

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：井内 康輝
所属機関名：広島大学大学院医歯薬学総合研究科
所属部署名：病理学研究室 職名：教授
所在地：〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3
電 話：082-257-5150 内線：



1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

アスベスト（石綿）曝露による健康被害に関する日中共同研究

3. 成果の概要

アスベスト（石綿）の吸入による健康被害、ことに呼吸器障害について、

中国及び日本の研究者が集まり、第2回中日アスベストシンポジウムを開催した。
※発表論文等

Proceedings of The 2nd China-Japan Joint Asbestos Symposium

4. 研究組織

日本側研究者氏名：井内 康輝

職名：教授

所属機関名：広島大学大学院医歯薬学総合研究科

部署名：病理学研究室

中国側研究者氏名：張 幸

職名：院長兼所長

所属機関名：浙江省医学科学院

部署名：衛生学研究所

アスベスト（石綿）曝露による健康被害に関する日中共同研究

研究者氏名：井内 康輝

所 属：広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学

要旨

アスベスト（石綿）の吸入による呼吸器障害について、中国及び日本の医療関係者が共同して討議するために、第2回中日アスベストシンポジウムを開催した。その成果をまとめた報告書を、いまだアスベストの全面的な使用禁止に至っていない中国におけるアスベスト対策に役立ててもらうことを目的にして、中国の関係者に広く配布した。

Key Words

アスベスト（石綿）、呼吸器障害、被害者補償・救済制度

緒言

アスベスト（石綿）は、繊維状の鉱物の総称であるが、耐熱性、耐火性などに優れた有用な物質として広く工業的に用いられてきた。しかし、これらを体内に吸引すると、呼吸器において石綿肺や胸膜肥厚などの非腫瘍性病変に加えて、中皮腫や肺がんなどの腫瘍性病変を発生させることが明らかとなった。1972年WHOがこれを発がん物質として指定して以降、欧米ではその使用が禁止されてきたが、日本での規制は欧米に比べ遅れ、2006年になり全面的な禁止に至った。現在日本では、この石綿への職業性曝露によって生じた呼吸器病変である石綿肺、びまん性胸膜肥厚、良性石綿胸水及び中皮腫、肺がんは労災補償制度の適応を受けることができ、一般生活環境下での曝露でも中皮腫と肺がんについては救済制度の対象となっている。

しかし、中国を含むアジア諸国ではいまだ、アスベスト（石綿）の使用規制が十分になされておらず、アスベスト（石綿）曝露による呼吸器障害発生は衆知されていない可能性がある。こうした観点から、日本におけるアスベスト（石綿）による曝露や障害に関する診断や治療法の進歩あるいはこれらの最新の研究を紹介することは、中国にとって有用な情報となるとと思われる。

そこで今回、中国・杭州において、中国と日本の研究者が一同に会し、シンポジウムを開催し、研究発表と討論によってお互いの研究の進展をはかることとした。

結果

中国からの発表の要約を以下に示す。

1. Li Tao (中国疾病予防センター)

[アスベストの生産]

- 中国で生産されるアスベストの99.9%はクリソタイルで、クロシドライトは0.1%以下である。
- 1996年の統計データでは、中国国内に120の石綿鉱山があり、うち30はかなり大規模である。これら鉱山で従事する労働者は24,300人である。
- アスベスト製品の生産工場は数千あり、それらで働く従業員は46,300人に達する。
- アスベスト製品には約200のカテゴリーがある。50%はアスベストセメント製品、20%は摩擦防止製品、10%は天井などの断熱材である。
- 1996年の鉱山の生産量は441,700トンで、世界の中で生産量第2位であり、世界の総生産量の約10%を占める。(図1)
- アスベスト製品の生産量は140,000トンで、世界の中で生産量は第3位であり、総生産量の約10%を占める。この生産量は増加を続けており、摩擦防止製品は2002年に比べ2003年は32.6%増加している。
- 長いアスベスト (amphibole) は消費量からみて不足しており、輸入が必要であり、輸入量は2003年に比べ、2004年は22.4%増加している。一方、短いアスベスト (serpentine) には国内生産分に余剰があり、輸出している。(図2)

[アスベストによる健康被害]

- 中国には80,000人のアスベスト曝露者がいて、1950年から法制度にもとづいて検診を受けている。2003年までに石綿肺と診断された例は7907例であり、塵肺症の約1%である。石綿肺が診断された時期のピークは1979～1985年であり、1985年は467例である。近年でも毎年220例が診断されている。2003年末までの死亡例は923例で、死亡率は11.67%である。死因は、混合性呼吸器疾患、循環器疾患、がんの順である。
- 疫学的研究では、アスベスト曝露者の総死亡率、がんでの死亡率、肺がんでの死亡率はそれぞれ100万人対522.9人、195.7人、72.2人である。
- 胸膜プラークは、石綿肺の51%、アスベスト曝露労働者の15%にみられる。

[職業病予防の方針]

- 2002年までに様々な職業病の予防法が作られた。
- アスベスト代替製品の開発が行われ、その使用が奨められている。
- クロシドライトは、2007年7月までに排除されるべき品目一覧にあがった。
- アスベストの代替品の研究は1980年代から始まっている。
- 多くのアスベスト企業とそれらを認める国では、アスベストのうちでクリソタイルは安全で信頼できるとしている。一方、International Labor Decision No.162では、アスベストを安全に使用することを厳密に守らなければならないことを強調している。
- 中国において、研究者の間ではアスベストの使用について議論があるが、クリソタイルはクロシドライトに比べ、その有害性はかなり低いと認識している。

[結論]

- 中国は世界の中でアスベストの生産と使用の主要国のひとつであるが、経済発展のレベルに従って、アスベストの使用の制限と禁止を行うという方針をとっている。
- アスベストを扱う地方の手工業は禁止し、小さなアスベスト鉱山も徐々に閉鎖している。
- クロシドライトを含む製品は2002年10月以降禁止し、2003年10月以降、自動車のブレーキの摩擦防止の目的での使用を禁止した。
- アスベストの代替製品について広く研究を続けている。

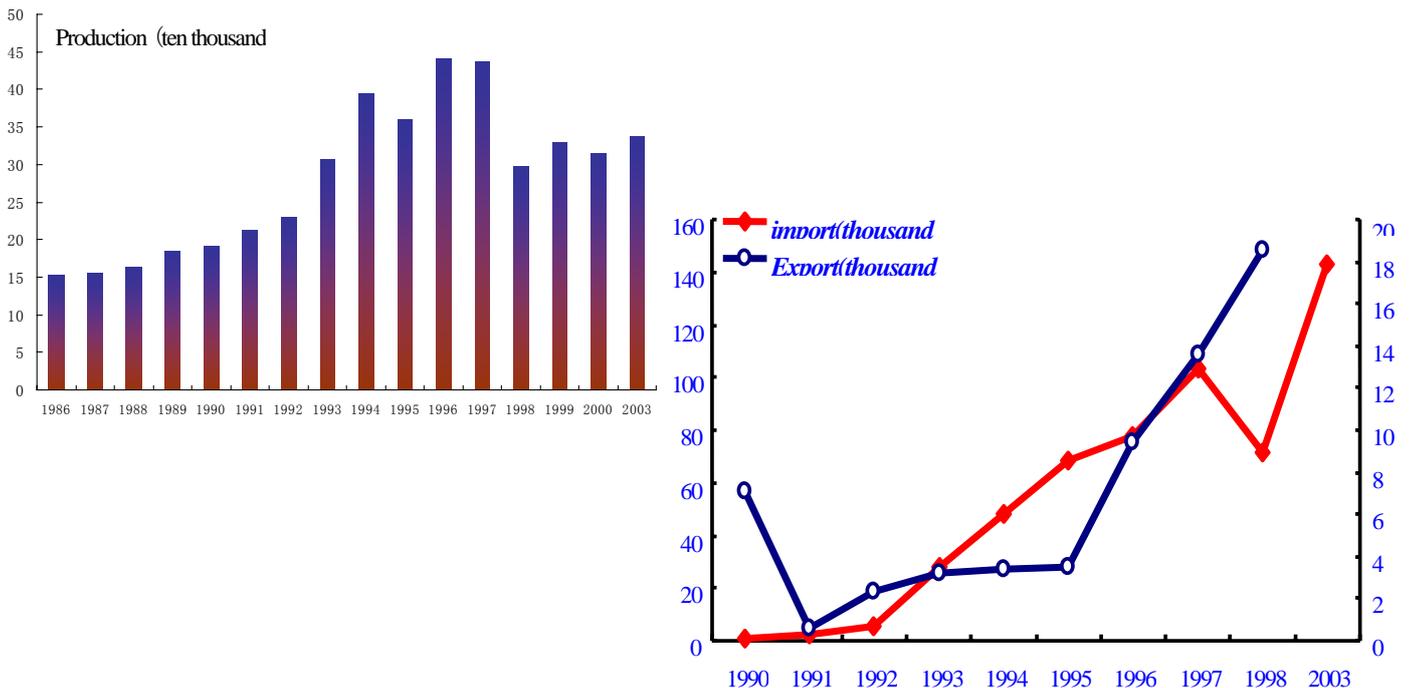


図1. 中国におけるアスベストの生産

図2. 中国におけるアスベストの輸出入

2. Wang Mianzhen 他 (四川大学)

アスベスト製品を生産する工場の男性従業員の石綿肺と死亡のコーホート研究の結果、アスベスト濃度や曝露期間に関連して石綿肺と死亡率の上昇を認めた。

3. Lan Yajia 他 (四川大学)

石綿肺の重症度と喫煙量の相関を、石綿プラントの従業員 1814 人について検討した結果、喫煙が石綿肺の増悪因子であることが判った。

4. Jun-Qiang Chen 他 (浙江省医学科学院)

クリソタイル曝露者の死因を解明するために 2854 死亡例の死因調査を行った結果、手工業のクリソタイル紡績業に従事した女性の呼吸器疾患と肺癌による過剰死を認めた。

5. Deng Qian 他 (四川大学)

石綿を扱う労働者における石綿肺の発生の量-反応関係を知るために、石綿工場で 1 年以上勤務した 338 人の男性について調査した結果、40 年間勤務する人の石綿肺を 1%以下にする石綿の濃度は $3.9\text{mg}/\text{m}^3$ と計算された。

6. Lijin Zhu (浙江省医学科学院)

人造繊維の発がん性を、培養された気管支上皮細胞を用いて検討した結果、耐火性セラミック繊維は石綿と同様に、細胞の悪性転化を誘導した。

7. Jixian Zhang 他 (余姚市人民医院)

中国における 27 例 (男女比=8 : 19) の悪性胸膜中皮腫を臨床的に解析した。17 例が職業性に、4 例が非職業性に石綿への曝露歴があった。病理学的には上皮型 9 例、肉腫型 5 例、二相型 8 例であった。

日本からの発表の要約を以下に示す。

1. 井内康輝他 (広島大学)

石綿への曝露によって、さまざまな非腫瘍性疾患すなわち、石綿肺、良性石綿胸水、びまん性胸膜肥厚や、腫瘍性疾患すなわち、中皮腫、肺癌が生じるが、これらについて日本では、患者に対する補償あるいは救済が行われている。従って、それらを正しく診断することが、患者の治療とともに補償制度や救済制度の運用にも重要である。しかしながら、血清や胸水中の診断マーカーの検査や CT などの画像診断にも不確実性があり、最終的な診断に至らない。そこで、正しい診断に至るための病理診断が期待されるが、そこにもさまざまな困難さがあり、その克服に努力している。

2. 岡部和倫他 (山口宇部医療センター)

悪性中皮腫に対する胸膜肺全摘出術 (extrapleural pneumonectomy, EPP) には実施者によって質の差がある。演者は Dr.Sugarbaker から手法を学んでおり、その手法を紹介した。

3. 廣島健三他 (千葉大学)

胸膜肺全摘出術を受けた後、長期生存している 7 例の中皮腫例について、中皮腫の組織像を把握するとともに、腫瘍細胞における p16^{INK4} のメチル化の有無を調べた結果、メチル化のある例では予後が悪いことが判明した。

4. 森永謙二他 (環境再生保全機構)

現在、世界のなかで石綿関連疾患について補償や救済が行われているフランス、ベルギー、オランダ、イギリス、日本の状況を紹介した。

5. 田川雅敏他 (千葉がんセンター)

Replication-competent recombinant adenovirus (Ad)を用いた中皮腫の遺伝子治療の開発のなかで、promotor-mediated

replication-competent Ad with the type 35 fiber-knob を作成し、これが中皮腫細胞に対して type 5 Ad よりつよい抗腫瘍効果をもつことを明らかにした。

6. 篠原也寸志他（労働安全衛生センター）

肺組織の中から石綿小体の定量を正しく行うために、2 年間にわたる共同研究を行った。初年度に石綿小体の形や大きさに関して規準を作成した結果、翌年度には定量結果により合意がえられた。

7. 西村泰光他（川崎医科大学）

抗腫瘍免疫を司る natural killer (NK)細胞の細胞障害性は NKG2D、2β4、NKp46 などのレセプターによってコントロールされている。実験的にクリソタイルに曝露されたヒト NK 細胞の特性を調べ、NKp46 が免疫活性をはかるよい指標となる可能性が示唆された。

8. 金龍男 他（広島大学）

上皮型中皮腫の腫瘍細胞におけるアポトーシスを検討し、アポトーシス関連蛋白である survivin の高発現が caspase3 の活性化を阻害しアポトーシスを抑制していることを見出した。

考察

中国におけるアスベスト（石綿）の生産状況や輸入状況を見ると、アスベストによる健康障害の発生が日本よりほぼ 20 年遅れて継続する可能性が考えられる。アスベスト（石綿）の中でクリソタイルは安全であるという考え方は、アスベスト（石綿）鉱山があり、これを輸入している国あるいはそれを担う企業において述べられているが、クリソタイルが安全であるという科学的な根拠は希薄である¹⁾。事実今回の中国側からの発表でも、クリソタイル紡績業に従事する女性に大きな健康障害が認められている。

アスベスト（石綿）の使用について、厳重な管理のもとで可能という議論もある。しかし、クリソタイルは短い繊維であり、空中に飛散する可能性も高いことから、アスベスト製品を生産する工場内での管理は可能であったとしても、その製品を利用する一般の生活環境では、製品の劣化によるクリソタイル飛散と体内への吸引という危険性が常に残されると考えられる。中国においてもクリソタイルを含むアスベスト（石綿）の全面的な使用禁止が望まれる。

アスベスト（石綿）曝露によるさまざまな疾患については診断が難しい²⁾。日本においては近年、労災補償制度に加えて救済制度が発足して以降、それらの疾患の診断の精度の問題が浮上ってきている。非腫瘍性疾患では、様々な原因でおこる肺の線維化の中からアスベスト（石綿）への曝露による石綿肺であることを証明していくことは難しい。また、胸水貯留あるいは胸膜肥厚という非特異的な所見も、他の原因による所見との鑑別が難しい。腫瘍性疾患では、中皮腫は病理学的診断が重視されるが、日本ではこれまでの診断を再検討すると 10 数%は誤診であるという結果をえている³⁾。また、肺癌についてみると、その 80～90%は喫煙が主たる要因と考えられることから、それらの中からアスベスト（石綿）が原因とする根拠をいかに求めるかが問題となる。欧米では、アスベスト（石綿）への曝露歴があれば全ての患者を補償・救済するとの考えもあるが、日本ではこれらの疾患の鑑別を厳密に行うことで対処している。日本においてもこれらの制度の運用方法が変わる可能性もなくはないが、中国が補償・救済制度をどのような形で作るかについても日本を参考にすることが多いと思われる。

日本においては、アスベスト（石綿）への曝露による健康被害に関する基礎的な研究が多方面からすすめられている。これらの研究の進展は、疾患の予防や診断あるいは治療法の開発に繋がると思われ、中国においても、こうした基礎的な研究が今後展開されることが期待される。

参考文献

- 1) 神山宣彦、石綿の基礎知識、石綿ばく露と石綿関連疾患（森永謙二編）、pp17-54、三信と所、2007
- 2) 井内康輝：病理学的にみたアスベスト関連疾患の診断。肺癌 49: 83-87, 2009
- 3) Takeshima Y., Inai K. et al: Accuracy of pathological diagnosis of mesothelioma cases in Japan: Clinicopathological analysis of 382 cases, Lung Cancer 66: 191-197, 2009

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 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・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： 川上 和義
所属機関名： 東北大学
所属部署名：医学系研究科 職名：教授
所在地：仙台市青葉区星陵町 2-1
電 話：022-717-7946 内線：



1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

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

3. 成果の概要

宮城県南地域の病院と中国広州市中山大学医学部附属第三医院の呼吸器外来に通院中の患者に肺炎球菌ワクチンを接種し、その前後の肺炎球菌莢膜抗原に対する血清抗体濃度を測定しその推移を日中間で比較検討するとともに、中国側への抗体濃度測定法の技術移転を行うことができた。

※発表論文等

特記なし

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 川上 和義	職名：教授
所属機関名： 東北大学	部署名：医学系研究科
中国側研究者氏名： 張 天托	職名：教授
所属機関名： 中山大学	部署名：医学部

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

研究者氏名 教授 川上和義
研究機関 東北大学大学院医学系研究科
共同研究者氏名 張 天托（中山大学医学部 教授）
宮坂智充（東北大学大学院医学系研究科
大学院生）

要旨

肺炎球菌は成人肺炎の最も頻度の高い起炎菌であり、65歳以上の高齢者や慢性心肺疾患を有する患者では肺炎球菌ワクチンの接種が推奨されている。現在使用可能な肺炎球菌ワクチン（ニューモバックス®）は胸腺非依存性抗原であるためメモリー反応が期待できず、感染予防に必要な血清抗体価がどの程度維持できるのか不明な点も多い。本研究では、中国広州市中山大学医学部附属第三医院呼吸器内科との共同研究により、肺炎球菌ワクチン接種前後で経時的に血清抗体濃度を測定することによって、ワクチンに対する免疫応答性及び抗体価の持続期間について検討するとともに、現在申請者が宮城県南地域において得ているデータと比較することで日中間の相違点について解析を実施した。宮城県南地域では、肺炎球菌莢膜血清型 6B、14、19F、23F に対する血清 IgG 抗体濃度については 14 で 3 カ月後、その他の血清型では 4 週後をピークに増加がみられた。その後、6B では接種 1 年後までピーク値に近い濃度が維持されたが、その他の血清型では接種 1 年後にはピーク値の半分近くにまで低下を示した。一方、中国での解析では、各種血清型に対する血清 IgG 抗体濃度は 19F を除き 1 カ月後にピークとなり、まだワクチン接種 6 カ月後の段階ではあるが、23F ではピーク値の約 1/3 にまで低下していた。このように、これまでの欧米からの報告と異なり、日本と中国では血清抗体濃度が比較的早期に低下する可能性が示唆され、今後のさらなる追跡調査が重要と考えられた。

Key Words : 肺炎球菌ワクチン、免疫応答性、血清抗体濃度、低応答者、日中間比較

緒言

肺炎は高齢者の主要な死亡原因であり、その予防は重要な対策のひとつとなる。肺炎球菌は成人肺炎の最も頻度の高い起炎菌であり、65歳以上の高齢者や慢性心肺疾患を有する患者では肺炎球菌ワクチンの接種が推奨されている。現在使用可能な肺炎球菌ワクチン（ニューモバックス®）は胸腺非依存性抗原であるためメモリー反応が期待できず、感染予防に必要な血清抗体価がどの程度維持できるのか不明な点も多い。欧米ではワクチン接種後の血清抗体価は 5 年程度持続するとされているが(1, 2)、わが国での解析は限定されたものであり、中国ではほとんど解析されていないのが現状である。最近 Chen らは、わが国の主要な 4 種の血清型についてワクチン接種前後での血清抗体価を解析し、上昇した抗体価が 2 年後には初期値付近まで低下することを報告している(3)。我々も宮城県南地域においてワクチン接種による血清抗体価の推移を検討しており、同様に 1 年以内の早期に低下する症例が少なくないことを観察している。このことは、血清抗体価の持続期間における人種の影響について問題を提起しているものと考えられる。すなわち、欧米と日本、中国のような東アジアとでワクチンに対する応答性や予防抗体の持続性に明らかな相違がみられるのであれば、今後の肺炎予防対策を考える際に欧米とは異なる独自のエビデンスの構築が求められることになる。そこで本研究では、中国広州

市中山大学医学部附属第三医院呼吸器内科との共同研究により、肺炎球菌ワクチン接種前後で経時的に血清抗体価を測定することによって、ワクチンに対する免疫応答性及び抗体濃度の持続期間について検討するとともに、現在我々が宮城県南地域において得ているデータや欧米からの報告と比較することで、日中間、そしてさらに欧米との相違点について解析を実施した。

対象と方法：

本研究では、宮城県白石市の公立刈田総合病院及び中国広州市中山大学医学部附属第三医院との共同研究を実施した。公立刈田総合病院呼吸器内科外来に通院中の慢性呼吸器疾患患者 55 症例、中山大学医学部附属第三医院呼吸器内科外来に通院中の 30 症例から得られた血清検体を用いて以下の研究を実施した。

ワクチン接種前後の血清抗体濃度の推移を調べるために、日本では接種前、接種 2 週、4 週、3 ヶ月、6 ヶ月後、そして 1 年後に、中国では接種前、接種 4 週、6 ヶ月後に血清を採取した。血清 IgG 抗体濃度は、WHO によって推奨されている第三世代 ELISA を用いて、莢膜血清型 6B、14、19F、23F について測定した。但し、中国の検体においては、本報告書作成の段階では 19F、23F については測定を開始できていなかった。

(倫理面への配慮)

本研究については、東北大学及び公立刈田総合病院の倫理委員会の承認を受けており、十分なインフォームドコンセントの上で被験者の同意を得ることとした。中国での研究を開始する前に、中山大学医学部第三附属医院の倫理委員会の承認を得た上で、被験者からは十分なインフォームドコンセントによる研究協力への同意を得た。

結 果：

1) 日本における血清抗体濃度の推移

公立刈田総合病院の 55 症例における肺炎球菌莢膜血清型 6B、14、19F、23F に対する血清 IgG 抗体濃度については 14 で 3 カ月後、その他の血清型では 4 週後をピークに増加がみられた。その後、6B では接種 1 年後までピーク値に近い濃度が維持されたが、その他の血清型では接種 1 年後にはピーク値の半分近くにまで低下を示した (図 1)。また、ワクチン接種前の IgG 抗体濃度が 2 μ g/ml 以下の患者では、6B、14、19F、23F においてそれぞれ 21%、15%、13%、22% でピーク時の濃度が前値の 2 倍に到達しなかった (低応答者)。

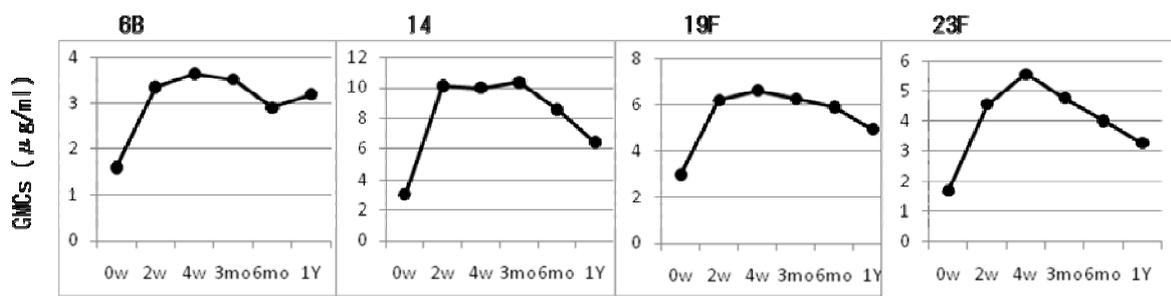


図 1. 日本における肺炎球菌ワクチン接種後の IgG 抗体血清濃度の推移

2) 中国における血清抗体濃度の推移

中山大学医学部附属第三医院での解析では、肺炎球菌莢膜血清型 6B、14、23F に対する血清 IgG 抗

体濃度は公立刈田総合病院と同様に1カ月後にピークとなり、19Fだけは1カ月後よりも6カ月後の方が高値を示した。まだワクチン接種6カ月の段階ではあるが、6B及び14ではピーク値の約3/2を維持しており、23Fではピーク値の約1/3にまで低下していた(図2)。また、低応答者は6B、14、19F、23Fにおいて、それぞれ、14.3%、16.7%、33.3%、9.1%であった。

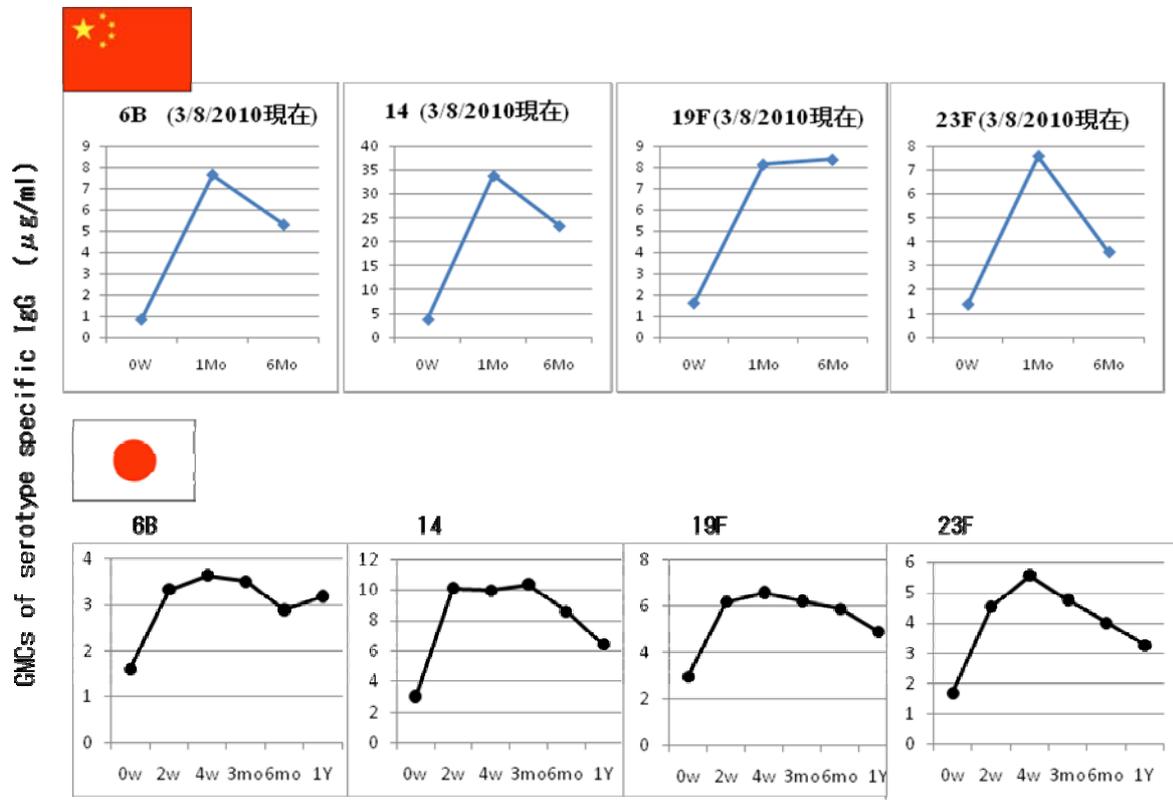


図2. 中国における肺炎球菌ワクチン接種後のIgG抗体血清濃度の推移

考 察:

本研究で我々は、肺炎球菌ワクチンに対する免疫応答性及びワクチン接種前後における血清中の荚膜血清型特異抗体濃度の推移について解析し、日中間での比較検討を行った。中国における肺炎、髄膜炎、菌血症患者から分離される肺炎球菌の荚膜血清型は未だ不明であるため、今回の抗体濃度測定は、我が国での主要な血清型である6B、14、19F、23Fについて実施した。ワクチン接種前の抗体濃度については両国間で類似した値を示しており、これらの血清型の頻度に関してはそれほど大きな相違はない可能性が予想される。一方、ワクチン接種後のピーク値については、19F、23Fでは大きな相違はないものの、6B、14では中国でより高い応答性が認められた。症例数が十分でないために明確なことは言えないものの、両国間でワクチンに対する免疫応答性に相違がみられる可能性が示唆された。便宜的にワクチン接種前の抗体濃度が2µg/ml未満で、前値に対するピーク値の比が2未満の場合を低応答者と定義すると、日本では6B、14、19F、23Fについてそれぞれ21%、15%、13%、22%、中国では14.3%、16.7%、33.3%、9.1%と多少の相違はあるものの、統計学的に有意な差は認められなかった。

肺炎球菌ワクチン接種後の血清抗体濃度の持続期間については、宮城県南での検討では6Bで接種1年後までピーク値に近い濃度が維持され、その他の血清型では接種1年後にはピーク値の半分近く

にまで低下を示したのに対して、中国での検討ではワクチン接種 6 カ月の段階ではあるが、6B 及び 14 ではピーク値の約 3/2 を維持しており、23F ではピーク値の約 1/3 にまで低下していた。今回の検討では、一部の血清型では血清抗体濃度が比較的短い期間で低下する可能性が予想された。米国における初期の検討から血清抗体価は 5~10 年程度持続すると考えられてきた (1, 2)。これまでわが国では、肺炎球菌ワクチンの再接種は認められておらず生涯 1 度のみであったが、最近になって前回の接種から 5 年程度経過していれば再接種が認められるように変更された (4-6)。しかし、本研究ではワクチン接種後 1 年という比較的短い期間での血清抗体濃度の低下が認められたことから、今後さらなる継続的な調査研究が必要になる。さらには、ワクチン接種後の血清抗体濃度の推移が日中間で類似していたことから、欧米との比較を目的とした研究も今後は望まれ、このような解析を通してより効果的な肺炎予防対策が可能になるものと考えられる。

参考文献：

- 1) Mufson MA, Krause HE, Schiffman G: Long-term persistence of antibody following immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 173: 270-275, 1983.
- 2) Mufson MA, Krause HE, Schiffman G, Hughey DF. Pneumococcal antibody levels one decade after immunization of healthy adults. *Am J Med Sci.* 293: 279-284, 1987.
- 3) Chen M, Hisatomi Y, Furumoto A, Kawakami K, Masaki H, Nagatake T, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Oishi K. Comparative immune responses of patients with chronic pulmonary diseases during the 2-year period after pneumococcal vaccination. *Clin Vaccine Immunol.* 14: 139-145, 2007.
- 4) 川上和義: 肺炎球菌ワクチンによる肺炎予防効果とその持続期間、そして再接種問題について. *感染制御*, 5: 539-542, 2009.
- 5) 川上和義: ワクチンによる肺炎予防とその免疫学的機序, *内科学会雑誌*, 98: 291-297, 2009.
- 6) 大石和徳, 川上和義, 永井英明, 砂川慶介, 渡辺 彰: 肺炎球菌ワクチン再接種承認の必要性に関するアンケート調査研究. *日本呼吸器学会雑誌*, 48: 5-9, 2010.

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： 馬 峰 
所属機関名：東京大学
所属部署名：医科学研究所 職名：特任研究員
所 在 地：東京都港区白金台 4-6-1
電 話：03-5449-5397 内線：

1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

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

3. 成果の概要

今回の研究により、ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、血液細胞への分化が可能であった。現在、先天性骨髄不全症候群患者から iPS 細胞を樹立中であり、今後は患者由来 iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞の血液細胞への分化を比較検討する予定である。

※発表論文等

Ma F, Ebihara Y, Nakauchi H, Tsuji K: Derivation of mature blood cells from human induced pluripotent stem cells. 38th Annual Scientific Meeting, International Society of Experimental Hematology. Athens. Sept 9 ~ 12, 2009.

4. 研究組織

日本側研究者氏名：馬峰

所属機関名：東京大学

中国側研究者氏名：竺晓凡

所属機関名：中国医学科学院中国协和医科大学

職名：特任研究員

部署名：医科学研究所

職名：教授

部署名：血液学研究所

血液病医院

児童血液病診療センター

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

研究者氏名	馬峰
日本研究機関	東京大学 特任研究員
中国研究機関	中国科学院血液学研究所
共同研究者名	竺晓凡

要 旨

Fanconi 貧血、Kostmann 症候群、Diamond-Blackfan 症候群、Pearson 症候群、Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化異常症等の様々な遺伝的背景を有する先天性骨髄不全症候群 (CBMFS: congenital bone marrow failure syndrome) の研究を目的として、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から血液細胞への分化誘導法を、健康人由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) と CBMFS 患者由来 iPS 細胞に応用し、その血液細胞への分化過程を解析することを計画した。健康人由来 iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、胎生 15~16 日のマウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、培養 2 週間頃より多能性造血前駆細胞を含む種々の造血前駆細胞が分化誘導され、これらの造血前駆細胞から、赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの様々な血液細胞の産生が可能であった。今後は、健康人由来 iPS 細胞から血液細胞への分化過程を、現在樹立中の CBMFS 患者由来 iPS 細胞のそれと比較検討することにより、CBMFS の病因・病態が解明され、新たな治療法が開発されることが期待される。

Key Words iPS 細胞, 先天性骨髄不全症候群, 造血前駆細胞, ストローマ細胞

緒 言:

Fanconi 貧血、Kostmann 症候群、Diamond-Blackfan 症候群、Pearson 症候群、Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化異常症等の様々な遺伝的背景を有する骨髄不全症が存在し、これらは先天性骨髄不全症候群 (CBMFS: congenital bone marrow failure syndrome) と呼ばれる。CBMFS の原因遺伝子については、その一部は特定されているが、同定されていないものも多数存在し、特定された遺伝子についても、骨髄不全を惹起するメカニズム、さらには白血病、悪性腫瘍へ進展するメカニズムについてはほとんど解っていない。

一方、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚繊維芽細胞などの体細胞から樹立される、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同質の性状を有する多能性幹細胞である。特に、ヒト iPS 細胞の樹立法が開発されたことにより、その臨床応用が期待されている。我々は、これまでに、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、ヒト ES 細胞が多能性造血細胞へ分化誘導されることを示してきた (参考文献 1, 2)。

それらの成果から我々は、我々が確立したヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導系をヒト iPS 細胞の分化誘導に応用することにより、さまざまな CBMF 疾患患者から樹立された iPS 細胞の血液細胞への分化過程を、健康人由来 iPS 細胞のそれと細胞生物学的及び分子生物学的に比較検討することにより、CBMFS の病因・病態の解明や治療法の開発が可能になるのではないかと考え、本研究を実施した。

方 法:

1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の樹立

我々がすでに報告した方法で（参考文献3）、胎生 15～16 日のマウス胎仔肝から分離された細胞を付着培養し、ストローマ細胞を樹立した。

2. ヒト iPS 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養

ヒト iPS 細胞を、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養し、産生されてくる細胞を、形態学的観察、フローサイトメトリー、RT-PCR 法、血液細胞コロニー形成法などにより、継時的に解析した。

3. ヒト iPS 細胞由来赤血球におけるヘモグロビンの解析

マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により分化誘導されたヒト iPS 細胞を血液細胞コロニー培養し、形成された赤血球コロニーや混合コロニーに含まれる赤血球系細胞のヘモグロビンを、免疫染色により解析した。

結 果:

1. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の樹立

胎生 15～16 日のマウス胎仔肝から分離された細胞を付着培養することにより、ストローマ細胞を樹立することができた（図1）。

2. マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養によるヒト iPS 細胞から血液細胞への分化

(1) 形態学的観察

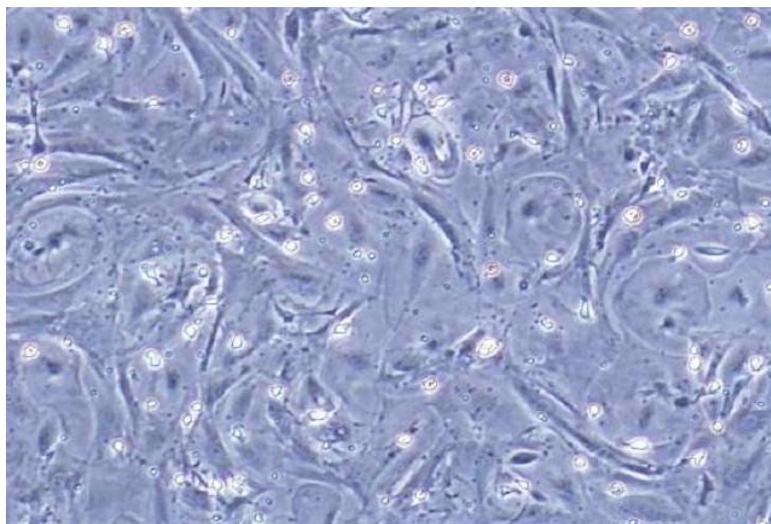
ヒト iPS 細胞は、樹立されたマウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養すると、ヒト ES 細胞との共培養と同様に、培養 5 日目ごろより分化を開始し、培養 10 日目ごろには、未分化な小型円形細胞が出現した（図2）。その後、培養 15 日目ごろまで、これらの細胞は増殖し続けた。

(2) RT-PCR による検討

ヒト ES 細胞との共培養と同様に、培養 13 日目には、未分化な iPS 細胞のマーカーである Oct4、未熟な中胚葉系細胞のマーカーである Brachury の発現は認められなくなった。

図1.

樹立されたマウス胎仔肝由来
ストローマ細胞



(3) フローサイトメトリーによる検討

ヒト ES 細胞との共培養と同様に、CD34+細胞は、培養 5 日目ころから共培養中に出現し、培養 16~17 日目ころまで増加し続けた。培養 14 日目の CD34+細胞の一部は、CD45 や c-Kit を発現していた。

(4) 血液コロニー形成法による検討

interleukin (IL)-3、エリスロポエチン、トロンボポエチン、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)、SCF (stem cell factor)存在下での血液コロニー培養による検討でも、ヒト ES 細胞との共培養と同様に、血液細胞コロニー形成細胞は、培養 10 日目ごろに初めて出現した。その数は次第に増加し、培養 14~16 日目には最大となった。観察されたコロニー形成細胞は多様で、赤血球コロニー、顆粒球・マクロファージコロニー、種々の血液細胞を含む混合コロニーが認められた。これらのコロニー中には、赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの種々の血液細胞がされていた。産生された赤血球の中には、脱核した成熟赤血球も認められた。

以上の結果は、ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、赤血球系前駆細胞、骨髄球系前駆細胞、さらには、複数の血液細胞に分化可能な多能性造血前駆細胞に分化誘導され、これらの造血前駆細胞から種々の血液細胞が産生されたことを示している。

3. ヒト iPS 細胞由来赤血球における成人型ヘモグロビンの合成

上記の方法により形成された赤血球コロニー、あるいは混合コロニーに含まれるヒト iPS 細胞由来赤血球のほとんどが、胎児型ヘモグロビン(HbF)を保持していたが、同時に、成人型ヘモグロビン(HbA)も保持していることが確認された。

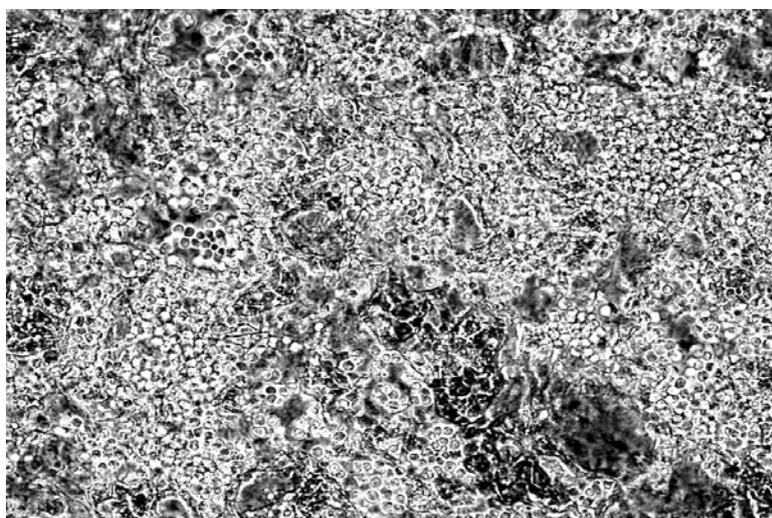
考 察：

今回の検討により、ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、血液細胞への分化が可能であった。

現在、CBMFS 患者から iPS 細胞を樹立中であり、今後は CBMFS 患者由来 iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞の血液細胞への分化を比較検討することにより、これまでほとんど解明されていない CBMFS の病因・病態を解明し、治療法の開発に繋げていきたいと考えている。

図 2.

ヒト iPS 細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養中に出現した小型円形細胞 (培養 10 日目)



参考文献：

1. Ma F, Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H, Zaike Y, Tsuchida E, Nakahata T, Nakauchi H, Tsuji K: Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13087-13092, 2008.
2. Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, Kawasaki H, Zaike Y, Heike T, Nakahata T, Tsuji K: Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. *Int J Hematol* 85:371-379, 2007.
3. Ma F, Wada M, Ebihara Y, Ishii F, Manabe A, Tanaka R, Maekawa T, Ito M, Mugishima H, Asano S, Nakahata T, Tsuji K: Development of human lymphohematopoietic stem/progenitor cells defined by CD34 and CD81 expressions. *Blood* 97: 3755-3762, 2001.

注：本研究成果の一部は、2009年9月9-12日第38回国際実験血液学会にて口頭発表。

作成日：2010年2月28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 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・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：江頭 健輔 
所属機関名：九州大学大学院医学研究院
所属部署名：循環器内科学 職名：准教授
所在地：812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1
電 話：092-642-5356 内線：5356

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

単球選択的ナノ DDS 技術を基盤とする急性心筋梗塞症の治療法の開発
(不安定化プラークの破綻と分子イメージング)

3. 成果の概要

動脈硬化プラークの進展と不安定化、破綻には単球/マクロファージの関与が大きいことから、単球選択性を持つナノ粒子を用いて、単球走化因子である MCP-1/CCR-2 シグナリングを阻害する治療戦略を検討した。MCP-1 のドミナントネガティブ変異体である 7ND の cDNA プラスミドを封入した PLGA ナノ粒子の静脈内投与により、ApoE 欠損マウスを用いたモデルにおけるプラーク破綻が予防できる事を明らかにした。

※発表論文等

本研究は 2009 年 11 月、米国心臓病学会 (AHA) にて口演発表した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名：江頭 健輔	職名：准教授
所属機関名：九州大学大学院医学研究院	部署名：循環器内科学
中国側研究者氏名：趙 鋼	職名：助手 (主治医)
所属機関名：上海交通大学附属第六人民医院	部署名：心内科

単球選択的ナノ DDS 技術を基盤とする急性心筋梗塞症の治療法の開発 (不安定化プラークの破綻と分子イメージング)

研究者氏名 江頭健輔

日本所属機関 九州大学大学院医学研究院循環器内科学・准教授
共同研究者

趙 鋼

中国所属機関 上海交通大学附属第六人民医院・助手（主治医）

要旨

心血管病の生命予後と生活の質を改善するため、急性冠症候群の主因である動脈硬化プラーク不安定化・破綻を効果的に予防する新規治療法の研究開発が求められている。動脈硬化プラークの進展と不安定化、破綻には単球/マクロファージの関与が大きいことから、単球選択性を持つナノ粒子を用いて、単球走化因子である MCP-1/CCR-2 シグナリングを阻害する治療戦略を検討した。MCP-1 のドミナントネガティブ変異体である 7ND の cDNA プラスミドを封入した PLGA ナノ粒子の静脈内投与により、ApoE 欠損マウスを用いたモデルにおけるプラーク破綻が予防できる事を明らかにした。今後、プラーク破綻予防のための分子イメージングによる診断と治療の融合としてより患者の負担を軽減する新規医療が期待される。本研究をさらに発展させ経時的に動脈硬化病変の分子イメージングによる診断と治療の融合を行う予定である。

Key words 単球、ナノテクノロジー、不安定化動脈硬化プラーク、低侵襲治療、遺伝子治療

緒言

我が国は超高齢化社会を迎え、動脈硬化性疾患（心筋梗塞、脳卒中、末梢動脈疾患など）が増加し、その中でも急性心筋梗塞症とその結果生じる心不全が死因の大半を占めている（平成 18 年、厚生労働省人口動態調査）。薬剤溶出ステントを用いた経皮的冠動脈インターベンションは再狭窄を抑制するが、急性心筋梗塞を含む急性冠症候群の予防効果はなく、また安定狭心症患者の予後改善には無力である¹。故に急性冠症候群の主因である動脈硬化プラーク不安定化・破綻を効果的に予防する新規治療法の研究開発は、心血管病の生命予後と生活の質を改善するための重要な研究課題である。動脈硬化プラークの進展と破綻のメカニズムに関して、ヒト病理および種々の動物モデルにおいて検討が行われ、血管壁を場とした慢性炎症がその主体である事が徐々に明らかにされてきた。中でも動脈硬化巣に対する単球/マクロファージの遊走、浸潤が血管壁の炎症および動脈硬化巣の進展において中心的な役割を果たすことが明らかになってきている。我々も主要な単球走化因子である Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)/CCR-2 およびその受容体である CCR-2 の役割に着目し、高脂血症マウスモデルを用いて検討を行ってきた²。MCP-1 の N 末端側 2~8 番目のアミノ酸を欠失した変異型 MCP-1(7ND)は CCR-2 受容体に対する阻害剤として作用する。リポソーム化した 7ND プラスミドの筋肉注射により遺伝子導入を行うと 7ND は血漿中に遊離し、単球/マクロファージの遊走を *in vivo* で抑制する²。その結果、ApoE 欠損マウスにおいて、高脂肉食負荷に伴う大動脈壁へのマクロファージの浸潤を抑制し、脂肪染色で評価した動脈硬化病変自体も抑制する事を明らかにしてきた³。また、ApoE および CCR-2 両遺伝子の欠損マウスをドナーとした骨髄移植モデルにおける検討により、骨髄細胞に発現する CCR-2 を介した MCP-1/CCR-2 シグナリングが動脈硬化病変の進展に重要な役割を果たしている事を示した。我々は、上述の研究成果を基礎として、単球/マクロファージにおける MCP-1/CCR-2 シグナリングが治療標的になり得ると考え、単球選択性を持つナノ粒子を用いた、新規のプラーク破綻予防療法を研究開発している。そこで、本研究では我々が独自に開発した単球・マクロファージに選択性を持つ生体吸収性ナノ粒子を用いて新規動脈硬化病変プラーク破綻に対する新規治療法の開発を目標とした。

研究対象と方法

水中エマルション溶媒拡散法によるマクロファージ走化因子(MCP-1)の変異体 7ND の cDNA プラスミド封入 PLGA ナノ粒子の作製

水中エマルション溶媒拡散法により PLGA ナノ粒子の作製を行った⁴。PLGA 2g をアセトン 150mL で溶解した後、精製水に溶解した蛍光マーカである FITC あるいは 7ND の cDNA プラスミド 10 mg 水溶液 25mL を添加してポリマー溶液とした。これを 40 °C で攪拌中の 0.5wt%PVA 水溶液 200mL と 0.015 wt%キトサン水溶液 200mL の混液中に滴下した後、アセトンを留去した。得られた PLGA ナノ粒子懸濁液に 10 %マンニトール(東和化成工業製)水溶液 20 mL を添加し、攪拌混合した後、凍結乾燥して粉末化した。ナノ粒子の平均粒子径の測定は、動的光散乱式粒度分布測定装置(マイクロトラック UPA150、日機装)を用いて行った。

PLGA ナノ粒子の単球/マクロファージへの選択的取り込み評価

PLGA ナノ粒子に治療因子を導入し、単球/マクロファージ選択的な DDS としてプラーク破綻に対する新規治療に応用が可能か検討を行った。蛍光色素 FITC を封入した PLGA ナノ粒子を先述の水中エマルション溶媒拡散法により作製し、ApoE 欠損マウスに単回静脈注射を行い、定法により 24 時間後に採血を行い、フローサイトメリーにより CD11b および Gr-1 陽性細胞の定量を行った。

マウスプラークラプチャーモデルの作製と 7ND 封入 PLGA ナノ粒子の有効性評価

従来のプラーク破綻に対する治療法開発研究では、プラーク破綻率が低く研究期間が長期にわたることなど、適切な動物モデルがないことが問題であった。我々は、高脂肪食を負荷した ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II 持続投与を行うことにより、腕頭動脈に高率にプラーク破綻を発症するモデルを開発した。本モデルでは急性プラーク破綻およびプラークに埋没した線維性皮膜をカウントすることにより、プラーク破綻を定量的に評価することが可能である。7ND プラスミド封入ナノ粒子を本モデルマウスに週 1 回静脈内投与し、4 週間後のプラーク破綻予防効果を検討した。

統計解析

データはすべて平均±標準誤差で示した。各データは Prism software program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いて解析を行った。P 値が 0.05 以下を統計学上の有意差とした。

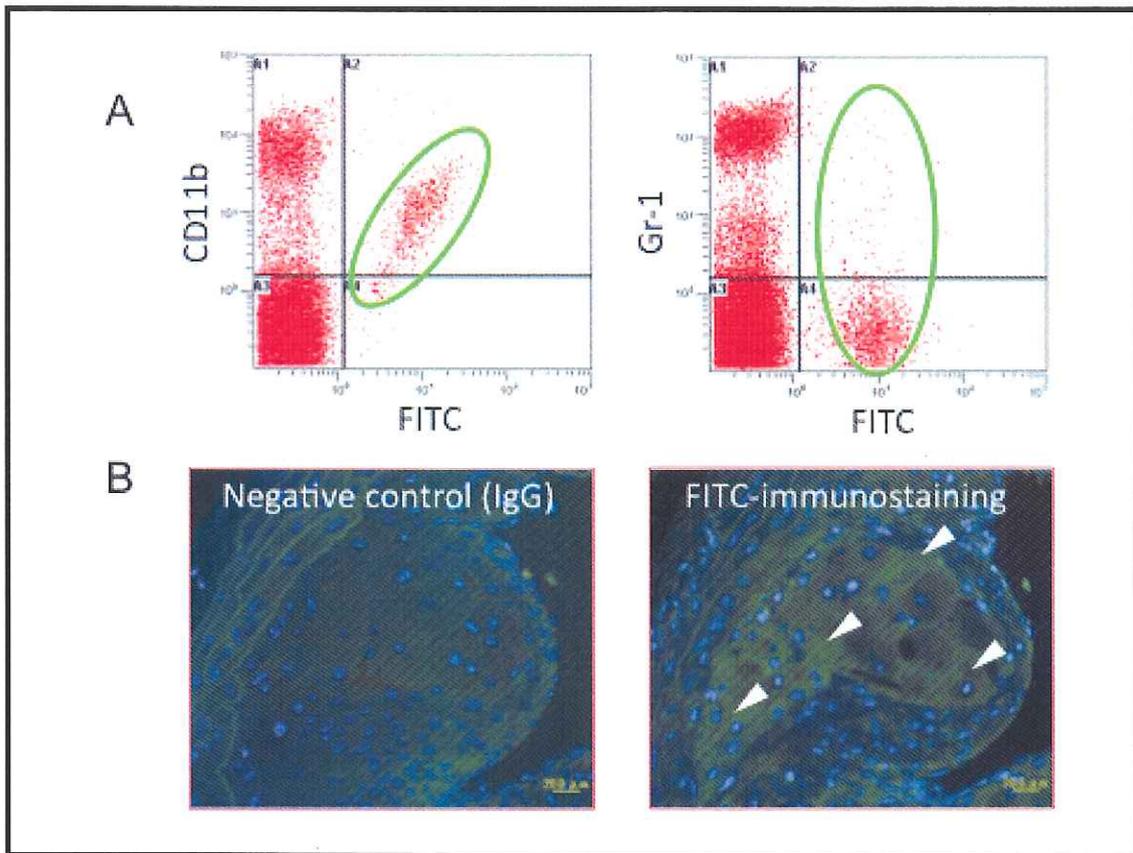
結果

生体吸収性 PLGA ナノ粒子の物性

水中エマルション溶媒拡散法により FITC 封入 PLGA ナノ粒子および 7ND プラスミド封入ナノ粒子を作製した。平均粒子径はそれぞれ 299.8nm、380.4nm、表面ゼータ電位はそれぞれ+6.7、+9.5mV であった。

PLGA ナノ粒子の単球/マクロファージへの選択的送達

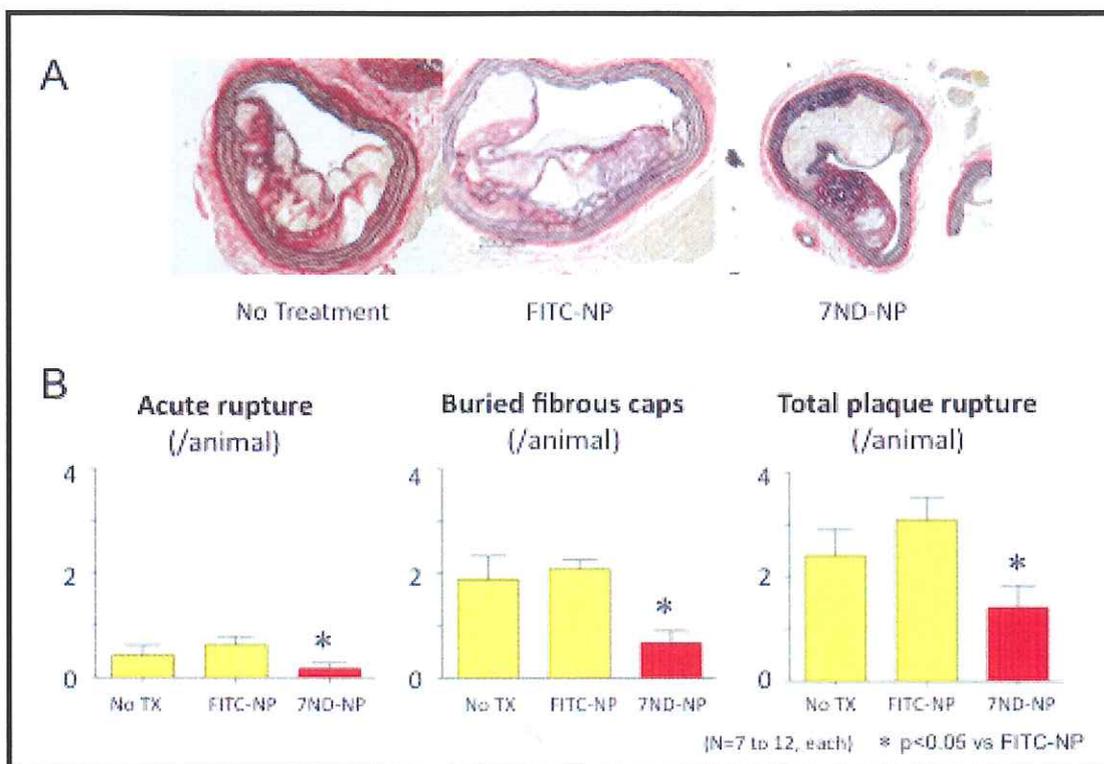
蛍光色素 FITC を封入した PLGA ナノ粒子を作成し、ApoE 欠損マウスに単回静脈注射を行ったところ、末梢血において白血球への取り込みを認めた。これらの末梢血白血球をフローサイトメリーで検討したところ、FITC 取り込みは主に CD11b 陽性、Gr-1 陰性の単球に認められた(図 1A)。さらに、高脂肪食負荷後の ApoE 欠損マウスにおいて FITC 封入ナノ粒子の分布を検討したところ、静脈注射 7 日後に腕頭動脈の動脈硬化病変内のマクロファージに FITC 免疫染色を認めた(図 1B)。従って、PLGA ナノ粒子の静脈内投与により、末梢血から動脈硬化病変へ遊走する単球に選択的に治療因子の送達が可能であり、プラーク破綻の治療に応用可能である事が示唆された。図 1. FITC 封入 PLGA ナノ粒子の単球/マクロファージへの送達



- A. ApoE 欠損マウスに FITC 封入ナノ粒子を静注し、1 時間後に末梢血白血球のフローサイトメトリーを検討した。FITC は CD11b 陽性、Gr-1 陰性の白血球に分布した。
- B. 高脂肪食を負荷した ApoE 欠損マウスに FITC 封入ナノ粒子を静注し、7 日後に腕頭動脈組織を検討し、プラーク内に FITC 免疫染色を認めた(矢頭)。

単球選択的ナノ粒子によるプラーク破綻治療

未治療のモデルマウスでは、腕頭動脈にプラーク破綻(急性プラーク破綻および埋没した線維性被膜)を認め、FITC 封入ナノ粒子では治療効果を認めなかったが、7ND プラスミド封入ナノ粒子はプラーク破綻数を有意に抑制した(図2)。プラーク破綻が抑制された病変では Mac-3 陽性マクロファージ数の減少およびプラーク線維性被膜の増厚を認め、7ND による単球/マクロファージ遊走の抑制がプラーク破綻予防の機序の一つである事が示唆された。図2. 7ND 封入ナノ粒子によるプラーク破綻予防



A. ApoE 欠損マウスに高脂肪食(8週間)およびアンジオテンシン II 持続注入(4週間)を負荷したモデルマウスにおいて、無治療では腕頭動脈にプラーク破綻を認めた。FITC 封入ナノ粒子(FITC-NP)では効果がなかったが、7ND プラスミド封入ナノ粒子(7ND-NP、週1回静脈内投与)プラーク破綻を抑制した。

B. 7ND-NP は急性動脈硬化プラーク破綻、埋没した線維性被膜を含めた動脈硬化プラーク破綻を有意に抑制した。

考察

ナノ粒子を用いたプラーク破綻治療は、今回検討した 7ND プラスミド遺伝子導入以外の治療因子に関しても応用が可能である。PLGA ナノ粒子には核酸以外にも各種薬剤の封入が可能であり、全身投与では有効性が明らかでない薬剤でも標的細胞への選択的投与により有効性を発揮する可能性がある。現在の医療では、不安定プラークが実際に急性冠症候群として症候性となった時点で治療介入が始まる場合が多い。現在、SPECT/CT など最先端の医療機器を用いた不安定プラークの分子イメージングの実現の開発に取り組んでおり、今後、不安定プラークが潜在する「不安定患者」を診断し、同時に、ナノ粒子を応用した「ナノ DDS 治療」により、診断と治療が一体となった、より低侵襲、高率な動脈硬化プラーク破綻を未然に防ぐ医療が実現できる可能性は極めて高いだろう。

参考文献

- 1 A. Kastrati, J. Mehilli, J. Pache et al., *The New England journal of medicine* **356** (10), 1030 (2007).
- 2 W. Ni, K. Egashira, S. Kitamoto et al., *Circulation* **103** (16), 2096 (2001).
- 3 M. Ishibashi, K. Egashira, Q. Zhao et al., *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24** (11), e174 (2004).
- 4 Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi et al., *Eur J Pharm Biopharm* **45** (1), 41 (1998).

注:本研究は 2009 年 11 月、米国心臓病学会(AHA)にて口演発表した。

作成日:2010 年 2 月 6 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—

2009 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： 川野 仁 
所属機関名： 東京都神経科学総合研究所
所属部署名：発生形態研究部門 職名：副参事研究員
所在地： 府中市武蔵台 2-6
電 話： 042-325-3881 内線：4507

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

脊髄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

3. 成果の概要

昨年5月に李助教授を招へいし、また9月には中国医科大学を訪れ、共同研究を進めるとともに、中国医科大学の若手研究者を指導した。協同研究の成果は欧文原著論文として投稿し、Neural Regeneration Research に受理された。

※発表論文等

Teng X, Yoshioka N, Kimura-Kuroda Junko, Kawamura Koki, Kawano H, Li HP: Neur. Regener. Res. 2010 印刷中

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 川野 仁	職名：副参事研究員
所属機関名：東京都神経科学総合研究所	部署名：発生形態 研究部門
中国側研究者氏名： 李 洪鵬	職名： 助教授
所属機関名： 中国医科大学	部署名：解剖学教室

脊髄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

研究者氏名	川野 仁
日本所属機関	東京都神経科学総合研究所
共同研究者名	李 洪鵬
中国所属機関	中国医科大学解剖学

要 旨

脊髄損傷患者は日本に約10万人おり、毎年新たに5000人の受傷者が生じている。しかし、その治療法が確立されていないために、多くの患者が寝たきりや車いすの生活を強いられている。中国でも日本の10倍に及ぶ脊髄損傷患者がいるが、脊髄損傷に関する研究は欧米や日本に比べて遅れている。本事業では、①日本と中国の研究者による脊髄損傷に関する共同研究を推進することと、②中国の医育研究機関において技術の習得や研究者の育成を進めること、の二つに焦点を当てた。その成果は以下の通りである。

- ① 日中共同研究の推進：脊髄損傷の治療法として有望視されている嗅神経被覆細胞（OEC）の移植の再生促進の機序を中国医科大学と協同して研究し、細胞移植が損傷部に形成される再生阻害因子である線維性瘢痕の形成を抑制することで神経再生と運動機能回復を促進することを見いだした（Neural Regeneration Research, 2010, 印刷中）。
- ② 中国の研究者の育成と技術の指導：李助教授は昨年5月に3週間神経研に滞在し、細胞移植や標本作成などの技術を習得し、帰国後、中国医科大学の教員や大学院生にその技術を教えている。さらに、昨年9月には川野研究員が中国医科大学を訪れ、神経再生に関する講習を行い、脊髄損傷の治療法の研究について指導した。

以上のように、当事業は所期の目的通りの成果を上げたと言える。

Key Words 脊髄損傷, 神経再生, 線維性瘢痕, グリア瘢痕, ラット

緒 言：

スポーツ事故や転落事故などにより脊髄が損傷を受けると、損傷部より下位の運動・知覚機能に重篤な障害が生じる。現在のところ脊髄損傷の有効な治療法は確立されておらず、多くの患者が車椅子や寝たきりの生活を余儀なくされている。脊髄損傷の治療が困難な理由は、損傷を受けた神経線維がほとんど再生せず、失われた機能を回復できないからである。神経再生が起こりにくい理由として、神経細胞自身の再生能の欠如に加えて、グリア瘢痕やコンドロイチン硫酸プロテオグリカンなど、再生軸索の伸長を阻害する種々の環境因子の存在が挙げられてきた。しかし脳や脊髄の損傷部でそれら阻害因子の働きを抑制し、神経再生を実現させようという試みが繰り返し行われてきたが、多くの場合予想外に小さな効果しか得られていない。

われわれは再生阻害因子として、線維性瘢痕に注目してきた。線維性瘢痕は損傷後、線維芽細胞が損傷部に侵入し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分泌して形成する、いわば「カサブタ」のようなものである。これまでに、①マウス新生仔(Kawano et al., 2005)、②IV型コラーゲンの合成阻害(Kawano et al., 2005)、③視床下部弓状核(Homma et al., 2006)、④コンドロイチン硫酸の酵素的分解(Li et al., 2007)などの損傷脳モデルを解析したところ、いずれのモデルにおいても、線維性瘢痕が形成されない状況で、神経再生が起こっていた。この一連の研究成果は、線維性瘢痕が強力な再生阻害因子であることを示している。

動物の脊髄損傷モデルにおいては、様々な細胞を損傷部に移植することで神経再生と機能回復を促進する試みが多数報告されている。とくに嗅神経被覆細胞（OEC）は患者自身から採取し、培養した後に移植することが可能なため、すでにいくつかの国では患者を対象にした移植手術も行われている。しかし、細胞移植による神経再生促進のメカニズムはいまだに不明であり、患者への移植手術も動物で見られたほどの運動機能の改善は起こっていない。われわれは最近、脳損傷モデルマウスの損傷部へOECを移植すると、線維性瘢痕の形成が抑制され神経再生が促進することを見出している（Teng et al., 2008）。

本研究は、ラットの脊髄損傷部へOECを移植し、その神経再生促進のメカニズムを明らかにすることを目的として計画された。もし、OEC移植群で損傷部における線維性瘢痕の形成が抑制され、神経再生が促進されていけば、線維性瘢痕が主要な再生阻害因子であるという、われわれの仮説が脊髄損傷においても証明されることになる。

対象と方法：

1. 嗅球グリア細胞の調整

生後4週齢のSD系雄ラットの嗅神経と嗅球の糸球体層をイソフルラン吸入麻酔下で取り出し、小片にして10%胎仔牛血清を含むEagle/F12培養液中で4-6日間培養した。組織片から細胞が十分に遊走したら、遊走した細胞だけを集め、さらに約2週間培養した。細胞を蛍光色素であるHoechst33342で標識した後、トリプシン処理によりディッシュから剥がし、培養液で約 $5-8 \times 10^7$ /mlの濃度に調整した。それぞれの細胞マーカーで確かめたところ、培養細胞に含まれるOECと線維芽細胞の割合はそれぞれ、40%と60%であった。

2. 嗅球グリア細胞の移植

生後8週齢のSD系雄ラットをペントバルビタールNa（50mg/kg体重）で麻酔し、背部の皮膚と筋を切開した後、下部胸椎の椎弓と棘突起を切除し、幅2mmのナイフで脊髄を完全に切断した。マイクロシリンジを用いて $2 \mu\text{l}$ （約 1×10^5 個）のOECと線維芽細胞の懸濁液を脊髄損傷部に注入した。術後、術部を縫合し、抗生物質を注射した。Shamコントロールは脊髄を露出するだけで、ナイフは挿入しなかった。

3. 標本作製と免疫組織化学

術後1週あるいは2週に、ラットはイソフルラン麻酔下で、心臓より4%パラフォルムアルデヒド液を用いて灌流を行い、脊髄を固定した。脊髄を取り出し、さらに一晩固定した後に、ドライアイス中で凍結し、 $40 \mu\text{m}$ 厚の連続矢状断切片を作成した。

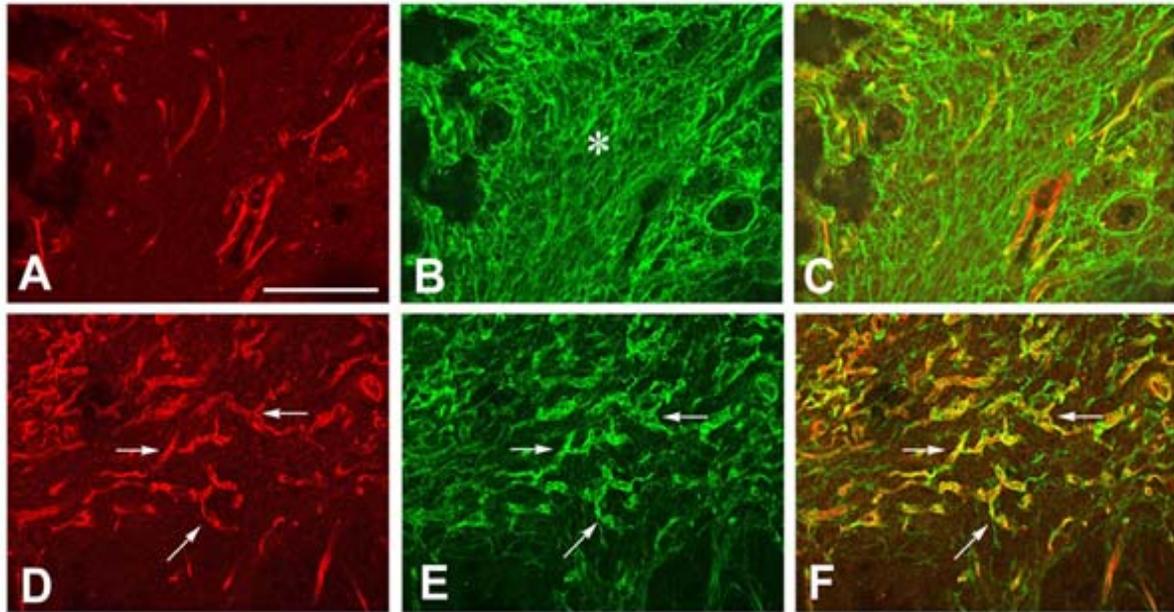
免疫組織化学的染色には、GFAP、IV型コラーゲン、RECA-1、セロトニン、CGRPに対する各抗体を用いた。単染色はABC法を行い、DABで褐色に発色した。また2重免疫染色は異なる蛍光色素で標識した抗体を用いた。セロトニン線維については、KS400（Ziess社、ドイツ）を用いて画像解析を行い、再生線維の数を計測した。

結果：

使用したラットは、損傷のみが9匹（1週間5匹、2週間4匹）、OEC移植が11匹（1週間5匹、2週間6匹）、sham手術群（脊髄を切断しないコントロール）が3匹であった。下位胸髄を微小ナイフにより切断すると、下肢の運動は麻痺し、2週間後までほとんど回復しなかった。組織学的に観察すると、損傷部にはIV型コラーゲン陽性の線維性瘢痕が形成されており、その周囲にはGFAP強陽性を示す反応性アストロサイトが集積してグリア瘢痕を形成していた。上行性（知覚性）のカリトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）を含む線維と、下行性（運動性）のセロトニン線維はいずれも損傷部を越えて再生することはなかった。

一方、OECを移植したラットは術直後では下肢の麻痺が見られたが、徐々に回復する傾向を示した。OEC移植群の損傷部を組織学的に解析すると、グリア瘢痕も線維性瘢痕も損傷のみの場合と変わりなく存在しているように見えた。それにもかかわらず、多数のセロトニン線維とCGRP線維が移植組織内を伸長し、損傷部を越

えて再生する線維も有意に増加していた。線維性癒痕の有無についてさらに詳しく調べてみた。IV型コラーゲンは線維性癒痕の他に血管にも発現しているため、血管に特異的な RECA-1 と蛍光二重免疫染色を行い両者の局在を比較した。損傷のみの群では、血管以外にも線維状の IV型コラーゲンの沈着が豊富に見られ、線維性癒痕が明らかに認められた (図 1A-C)。それに対し、OEC 移植群では、損傷のみに比べ血管が明らかに増加していたが、血管以外の IV型コラーゲンの沈着は少なく、線維性癒痕の形成が抑制されていることが分か



った (図 1D-F)。

図 1. 損傷のみ (上段) と OEC 移植 (下段) の損傷部における RECA-1 陽性の血管 (A, D、赤色) と Col IV (B, E、緑色) の局在。損傷のみでは血管以外に Col IV の沈着 (C、緑色) が豊富に存在し、線維性癒痕が形成されているが、OEC 移植では線維性癒痕の形成はほとんどない (F)

考 察

現在、OEC の損傷部への移植は、脊髄損傷の治療法としてもっとも有望視されているが、その再生促進のメカニズムは明らかでなかった。脊髄損傷部には種々の再生阻害因子が存在する。それらの中で、OEC 移植により、線維性癒痕の形成が抑制されていることを見出した (図 1)。私たちは最近、OEC をラット中脳ドーパミン線維の切断部に移植し、OEC 移植 2 週後で有意に神経再生が促進されることを見出している (Teng et al., 2008)。

本研究では、ラット脊髄損傷部への OEC の移植により、下行性のセロトニン線維と上行性の CGRP 線維が損傷部を越えて再生し、同時に運動機能回復も促進した。このような効果は、再生を阻害する線維性癒痕の形成が OEC 移植により抑制されたことによると結論された (図 2)。本研究の成果は、現在、欧文原著論文として印刷中である (Teng et al., 2010)

損傷後の脊髄には様々な軸索伸長阻害因子が存在し、これが神経再生が起こりにくい理由であると考えられてきた。これまで多くの研究者は反応性アストロサイトが形成するグリア癒痕が主要な阻害因子であると考えられてきたが、OEC 移植により、グリア癒痕の形成が抑制されるという結果は得られていない。今回の結果でもグリア癒痕に変化は見られなかった。

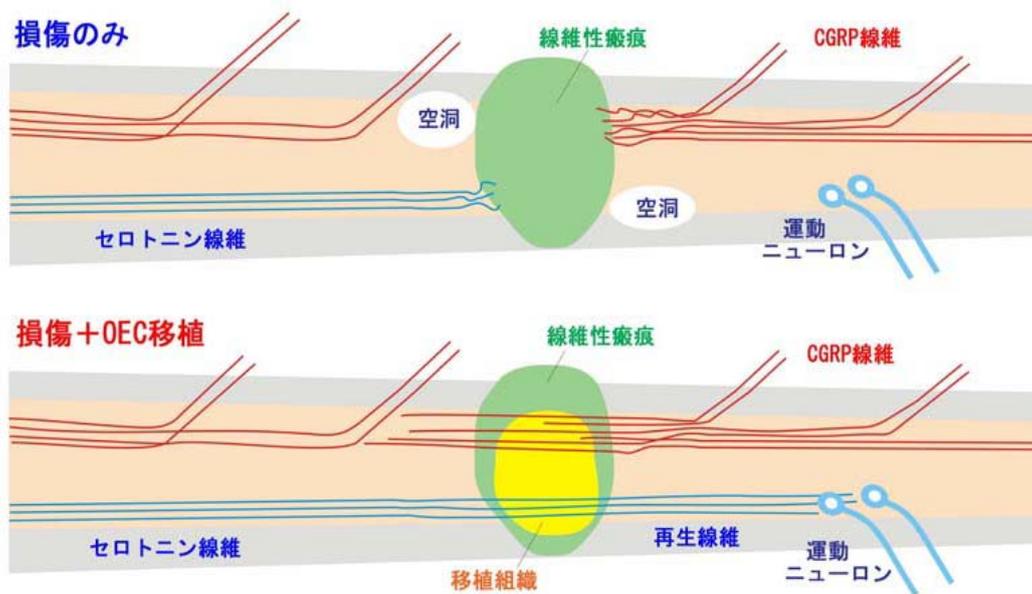


図2. 本研究のまとめ。損傷のみの場合（上）は脊髄の損傷部には線維性瘢痕が形成され、切断された下行性のセロトニン線維と上行性の CGRP 線維は再生しない。OEC 移植群（下）では移植により線維性瘢痕の形成が抑制され、再生線維が損傷部を越えて伸長する。

以上の研究のうち、損傷と OEC 移植の手術は共同研究員である李洪鵬（中国医科大学・解剖学教室・助教授）と昨年 7 月まで神経研の流動研究員であった膝錫川（現遼東医学院大学・病理学教室・助教授）が、OEC の培養は東京都神経研の黒田純子技術員がそれぞれ担当し、川野が研究の統括を行った。

今後、脊髄損傷の治療法の確立を目指してさらに研究を進めていく予定である。具体的には、OEC 移植に加え、線維性瘢痕の形成を阻害する処置（IV 型コラーゲンの合成阻害やコンドロイチン硫酸の分解）の併用や、軸索伸長を促進する神経栄養因子の投与なども考えている。

参考文献（下線は代表研究者と共同研究者）：

Kawano H, Li HP, Sango K, Kawamura K, Raisman G: Inhibition of collagen synthesis overrides the age-related failure of regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. J. Neurosci. Res., 80 (2): 191-202, 2005.

Homma A, Li HP, Hayashi K, Kawano Y, Kawano H: Differential response of arcuate proopiomelanocortin- and neuropeptide Y-containing neurons to the lesion produced by gold thioglucose administration. J Comp Neurol., 499: 120-131, 2006.

Li HP, Homma A, Sango K, Kawamura H, Raisman G, Kawano H: Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons by degradation of chondroitin sulfate is accompanied by elimination of the fibrotic scar and glia limitans in the lesion site. J. Neurosci. Res., 85: 536-547, 2007.

Teng X, Nagata I, Li HP, Kimura-Kuroda J, Sango K, Kawamura K, Raisman G, Kawano H: Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons after transplantation of olfactory ensheathing cells and fibroblasts prevents fibrotic scar formation in the lesion site. J. Neurosci. Res. 86(14):3140-3150, 2008.

注：本研究は以下に掲載された。Teng X, Yoshioka N, Kimura-Kuroda Junko, Kawamura Koki, Kawano H, Li HP: Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in a rat model of spinal cord injury. Neur. Regener. Res. 2010 印刷中。 作成日：2010年3月12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： 福永 浩司
所属機関名： 東北大学大学院薬学研究科
所属部署名： 薬理学分野 職名： 教授
所在地： 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3
電 話： 022-795-6836 内線： 6836



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

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

3. 成果の概要

本研究では生薬を含む天然化合物の中から、神経細胞において神経生存シグナルであるプロテインキナーゼ B の活性化反応を指標にして、新規バナジウム有機錯体化合物を創製した。さらに、日本と中国における神経変性疾患の創薬研究拠点を作るために共同して、シーズ化合物の創薬研究を行なった。

※発表論文等

Transcriptional Upregulation of Calcineurin A β by Endothelin-1 is Partially Mediated by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II δ 3 in Rat Cardiomyocytes. Ying-Mei Lu, Norifumi Shioda, Yui Yamamoto, Feng Han, Kohji Fukunaga BBA - Gene Regulatory Mechanisms 2010 in press.

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 福永 浩司	職名： 教授
所属機関名： 東北大学大学院薬学研究科	部署名： 薬理学分野
中国側研究者氏名： 韓 峰 (Feng Han)	職名： 准教授
所属機関名： 浙江大学薬学部・薬理毒性研究所	部署名： 薬理学分野

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

日本側研究者氏名	福永 浩司
所属機関	東北大学大学院薬学研究科
中国側研究者氏名	韓 峰
所属機関	浙江大学薬学部

要 旨

本研究の目的は日本と中国における神経変性疾患治療薬のトランスレーショナル・リサーチの基盤を形成することである。東北大学(日本)、蘇州大学(中国)、浙江大学(中国)チームで神経変性疾患治療薬の開発研究を行った。Fas-ligand (FasL) は TNF ファミリーに属するアポトーシス誘導因子のひとつであり、分子量約 40kDa の II 型膜貫通蛋白質である受容体である Fas と結合することによって Fas を発現する細胞でアポトーシスを誘導する。主に細胞膜に発現する膜型 FasL (mFasL)の細胞外領域にあたる C 末端側 26kDa が metalloprotease のひとつである ADAM10 に限定分解され、soluble Fas-ligand (sFasL) が産生される。しかしながら、脳虚血において sFasL がいつ、どの細胞で産生され神経細胞死を誘導するのか明らかではない。本研究では 2 種類の脳虚血モデルを用いて ADAM10 の活性化機構と脳虚血後の FasL の発現細胞を初めて明らかにした。さらに、FasL の誘導を抑制する神経変性疾患治療薬のシーズを見出した。

Key Words 神経変性疾患, Fas-ligand, ADAM10, アポトーシス, Akt

緒 言 :

私達はアルツハイマー病のモデルマウスである嗅球摘出マウスを用いて bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium (IV) [VO(OPT)] が protein tyrosine phosphatase1B を抑制して、PI3 キナーゼを活性化する結果、細胞の生存シグナルである protein kinase B (Akt) を活性化することを報告した(図1) (1)。新しいシーズである VO(OPT) は嗅球摘出マウスにおいて傷害された海馬歯状回における神経新生を回復させ、同時に認知機能障害を改善した (2)。脳虚血において Akt 活性が低下して、その結果 FasL が誘導されること、FasL の誘導は神経細胞に置いて Caspase 8、Caspase 3 を活性化してアポトーシスを誘導することを明らかにした (3, 4)。しかし、脳虚血障害時に FasL が脳のどの細胞で産生され、脳損傷を起こすのか不明であった。本研究では 2 種類の脳虚血モデルを用いて FasL の活性化機構を明らかにした。さらに、FasL の活性化を抑制する神経変性疾患治療薬のシーズを見出した。

実験方法 :

マウス中大脳動脈一過性閉塞虚血モデルは既報の方法により作製した (3)。12 週齢の C57BL6J マウスを実験に用いた。シリコンコーティングしたナイロン栓糸を内頸動脈から挿入して、中大脳動脈を 90 分間閉塞した後再開通した。再開通直後(0)、2、6、24 時間後に脳組織を摘出して免疫ブロット解析を、灌流固定して免疫組

織化学的解析を行った。多発性脳塞栓モデルであるマイクロスフェア脳塞栓モデルは 10-12 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いて既報の方法で作製した (5)。マイクロスフェア注入直後(0)、0.5、2、3、7 日目に大脳皮質を摘出して FasL の発現を免疫プロット法で解析し、灌流固定して免疫組織化学でも解析した。ミノサイクリンは 45 mg/kg/day でマイクロスフェア注入の翌日から 6 日間、腹腔内投与した。

実験結果：

福永らはマウス中大脳一過性閉塞虚血モデルを用いて、90 分間虚血の再開通直後 (0)、2、6、24 時間後に虚血部位である大脳皮質を摘出して、組織抽出液を調製して、免疫プロット解析を行い、ADAM10 の活性化の時間経過を調べた。ADAM10 の活性化体は再開通直後から有意に上昇し、少なくとも 24 時間、その活性体の発現は上昇した。免疫組織化学手法を用いて ADAM10 の発現細胞を調べると、特に、虚血の梗塞周辺領域(ペナンプラ)において強い発現が見られ、その免疫反応性を示す陽性細胞のほとんど MAP2 陽性細胞であった。このことはペナンプラ領域の神経細胞において活性型 ADAM10 が脳虚血直後から持続的に発現することが示唆された。次に、同じ脳組織抽出液を用いて、mFasL と sFasL の発現を免疫プロット法にて解析した。活性型 ADAM10 の発現上昇の時間経過に一致して、sFasL の量は 2 時間をピークとして急激に上昇し、24 時間まで有意な上昇が持続した。逆に、mFasL の発現量は 0 及び 2 時間で一過性に低下した。面白いことに虚血再開通後 24 時間後には mFasL も発現量が有意に上昇した。私達は以前に、FasL 遺伝子発現が虚血後 1-2 日目に上昇することを見いだしており、この結果と一致している。

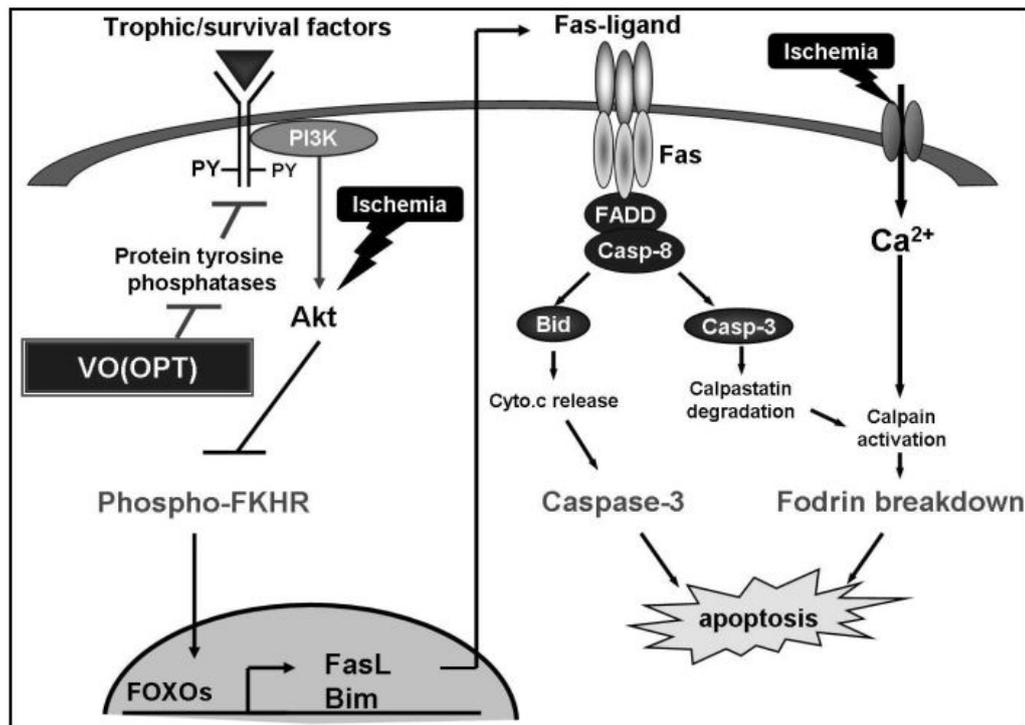


図 1. 脳虚血における Fas-ligand の発現とアポトーシスの誘導機構

次に、免疫組織化学的解析により、sFasL の発現部位について検討した。偽手術群のマウス大脳皮質においては sFasL の免疫染色はほとんど見られない。それに対して、虚血再開通マウス大脳皮質のペナンプラ領域では著しい免疫陽性細胞の上昇が見られた。神経細胞のマーカーである NeuN とミクログリア細胞のマーカーである

ED1 で二重染色を行うと、ほとんどの sFasL 陽性細胞は NeuN で染色され、僅かな sFasL 陽性細胞が ED1 陽性であった。このことは虚血直後から発現する活性型 sFasL は主にペナンプラ領域の神経細胞に発現することを示している。虚血直後の sFasL の発現上昇は私達のオリジナルな発見である (Fukunaga et al, 論文準備中)。

共同研究者である韓博士は、彼らが開発した多発性脳塞栓モデルであるマイクロスフェア脳塞栓ラットを用いて、虚血後亜急性期での FasL の誘導を調べた (5)。マイクロスフェア注入後 2-7 日目にかけて、持続的な FasL の上昇が認められた。免疫組織化学的解析により、FasL の発現細胞を同定した。マイクロスフェア注入後 24 時間以降に発現が上昇するほとんどの細胞は ED1 陽性細胞であり、ミクログリアにおいて FasL が上昇することが示された。一方、少数の神経細胞とアストログリア細胞においても FasL の発現は上昇していた。次に、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンをマイクロスフェア注入後 1 日目から 6 日間投与して、FasL の発現を検討した。マイクロスフェア注入後 7 日目に見られる FasL の顕著な誘導はミノサイクリン投与により完全に抑制された。同時に、神経細胞死も有意に抑制された (Han et al, 論文投稿中)。このことは活性化ミクログリアにおける FasL の誘導は神経細胞のアポトーシスの引き金になることを示している。

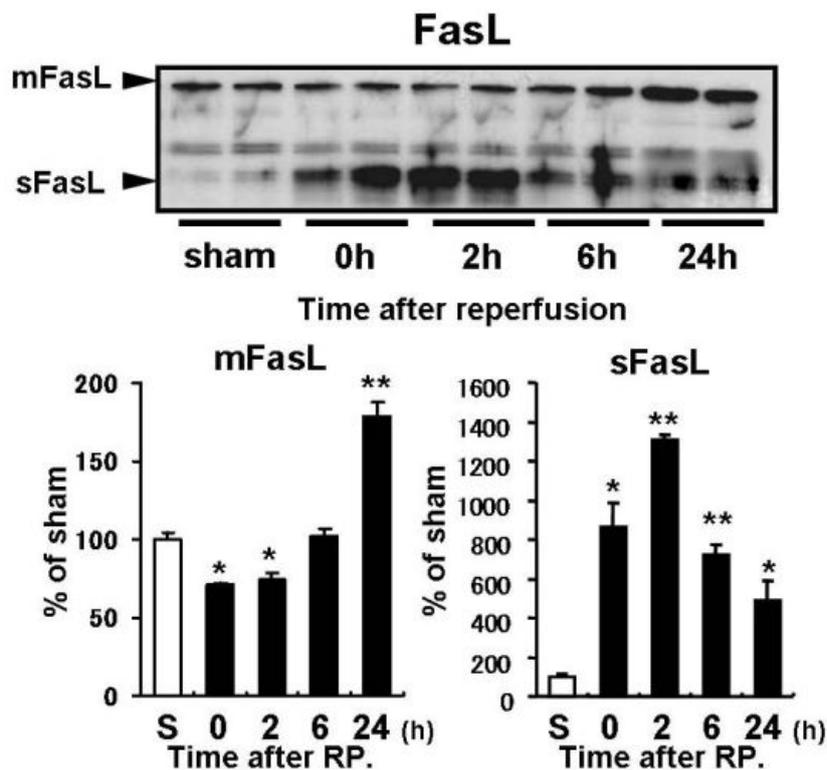


図 2. マウス中大脳動脈閉塞虚血後の大脳皮質における FasL の誘導の時間経過

考察：

本研究で私達 (東北大学) と韓博士 (浙江大学) は異なる中大脳閉塞マウスとマイクロスフェア脳塞栓ラット脳虚血モデルで検討した。急速に脳損傷が進展する中大脳動脈閉塞では再開通直後から FasL は ADAM10 により、mFasL から sFasL が神経細胞において産生され、活性型 sFasL が神経細胞死を誘導すること、また、24 時間後では mFasL が誘導されることが明らかとなった。一方、マイクロスフェア脳塞栓では 12 時間後から 7 日にか

けて mFasL の誘導が起こり、アポトーシスを誘導された。マイクロスフェア脳塞栓における mFasL の誘導細胞はミクログリアであり、ミクログリア抑制薬であるミノサイクリンがほぼ完全に mFasL 誘導を抑制することが解った。一方、Qin 博士らは、脳虚血においてアポトーシスとは異なるオートファジーによる細胞障害が細胞死を誘導することを見いだした (6)。今後はオートファジーによる細胞死に対する V0(OPT) とミノサイクリンの抑制効果について共同で解析する。

結語：

本研究では脳梗塞に伴う FasL の誘導を抑制する 2 つのシーズを開発した。V0(OPT) は Akt の活性化反応を介して FasL や Bim などのアポトーシス誘導因子の発現を抑制した(図 1)。テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンはミクログリアの活性化反応を抑制することで、FasL の発現を抑制する。これらの研究成果は私達のグループのオリジナルな発見であり、今後の脳梗塞急性期と亜急性期治療において新しい創薬開発に繋がる。今後はこれらのシーズ化合物の毒性と臨床応用について日本と中国で共同研究を進めて臨床開発の基盤を作る。

参考文献

1. F. Han, N. Shioda, S. Moriguchi, ZH. Qin and K. Fukunaga: The vanadium (IV) compound rescues septo-hippocampal cholinergic neurons from neurodegeneration in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience* 151: 671-679 (2008)
2. N. Shioda, F. Han, M. Morioka and K. Fukunaga: Bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 155: 876-887 (2008)
3. N. Shioda, F. Han, S. Moriguchi, K. Fukunaga: Constitutively active calcineurin mediates delayed neuronal death through Fas-ligand expression via activation of NFAT and FKHR transcriptional activities in mouse brain ischemia. *J. Neurochem.* 102: 1506-1517 (2007)
4. N. Shioda, T. Ishigami, F. Han, S. Moriguchi, M. Shibuya, Y. Iwabuchi and K. Fukunaga: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway by a vanadyl compound mediates its neuroprotective effect in mouse brain ischemia. *Neuroscience* 148: 221-229 (2007)
5. F. Han, A. Ali Raie, N. Shioda, ZH. Qin and K. Fukunaga: Accumulation of beta-amyloid in the brain microvessels accompanies increased hyperphosphorylated tau proteins following microsphere embolism in aged rats. *Neuroscience* 153: 414-427 (2008)
6. HL. Zhang, ZL. Gu, SI. Savitz, F. Han, K. Fukunaga and ZH. Qin: Neuroprotective effects of prostaglandin A(1) in rat models of permanent focal cerebral ischemia are associated with nuclear factor-kappaB inhibition and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma up-regulation. *J. Neurosci. Res.* 86: 1132-1141 (2008)

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 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 許 煥麗
所属機関名： 東京大学大学院医学系研究科
所属部署名： 肝胆膵外科 職名： 客員研究員
所在地： 〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1
東京大学医学部附属病院
電 話： 03-5800-8654 内線： 33321



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

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

3. 成果の概要

本研究はウイルス性肝炎の発症及び関連疾患への進行を抑制する化学療法剤を開発することを目的とし、新規に合成された化合物も含めて、基礎生命科学的手法を用いた in vitro 研究及び in vivo 研究を行うことにより、有効性の高い化合物をライブラリから抽出し、有効性が評価された化合物による疾患制御のメカニズムを基礎医学的な視点から解析することを展開した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 許 煥麗	職名： 客員研究員
所属機関名： 東京大学大学院医学系研究科	部署名： 肝胆膵外科
中国側研究者氏名： 杜 冠華	職名： 副所長・教授
所属機関名： 中国医学科学院・協和医科大学	部署名： 薬物研究所

肝癌・ウイルス性肝炎に対する新規治療薬の開発と評価

Evaluation of new chemotherapeutic agents for hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus infection

研究代表者名：許 煥麗

日本研究機関名：東京大学医学部附属病院・肝胆膵外科学

中国側共同研究代表者名：杜 冠華

中国所属機関名：中国医学科学院・協和医科大学・薬物研究所

中国側共同研究者名：趙 新（解放軍第302医院・医），崔 曉燕（川大・医），徐 文方（山大・薬）

日本側共同研究者名：稲垣 善則（東大・医），唐 偉（東大・医）

Abstract

To find effective chemotherapeutic agents for hepatocellular carcinoma (HCC) with hepatitis B virus (HBV) infection, we evaluated the effects of newly-synthesized compounds 24F and LY52 on the metastasis of a HBV infected HCC cell line and the anti-HBV activities of cinobufacini and its active components bufalin and cinobufagin in this cell line. The effects of these drugs on the cell proliferations were detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide assays. The effect of 24F on aminopeptidase (APN) activity was measured by a spectrophotometric method using L-leucine-*p*-nitroanilide as a substrate of APN. The effects of LY52 on the MMPs expressions were measured by gelatin zymography. The effects of 24F and LY52 on cell invasion were performed by 24-well invasion chambers. Effects of Cinobufacini, Bufalin, and cinobufagin on HBV antigens and DNA were quantified with a HBV DNA quantitative kit. The APN activity was inhibited in the presence of 24F in dose-dependent manner. The effects of LY52 on MMP-9 expressions in HepG2.2.15 cells were not obvious. The inhibition rates of LY52 on pro-MMP-2 levels of HepG2.2.15 cells were in a dose-dependent manner. 24F could inhibit the invasion of HepG2.2.15 cells, which displayed 56% of inhibition rate in the concentration of 100 μ g/mL. LY52 could also effectively inhibit the invasion of HepG2.2.15 cells, although a dose dependent manner was not found. The effect of cinobufacini on secretion of HBsAg, HBeAg, and HBcrAg was promoted in a time-dependent manner. It was more effective than its components bufalin and cinobufagin in inhibiting the secretion of HBV antigens. These result showed that 24F and LY52 might be effective anti-metastasis regents for HCCs, even when the HCC cells were infected by HBV. Cinobufacini may serve as an anti-viral therapeutic agent for the management of HBV infection, which warrants further investigation.

Key words: Hepatitis B virus, hepatocellular carcinoma, Aminopeptidase N inhibitor, matrix metalloproteinases inhibitor, Cinobufacini

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) is recognized as the leading cause of chronic hepatitis and the cause of 60-80% of hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide. A number of researches have shown that chronic infection by hepatitis virus, especially HBV, leads to the progression of chronic hepatitis to liver cirrhosis and contribute to HCC. It was also showed that HBV infection increased the invasion potential of HCC, though the role of HBV in the invasion and metastasis of HCC was not elucidated clearly. Thus, the discovery and development of novel antiviral drugs for HCC is urgently needed. Aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor 24F and matrix metalloproteinases (MMPs) inhibitor LY52 were newly-synthesized compounds by our research group. Our previous studies showed that 24F could inhibit the activity of the targeted enzyme APN and suppress the invasive capacity of HCC cells, and LY52 could inhibit the

invasion and metastasis of HCCs via blocking the proteolytic activities of MMPs. In this study, we evaluated the effects of 24F and LY52 on the invasion ability of a HBV infected HCC cell line, HepG2.2.15.

Cinobufacini (Huachansu), a Chinese medicine prepared from this toad skin, has been extensively used in clinics to treat a number of diseases, such as malignant tumors, chronic hepatitis B. In this study, we also evaluated the anti-hepatitis B virus activities of cinobufacini and its active components bufalin and cinobufagin in HepG2.2.15 cells.

Materials and Methods

Reagents. The hydroxamic acid derivatives 24F was synthesized as one of series of cyclic-imide peptidomimetics with free amino group by using 3D-QSAR model¹. Caffeoyl pyrrolidine derivative LY52, was designed and synthesized as described previously². LY52 was dissolved in dimethylsulfoxide and 24F was dissolved in phosphate-buffered saline for *in vitro* studies. Cinobufacini was obtained from Anhui Jinchuan Biochemical Co., Ltd., China. Bufalin and cinobufagin were purchased from Sigma.

Cell culture and treatment. The human HBV-transfected cell line HepG2.2.15 was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 200 µg/mL G418 at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. The effects of these drugs on the cell proliferations were detected by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. The effect of 24F on APN activity was measured by a spectrophotometric method using L-leucine-*p*-nitroanilide as a substrate of APN. The effects of LY52 on the MMP-2 and -9 expressions were measured by gelatin zymography. The effects of 24F and LY52 on cell invasion was performed by 24-well BD BioCoat Matrigel invasion chambers. Effects of Cinobufacini, Bufalin, and cinobufagin on HBV antigens and DNA were quantified with a HBV DNA quantitative kit.

Results

Effects on proliferations of HepG2.2.15 cells

The HepG2.2.15 cell growth could be inhibited by 24F, but there was no significant difference in the inhibition rate among 1-200 µg/mL of 24F. No acute cytotoxic effect was observed by trypan blue staining. The inhibitory effects of LY52 on HepG2.2.15 cells proliferations increased as the concentrations and incubation periods increased. No obvious inhibitory effects of LY52 were found in lower concentrations (<200 µg/mL) and in shorter incubation period (24 h), which was also verified by trypan blue staining. Cinobufacini at the concentrations below 20 µg/mL, bufalin at the concentrations below 10⁻² µM, and cinobufagin at the concentrations below 10⁻¹ µM were non-toxic to HepG2.2.15 cells. Cinobufacini, bufalin, and cinobufagin could significantly inhibit the growth of HepG2.2.15 cells at the concentrations above 20 µg/mL, 10⁻² µM, and 10⁻¹ µM, respectively.

Effects of 24F on aminopeptidase activity

The aminopeptidase activity was inhibited in the presence of 24F in dose-dependent manner and the inhibition rate of ΔA/min under 0.27 mM (100 µg/mL) of 24F was around 25% compared with the negative control. In this analysis, IC₅₀ of 24F (the volume of 24F that displayed 50% inhibition of enzyme activity) was calculated 1.88 mM.

Effects of LY52 on MMPs activities

The effects of LY52 on MMP-9 expressions in HepG2.2.15 cells were not obvious. The inhibition rates of 0.1, 1, 10, 100, and 200 µg/ml of LY52 on pro-MMP-2 levels of HepG2.2.15 cells were 4.0%, 9.4%, 11.5%, 15.8%, and 34.4%, respectively, compared with the control group (100%).

Effects of 24F and LY52 on the invasion of HepG2.2.15 cells

The number of invading cells was significantly decreased in the presence of 100 µg/mL of 24F compared with that in non-treated cells. This result suggested that 24F has an ability to inhibit the invasion of HepG2.2.15 cells, which displayed 56% of inhibition rate in the sample incubated with 100 µg/mL of 24F. LY52 could also effectively inhibit

the invasion of HepG2.2.15 cells, although a dose dependent manner was not found. The inhibition rates of 0.1, 1, 10, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LY52 on invasion abilities of the HepG2.2.15 cells were 21.8%, 26.4%, 43.3%, 50.2%, and 19.7%, respectively.

Effects of cinobufacini, bufalin, and cinobufagin on the HBV antigens and DNA

The data clearly showed that the inhibitory effect of cinobufacini on secretion of three HBV antigens (HBsAg, HBeAg, and HBcrAg) was promoted in a time-dependent manner. On day 6 cinobufacini at the concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ significantly reduced the secretion of HBsAg, HBeAg, and HBcrAg, which was more potent than the positive control 3TC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in inhibiting HBV antigen secretion. On day 6, bufalin at the concentration of 10^{-4} μM significantly inhibited secretion of HBeAg and HBcrAg at the rates of 11.36 and 19.58%, respectively. In this concentration of bufalin was more potent than the positive control 3TC in inhibiting HBcrAg secretion. The data for bufalin at 10^{-4} μM on day 3 and 6 showed that the inhibitory effects of bufalin on secretion of two HBV antigens (HBeAg and HBcrAg) were time-dependent. After incubation with cinobufagin for 3 days or 6 days, secretion of HBeAg and HBcrAg in the culture medium was slightly less than that with the control. Moreover, cinobufagin at a concentration of 10^{-3} μM on day 3 exhibited the same potent activity as the positive control 3TC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in terms of the inhibition of HBeAg secretion.

Discussion

Although recent progress in the diagnosis and treatment modalities has improved the prognosis of patients with HCC, the long-term prognosis remains disappointing because of the frequent recurrence and the development of intrahepatic metastasis in 16%-65% of HCCs patients. Since APN functions to degrade extracellular matrix and thereby promote the cancer cell invasion and metastasis, inhibition of APN function would have a significant role in the development of cancer chemotherapeutic agents. This study showed that our newly-developed APN/CD13 inhibitor 24F can inhibit the activity of the targeted enzyme APN and suppress the invasive capacity of HCC cell. It was suggested that HBV infection may facilitate tumor cell invasion by upregulation of MMPs and subsequent destruction of the extracellular matrix. In this study, we assessed the effects of MMPs inhibitor LY52 on MMPs expressions in HepG2.2.15 cells, which is originated from the same clone of HCC. It was suggested that LY52 could effectively inhibit invasion of HCC cells by suppressing MMP-2 expressions. These result showed that 24F and LY 52 might be effective anti-metastasis regents for HCCs, even when the HCC cells were infected by HBV.

We also evaluated the anti-hepatitis B virus activities of cinobufacini and its active components bufalin and cinobufagin in HepG2.2.15 cells. It was demonstrated that the effects of cinobufacini on secretion of HBsAg, HBeAg, and HBcrAg was promoted in a time-dependent manner. It was more effective than its components bufalin and cinobufagin in inhibiting the secretion of HBV antigens. The present findings suggested cinobufacini may serve as an anti-viral therapeutic agent for the management of HBV infection, which warrants further investigation.

参考文献

- 1 Cui SX, Qu XJ, Gao ZH, et al. Targeting aminopeptidase N (APN/CD13) with cyclic-imide peptidomimetics derivative CIP-13F inhibits the growth of human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009.
- 2 Qu X, Yuan Y, Tian Z, et al. Using caffeoyl pyrrolidine derivative LY52, a potential inhibitor of matrix metalloproteinase-2, to suppress tumor invasion and metastasis. *Int J Mol Med*. 2006; 18 (4), 609-614

注：本研究は、2009年10月24日第82回日本生化学会大会にてポスター発表。なお、英文学術論文は投稿中であります。

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 酒 井 郁 子
所属機関名：千葉大学
所属部署名：看護学研究科 職名：教授
所 在 地：千葉市中央区亥鼻 1-8-1
電 話：043-226-2768（直通）



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

四川大地震後被災者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

3. 成果の概要

四川大地震災害拠点病院に勤務する医師、看護師、理学療法士、作業療法士お
よび被災後リハビリテーションを必要とした患者へのインタビューを実施し、リ
ハビリテーション看護ニーズに関する調査票を作成した。その後専門家会議を実
施して調査票を洗練し、リハビリテーション看護に関する現任教育ニーズを調査
した。この調査結果を用いて看護師を対象とした現任教育プログラムの素案を作
成した。

※発表論文等

なし。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 酒井郁子	職名：教授
所属機関名：千葉大学	部署名：看護学研究科
中国側研究者氏名： 胡秀英	職名：副教授/副科長
所属機関名：四川大学	部署名：華西看護学部/華西病院

四川大地震被災住民のリハ看護に関するニーズに応じた 看護師現任教育プログラムの開発

研究者氏名 酒井郁子
日本所属機関 千葉大学大学院看護学研究科
共同研究代表者 胡秀英
中国所属機関 四川大学華西看護学部/華西病院

<要旨>

四川大地震被災者のリハ(以下リハ)看護ニーズおよび看護師のリハ看護に関する学習ニーズを明らかにし、これをもとに看護師教育プログラムを立案、実施し、患者、看護師、病院管理からの多面的な効果を検討することを目的として研究を実施した。四川大地震災害拠点病院に勤務する医師、看護師、理学療法士、作業療法士および被災後リハを必要とした患者へのインタビューを実施し、リハ看護学習ニーズに関する調査票を作成した。その後専門家会議を実施して調査票を洗練し、看護師の災害リハ看護に関する学習ニーズ(以下学習ニーズ)を調査した。4か所の災害拠点病院の看護師220人に配布し、170人から回答を得た。結果、学習ニーズは、災害発生から1カ月までの早期のリハ看護について必要と答えたものが80%以上の項目は、合併症管理とくに慢性病のコントロールと睡眠障害の予防、PTSDへの対応、疼痛管理であった。1カ月から6ヶ月後の中期の学習ニーズでは、80%以上の対象者が必要と答えた項目は、日常生活能力の再獲得支援、移動能力の向上支援、家族への介護指導方法であった。災害6か月以降の後期リハにおける学習ニーズでは社会資源の利用であった。また災害リハを提供するための看護管理では、患者の状態に応じた療養場所の選択と搬送に関するマネジメント、リハ資源の公平分配と継続看護のためのマネジメントについての学習ニーズが高かった。以上を看護師現任教育プログラムの学習項目に組み入れた学習プログラムを検討し作成した。

<Key Words> 四川大地震、被災者、リハビリテーション看護、看護師、学習ニーズ、現任教育

I はじめに

日本では、阪神大震災をきっかけとして、その後、新潟中越沖地震、能登半島地震、JR 福知山線事故など大規模災害を経験したことによって災害看護学が構築されつつあり、現場救護、救命救急に関する知見は蓄積しつつあるが、災害により障害を負った人々への長期的リハ看護に関してはほとんど報告がない。

2008年5月12日に発生した四川大地震に関しても同様に、発生直後からの医療支援活動、心のケアに関する報告はあるが、被災者のリハに関する報告はほとんどないのが現状である。しかし現地では巨大地震のあとの復興はいまだ進んでいない。現在、中国は高齢化を突き進んでおり、今回の被災者のなかにも災害弱者である高齢者が多く含まれている。リハは本来、予防の概念を含む実践活動である。つまり地震により障害を負った人に加え、障害をもともと有している人に対する災害時の情報提供、救助、健康問題への対応、長期的回復支援を一貫して実施することが災害リハ看護の重要課題と考える。一方、四川大地震被災者のリハ看護ニーズの実態調査、医療者の困難感やリハにかかわる医療ケア提供システムの評価は不十分である。

このような背景から、四川大地震被災住民に対して中国四川省の災害拠点病院などの看護師が、リハ看護の基本的な知識と技術を得て、被災住民の長期的な回復とQOLの向上に資する看護援助を実施できるように、教育プログラムを考案することは、中国だけでなく日本においても有用だと考えた。

【研究目的】

四川大地震被災者のリハ看護ニーズおよび看護師のリハ看護に関する学習ニーズを明らかにする。これをもとに看護師教育プログラムを立案、実施し、多面的に実現可能性と効果を検討する。

II 研究方法

1. 研究枠組み

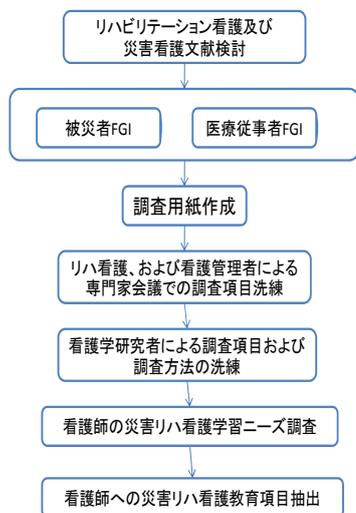


図1 研究枠組み

研究枠組みを図1に示した。本研究では、段階的に、看護師の災害リハ看護の学習ニーズを明らかにする。第1段階では、被災者と災害医療従事者へのフォーカスグループインタビュー（以下 FGI）を実施し、災害リハ看護のニーズと看護師の学習ニーズを抽出した。これをもとに看護師の災害リハ看護学習ニーズ調査用紙 ver1 を作成し、これを用いてリハ看護および看護管理者による専門家会議を実施し項目の内容妥当性の検討と洗練を行い、調査用紙 ver2 とした。そして看護学研究者による調査項目および調査方法の洗練を行い、調査用紙 ver3 を作成した。調査用紙 ver3 を用いて看護師の災害リハ看護に関する学習ニーズ調査を実施し、これらの結果を統合して、四川省災害拠点病院等における看護師への災害リハ看護教育項目を抽出した。

2. 医療従事者への FGI

1) 調査期間及び調査場所、調査対象

調査期間は2009年6月であった。調査場所は、四川大学華西病院地震リハ治療センターおよび、都江堰市整形外科病院（災害拠点病院）の2か所であった。調査対象は四川大学華西病院リハ治療センター医師2名、理学療法士1名、作業療法士1名、看護管理者2名、看護師2名、都江堰市整形外科病院医師3名、看護管理者3名であった。

四川大学華西病院地震リハ治療センターは大地震後に震源地周辺から搬送されてきた被災者への本格的なリハ拠点として現在も活動している。また災害拠点病院である都江堰市整形外科病院は、もともと地域の医療拠点であったが地震のため倒壊し、地震から1年以上経過した2009年6月においても仮設プレハブ平屋建てで診療を継続していた。

2) データ収集方法およびデータ分析方法

前もって研究同意の得られたリハ関連の医療従事者に集まってもらい、2時間半から3時間のグループインタビューを実施した。インタビューの全ての経過を調査対象者の許可を得て録音し逐語録を作成し、これをデータとした。なおデータは日本語に訳し中国側研究者と日本の研究者が共有した。

インタビュー内容は、地震発生後から現在までのリハ活動の実際、医療従事者が認識している被災者のリハニーズ、リハ提供上の困難と課題、リハ看護に関する看護師の学習ニーズであった。分析は、これらのインタビュー項目ごとに発言内容を分類し、最終的に全体を統合して災害リハ看護の学習ニーズを抽出した。

3. 被災者の FGI

調査期間は2009年6月であった。都江堰市整形外科病院に通院中の被災者6名に対して FGI を実施した。インタビュー内容は、現在の健康状態、災害による身体、心理、社会面への影響、日常生活上の困難、リハへの自己の取り組み状況、将来展望であった。分析は、これらのインタビュー項目ごとに内容分析を用いて、発言内容を分類し、現在のリハ医療提供上の課題を抽出した。

4. 災害リハ看護に関する学習ニーズの実態把握のための調査票の開発と調査

1) 調査用紙開発過程

医療従事者の FGI 及び被災者の FGI をもとに、調査用紙 ver1 を作成した。作成の際の基本的考え方は、災害リハの特徴を表現できること、地震災害の被災によるリハ提供上の特徴を表現できること、長期的な回復過程を網羅できることであった。これを用いて専門家会議を実施した。専門家会議構成員は、リハ看護

護、看護教育、看護管理の領域から 10 年以上の経験を有し、リハ看護学に関する知識が豊富であり、本研究への協力の同意を得られたを一人ずつ 3 名選択した。また同様の基準で理学療法士 1 名、作業療法士 1 名を選択し、合計 5 名による専門家会議を開催した。この結果を基に調査用紙 ver2 を作成した。また次に看護学研究者 5 名による専門家会議を実施し、項目を確定し調査方法を決定した。

2) 開発した調査用紙 ver3 の構造

FGI および専門家会議の検討から、災害リハ看護に必要な項目を、①対象者の特徴、②リハ過程、③リハを効果的に提供するための看護管理、④発展的災害リハ看護の 4 つの枠組みで検討した。そして①対象者の特徴を被災者、災害弱者（高齢者、小児、もともとの障害を有していた人）、健康住民に分類した。②リハ過程を初期（災害発生から 1 カ月）、中期（1 カ月から 6 カ月）、後期（6 か月以降）と分類した。このリハ過程に沿って FGI で得られたデータをもとに項目を作成し、研究方法で示した調査用紙を作成した。

調査用紙は、①回答者の属性 8 項目、②リハ看護学習経験 6 項目、③災害リハ看護学習への動機と準備性 3 項目、④災害リハ看護現任教育のニーズに関する自己評価 46 項目、の 4 セクションから構成され、合計 63 項目であった。①、②、③は 2 択および複数回答を指示し、④は非常に必要、必要、わからない、あまり必要でない、全く不要の 5 段階リッカートを指示した。

3) 災害リハ看護に関する看護師の学習ニーズ調査

調査期間は 2009 年 12 月、調査場所は、四川華西病院老年科およびリハ病棟、都江堰市中心鎮骨傷医院、都江堰市第二病院、都江堰市公立衛生医院の 4 か所であった。合計で 220 部配布し、170 部改修した。回収率は 77.3%であった。

5. 看護師現任教育プログラム案の作成

以上の結果をもとに、看護師現任教育プログラムに含まれる必要のある学習項目を抽出しプログラム案を検討した。

Ⅲ結果

1. 大地震後のリハの実態

大地震後のリハは、初期（地震発生から 1 カ月後）、中期（1 ヶ月後から 6 ヶ月未満）、後期（6 か月以降）のⅢ期に分け実施された。四川大学華西病院では、初期、中期のリハを受け持ち、被災者がそれぞれの自宅に復帰した後の後期のリハを災害拠点病院が担当した。四川大学華西病院の職員は、早期リハの効果を認識していた。しかしこれらの被災者が自分のコミュニティに帰って以降の後期リハは、人員や社会資源、物資の不足から不十分だと認識していた。その要因の一つとして地震発生地域が非常に広範であり、ゆえに、被災者の居住地区も分散しており公共交通機関が分断し、医療施設へのアクセシビリティが低いことが挙げられた。都江堰市整形外科病院職員は、災害発生まで全くリハを行ったことがなく、職員に基本的知識や技術がなかったこと、初期は救命救急に当たり、その後は 3 カ月にわたり、被災した各村を、チームを組んで訪問し、公衆衛生教育を実施した。これによって感染症の蔓延を防ぐことはできたが、それと並行して 2008 年 8 月以降の中期からリハを行わざるを得ず、さまざまな研修に職員を派遣しながら実施してきたことを語った。またリハに必要な機材の欠乏は深刻であり、現在もそれは継続した課題であると認識していた。

2. 今後のリハ提供上の課題

FGI で語られた、リハ提供上の課題は、①職業リハの資源が不足している。②医療従事者の知識と技術の標準化がなされていないため、体系的・理論的なリハが実施できない。③住民のリハに関する知識不足があり理解が得られにくく、啓発活動が必要である。④慢性疾患管理、健康教育、リハ、子育て支援を一貫してサービス提供できるようなコミュニティ拠点が必要である。の 4 点であった。そのほかに都江堰市整形外科病院では医療者も被災者であるため、医療者のストレスマネジメントの必要性が語られた。

3. リハを必要とする被災者の特徴

FGI 参加者の発言から、通常のリハを必要とする患者と比較して、被災者の特徴として以下のことが抽出された。①医療従事者への依存、愛着が非常に強く、「自分の健康や命をまるごと医療者に任せた」ようになることが多かった。②家族、家屋、財産、職業など人生にとって重要な事柄をいっぺんに喪失した体験をもちながら、リハに取り組んでいるため、当事者は気がつかないが、大きな精神的問題を抱えていることが多い。③とくに都市部に居住する中高年の被災者は大きな喪失であるにもかかわらず、政府保証が農村部ほど大きくない

ため将来への不安を抱えていることが多い、④地震発生1年以上経過した現在、中年以降の女性に首、肩、腰、足の疼痛の問題が多く生じているが、これは地震の影響が大きい。⑤PTSD、うつ、不眠などの精神症状を有する被災者は都市部に多い

3) 災害リハ看護に関する学習ニーズ

看護師、医師、理学療法士、作業療法士は災害リハ看護の学習ニーズに関して、以下のようにあげていた。①被災者の「喪失」からの回復をどのように援助したらよいか心理的援助スキルを学びたい。②長期的持続的な援助提供をどのようにしていったらよいか、③被災者は通常のリハ患者と比較して、リハ過程の合併症が発生しやすいため、合併症管理の知識を得たい。④被災者は家族からの支援を得られないケースが多いため、家族への教育の方法を知りたい、⑤農村部では「なにかあったら医師に診てもらおう」という伝統的な治療への価値観が強く、主体的にリハに取り組むことに関して住民の理解を得にくいため、啓発活動の方法、健康教育の方法を知りたい。⑥継続的なリハ医療の提供のために看護として何ができるか知りたい、⑦系統的なリハおよびリハ看護に関する教育を受けたい。断片的な知識は得ているが応用が難しく、さまざまなリハスキルをどのように被災者に適用してよいかわからない。⑧人員配置や資源の公平分配などに関するリハ看護管理を学びたい、であった。この結果をもとにして災害リハ学習ニーズ調査項目を作成した。

4. 災害リハ看護に関する看護師の学習ニーズ調査と教育プログラム検討

看護師への学習ニーズ調査（220人に配布、170人回収）の結果、非常に必要、必要と答えた看護師が80%以上であった項目を初期、中期、後期を分けて説明する。

災害発生から1カ月までの早期のリハ看護について必要と答えたものが80%以上の項目は、合併症管理とくに慢性病のコントロールと睡眠障害の予防、PTSDへの対応、疼痛管理であった。1カ月から6ヶ月後の中期の学習ニーズでは、80%以上の対象者が必要と答えた項目は、日常生活能力の再獲得支援、移動能力の向上支援、家族への介護指導方法であった。災害6か月以降の後期リハにおける学習ニーズでは社会資源の利用であった。また災害リハを提供するための看護管理では、患者の状態に応じた療養場所の選択と搬送に関するマネジメント、リハ資源の公平分配と継続看護のためのマネジメントの項目について、必要だと回答した人が80%以上であった。

以上の結果から、学習項目として、災害リハ看護の展開に必要な理論と知識、災害リハ看護の目的と目標の設定、災害リハの対象の理解、災害リハの過程の理解、看護の方法（廃用と合併症の予防、活動の促進、参加の促進、コミュニティベーストリハビリテーション、地域医療連携とネットワーク形成を含む看護師教育プログラム案を作成した。

IV 考察

震災前からリハ看護の理念の共有がなされず、リハビリテーションネットワークの仕組みが発展していたとはいえない状態で大地震が発生し、長期的にリハを必要とする被災者が多く存在している。住民も医療者もリハ看護に関する知識不足があり、提供システムの構築が間に合っていないことからリハ資源の公平分配に大きな課題があることが示唆された。リハ看護はチームアプローチが基本であり、そのためにはリハに関する知識と技術の標準化と目標の共有が必須である。そのため、災害リハ看護の学習項目は必要最小限の項目を洗練し、知識と技術の標準化を目的に検討した。また教育プログラムの実施方法に関しては、出前講義を行うか、あるいはITを活用した学習方法を構築し、災害拠点病院の負担を軽減する方向で検討することが望ましいと考えられた。また災害拠点病院にはコミュニティベーストリハビリテーション（CBR）の知識やスキルが必要とされており、大学病院ではリハビリテーションのシステム化の知識、連携協働のスキル、ネットワーク形成のスキルが必要とされていると考えられたためこれらを教育プログラムに盛り込む必要があった。

リハビリテーションを必要とする四川大地震被災者は震災後のパニック、無力感などによって身も心もまるごと医療者にあずけ、依存せざるを得ない状況に置かれること、喪失体験が非常に強大であることから通常のリハと心理的回復のプロセスが全く違うことが示唆された。また医療従事者も被災者であることからお互いが自律性を取り戻していくプロセスと体験を理解し共有することも今後重要な研究課題である。

今後開発した教育プログラムを実際に行うためには、教材の制作および、ファシリテーターの育成が必要となる。そのためのプロジェクト研究なども必要となる。四川大地震からの復興を契機に、四川省におけるリハビリテーション看護学がさらに充実していくことが期待される。