

財団法人 日中医学協会


2011 年度共同研究等助成金報告書－中国人研究者・技術者招聘－

2012年3月7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中国人研究者・技術者招聘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：河野 茂 
所属機関名：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
所属部署名：感染免疫学講座 職名：教授
所在地：長崎市坂本1-7-1
電 話：095-819-7273 内線：

1. 助成金額：1,000,000円

2. 研究テーマ

中国吉林省の HIV 浸淫地域における真菌の薬剤耐性と疫学研究

3. 成果の概要

中国吉林省の医療施設で分離されたカンジダ属 (*Candida albicans* 17 株、*C. guilliermondii* 8 株、*C. parapsilosis* 9 株) について抗真菌薬の感受性試験を行った。微量希釈法により得られた micafungin (MCFG) の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) は、*C. albicans* で最も低く、*C. guilliermondii* は最も高かった。fluconazole に関して、*C. guilliermondii* は、*C. albicans* や *C. parapsilosis* に比較して高い MIC 値を示した。amphotericin B に対する感受性は 3 菌種とも感受性を示し差は認められなかった。播種性 *C. guilliermondii* マウスモデルにおける MCFG の治療効果を検討したところ、MCFG を 2.5mg/kg/日 (低用量群)、25mg/kg/日 (高用量群) の用量にて腹腔内投与したところ、高用量群では、腎臓、脾臓、肝臓での菌数が有意に減少し MCFG の有効性を示した。

4. 被招聘者

被招聘者氏名：贾冬梅
所属機関名：北華大学

職名：准教授
部署名：附属病院

5. 滞在日程概要 (日付・主な活動・工程など)

2011年9月9日に長崎に到着後、当教室にて実験を開始、2012年2月26日に長崎を出発し、帰国した。この間、臨床分離真菌の薬剤感受性試験、臨床分離真菌の薬剤感受性試験、動物モデルを使用し抗真菌薬の有効性評価を行った。

中国吉林省にて分離された *Candida guilliermondii* の薬剤感受性試験と播種性マウ

スモデルにおける micafungin の有用性

研究者氏名 Dongmei Jia
中国所属機関 北華大学附属病院、吉林市、吉林省、中国
日本研究期間 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座
指導責任者 教授 河野 茂
共同研究者 泉川公一、宮崎泰可

要旨

中国吉林省の医療施設で分離されたカンジダ属 (*Candida albicans* 17 株、*C. guilliermondii* 8 株、*C. parapsilosis* 9 株) について抗真菌薬の感受性試験を行った。微量希釈法により得られた micafungin (MCFG) の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) は、*C. albicans* で最も低く、*C. guilliermondii* は最も高かった。fluconazole に関して、*C. guilliermondii* は、*C. albicans* や *C. parapsilosis* に比較して高い MIC 値を示した。amphotericin B に対する感受性は 3 菌種とも感受性を示し差は認められなかった。播種性 *C. guilliermondii* マウスモデルにおける MCFG の治療効果を検討したところ、MCFG を 2.5mg/kg/日 (低用量群)、25mg/kg/日 (高用量群) の用量にて腹腔内投与したところ、高用量群では、腎臓、脾臓、肝臓での菌数が有意に減少し MCFG の有効性を示した。

Key words

Candida guilliermondii, micafungin, 播種性, マウスモデル, 薬剤感受性

緒言：

カンジダ属は院内発症血流感染症の原因菌として第 4 位を占める (1)。*C. albicans* が重症真菌感染症の原因菌として最も検出頻度が高い、他のカンジダ属も日和見感染症の原因微生物として重要である (1)。*C. guilliermondii* は、カンジダ属の中でも稀な種であり、ヒトの粘膜表面や皮膚の細菌叢として検出され、爪白癬の原因真菌として重要である (2, 3)。*C. guilliermondii* は *C. albicans* に比較して病原性は低く、易感染性宿主において播種性カンジダ症および深在性真菌症を引き起こす (1, 2)。カンジダ血流感染症の 1-3% と低い頻度ではあるが、地域により異なる疫学データを示す (4)。本菌感染症の臨床的な問題点は、本菌が fluconazole (FLCZ) やキャンディン系抗真菌薬に対して低感受性であることである (4-6)。FLCZ 耐性 *C. guilliermondii* による骨髄炎の症例では、FLCZ の 400mg/day 治療は無効で、罹患部位の切断が必要になったと報告されている (7)。キャンディン系抗真菌薬は、カンジダ症およびアスペルギルス症に使用される抗真菌薬であり、高いタンパク結合率を有する (8)。*C. guilliermondii* 感染症における MCFG の感受性や活性については報告が少ない。そこで、本研究では、*C. guilliermondii* に対して MCFG、FLCZ、AMPH-B の薬剤感受性試験を行い、MCFG の *C. guilliermondii* に対する臨床的効果を in vivo で検討した。

材料と方法：

①カンジダ臨床分離株

中国吉林省の医療施設で分離されたカンジダ属 (*C. albicans* 17 株、*C. guilliermondii* 8 株、*C. parapsilosis*

9株)、ならびに標準株として *C. parapsilosis* (ATCC90018)、*C. krusei* (ATCC6258) を用いた。すべての臨床分離カンジダ株は、口腔内、爪、大腿から分離された。すべてのカンジダ株は、CHROMagar (関東化学) と RapID™Yeast プラグシステム (REMEL Inc) によって菌種を同定した。

②薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standards Institute の M27-A2 標準法による微量液体希釈法にて行った(9)。MCFG、FLCZ、AMPH-B の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) を測定した。

③感染実験

5週齢の雌 BALB/c マウス (日本ククリア株式会社) を用いた。マウスの取り扱いについて、American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care criteria に基づいて行った(10)。また、本研究は、長崎大学の動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。マウスは、200 mg/kg の cyclophosphamide (Sigma-Aldrich) と 250 mg/kg の 酢酸コルチゾン (Sigma-Aldrich) を、カンジダ感染の2日前に腹腔内投与し、さらに感染当日にも等量の免疫抑制剤を投与し免疫抑制状態にした。臨床分離 *C. guilliermondii* は、感染前日まで YPD 液体培地 (Becton Dickinson) で 30°C、一晚、振とう培養した。感染当日に、対数期の細胞を滅菌生理食塩水にて再懸濁、洗浄し、吸光度計にて 2×10^8 /ml に調整した。マウスの尾静脈より本菌液の 0.2ml を経静脈的に接種した (最終接種菌量: 4×10^7 /マウス)。MCFG による治療は、MCFG を 2.5 mg/kg ならびに 25 mg/kg を感染当日の感染後4時間後、その後、1回/1日、連日7日間、腹腔内投与した。対象として生理食塩水を腹腔内投与した。マウスは、7日間観察され7日目に屠殺した。屠殺後に、脾臓、腎臓、肝臓を無菌的に除去し、脾臓と腎臓は滅菌生理食塩水 1ml 中でホモジナイズした。肝臓は、滅菌生理食塩水 0.2 ml 中でホモジナイズした。ホモジネート液の段階希釈液を作成し YPD 寒天培地 (Becton Dickinson) 上に塗布し、35°C でインキュベート、各臓器におけるカンジダの菌数を計算した。感染実験は各治療群 10 匹ずつ使用し1回のみ行った。

④統計分析

動物実験における各臓器の菌数について、GraphPad Prism、バージョン 5.0 (グラフパッドソフトウェア社) を用いて行った。P<0.05 を統計学的に有意差があるとした。

結果:

①カンジダ属の薬剤感受性試験結果

表1に結果を示す。MCFG の MIC は *C. albicans* で最も低く、*C. guilliermondii* は最も高かった。FLCZ について *C. guilliermondii* は、*C. albicans* や *C. parapsilosis* に比較して高い MIC 値を示した。AMPH-B に対する感受性は3菌種で差は認められず感受性を示した。

②感染実験と MCFG の有効性

臨床分離 *C. guilliermondii* の各臓器からの検出菌数を、図1 (脾臓)、図2 (腎臓)、図3 (肝臓) に示す。高用量 MCFG 治療群では、脾臓を除いて腎臓、肝臓において菌数を有意に減少させた。

考察:

本研究では、中国吉林省の臨床分離カンジダ 34 株について、FLCZ、AMPH-B、MCFG に対する薬剤感受性を検討し、特に *C. guilliermondii* についてマウスにおける MCFG の有用性を検討した。薬剤感受性の結果は、欧米から報告されている種々の報告と比較して大きな差は認められなかった(11, 12)。今回の検討では、カンジダの分離株としては比較的少ない *C. guilliermondii* が多く認められたが、いずれも、FLCZ の MIC 値は高値であり、この点についても既存の報告と大差はなかった(2, 13)。MCFG について、今回検討した3菌種では、*C. guilliermondii* が最も高い MIC 値を示した。一方、Canton らは 10%不活化ウシ胎児血清の存在下で、*C. guilliermondii* 19 株に対する MCFG とカスポファンギン (CAS) の感受性を報告しており、MCFG はウシ胎児血清存在下で感受性が非存在下よりも3倍程度向上したと報告している。一方、CAS にはそのような効果は認められず、同じキャンディ

ン系抗真菌薬でも差があることを示している(14)。また、他の報告でも、同様に、血清存在下における MCFG の感受性向上が報告されている(8)。一方、*C. guilliermondii* 感染症に対する MCFG の効果を in vivo で検討した報告は少ない。今回の我々の検討では、MCFG は 2.5mg/kg の低用量では、肝臓、脾臓、腎臓における菌数の減少が認められなかったが、25mg/kg の高用量群では、脾臓を除いて、有意に菌数の減少を認め *C. guilliermondii* 感染症における MCFG の有効性を示すことができた。なお、MCFG の高用量群にて、脾臓における菌数の減少傾向は認められたが有意差は認められなかった。この点については、理由は不明であり今後の検討が待たれる。

参考文献：

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4419-31.
2. Savini V, Catavittello C, Di Marzio I, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, Pompilio A, Di Bonaventura G, D'Amario C, D'Antonio D. Pan-azole-resistant *Candida guilliermondii* from a leukemia patient's silent funguria. Mycopathologia. 2010 Jun;169(6):457-9. Epub 2010 Feb 5.
3. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, Sullivan S, Daniel R, Krusinski P, Fleckman P, Rich P, Odom R, Aly R, Pariser D, Zaiac M, Rebell G, Leshner J, Gerlach B, Ponce-De-Leon GF, Ghannoum A, Warner J, Isham N, Elewski B. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. J Am Acad Dermatol. 2000 Oct;43(4):641-8.
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, Gibbs DL, Newell VA. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. J Clin Microbiol. 2006 Oct;44(10):3551-6.
5. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, Lee J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Oct;47(10):3149-54.
6. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):760-3.
7. Masala L, Luzzati R, Maccacaro L, Antozzi L, Concia E, Fontana R. Nosocomial cluster of *Candida guilliermondii* fungemia in surgical patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003 Nov;22(11):686-8.
8. Saribas Z, Yurdakul P, Cetin-Hazirolan G, Arikan-Akdagli S. Influence of serum on in vitro susceptibility testing of echinocandins for *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii*. Mycoses. 2012 Mar;55(2):156-60.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeast, 2nd ed. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
10. Committee on the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences, National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C.
11. Axner-Elings M, Botero-Kleiven S, Jensen RH, Arendrup MC. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* isolates collected during a 1-year period in Sweden. J Clin Microbiol. 2011 Jul;49(7):2516-21.
12. Graybill JR, Bocanegra R, Luther M, Fothergill A, Rinaldi MJ. Treatment of murine *Candida krusei* or *Candida glabrata* infection with L-743,872. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Sep;41(9):1937-9.

13. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Identification and Susceptibility Profile of *Candida fermentati* from a worldwide collection of *Candida guilliermondii* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2009 Jan;47(1):242-4.

14. Cantón E, Pemán J, Sastre M, Romero M, Espinel-Ingroff A. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Aug;50(8):2829-3

表 1. 中国吉林省にて分離されたカンジダ属の薬剤感受性試験結果

Candida Species	No	Geometric mean MIC (range) (μ g/ml) obtained by:		
		MCFG	FLCZ	AMPH-B
<i>C. albicans</i>	17	0.07 (0.03-0.5)	1.21 (0.125-16)	0.63 (0.25-1)
<i>C. guilliermondii</i>	8	0.44 (0.25-0.5)	13.5 (4-32)	0.56 (0.5-1)
<i>C. parapsilosis</i>	9	0.37 (0.06-1)	1.39 (0.5-2)	0.67 (0.25-1)

図の説明

図 1. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (脾臓における菌数)

各ドットは各マウスから分離された *C. guilliermondii* の菌数を示している。MFG 2.5 は、MCFG 2.5mg/kg/日投与群、MFG25 は MCFG 25mg/kg/日投与群を示す。脾臓から分離された *C. guilliermondii* の菌数は、生理食塩水投与群、MCFG 投与群において有意差を認めなかった。

図 2. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (腎臓における菌数)

各ドットは各マウスから分離された *C. guilliermondii* の菌数を示している。MFG 2.5 は、MCFG 2.5mg/kg/日投与群、MFG25 は MCFG 25mg/kg/日投与群を示す。腎臓から分離された *C. guilliermondii* の菌数は、生理食塩水投与群、MCFG 低容量群では有意差を認めなかったが、MCFG 高用量群では有意に減少した。

図 3. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (肝臓における菌数)

各ドットは各マウスから分離された *C. guilliermondii* の菌数を示している。MFG 2.5 は、MCFG 2.5mg/kg/日投与群、MFG25 は MCFG 25mg/kg/日投与群を示す。肝臓から分離された *C. guilliermondii* の菌数は、生理食塩水投与群、MCFG 低容量群では有意差を認めなかったが、MCFG 高用量群では有意に減少した。

図1. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (脾臓における菌数)

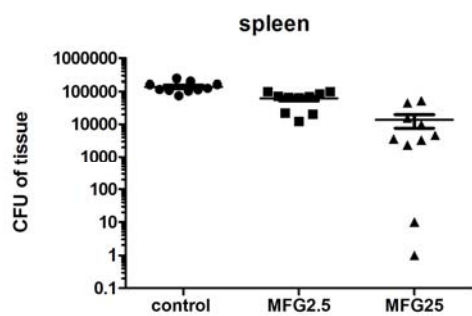


図2. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (腎臓における菌数)

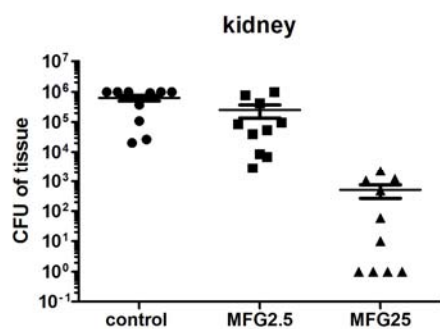
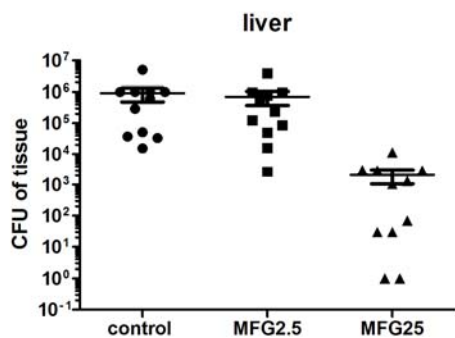


図3. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (肝臓における菌数)



作成日 : 2012 年 2 月 25 日

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2012 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研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 張 冬穎 
指導責任者名： 谷内 一彦
所属部署名： 機能薬理学分野 職名：教授
所在地： 仙台市青葉区星陵町 2-1
電 話： 022-717-8055 内線： 8055

1. 助成金額： 60 万 円

2. 研究テーマ

抗ヒスタミン薬含有点眼剤使用後における脳内ヒスタミン H₁ 受容体占拠率の
評価：健常者における陽電子断層撮影法 (PET) 測定

3. 成果の概要

第一世代と第二世代抗ヒスタミン類含有点眼薬をそれぞれに健康被験者に
点眼し、その抗ヒスタミン成分の脳内への移行程度を陽電子断層撮影法 (PET)
で測定・評価した。第一世代抗ヒスタミン類含有点眼薬 (商品名：ザジテン) が
点眼後に高い H₁ 受容体占有率 (40% 超えた) を示していた一方、第二世代抗ヒ
スタミン類含有点眼薬 (リザベン) が H₁ 受容体を占有せず、脳内にも透過しに
くいとのことも分かった。従来、点眼薬は外用薬として認識されて、その中枢副
作用・安全性への考慮が少なかったが、本研究より第一世代抗ヒスタミン含有
点眼薬使用後に、中枢鎮静副作用の存在があるため、これらの医療品を使用する際
に安全性への考慮もあるべきと結論した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・ (学会名・演題)

Potential Central Sedative Effect of Antihistamine Eye-drops: Histamine H₁ Receptor
Occupancy Measured by Positron Emission Tomography. 第 5 回日中薬理ジョイントミーテ
ィング (中国ウルムチ市) 2011 年 8 月 7~9 日

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

5. 指導責任者の意見(指導責任者をご記入・ご捺印ください)

張 冬穎先生は、今まで殆ど研究がされていない薬物の点眼からの脳移行性について
の研究を行った。世界で初めてPETを用いて鎮静性抗ヒスタミン薬含有点眼液からの
脳移行を証明した。現在、英語論文を執筆中で大変に努力したと評価できる。

指導責任者署名

谷内一孝



抗ヒスタミン薬含有点眼剤使用後における脳内ヒスタミンH1受容体占拠率の評価：健常者における陽電子断層撮影法（PET）測定

研究者氏名 張冬穎
中国所属機関 中国医科大学付属病院麻酔科
日本研究機関 東北大学医学系研究科機能薬理学分野
指導責任者 教授谷内一彦
共同研究者名 渋谷勝彦, 田代学

要旨：

Topical antihistamines are probably the best treatment option for various ocular allergies, thanks to their rapid action, safety and convenience of use. As the oral antihistamines are known to produce drowsiness, the present study was conducted to assess the possible influence of two antihistamine eye-drops, 0.05% ketotifen (Zaditen®) and 0.1% olopatadine (Patanol®), on the central nervous system (CNS) by measuring brain histamine H₁ receptor occupancy (H₁RO) using positron emission tomography. Eight healthy adult subjects are recruited and a PET scan was performed 1.5 hr after 4 repeated local instillation of eye-drops (2 drops per eye, 30 min-interval) in a single-blind, placebo-controlled, crossover manner. H₁RO were calculated in several H₁R-rich cortical regions. We found that the H₁RO following ketotifen treatment is more than 20% and that following olopatadine was nearly zero. Our results provides the evidence for the first time that the first-generation antihistamine eye-drop, ketotifen, may potentially induce central sedation with higher doses, while olopatadine has no CNS influence, though the central side-effects have been rarely documented in the case of topical medications.

Key Words

olopatadine; Ketotifen; histamine H₁ receptor occupancy; positron emission tomography (PET); crossover study.

緒言：

Allergic conjunctivitis is a frequent condition as it is estimated to affect 20% of the population on an annual basis, with individuals in Italy, Japan, and other warm climates being more likely to have these conditions. Topical ophthalmic anti-allergy agent, antihistamine is now the first-line treatment option thanks to their rapid action, safety and convenience of use. However, recently years, with the improvement of the safety conscience regarding the drugs, sedation side-effect of Topical administration of antihistamine eye- or nasal- drops began to raise our attention. Topical administration of antihistamine induces subjective drowsiness in some users though objective evidence is still not available.

Oral or intravenous antihistamines were known to induce sedation, by blocking brain histaminergic system trough H₁ receptors or other non-specific bindings. The sedative degree depends on the ability of

antihistamine in the circulation to penetrate blood-brain-barrier (BBB) and entered into the brain. In recent decade, researchers began to evaluate the sedative property of antihistamines using a more objective method, positron emission tomography (PET), by measuring brain H₁RO. The more drug enters brain, the more H₁ receptors should be occupied and thus induce sedation. H₁RO has been approved to as an index to reflect the sedation with the advantages of objectivity and quantify over the traditional method such as questionnaires or performance tasks. We therefore speculate that whether the sedation side effect of eye-drop also related with their occupying H₁RO in the brain. However, up to date, no study has been conducted regarding the central receptor occupying degree following topical administration of histamine eye-drops.

We designed a randomized, single-blind, placebo-controlled, crossover study and measured the brain histamine H₁RO following the local instillation of two commercially marked antihistamine eye-drops, ketotifen and olopatadine using PET and ¹¹C-doxepin. We aimed to compare and assess the possible sedative outcome of topical eye-drops in a point of view of molecular imaging, and to provide the doctors and patients information that might be useful in their guiding using or receiving such medications.

対象と方法：

Seven healthy Japanese volunteers (male, mean age \pm SD: 23.1 \pm 1.6 years) without history of allergy or any psychiatric diseases or of long-term taking H₁ antagonists, participated in this study. They showed no abnormality in brain magnetic resonance images (MRI). Drugs that might affect histamine response (such as sleep-aids, antidepressants or mast-cell stabilizers) were not allowed at least for 1 week prior to the study. Caffeine, tea, alcohol or grape juice was not allowed on the experiment day. This study was approved by the Ethics Committee on Clinical Investigation at Tohoku University School of Medicine and was performed in accordance with the policy of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all the participants.

Each subject was randomly assigned to the treatment of 0.05% ketotifen (Zaditen® eye-drop, Novartis Pharma Corporation, Tokyo, Japan), 0.1% olopatadine (Patanol® eye-drop, Alcon, Inc, Tokyo, Japan) or a placebo (0.5% tranilast, Rizaben®, a mast-cell stabilizer, Kisei Pharma, Matsumoto, Japan) in a single-blind, crossover manner. The minimum washout period is 7 days. On the experiment day, the antihistamine-containing eye-drops or placebo, were instilled into both eyes of the subject (2 drops each eye with 5 min-intervals between each drop). Then the subject was asked to keep quiet in a supine position until the drug was adequately absorbed. Such instillation process would be repeated for 4 times with a 30 min break inserted (eg, around 0', 30', 60', 90' after the first ocular instillation). During the break time, light music or walking in the room was permitted but reading or strenuous exercise was not. The label of the eye-drop was removed during the experiment to keep the subject blind to it. All the eye-drops were obtained commercially. After the fourth ocular instillation, subject was showed into the PET room and ¹¹C-doxepin-containing saline was injected intravenously. PET scan commenced about 70

min later with a SET2400W PET scanner (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) according to our previous established static PET protocol. This protocol included a 15-min-long three-dimensional mode emission scan (70-85 min post ^{11}C -doxepin-injection) and a 6-min-long transmission scan thereafter.

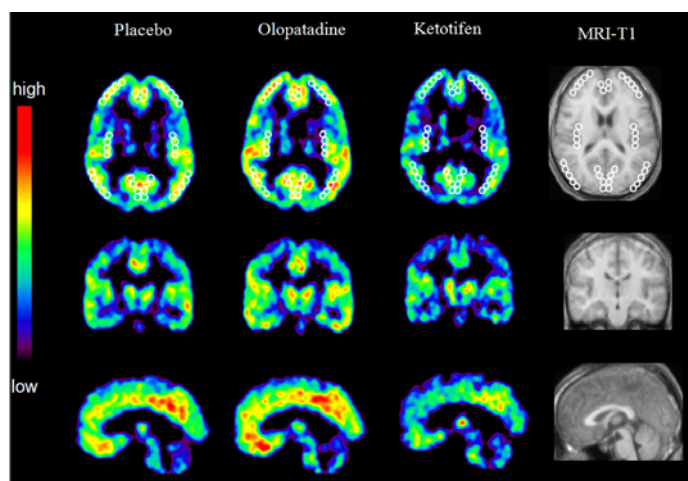
In this study, one subject missed ketotifen-PET examination for irresistible personal reasons; two PET data (following ketotifen and placebo treatment, respectively) of another two subjects was eluted because of the low specific radioactivities of ^{11}C -doxepin below 20 GBq/ μmol at the time of injection. Thus the sample sizes reduced to 5 for ketotifen and 6 for placebo, respectively, in our PET analysis.

Just prior to each time of ocular instillation (at 0', 30', 60', 90' after instillation), subjective sedation was assessed by Line Analogue Rating Scale (LARS) and Stanford Sleepiness Scale (SSS). The LARS measurement assesses the sedation using a line scaled from 0, no sedation to 100, most marked sedation; SSS is composed of a 7 level self-report measure from feeling fully alert, level 1 to sleep onset soon, level 7. Subjects were asked to mark their present feelings on the line, and also select a statement to reflect their current level of alertness and sleepiness.

結果：

1. Brain distribution of ^{11}C -doxepin

After ^{11}C -doxepin injection, the radioligand was found apparently accumulated in H_1R -rich cortical regions, such as ACG and PCG, PFC, IC, LTC and MTC, PC, and OC. In the subjects treated with olopatadine or placebo, the ^{11}C -doxepin distribution patterns and intensity were similar. However, in the subject



treated with ketotifen, radioactivity distribution appeared much lower than that in olopatadine or placebo (Figure). ^{11}C -doxepin, an H_1 -antagonist, is known to compete with antihistamines for H_1R binding sites in the brain, which reflects inverse-proportionally the amount of antihistamines in the brain. Ketotifen-treated subjects appeared much lower specific binding of ^{11}C -doxepin compared with placebo- or olopatadine-treated subjects, suggesting that more ketotifen have entered into the brain instead.

2. Comparison of parametric of BPR images (Ketotifen vs. Olopatadine)

The parametric brain BPR images following treatment with ketotifen or olopatadine, were compared statistically on a voxel-by-voxel basis with those following treatment with the placebo using SPM5. In the ketotifen-treated subjects, ACG, PFC, PC, TC demonstrated significantly lower BPRs than those of the

placebo-treated subjects. Table 1 shows the detail coordinate information of these regions. In contrast, SPM5 analysis could not detect any area with significant lower BPR in the olopatadine-treated subjects than in the placebo-treated subjects.

3. ROI-based comparison of BPR and H₁RO

BPR in the different ROIs revealed significantly lower values in the case of ketotifen than in the case of olopatadine or the placebo in almost all the cortical regions studied except IFC and MTC ($P < 0.01$). No significant difference between olopatadine and the placebo was detected. H₁RO following ketotifen or olopatadine treatment was calculated considering the H₁RO after placebo treatment as baseline (0%). H₁ROs following ketotifen treatment were significantly higher than those following olopatadine treatment in all cortical regions studied. The mean H₁RO across all the cortical regions following ketotifen treatment was approximately 45.7% and that following olopatadine treatment was approximately -1.83%. The difference between mean cortical H₁RO following treatment with ketotifen and olopatadine was statistically significant.

3. Subjective sleepiness and their correlation with H₁RO

Individual subjective sleepiness is represented by the average scores of LARS and SSS data measured at approximately 0`, 30`, 60` and 90` min post-ocular illustration. Non-parametric analysis of Kruskal-Wallis test followed by Dunn`s multiple comparison failed to demonstrate statistical difference in sleepiness among the subjects treated with ketotifen, olopatadine or the placebo. Correlation analysis demonstrated that subjective sleepiness, as represented by area under the curve (AUC) of LARS measurement, showed moderate positive correlation ($r = 0.48$) with mean cortical H₁RO in the ketotifen treated subjects, but this correlation was not significant ($P = 0.16$). On the other hand, sleepiness did not correlate with H₁RO in the case of olopatadine.

考察 :

The primary aim of this study was to provide quantitative evidence via molecular imaging using ¹¹C-doxepin-PET on whether and to what extent the sedative effect happen in healthy subjects after antihistamine eyedrop instillation. We also compared this sedative effect of ketotifen with that of a second-generation antihistamine, olopatadine, which has been demonstrated to be a non-sedative. To the best of our knowledge, the present study is the first to verify the sedative effect using a direct measure of central occupancy with PET in human subjects. We found that the radioactivity distribution of the PET tracer, ¹¹C-doxepin, in subjects treated with ketotifen after instillation was much lower than that in olopatadine- or placebo-treated subjects. From this we know that ketotifen blocked a greater proportion of H₁Rs than olopatadine or placebo did at the time point examined. We confirmed these differences in terms of BPRs using both voxel-by-voxel and ROI-based comparison. As a result, most H₁R-rich brain regions demonstrated significantly lower BPRs in the ketotifen -treated subjects. On the other hand, there was no difference in BPRs between subjects treated with olopatadine and those treated with placebo. H₁RO of

ketotifen and olopatadine using H_1RO of each subject after placebo treatment as a baseline. Ketotifen and olopatadine H_1ROs at 12 h after dosing were 45% and 17%, respectively. In conclusion, topical instillation of ketotifen results in a predominant residual sedative effect, due to which high alertness demanding activities, such as driving, should be avoided, whereas the non-sedative olopatadine may have advantages over the first-generation antihistamines in the treatment of allergic conjunctivitis.

注：本研究は、2011年8月7～9日『第5回日中薬理ジョイントミーティング』にて口演発表。

作成日：2012年3月15日

財団法人 日中医学協会


2011 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2012 年 03 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研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 焦 其彬 
指導責任者名： 南沢 享
所属部署名： 早稲田大学 職名：研究員
所在地： 東京都新宿区若松町 2-2 TWIns
電 話：03-5369-7322 内線：

1. 助成金額： 600000 円

2. 研究テーマ

心房筋特異的遺伝子欠損法の開発と応用

3. 成果の概要

Cre リコンビナーゼが、心臓で心房筋に特異的に発現することが確かめられた。

Sarcopin het と KO マウスの心機能や心房筋機能に異常がないことを証明した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・有(学会名・演題)

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

5. 指導責任者の意見(指導責任者がご記入・ご捺印ください)

焦 其彬研究員は真摯な態度と熱意をもって、本研究を精力的に推進した。

心房筋特異的に Cre 遺伝子を発現させることに成功し、今後、本マウスを

使って、心房筋特異的遺伝子欠損を生体で起こすことが可能になり、世界的

広く利用されることになるものを予測される。現在、論文も準備されており、

短期間に十分な成果を挙げる事が出来た。

指導責任者署名 南沢 亨



収支報告

心房筋特異的遺伝子欠損法の開発と応用

研究者氏名： 焦 其彬
日本研究機関： 早稲田大学 先端生命医科学 研究員
指導責任者： 教授 南沢 享
共同研究者： 岩崎 清隆, 中井 岳

要 旨：

時空間条件付き遺伝子欠損法、いわゆるコンディショナルノックアウトは、非常に強力な分子生物学的研究手法であり、心臓研究においても、心筋特異的遺伝子欠損法により多くの新しい知見が得られている。しかしながら、心房筋特有の分化過程・機能・病態を調べる上で、心房筋特異的な遺伝子欠損法の開発は重要であるにも拘わらず、現在までその開発は進んでいない。我々の研究室では、筋小胞体膜蛋白のひとつで、筋小胞体カルシウムATPaseの活性を制御するsarcolipinが、心臓では心房筋に特異的に発現していることを利用し、sarcolipin遺伝子座にCreリコンビナーゼ遺伝子を挿入し、Creリコンビナーゼknockin-sarcolipin knockoutマウスを作成することによって、心房筋特異的遺伝子欠損法を開発した。本研究では、本マウスを使って心房筋特異的遺伝子欠損を行うことの有用性を検証することを目的とする。

現在まで心房は心臓のポンプ機能の側面からは補助的な役割しかなく、そのために心房筋自体の発生・分化の過程や心室筋との機能的相違をもたらす分子機序に関しては十分に調べられてきたとはいえない。こうした基礎的検討が未熟なために心房に特有の病態解明に関しても不明な点が多く残されている。本研究によって、Creリコンビナーゼknockin-sarcolipin knockoutマウスが、心房筋特異的な遺伝子欠除を生じさせるための分子道具として、利用されてゆけば、心房筋特有の分化過程・機能・病態の分子機序の解明に大きく貢献できると考えている。特に将来的には心房細動の分子機序の解明につなげてゆくことを目標としている。心房細動は臨床で、最も一般的に見られる不整脈であり、人口の約1%が罹患しているとされ、心房筋特有の病態である。このマウスを利用することで、心房筋特異的に各種のイオンチャネル欠損マウスの作成が可能となり、病態を詳細に解明し、新しい治療法の開発につなげてゆくことが出来るのではないかと考えている。

Key Words マウス, 心房筋, 遺伝子欠損法, 心機能, western blot

緒 言：

1 背景

組織特異的遺伝子発現を利用して、ある組織・器官に局限して目的の遺伝子を欠損させる技

術（時空間条件付き遺伝子欠損法）は、非常に強力な研究手法である。心臓研究においても、心筋特異的遺伝子欠損法により多くの新しい知見が得られている。しかし現在まで心房筋特異的な遺伝子欠損法の開発は進んでいない。心房筋と心室筋とは各々異なる構造及び機能特性を有し、心房細動など心房筋に特有な病態が存在する。心房筋特有の分化過程・機能・病態を調べる上で、心房筋特異的な遺伝子欠損法の実用化は必須である。我々は先行研究において、筋小胞体膜蛋白のひとつで、筋小胞体カルシウム ATPase の活性を制御する sarcolipin が、心臓では心房筋に特異的に発現していることを見出した (Minamisawa et al. J Biol Chem, 2003)。DNA マイクロアレイを用いた他の研究などによっても、sarcolipin の心房筋特異的な発現は確認されている (Circ Res 93:1193-201, 2003; Physiol Genomics 12:53-60, 2002)。心房、心室での収縮機能の相違をきたす大きな原因のひとつに筋小胞体でのカルシウム調節が重要であり、sarcolipin による筋小胞体カルシウム ATPase 制御が心房筋の収縮特性を特徴づけるのに重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで我々はハーバード大学 Chien 博士との共同研究のもと、sarcolipin 遺伝子座に Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入し、Cre リコンビナーゼ遺伝子が sarcolipin 発現部位に特異的に発現するような、Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスを作成した。

2. 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

現在まで心房筋特異的な遺伝子欠損・導入法の実用化は進んでいないため、本研究において、Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスの利用が心房筋特異的な遺伝子発現を行う方法として確立出来れば、世界で初めて利用可能なものを示すことになる。sarcolipin 以外にも心房筋特異的な発現を示すと考えられている分子はあるが、その殆どが心肥大や心不全などの疾患時に、心室筋への発現が増加する問題点を有している。例えば、心房性ナトリウム利尿ホルモン (ANF) は心房筋特異的に発現することが知られており、実際そのプロモーターはクローニングされ、発現実験に利用されている。しかし ANF は心肥大などストレスによって、心室筋に発現が誘導され、心負荷の分子マーカーとして利用されている。この点、sarcolipin はこうした病態時にも心室筋への発現は殆ど認められないため、心房筋特異性が極めて高く、心房筋特有の分化過程・機能・病態を調べるための分子道具として、利用価値が極めて大きいと考えられる。

さらに本研究において、Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスの表現型を詳細に検討することによって、sarcolipin 分子自体の心房での役割を明らかにすることが可能となる。sarcolipin は筋小胞体カルシウム ATPase の活性を制御し、心房筋の収縮特性を特徴づけるのに重要な役割を果たしていることが想定されているが、sarcolipin が個体において、心房機能をいかに制御しているかに関しては、不明のままである。sarcolipin knockout マウスによる解析はその最も直截的な証明となると考えられる。

対象 と 方法 :

Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin het と knockout マウスを使って心房筋特異的遺

伝子欠損を行うことの有用性を検証するため、以下の詳細な解析を行う。

1) Cre リコンビナーゼ knockin 効果の確認

我々の研究室では、既に Cre リコンビナーゼによる組換えによって、蛍光色素 YFP を発現するマウスを米国 Jackson 研究所から購入をしており、このマウスと Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスとを掛け合わせて、心臓発生段階における心房筋での YFP 発現時期とその様式を詳細に観察する。これによって、心房発生の中のどの時期から、sarcolipin が発現し、心房特異的な遺伝子欠損が可能となるのかを検証する。

2) sarcolipin ヘテロ欠損による心機能への影響の有無

野生型マウスと比較して、sarcolipin ヘテロマウスでの心機能や心房筋機能・心房形態に異常がないかを調べる。すなわち、本マウスを心房筋特異的遺伝子欠損を生じさせるために使用する場合、一方の遺伝子座は少なくとも sarcolipin ヘテロ欠損となる。従って、sarcolipin ヘテロ欠損によって、既に心房筋に異常を生じてしまうと、本マウスを心房筋特異的遺伝子欠損法を行うための分子道具として使用するには大きな制約が生まれてしまう。そこで平成 22 年度においては、生物学研究法によって、sarcolipin ヘテロマウスでの心機能や心房筋機能・心房形態に異常がないかを調べる。

結果：

1. 心室と心房筋の重量

普通マウスと sarcolipin 遺伝子欠損マウスの左心室、右心室、左心房、右心房の重量一体重比が変化していない。

2. 心機能

普通マウスと sarcolipin 遺伝子欠損マウスの心機能指標 (FS) は変化がしていない。心室壁の厚さも変化がない。

3. 心肥大

sarcolipin 遺伝子欠損マウスの心肥大の指標 (ANP, BNP, MHC) の発現が増加していない。

4. Ca²⁺ ハンドリング蛋白の変化

sarcolipin 遺伝子欠損マウスでは SERCA2, PLN, RyR2, CSQ、NCX1 等の Ca²⁺ ハンドリング蛋白の変化を認められない。

5. テレメトリー解析

sarcolipin 遺伝子欠損マウスでは交感神経と副交感神経の指標 (LF, HF, SDNN 等) が変わっていない。

考 察 :

本研究の結果から見ると、若時時期には sarcolipin 遺伝子欠損マウスでは心機能が変わっていないことが分かりましたが、高齢になったら、心機能が変わるかどうか、まだ分からない状態になっている。将来は18月の高齢マウスを用いて、sarcolipin 遺伝子欠損マウスの心房筋特有の機能・病態を調べることを考えている。

参考文献 :

1. Minamisawa S, Wang Y, Chen J, Ishikawa Y, Chien KR, Matsuoka R. Atrial Chamber-specific Expression of Sarcolipin Is Regulated during Development and Hypertrophic Remodeling. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):9570-5.
2. Shanmugam M, Molina CE, Gao S, Severac-Bastide R, Fischmeister R, Babu GJ. Decreased sarcolipin protein expression and enhanced sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ uptake in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jun 24;410(1):97-101. Epub 2011 May 25.
3. Shanmugam M, Gao S, Hong C, Fefelova N, Nowycky MC, Xie LH, Periasamy M, Babu GJ. Ablation of phospholamban and sarcolipin results in cardiac hypertrophy and decreased cardiac contractility. *Cardiovasc Res.* 2011 Feb 1;89(2):353-61. Epub 2010 Sep 10.
4. Jiao Q, Takeshima H, Ishikawa Y, Minamisawa S. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium.* 2012 Jan;51(1):31-9. doi: 10.1016/j.ceca.2011.10.003. Epub 2011 Nov 25.
5. Jiao Q, Bai Y, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, Minamisawa S. Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Aug;297(2):H576-82. Epub 2009 Jun 5.

作成日 : 2012 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会

2011年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2012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研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 鄧 澤義
指導責任者名： 鈴木幹男
所属部署名： 琉球大学大学院 職名：教授
所在地：沖縄県中頭郡西原町上原 207 番地
電 話：098-895-1183 内線：1183



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

頭頸部癌における HPV 感染の役割及び SCCA と予後に関する研究

3. 成果の概要

頭頸部癌組織の生検と手術サンプルを用いて、PCR 法及びリアルタイム PCR

法を利用して検討を行い、頭頸部癌発症における HPV 感染の役割及び SCCA

と予後の関係を明らかにし、国際の学会及び英文論文を発表した。

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・㊟(学会名・演題)

1) Detection and prognosis of HPV in head and neck cancer · 27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Poster presentation.

2) Viral load, physical status and prognosis of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma 11th · Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery. Oral presentation

(2)発表した論文 無・㊟(雑誌名・題名)

1) **Deng Z**, Hasegawa M, Kiyuna A, et al. Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck, 2012 (in Press)

2) Hasegawa M, **Deng Z**, Maeda H, et al. Human papillomavirus load and physical status in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. Rhinology. 2012 (in Press)

3) **Deng Z**, Hasegawa M, Matayoshi S, et al. Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan. Eur Arch Otolaryngol. 2011; 268:1625-1631.

5. 指導責任者の意見(指導責任者をご記入・ご捺印ください)

300以上の臨床検体を用いて、詳細な検討をおこなった。日本、アジア地域

でははじめての prospective study であり、国際的にも高く評価される。

予後に関する論文は、現在投稿中である。

指導責任者署名

鈴木幹男



頭頸部癌における HPV の役割及び SCCA と予後に関する研究

研究者氏名 鄧 澤義

中国所属機関 中国広西医科大学耳鼻咽喉科

日本所属機関 琉球大学大学院医学研究科耳鼻咽喉頭頸部外科

指導責任者 教授 鈴木 幹男

共同研究者名 長谷川昌宏, 又吉 宣, 山下 懐, 上原貴行

喜友名朝則, 安慶名信也, 真栄田裕行

要旨

To clarify the synergistic influence of HPV status and *SCCA* mRNA expression on HNSCC prognosis, HPV DNA presence and *SCCA1* and *SCCA2* mRNA expression were determined by polymerase chain reaction (PCR) and quantitative real-time reverse transcription-PCR, respectively, in 121 patients with primary HNSCC who were receiving curative treatment. Positive HPV status showed a significantly better prognosis than negative HPV status ($P = 0.022$). An elevated *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio was an independent predictor of disease recurrence ($P = 0.007$). Although no significant correlation between HPV status and the *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio was observed, HPV-negative patients with a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio (>0.27) had a significantly lower survival rate compared with HPV-positive patients and those with a low *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio ($P = 0.001$). Our findings revealed that both HPV status and the *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio are independently associated with prognosis in HNSCC. Patients with both a HPV-negative status and a high *SCCA2/SCCA1* ratio may need more aggressive treatment and rigorous follow-up after treatment because of the high risk of recurrence.

Key words human papillomavirus; squamous cell carcinoma antigen; disease prognosis; head and neck squamous cell carcinoma

緒言

During the last decade, the strongest correlation between human papillomavirus (HPV) and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has been found in oropharyngeal squamous cell carcinoma, particularly tonsillar carcinoma, with HPV DNA present in up to 70% of studied patients.¹⁻³ Furthermore, many studies have demonstrated that patients with HPV-positive oropharyngeal carcinoma have a better prognosis than HPV-negative oropharyngeal carcinoma.¹ Nevertheless, there are few reports regarding the relationship

between HPV presence and other prognostic factors in patients with HNSCC. Squamous cell carcinoma antigen (SCCA) is a member of the family of serine protease inhibitors that map to the serine protease inhibitor (serpin) cluster at chromosome 18q21.3.⁴ Molecular studies have demonstrated that SCCA is transcribed by two almost identical genes (*SCCA1* and *SCCA2*). In previous studies, the correlation between prognosis and *SCCA* mRNA expression in the uterine cervix and head and neck has also been investigated.⁵⁻⁷ To clarify the synergistic influence of HPV status and SCCA on HNSCC prognosis, the present prospective study employed polymerase chain reaction (PCR) for HPV DNA detection and quantitative real-time PCR for *SCCA1* and *SCCA2* mRNA expression in patients receiving radical treatment.

対象と方法

One hundred and seventy-two patients with HNSCC provided written informed consent before being enrolled into this prospective study. Demographic and clinicopathologic parameters for each patient were collected at scheduled intervals during the follow-up period. After isolating DNA from the clinical fresh-frozen samples, the presence of HPV DNA was analyzed by PCR using the general consensus primer sets GP5+/GP6+ and MY09/11. Positive PCR products were purified and directly sequenced. Obtained sequences were aligned and compared with those of known HPV types in the GenBank database using the BLAST program.

cDNA was synthesized from DNA-free total RNA after total RNA was isolated from frozen samples of HNSCCs. To estimate *SCCA1* and *SCCA2* genes expression, quantitative real time-PCR was performed with the ABI Prism 7300 Sequence Detection System and TaqMan PCR Master Mix II. Primers and TaqMan probes were used as previously described.⁷ Two standard curves for the *SCCA1* and *SCCA2* genes were generated by amplification of serial 10-fold dilutions of a plasmid pDNR-LIB carrying *SCCA1* and *SCCA2* cDNA, respectively. A linear relationship was found between the threshold cycle values plotted against the log of the copy number over the entire range of dilutions. For precise quantification, the *SCCA1* and *SCCA2* mRNA expression level of each sample was normalized using the expression of the β -*actin* gene. The quantitative value of *SCCA1* or *SCCA2* mRNA was described as each value relative to β -*actin* mRNA (relative signal intensity, e.g. RSI: value of $100,000 \times \text{SCCA} / \beta\text{-actin}$).

A Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test for continuous variables and Pearson's Chi-square test or Fisher's exact test for dichotomous variables were used to compare patients with and without mutations at baseline. Survival curves were estimated according to the Kaplan-Meier method, and survival distributions were compared using the log-rank test. Multivariate analysis for recurrence-free survival and disease-specific survival were performed using the Cox proportional hazards model. Analyses were performed using the SPSS statistical package.

結果

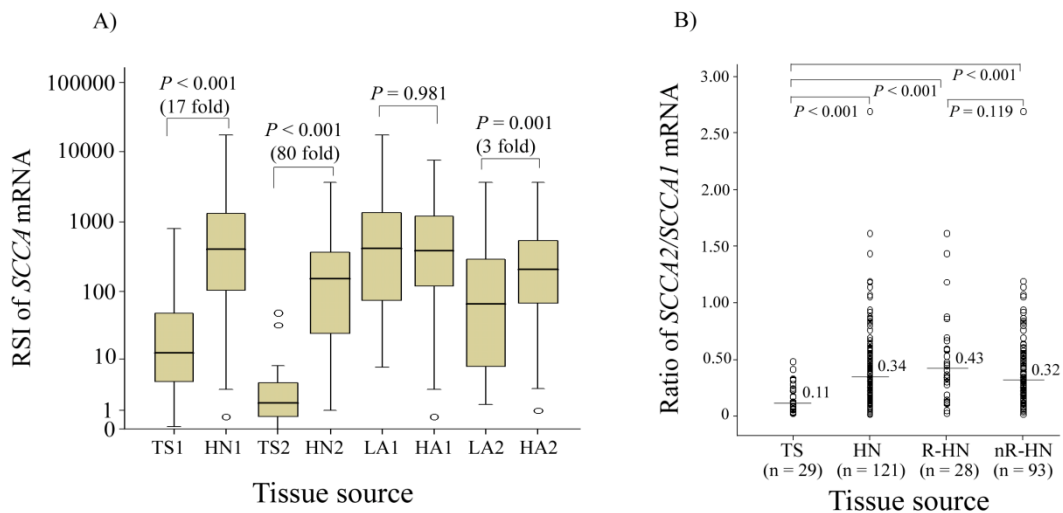
Prevalence of HPV in HNSCC

Of the 172 registered patients, 38 were excluded from the study, since they did not meet eligibility criteria. The remaining 121 patients were eligible for investigation. The prevalence of HPV DNA in HNSCC was 28.1% (34/121). HPV DNA was most frequently observed in the oropharynx (18 of 38 cases, 47.4%). The palatine tonsil was the most common site in the oropharynx infected by HPV (15 of 22 cases, 68.2%). Among HPV-positive HNSCC samples, 29 (85.3%) were infected with HPV-16 and the others were infected with non-16 high-risk types, in particular, 2 with HPV-33, 1 with HPV-35, and 2 with HPV-58. There were no cases of HPV-18, and no multiple HPV infections were detected.

Quantitative analysis of *SCCA1* and *SCCA2* mRNA expression in HNSCC

Each expression of *SCCA1* and *SCCA2* mRNA in HNSCC was significantly higher than that in non-malignant tissue ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively), shown in Figure 1-A. HNSCC had a significantly higher value than non-malignant tissue for the *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio ($P < 0.001$, Figure 1-B). *SCCA2* expression in samples with a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio was significantly increased and 3-fold higher than samples with a low *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio (median 2.10×10^2 vs 6.59×10 , $P = 0.001$).

(Figure 1)



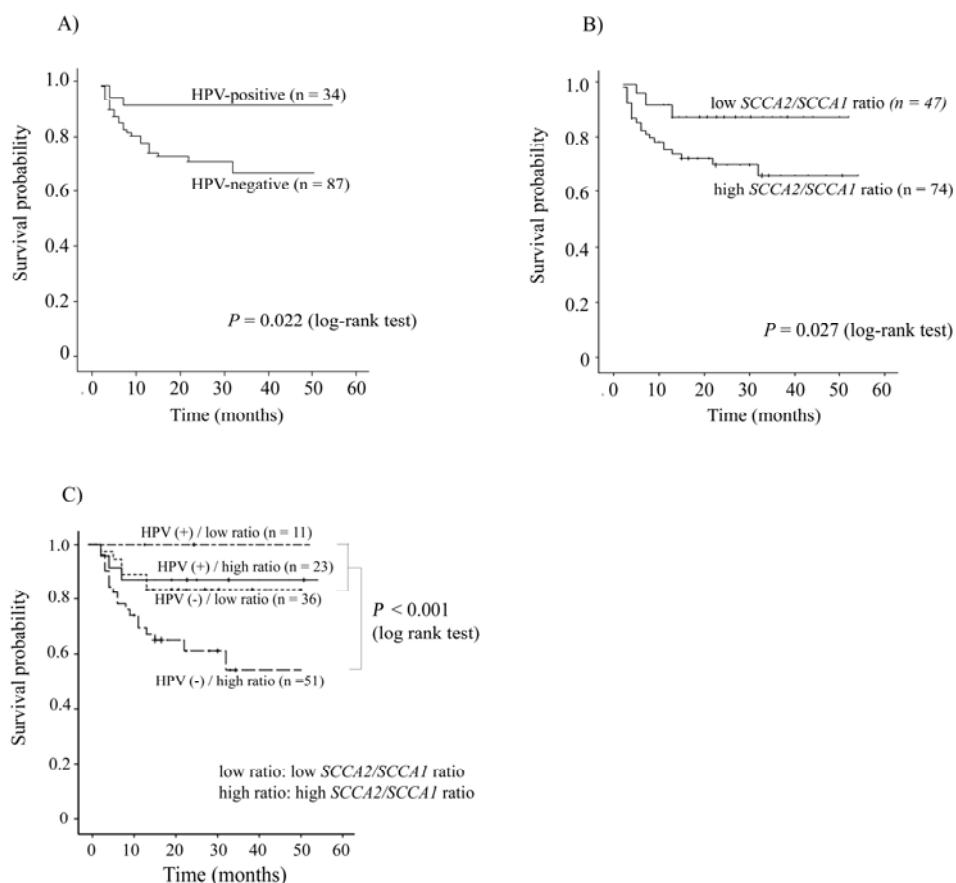
Prognosis in relation to HPV DNA presence and the *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio

1) Impact of HPV DNA presence and *SCCA2/SCCA1* mRNA expression ratio, respectively, on prognosis

Kaplan-Meier analysis revealed that patients with HPV-positive HNSCC had better recurrence-free survival than patients with HPV-negative HNSCC ($P = 0.022$, Figure 2-A).

Of the various primary lesions, HPV-positive patients with oropharyngeal carcinoma had better recurrence-free survival than HPV-negative patients with oropharyngeal cancer ($P = 0.037$, Figure 3-A). Patients with a low *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio (≤ 0.27 , $n = 47$) had better recurrence-free survival than patients with a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio (>0.27 , $n = 74$) ($P = 0.027$, Figure 2-B).

(Figure 2)

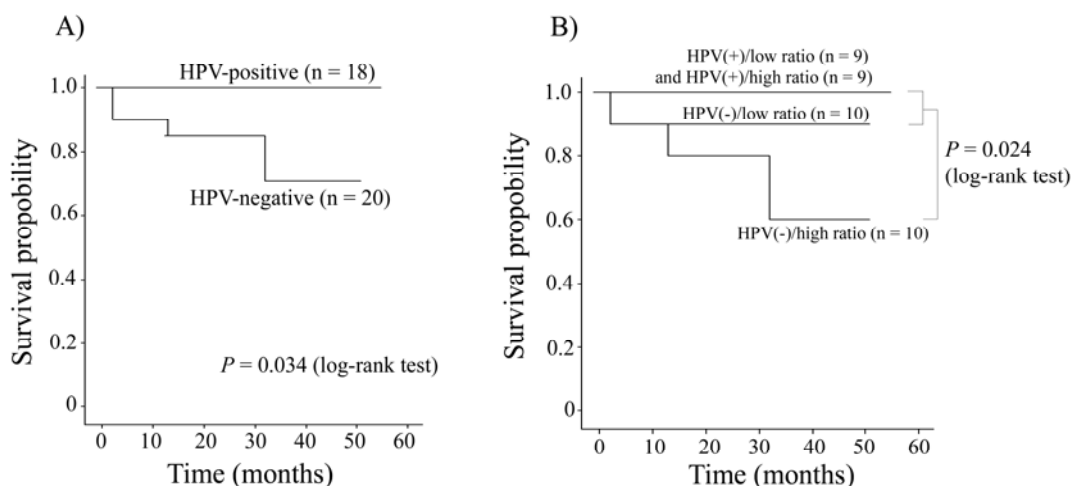


2) Synergistic relationship between HPV presence and *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio in recurrence-free survival

HPV-negative patients with a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio had significantly lower recurrence-free survival compared with both HPV-positive patients and HPV-negative/low *SCCA2/SCCA1* ratio patients ($P < 0.001$, Figure 2-C). In oropharyngeal carcinoma, HPV-negative patients with a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio also had a significantly decreased recurrence-free survival compared with HPV-positive patients or with those with a low *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio ($P = 0.024$, Figure 3-B). The final model of multivariate analysis using a Cox proportional hazards model for identification of independent risk factors of recurrence-free survival of HNSCC showed that female gender ($P = 0.044$; adjusted HR = 2.83; 95% CI = 1.03–7.78), advanced T stage ($P = 0.020$; adjusted HR = 2.56; 95% CI = 1.16–5.66),

HPV-negative status ($P = 0.005$; adjusted HR = 5.97; 95% CI = 1.71–20.87), and a high *SCCA2/SCCA1* ratio ($P = 0.007$; adjusted HR = 3.64; 95% CI = 1.42–9.30) were associated with a high risk of HNSCC recurrence.

(Figure 3)



考察

In the present study, HPV DNA, mainly HPV-16, was detected in 28.1% of HNSCC cases. The recurrence-free survival in HPV-positive patients with HNSCC, including the oropharynx, was significantly better than in HPV-negative patients with HNSCC, which was consistent with previous study.¹ *SCCA1* and *SCCA2* mRNA expression in HNSCC was 17-fold and 80-fold higher than in non-malignant tissues, respectively, suggesting that the high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio in HNSCC is due to elevation of *SCCA2* mRNA expression. It seems that elevated *SCCA2* expression might play a more important role in the progression of cancer and in protecting malignant cells from various therapies for HNSCC than previously envisaged.

The present study indicated that patients with a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio had a poor prognosis and that a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio is associated with disease recurrence. These results suggest that the *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio has potential for predicting disease severity and response to treatment. To the best of our knowledge, this is the first study to perform absolute quantification of *SCCA1* and *SCCA2* from malignant and non-malignant tissue of the head and neck.

Multivariate analysis on recurrence-free survival in the present study clearly indicated that in addition to tumor stage and gender, both HPV status and the *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio are independent prognostic factors for recurrence in HNSCCs. In addition, a HPV-negative status and/or a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio indicated a markedly increased risk of recurrence after initial radical therapy in patients with HNSCC, and a similar tendency was observed in patients with oropharyngeal carcinoma.

In conclusion, our findings provide evidence that both HPV status and the *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio are independently associated with HNSCC prognosis. Positive HPV status and a low *SCCA2/SCCA1* ratio are two independent factors for predicting good prognosis. On the other hand, patients with both high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio and negative HPV status had HNSCC recurrence after radical treatment. The present results suggest that HPV-negative patients with a high *SCCA2/SCCA1* mRNA ratio need more aggressive therapy and rigorous follow-up after treatment.

参考文献

1. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:261-9.
2. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-56.
3. Deng Z, Hasegawa M, Matayoshi S, Kiyuna A, Yamashita Y, Maeda H, Suzuki M. Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268:1625-31.
4. Schneider SS, Schick C, Fish KE, Miller E, Pena JC, Treter SD, Hui SM, Silverman GA. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3147-51.
5. Yuan SH, Liang XF, Jia WH, Huang JL, Wei M, Deng L, Liang LZ, Wang XY, Zeng YX. Molecular diagnosis of sentinel lymph node metastases in cervical cancer using squamous cell carcinoma antigen. *Clin Cancer Res* 2008;14:5571-8.
6. Stenman J, Hedstrom J, Grenman R, Leivo I, Finne P, Palotie A, Orpana A. Relative levels of *SCCA2* and *SCCA1* mRNA in primary tumors predicts recurrent disease in squamous cell cancer of the head and neck. *Int J Cancer* 2001;95:39-43.
7. Hsu KF, Huang SC, Shiau AL, Cheng YM, Shen MR, Chen YF, Lin CY, Lee BH, Chou CY. Increased expression level of squamous cell carcinoma antigen 2 and 1 ratio is associated with poor prognosis in early-stage uterine cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:174-81.

注：本研究は、2011年9月『第27回国際乳頭腫ウイルス学会』にてポスター発表、2011年12月『第11回日台耳鼻咽喉科学学会』にて口演発表。

作成日：2012年3月9日

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2012 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研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 石 棟
指導責任者名： 布施 昇男
所属部署名：東北大学東北メデ 職名：教授
イカル メガバンク機構
所 在 地：仙台市青葉区星陵町 1-1
電 話：022-717-7294 内線：



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障、発達緑内障の分子遺伝学的解析

3. 成果の概要

緑内障原因遺伝子のスクリーニングを行い、常染色体 2 番の HK2 遺伝

子、NCK2 遺伝子の正常眼圧緑内障との相関を見出した (学位論文)、また発達

緑内障における LTBP2 遺伝子のスクリーニング等と成果は多岐にわたる。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・有(学会名・演題)

WOC 2012(Abu Dhabi, UAE)

Molecular Genetic Analysis of Primary Open-angle Glaucoma, Normal

Tension Glaucoma, and Developmental Glaucoma for VAV2 and VAV3 Variants in

Japanese

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

5. 指導責任者の意見(指導責任者がご記入・ご捺印ください)

短期間に次々と成果を上げており、その熱意、才能は他の学生の追隨を

許さない。研究に対する情熱、姿勢、着眼点はすばらしいものがある。

海外の緑内障の遺伝子解析は、明らかに遺伝学的な背景が日本人と異なって

おり、今回の検討は、国内の緑内障分野での遺伝子診断・解析に多大な貢献を

もたらすと考えられる。今後の更なる展開が期待される。

指導責任者署名 布施 昇男



収支報告

開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障、発達緑内障の分子遺伝学的解析

研究者氏名	石 棟
中国所属機関	中国医科大学眼科病院
日本研究機関	東北大学大学院医学系研究科 眼科学分野
指導責任者	教授 布施 昇男
共同研究者名	高野 良真、清水 愛

Molecular Genetic Analysis of Primary Open-angle Glaucoma, Normal Tension Glaucoma, and Developmental Glaucoma for VAV2 and VAV3 Variants in Japanese

要旨

Purpose: The VAV2 and VAV3 genes have been implicated in primary open angle glaucoma (POAG) in the Japanese. The purpose of this study was to determine whether variants in the vav 2 guanine nucleotide exchange factor (VAV2) and vav 3 guanine nucleotide exchange factor (VAV3) genes are associated with primary open-angle glaucoma (POAG), normal tension glaucoma (NTG), and developmental glaucoma (DG) in the Japanese.

Methods: One hundred sixty-eight unrelated Japanese patients with POAG, 163 unrelated patients with NTG, 45 unrelated patients with DG, and 180 ethnically-matched normal controls were studied. Genomic DNA was extracted from leukocytes of the peripheral blood, and variants in the VAV2 and VAV3 genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and directly sequenced.

Results: Two variants were identified; rs2156323 in VAV2 and rs2801219 in VAV3. The allele frequency of rs2156323 in VAV2 in the POAG, NTG, and DG groups was not significantly different from the control group (minor allele frequency 0.051, 0.049, 0.022 vs. 0.036; $P = 0.35, 0.40, \text{ and } 0.51$, respectively). The allele frequency of the rs2801219 in VAV3 was also not significantly higher in the two groups than in the control group (minor allele frequency 0.211, 0.236, 0.244 vs. 0.197; $P = 0.64, 0.22 \text{ and } 0.32$).

Conclusions: The variants, rs2156323 in VAV2 and rs2801219 in VAV3 genes and the prevalence of POAG, NTG, and DG in unrelated Japanese patients indicate that they are not involved in the pathogenesis of POAG, NTG, or DG.

Key Words POAG, NTG, DG, VAV2, VAV3, Gene screening

緒言

Glaucoma is a complex, heterogeneous disease characterized by a progressive degeneration of the optic nerve axons, and is the second highest cause of blindness affecting approximately 70 million people. The prevalence of NTG is significantly higher among the Japanese than among Caucasians.

Although the precise molecular basis of POAG has not been established, it is probably a genetically heterogeneous disorder caused by the interaction of multiple genes and environmental factors. To date, at least fifteen loci from GLC1A to GLC1O have been linked to POAG, and three genes have been identified.

Recently, the *vav* 2 guanine nucleotide exchange factor (*VAV2*) and *vav* 3 guanine nucleotide exchange factor (*VAV3*) genes were reported to cause POAG in the Japanese. The authors provided functional evidence suggesting that *Vav2* and *Vav2/Vav3* deficient mice had a spontaneous glaucoma phenotype resulting in progressive iridocorneal changes and elevated IOPs. In addition, a genome-wide association study (GWAS) screening for glaucoma susceptibility loci using single nucleotide polymorphisms (SNPs) analysis identified intronic SNPs in *VAV2* (rs2156323) and *VAV3* (rs2801219) as candidates for genes associated with POAG in Japanese patients.

The development of an accurate diagnostic test for pre-symptomatic individuals at risk for glaucoma is needed, and the screening of the *VAV2* and *VAV3* genes may identify pre-symptomatic cases in the general population. Thus, the purpose of this study was to determine whether variants in the *VAV2* and *VAV3* genes contribute to POAG, NTG, and developmental glaucoma (DG) in Japanese patients.

対象と方法

Patients

168 unrelated Japanese patients with POAG, 163 unrelated Japanese patients with NTG, and 45 unrelated Japanese patients with DG, who were diagnosed in the ophthalmological clinic at the Tohoku University Hospital, Sendai, Japan, were studied.

Sample Preparation and Variant Screening

Genomic DNA was extracted from leukocytes of peripheral blood and purified with the Qiagen QIAamp Blood Kit (Qiagen, USA). SNPs rs2156323 (*VAV2*) and rs2801219 (*VAV3*) and their flanking regions were amplified by a polymerase chain reaction (PCR) using 0.5 μ M intronic primers in the amplification mixture (25 μ l) containing 0.2 mM dNTPs and 0.5 U Ex Taq polymerase (Takara) with 30 ng template DNA at an annealing temperature of 60° C. Oligonucleotides for amplification and sequencing were selected using Primer3 software, (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/) provided in the public domain by the Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA).

The PCR fragments were purified with ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio, USA), sequenced by the BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Foster City, California, USA) on an automated DNA sequencer (ABI PRISMTM 3100 Genetic Analyzer, Perkin-Elmer).

結果

Allelic frequencies for rs2156323 SNP in *VAV2* and rs2801219 SNP in *VAV3*

Two variants were identified: rs2156323 in *VAV2* and rs2801219 in *VAV3*. The allele frequencies of rs2156323 in *VAV2* in the POAG, the NTG, and the DG groups were not significantly different from that in the control group. The allele frequency of the rs2801219 in *VAV3* was also not significantly higher in the two groups than in the control group.

Genotype frequencies for rs2156323 SNP in *VAV2* and rs2801219 SNP in *VAV3*

For the rs2156323 in *VAV2*, the genotype frequency was not statistically higher in the POAG, the NTG, and the DG groups than in the control group. For the rs2801219 in *VAV3*, the genotype

frequency was not statistically higher in the POAG, the NTG, and DG groups than in the control group.

Dominant and recessive model for rs2156323 SNP in VAV2 and rs2801219 SNP in VAV3

The homozygotes for rs2156323 SNP A/A were 0% in the glaucoma subjects, and 0.6% in the control subjects. We analyzed the dominant and recessive model for rs2801219 SNP in VAV3. There was also no significant difference between the subgroups of glaucoma and SNP rs2801219 in VAV3. However, in NTG group, the $P = 0.06$ for the dominant model.

考察

Obtaining evidence that candidate genes and gene variants are significantly associated with a specific disease is biologically more meaningful when they are found in different ethnic populations. The significant associations would then indicate that these genes play a role in the pathogenesis of the disease. Our findings showed that the risk alleles rs2156323 (VAV2) and rs2801219 (VAV3) were not significantly associated with POAG in Japanese patients. These risk alleles were also found to be not significantly associated with either POAG or primary angle closure glaucoma (PACG) in an Indian cohort. The investigators found that the genotype frequencies at these loci were not significantly different among the POAG, PACG, and controls subjects among their Indian cohorts.

The finding that *Vav2*-deficiency alone resulted in a glaucoma phenotype in mice suggested that the absence of *Vav2* is associated with the development of glaucoma in mice. However, our findings showed there was no significant association between the VAV2 SNP and POAG, NTG, and DG. In addition, the VAV2 SNP rs2156323 was not associated with these glaucoma phenotypes. Functionally, *Vav2/Vav3*-deficient (*Vav2*^{-/-}*Vav3*^{-/-}) mice have buphthalmos along with iridocorneal changes that altered the aqueous outflow leading to the elevated intraocular pressures. The optic nerve head cupping resembled that in developmental glaucoma and PACG. Thus, we suggest that VAV2 and VAV3 could be major candidate genes for developmental glaucoma in humans. But our results showed that not only DG but also POAG and NTG were not associated with alleles rs2156323 (VAV2) and rs2801219 (VAV3).

There is a possibility that a lack of significant associations at these loci in our POAG cases could have been due to clinical heterogeneity.

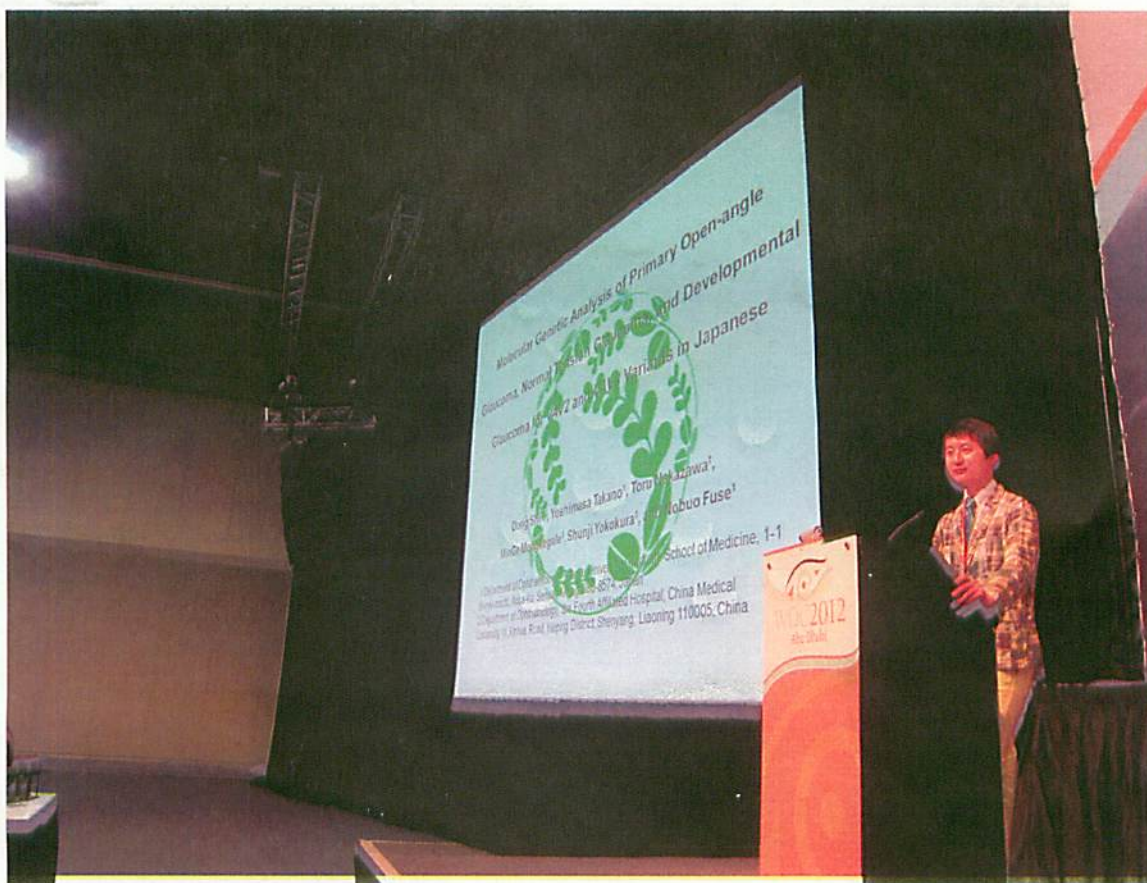
Another possibility for the lack of significant associations is the sample size.

In summary, variants rs2156323 in VAV2 and rs2801219 in VAV3 genes do not appear to be major risk factors for the pathogenesis of glaucoma in the Japanese. However, *Vav2/Vav3*-deficient mice can still serve as a useful model of spontaneous glaucoma, and investigations of the development of their phenotype may provide information on the pathogenesis of glaucoma in humans.

References

1. Quigley H. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol*. 1996;80:389-393.
2. Werner E. *Normal-tension glaucoma*. St.Louis: Mosby; 1996.
3. Shiose Y, Kitazawa Y, Tsukahara S, et al. Epidemiology of glaucoma in Japan--a nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol*. 1991;35:133-155.
4. Iwase A, Suzuki Y, Araie M, et al. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology*. 2004;111:1641-1648.
5. Raymond V. Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five "GLC" loci. *Am J Hum Genet*. 1997;60:272-277.
6. Sarfarazi M. Recent advances in molecular genetics of glaucomas. *Hum Mol Genet*. 1997;6:1667-1677.
7. Stone EM, Fingert JH, Alward WL, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*. 1997;275:668-670.
8. Rezaie T, Child A, Hitchings R, et al. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science*. 2002;295:1077-1079.
9. Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet*. 2005;14:725-733.
10. Alward WL, Kwon YH, Kawase K, et al. Evaluation of optineurin sequence variations in 1,048 patients with open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2003;136:904-910.
11. Wiggs JL, Auguste J, Allingham RR, et al. Lack of association of mutations in optineurin with disease in patients with adult-onset primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2003;121:1181-1183.
12. Hewitt AW, Dimasi DP, Mackey DA, Craig JE. A Glaucoma Case-control Study of the WDR36 Gene D658G sequence variant. *Am J Ophthalmol*. 2006;142:324-325.
13. Fingert JH, Alward WL, Kwon YH, et al. No association between variations in the WDR36 gene and primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2007;125:434-436.
14. Miyazawa A, Fuse N, Mengkegale M, et al. Association between primary open-angle glaucoma and WDR36 DNA sequence variants in Japanese. *Mol Vis*. 2007;13:1912-1919.
15. Pasutto F, Mardin CY, Michels-Rautenstrauss K, et al. Profiling of WDR36 missense variants in German patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:270-274.
16. Fujikawa K, Iwata T, Inoue K, et al. VAV2 and VAV3 as candidate disease genes for spontaneous glaucoma in mice and humans. *PLoS One*. 2010;5:e9050.
17. Zhao JH, Curtis D, Sham PC. Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum. Hered*. 2000;50:133-139.
18. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175-191.
19. Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, et al. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature*. 2007;447:655-660.

20. Rao KN, Kaur I, Parikh RS, et al. Variations in NTF4, VAV2, and VAV3 genes are not involved with primary open-angle and primary angle-closure glaucomas in an indian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:4937-4941.
21. Bustelo XR. Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene.* 2001;20:6372-6381.



注：本研究は、2012年2月20日『世界眼科学会議2012（WOC2012）』にて口演発表

作成日：2012年3月14日

財団法人 日中医学協会


2011 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2012年 2月 28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研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 郝 佳 
指導責任者名： 春日井 昇平
所属部署名： 北京朗瑞口腔 門部 職名： 医員
所在地： 北京朝阳区广顺北大街 31 号夏都家园
電 話： 03 3872 4869 内線：

1. 助成金額： 60 万 円

2. 研究テーマ

ビスフォスフォネート (BP) 局所投与による、骨粗鬆モデルラット脛骨骨髓内に埋入した薄膜ハイドロキシアパタイト (HA) コーティングインプラント骨性結合への効果

3. 成果の概要

BP 局所投与した薄膜 HA インプラントを骨粗鬆症モデルラット脛骨内へ埋入した際に、インプラント周囲骨の骨量を増加させる効果があること。また、BP を局所投与した際は材料表面の細菌接着に影響ないことを証明した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・有(学会名・演題)

1. バイオインテグレーション学会・第2回学術大会,

2. ISTA 2011 Annual Congress

演題:

Bacterial adhesion behavior and bone formation effect of Zoledronic Acid (ZOL) immobilized hydroxyapatite implants.

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

Enhanced osteoblast and osteoclast responses to a thin film sputtered hydroxyapatite coating.

J Mater Sci Mater Med. 2011 Jun;22(6):1489-99. Epub 2011 May 13.

5. 指導責任者の意見(指導責任者をご記入・ご捺印ください)

我々の研究では、4ヶ月表面にヒドロキシアパタイト(HA)を薄膜コーティングしたインプラントを開発しておりますが、彼女はこのインプラントの骨結合の向上を確認し、その有効性と安全性を示しました。本研究では、このHAコーティングとビスフォスフォネート(BP)の局所投与を組み合わせることにより、骨結合をさらに強化するインプラントの有効性を証明しました。

指導責任者署名

春日井 昇平



収支報告

ビスフォスフォネート局所投与による、骨粗鬆モデルラット脛骨内に埋入した薄膜ハイドロキシアパタイト (HA) コーティングインプラント骨性結合への効果

研究者氏名	郝 佳
中国所属機関	北京朗瑞口腔门诊部
日本研究機関	東京医科歯科大学
指導責任者	教授 春日井 昇平
共同研究者名	黒田 真司

要 旨 (Abstract)

Bisphosphonates are well known drugs that can inhibit bone resorption and normalize the high rate of bone turnover that characterizes osteoporosis. Recently, hydroxyapatite (HA) has been used as bisphosphonates local delivery system to enhance peri-implant bone formation, and the results are generally encouraging. In the present study, a thin film HA coating with strong adhesion and bioactive microstructure prepared by radio frequency (RF) magnetron sputtering technique was used as bisphosphonate carrier. Microbial adhesion and the accumulation of pathogenic biofilms are considered to play major roles in the pathogenesis of peri-implantitis and implant loss. In addition, bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) has become a big concern lately. A recent study reported that zoledronic acid (ZOL) promoted the adherence of streptococcus mutans to hydroxyapatite and the proliferation of oral bacteria. The purpose of the present study is to find out a coating concentration which can improve peri-implant bone formation but minimize bacterial adhesion. Custom made sputtered HA coated titanium cylinders were used as the substrate materials for ZOL application. There are four groups: (1) control group (without ZOL treatment); (2) Low dose group (0.5 µg/implant); (3) medium dose group (2µg/implant); (4) high dose group (10µg/implant). Each implant was inserted in the medullary cavity of a femur from the intercondylar notch. After 2 weeks healing, animals were sacrificed and femora were harvested for micro-CT and histology analysis. Bacteria were cultured on the samples with different amount of ZOL, and analyzed with the Live/Dead BacLight bacterial viability kit. We found out that the low dose and medium dose groups showed significantly higher bone implant contact than the control and high dose groups. There was also a significantly larger peri-implant bone volume in the low dose group than in the control and high dose groups, which was consistent with the result of mineral apposition rate. In addition, no significant difference in bacterial adhesion was observed among groups. The results indicated that the ZOL released from the sputtered HA coating stimulated peri-implant bone formation at relatively low dose (0.5 µg and 2µg). Furthermore, the bacterial adhesion to the HA implant was not affected by the application of ZOL.

Key words

Implant, hydroxyapatite, bisphosphonates, bone formation, bacteria.

緒 言 (Introduction)

Bisphosphonates (BP) are well known drugs that can inhibit bone resorption and normalize the high rate of bone turnover that characterizes osteoporosis. BP, such as zoledronic acid (ZOL), have a high affinity for both natural and synthetic hydroxyapatite (HA), and their powerful anti-resorptive effects in osteoporosis were recognized through directly blocking osteoclastic proliferation and activity, or indirectly acting on osteoclasts via osteoblasts. Considering the undesirable effects such as gastrointestinal ulceration and osteonecrosis of the jaw, local application of BPs, a direct targeting at osteoclasts to be controlled, seems more effective. Recently, HA has been used as a local delivery system for bisphosphonates to enhance peri-implant bone formation, and the results are generally encouraging [1, 2]. However the HA coating in the previous studies was produced by a plasma spray technique which has been reported to result in a non-uniformity in coating density and poor adhesion between the coating and substrates [3]. The inflammatory response which in turn induces implant loosening is a biological consequence of the coating debris. In the present study, a thin film HA coating with strong adhesion and bioactive microstructure prepared by a radio frequency (RF) magnetron sputtering technique [4] was used as an alternative bisphosphonate carrier. Microbial adhesion and the accumulation of pathogenic biofilms are considered to play major roles in the pathogenesis of peri-implantitis and implant loss. In addition, bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) has become a big concern lately. A recent study reported that ZOL promoted the adherence of streptococcus mutans to hydroxyapatite and the proliferation of oral bacteria. The purpose of the present study is to find out a coating concentration which can improve peri-implant bone formation but minimize bacterial adhesion.

対象と方法 (Materials and Methods) :

Preparation of implants

Custom made Radio frequency (RF) sputtered HA coated titanium cylinders, measuring 1 mm in diameter and 15 mm in length, were used as the substrate materials for ZOL. Briefly, all the titanium cylinders were sandblasted by fluorapatite crystal and then subjected to an acid etching treatment. Sputtering was carried out to produce an average thickness of 1.1 μ m. Subsequently, a hydrothermal treatment was performed at a temperature of 120 $^{\circ}$ C in an electrolyte solution containing calcium and phosphate ions for 20h. The surface roughness (Ra) was determined using a surface measurement tester (SURFCOM 130A). The average roughness of the sputtered HA coating was 1.5 μ m. These implants were sterilized and subjected to different amount of ZOL, including (1) control group (without ZOL treatment); (2) Low dose group (0.5 μ g/implant); (3) medium dose group (2 μ g/implant); (4) high dose group (10 μ g/implant)

Animal and surgical procedures

Twelve 24-week-old female Wistar rats were randomly assigned into four groups explained above. Each implant was inserted in the medullary cavity of a femur from the intercondylar notch. After 2 weeks healing, animals were sacrificed and femora were harvested for micro-CT and histology analysis.

Micro CT analysis

X-ray imaging was performed by a micro-CT scanner (InspeXio; Shimadzu Science East Corporation, Tokyo, Japan) with a voxel size of 20 μ m/pixel. Tri/3D-Bon software (RATOC System Engineering Co. Ltd, Tokyo, Japan) was used to make a 3D reconstruction from the obtained set of scans. Out of the entire 3D data set, the region of interest (ROI) was defined as the 100 slices from 3 mm below the growth plate and limited to a semi-ring of 2.0 mm diameter from the implant axis. Bone volume within the region of interest was calculated.

Histological evaluation

To obtain non-decalcified sections, samples were dehydrated in ascending gradient of ethanol, and then embedded in polyester resin (Rigolac-70F, Rigolac-2004, Nisshin EM Co.,Tokyo, Japan). The sections at approximate 3 mm below the growth plate were cut (Exakt, Mesmer, Ost Einbeck, Germany) in the horizontal direction and ground to a thickness of about 200 μm . The sections were finally stained with 0.1% toluidine blue, and observed under a light microscope. Bone implant contact (BIC) was quantified by a computer image analyzer (Image J, National Institute of Health, U.S.A).

Measurement of mineral apposition rate (MAR)

Inter label distance was measured (Image J, National Institute of Health, U.S.A) and the value was divided by the time interval (7 days) between administrations of two vital markers.

Bacteria growth

Bacteria were cultured on the samples with different amount of ZOL, and analyzed with the Live/Dead BacLight bacterial viability kit.

結果 (Results) :

Micro-CT analysis revealed considerable difference among different groups (Fig. 1). Low dosage (0.5 $\mu\text{g}/\text{implant}$) and medium dosage (2 $\mu\text{g}/\text{implant}$) groups had striking effects on increasing the peri-implant bone volume when compared with the control group ($p < 0.05$). By contrast, the high dosage group (10 $\mu\text{g}/\text{implant}$) could not induce a greater restoration in the bone volume.

In all the histological sections, no delamination of the HA coating was noted. The low dosage (0.5 $\mu\text{g}/\text{implant}$) and medium dosage (2 $\mu\text{g}/\text{implant}$) groups showed significantly higher BIC than the control and high dosage (10 $\mu\text{g}/\text{implant}$) groups (Fig 2). Furthermore, the MAR in The low dosage (0.5 $\mu\text{g}/\text{implant}$) was also significantly higher than those of other groups (Fig 3.)

考察 (Discussion and conclusions) : The results indicated that the ZOL released from the sputtered HA coating stimulated peri-implant bone formation at relatively low dose (0.5 μg and 2 μg), which is even less than the previous study by using plasma spray HA coating. This might be due to the small crystallite size (around 100nm) of the sputtered thin film HA, which was supposed to increase the effectiveness of ZOL absorption. Furthermore, the bacterial adhesion to the HA implant was not affected by the application of ZOL. A long-term in vivo study should be performed to test coating degradation.

参考文献 (References) :

1. Wermelin K et al., Acta Orthopaedica 2007; 78:385-392.
2. Peter B et al., J Biomed Mater Res A 2006; 76:133-143.
3. Kangasniemi I et al., J Biomed Mater Res 1994;28:563.
4. Ozeki K et al., Biomed Mater Eng 2003;13:451.

Fig 1. Bone volume ($10^8 \mu\text{m}^3$)

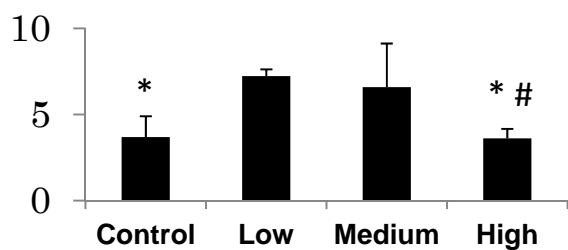


Fig 2. Bone implant contact (%)

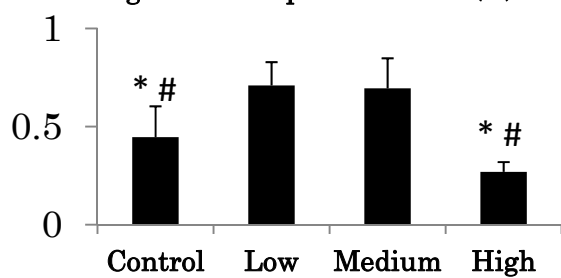
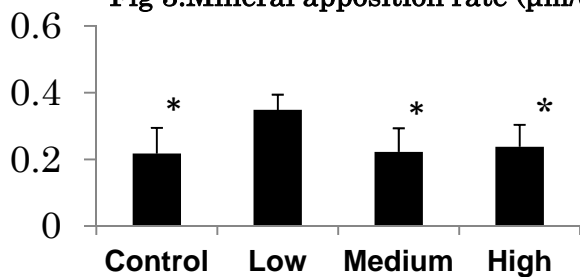


Fig 3. Mineral apposition rate ($\mu\text{m}/\text{day}$)



Data was expressed as mean \pm SD (n=3).

* $p < 0.05$ vs. low dosage group;

$p < 0.05$ vs. medium dosage group (One way ANOVA-LSD test).

注： This study was presented in the バイオインテグレーション学会・第2回学術大会 and ISTA 2011 Annual Congress. The preliminary data of the present study was published in J Mater Sci Mater Med. 2011 Jun;22(6):1489-99. Epub 2011 May 13.

作成日：2012年2月28日

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2012 年 3 月 23 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研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 裴麗瑩

指導責任者名： 奥野 純子

所属部署名： 筑波大学大学院 人間総合科学研究科

所在地： 茨城県つくば市

電話： +81-29-853-3496 内線： 3496



1. 助成金額： 60万 円

2. 研究テーマ

中国吉林省都市部の朝鮮民族と漢民族の老老介護世帯における生活の質に影響する要因に関する研究。

3. 成果の概要

中国吉林省長春・延吉両市の高齢者世帯の実態をとり、朝鮮民族と漢民族の民族による生活の質の違いやこれに関連する要因を明らかにしました。

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・ (学会名・演題)

学会名：「第70回 日本公衆衛生学会」ポスター発表


演題：「中国東北部朝鮮族と漢族の老老介護世帯における生活の質と民族間の介護負担感の影響要因に関する研究」

(2)発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

5. 指導責任者の意見(指導責任者がご記入・ご捺印ください)

ハイレイエイさんは、調査研究に熱心であり、中国吉林省の高齢者宅を訪問しデータを集めてきました。高齢者世帯の実態を知り、今後の中国の民族による生活の質の違いやそれに関連する要因を明らかにしました。今後さらに研究を進めて行くことで、一人っ子世代の高齢者介護への一助となることを確信します。

指導責任者署名

奥野純子 

収支報告

-日中医学協会助成事業-

**中国吉林省都市部の朝鮮族と漢族の
老老介護世帯における生活の質に影響する要因に関する研究**

研究者氏名：裴 麗瑩
所属機関：日本筑波大学大学院
指導責任者：講師 奥野 純子
共同研究者名：柳 久子、権 海善

要 旨

目的：朝鮮民族と漢民族の要介護高齢者の生活状況と健康関連 QOL および介護負担感に影響する要因を明らかにし、少数民族の老老介護世帯への支援のあり方を検討すること。 **方法：**対象は中国吉林省の長春・延吉 2 市在住の 60 歳以上の老老介護世帯 112 組。朝鮮民族 51 組 (45.5%) と漢民族 61 組 (54.5%) である。調査方法は横断研究であり、要介護者には面接聞き取り調査、介護者には自記式質問紙を用いて実施した。調査項目：要介護者は一般属性、障害高齢者の日常生活自立度、認知機能、周辺症状 (7 項目)、ADL、ソーシャルサポート等を調査し、主介護者には一般属性、障害高齢者の日常生活自立度、認知機能、生活満足度、生活の質、介護負担感、ADL、ソーシャルサポート等を調査した。分析は SPSS17.0 を用い、連続変数の平均値の比較には t 検定、正規分布していない順位尺度の場合は Mann-Whitney の U 検定を行い、相関関係には Spearman の順位相関関係を用いた。有意水準は $p < .05$ とした。 **結果：**両民族の生活の質に影響する共通要因として経済要因が一番著しかった。また朝鮮民族は生活の質は主に睡眠状況と関連があり、漢民族は経済要因、教育レベル、施設入所の考え方等との関連が見られた。 **討論：**朝鮮民族と漢民族は同じ国籍、同じ地方に住んでいるにも関わらず、民族間の伝統・習慣・文化等の考え方によって生活の質と介護負担感に影響する要因は多少違うことが明らかになった。

Key words：高齢者、生活の質、介護負担感、中国、吉林省

緒 言：

近年、中華人民共和国 (以下、中国) は急激な高齢化、少子化、核家族化 が進んでおり、「中国人口普查」によると 2010 年まで 65 歳以上の人口が 8% を超えており、高齢者か社会となっている¹⁾。一人っ子政策で親になった世帯が高齢者となる 2026 年には、高齢者人口が 14% を高齢社会になると推測されている²⁾。中国の伝統的な思想として儒教思想が挙げられるが、高齢者扶養についても「孝行」と言う道徳観・家族観によって支えられていた。さらに一人っ子政策を国策として推進して以来、一人っ子が老祖母四人という老親を扶養しなければならない「四二一総合症」が発症し、事態を複雑・深刻にしている³⁾。しかし、中国で都市部民族間の違いによる生活質に関する研究は少ない。本研究は、中国東北地方の吉林省で主に老老介護世帯の高齢介護者の生活の質に着目し、家族介護を維持することにどんな困難を感じているのか、また生活の質に関連要因を明らかにすることを目的とした。

対象と方法：

1. 対象

調査期間は 2009 年 7 月から 2012 年 1 月まで、対象者は中国吉林省の長春・延吉 2 市在住の 60 歳以上の老老介護世帯 112 組、朝鮮民族 51 組 (45.5%) と漢民族 61 組 (54.5%) とした。

質問紙は無記名とし、コミュニティーの老人会などの場で対象者情報を集め、実施分担者裴麗瑩 (PEI LIYING) が家庭訪問をし、インタビュー調査を行った。回答の拒否や中断は随時可能であることを書面で説明し、質問紙の回答を持って同意とみなした。筑波大学人間総合科学研究科・研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

選択基準は地域の高齢者担当者に紹介された後、基準を満たし、本人同意を得た者

除外基準は 1) コミュニケーションが取れない者、2) 認知機能が低い者、3) 60 歳未満者とした。

2. 調査方法

調査方法は横断研究であり、要介護者には面接聞き取り調査、介護者には自記式質問紙を用いて実施した。

障害高齢者の日常生活自立度判定基準を用い、ランク A1~ランク C2 まで属する何らかの障害を有する者を要介護者として定義し、一般属性、障害高齢者の日常生活自立度、認知機能(認知症高齢者日常生活自立度判定基準)、周辺症状(7項目)、ADL、ソーシャルサポート等を調査した。主介護者は一般属性、施設入所の考え方、障害高齢者の日常生活自立度、認知機能、生活満足度(VAS)、生活の質(健康関連 QOL<SF-8>スタンダード版)、介護負担感(Zarit 介護負担尺度 22 項目版)、ADL (Barthel Index);、ソーシャルサポート等を調査した。

健康関連 QOL を測定する SF-8 スタンダード版は 8 つの項目からなり、健康の 8 次元(身体機能、日常役割機能(身体)、体の痛み、全体的健康感、活力、社会生活機能、日常役割機能(精神)、心の健康)にそれぞれ 1 項目ずつ振られている。健康の 8 次元と身体的・精神的サマリースコアの得点を算出できる⁴⁾。

3. 分析方法

分析は SPSS17.0 を用い、連続変数の平均値の比較には t 検定、正規分布していない順位尺度の場合は Mann-Whitney の U 検定を行い、相関関係には Spearman の順位相関関係を用いた。有意水準は $p < .05$ にした。

結 果

1. 対象者特性 (表 1、表 2)

表 1 要介護者特性

項目	全体 (n=112)	朝鮮民族 (n=51)	漢民族 (n=61)	P 値
年齢(歳)	71.1±6.5	74.9±7.8	73.3±7.8	
60~69 歳	39(34.8%)	16(31.4%)	23(37.7%)	
70~79 歳	43(38.4%)	20(39.2%)	23(37.7%)	Ns
80 歳以上	30(26.8%)	15(29.4%)	15(24.6%)	
性別(男)	72(64.3%)	37(72.5%)	35(57.4%)	*
疾患				
脳血管疾患	70(62.5%)	38(74.5%)	32(52.5%)	*
高血圧	51(45.5%)	21(41.2%)	30(49.2%)	Ns
心臓疾患	36(32.1%)	11(22.0%)	25(41.0%)	*
糖尿病	29(25.9%)	10(19.6%)	19(31.1%)	Ns
骨粗鬆症	12(10.7%)	0(0%)	12(19.7%)	**
高齢者のみ二人家族	72(66.1%)	31(62.0%)	41(69.5%)	Ns
夫婦	70(97.2%)	30(96.8%)	40(97.6%)	Ns
周辺症状(有)	64(57.1%)	33(64.7%)	31(50.8%)	
教育レベル(年)	7.9±5.3	9.0±4.6	7.0±5.6	
施設入所の考え方				
良い	22(21.6%)	10(20.8%)	12(22.2%)	
仕方ない	25(24.5%)	7(14.6%)	18(33.3%)	*
良くない	55(53.9%)	31(64.6%)	24(44.4%)	
障害自立 J1~J2	29(25.9%)	16(31.4%)	13(21.3%)	Ns

	A1～A2	41 (36.6%)	15 (29.4%)	26 (42.6%)	
	B1～C2	42 (37.5%)	20 (39.2%)	22 (36.1%)	
経済状況 以下	2000 元	40 (35.7%)	23 (45.1%)	17 (27.9%)	
	2000 元～4000 元	50 (44.6%)	22 (43.1%)	28 (45.9%)	*
	4000 元以上	22 (19.6%)	6 (11.8%)	16 (26.2%)	
介護最適者	配偶者	80 (76.9%)	45 (91.8%)	35 (63.6%)	**
着替え	介助が必要	28 (50.9%)	32 (62.8%)	25 (40.1%)	*
在宅生活継続意思	あり	99 (96.1%)	47 (97.9%)	52 (94.5%)	Ns
親族と距離	近くに住んでいる	73 (65.2%)	30 (58.8%)	43 (70.5%)	Ns
ADL (BI)		59.2±31.7	55.2±31.3	62.6±31.9	Ns

数値は平均値±SD, n(%), *p<0.05

表2 介護者特性

項目	全体 (n=112)	朝鮮民族 (n=51)	漢民族 (n=61)	P 値	
年齢(歳)	71.3±6.5	71.0±5.6	71.5±7.1		
60～69 歳	44 (39.3%)	19 (37.3%)	25 (41.0%)		
70～79 歳	57 (50.9%)	29 (56.9%)	28 (45.9%)	Ns	
80 歳以上	11 (9.8%)	3 (5.9%)	8 (13.1%)		
性別 (女)	75 (67.0%)	38 (74.5%)	37 (60.7%)		
疾患					
心臓疾患	46 (41.1%)	23 (45.1%)	23 (37.7%)	Ns	
高血圧	37 (33.0%)	16 (31.4%)	21 (34.4%)	Ns	
脳血管疾患	19 (17.0%)	13 (25.5%)	6 (9.8%)	*	
糖尿病	11 (9.8%)	3 (5.9%)	8 (13.1%)	Ns	
骨粗鬆症	7 (6.3%)	0 (0%)	7 (11.5%)	*	
教育レベル(年)	7.6±5.2	8.4±4.7	6.9±5.5		
介護時間					
3 時間未満	33 (29.5%)	8 (15.7%)	25 (41.0%)	*	
3 時間以上	79 (70.5%)	43 (84.3%)	36 (59%)		
介護最適者	配偶者	80 (69.6%)	46 (90.2%)	32 (54.1%)	**
健康状態	健康～普通	64 (57.1%)	21 (41.1%)	43 (70.5%)	*
やや不健康～不健康	48 (42.9%)	30 (58.9%)	18 (29.5%)		
夜間睡眠	不十分+殆ど眠れない	9 (36.6%)	22 (43.1%)	19 (31.1%)	*
ソーシャルサポート資源					
冠婚葬祭時介護代替者(無)	38 (33.9%)	30 (58.8%)	8 (13.3%)	**	
病気時介護代替者(無)	22 (19.6%)	18 (35.3%)	4 (6.8%)	**	
社会活動	積極的～時々参加	33 (29.5%)	16 (31.4%)	17 (27.9%)	
殆ど～全く参加しない	79 (70.5%)	35 (68.6%)	44 (72.1%)	*	
PCS-8	43.8±10.4	43.9±8.2	43.8±11.9		
MCS-8	49.9±8.8	51.0±7.8	49.0±9.5		
ZBI 総得点	32.2±17.7	33.9±16.5	30.7±18.6		

数値は平均値±SD, n(%), *p < 0.05, **p < 0.01

2. 民族における生活の質と生活満足との関連要因 (表3)

表3 民族における生活の質 (SF-8) と生活満足度 (VAS) との相関

項目	SF-8 身体的 サマリースコア		SF-8 精神的 サマリースコア		VAS ^{h)} 生活満足度	
	朝鮮 族 (n=51)	漢民族 (n=61)	朝鮮族 (n=51)	漢民族 (n=61)	朝鮮族 (n=51)	漢民族 (n=61)
要介護者状況						
年齢	-.111	-.381**	.364**	.020	.421**	.025
周辺症状 (総 数) ^{f)}	-.229	.058	-.176	.248	-.178	-.295*
障害自立度	.264	.056	-.344*	-.107	-.244	.172
認知度 ^{e)}	-.051	.094	-.259	-.253*	-.280*	-.138
教育歴 ^{a)}	-.239	.117	-.149	.288*	-.179	.136
経済状況	.181	.049	.319*	.292*	.413**	.338**
疾患数	-.115	.058	-.189	.248	-.385**	.203
主介護者状況						
年齢	-.111	-.304*	.364**	.227	.435**	.273*
教育歴 ^{a)}	.493*	.197	-.209	.112	.079	.053
疾患数	-	-.196	-.150	.119	-.150	.021
睡眠状況 ^{d)}	.181	.182	.319*	-.031	.282*	.007
ZBI ^{e)}	-.108	.171	-.525**	-.514**	-.439**	-.249
PCS ⁱ⁾	-	-	-	-	.133	.037
MCS ⁱ⁾	-	-	-	-	.379**	.475**
ADL (BI)	.406*	.298*	-.194	-.073	-.125	-.027

数値は Spearman の順位相関係数。*P<0.05, **P<0.01

a) 周辺症状：昼夜区別、妄想、徘徊、大声出す、暴力的、失禁、同じことをしつこく言う等一つでもあったら1点 b) 障害自立度：障害高齢者の日常生活自立度判定基準を用い、ランク J1～ランク C2 まで属する何らかの障害を有する者 c) 認知度：認知症老人の日常生活自立度 (認知度) の判定基準を用い I～M の中、完全自立を0点、Iを1点、II-a～b2点、III-a～b3点、IVを4点、Mを5点とした。d) 教育歴：教育された年数 d) 睡眠状況：5. 十分取れている 4. 取れている 3. まあまあ 2. 不十分である 1. 殆ど眠れない e) 経済状況：1. <1000元 2. 1000～2000元 3. 2000～3000元 3. 3000～4000元 4. ≥5000元 f) SF-8 尺度は、得点が高いほど良い健康状態を表す g) 介護負担感 は Zarit 介護負担尺度 (ZBI22 項目版) を用い「思わない：0点～いつも思う：4点」の5段階で評価し、点数が高いほど介護負担感が高い h) Visual Analogue Scale (VAS) で測定し、0 から 100 までの目盛りのもものさしを見ながら、点数をつける。 i) SF-8: 身体的サマリースコア (PCS: Physical component

summary):身体的健康を表す項目(身体機能、日常役割機能(身体)、体の痛み)であり、精神的サマリースコア(MCS: Mental component summary):精神的健康を表す項目(心の健康、日常役割機能(精神)、社会生活機能)である

考 察

両民族の場合経済状況は生活の質に影響する主な影響と見られたことから高齢者の老後生活の質を確保出来る社会からの援助が必要と考えられる。また介護負担感の上昇により生活の質の低下を齎すため介護のためのレスパイトが必要と考えられる。

朝鮮民族の場合、睡眠状況が生活の質に関連していた。このことは最適介護者を配偶者(90.2%)とする文化で、近隣に介護代替者もいなく、一人で夜間介護していたためではと推測される。

漢民族の場合は経済要因、教育レベル、施設入所の考え方、介護負担感等の要因が生活の質に影響していたことから経済発展に伴い、子供は仕事と介護の両立が難しく、子供が親の面倒を見る伝統的な考え方があり、葛藤を感じているのではないかと考えられる。

結 論

朝鮮民族と漢民族は同じ国籍、同じ地方に住んでいるにも関わらず、民族間の伝統・習慣・文化等の考え方によって生活の質と介護負担感に影響する要因は多少違うことが明らかになった。ということから、民族による適切な社会支援が必要だと考えられる。また、現在の中国の高齢者はまだ1979年からの一人っ子政策の影響は見られてないけど、これから、もっと家族介護力が低下して行くと推測される。

参考文献

- 1) 中国国家统计局編. 2010年第六次全国人口普查主要数居公報(第1号)、2011;4月
- 2) 陳 衛. 2005年から2050年までの中国の将来人口推計及び人口動態. 人口研究 2006;30(4):93-95
- 3) 「中国における高齢者ターミナルケア」周チン 著、2002;11月 50p

注:本研究は、2011年10月28日「第70回日本公衆衛生学会」にてポスター発表を行った。

作成日:2012年3月13日

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2012 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研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 高 靖

指導責任者名： 平田 雅人

所属部署名：九州大学大学院歯学研究院

所 在 地：福岡市東区馬出 3 - 1 - 1

電 話： 092-642-6321



職名：教授

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

新規分子 PRIP の開口分泌における役割の解明

3. 成果の概要

SNAP-25 (synaptosomal-associated protein 25) is a member of SNARE complex which is the minimal machinery for membrane fusion, the final step of regulated exocytosis. Phosphorylated SNAP-25 was dephosphorylated by protein phosphatase-1, whose activity was regulated by PRIP, thus regulating exocytosis. The results provide the first information regarding the phosphatases responsible for phospho-modulation of SNAP-25 and the regulation of exocytosis.

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・ (学会名・演題)

1. Roles of PRIP in phospho-regulation of exocytosis through the interaction with protein phosphatases. The 7th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientist, Ulsan, Korea, Feb 17-18, 2012.

2. Phospho-dependent modulation of exocytosis by PRIP.

The 10th JBS Biofrontier Symposium on New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine, Fukuoka, Japan, Nov 14-16, 2011.

3. Involvement of PRIP in exocytosis through phospho-dependent regulation of SNAP-25.

第 8 4 回日本生化学会大会、京都市、2011.9.

(2) 発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Fukuda, M. and Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) modulates synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) phosphorylation and exocytosis.

J Biol Chem. 287:10565-10578, 2012

5. 指導責任者の意見(指導責任者がご記入・ご捺印ください)

中国・河北医科大学を卒業後、来日し本学大学院博士課程を優秀な成績で終了した高靖は現在、当教室で助教として教育および研究に従事しています。幸運にも貴財団からの援助を得て、彼女は本研究を遂行することができました。学部学生教育や大学院生の実験指導も行いながら、着実に研究成果を重ねて学会発表のみならず原著論文を作製するまでなし得たのは彼女の弛まぬ努力と優れた才能の賜であると言えます。将来中国に帰国後も必ず中国における医学研究に貢献してくれるものと信じています。

指導責任者署名 平田 雅人



新規分子 PRIP の開口分泌における役割の解明

研究者氏名	高 靖
日本研究機関	九州大学大学院歯学研究院
指導責任者	教授 平田 雅人
共同研究者名	竹内 弘

要旨:

Exocytosis is one of the most fundamental cellular events. The basic mechanism of the final step, membrane fusion, is mediated by the formation of the SNARE complex, which is modulated by the phosphorylation of proteins controlled by the concerted actions of protein kinases and phosphatases. We have previously shown that a protein phosphatase-1 (PP1) anchoring protein, PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein), has an inhibitory role in regulated exocytosis. The current study investigated the involvement of PRIP in the phospho-dependent modulation of exocytosis. Dephosphorylation of SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25kDa) was mainly catalyzed by PP1 and the process was modulated by wild-type PRIP, but not by the mutant (F97A) lacking PP1-binding ability in *in vitro* studies. We then examined the role of PRIP in phospho-dependent regulation of exocytosis in cell-based studies using a pheochromocytoma cell line, PC12 cells, that secrete noradrenalin. Exogenous expression of PRIP accelerated the dephosphorylation process of phosphorylated SNAP-25 after forskolin or phorbol ester treatment of the cells. The phospho-states of SNAP-25 were correlated with noradrenalin secretion, which was enhanced by forskolin or phorbol ester treatment and modulated by PRIP expression in PC12 cells. Both SNAP-25 and PP1 were co-precipitated in anti-PRIP immunocomplex isolated from PC12 cells expressing PRIP. Collectively, together with our previous observation regarding the roles of PRIP in PP1 regulation, these results suggest that PRIP is involved in the regulation of the phospho-states of SNAP-25 by modulating the activity of PP1, thus regulating exocytosis.

Key words:

cAMP-dependent protein kinase, exocytosis, phospholipase C, protein phosphatase, SNARE

緒言:

Protein phosphorylation and dephosphorylation through activation of protein kinases and phosphatases play an important role in the regulation of exocytosis. Fewer studies regarding the phosphatases responsible for the phospho-regulation of exocytosis have been performed than those regarding kinases. Furthermore, the combination of specific substrate proteins implicated in exocytosis, specific kinase and phosphatase, and their regulation to modulate exocytosis are still unknown.

Phospholipase C-related, but catalytically inactive protein (PRIP) was originally identified in this laboratory as a novel D-*myo*-inositol 1, 4, 5-trisphosphate [Ins(1,4,5)P₃] binding protein, whose name was derived from the lack of catalytic activity in spite of the similarity to phospholipase C δ -1 (1-6). Further studies revealed that PRIP has a number of binding partners, including the catalytic subunit of protein phosphatase 1 α (PP1 α) and PP2A (7, 8), phosphorylated (active) form of Akt (9). Thus, PRIP is a unique molecule which associates with both multiple phosphatases and a kinase, suggesting that PRIP participates in the phosphoregulation of cellular events, by recruiting these enzymes to where the event occurs if PRIP can approach. We have recently reported that exocytosis of various peptide hormones such as gonadotropins and insulin was up-regulated in PRIP knock-out mice (10, 11), indicating that PRIP is likely to be involved in dense-core vesicle exocytosis in a negative manner. The molecular mechanisms underlying the inhibition of exocytosis by PRIP are currently being studied in the laboratory. In the present study, we investigated the possible involvement of PRIP in the phospho-regulation of exocytosis through modulation of the dynamics of protein phosphorylation.

研究方法:

Noradrenalin Secretion Assay: PC12 cells were labeled with [³H]noradrenalin (NA). The secretion of

[³H]NA was triggered with high-K⁺/PSS (81 mM NaCl, 70 mM KCl). The radioactivity of [³H]NA remaining in cells and secreted into the medium was measured by a liquid scintillation counter.

In vitro Phosphorylation and Dephosphorylation of SNAP-25: GST-tagged SNAP-25 was phosphorylated with [³²P]ATP using the catalytic subunit of PKA. The mixture was separated by SDS-PAGE, followed by CBB staining and autoradiography. For the dephosphorylation assay, GST-tagged SNAP-25 immobilized on glutathione beads was phosphorylated as described above, followed by de-phosphorylation by PP1, PP2A, or PP2B in an appropriate buffer solution. The radioactivity of released ³²P was counted using a liquid scintillation counter, and beads were analyzed by SDS-PAGE for CBB staining and autoradiography.

Labeling of PC12 Cells and Immunoprecipitation for Phosphorylation Assay: PC12 cells were labeled with [³²P]orthophosphate. After treating the cells with the substance of interest, cells were lysed and the cell extract were subjected to immunoprecipitation by anti-SNAP-25 antibody and the precipitates were examined by SDS-PAGE for autoradiography.

結果 :

Regulation of exocytosis by protein phosphorylation: We previously found that the absence of ATP after permeabilization of PC12 cells diminished Ca²⁺-triggered exocytosis (12), and this diminishment is assumed to be caused by the conversion of membrane PtdIns(4,5)P₂ to phosphatidylinositol phosphate and then phosphatidylinositol in the absence of ATP. We assumed that protein phosphorylation involved in exocytosis is also implicated in its regulation and it was confirmed using a protein phosphatase inhibitor, calyculin A, which partially rescued the diminishment by about 25 % (Data not shown). PtdIns(4,5)P₂ was not increased by calyculin A, although permeabilization decreased PtdIns(4,5)P₂ and incubation in the presence of ATP increased PtdIns(4,5)P₂ (Data not shown). The results clearly indicate that protein phosphorylation is involved in the regulation of exocytosis in a positive manner.

Dephosphorylation of SNAP-25: Many proteins important for exocytosis can be phosphorylated by various protein kinases. One of the most investigated SNARE proteins is SNAP-25, the phosphorylation of which has been previously reported to be catalyzed by both PKA and PKC to enhance exocytosis (13-16). Thus, we focused on the phospho-modulation of exocytosis *via* SNAP-25.

GST-fused SNAP-25 was phosphorylated by the catalytic subunit of PKA using [³²P]ATP (Fig. 1A), which was subjected to measuring phosphatase activity of the catalytic subunit of PP1, PP2A or PP2B. PP1 caused the release of ³²P from GST-SNAP-25 in a dose-dependent manner, and PP2A also catalyzed the release but to a lesser extent, whereas PP2B showed no activity (Fig. 1B), indicating that SNAP-25 phosphorylated by PKA was mainly dephosphorylated by PP1 and to a lesser extent by PP2A *in vitro*.

We have previously shown that PRIP is a negative modulator of PP1 (7). PRIP binds to PP1 to inhibit the phosphatase activity. When PRIP-1 itself is phosphorylated by PKA at residue T94, PP1 could no longer associate with PRIP to be an active form. Thus, we examined the effect of PRIP on dephosphorylation of SNAP-25 by PP1. The release of ³²P from phosphorylated SNAP-25 was inhibited by the wild-type PRIP-1, but not by the mutant PRIP-1, whose residue Phe97 was replaced with Ala, lacking PP1 binding ability (7) (Fig. 1C). Dephosphorylation of SNAP-25 catalyzed by PP1 was not inhibited by previously phosphorylated PRIP-1 (Fig. 1D). The results indicate that PRIP could be involved in the modulation of the phospho-state of SNAP-25 through regulating the activity of PP1.

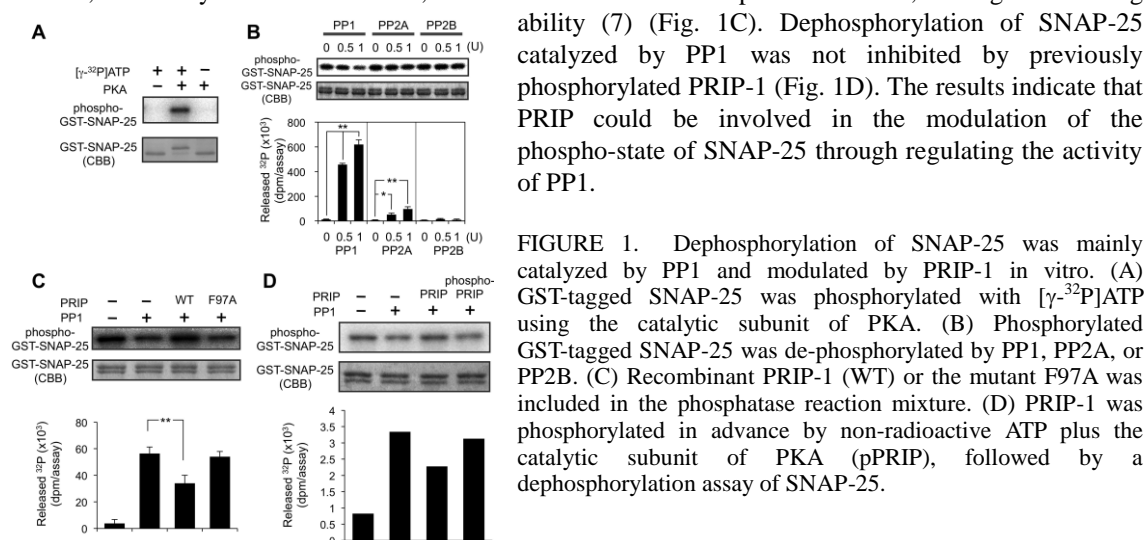
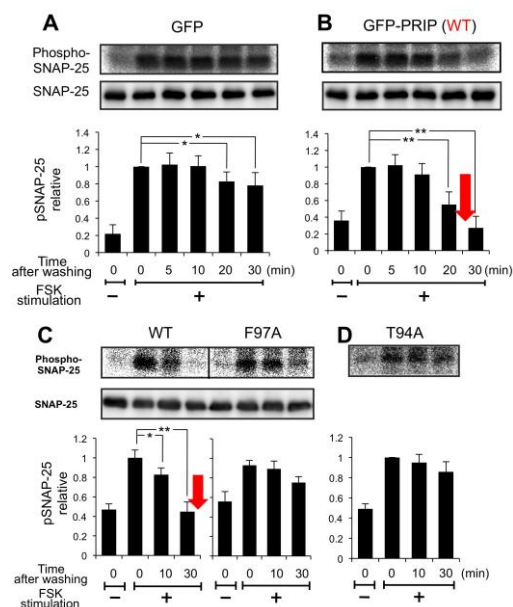


FIGURE 1. Dephosphorylation of SNAP-25 was mainly catalyzed by PP1 and modulated by PRIP-1 in vitro. (A) GST-tagged SNAP-25 was phosphorylated with [³²P]ATP using the catalytic subunit of PKA. (B) Phosphorylated GST-tagged SNAP-25 was de-phosphorylated by PP1, PP2A, or PP2B. (C) Recombinant PRIP-1 (WT) or the mutant F97A was included in the phosphatase reaction mixture. (D) PRIP-1 was phosphorylated in advance by non-radioactive ATP plus the catalytic subunit of PKA (pPRIP), followed by a dephosphorylation assay of SNAP-25.

Regulation of dephosphorylation of SNAP-25 by PRIP-1: We then examined the roles of PRIP in regulating the phospho-state of SNAP-25 in PC12 cells labeled with [³²P]orthophosphate. Forskolin treatment caused robust ³²P incorporation into SNAP-25, slowly decreasing for up to 30 min after the removal of forskolin (Fig. 2A). However, expression of wild type PRIP-1 (Fig. 2B), but not the mutant PRIP-1 (F97A; Fig. 2C), which lacks PP1 binding ability, or PRIP-1 (T94A; Fig. 2D), which is not phosphorylated and therefore keeps PP1 sequestered and inactivated, promoted the dephosphorylation process of SNAP-25. These results indicate that the dephosphorylation process of SNAP-25 catalyzed mainly by PP1 was accelerated by the presence of PRIP-1 in PC12 cells, and PP1 binding ability is required for PRIP to execute the role in regulating the dephosphorylation of SNAP-25.

FIGURE 2. Dephosphorylation of SNAP-25 was modulated in PC12 cells expressing PRIP-1. PC12 cells expressing GFP (A), GFP-PRIP-1 (WT) (B), GFP-RPIP-1 (F97A) (C) or GFP-PRIP-1 (T94A) (D) were labeled with [³²P]orthophosphate, followed by stimulation with 50 μM FSK for 5 min. After removing the stimulus, cells were left for the time period indicated. Phosphorylation of SNAP-25 was analyzed by immunoprecipitation followed by autoradiography and Western blotting.



Noradrenalin secretion induced by high-K⁺ from PC12 cells, which were treated similarly to the description in Figure 2, was also examined. As shown in Figure 3, the results indicate that PRIP-1 is involved in the regulation of NA secretion through modulating the dephosphorylation of some proteins important for exocytosis. This correlated with the regulation of the phospho-state of SNAP-25 by PRIP-1 through PP1 binding.

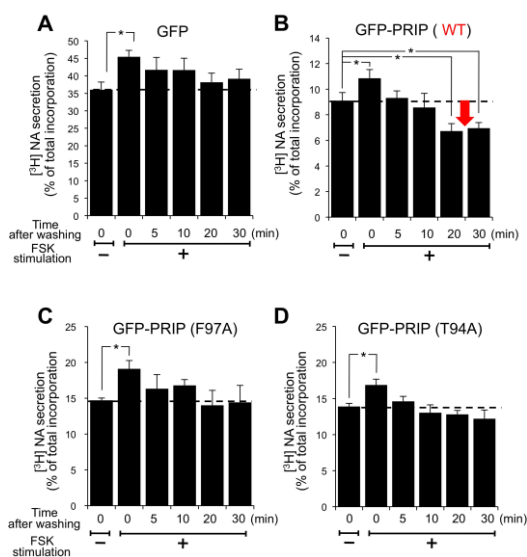


FIGURE 3. [³H]NA secretion was modulated by PRIP-1. PC12 cells expressing GFP (A), GFP-PRIP-1 (WT) (B), GFP-RPIP-1 (F97A) (C) or GFP-PRIP-1 (T94A) (D) were labeled with [³H]NA, followed by stimulation with 50 μM FSK for 5 min. After removing the stimulus, cells were left at room temperature for 5, 10, 20 or 30 min, followed by [³H]NA secretion assay with high-K⁺ solution for 5 min.

Complex formation of PRIP-1 with PP1 and SNAP-25 in PC12 cells: SNAP-25 is mainly localized at the plasma membrane, while PP1 exists throughout the cytosol in the cells, therefore PP1 needs to be recruited to the site where SNAP-25 is localized in order to function in exocytosis. To examine if PRIP helps PP1 to be recruited to the site where SNAP-25 is localized and exocytosis takes place, we performed a co-immunoprecipitation assay using PC12 cells expressing PRIP-1. As shown in the figure, SNAP-25 formed complex with PRIP-1, PP1 and syntaxin (Fig. 4A); however, PP1 was only co-precipitated with WT of PRIP-1, not with F97A (Fig. 4B). PC12 cells expressing either WT or T94A mutant of PRIP-1 were first treated with forskolin for 5 min to induce the phosphorylation of PRIP-1 probably along with SNAP-25, followed by immunoprecipitation by anti-PRIP-1 antibody. As shown in Figure 4C, forskolin treatment reduced the amount of PP1 immunoprecipitated with PRIP-1 from PC12 cells expressing WT, but not cells expressing T94A of PRIP-1, despite a similar amount of SNAP-25. These results support our

assumption that PRIP-1 recruits PP1 to SNAP-25 by the complex formation, probably along with syntaxin.

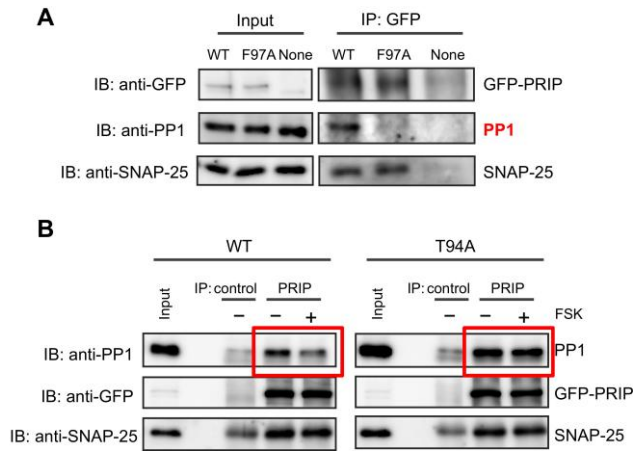


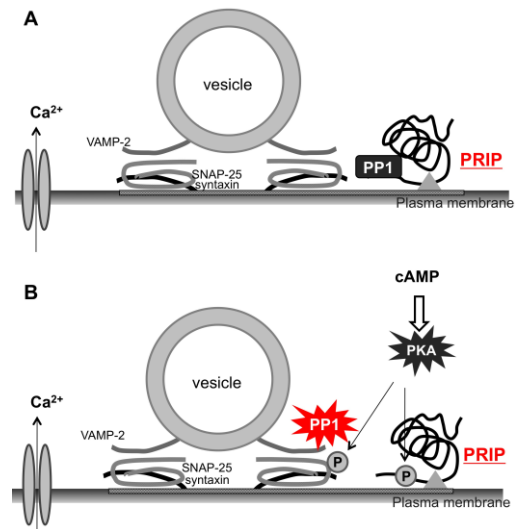
FIGURE 4. Interaction of PRIP-1, SNAP-25 and PP1 in PC12 cells. (A) PC12 cells expressing GFP alone (none) or GFP-PRIP-1 (WT) were subjected to co-immunoprecipitation assay using anti-SNAP25 antibody. (B) PC12 cells expressing GFP (none), GFP-PRIP-1 (WT) or GFP-PRIP-1 (F97A) were subjected to co-immunoprecipitation assay with anti-GFP antibody using an Seize X protein A Immunoprecipitation Kit. (C) PC12 cells expressing GFP-PRIP-1 (WT) or GFP-PRIP-1 (T94A) were first stimulated to phosphorylate PRIP-1 itself with FSK (50 μ M) for 5 min, followed by immunoprecipitation by anti-PRIP-1 antibody (PRIP). The immunoprecipitates were analyzed by Western blotting.

考察：

Collecting the data presented in this study, a model explaining that PRIP modulates the phospho-states of SNAP-25 and exocytosis is shown in Figure 5. PRIP recruits PP1 and PP2A to the site where t-SNARE proteins exist, but inhibits PP1 activity, probably with the aid of the PH and C2 domains (Fig. 5A). When the intracellular cAMP level is elevated or PKC is activated by cellular stimulation, PKA and PKC phosphorylate both SNAP-25 and PRIP. Following the phosphorylation of PRIP, PP1 is released to be active near SNAP-25; thus, PP1 can dephosphorylate SNAP-25 effectively to abolish the effect (Fig. 5B).

FIGURE 5. Schematic representation of the role of PRIP in phospho-dependent regulation of SNAP-25. (A) Basal condition, and (B) PKA or PKC activated condition (see DISCUSSION).

The current study showed the possible involvement of PRIP in PKA and PKC-dependent phospho-modulation of regulatory exocytosis by regulating the location and activities of protein phosphatases, PP1 and PP2A, using PC12 cells expressing PRIP-1. To our knowledge, there have been few studies regarding the de-phosphorylation (OFF) process of SNARE proteins for exocytosis compared to those regarding the phosphorylation (ON) process. For the first time, we here elucidated that PP1 is a major phosphatase responsible for the OFF process, which is regulated by PRIP. Further studies are clearly required using cells intrinsically expressing PRIP for a more physiological point of view. Other issues to be addressed are the role of PP2A binding of PRIP and the regulation of catalytic activity in phospho-dependent modulation of exocytosis, although the participation of PP2A appears to be reduced. Furthermore, other proteins of exocytosis, including syntaxin as a substrate, have been reported to participate in the phospho-dependent regulation of exocytosis (17,18). Whether PRIP modulates the phospho-states of these proteins should also be investigated to better understand the mechanism of the OFF process in the phospho-modulation of exocytosis.



参考文献：

1. Kanematsu, T., Takeya, H., Watanabe, Y., Ozaki, S., Yoshida, M., Koga, T., Iwanaga, S., and Hirata, M. (1992) *J Biol Chem* **267**, 6518-6525
2. Kanematsu, T., Misumi, Y., Watanabe, Y., Ozaki, S., Koga, T., Iwanaga, S., Ikehara, Y., and Hirata, M. (1996) *Biochem J* **313**, 319-325
3. Kanematsu, T., Yoshimura, K., Hidaka, K., Takeuchi, H., Katan, M., and Hirata, M. (2000) *Eur J Biochem* **267**, 2731-2737
4. Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., and Williams, R. L. (1996) *Nature* **380**, 595-602
5. Yoshida, M., Kanematsu, T., Watanabe, Y., Koga, T., Ozaki, S., Iwanaga, S., and Hirata, M. (1994) *J Biochem* **115**, 973-980
6. Uji, A., Matsuda, M., Kukita, T., Maeda, K., Kanematsu, T., and Hirata, M. (2002) *Life Sci* **72**, 443-453
7. Yoshimura, K., Takeuchi, H., Sato, O., Hidaka, K., Doira, N., Terunuma, M., Harada, K., Ogawa, Y., Ito, Y., Kanematsu, T., and Hirata, M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 17908-17913
8. Kanematsu, T., Yasunaga, A., Mizoguchi, Y., Kuratani, A., Kittler, J. T., Jovanovic, J. N., Takenaka, K., Nakayama, K. I., Fukami, K., Takenawa, T., Moss, S. J., Nabekura, J., and Hirata, M. (2006) *J Biol Chem* **281**, 22180-22189
9. Fujii, M., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K. I., Moss, S. J., Nabekura, J., and Hirata, M. (2010) *J Biol Chem* **285**, 4837-4846
10. Matsuda, M., Tsutsumi, K., Kanematsu, T., Fukami, K., Terada, Y., Takenawa, T., Nakayama, K. I., and Hirata, M. (2009) *Biol Reprod* **81**, 681-689
11. Doira, N., Kanematsu, T., Matsuda, M., Takeuchi, H., Nakano, H., Ito, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Hirata, M. (2001) *Biomed Res* **22**, 157-165
12. Gao, J., Takeuchi, H., Umebayashi, H., Zhang, Z., Matsuda, M., and Hirata, M. *Adv Enzyme Regul* **50**, 237-246
13. Nagy, G., Reim, K., Matti, U., Brose, N., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., and Sorensen, J. B. (2004) *Neuron* **41**, 417-429
14. Nagy, G., Matti, U., Nehring, R. B., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., and Sorensen, J. B. (2002) *J Neurosci* **22**, 9278-9286
15. Shu, Y., Liu, X., Yang, Y., Takahashi, M., and Gillis, K. D. (2008) *J Neurosci* **28**, 21-30
16. Iwasaki, S., Kataoka, M., Sekiguchi, M., Shimazaki, Y., Sato, K., and Takahashi, M. (2000) *J Biochem* **128**, 407-414
17. Risinger, C., and Bennett, M. K. (1999) *J Neurochem* **72**, 614-624
18. Dubois, T., Kerai, P., Learmonth, M., Cronshaw, A., and Aitken, A. (2002) *Eur J Biochem* **269**, 909-914

注：本研究は、2011年9月京都での「第84回日本生化学会大会」にて口演発表、2011年11月15日福岡での「The 10th JBS Biofrontier Symposium on New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine」にてポスター発表、2012年2月17日韓国で「The 7th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists」にて招待講演、「Journal of Biological Chemistry」(2012年3月 VOL287巻)に掲載。

作成日 2012年3月13日


財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

平成 23 年 6 月 20 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名： 祖父江 元 
所属機関名： 名古屋大学大学院医学系研究科
所属部署名： 神経内科学 職名： 教授
所 在 地： 名古屋市昭和区鶴舞町 65
電 話： 052-744-2385 内線：

1. 助成金額： 50,000 円

2. 会議名称・テーマ

東アジア神経学フォーラム

3. 会議の概要

平成 23 年 5 月 19 日に開催した東アジア神経学フォーラムでは、13:10-14:40 にキーノートセッション「Future Perspective of East Asian Neurology」を開催し、中国、韓国、日本の神経学会の現状と将来展望について、教育、研究、学会活動の観点から各々のプレゼンテーションと、それに引き続く討論を行った。被招聘者の Liying Cui 教授は中国神経学会の前会長として、中国の神経学の現状を紹介し、その問題点と今後の東アジアの神経学において果たす役割について講演を行った。

4. 被招聘者概要

- | | |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1. 被招聘者氏名： 崔 麗英 Liying Cui | 職名： 教授 Professor |
| 所属機関名：
Peking Union Medical College Hospital | 部署名：
Neurological Department |
| 2. 被招聘者氏名： | 職名： |
| 所属機関名： | 部署名： |
| 3. 被招聘者氏名： | 職名： |
| 所属機関名： | 部署名： |

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

平成 23 年 7 月 25 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名： 帖佐 徹
所属機関名： 聖マリア病院
所属部署名： 聖母の家 職名：施設長
所在地： 〒830-8543 福岡県久留米市津福本町 387-1
電 話： 0942-34-3573 内線：6005



1. 助成金額： ¥300,000 円

2. 会議名称・テーマ

アジア環境サーベイランスワークショップ

3. 会議の概要

詳細は別紙御参照下さい。

4. 被招聘者概要

- | | |
|------------------------------|------------|
| 1. 被招聘者氏名：張勇 Zhang Yong | 職名：副研究員 |
| 所属機関名：中国 CDC ウイルス研究所 | 部署名：ポリオ実験室 |
| 2. 被招聘者氏名：陶澤新 Tao Zexin | 職名：医師 |
| 所属機関名：山東省 CDC | 部署名：ポリオ実験室 |
| 3. 被招聘者氏名：鄭煥英 Zheng Huanying | 職名：主管技師 |
| 所属機関名：広東省 CDC 微生物病研究所 | 部署名：ポリオ実験室 |

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2011 年 11 月 18 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名：土井 由利子
所属機関名：国立保健医療科学院
所属部署名：疫学調査研究分野
所在地：埼玉県和光市南 2-3-6
電話：048-458-6148



職名：統括研究官
内線：

1. 助成金額： 100,000 円

2. 会議名称・テーマ

Sleep and Health Promotion & Policy among Asian Countries, Present and Future

3. 会議の概要

2011 年 10 月 15 日から 20 日にかけて京都国際会議場にて、世界睡眠学会、アジア睡眠学および日本睡眠学会の学術総会が開催され、国内外から約 2,700 名が参加した。上記シンポジウム（演者：中国 1 名、タイ 1 名、日本 1 名）で、Xuanwu Hospital の Sleep Center の Director でもある Professor Yuping Wang が、中国における睡眠障害の現状と健康施策について講演された。中国においても、近年、睡眠障害や睡眠不足を有する人々が増加しており、国・地方を挙げて積極的な取り組みを始めていることが報告された。睡眠に関する法律の制定、睡眠研究費の増大、国民への睡眠に関する啓発活動など示唆に富む講演内容であった。

4. 被招聘者概要

- | | |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1. 被招聘者氏名：Yuping Wang | 職名：Professor |
| 所属機関名：Xuanwu Hospital, Capital
Medical University, Beijing | 部署名：Department of
Neurology |
| 2. 被招聘者氏名： | 職名： |
| 所属機関名： | 部署名： |
| 3. 被招聘者氏名： | 職名： |
| 所属機関名： | 部署名： |

財団法人 日中医学協会


2011 年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2011 年 9 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金ご支援のご承諾をいただいて行った会議について報告いたします。

受給者氏名：

伊川 要 

所属機関名： 日本中医学協会

所属部署名：第 1 回日本中医学 職名：理事、実行委
術総会実行委員会 員長

所 在 地：東京都千代田区猿樂町 1-3-1、北村ビル 2 階、
東京中医鍼灸センター内

電 話：03-3293-8028 内線：

1. 助成金額： 金壹拾万(100,000.-)円

2. 会議名称・テーマ

第 1 回日本中医学協会学術総会、[総合テーマ]中医学の臨床への普及と科学的検証

3. 会議の概要

2011 年 9 月 3 日 13 時 00 分～17 時 00 分および 2011 年 9 月 4 日 9 時 00 分～17 時 30 分の 2 日間。大会の概要は同封の抄録に記された大会プログラムを参照のこと。

4. 被招聘者概要

1. 被招聘者氏名：趙吉平

職名：中医

所属機関名：北京中医薬大学東直門医院

部署名：東直門医院針灸科主任

2. 被招聘者氏名：

職名：

所属機関名：

部署名：

3. 被招聘者氏名：

職名：

所属機関名：

部署名：

2011年度共同研究等助成事業報告集

財団法人 日中医学協会

〒101-0032 東京都千代田区岩本町1-4-3

TEL:03-5829-9123 FAX:03-3866-9080

発行日 2012年4月

発行人 安達 勇