒトの腸管で増殖し免疫を誘導するが、同時にウイルスゲノム上ではわずかに変異が起こり、糞便中に排泄される。集団免疫が高ければ排泄されたウイルスがヒト集団に広まることはないが、OPV接種率が低下すると、ヒト-ヒト感染を繰り返しゲノム上に変異が蓄積した強毒型ワクチン由来株(VDPV)が出現する。中国ではVDPVによる流行が貴州省(2004年)他で問題となった。

環境ウイルスサーベイランスは、ヒトから環境水に排泄されたPVを調べることで、顕性、不顕性感染に関わらず地域に流行するウイルスを高感度に検出できる可能性がある(1)。実際2007年にスイスジュネーブ市では、患者感染例はなかったがチャド由来野生株が下水中より検出されたことにより、輸入リスク評価のツールとして有用性が認められている。WHOは“2010-12年行動計画”(2)の中で環境ウイルスサーベイランスを導入する計画である。本課題では、2008年以来、広東省CDCと共同研究を行っている環境ウイルスサーベイランスにより、ポリオウイルス野生株輸入・VDPVリスク対策方法として導入可能か検討する。

材料と方法

環境水採取エリア：広東省広州市内（人口約 1000 万人、流動人口約 300 万人）を流れる珠江（1 箇所）及び天河地区猎德下水処理場の流入下水（2 箇所）にて、2008 年 4 月から月 2 回の頻度で 2010 年 3 月まで 2 年間継続した。なお既に河川、下水処理場からのサンプリングについては広州市監督官庁から承認済み。

ウイルス分離同定：流入下水（500ml）を出発材料に、疎遠心（3000 rpm、30 分）後、上清に塩化マグネシウムを添加（最終濃度 0.05M）し、pH3.5 に調整。加圧ろ過装置（KST142、アドバンテック）に装着した陰電荷膜（A045A142、アドバンテック）にてウイルス吸着。3% beef extract（10ml）存在下、2mmプローブを用いて 1 分間超音波処理（VP-5S、タイテック）を行いウイルス誘出を 2 回行った。膜より誘出した濃縮液を 0.45um フィルターにてろ過後、RD, HEp-2、Vero、L20B 細胞へ 0.2ml ずつ接種、2 代継代を行った。なお RD, HEp-2、Vero で CPE 陽性の場合は L20B に再接種しポリオウイルスの有無を確認した。分離ウイルスは、ポリオ抗血清を用いて中和法にて型別同定を行った。

ポリオウイルス遺伝子解析

ポリオウイルスはRNA抽出後、ウイルスゲノム VP1 領域をターゲットとした UG1, UC11 プライマーセットを用いて RT-PCR にて増幅。得られた PCR 産物をダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、1-3 型ワクチン株と比較した。

結果

環境水採取：2008 年 4 月から 2009 年 11 月まで、下水処理場流入口 1 号、3 号から月 2 回、合計 20 回採水。80 試料を得た。

ウイルス分離、同定：80 試料を RD、HEp-2、Vero、L20B に接種したところ、各々 80、61、15、29 株分離された。これらのウイルスについてはポリオ以外のエンテロウイルスも混ざっているため検査続行中である。

L20B に接種/再接種して分離されたポリオウイルスに関しては 2008 年 3 月から 2009 年 11 月までに 1 型 14 株、2 型 32 株、3 型 14 株、計 60 株が分離された。また 2008 年 6 月を除き毎月ポリオウイルスが分離されている（表 1）。これは広東省における AFP サーベイランスより高い分離頻度である（3）

1-3 型分離株について、VP1 領域の塩基配列を調べたところ、ワクチン株と 1% 以下の違いであり、すべて Sabin-like 株と判定された（図 1）。

考察

本研究では従来の AFP サーベイランスとポリオウイルス分離頻度の比較検討を行い野生株輸入・VDPV 検出法としての妥当性、ヒト集団中のエンテロウイルス流行を包括的に把握するツールとしての適用性を研究目的とした。先行研究を含め 2 年間の調査を通じ、①AFP サーベイランスによるポリオ分離率に比べ高頻度にポリオウイルスが分離できること、②VP1 領域の遺伝子解析により分離株は Sabin-like 株であったことから、OPV 定期接種状況を把握するモニタリングツールとしても適用できる可能性、③未同定ではあるもの多量のエンテロウイルスの地域流行の可能性、を示唆している。

野生株ポリオフリー地域では、集団免疫低下に伴う VDPV のアウトブレイクの危険性が存在する。本研究で行った遺伝子解析の結果、分離ウイルス株の変異が 1% 以内であることから、広東省広州市では、OPV 接種状況が良好であることが示唆される。このこ

とは広東省のような流動人口を多く抱え、疾患サーベイランスが困難な省において、従来のAFPサーベイランスの補助的な役割として、高感度にワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）や輸入野生株を検出する方法として期待できる。

他方、新疆ウイグル自治区のように広大な面積を有し、流行国であるパキスタンに隣接するような省では、国境地域に環境ウイルスサーベイランスを導入することで輸入リスク対応として期待できる。

（研究協力者）

中国広東省 CDC Dr. Ke Changwen

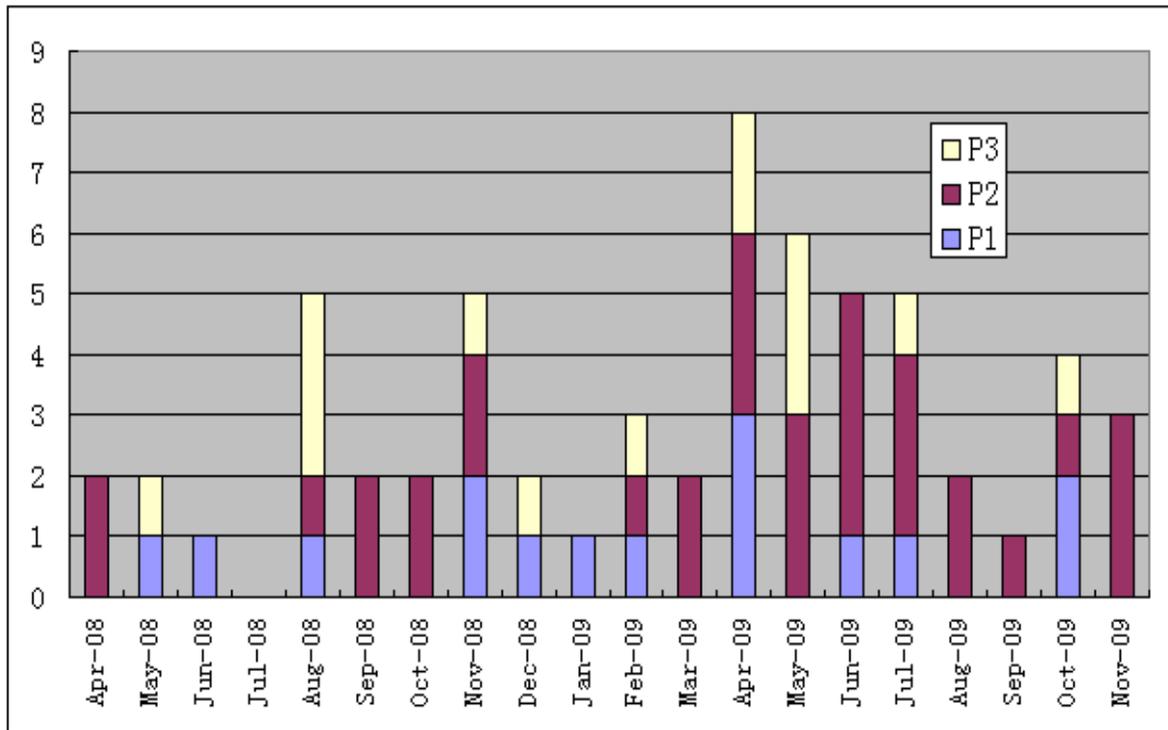
中国 CDC ポリオ実験室 Dr. XuWenbo, Dr. ZhangYong.

参考文献

- 1) 岩井雅恵 中村一哉 小原真弓 堀元栄詞 長谷川澄代 倉田 毅 滝澤剛則 吉田 弘 環境水サーベイランスによるポリオウイルス伝播の監視－富山県 IASR Vol. 30 p. 180-181: 2009年7月号
- 2) <http://www.wpro.who.int/sites/epi/documents/PolioWeeklyBulletin.htm>
- 3) http://www.polioeradication.org/content/publications/GPEI_ProgrammeofWorkStructureNovember2009.pdf

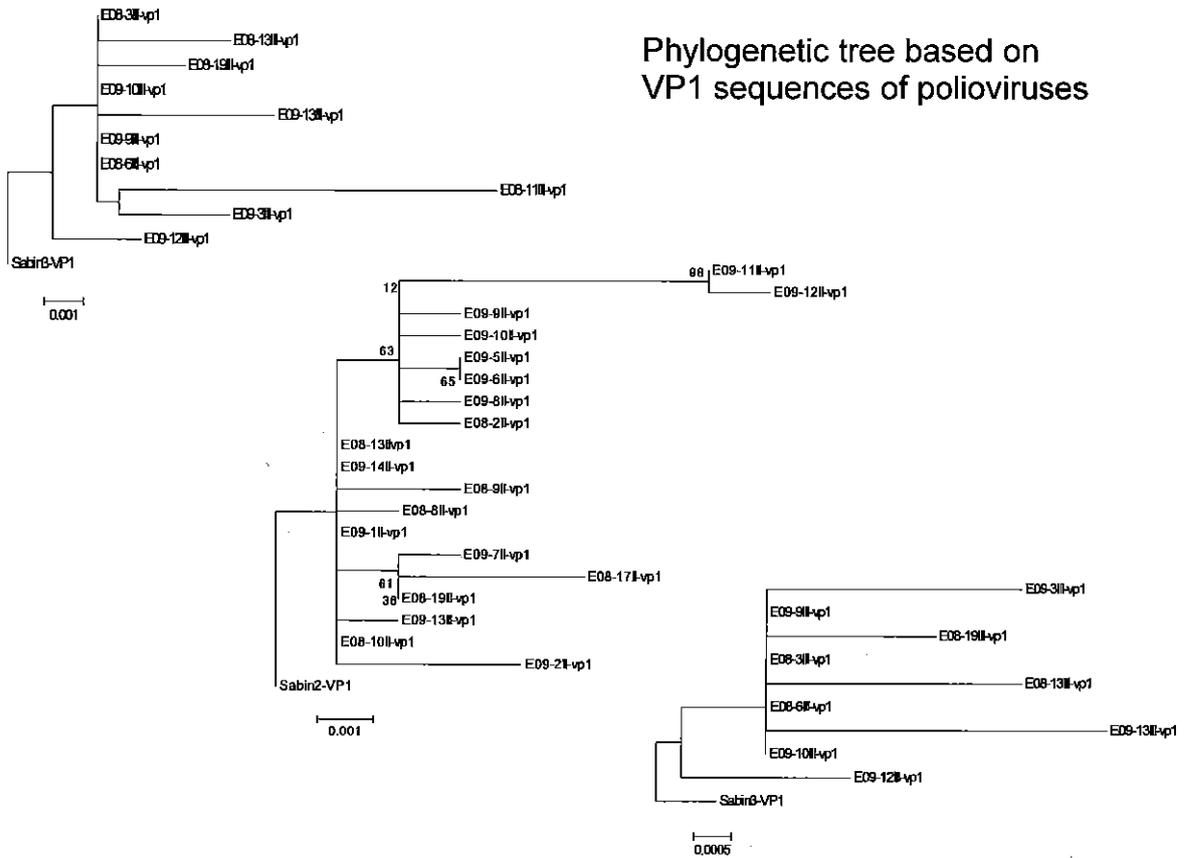
作成日：2010年3月11日

図1 天河地区猎德下水処理場の流入下水（2箇所）におけるポリオウイルス分離
 (2008.4-2009.11)



横軸は採取月、縦軸は分離数を示す。P1, 2, 3 はそれぞれポリオ1型、2型、3型。

図 2



広東省広州市内の下水由来ポリオウイルス 1-3 型とのワクチン株と VP1 領域にて 1%以下の塩基置換であることを示す。

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 大坂 巖 
所属機関名：静岡県立静岡がんセンター
所属部署名：緩和医療科 職名：医長
所在地：静岡県駿東郡長泉町下長窪 1007
電 話：055-989-5222 内線：6105

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

終末期がん患者の苦痛症状に対する鍼治療の有用性の検証

3. 成果の概要

終末期がん患者に対して MD アンダーソン症状評価表日本語版 (MDASI-J) を用いて鍼治療前後での種々の苦痛症状の変化と、EORTC-QLQ-C30 による QOL の変化を測定した。共同研究者である佐々木弘鍼灸師が中医学に基づいた診察を行い、虚証に対する治療 (本治) を行った上で、主訴に対する治療 (標治) を行った。15 例に対して計 68 回の治療を行った。経穴の選定に関しては、王健教授のアドバイスをお願いした。治療前後において、疼痛、倦怠感、しびれが有意な低下を示した。MDASI-J にて 3 ポイント以上の低下は 6 例において認められ、不眠、食思不振、眠気、口渴、倦怠感、呼吸苦、しびれが多かった。QOL は有意な改善は認められなかった。MDASI-J によって潜在的な苦痛症状が明らかとなり、本治により改善した可能性がある。症例数の蓄積により、治療効果が期待できる症状およびその時期などがより明確にされうる。

4. 研究組織

日本側研究者氏名：大坂 巖	職名：医長
所属機関名：静岡県立静岡がんセンター	部署名：緩和医療科
中国側研究者氏名：王 健	職名：教授
所属機関名：遼寧中医薬大学付属病院	部署名：鍼灸科

終末期がん患者の苦痛症状に対する鍼治療の有用性の検証

研究者氏名	大坂 巖
所属機関	静岡県立静岡がんセンター緩和医療科
共同研究者	王 健
中国所属機関	遼寧中医薬大学附属病院鍼灸科
共同研究者	佐々木 弘

要 旨

終末期がん患者の苦痛に対して、補完代替医療（CAM）が患者のQOLを向上させられる可能性がある。鍼灸治療は中医学の根幹をなす確立された標準的治療であり、CAMの中でも最もevidenceが豊富な治療である。がん患者の症状緩和に関する研究は存在するが、これらの多くは抗がん治療が可能な状態の患者を対象としていることが多く、予後が限られている患者を対象とした研究は皆無に等しい。今回、終末期がん患者に対して包括的症状評価ツールであるMDアンダーソン症状評価表日本語版（MDASI-J）を用い、鍼治療前後での種々の苦痛症状の変化を検討した。あわせてEORTC-QLQ-C30によるQOLの変化も測定した。鍼治療は1名の鍼灸師が中医学に基づいた診察を行い、虚証に対する治療（本治）を行った上で、主訴に対する治療（標治）を行った。15例に対して計68回の治療を行ったが、46回の治療において評価が可能であった。治療前後において、疼痛（ $P < 0.001$ ）、倦怠感（ $P = 0.032$ ）、しびれ（ $P = 0.004$ ）が有意な低下を示した。MDASI-Jにて3ポイント以上の低下は、6例において認められた。改善した症状としては不眠、食思不振、眠気、口渇、倦怠感、呼吸苦、しびれが多かった。QOLは有意な改善は認められなかった。治療開始から死亡日までは中央値21.5日であった。MDASI-Jにより明らかになった潜在的な苦痛症状が本治により改善した可能性がある。症例数の蓄積により、治療効果が期待できる症状およびその時期などがより明確となることが期待される。

Key Words 鍼治療, 終末期, がん, 苦痛症状, MDASI-J

緒 言 :

終末期がん患者の苦痛に対して、標準的な医療やケアのみでは対応不十分なことが多い。補完代替医療（CAM）が患者のQOLを向上させられる可能性があることは以前より指摘されている。鍼灸治療は中医学の根幹をなす確立された標準的治療であり、CAMの中でも最もevidenceが豊富な治療である。がん患者の疼痛、嘔気、倦怠感、呼吸困難感、口腔乾燥などの症状緩和に有効であることが報告されている。しかし、これらの研究の多くは抗がん治療が可能な状態の患者を対象としていることが多く、終末期がん患者を対象とした研究報告は皆無に等しい。終末期がん

患者の症状緩和に関しても鍼灸治療が有効であることが明らかにされれば、患者の QOL 向上に大きく貢献できる可能性がある。特に polypharmacy に陥りがちな緩和医療においては、薬物療法以外の治療方法の選択肢が増えることの意義は非常に大きい。苦痛症状を有する終末期がん患者に対して鍼灸治療を実施し、症状の改善度を検討することとした。

対象と方法：

2009 年 9 月～2010 年 2 月までに当院緩和ケア病棟に入院中の患者のうち、以下の適格基準を満たし、鍼治療の希望がある患者に対して鍼治療を実施した。

【適格基準】

- ・ 緩和ケア病棟入院中の患者
- ・ 何らかの苦痛を有する患者
- ・ 自記式質問票に回答可能な患者

【除外基準】

- ・ 血小板減少症 (PLT < 50,000/ μ L) がある患者
- ・ 臨床的に予後が 1 週間以内と予測される患者

【方法】

1 名の鍼灸師 (三島広小路治療院 佐々木弘鍼灸師) が中医学に基づいた診察を行い、虚証に対する治療 (本治) を行った上で、各種症状緩和に対する治療 (標治) を行った。本治に対する治療として、肺虚には太淵 (LU9) や太白 (SP3)、脾虚には太都 (SP2) や太白 (SP3)、肝虚には曲泉 (LR8) や復溜 (KI7)、腎虚には復溜 (KI7)、陰谷 (KI10)、尺沢 (LU5)、太淵 (LU9) など、心虚には神門 (HT7) などを主に取穴した。経穴の選定に関しては、あらかじめ王健教授のアドバイスを受けた。施術は 1 回 30 分以内とし、原則的に週 2 回行った。治療当日の治療前と 1 日後に、症状評価として MD アンダーソン症状評価票日本語版 (MDASI-J) を、QOL 評価として EORTC-QLQ-C15PAL (The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C15PAL) の item15 (1:とても悪いから 7:とてもよいの 7 件法) を各々測定した。

主要エンドポイントは MDASI-J により測定される鍼治療前後の 11 症状 (疼痛、倦怠感、嘔気、不眠、呼吸苦、食思不振、便秘、眠気、口渇、抑うつ気分、しびれ) のスコアの変化であり、副次的エンドポイントは EORTC-QLQ-C15PAL により測定される鍼治療前後の QOL の変化とした。治療前後での評価項目を t-検定にて各々の統計学的検討を行った。研究開始に際しては、当院倫理審査委員会にて承認を受け、患者本人に同意を得た上で行った。

結 果：

計 15 例に対して計 68 回の鍼治療を実施したが、症状評価が実施できたのは計 46 回であった。年齢は 42～83 歳であり、平均 65.2 歳 (中央値 64 歳)、性別は男性 7 例、女性 8 例であった。PS は 1 が 1 例、2 が 2 例、3 が 9 例、4 が 3 例であった。各症例の原疾患、転移部位、主訴、治療回数および中医学にもとづく虚証は表 1 に示す。

表1 症例一覧

No.	原疾患	転移	主訴	治療回数	虚証				
					肺	脾	肝	腎	心
1	肝細胞癌	骨	腰痛、下肢しびれ、上肢脱力	13	1	1		4	
2	胃癌	腹膜	腰痛	1			1		
3	胆管癌	腹膜、肝、骨	腰痛、下肢しびれ、便秘	3	1	1	1	1	
4	大腸癌	脳	半身痛	3	1	1			
5	肺癌	脳、骨	肩痛	4	1	2	2		1
6	子宮頸癌	肺	下肢痛	6			3	3	1
7	卵巣癌	腹膜	便秘、腹部膨満感	3		3	3		
8	前立腺癌	骨	倦怠感、肩痛	4	4	1		3	
9	膀胱癌	肺、胸膜	肩凝り	2	1			1	
10	膵癌		腰痛	1		1		1	
11	肺癌		四肢のしびれ	18	17			2	
12	胃癌	肝、腹膜	倦怠感	4	3	2		1	
13	胃癌	肝	下肢のだるさ	3				1	
14	肺癌		背部痛	2	2				
15	乳癌		上肢のしびれ	1	1			1	

治療前後において MDASI-J による改善を認めた症状は、疼痛、倦怠感、しびれであった。また、症状毎に 3 ポイント以上の改善を認めたものは、疼痛 2 回、倦怠感 3 回、嘔気 2 回、不眠 5 回、呼吸苦 3 回、食思不振 5 回、便秘 3 回、眠気 5 回、口渇 4 回、抑うつ気分 3 回、しびれ 4 回であったが、増悪をみとめたものは嘔気 1 回、不眠 5 回、呼吸苦 2 回、食思不振 1 回、便秘 1 回、眠気 5 回、口渇 1 回、抑うつ気分 1 回であった。

さらに、1 回でも 3 ポイント以上の改善を認めた症例数は 6 例であり、内訳は不眠、食思不振、眠気、口渇が 4 例、倦怠感、呼吸苦、しびれが 3 例、疼痛、便秘、抑うつが 2 例、嘔気が 1 例であった。

QOL は治療前と治療後は各々 4.2 ± 1.0 、 4.4 ± 1.2 であり、有意な改善は認められなかったが、6 回において 2 ポイント以上の改善を認めたが、2 回において増悪を認めた。

治療開始から死亡日までの日数は 30.5 ± 22.3 (平均 \pm 標準偏差) 日、中央値 21.5 日、最終治療日から死亡日までの日数は平均 12.8 ± 6.9 日、中央値 12.0 日であった。

表 2 鍼治療前後での MDASI-J の変化

症状	治療前*	治療後*	P 値
疼痛	4.1 ± 2.3	3.4 ± 2.3	<0.001
倦怠感	4.4 ± 1.5	3.8 ± 1.6	0.032
嘔気	1.4 ± 2.3	1.1 ± 2.4	0.230
不眠	2.4 ± 2.3	2.5 ± 2.4	0.882
呼吸苦	3.5 ± 2.3	3.2 ± 2.0	0.302
食思不振	2.9 ± 3.1	2.5 ± 2.7	0.136
便秘	1.1 ± 2.1	0.9 ± 1.8	0.393
眠気	3.1 ± 2.6	3.1 ± 2.2	0.894
口渇	5.1 ± 2.4	4.6 ± 2.3	0.103
抑うつ気分	2.7 ± 3.2	2.3 ± 3.1	0.133
しびれ	4.1 ± 2.2	3.4 ± 2.3	0.004

*平均値 \pm 標準偏差

考 察：

本研究においては、患者の包括的評価として MDASI-J を用いることにより、潜在的な苦痛症状を明らかにし、本治法も加えることによる治療効果の変化を検討した。MDASI-J の変化に着目すると全体の平均としての変化は疼痛、倦怠感、しびれと限られた症状の改善にとどまったが、個々の治療の前後で比較すると大きな変化が認められていた。このことから、鍼治療の効果を検討する際には全体の変化のみにとらわれることだけではなく、症例蓄積を重ねていくことの意義も考慮しなければならないと考えられる。

鍼治療に関する多くの研究は標治が主体であり、中医学に基づく診断から本治も行った研究はほとんどない。患者の状態は流動的であり、実際に本研究においても治療毎に証が変化することが明かになった。このことは鍼治療に関する研究を行う上で熟慮されるべき点であるが、施術者の経験や力量によるバイアスや再現性の点で limitation のひとつとなると考えられる。

今後は症例数の蓄積により、治療効果が期待できる症状、時期などがより明確にされうる。鍼治療を通常の緩和医療に取り入れることにより、薬物療法以外の strategy が豊富になり、しいては終末期がん患者の QOL 向上の一助となりうる可能性がある。

参考文献：

1. Kwok OL, et al. Symptom distress as rated by advanced cancer patients, caregivers and physicians in the last week of life. Palliat Med 2005; 19: 228-233.
2. Bullinger M. Quality of life assessment in palliative care. J Palliat Care 1992; 8: 34-39.
3. Deng GE, et al. Integrative Oncology Practice Guidelines. J Soc Integr Oncol 2007; 5: 65-84.
4. NIH Consensus Conference, Acupuncture. JAMA. 1998; 280: 1518-24.
5. Takahashi H. Effects of acupuncture on terminal cancer patients in the home care settings. 20th Annual AAMA Symposium 2008.
6. Helms JM. Acupuncture energetics: a clinical approach for physicians. Berkeley, California: Medical Acupuncture Publishers, 1995
7. Filshie J. Safety aspects of acupuncture in palliative care. Acupuncture in Med 2001; 19: 117-122.
8. Groenvold M. The development of the EORTC QLQ-C15-PAL: A shortened questionnaire for cancer patients in palliative care. Eu J Cancer 2006; 42: 55-64.

注：本研究は、第 15 回日本緩和医療学会学術大会および第 18 回日本ホスピス・在宅ケア研究会にてポスター発表予定。

作成日：2010 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 5 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 村 松 正 明 
所属機関名： 東京医科歯科大学難治疾患研究所
所属部署名： 分子疫学分野 職名： 教授
所 在 地： 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10
電 話： 03-5280-8060 内線：

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

中国漢民族における CIDEA 遺伝子多型と肥満との相関に関する研究

3. 成果の概要

CIDEA (Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor Alpha-like Effector A) 遺伝子はミトコンドリアにおける基礎代謝を介して体重調節に重要な役割を果たすことが知られている。私達は日本における先行研究において CIDEA 遺伝子 V115F 変異 (dpSNP:rs45619832) が肥満に影響していることを日本人集団において報告した。そこで本研究においては、CIDEA 遺伝子 V115F 多型が中国間民族集団においてと肥満との相関関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

中国漢民族サンプルは北京首都医科大学において、新規に高血圧と診断された患者 (n=351, 男:163、女:188) を用いた。解析の結果、CIDEA 遺伝子 V115F は腹部肥満、メタボリック症候群発症リスクと関連しており、CIDEA 遺伝子 T allele がそれぞれの表現型のリスク因子であることが明らかになった。即ち体重、BMI、ウエスト囲、ヒップ囲、WHR、中性脂肪(TG)において、CIDEA 遺伝子の TT +TG 遺伝子群は GG 遺伝子群に比較して有意に高かった (P<0.05)。脂質代謝異常、腹部肥満とメタボリックシンドロームとの発症率も TT +TG 遺伝子群は GG 遺伝子群に比較して有意に高かった (P<0.05)。ロジスティック解析によると、T アレル優性モデルにおいてガリスク比は過体重 (OR=1.83, 95% CI: 1.13-2.97)、肥満 (同 1.91, 1.08-3.36)、腹部肥満 (同 2.38, 1.45-3.92)、脂質代謝異常 (2.09, 1.28-3.43) とメタボリック症候群 (同 2.36, 1.42-3.92) であった。本研究において中国人においても、日本人と同様な遺伝子-形質の関連を CIDEA 遺伝子に

認めることができた。このようなゲノム情報を取り入れた疫学は、中国においては未だに新しい段階の研究であり、今後より発展して行く事が期待される。

※ 発表論文等

1. Zhang L et al. Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor Alpha-like Effector A (CIDEA) Gene V115F (G/T) Polymorphism Is Associated with Phenotypes of Metabolic Syndrome in Chinese Population. *submitted*
2. Zhang L et al. Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (CIDEA) gene V115F (G/T) polymorphism is associated with obesity and metabolic syndrome in Chinese. Abstracts in International Journal of Cardiology. Vol.137, Suppl.1, pS115. World Hypertension Congress Inconjunction with the 11th International Symposium on Hypertension and Related Diseases. Oct,29-Nov,1,2009, Beijing,China.

4. 研究組織

日本側研究者氏名:村松 正明
所属機関名:東京医科歯科大学
中国側研究者氏名:張 玲
所属機関名:首都医科大学

職名:教授
部署名:難治疾患研究所分子疫学分野
職名:講師
部署名:公衆衛生と家庭医学学院

中国漢民族におけるCIDEA遺伝子V115F多型と肥満との関連に関する研究

研究者氏名	教授 村松 正明
日本所属機関	東京医科歯科大学難治疾患研究所分子疫学分野
中国研究機関	首都医科大学公衆衛生と家庭医学学院
指導責任者	教授 村松 正明
共同研究者	張 玲、戴 穎、辺 麗麗、王 崑、華 琦

要旨

CIDEA遺伝子の非同義一塩基多型V115F (G/T) は、肥満とメタボリック症候群 (MetS) に関連する新しい候補遺伝子であると考えられる。しかし中国漢民族においては、CIDEAの影響は明らかにされていない。そこで本研究では、CIDEAのSNPと、肥満およびMetSの関連を中国において検討した。対象は新規に本態性高血圧と診断された中国漢民族患者351人 (平均年齢51y、男：46%、女：54%) であり、横断研究を行った。理学的所見、生化学検査等およびCIDEA V115F SNPを測定した。その結果、体重、腹囲、血清トリグリセリド値、高脂血症、腹部肥満など複数のMetS形質とCIDEA遺伝子V115Fの関連を認めた。多変量解析の結果、GG遺伝子型グループにおいてはTT+TG遺伝子型グループより高値であり、オッズ比はそれぞれ体重 (OR=1.83, 95%CI: 1.13-2.97)、肥満 (1.91: 1.08-3.36)、腹部肥満 (2.38: 1.45-3.92)、高脂血症 (2.09: 1.28-3.43)、およびMetS発症 (2.36: 1.42-3.92) であった。以上のようにCIDEA遺伝子は中国漢民族においてMetSとその関連した表現型の危険因子であると結論した。

キーワード: CIDEA、一塩基多型、メタボリック症候群、肥満、交互作用

緒言

メタボリック症候群 (MetS) は過食、運動不足といったライフスタイル因子に依るところ大きいものの、遺伝子もその発症に大きく関与しており、この両因子が絡み合って発症すると考えられる。MetSの病態にはインスリン抵抗性、持続的炎症反応が知られており、これによって慢性的な代謝異常が引き起こされる。近年、肥満やMetSに関連する多くの遺伝子が発見されたが、これらの結果は異なった民族でも再現されるかどうか十分に検証される必要がある。

CIDEA遺伝子はモデルマウスの実験より、エネルギー代謝に重要な機能を担っている事が明らかにされた。またCIDEAは脂肪酸代謝にも関連している事が知られている。血中に遊離脂肪酸を過剰に負荷すると、インスリン抵抗性および高脂血症となるが、この理由として最も支持されている仮説は、炎症性サイトカインTNF- α の活性を抑制することを介して、CIDEAが脂肪質の分解を低下させる、あるいはCIDEAが中性脂肪をエステル化することによって、脂肪細胞に脂質滴を保存させることであると考えられている。このようにCIDEAの機能障害によって、MetSに繋がる種々の代謝異常が誘発される可能性が示唆されている。

一方、家系解析等より肥満、中性脂肪濃度、空腹時血糖、糖尿病と関連する連鎖領域として染色体18p11が知られていた。CIDEAはこの領域の中にある候補遺伝子としても見出された。CIDEAは、4つのイントロンと5つのエクソンを持ち長さが23.22キロ塩基対ある。CIDEAには唯一の非同義SNP、V115Fが存在する。スウェーデン人において、Gアレル (Vをコード) が肥満のリスクであることが報告された。一方、日本人における追試実験では、CIDEA Tアレル (Fをコード) が日本人のリスクであることを私達は報告した。これらのCIDEA遺伝子多型と肥満・MetSの形質の関係は相反する結果であり、更なる検討が必要である。そこで本研究では、MetSとその関連した表現型の上で中国人集団内でV115F多型の影響を検討した。私達の知る限りでは、これは中国において実施されたはじめてのCIDEAの疾患関連研究である。

対象と方法

参加者は、2007年に首都医科大学付属玄武病院において新しく本態性高血圧と診断された中から任意に選択された患者である。参加者合計351人、163人の男性と188人の女性であり、年齢は50.86の±6.14年、年齢分布は18歳から86歳である。悪性腫瘍、重度の心血管疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、痴呆、結核、後天性免疫不全症候群、感染症等の重篤な余病を持つ患者は除外した。各々の参加者は面談し、標準化されたアンケート取った。身体検査とインタビューは、訓練された看護婦と医者によって行われた。総コレステロール（TC）、高密度リポタンパク質-コレステロール（HDL-C）、トリグリセリド（TG）と空腹時血糖（FPG）は、ルーチン方法で測定した。すべての参加者より書面によるインフォームドコンセントを得ており、本プロトコルは、首都医科大学の倫理委員会で承認を受けた。

肥満、MetSの定義は中国において推奨されている2005年IDF最新版の基準に従った。即ち、中心肥満（腹囲：男性の90cm、女性の80cmを持ち、且つ1）高血圧：140/90mmHg以上、または高血圧治療の既往；2）高トリグリセリド血症：空腹時トリグリセリド1.7mmol/L、以上；3）低HDL：空腹時のHDLコレステロール男性：1.0mmol/L以下、女性：1.3mmol/L以下、；4）高血糖：空腹時血糖5.6mmol/L以上、のいずれか二項目がある事である。DNAは、-80°Cで凍結保存された全血サンプルより標準的な方法により抽出した。PCR反応は50 μL溶液：5μL 10×PCR Buffer（50mM, KCl, 20mM, Tris-HCl）、1μL：Fプライマー（20pmol/L）、1μL：Rプライマー（20pmol/L）、4μL dNTP混合物（2.5mM）、0.25のU Taqポリメラーゼ、2μL DNA、で行った（30秒間の94°C変性、30秒間の52°Cアニーリング、1分間の72°C伸張反応を40回繰り返した。遺伝子タイピングはPSQTM 96 MA機械（ジーン社、HK）で行った。最後に94°Cで変性し、pyrosequencing法にてタイピングをした。統計解析にはソフトウェアSPSS 13.0（SPSS Inc, Chicago, IL, USA）を使用し、カイ二乗検定、フィッシャー正確検定、一方向性分散分析、ロジスティック回帰分析を行った。すべての確率値は両側検定で $p < 0.05$ の時に統計学的に有意である判定した。

結果

CIDEA遺伝子多型V115F(G/T)を測定したところ、GG、GT、TT遺伝子型頻度は、29.91%、50.71%、19.48%であった。遺伝子型分布は、Hardy-Weinbergの平衡に従っていた。体重、腹囲、腰囲、腹腰比率、BMI、および中性脂肪において、TT+TGグループがGGグループより高値だった（ $p < 0.05$ ）。年齢、SBP、DBP、TC、HDL-CとFPGに関しては3つの遺伝子型グループによる有意差はなかった。

MetSの各形質の有病率は、MetS：46.64%、肥満：28.21%、腹部肥満：65.81%、高脂血症：41.10%、高血圧：69.80%、空腹時高血糖：35.04%だった。腹部の肥満と同様にMetSの流行、異脂肪血症はTT+TGグループでGGグループ（ $P < 0.05$ ）のそれより高かった。全体的な肥満において、女性より男性で高かった（32.5%対22.9%）。

TTグループとTGグループはMetSに関連した大部分の変数でGGグループより同じ程度に高いレベルを示したので、以下の分析はTT+TGグループを1つにまとめてTキャリアーとし、GGグループと比較した。GGグループと比較してTキャリアーでは代謝性障害と相関しているパラメータが高値だった。体重（74.08の±17.50対66.76の±12.39）、腹囲（90.26の±12.08対84.64の±12.08）、腰囲（103.07の±9.61対99.55の±11.83）、WHR（0.88.11±0.11対0.85の±0.07）、HDL-C（50.64の±46.18対53.58の±27.72）BMI（26.59の±5.40対24.54の±3.78）、FPG（104.95の±34.12対98.06の±22.01）、TG（176.66の±126.52対138.81の±96.96）で有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）。

単純回帰分析の結果、TキャリアーグループがGGグループに比べて持つ危険度は、過体重（OR=1.82, 95%CI: 1.14-2.90）肥満 1.92（1.10-3.36）、腹部肥満 2.16（1.35-3.46）、高脂血症 2.10（1.29-3.42）とMetS 2.17（1.35-3.39）であった。年齢、性、BMIで調節される多重ロジスティック回帰分析では、関連は減弱したが、統計的有意性は維持された。以上よりCIDEA遺伝子V115F(G/T)遺伝子型はMetSの代謝性障害の形質との間に有意な関係があると結論した。

考察

中国において肥満や MetS の人口は急速に拡大しており、その対応が急がれる。本研究において、CIDEA 遺伝子が始めて中国漢民族における MetS 代謝性障害と関連している事を始めて見出した。CIDEA は肥満のための新しい候補遺伝子としてこれまで注目されてきた。始めはスウェーデン人における研究において、CIDEA V115F (G/T) が肥満と関係がある事が報告された。続いて日本人においても CIDEA V115F (G/T) が MetS の形質と関連していることが示された。しかしスウェーデン人においては、リスクアレルはGアレルであり、日本人においては、リスクアレルはTアレルであり、正反対の結果となっていた。今回、中国人を対象とした研究の結果、CIDEA V115F (G/T) が肥満などの代謝障害形質と関連し、Tアレルがリスクアレルであることが明らかとなった。これは日本人を対象とした研究結果と基本的に同じであり、少なくともアジア人においてはTアレルキャリアーが高リスクであることを支持する。中国人、日本人とスウェーデン人の間でこのような違いが生まれた原因は、当該の遺伝子多型を含む haplotype ブロックの異質性あるいは北ヨーロッパとアジアの環境違いによって説明されるかもしれない。本横断研究は高血圧外来受診の患者で行われたが、高血圧の有無で、CIDEA 遺伝子多型の効果を比較すると、明らかに高血圧群の方が肥満・MetS 形質との関連が強く見られた。このことは高血圧が CIDEA 遺伝子多型と交互作用を起こしている事を示唆しており、この点は更なる研究が必要である。

以上、本研究は CIDEA 遺伝子 T アレルが中国人の MetS を起こす代謝性障害の表現形質の危険因子であることを明らかにした。

注：本論文 “Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor Alpha-like Effector A (CIDEA) Gene V115F (G/T) Polymorphism Is Associated with Phenotypes of Metabolic Syndrome in Chinese Population.” Zhang L. et al は現在投稿中。

作成日：2010年3月5日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2010 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：渡邊 泰男
所属機関名：昭和薬科大学
所属部署名：薬理学研究室 職名：教授
所在地：東京都町田市東玉川学園 3-3165
電 話：042-721-1511 内線：2120



1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

神経因性疼痛における一酸化窒素の分子病態：カルシウム受容キナーゼの調節機構

3. 成果の概要

ラット神経因性疼痛モデルにおいて、後根画分の一酸化窒素修飾タンパクの検出を行ったところ、損傷側に有意にニトロソ化タンパクの上昇が検出された。一方、分子・細胞レベルでの解析の結果、カルシウム受容キナーゼのカルモデュリン（CaM）キナーゼ I が、部位特異的なグルタチオン化修飾を受けることによって酵素活性が可逆的に阻害されることを見出した。このことは慢性疼痛における新しい作用機構解明に役立つと思われる。

※発表論文等

平成 21 年 10 月 21 日-24 日 第 82 回日本生化学会大会（神戸）にて口演発表、現在 FEBS Lett で改訂中。平成 22 年 3 月 16 日-18 日第 83 回日本薬理学会年会（大阪）にてシンポジウム発表予定。

4. 研究組織

日本側研究者氏名：渡邊 泰男	職名：教授
所属機関名：昭和薬科大学	部署名：薬理学
中国側研究者氏名：宋 涛	職名：准教授
所属機関名：中国医科大学付属第一病院	部署名：麻酔科

神経因性疼痛における一酸化窒素の分子病態：カルシウム受容キナーゼの調節機構

日本側研究者氏名 渡邊 泰男

所 属 機 関 昭和薬科大学薬理学研究室 教授

中国側研究者氏名 宋 涛

所 属 機 関 中国医科大学附属第一病院麻酔科 准教授

要旨

細胞は様々なレドックス反応「レダクション(還元)とオキシデイション(酸化)」を基本として維持されている。近年、このレドックス代謝に異常を起こすことが、脳梗塞、脊髄損傷、脳神経変性疾患等の種々の疾患に密接に関与している可能性が強く指摘されている。また、これらの中樞神経障害に一酸化窒素(NO)が関与することが報告されている。そして、このNOによる中樞神経細胞死はNO由来の反応性窒素酸化物による生体機能分子のレドックス制御機構の乱れによる可逆的修飾であるグルタチオン化やニトロソ化を介して発現することも示唆されている。一方、脳神経系において、神経成長、成熟に関わる細胞内情報伝達はカルシウム/カルモデュリン(Ca^{2+}/CaM)によって活性化されるカルシウム受容リン酸化酵素、CaMキナーゼ群が絡んでいる可能性が示唆されている。近年、このCaMキナーゼ群ならびにNOが、神経因性疼痛等の種々の慢性疼痛に密接に関与している可能性が強く指摘されている。しかし、これまでに、神経因性疼痛のメカニズムをCaMキナーゼ群のNO応答性ならびにレドックス反応性に着目して行われた研究はない。そこで、本研究課題では、神経因性疼痛の分子病態をNOとカルシウム受容キナーゼの相互作用で理解し、予防法・治療法の基盤を築くことを目的とした。その結果、ラット脊髄神経損傷モデルにおいて、後根画分のNO修飾タンパクの検出を行ったところ、損傷側に有意にニトロソ化タンパクの上昇が検出された。一方、分子・細胞レベルでの解析の結果、CaMキナーゼIが、部位特異的なグルタチオン化修飾を受けることによって酵素活性が可逆的に阻害されることを見出した。これらレドックス応答分子としてのキナーゼ群ならびにタンパクの制御機構解明は、脳神経傷害における新たなレドックス制御薬の理論的基礎研究として位置付けられる。

Key Words 神経因性疼痛、CaM キナーゼ、一酸化窒素、ニトロソ化、グルタチオン化

緒言

近年、脳梗塞、変性疾患による中枢神経障害に一酸化窒素(NO)を始め様々なタンパク質リン酸化酵素が関与することが

報告されている。中でも、カルシウム/カルモデュ

リン (Ca^{2+}/CaM) によって活性化されるリン酸化

酵素 CaM キナーゼは、神経シナプス形成、記憶・

学習に関わる機能分子でもあることが広く研究さ

れてきている。これまでに、私共は神経における

NO 産生の律速酵素である神経型 NO 合成酵素

(NOS) の CaM キナーゼによる部位特異的リン

酸化が NO シグナルを負に制御していることにより脳梗塞や神経伝達物質ドパミン信号系において重要な役割を果たして

いることを示唆してきた (図) [1-4]。

ところで、NO によるシグナル伝達には可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化による cGMP を介する経路と、cGMP

に依存しないものがある。前者は、血管内皮依存性 NOS による血管平滑筋弛緩反応に代表される情報伝達メカニズムで

脳循環や血圧調節に関与する。後者の場合、NO そのものというより、NO 由来の反応性窒素酸化物による生体分子のシ

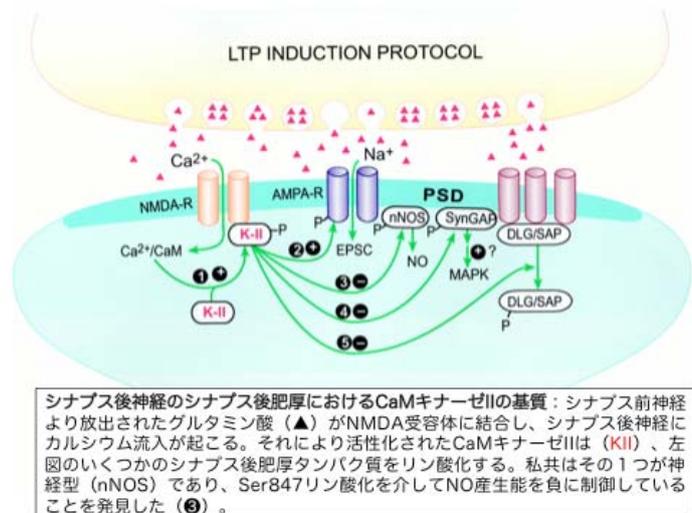
ステインチオールグルタチオン化 (RSSG) やニトロソ化 (RSNO) 反応を介するものである。近年、この後者の反応

性窒素酸化物などによる生体分子修飾が、脳神経変性疾患等の種々の疾患に密接に関与している可能性が強く指摘されて

いる。私共はこれまでに、CaM キナーゼ II の部位特異的システインチオールのニトロソ化によってキナーゼ活性が可逆的

に阻害され、脳虚血時の CaM キナーゼ II 活性の低下がこの部位特異的 NO 修飾によることを示唆した [5]。本研究課題では、

近年、いくつかの神経機能がそれにより調節されているとされる CaM キナーゼ I のレドックス応答性の分子基盤ならびに、



その脳神経細胞機能を明らかにすることを目的とした。そして、ペインクリニックでも重要懸案である神経因性疼痛のメカニズムを機能分子のレドックス応答性解析の為、ラット神経因性疼痛モデルにおける髄後根画分でのレドックス応答タンパク質の検索を行った。

方法

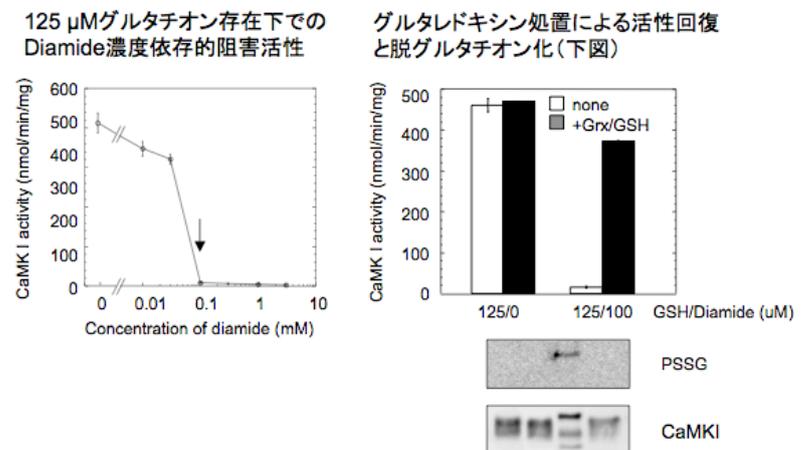
神経因性疼痛モデルラットは、手技的な変動が少ない脊髄神経結紮モデルを用いた。腰髄後根画分での不特定多数の修饰タンパクの検出は、抗ニトロソ化タンパク抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。CaM キナーゼ I のレドックス応答性の解析には、酸化ストレス刺激として SH 基選択性酸化剤(diamide)ならびに還元型グルタチオンを使用した。リコンビナント CaM キナーゼ I は大腸菌発現系にて精製し、キナーゼ活性測定には [γ - 32 P]ATP から合成ペプチド基質 (シグナイド 2) への 32 P 転位の検出によって行った。酸化修饰部位および種類解析は、CaM キナーゼ I の分子内のシステイン残基の点変異体および ESI-四重極型 MS による質量分析法にて行った。グルタチオン化タンパクの検出には抗グルタチオン化抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。

結果

1) CaM キナーゼ I のグルタチオン化による活性阻害

リコンビナント CaM キナーゼ I を Diamide (0-3 mM) および還元型グルタチオン (125 μ M) 処置し、酵素活性を測定すると 100 μ M Diamide でほぼ完全に阻害された。この処置により CaM キナーゼ I がグルタチオン化されていることが、抗グルタチオン抗体を用い

図 1 Diamide/グルタチオン処置によるCaMキナーゼI活性阻害



確認できた。さらに、阻害された酵素活性は、脱グルタチオン化酵素であるグルタレドキシシンによって回復され、同時に

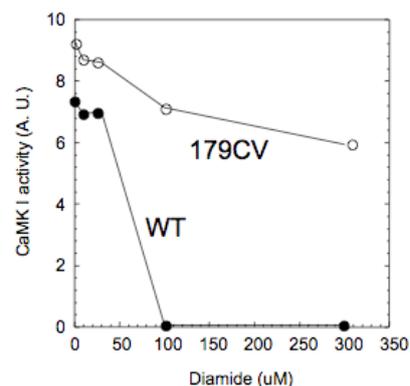
脱グルタチオン化も観察された (図 1)。

2) Cys179 修飾による CaM キナーゼ I 活性阻害

CaM キナーゼ I の活性中心近傍の Cys179 の変異体(179CV)ミュータントのリコンビナント酵素を作成した。そして、Diamide/グルタチオン処置による CaM キナーゼ I 活性阻害を野生型と比較した。179CV は 125 μ M グルタチオン、0-300 μ M Diamide 存在下で、酵素活性に大きな変化は見られなかつ

た (図 2)。CaM キナーゼ I は Cys179 以外に 9 つの Cys 残基を有するがどの点変異体も Diamide/グルタチオン処置による活性低下には抵抗性を示さなかつた (データ表示せず)。

図2 Cys179を介したグルタチオン化によるCaMキナーゼIの活性阻害



3) CaM キナーゼ I の Cys179 残基のグルタチオン化修飾の検出

Diamide/グルタチオン処置によって

Cys179 にグルタチオン化修飾が見られるのかを、処置酵素のプロテアーゼ分解後、

ESI四重極型 MS による質量分析法によ

って解析を行った。73%のペプチド回

収率で10個のCys残基のうち3つの

Cys 残基を含むペプチド (Cys179, Cys267, Cys349) が回収された。そのどの Cys 残基にもグルタチオン化修飾が検出された

(表)。

プロテアーゼ処置後のCys残基を含むペプチドのグルタチオン化検出

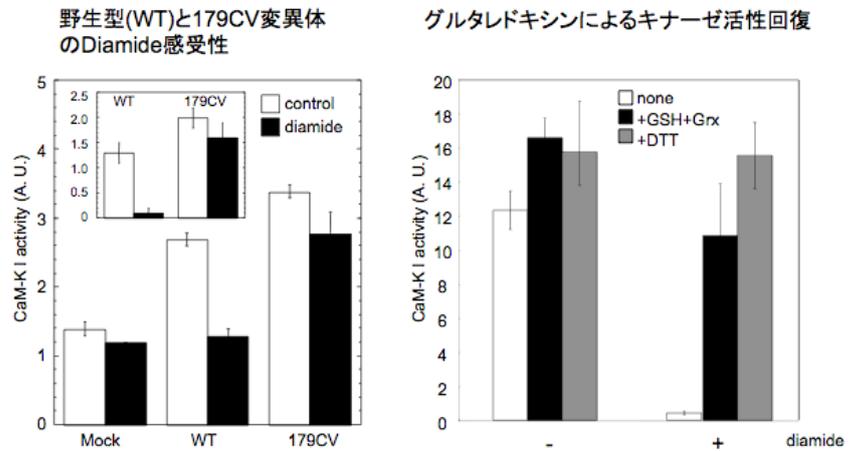
Amino acid sequence	Modification	ESI (m/z)
170-188	DPGSVLSTACGTPGYVAPE	1063.47
176-190	STACGTPGYVAPEVL	885.39
176-195	STACGTPGYVAPEVLAQKPY	786.38
265-275	FTCEQALQHPW	832.87
336-349	ELLTPTAGGPAAGC	781.86

4) 細胞内 CaM キナーゼ I のグルタチオン

化による活性制御

Hela 細胞に野生型と 179CV 変異体の CaM キナーゼ I を遺伝子導入し、Diamide(1 mM) 処置後、CaM キナーゼ活性を測定した。野生型では Diamide 処置により酵素活性は殆ど消失したが、179CV 変異体は抵抗性を示した。

図3 Hela細胞におけるCaMキナーゼIの酸化ストレスによる活性阻害



さらに、野生型の酵素活性消失は、その後のグルタレドキシン処置によって回復が見られた (図 3)。

5) ラット神経因性疼痛モデルにおける髄後根画分でのレドックス応答タンパク質の検索

脊髄神経結紮モデルを用い、腰髄後根画分での不特定多数の修飾タンパクの検出を、抗ニトロソ化タンパク抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。障害側でのニトロソ化タンパクは健側側に比べて有意に増加していることが分かった (図 4)。なお、障害側でのバンドは還元剤処置によって消失することを確認した (データ表示せず)。

図4
損傷側 健側



Anti-SNO抗体

考察

以上のように、今回の助成では、NO 信号系制御の新しい作用機序の解明を通して、NO 信号系制御薬創製の分子基盤を築くことが出来た。つまり、CaM キナーゼ群が直接 NO の修飾を受けその活性が可逆的に制御されているという概念を確立できた。これまでに、レドックス制御の乱れが、脳神経細胞障害を引き起こすとされている。実際に、いわゆるレド

ックス制御薬が、急性期脳梗塞の治療に使われている。しかしながら、各レドックス疾患において主因となる酸化ストレス系は単一でないことから、フリーラジカル消去薬だけで全てのレドックス疾患を効率的に治療するには限界があり、今後は各疾患の信号系に特化したレドックス疾患治療に貢献する新しいレドックス制御薬の登場が待たれる。私共はこれまで、キナーゼシグナルによる活性窒素シグナルの制御機構を報告してきた。その中で、私共が見出したレドックス応答分子としてのCaMキナーゼ群の制御機構は、神経傷害において防御的分子であるCaMキナーゼ群と攻撃的分子である酸化ストレスのクロストーク理解において新展開であり、新たなレドックス制御薬の理論的基礎研究として位置付けられる。神経因性疼痛モデルでは脊髄でのNO産生が亢進していることが判明しているため、今回得られた障害側の腰髄後根画分でのニトロソ化タンパクの検出は今後その標的分子の同定を通して、慢性疼痛における新しい作用機構を明らかにすることができると思われる。現在、CaMキナーゼ群のニトロソ化ならびにグルタチオン化の検出をしているところである。今後は脳虚血、神経損傷、クモ膜下出血などの中枢神経疾患の分子病態を広く生体機能分子のレドックス制御破綻として捉え、レドックス制御薬開発の基盤研究を展開させたい。

参考文献

- [1] T. Song, N. Hatano, K. Kume, K. Sugimoto, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by phosphorylation at Threonine1296 in NG108-15 neuronal cells. *FEBS Lett.* 579 (2005) 5658-5662.
- [2] Y. Hayashi, M. Nishio, Y. Naito, H. Yokokura, Y. Nimura, H. Hidaka, and Y. Watanabe, Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20597-20602.
- [3] K. Komeima, Y. Hayashi, Y. Naito, and Y. Watanabe, Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 28139-28143.
- [4] T. Song, N. Hatano, M. Horii, H. Tokumitsu, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *FEBS Lett.* 570 (2004) 133-137.
- [5] T. Song, N. Hatano, T. Kambe, Y. Miyamoto, H. Ihara, H. Yamamoto, K. Sugimoto, K. Kume, F. Yamaguchi, M. Tokuda, and Y. Watanabe, Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 412 (2008) 223-231.

注：本研究は、平成21年10月21日-24日 第82回日本生化学会大会（神戸）にて口演発表、現在FEBS Lettで改訂中。

平成22年3月16日—18日第83回日本薬理学会年会（大阪）にてシンポジウム発表予定。

作成日：2010年3月10日

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2010 年 3 月 6 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：塚本徹哉
所属機関名：藤田保健衛生大学医学部
所属部署名： 第一病理学 職名：准教授
所在地：愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98
電 話：0562-93-2440 内線：



1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

スナネズミモデルにおけるグリチルリチン酸の *H. pylori* 感染胃発癌への予防効果

3. 成果の概要

甘草の主成分であるグリチルリチン酸の加水分解産物グリチルレチン酸は、*H. pylori* 感染スナネズミ胃底腺および幽門腺胃粘膜において、好中球、単核球浸潤を抑制し、粘膜上皮の過形成や潰瘍形成も軽減したことから、有力な抗炎症効果を有する事が確認された。

※発表論文等

第68回日本癌学会学術集会（2009年10月1日、横浜、示説発表）

「スナネズミにおけるグリチルリチン酸の *H. pylori* 感染胃炎への抑制効果」

4. 研究組織

日本側研究者氏名：塚本 徹哉

職名：准教授

所属機関名：藤田保健衛生大学医学部

部署名：第一病理学

中国側研究者氏名：曹 雪源

職名：副教授

所属機関名：吉林大學第一病院

部署名：胃腸外科

スナネズミモデルにおけるグリチルリチン酸の *H. pylori* 感染胃発癌への予防効果

日本側研究者氏名	准教授 塚本徹哉
所属機関名	藤田保健衛生大学医学部病理学 I
中国側研究者氏名	副教授 曹 雪源
所属機関名	吉林大学第一病院

要 旨:

ヘリコバクター・ピロリ菌(*H. pylori*)感染は、慢性胃炎、胃発癌に非常に重要な役割を果たしており、その除菌あるいは炎症の制御によるヒト胃癌の予防が急務である。しかし、抗生物質耐性菌の出現や除菌に伴うコストの問題も発生しており、それに代わる新しい安価かつ安全な天然資源の探索が注目されている。今回、スナネズミモデルを用いて、甘草に含まれる天然物質グリチルリチン酸の *H. pylori* 感染による慢性胃炎の抑制作用を検討した。スナネズミに *H. pylori* を強制胃内投与し、2 週間からグリチルリチン酸の加水分解産物であるグリチルレチン酸 (GA) を 0.1% の濃度で混餌投与し、20 週後に屠殺した。*H. pylori* 感染スナネズミの胃底腺粘膜における好中球および単核球浸潤の程度 (スコア: 0-3) は、対照群が 1.6 ± 0.1 、 1.3 ± 0.1 に対して、GA 投与群では、 0.9 ± 0.2 ($P < 0.05$)、 0.8 ± 0.2 ($P < 0.05$) と有意に減少した。また、幽門腺粘膜においても、対照群が 2.9 ± 0.3 、 3.0 ± 0.2 に対して、GA 投与群では、 2.2 ± 0.4 ($P < 0.05$)、 2.0 ± 0.2 ($P < 0.05$) と有意な改善が見られた。本研究により、グリチルリチン酸の投与により、*H. pylori* 感染に伴う胃炎が抑制され、胃癌発生にも効果的である可能性が示唆された。

Key Words Mongolian gerbils, stomach cancer, *Helicobacter pylori*, Glycyrrhizic acid

緒 言:

動物モデルは胃癌発生にかかわる遺伝子と環境要因の解析や化学予防候補物質の有効性を評価するに有用と考えられる。ヘリコバクターピロリ菌(*H. pylori*)除菌によるヒト胃癌発生の予防効果が臨床において期待されている。



図1. 甘草 (カンゾウ) とグリチルレチン酸

胃癌は、東アジアを中心に依然高い罹患率、死亡率を示している。*H. pylori* 感染は、慢性胃炎、胃発癌に非常に重要な役割を果たしており、その除菌あるいは炎症の制御によるヒト胃癌の予防が急務である。しかし、抗生物質耐性菌の出現やコストの問題も発生しており、それに代わる新しい安価かつ安全な天然資源の探索が注目されている。申請者らが開発したスナネズミ

胃発癌モデルは胃癌発生にかかわる遺伝子と環境要因の解析や化学予防候補物質の有効性を評価するに有用である。我々はこれまでに、梅エキス、リグナン類、さらに菜種原油中に含まれる抗ラジカル活性物質 Canolol の酸化抑制作用と胃発癌予防効果を明らかにしてきており、天然物質の胃発癌への影響についての研究基盤を確立している。

グリチルリチン酸は、植物カンゾウ（甘草）の根から抽出される抗炎症・抗アレルギー成分である。胃・十二指腸の粘膜を保護し、潰瘍の予防・炎症の改善効果があり、*H. pylori* の抑制作用も観察されている。本研究においては、*H. pylori* 感染スナネズミモデルを用いて、天然物質グリチルリチン酸の加水分解産物であるグリチルレチン酸の抗炎症効果を検討し、新しい胃癌抑制戦略を構築する事を目的とする。(図1)

対象と方法：

動物実験：グリチルリチン酸による *H. pylori* 感染慢性胃炎の抑制実験

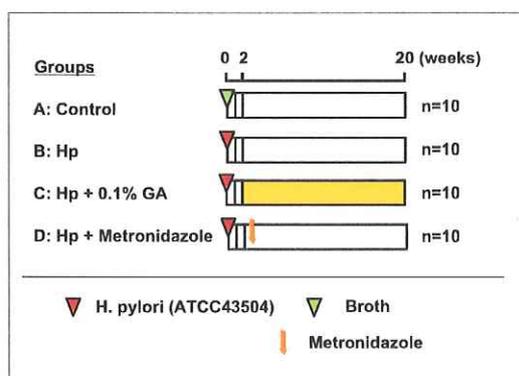
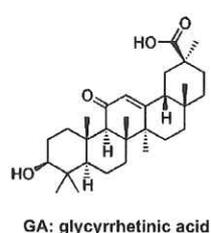


図2. 実験デザイン

5 週齢 Specific pathogen-free 雄性スナネズミ (*Meriones unguiculatus*; MGS/Sea) に、*H. pylori* 標準株 (ATCC43504, American Tissue Culture Collection) を経口胃内投与し感染させた。*H. pylori* 感染後、無処置群を B 群とした。2 週後から 0.1% グリチルリチン酸を添加した飼料を投与し C 群とした。また、メトロニダゾールを投与した群を設け、除菌効果の陽性対象とした (D 群)。非感染群を陰性対照群とした (液体培地 *Brucella* broth のみ投与、A 群)。

実験第 20 週で屠殺し、胃底腺および幽門腺粘膜における好中球 (Neutrophils)、リンパ球や形質細胞などの単核球 (Mononuclear cells)、粘膜の過形成の程度、潰瘍の程度について、病理組織学的にスコアリング (0 : ほぼ正常、1 : 軽度、2 : 中等度、3 : 高度) し、Mann-Whitney U 検定を用いて統計検算を行った。 $P < 0.05$ を有意と判断した。

結果：

動物の感染率は 90% 以上であった。*H. pylori* 感染により、強い好中球、リンパ球、形質細胞浸潤が観察された。胃粘膜の潰瘍が発生し、胃粘膜の肥厚や過形成性病変が認められた。

グリチルレチン酸投与群 (C 群)、メトロニダゾール投与群 (D 群) では、対照群 (B 群) と比較して、好中球浸潤、リンパ球浸潤の程度が有意に軽減した。また、過形成性の変化も軽減した。陰性対照群 (A 群) では、明らかな炎症所見は確認されなかった。

考察：

H. pylori 除菌によるヒト胃癌の予防効果が臨床において期待されており、抗生物質に代わる新しい天然資源の探索が注目されている。グリチルリチン酸 (Glycyrrhizic acid, GA) は、植物カンゾウ (甘草) の根から抽出される抗炎症・抗アレルギー成分である。胃・十二指腸の粘膜を保護し、潰瘍の予防・炎症の改善効果もよく知られている。本実験では、*H. pylori* による炎症の抑制作用が観察された。他の実験の類推から、抗炎症効果を

持つ化学物質は、胃粘膜における過酸化物質の過剰産生を調節し、炎症反応の軽減に寄与しているものと想定される。現在、グリチルレチン酸による胃癌抑制実験が進行中であり、胃癌の抑制に対しても期待される。

動物モデルは胃癌発生にかかわる遺伝子発現やその異常、環境要因の解析、化学予防候補物質の有効性を評価するに有用であり、胃癌動物モデルの研究を実施していくことにより、天然物質から新しいがん抑制物質の探索を可能にすると考えられる。

本研究は、胃癌を抑制する薬物を探索して、胃炎や胃潰瘍の軽減と胃癌の新しい化学予防のための戦略を確立するにも寄与するものと考えている。

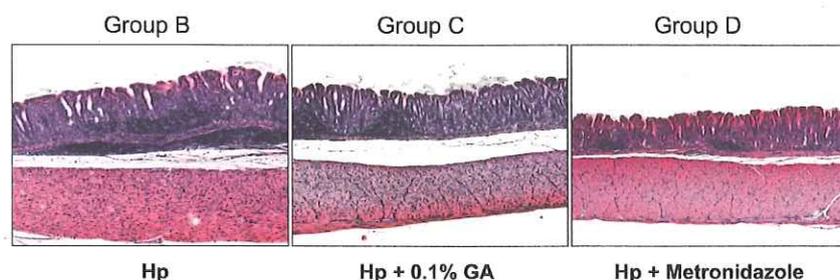


図3. 実験第12週におけるスナネズミ胃粘膜の病理組織学所見。HE染色 (対物X50)。

表 1. 胃底腺における炎症所見

Groups	No.	Treatments	Corpus			
			Infiltration of neutrophils	Infiltration of mononuclear cells	Hyperplasia	Peptic ulcer
A	10	Broth	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
B	10	Hp	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.3
C	10	Hp → GA	0.9 ± 0.2*	0.8 ± 0.2*	0.7 ± 0.2*	0.9 ± 0.2*
D	10	Hp → Metronidazol	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.2

Hp, *Helicobacter pylori*; GA, glycyrrhethinic acid.

* $P < 0.05$, compared with group B. Values for results are expressed as means ± SD.

表 2. 幽門腺における炎症所見

Groups	No.	Treatments	Antrum			
			Infiltration of neutrophils	Infiltration of mononuclear cells	Hyperplasia	Peptic ulcer
A	10	Broth	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
B	10	Hp	2.9 ± 0.3	3.0 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.3
C	10	Hp → GA	2.2 ± 0.4*	2.0 ± 0.2*	1.5 ± 0.1*	1.2 ± 0.3*
D	10	Hp → Metronidazol	2.0 ± 0.4*	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.0 ± 0.0

Hp, *Helicobacter pylori*; GA, glycyrrhethinic acid.

* $P < 0.05$, compared with group B. Values for results are expressed as means ± SD.

参考文献：

1. Krausse R, Bielenberg J, Blaschek W, Ullmann U. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Extractum liquiritiae, glycyrrhizin and its metabolites. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul;54(1):243-6. Epub 2004 Jun 9.
2. Kamiya S, Taguchi H. Prospect of the development of new bactericidal drugs against Helicobacter pylori for eradication therapy. *Nippon Rinsho.* 2002 Feb;60 Suppl 2:751-5.
3. Kawashima K, Fujimura Y, Makino T, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicine (XXXII): protective effects of hangeshashinto and the combinations of its major constituents on gastric lesions in rats. *Biol Pharm Bull.* 2006 Sep;29(9):1973-5.
4. Tian M, Yan H, Row KH. Extraction of glycyrrhizic Acid and glabridin from licorice. *Int J Mol Sci.* 2008 Apr;9(4):571-7.
5. Ikeda T, Abe K, Kuroda N, Kida Y, Inoue H, Wake K, Morito M, Sato T. The inhibition of apoptosis by glycyrrhizin in hepatic injury induced by injection of lipopolysaccharide / D-galactosamine in mice. *Arch Histol Cytol.* 2008 Nov;71(3):163-78.
6. Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Muranaka T. Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 16;105(37):14204-9.
7. Shiota G, Harada K, Ishida M, Tomie Y, Okubo M, Katayama S, Ito H, Kawasaki H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice. *Carcinogenesis.* 1999 Jan;20(1):59-63.
8. Arase Y, Ikeda K, Murashima N, Chayama K, Tsubota A, Koida I, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Kumada H. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer.* 1997 Apr 15;79(8):1494-500.
9. Cao X, Tsukamoto T, Seki T, Tanaka Hi, Morimura S, Cao Liyu, Mizoshita T, Ban H, Toyoda T, Maeda H, and Tatematsu M. 4-Vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (Canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *Int J Cancer.* 2008 Apr 1;122(7):1445-54.
10. Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Tanaka H, Cao L, Toyoda T, Takasu S, Ban H, Kumagai T, Tatematsu M. Severity of gastritis determines glandular stomach carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci.* 2007 Apr; 98(4):478-83.
11. Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Shimizu N, Mizoshita T, Kumagai T, Kaminishi M, Tatematsu M. Eradication of Helicobacter pylori induces apoptosis and inhibits proliferation of heterotopic proliferative glands in infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci.* 2004 Nov; 95(11):872-7.
12. Takasu S, Tsukamoto T, Cao X, Toyoda T, Hirata A, Ban H, Yamamoto M, Sakai H, Yanai T, Masegi T, Oshima M, Tatematsu M. Roles of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and beta-catenin activation in gastric carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea-treated K19-C2mE transgenic mice. *Cancer Sci.* 2008 Dec;99(12):2356-64.
13. Toyoda T, Tsukamoto T, Takasu S, Shi L, Hirano N, Ban H, Kumagai T, Tatematsu M. Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Cancer.* 2009 Oct 15;125(8):1786-95.

注：本研究は、2009年10月1日『第68回日本癌学会学術総会（横浜）』（68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association -PROCEEDINGS-, 2009, Yokohama, p. 129）にて示説発表した。

作成日：2010年3月6日