

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

平成 25 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 袁 博  
所属機関名： 東京薬科大学・薬学部  
所属部署名： 臨床ゲノム生化教室 職名： 助教  
所在地： 東京都八王子市堀之内 1432-1  
電 話： 0426765738 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

フラボノイド併用による三酸化ヒ素の新規抗がん作用に関する基盤的研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 袁 博	職名： 助教
所属機関名： 東京薬科大学・薬学部	部署名： 臨床ゲノム生化学教室
中国側研究者氏名： 胡 曉梅	職名： 教授
所属機関名： 中国中医科学院・西苑医院	部署名： 血液科

4. 当該研究における発表論文等

原著(\*:corresponding author, †: equal contributor)

1. Iriyama, N., Yuan, B<sup>†</sup>., Hatta, Y., Horikoshi, A., Yoshino, Y., Toyoda, H., Aizawa, S., Takeuchi, J., Granulocyte colony-stimulating factor potentiates differentiation induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide and enhances arsenic uptake in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. Oncol Rep. 28, 1875-1882 (2012).
2. Iriyama, N., Yuan, B<sup>\*</sup>., Yoshino, Y., Hatta, Y., Horikoshi, A., Aizawa, S., Takeuchi, J., Toyoda, H., Aquaporin 9, a promising predictor for cytotoxic effect of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cell lines and primary blasts.

Oncol Rep. (in press).

3. Hu, X.M., Tanaka, S., Onda, K., Yuan, B., Toyoda, H., Ma, R., Liu, F., Toshihiko, H., Arsenic disulfide induced apoptosis and concurrently promoted erythroid differentiation in cytokine-dependent MDS-progressed leukemia cell line F-36p with complex karyotype including monosomy 7. Chin J Integr Med. (in press).
4. Kikuchi, H., Yuan, B\*, Nishimura, Y., Imai, M., Furutani, R., Kamoi, S., Seno, M., Fukushima, S., Hazama, S., Hirobe, C, Ohyama, K., Hu, X.M., Hirano, T., Toyoda, H., Cytotoxicity of Vitex agnus-castus fruits extract and its major component, casticin correlate with differentiation status in leukemic cell lines. Chin Med. (Under review)
5. Yoshino, Y., Yuan, B\*, Aoyama, R., Murota, R., Moriyama, C., Sato, A., Toyoda, H., Enhanced cytotoxic effects of arsenite in combination with delphinidin against a human leukemia cell line, HL-60. Preparation.

著書

1. Yuan, B\*, Imai, M., Kikuchi, H., Fukushima, S., Hazama, S., Akaike, T., Yoshino, Y., Ohyama, K., Hu, X.M., Pei, X.H., Toyoda, H., Cytocidal Effects of Polyphenolic Compounds, Alone or in Combination with, Anticancer Drugs Against Cancer Cells: Potential Future Application of the Combinatory Therapy. Ed. by Tobias M. Ntuli. Apoptosis and Medicine. InTech. Rijeka, 2012, pp. 155-174.

## フラボノイド併用による三酸化ヒ素の新規抗がん作用に関する基盤的研究

研究者氏名	助教 袁 博
日本所属機関	東京薬科大学薬学部
中国研究者氏名	教授 胡 曉梅
中国所属機関	中国中医科学院西苑医院

### 要 旨

骨髓性白血病細胞 HL-60 および急性前骨髄球性白血病(APL)細胞 NB4 に対するデルフィニジン(Del)と三酸化ヒ素( $As^{III}$ )の単独および併用効果について検討した。Del が両細胞に濃度依存的に細胞毒性を誘導したが、健常者由来末梢血単核球(PBMCs)の増殖に殆ど影響を与えなかった。Del と  $As^{III}$  の併用がそれぞれ単独処理より、 $As^{III}$  低感受性細胞 HL-60 のみならず、高感受性細胞 NB4 にもより強い殺細胞作用を示した。一方、PBMCs における両者の併用による殺細胞作用が顕著ではなかった。HL-60 に対する併用による殺細胞作用増強機構を検討したところ、それぞれの単独処理に比較し、両者の併用がミトコンドリア膜電位(MMP)の低下、Bid, caspase-9, -8 および-3 の活性化をより顕著に誘導した。さらに、Del がグルタチオン(GSH)枯渇剤である BSO(buthionine sulfoximine)と同様に細胞内 GSH 量を低下させた。興味深いことに比較的低濃度  $As^{III}$  に惹起された GSH の上昇が Del 存在下でコントロール以下まで低下した。また、Del が  $NF-\kappa B$ (nuclear factor- $\kappa B$ )活性を阻害したこと、 $NF-\kappa B$  阻害剤である JSH-23 および PDTC(pyrrrolibine dithiocarbamate)が Del と同様に、HL-60 に対する  $As^{III}$  の細胞毒性を増強したことが観察された。これらのことから、HL-60 における Del と  $As^{III}$  の併用による殺細胞作用増強機構に、ミトコンドリア障害に起因する caspase 活性化が関与するアポトーシスの誘導が密接に関係することが考えられた。さらに、Del が  $NF-\kappa B$  活性を抑制することにより、細胞内 GSH を低下させ、殺細胞増強機構に寄与することが示唆された。

**Key Words** フラボノイド、デルフィニジン、三酸化ヒ素、併用療法、HL-60

### 緒 言：

再発性・難治性 APL に優れた治療効果を示す  $As^{III}$  は、固形がん細胞を含む種々のがん細胞に殺細胞効果を発揮し、注目を集めている<sup>1,2)</sup>。一方、その臨床副作用である APL 分化症候群などが知られている。また、APL 以外のがん細胞の低感受性が  $As^{III}$  の臨床応用拡大を阻む要因の一つとなっている。フラボノイドの一種であるアントシアニジンは、有色性のフルーツ・野菜に豊富に含まれる化合物であり、がん細胞増殖を抑制することが報告され、ヒト由来正常細胞に対する低毒性も知られている。そこで、 $As^{III}$  の他のがん細胞への適応拡大を目的とし、 $As^{III}$  の殺細胞効果を維持・増強しつつ、投与量の減量、副作用の軽減をもたらす可能性のあるアントシアニジンの一種である Del (Fig. 1) について詳細な検討を行った。

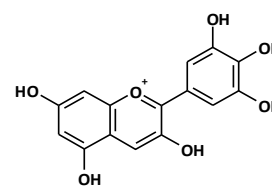


Fig. 1 Chemical structure of Del

### 対象と方法：

本研究では、HL-60、NB4 および PBMCs において、Del と  $As^{III}$  の単独および併用処理時に誘導される細胞増殖抑制は XTT 法で検討した。細胞周期は PI(propidium iodide)の核染色を用いた FACS 解析により検討した。ミトコンドリア膜電位(MMP)の低下は Rhodamine 123 を用いて検討した。アポトーシス誘導は Annexin V/PI 染色を用いた FACS 解析およびアガロースゲル電気泳動法により検討した。Bid, Bad, caspase-9, -8 および-3 の発現・活性化はウエスタンブロット(WB)法で検討した。細胞内 GSH の量は色素 MCB(monochlorobimane)を用いて検討した。 $NF-\kappa B$  の DNA 結合活性はゲルシフトアッセイにより評価した。尚、PBMCs を用いた研究は東京薬科大学倫理委員

会で認められており、健常者からインフォームドコンセントを得た。

## 結 果:

### I. Del による As<sup>III</sup> の細胞毒性の増強

1) 5 種類のアントシアニン (De1、マルビジン、ペオニジン、シアニジン、ペラルゴジニン) で HL-60、PMMCs を 48h 処理した。Table 1 で示したように、5 種類アントシアニンのうち、De1 が PMMCs の増殖に殆ど影響を与えず、HL-60 に最も強い殺細胞作用を示した。また、8.0 μM De1 が約 20% の細胞増殖阻害率を示した。

2) As<sup>III</sup> と Del 単独、あるいは併用で細胞を 48h 処理した。As<sup>III</sup> が濃度依存的に HL-60、NB4 および PMMCs に細胞毒性を示し、それぞれの IC<sub>50</sub> は 11.2、2.4、9.9 μM であった。さらに、8.0 μM De1 の共存下でそれぞれの IC<sub>50</sub> は 1.5、1.4、8.2 μM となった (Table 2)。また、最も併用効果が示されたのは、5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM De1 の併用だったので、併用による殺細胞作用増強機構を詳細に検討するために、5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM De1 を用いた。

**Table 1. IC<sub>50</sub> values for cytotoxicity induced by each anthocyanidin**

	HL-60	PBMCs
Delphinidin	10.9 μM	> 50 μM
Malvidin	25.4 μM	> 50 μM
Peonidin	29.5 μM	> 50 μM
Cyanidin	31.6 μM	> 50 μM
Pelargonidin	85.2 μM	> 100 μM

**Table 2. IC<sub>50</sub> values for cytotoxicity induced by As(III) alone and the combination of As(III) and Del**

Cells	Treatment	IC <sub>50</sub>
HL-60	As(III) alone	11.2 μM
	As(III) + delphinidin 8μM	1.5 μM
NB4	As(III) alone	2.4 μM
	As(III) + delphinidin 8μM	1.4 μM
PBMCS	As(III) alone	9.9 μM
	As(III) + delphinidin 8μM	8.2 μM

### II. 細胞周期に対する Del と As<sup>III</sup> の併用時の影響

1) HL-60 を 5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM Del の併用で 24、48h 処理したところ、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>/M 期の細胞数は、コントロールと比較して有意な変化が認められなかった。一方、Sub G<sub>1</sub> 期の細胞数は、コントロールと比較して顕著に増加した (Fig. 2)。

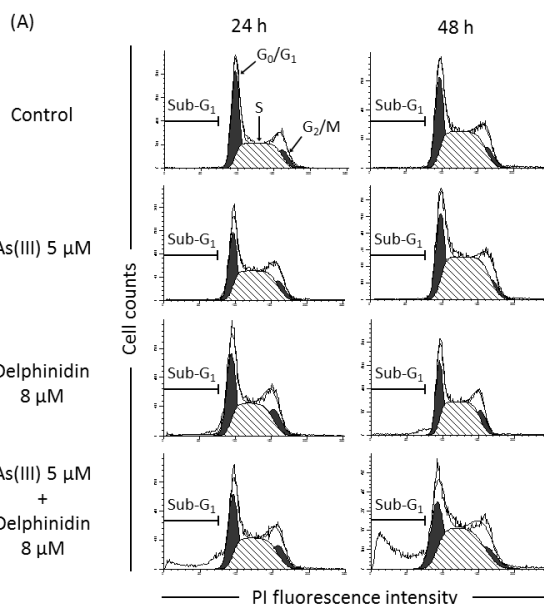
### III. MMP に対する Del と As<sup>III</sup> の併用時の影響

1) HL-60 を 5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM Del の単独、あるいは併用で 6h 処理したところ、Del 単独処理では MMP がある程度下がったが、As<sup>III</sup> 単独処理では MMP の低下が殆どなかった。また、それぞれ単独処理と比べ、併用処理では顕著な MMP 低下が認められた (Fig. 3)。

### IV. Del と As<sup>III</sup> の併用によるアポトーシスの誘導

1) HL-60 を 5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM Del の単独、あるいは併用で 12、24、48h 処理したところ、それぞれ単独処理では、わずかな DNA の断片化が確認されたが、併用では、明確な DNA の断片化が確認された (Fig. 4)。さらに、Annexin V/PI 染色を用いた FACS 解析により同様な結果が得られた。

2) HL-60 を 5.0 μM As<sup>III</sup> と 8.0 μM Del の単独、あるいは併用で 6、12、24h 処理した後、WB 法で Bid、Bad caspase-9、8、3 の活性化を検討した。それぞれ単独処理と比べ、両者の併用では処理 6h 後において、すべてのタンパク質



**Fig. 2 Effects of As(III) and Del, alone or in combination, on cell cycle in HL-60 cells.**

の活性化が観察された。また、caspase-9、8、3の活性化は処理12、24h後においても観察された。

### V. Delによる細胞内GSHの量の低下

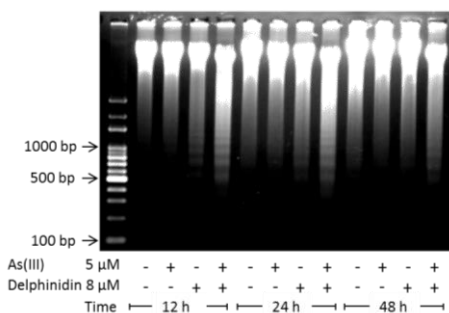
1) Delは、ポジコンのGSH枯渇剤であるBSOと同様に、有意にGSH量を低下させた。興味深いことに比較的低濃度のAs<sup>III</sup>によって上昇したGSH量がDelの存在下でコントロール以下まで有意に低下した(Fig. 5A)。

2) As<sup>III</sup>単独処理群と比べ、Del共存下の殺細胞作用増強効果と同様に、BSOも濃度依存的にAs<sup>III</sup>の殺細胞作用を増強させた(Fig. 5B)。

### VI. 細胞内GSH量の低下および殺細胞作用にNF-κB関与の可能性

1) HL-60細胞を5.0 μM As<sup>III</sup>と8.0 μM Delの単独、あるいは併用で、または、ポジコンとしてNF-κB活性阻害剤であるJSH-23、NF-κB活性化誘導剤であるTNF-αでそれぞれ48h処理した。NF-κB活性はDel単独処理では、JSH-23処理と同様に抑制された。また、As<sup>III</sup>単独処理によりNF-κB活性がある程度高まったが、Delの併用により顕著に低下した。これらの結果はFig. 5Aで示すGSHの結果と良く相関した。

2) JSH-23が濃度依存的にGSHの量が低下し、同時にJSH23との併用によりAs<sup>III</sup>の殺細胞作用は有意に増強された。同様な現象はNF-κB阻害剤であるPDTCにおいても観察された。

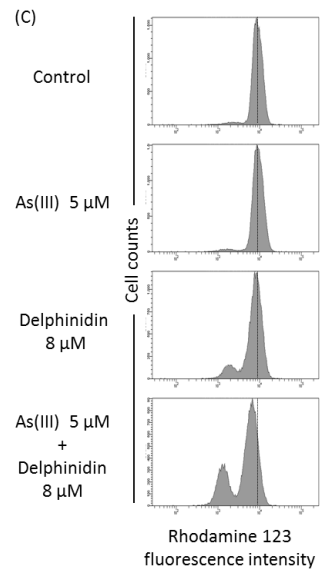


**Fig. 4 Apoptosis induction of As(III) and Del, alone or in combination, in HL-60 cells.**

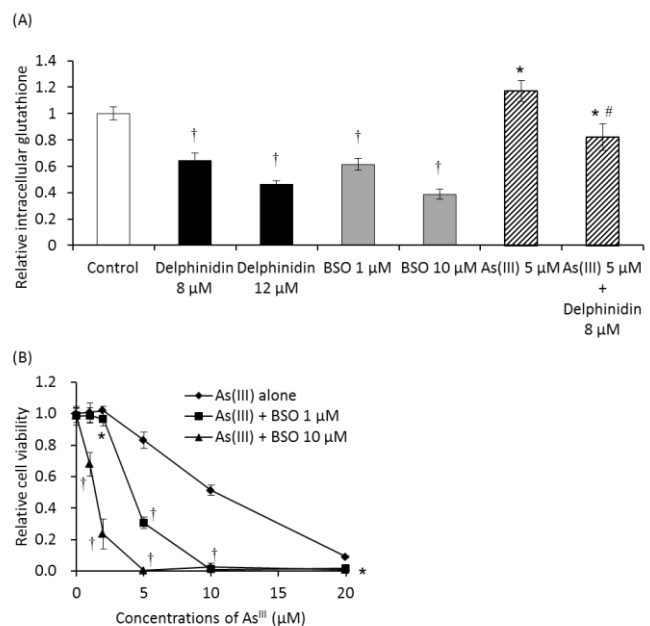
### 考察:

本論文に用いられた5種類のアントシアニジンのうち、DelがPBMCsの増殖に殆ど影響を与えないだけでなく、HL-60に最も強い殺細胞作用を示したことから、Delが腫瘍細胞選択的な殺細胞作用を有することが示唆された。NB4細胞と比べ、HL-60細胞がAs<sup>III</sup>に対する低感受性であることが知られている<sup>3)</sup>。本研究において、HL-60およびNB4細胞におけるAs<sup>III</sup>のIC<sub>50</sub>はそれぞれ11.2と

2.4 μMであったことから、NB4よりHL-60はAs<sup>III</sup>の低感受性細胞であることが改めて確かめられた。興味深いことに、8 μM Delの共存下で、As<sup>III</sup>に対するHL-60のIC<sub>50</sub>は11.2 μMから1.5 μMとなった。また、1.5 μM As<sup>III</sup>と



**Fig. 3 Loss of MMP in HL-60 cells treated with As(III) and Del, alone or in combination.**



**Fig. 5 Contribution of Del-induced reduction of GSH content to enhanced cytotoxic effects of As(III) in combination with delphinidin in HL-60 cells.** (A) After treatment with Del, BSO, As(III), alone or in combination for 48 h, the alteration of GSH was investigated. \*,  $p < 0.05$  and †,  $p < 0.001$  vs. control; #,  $p < 0.05$ , As(III)-alone vs. As(III)+Del. (B) After exposure to various concentrations of As(III) in the presence or absence of BSO for 48 h, cell viability of HL-60 was determined. \*,  $p < 0.05$  and †,  $p < 0.001$ , As(III)-alone vs. As(III)+BSO (1 or 10 μM).

いう濃度は臨床上で到達できる濃度であり、十分な治療効果が期待できると報告されている<sup>2,4)</sup>。さらに、この併用はPBMCsより、むしろHL-60、NB4をより効率良く殺細胞作用を示すことから、今後難治性がん治療へのAs<sup>III</sup>とDe1の臨床応用の可能性が考えられた。今現在、臨床上の効果については、共同研究者の胡先生が進めているところである。

As<sup>III</sup>とDe1の併用が細胞周期に影響を与えず、顕著にMMPの低下、caspasesの活性化、DNAの断片化を誘導したことから、ミトコンドリア障害に起因するcaspases活性化が関与するアポトーシスの誘導が殺細胞増強機構に大きく寄与することが示唆された。また、興味深いことに、Bidの活性化が観察されたことから、intrinsic pathwayとextrinsic pathwayのcross talkがアポトーシス誘導に関与する可能性が示唆された。

GSHは亜ヒ酸と抱合体の形成や酸化ストレスの除去を通じて、亜ヒ酸の抵抗性に大きく寄与することが知られている。本研究では、5 $\mu$ Mと比較的低濃度As<sup>III</sup>はGSH量を増加させ、この増加がHL-60のAs<sup>III</sup>耐性に寄与している可能性が考えられた。また、De1がGSH枯渇剤であるBS0と同様に、GSH量を減少させただけでなく、比較的低濃度As<sup>III</sup>に惹起されたGSH上昇を是正した。さらに、De1がNF- $\kappa$ B阻害剤であるJSH-23と同様に、NF- $\kappa$ Bの活性を阻害した。NF- $\kappa$ Bは細胞内GSH量の調節に重要な役割をしていることが報告されている<sup>5)</sup>。以上ことから、De1がNF- $\kappa$ B活性を抑制することにより、細胞内GSHを低下させ、殺細胞増強機構に寄与することが示唆された。本研究成果がDe1とAs<sup>III</sup>の併用がHL-60のAs<sup>III</sup>感受性を増大させ、がん治療へのAs<sup>III</sup>の応用拡大につながる有用な知見を与えると思われる。

これまでに、私たちはトランスポーターであるAQP9がAs<sup>III</sup>の細胞毒性、治療効果に大きく関与することを報告した<sup>2,6,7)</sup>。この観点から併用時のAQP9の発現、細胞内ヒ素の蓄積を検討しているところである。

#### 参考文献：

- [1]. Litzow M.R., Arsenic trioxide, *Expert Opin. Pharmacother.* **9**, 1773-1785 (2008).
- [2]. Yuan B., Yoshino Y., Kaise T., Toyoda H., Application of arsenic trioxide therapy for patients with leukemia. Ed. by Sun Hongzhe. In *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*. John Wiley & Sons, New York, 2010, pp. 263-292.
- [3]. Rojewski M.T., Baldus C., Knauf W., et al., Dual effects of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation, *Br. J. Haematol.* **116**, 555-563 (2002).
- [4]. Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., et al., Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide, *N. Engl. J. Med.* **339**, 1341-1348 (1998).
- [5]. Peng Z., Geh E., Chen L., et al., Inhibitor of kappaB kinase beta regulates redox homeostasis by controlling the constitutive levels of glutathione, *Mol. Pharmacol.* **77**, 784-792 (2010).
- [6]. Yoshino Y., Yuan B., Kaise T., et al., Contribution of aquaporin 9 and multidrug resistance-associated protein 2 to differential sensitivity to arsenite between primary cultured chorion and amnion cells prepared from human fetal membranes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **257**, 198-208 (2011).
- [7]. Iriyama N., Yuan B., Yoshino Y., et al., Aquaporin 9, a promising predictor for cytotoxic effect of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cell lines and primary blasts, *Oncol Rep.* (in press).

#### 学会発表：

- [1] "EFMC-ISMIC 2012 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry" conference. Berlin, Germany. (2012.9.2-6)
- [2] "11th Meeting of Consortium for Globalization of Chinese Medicine" conference. Macau, China. (2012.8.20-23)

作成日：2012年3月10日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013 年 3 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：西岡 安彦

所属機関名：徳島大学大学院

所属部署名：呼吸器・膠原病内科学

所在地：徳島市蔵本町 3-18-15

電話：088-633-7127



職名：教授

内線：

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

Focal adhesion kinase 阻害薬を用いた肺線維症に対する分子標的治療の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：西岡 安彦

所属機関名：徳島大学大学院

中国側研究者氏名：文 富強

所属機関名：四川大学附属華西病院

職名：教授

部署名：呼吸器・膠原病内科学

職名：教授・主任

部署名：呼吸器内科

4. 当該研究における発表論文等

2013 年 6 月 22 日第 12 回肺サーファクタント研究会で発表予定

## Focal adhesion kinase阻害薬を用いた肺線維症に対する分子標的治療の開発

研究者氏名	教授 西岡 安彦
日本所属機関	徳島大学大学院
中国研究者氏名	教授・主任 文 富強
中国所属機関	四川大学附属華西病院

### 要 旨：

Focal adhesion kinase (FAK)は、インテグリンを介した細胞運動能や遊走能に関与する125kDaのチロシンキナーゼである。フィブロネクチンなどの細胞外基質からのシグナルを伝達するとともに、増殖因子レセプターからのシグナル伝達に関与する。マウス線維化肺においてFAK Y397がリン酸化されていることが確認されており、FAKリン酸化阻害は抗線維化効果を期待できる可能性がある。そこで我々はマウスブレオマイシン (bleomycin: BLM) 肺線維症モデルを用いてFAKチロシンリン酸化阻害薬TAE226の抗線維化効果を検討した。TAE226はヒトおよびマウス肺線維芽細胞のFAK Y397のリン酸化を抑制した。さらにTAE226は、肺線維芽細胞の増殖を用量依存性に阻害し、transforming growth factor (TGF)- $\beta$ によって増強されるコラーゲン産生と $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)発現を抑制した。*In vivo*実験の結果から、TAE226投与はマウスBLM肺線維症モデルにおける肺の線維化とコラーゲン産生を抑制した。Ki-67染色による検討結果から、TAE226処理は線維化肺において増殖している肺線維芽細胞の数を減少させることが明らかとなった。以上からFAKを標的としたアプローチは抗線維化療法として有効である可能性が示唆された。

**Key Words：**肺線維症、FAK、線維芽細胞、ブレオマイシン、チロシンリン酸化

### 緒 言：

Focal adhesion kinase (FAK)は、インテグリンを介した細胞運動能や遊走能に関与する125kDaのチロシンキナーゼである<sup>1,2)</sup>。フィブロネクチンなどの細胞外基質からのシグナルを伝達するとともに、増殖因子レセプターからのシグナル伝達にも関与する<sup>3)</sup>。がん細胞の遊走、浸潤、増殖に深く関与していることが報告されており、FAKを標的とした低分子阻害薬の開発が試みられている。既に動物モデルを用いた検討から、神経膠芽腫や卵巣がんに対するFAK阻害薬の抗腫瘍効果が報告されている<sup>4,5)</sup>。一方、マウス線維化肺においてFAK Y397がリン酸化されていることが確認されており<sup>6)</sup>、またtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ による線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化にFAKが介在しているとする報告がある<sup>7)</sup>。また、我々はCCN(CYR61、CTGF、NOV)ファミリーであるCCN6がインテグリンを介してFAK Y397をリン酸化することを報告している<sup>8)</sup>。以上から、FAKを介するシグナルが肺線維症において重要な役割を果たしている可能性があり、FAKリン酸化阻害は抗線維化効果を期待できる可能性がある。

### 対象と方法：

FAK阻害による抗線維化効果を検討するため、本研究においてはFAK阻害薬であるTAE226(ノバルティス社より供与)を使用した。C57BL/6マウス肺より作成した線維芽細胞株及びヒト肺線維芽細胞(MRC-5)を使用し、3H-TdR取り込み試験にて増殖反応を検討した。肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に及ぼす効果の検討は、TGF- $\beta$ にて誘導される $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)発現をWestern blottingで評価することで行った。また、肺線維芽細胞のcollagen I産生に及ぼす効果を同様にWestern Blotにて検討した。また、C57BL/6マウスのブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルを用いてTAE226の抗線維化効果の検討を



開始した。day1 に BLM(125mg/kg)を充填したポンプを C57BL/6 マウスの皮下に留置し、1 週間で持続皮下投与することで肺線維症モデルを作成した。day15~day28 に TAE226(30 mg/kg)を連日経口投与し、day29 に sacrifice したマウス右肺のヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて肺線維化スコア (Ashcroft Score) で検討した。また左肺は、Sircol collagen キットを用いてコラーゲン含量を定量した。さらに、Ki-67 に対する免疫染色を行いマウス線維化肺組織の中での増殖細胞をカウントした。

## 結果:

- 1) TAE226の肺線維芽細胞に対するFAK Tyr397のリン酸化抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞に対するTAE226のFAK Y397リン酸化抑制効果を検討した(図1)。その結果、TAE226は、5 $\mu$ M以上の濃度でFAK Y397のリン酸化を抑制した。

- 2) TAE226の肺線維芽細胞に対する増殖抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞およびMRC5細胞をPDGF(10 ng/ml)刺激下に培養し、TAE226の増殖能に及ぼす影響を検討した。その結果、TAE226は、C57BL/6マウス肺線維芽細胞に対しては3 $\mu$ M以上の濃度で、MRC5に対しては0.1 $\mu$ M以上の濃度で細胞増殖を抑制した。

- 3) TAE226の肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化および細胞外マトリックス産生に及ぼす効果

MRC5細胞をTGF- $\beta$ (5ng/ml)存在下で培養し、TGF- $\beta$ によって促進された $\alpha$ -SMAのおよびコラーゲン I 発現に対してTAE226が与える影響を検討した。TAE226はTGF- $\beta$ 刺激により促進された $\alpha$ -SMAおよびコラーゲン I の発現を濃度依存的に抑制した(図3)。

- 4) BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維症抑制効果
- BLM投与開始後、28日目の肺組織におけるAshcroft scoreの検討から、TAE226 30mg/kg/日の投与により、BLMにより惹起された肺線維化が有意に抑制されていることが組織学的に確認された(図4)。また、上記の肺組織をKi67染色にて評価した結果、BLM単独群と比較してTAE226投与群では特に肺間質に存在するKi67陽性細胞数が有意に減少しており、TAE226はin vivoにおいても肺線維芽細胞の増殖を抑制していることが確認された。

## 考察:

今回の検討からFAK阻害剤は肺線維芽細胞の増殖を抑制すること、さらには線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑

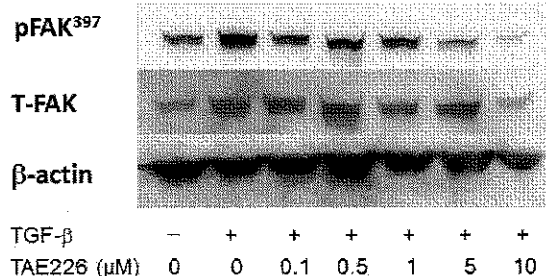


図1 TAE226の肺線維芽細胞に対するFAK Tyr397のリン酸化抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞をTGF- $\beta$ (10 ng/ml)および種々の濃度のTAE226存在下に24時間培養し、lysateを作成した。7.5%SDS-PAGE後に、抗FAKおよび抗リン酸化FAK(Y397)抗体を用いてWestern blottingで検討した。

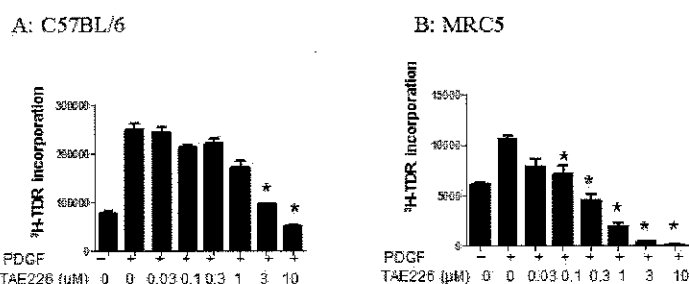


図2 TAE226の肺線維芽細胞に対する増殖抑制効果

C57BL/6マウス肺線維芽細胞(A)およびMRC5細胞(B)を、PDGF(10 ng/ml)存在下に54時間培養した。同時に種々の濃度のTAE226を添加した。その後1 $\mu$ Ciの<sup>3</sup>H-TdRを添加し、18時間培養後に測定し増殖能を算出した。\*P<0.05

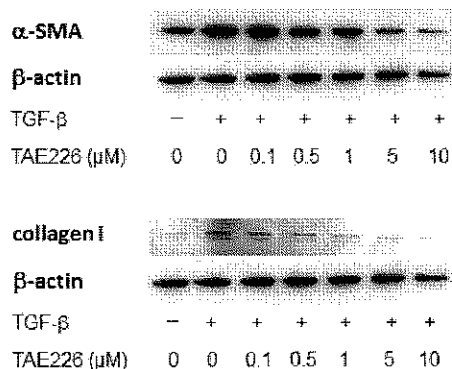
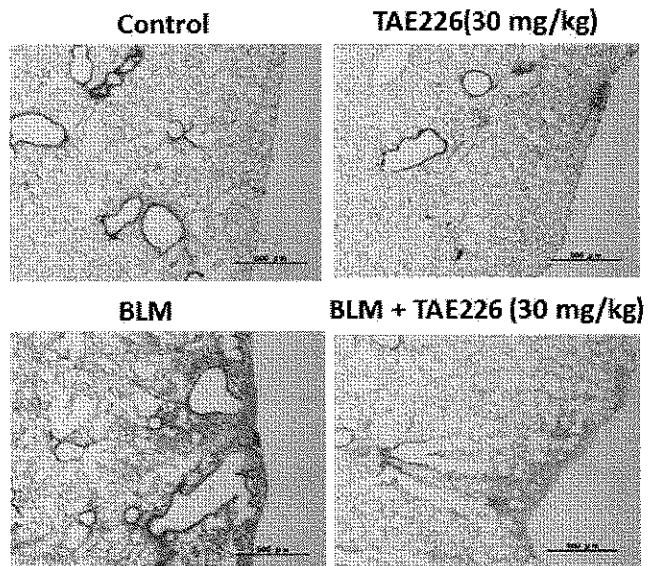


図3 TAE226の肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化および細胞外マトリックス産生に及ぼす効果

MRC5細胞を、TGF- $\beta$ (10 ng/ml)および種々の濃度のTAE226存在下に24時間培養し、lysateを作成した。7.5%SDS-PAGE後に、 $\alpha$ -SMAおよびコラーゲンIに対する抗体を用いてWestern blottingで検討した。

制することにより肺線維症に対する抑制効果を発揮することが確認された。BLM肺線維症モデルでは、FAK阻害剤は後半の2週間のみ投与されていることから、BLMで誘導される早期の炎症を抑制することによる抗線維化効果ではなく、恐らく直接肺線維芽細胞に作用することによって発揮された抗線維化効果であると思われる。現在FAK阻害剤は、がん分子標的治療薬として開発が進められているが、肺線維芽細胞増殖抑制作用、筋線維芽細胞への分化抑制作用、コラーゲン産生抑制作用を併せ持つことから、抗線維化薬としての応用も期待される。一方、TAE226については、IGF-1レセプターやインスリンレセプターに対する阻害作用があり、血糖値に影響を及ぼすことが報告されている。現在、さらにFAK特異的な阻害薬が開発されつつあり、今後このような第2世代のFAK阻害薬の抗線維薬としての可能性を検討することが重要と思われる。



**図4 BLM肺線維症モデルにおけるTAE226の肺線維化抑制効果**

C57BL/6マウスにBLM(125mg/kg)を投与し、肺線維症モデルを作製した。TAE226(30 mg/kg/day)は、day14よりday28まで連日経口投与し、day 28にH&E染色で肺線維化を検討した。

**参考文献：**

1. Schaller MD, et al., pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. Proc Natl Acad Sci USA 89: 5192-5196, 1992.
2. Hanks SK, et al., Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylation in response to cell attachment to fibronectin. Proc Natl Acad Sci USA 89: 8487-8491, 1992.
3. Sieg DJ, et al., FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nat Cell Biol 2: 249-257, 2000.
4. Liu T-J, et al., Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther 6: 1357-1367, 2007.
5. Halder J, et al., Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. Cancer Res 67:10976-10983, 2007.
6. Vittal R et al., Modulation of prosurvival signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury. Am J Pathol 166: 367-375, 2005.
7. Thannickal VJ et al., Myofibroblast differentiation by transforming growth factor- $\beta$ 1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. J Biol Chem 278: 12384-12389, 2003.
8. Batmunkh R et al., CCN6 as a profibrotic mediator that stimulates the proliferation of lung fibroblasts via the integrin  $\beta$ 1/focal adhesion kinase pathway. J Med Invest. 58(3-4): 188-96, 2011.

注：本研究は、2013年6月22日第12回肺サーファクタント研究会で発表予定

作成日：2013年 3月 12日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：秦 亮  
所属機関名：久留米大学医学部  
所属部署名：感染医学講座 職名：助教  
臨床感染医学部門  
所在地：福岡県久留米市旭町 6 7  
電 話：0942-31-7549 内線：



1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

中国上海市中病院における *Acinetobacter baumannii* の水平伝播及び薬剤耐性状況についての研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：秦 亮	職名：助教
所属機関名：久留米大学医学部	部署名：感染医学講座 臨床感染医学部門
中国側研究者氏名：胡必杰	職名：教授
所属機関名：复旦大学附属中山医院	部署名：感染性疾病科

4. 当該研究における発表論文等

研究データはまだ解析中であり、現在発表論文等はない。

## 中国上海市中病院における*Acinetobacter baumannii*の水平伝播及び薬剤耐性状況についての研究

研究者氏名	助教 秦 亮
日本所属機関	久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門
中国研究者氏名	教授 胡 必杰
中国所属機関	复旦大学附属中山医院 感染性疾病科

### 要 旨

近年、わが国でも多剤耐性アシネトバクター・バウマニ(MDRAB: Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*)が病院感染として問題視されるようになった。一方、中国において院内環境由来*A. baumannii*が高頻度で分離され、本菌による院内感染も報告されているが、情報はまだ不十分である。本研究において、*A. baumannii*の薬剤感受性や水平伝播の特徴などについての解析を行った。データの集計や解析などはまだ進行中であるが、現時点において、計41名の院内感染患者(男:31名,女:10名)から、50株の*A. baumannii*臨床株が分離された。また、院内環境調査も行い、計21株の*A. baumannii*環境由来株も分離された。患者の平均年齢は61歳(30-86歳)であり、うち21名の患者は基礎疾患を有し、5名が死亡した。死亡原因として、本菌との関連性は不明である。患者分離株のうち、35(70%)株は血液由来であり、5(10%)株は胸水または腹水由来であり、脳脊髄液及び肺組織からもそれぞれ1株が分離され、残りの8(16%)株は深部カテーテルから分離された。薬剤感受性試験の結果により、殆どの臨床株は多数の抗生剤へ耐性を示し、その内、16(32%)株は多剤耐性株(MDRAB)であることが示唆された。今までの結果により、中国の市中病院において、*A. baumannii*は院内感染を引き起す重要な病原菌の一種であることが明らかにとされた。また耐性株の割合は非常に高く、MDRABも高頻度で分離された。次のステップとして、薬剤感受性遺伝子の解析を行い、パルスフィールドゲル電気泳動法により、すべての分離株の水平伝播を調べる予定である。最後に我々は本研究を遂行する上で、多くの交流機会を設け、日中両国の相互理解を更に深めていくことを期待している。

Key Words *Acinetobacter baumannii*, 院内感染, 薬剤耐性, MDRAB, 水平伝播

### 緒 言 :

*Acinetobacter baumannii*は好気性のグラム陰性短桿菌であり、鞭毛を持たず不動性である。大きさは1.0~1.5 X 1.5~2.5  $\mu\text{m}$ であり、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、ブドウ糖を醗酵しない。2010年時点では、アシネトバクター属には少なくとも22の種名と11の遺伝型が確認されている。本菌名は1968年に微生物学者のPaul and Linda Baumann夫妻に由来する。1980年代に病原性を示す種として、*A. baumannii*が認知されるようになった。乾燥には比較的強く土壌など湿潤環境を好み、自然環境中に広く分布する。健康な人の皮膚や腸管にも存在することがあり、動物の排泄物からも分離されることがある。

近年、カルバペネムや第3世代セファロスポリン等の広域 $\beta$ -ラクタム薬、アミノ配糖体およびフルオロキノロンに広範囲の耐性を獲得したMDRABが報告され、日本感染症学会では、

ニューキノロン系のシプロフロキサシン (CPF) (>4 µg/ml)、カルバペネム系のイミペネム (IP M/CS) (>16 µg/ml)、アミノグリコシド系のアミカシン (AMK) (>32 µg/ml)の全てに耐性を示す菌株を、多剤耐性アシネトバクター (MDRA) と定義し、5類感染症の届け出の基準とされている。

癌末期や糖尿病など感染防御能力の低下した患者において、尿路感染症、肺炎や敗血症、手術部位感染症などの起原菌になっている。日本でも多数の病院や医療施設において、集団感染で本菌が注目を浴びつつあり、院内感染の重要な原因となることが認識されている。一方、中国において、院内環境由来*A. baumannii*が高頻度で分離され、本菌による院内感染も報告されている。しかし、病原菌である本菌の薬剤感受性や水平伝播の特徴及び重要な病原因子などについて、データはまだ不十分である。

#### 対象と方法：

中国・上海における市中病院（3施設程度）を訪問し、共同研究の合意を得た上で、共同研究プロトコールを作成した。2012年4月から、2013年3月までに、中国・上海における市中病院において、病院内感染患者及び病院内環境調査より、分離された*A. baumannii*を対象とし、計100株を目標数とした。

協力病院において、診療記録により*A. baumannii*が病原菌と考えられる感染症の患者を対象とし、ケースカードを作成し、分離された*A. baumannii*を保存する。また、前述の病院において、病院内環境調査も行い、同定された*A. baumannii*を保存し、すべての分離株は中山病院で保管する。環境及び患者由来の*A. baumannii*に対し、臨床上よく用いられる抗生剤への薬剤感受性試験を行う。薬剤耐性株に対し、薬剤耐性の特徴を分子生物学手法で確認し、日本で分離された耐性株と比較する予定である。パルスフィールド電気泳動法を用いて、特に耐性*A. baumannii*の水平伝播を明らかにする。基礎研究のデータを加え、患者ケースカードのまとめを行い、臨床経過および予後についての検討を行う。

#### 結果：

- 1) 現地での見学を行い、共同研究についての打合せをし、共同研究プロトコールを作成した。（図1）
- 2) 本研究において、一部の分離株の薬剤感受性についての解析を行った。データの集計や解析はまだ進行中であるが、現時点において計41名院内感染患者（男：31名、女：10名）から、50株の*A. baumannii*が分離された。患者の平均年齢は61歳（30-86歳）であり、うち21名患者は基礎疾患を有し、5人が亡くなった。死亡原因として、本菌との関連性は不明である。患者分離株のうち、35（70%）株は血液由来であり、5（10%）株は胸水または腹水由来であり、脳脊髄液及び肺組織からもそれぞれ1株が分離され、残りの8（16%）株は深部カテーテルから分離された（図2）。また、院内環境調査も行い、計21株の*A. baumannii*環境由来株も分離された。薬剤感受性試験の結果により、殆どの臨床株は多数の抗生剤へ耐性を示し（表1）、その内、16（32%）株は多剤耐性株（MDRAB）であることが示唆された。

#### 考察：

今までの結果により、中国の市中病院において、*A. baumannii*は院内感染を引き起す重要な病原菌の一種であることが明らかにとされた。また、耐性株の割合は非常に高く、MDRA Bも高頻度で分離された。次のステップとして、薬剤感受性遺伝子の解析を行い、パルスフ

イーロードゲル電気泳動法により、すべての分離株の水平伝播を調べる予定である。また、今回の調査結果に基づいて、中国における院内感染制御上有効な予防策についても検討する。研究結果は国内外での学会において発表し、かつ国際的雑誌に投稿し、フィードバックする。最後に我々は本研究を遂行する上で、多くの交流機会を設け、日中両国の相互理解を更に深めていくことを期待している。

#### 参考文献：

1. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53 (45): 1063-6. 2004
2. Rahal J. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2: S95-9. 2006
3. Visca P, Seifert H, Towner KJ. *Acinetobacter* infection--an emerging threat to human health. *IUBM B Life* 63 (12): 1048-54. 2011

図1 現地での見学及び共同研究の打合せ



図2 臨床分離株の内訳について

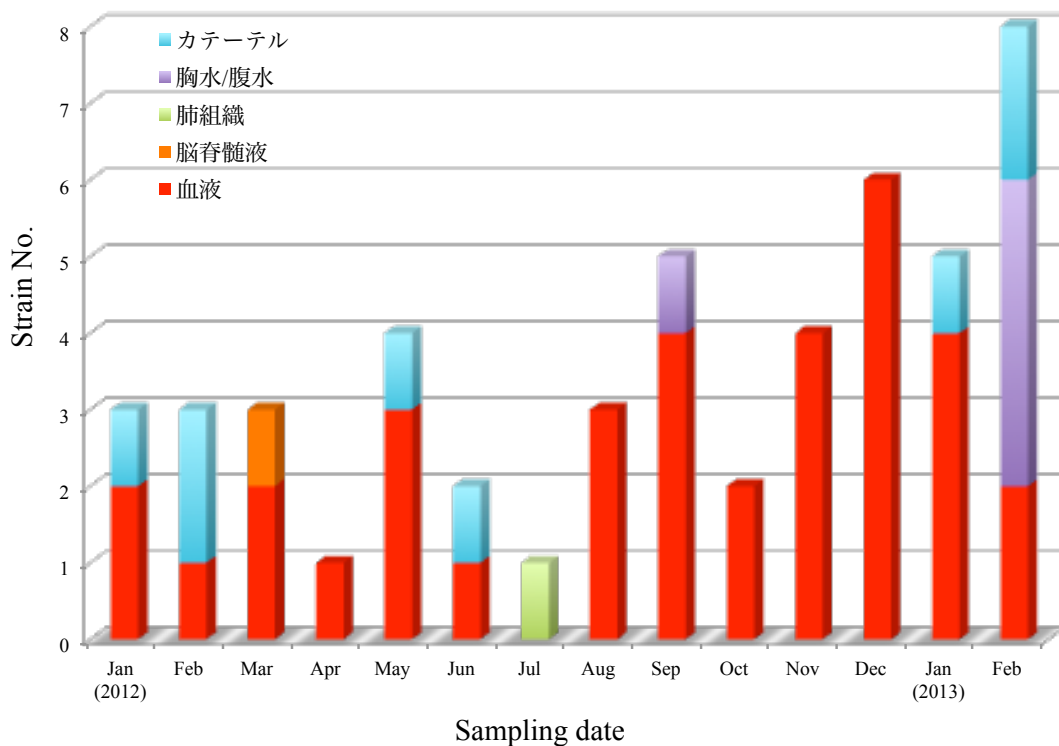


表1 一部臨床分離株の薬剤感受性試験の結果

	Antibiotics MIC <sub>50 (90)</sub>											(μg/ml)	
	AMK	GM	IPM	MEPM	CAZ	CTX	CFPM	PIPC	PL-B	ST	CPFX	LVFX	TC
All strains	>32(>32)	>8(>8)	>8(>8)	>8(>8)	>16(>16)	>32(>32)	>16(>16)	>64(>64)	<0.5(<0.5)	>2(>2)	>2(>2)	>8(>8)	>8(>8)

作成日：2013年3月15日

## 財団法人 日中医学協会


2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

平成 25 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 國 土 典 宏   
所属機関名： 東京大学  
所属部署名： 医学部附属病院 職名： 教授  
所 在 地： 東京都文京区本郷 7 - 3 - 1  
電 話： 03-3815-5411 内線： 33339

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

システムバイオロジー技術を駆使した肝細胞癌の病態制御機構の総括的解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 國 土 典 宏 職名： 教授  
所属機関名： 東京大学 部署名： 医学部附属病院  
中国側研究者氏名： 敖 平 職名： 教授  
所属機関名： 上海交通大学 部署名： システム生物医学研究院

4. 当該研究における発表論文等

(1). Zhong YS, Deng MH, Xu RY, Kokudo N, Tang W. Pseudomyxoma peritonei as an intractable disease and its preoperative assessment to help improve prognosis after surgery: A review of the literature. Intractable & Rare Diseases Research. 2012; 1:115-121.



(2). Song PP, Feng XB, Zhang KM, Song TQ, Ma KS, Kokudo N, Dong JH, Yao LN, Tang W.

Screening for and surveillance of high-risk patients with HBV-related chronic liver disease: Promoting the early detection of hepatocellular carcinoma in China.

Biosci Trends. 2013; 7:1-6.

(3). Xia JF, Gao JJ, Inagaki Y, Kokudo N, Tang W. Flavonoids as potential

anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line.

Drug Disco & Ther. 2013; in press.

## 5. 成果の概要

肝細胞癌特有の病態機構をターゲットとした診断技術や化学療法剤の開発が癌の早期発見や進行癌患者の予後改善に有効であると考え、DCP及びc-Metの臨床病理学的解析を実施し、両因子の発現性に関連性があることを示唆した。また、これらの因子の発現を蛍光で検出することで、高感度かつリアルタイムな診断技術、光線力学的治療技術への応用が可能であると考え、ICGを投与した移植癌モデルで検討を実施した。その結果、蛍光物質を利用した高感度診断及び光線力学的治療を検討する *in vivo* 解析系を構築できたと示唆される。

## 6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

本研究における中国側研究者の役割は、DCP及びc-Metの臨床病理学的解析を担当。中でも、両因子の発現性を評価する段階に従事した。さらに、システムバイオロジー技術を駆使した因子の発現評価システムの構築を試みた。

## システムバイオロジー技術を駆使した肝細胞癌の病態制御機構の総括的解析

研究代表者：國土 典宏

日本研究機関：東京大学医学部附属病院・肝胆膵外科学

中国側共同研究代表者：敖 平

中国所属機関：上海交通大学・システム生物医学研究院

**要旨：**肝細胞癌は、外科的切除術の発展などにより予後が改善しつつある癌疾患であるが、罹患者数の増加と進行癌患者に対する化学療法の開発が課題となっている。肝細胞癌の病態悪化にはDCPやc-Metといった特有の因子の関与が示唆されてきたが、臨床上の意義は十分に解明されていない。そこで、肝細胞癌特有の病態機構をターゲットとした診断技術や化学療法剤の開発が癌の早期発見や進行癌患者の予後改善に有効であると考え、DCP及びc-Metの臨床病理学的解析を実施し、癌の病態との関連性を検討した。その結果、DCP及びc-Metの高発現は癌部組織及び周辺非癌部組織の双方で検出された。また、両因子の高発現が同時に検出される症例が有意に高頻度であったことから、両因子の発現性に関連性があることが示唆された。また、これらの因子の発現を蛍光で検出することで、高感度かつリアルタイムな診断技術、光線力学的治療技術への応用が可能であると考え、ICGを投与した移植癌モデルで検討を実施した。肝細胞癌培養細胞由来の腫瘍組織を形成させたマウスにICGを投与したところ、腫瘍組織に集積するICGの蛍光を高感度かつ特異的に検出した。さらに、このICGを集積した腫瘍組織に近赤外光を照射したところ、腫瘍組織の拡大は有意に抑制された。従って、蛍光物質を利用した高感度診断及び光線力学的治療を検討する*in vivo*解析系を構築できたと示唆される。DCP及びc-Metの高発現と蛍光検出技術を融合させることにより、肝細胞癌の病態を評価可能な診断技術や進行した病巣に有効な治療技術の開発が期待される。

**キーワード：**肝細胞癌、c-Met、DCP、診断、治療

### 1. 導入

肝細胞癌は、世界的に罹患者数が増加しており、日本及び中国を含むアジア地域においては特に顕著である。外科的切除術の発展により肝細胞癌患者の予後は改善されつつあるが、癌患者の早期発見や進行癌患者に対する治療に関する技術はまだ開発途上にあり、手術不適応になった患者の予後は悪い状況にある。この臨床上の課題を克服するためには、肝細胞癌の病態機構を解明し、癌が進行する前の早期発見を可能とする診断技術や進行癌

患者の予後改善に貢献する化学療法の開発が求められる。

本研究グループでは、これまでに肝細胞癌に特有の病態機構に着目した臨床病理学的あるいは生化学的研究を実施してきた。肝細胞癌の診断マーカーとして知られるDes- $\gamma$ -carboxyprothrombin (DCP) が、癌部組織だけでなく周辺の非癌部組織でも発現し、その高発現が癌患者の予後の悪化と相関することを見出した。また、培養細胞を用いた基礎医学的研究では、DCPが癌細胞の増殖を促進させる活性をもつことを示し、その働きに癌細胞の細胞膜に発現する肝細胞成長因子受容体c-Metが重要な役割を果たすことを示唆した。従って、これらのタンパク質をターゲットとした診断技術の開発や治療薬の創出などが有効であると考えられた。

肝細胞癌組織を術中にリアルタイムで画像提示し、癌組織の大きさの分析や切除範囲の決定を可能とする技術が当研究グループによって開発された。その技術では、肝細胞癌細胞に取り込まれ、細胞内に長期的に維持されるIndocyanine green (ICG) という蛍光物質を用いている。その特性を利用して、癌組織を高感度に検出することを可能としている。一方、ICGが特定の波長をもつ近赤外光を吸収して熱を発することから、光線力学的な治療法の確立に有用であると考えられた。また、この蛍光標識技術を駆使して上述したDCPやc-Metをターゲットとした癌組織の描出法を構築することにより、癌の病態に基づく診断や治療技術の開発の可能性が期待された。そこで、本研究ではDCP及びc-Metの癌患者由来組織における発現性を組織化学的に解析して、これらの因子と癌の病態との関連性を検討した。そして、ICGを投与したマウス移植癌モデルを用いて、癌の診断及び治療における蛍光描出技術の有用性を*in vivo*の実験系で明らかにすることとした。

## 2. 方法

### 2.1 DCP 及び c-Met の発現性と臨床病理学的解析

肝細胞癌組織 153 例についてホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、抗 DCP 抗体あるいは抗 c-Met 抗体を用いた免疫組織化学的手法による解析を実施した。各種抗原の発現性は、癌部組織及び非癌部組織における局在性を観察すると共に、無作為に選出した 10 区域における陽性細胞の割合を算出して比較解析した。

### 2.2 蛍光ナビゲーションシステムによる肝細胞癌組織の描出

肝細胞癌培養細胞株HuH-7及びHepG2を10%牛血清含有Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地にて培養し、 $5 \times 10^6$ 個の細胞をBALB/cヌードマウスの皮下に移植した。約10日後、移植した癌組織が50~1000 mm<sup>3</sup>となったことを確認した後、ICGを5 mg/mLの濃度で尾静脈から血中投与した。24時間後、蛍光イメージングシステムを用いてICGの癌組織へ

の取り込みを観察した。

### 2.3 近赤外光照射

肝細胞癌培養細胞株HuH-7細胞をDMEM培地にて培養し、 $5 \times 10^6$ 個の細胞をBALB/cヌードマウスの皮下に移植した。約10日後、移植部位に腫瘍組織が形成されたことが確認できたマウスに対してICGを5 mg/mLの濃度で投与し、ICG投与から24時間後に蛍光発光を確認した。なお、同時にICGを投与しない移植癌マウスも作出した。これらのICG投与・非投与の移植癌マウスの腫瘍組織に対して $160 \text{ mW/cm}^2$ の光線密度で3分間近赤外光を照射し、その後3日おきに腫瘍組織の大きさを測定した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 DCP 及び c-Met の発現性と臨床病理学意義の解明

当研究グループでは、肝細胞癌特有の異常タンパク質である DCP が c-Met と協調して肝細胞癌の病態悪化に関与することを培養細胞を用いた基礎医学的解析により示唆した。しかし、肝細胞癌患者由来の組織での DCP 及び c-Met の発現性とその臨床病理学的意義に関しては不明であった。そこで、これらの因子の発現性を免疫組織化学的手法により解析し、肝細胞癌の病態との関連性を検討した。その結果、DCP 及び c-Met の発現は癌部組織において高頻度に検出されたが、非癌部組織においても検出された（表 1）。また、DCP が高発現している症例では c-Met の高発現が高頻度に認められたことから、これらの因子の発現の有無には関連性が示唆された（表 2）。さらに、c-Met の高発現が認められた症例群では、術後の予後が有意に悪化していた。以上の結果から、DCP と c-Met が予後の悪い症例の癌組織において協調的に発現していたことから、肝細胞癌の病態悪化に寄与することが癌患者由来の組織においても示唆された。また、これらの因子が、予後の悪い患者のスクリーニングを目的とした免疫組織化学的診断法の開発に有効であると考えられる。

### 3.2 移植癌モデルマウスを用いた ICG による肝細胞癌組織の描出

ICG は、肝細胞癌患者の肝予備能の診断という目的で臨床医療の場において用いられている。ICG は蛍光物質であり、癌細胞に取り込まれると長期的に維持される性質を有することから、癌組織を高感度に検出することを可能としている。この現象が、移植癌モデルマウスを用いた *in vivo* 条件下においても再現可能であるかを検討する目的で、肝細胞癌組織を形成させたマウスに対して ICG を投与し、蛍光を観察した。その結果、癌細胞腫によって強度は異なるものの、腫瘍組織の位置に ICG 由来の蛍光が検出された（図 1）。一方で、腫瘍組織周辺の非癌部組織は蛍光を示さなかったことから、この蛍光は腫瘍組織において

特異性高く観察された。以上の結果から、ICG の蛍光が、肝細胞癌細胞由来の腫瘍組織の検出に有効であることが、移植癌モデルマウスを用いた *in vivo* 実験でも証明された。この解析系の確立は、次項の ICG の更なる応用に関する研究に必須であるほか、上述した DCP や c-Met をターゲットとした診断や治療技術の開発にも応用可能であると考えられる。蛍光を検出する技術と病態制御に関わる因子の発現を融合させることにより、高感度な新規診断法を構築できると期待される。

### 3.3 ICG 蛍光法を応用した光線力学的治療法の確立

上述したように、ICG は静注後に肝細胞癌組織に特異性高く集積し、腫瘍組織の高感度検出を可能とすることを *in vivo* モデルで示した。そして、ICG は特定波長の近赤外光を吸収して発熱を呈することから、光線力学的な治療に有用であるとされてきた。そこで、この ICG の性質と当研究グループが明らかにした ICG による肝細胞癌組織の描出技術とを融合させることにより、肝細胞癌に対する高い特異性を有する光線力学的治療が可能であると考え、*in vivo* モデルを用いた解析を実施した。ICG の投与によって蛍光を呈した肝細胞癌組織に対して近赤外光を照射して腫瘍の大きさを継時的に観察したところ、照射していない肝細胞癌組織に比べて腫瘍組織の拡大が抑制された (図 2)。また、この効果は ICG を投与していない組織に近赤外光を照射しても誘導されなかった。なお、腫瘍組織周辺の正常組織には、近赤外光照射による顕著な障害は観察されなかった。以上の結果から、ICG は肝細胞癌組織の描出だけでなく、近赤外光照射による光線力学的治療への応用にも有効であることが示唆された。本技術は、ICG と同様の性質を有する物質が肝細胞癌の光線力学的治療法に有効であるか否かの評価に利用できる。

## 総括

本研究では、肝細胞癌組織における DCP と c-Met の高発現が関連性を有することを組織化学的解析により示した。細胞を用いた過去の研究において、DCP が c-Met を介して癌細胞の増殖と浸潤を活性化することが示唆されたことから、その現象が肝細胞癌患者の病態悪化に寄与していることが考えられる。一方、本研究では蛍光物質を利用した肝細胞癌組織の高感度検出と光線力学的治療に関する解析を可能とする *in vivo* 実験系の構築を達成した。DCP や c-Met といった肝細胞癌特有の病態関連因子を蛍光標識する技術、関連因子の発現性に基づく数理プログラムを用いた病態機構予測技術を構築することで、患者個々の癌の病態を評価できる方法の確立が期待される。

表 1. 肝細胞癌患者組織における発現性

Sub-group	DCP n (percent)	c-Met n (percent)
C(+)NC(+)	15 (9.8%)	36 (23.5%)
C(+)NC(-)	82 (53.6%)	66 (43.1%)
C(-)NC(+)	5 (3.3%)	8 (5.2%)
C(-)NC(-)	51 (33.3%)	43 (28.1%)
Total cases	153	153
C(+)	97 (63.4%)	102 (66.7%)
NC(+)	20 (13.1%)	44 (28.8%)

C : 癌部組織、NC : 非癌部組織

表 2. 肝細胞癌患者由来組織における DCP と c-Met の発現の関連性

Sub-group	DCP <sub>c</sub> ↔c-Met <sub>c</sub>	DCP <sub>nc</sub> ↔c-Met <sub>nc</sub>	DCP <sub>w</sub> ↔c-Met <sub>w</sub>
DCP(+)c-Met(+) cases	78 (51.0%)	11 (7.2%)	89 (58.2%)
DCP(-)c-Met(-) cases	32 (20.9%)	100 (65.4%)	30 (19.6%)
DCP(+)c-Met(-) cases	19 (12.4%)	9 (5.9%)	13 (8.5%)
DCP(-)c-Met(+) cases	24 (15.7%)	33 (21.6%)	21 (13.7%)
Total cases	153	153	153
p value	< 0.0001	0.0054	< 0.0001

DCP<sub>c</sub> : 癌部組織での DCP の発現、c-Met<sub>c</sub> : 癌部組織での c-Met の発現、DCP<sub>nc</sub> : 非癌部組織での DCP の発現、c-Met<sub>nc</sub> : 非癌部組織での c-Met の発現、DCP<sub>w</sub> : 組織全体での DCP の発現、c-Met<sub>w</sub> : 組織全体での c-Met の発現

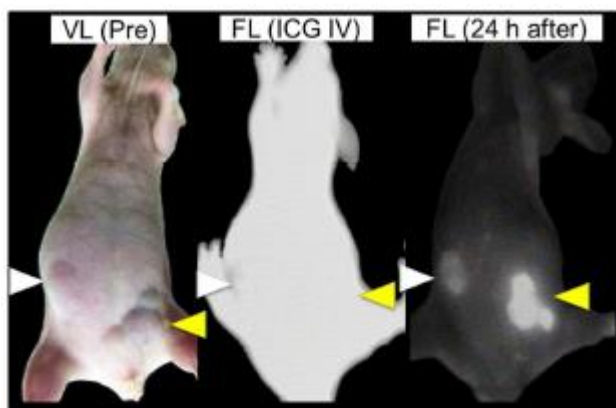


図 1. ICG を投与した移植癌マウスにおける蛍光発光。左側腹部に HuH-7 を移植し (黄矢印)、右側腹部に HepG2 を移植した (白矢印)。ICG 投与直後は全身で蛍光が検出されたが (図中央、FL(ICG IV))、投与 24 時間後では蛍光が腫瘍組織特異的に検出された (図右、FL(24h after))。

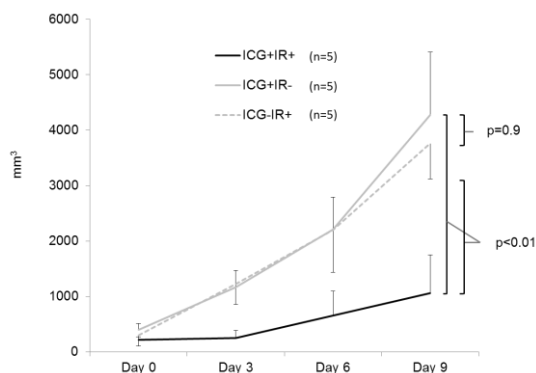


図 2. 近赤外光照射による肝細胞癌組織の拡大の抑制。近赤外光照射から 3 日ごとに腫瘍の大きさを測定したところ、ICG を投与して近赤外光を照射したマウスの腫瘍組織 (ICG+IR+) は、ICG を投与して近赤外光を照射していないマウスの腫瘍組織 (ICG+IR-) 及び ICG を投与せず近赤外光を照射したマウスの腫瘍組織 (ICG-IR+) と比較して 9 日後の体積が有意に小さかった (p<0.01)。

## 財団法人 日中医学協会


2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013年 3月 11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 鈴木康夫  ④  
所属機関名：中部大学  
所属部署名：生命健康科学部 職名：教授  
所在地：愛知県春日井市松本町 1200  
電 話：0568-51-6391 内線：直通

1. 助成金額：1,000,000 円

### 2. 研究テーマ

鳥インフルエンザウイルスのヒト適応変異におけるウイルスヘマグルチニンおよび受容体破壊酵素（ノイラミニダーゼ）の役割に関する研究

### 3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 鈴木康夫	職名： 教授
所属機関名： 中部大学	部署名： 生命健康 科学部
中国側研究者氏名： 郭 潮潭	職名： 所長
所属機関名： 浙江省医学科学院	部署名： 生物工程 研究所

### 4. 当該研究における発表論文等

現在、投稿準備中

Chao-Tan Guo, Keming Xu, Wengjun Song, Zhoujing He, C.Y. Cheung, Hoang Thuy Long, Honglin Chen, J.S.M. Peiris, Yasuo Suzuki, and Yi Guan: Receptor Binding Profile of H5N1 Influenza Virus Correlates with Glycosylation of Hemagglutinin and Length of Neuraminidase Stalk. *J. Biochem.*, to be submitted.

## 鳥インフルエンザウイルスのヒト適応変異におけるウイルスヘマグルチニン および受容体破壊酵素（ノイラミニダーゼ）の役割に関する研究

研究者氏名	教授 鈴木 康夫
日本所属機関	中部大学生命健康科学部
中国研究者氏名	所長 郭 潮潭
中国所属機関	中国浙江省医学科学院 生物工程研究所

### 要 旨

1) 現在流行している高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1 亜型、以下 H5N1）の多くは、ノイラミニダーゼ（NA）スパイクの stalk 部位に約 20 アミノ酸が欠落する変異が生じていた。2) HA 上のレセプター結合ポケット近傍の 169 番目のアミノ酸には常に糖鎖が付加していた。3) 158 糖鎖無/NA stalk 長の H5N1 は、主として、ヒト型レセプター（Neu5Ac  $\alpha$  2-6Gal）への結合性を示し、HA 158 糖鎖有/NA stalk 短の H5N1 は、鳥型レセプター（Neu5Ac  $\alpha$  2-3Gal）への結合性を、HA 158 糖鎖無/NA stalk 短の H5N1 は、鳥型（Neu5Ac  $\alpha$  2-3Gal）およびヒト型レセプター（Neu5Ac  $\alpha$  2-6Gal）の両者への結合性を示すことを見出した。4) さらに、自然界分離ウイルスと同様に人工的変異ウイルスでも上記の法則性が成り立つことを確認した。

以上により、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1 亜型）のヒト細胞受容体結合性獲得におけるレセプター破壊酵素（NA）の全く新しい役割の一端を明らかにすることが出来た。

Key Words インフルエンザウイルス、レセプター、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ、受容体破壊酵素、変異

### 緒 言：

A 型インフルエンザウイルスの自然宿主は、カモなどの野生水鳥である。ウイルスは、これらの体内では、低病原性で、水鳥を殺さず、水鳥腸管の細胞膜にあるシアロ糖鎖へ結合して、感染・増殖し、糞と共に湖水中へ排出され、それを飲んだ他の水鳥に感染が広がっていく（1-5）。水鳥の砂嚢は、酸性があまり強くなく、飲み込まれたウイルスは速やかに消化管へと運ばれ、体内に長く留まらず、抗体による圧力もあまり受けないので、変異の速度が遅いとされている。このようにして、大量のインフルエンザウイルスは、水鳥の渡りとともに、世界中に拡散する。1997 年に香港で発生し、ニワトリからヒトへ伝播した H5N1 ウイルスは、100 万羽を越すニワトリを殺すことにより一時的に流行は終息したが、再び 2003 年、中国福建省でヒトへの伝播が発生し、その後、世界各国へ広がっている。2010 年以降、最もヒトへの伝播が多い国はエジプト、インドネシア、カンボジア、中国である。現在、H5N1 は、様々な動物（ブタ、野鳥、ネコ科の動物、イヌ、アライグマなど）（6）へも宿主域を拡げている。

H5N1 を含む全ての A 型インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン（HA、3 量体）およびノイラミニダーゼ（NA、4 量体）スパイクを持つ（図 1）。両者は糖タンパク質で、宿主由来の N-型糖鎖が感染過程で付加される。これらの糖鎖は、HA、NA の生物学的活性発現や、HA、NA の 3 次構造の維持に重要である。さらに、付加された糖鎖は宿主由来であるため、ウイルスが宿主の免疫監視機構から逃れる上で重要な働きをしていると考えられている。HA は、ウイルスが宿主細胞のレセプターシアロ糖鎖へ特異的に結合する上で必須の役割を担っている。HA には  $\alpha$  2-6（ヒト型レセプター）、 $\alpha$  2-3（鳥型レセプター）シアロ糖鎖レセプターへ結合できる主要（1 番目）レセプター結合ポケットと  $\alpha$  2-3（鳥型レセプター）のみしか結合で



きない 2 番目のレセプター結合ポケットが存在する。一方、NA は、ウイルスが出芽により宿主細胞膜から遊離する上で必須の役割を果たす

(1-4)。近年、NA はウイルスの感染初期過程にも関わり、ウイルスの感染細胞内増殖とも深く関わる事が明らかとなっている (7)。我々は、これまでに、下記の点を明らかにしてきた。1) 鳥インフルエンザウイルスとヒトインフルエンザウイルスでは明らかにレセプター認識特異性が異なる (3)。2) これまで H5N1 感染患者 (中国, タイ, ベトナム, インドネシア, エジプトなど) から分離されたウイルスの中でヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異株を見出した (1, 5, 6, 8, 9)。鳥間で速やかに伝播する鳥インフルエンザウイルス (H5N1 を含む) は、宿主細胞膜の「シアル酸  $\alpha$  2-3 ガラクトース含有糖鎖: Sia  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-, 以後  $\alpha$  2-3 と

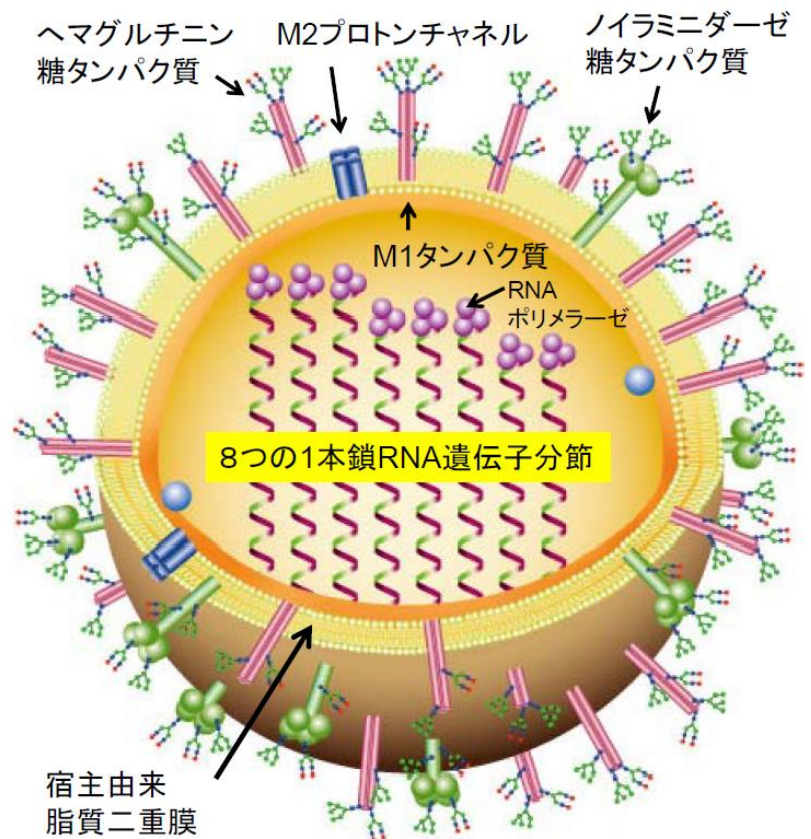


図1 インフルエンザウイルスの構造模式図

略」 (鳥型レセプターと呼ぶ) に優先的に結合する (1-5)。一方、ヒト間で流行する、例えば季節性のヒトインフルエンザウイルスは、「シアル酸  $\alpha$  2-6 ガラクトース含有糖鎖: Sia  $\alpha$  2-6Gal  $\beta$  1-,  $\alpha$  2-6 と略」 (ヒト型レセプター) に優先的に結合する (8, 9)。

#### 対象と方法：

インフルエンザウイルスは発育鶏卵またはMDCK細胞で培養した。ヘマグルチニンおよびノイラミナーゼの任意のアミノ酸置換は、リバーシジェネティクスの手法により行った。

#### 結果：

(1) 自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス NA の役割  
今回、自然界から分離された H5N1 ウイルスの HA 内 158 番目の Asn における糖鎖付加の有無、さらに、NA の stalk(軸)部位における連続した 20 アミノ酸配列の欠失の有無が、H5N1 ウイルスのヒト型および鳥型レセプターへの結合性に深く関わることを見出した。香港大が所有するヒトおよび鳥 (カモ, ガチョウ, ウズラ, キジ, grey heron, Bar head goose) から分離された天然の H5N1 ウイルス (全 55 株) について、HA および NA 遺伝子、それによるアミノ酸配列、さらにレセプターシアロ糖鎖 ( $\alpha$  2-3,  $\alpha$  2-6) への結合特異性を調べた。その結果、H5N1 ウイルスは、

- 1) 主にヒト型レセプターシアロ糖鎖 ( $\alpha$  2-6) に優先的に結合するウイルス群 (グループ I, 7 株), 2) 鳥型, ヒト型レセプターシアロ糖鎖の両者に結合するウイルス群 (グループ II, 24 株)
- 3) 鳥型レセプターシアロ糖鎖 ( $\alpha$  2-3) へ優先的に結合するウイルス群 (グループ III, 24 株)

が存在することを見出した。

さらに、これらの3つのグループは、下記の特徴によって分類され得ることを見出した。

- 1) グループ I に属する H5N1 (ヒト型レセプターへ優先的に結合できるウイルス) は、158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されていない。また、NA の Stalk に連続した 20 アミノ酸欠失が無く正常の長さである。
- 2) グループ II に属する H5N1 (ヒトおよび鳥型レセプターの両者へ結合できるウイルス) はレセプター結合ポケットと近傍にある 158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されていない。しかし、NA の Stalk に 20 アミノ酸欠失があり、短くなっている。
- 3) グループ III に属する H5N1 (鳥型レセプターへ優先的に結合できるウイルス) は 158 番目の Asn に *N*-型糖鎖が付加されている。また、NA の Stalk に 20 アミノ酸欠失があり、短くなっている。

また、第一のレセプター結合ポケットの近傍には 158 番目の他に 169 番目の Asn にも *N*-型糖鎖が付加されているが、天然から分離された全ての H5N1 は 169 番目の糖鎖付加を持っており、糖鎖付加の有無は 158 番目の Asn に限られることが判明した。

自然界で分離された H5N1 ウイルスの HA 分子内 Asn158 のグルコシル化の有無、および NA 分子の長短により、H5N1 ウイルスの宿主レセプターへの結合特異性が変わることは、これまで知られておらず、初の観察である。

## (2) 自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス HA および NA の役割の証明

自然界で分離された H5N1 における HA 分子内 Asn158 の糖鎖付加の有無、NA 分子の stalk (軸) 部分の連続 20 アミノ酸欠失の有無 (NA 分子の長短) の組み合わせが、ヒト型レセプターへの結合性変異獲得に重要であることをさらに証明するために、リバーシジェネティクス手法により、8 種類の人工ウイルス (① Asn158-, Asn169-, NA 完全長; ② Asn158-, Asn169+, NA 完全長; ③ Asn158+, Asn169-, NA 完全長; ④ Asn158-, Asn169-, NA 短; Asn158-, Asn169+, ⑤ NA 完全長 Asn158-, Asn169+, NA 短; ⑥ Asn158+, Asn169-, NA 短; ⑦ Asn158+, Asn169+, NA 短; ⑧ Asn158+, Asn169+, NA 完全長) (+, - は糖鎖付加の有無を示す) を作成し、レセプター結合特異性を調べた。その結果、自然界で分離されたウイルスを用いた結果を再現出来ることが判明した。すなわち、② Asn158 の糖鎖付加なし、NA stalk 完全長のウイルスはヒト型レセプターへ優先的に結合し、⑤ Asn158 の糖鎖付加なし、NA stalk 短のウイルスは鳥およびヒト型レセプターの両方へ結合、さらに⑦ Asn158 糖鎖付加あり、NA stalk 短のウイルスは、鳥型レセプターへ優先的に結合した。また、HA 分子内 Asn169 の糖鎖付加の有無は結果に影響を及ぼさないことも確認された。以上により、自然界で分離された H5N1 ウイルスのヒト型レセプター結合適応性変異におけるウイルス HA および NA の役割が再現性良く証明された。

### 考 察 :

以上、本研究により、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) のヘマグルチニン HA 分子内 Asn158 の糖鎖付加の有無、および NA 分子内 stalk (軸) 部位の連続 20 アミノ酸欠失の有無が、H5N1 ウイルスの鳥型レセプター ( $\alpha 2-3$ ) 結合特異性からヒト型レセプター ( $\alpha 2-6$ ) 結合特異性へのフェノタイプ変異をもたらすことが初めて明らかとなった。これまで、H5N1 を含むインフルエンザウイルスのレセプター結合特異性は、HA 分子内アミノ酸置換のみによるとされていたが、今回、NA stalk のアミノ酸欠失という NA の構造、機能にも関わることを初めて明らかにした。現在、流行している H5N1 の多くは⑤および⑦のタイプであり、今のところ②のヒト型レセプターへ優先的に結合出来る変異ウイルスは分離されていない。今後は、自然界における②タイプの H5N1 ウイルスの出現を監視することが重要である。

### 参考文献 :

- 1) Suzuki, Y. : *Chang Gung Med. J.*, 32, 258-263 (2009).

- 2) Sriwilaijaroen, N., Suzuki, Y. : Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc. Japan Academy Ser. B, Physical and biological Sciences* 88 (6) 226-249 (2012).
- 3) Suzuki, Y.: Sialobiology of influenza -Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses- *Biol. Pham. Bull.*, 28 (3) 399-408 (2005).
- 4) Suzuki, Y.: Highly pathogenic avian influenza. *J. Disaster Res.*, 6 (4), 398-403 (2011).
- 5) Watanabe, Y. *et al.*: Acquisition of Human-Type Receptor Binding Specificity by New H5N1 Influenza Virus Sublineages during Their Emergence in Birds in Egypt. *PLoS Pathogens*, 7, issue 5, e-1002068 (2011).
- 6) Nidom, C.A. *et al.*: Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 1515-1523 (2010).
- 7) Suzuki, T. *et al.*: Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. *J. Virol.*, 79, 11705-11715 (2005).
- 8) Auewarakul, P. *et al.*: An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J. Virol.*, 81, 9950-9955 (2007)
- 9) Le, Q.M. *et al.*: Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*, 437, 1108 (2005).

#### 謝辞

本研究は、財団法人日中医学協会の助成を受けたものであり、ここに深く感謝の意を表します。

作成日：2013年 3月5日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 2 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 左 一八



所属機関名： 静岡県立大学

所属部署名： 薬学部

職名： 准教授

所在地： 静岡市谷田 52-1

電話： 054-264-5720

内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

### 2. 研究テーマ

受容体糖鎖構造に基づくウイルス機能阻害剤探索

### 3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 左 一八

職名： 准教授

所属機関名： 静岡県立大学

部署名： 薬学部

中国側研究者氏名： 郭 潮潭

職名： 所長

所属機関名： 浙江省医学科学院

部署名： 生物工程研究所

### 4. 当該研究における発表論文等

本研究は、Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 424, 573-578 (2012)に

紙上発表した。

## 受容体糖鎖構造に基づくウイルス機能阻害剤探索

研究者氏名	准教授 左 一八
日本所属機関	静岡県立大学薬学部生化学分野
中国研究者氏名	所長 郭 潮潭
中国所属機関	浙江省医学科学院生物工程研究所

### 要旨

Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖に対する新規単クローン抗体 (HYB4) を樹立し、その性状解析を行った。HYB4 の詳細な糖鎖認識性を明らかにし、HYB4 を用いた生化学的な Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖検出法を確立した。HYB4 はインフルエンザウイルス (IFV) の細胞表面への結合を有意に阻害したことから機能的 IFV 受容体 (Sia $\alpha$ 2-3) 糖鎖を検出できることが示唆された。ヒト IFV について、その受容体合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとして大腸菌を宿主として、より効率的かつ簡便に発現・精製できる系を確立した。

デングウイルス (DENV) についてウイルスの結合性、感染阻害効果を示す HNK-1 糖鎖分子の合成酵素遺伝子を細胞に導入した HNK-1 糖鎖高発現細胞において DENV の有意な感染性の上昇が観察された。HNK-1 が DENV の機能的受容体であることが示唆された。ウイルス機能制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 感染阻害活性を有する化合物として 3-O-硫酸化グルクロン酸を創出した。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコに強力な抗 DENV 活性を見出した。

**Key Words** インフルエンザウイルス、デングウイルス、糖鎖受容体、抗ウイルス剤

### 緒言：

感染初期におけるウイルスと宿主受容体糖鎖分子との相互作用の解明は、ウイルス感染による病態形成を理解するうえで必須である。インフルエンザウイルス (IFV) やデングウイルス (DENV) 感染症は、自然宿主動物からヒトへとウイルスが異種間感染することで引き起こされる。これまで宿主糖鎖分子のウイルス感染における機能、ウイルス異種間感染機構、さらには病態形成の分子機構は十分に解明されていない。ウイルス感染時、宿主側因子に作用する抗ウイルス剤は臨床応用されていない。

IFV の宿主認識において、シアル酸含有糖鎖 (シアロ糖鎖) は宿主特異的受容体として機能していると考えられている。IFV の表面には、ヘマグルチニン (Hemagglutinin, HA) と、ノイラミニダーゼ (Neuraminidase, NA) の 2 種類の糖タンパク質がスパイク状に突出しており、A 型 IFV は HA と NA の抗原性に基づいて多くの亜型 (HA は 1~16 種類 6)、NA は 1~9 種類 7) に分類される。HA は宿主細胞膜上に存在し受容体として機能する特定のシアロ糖鎖の認識、結合および膜融合による細胞内侵入に関わる [1]。IFV 受容体認識において、シアル酸の結合様式が深く関与している。ヒト IFV は  $\alpha$ 2-6 結合型のシアロ糖鎖 (Sia $\alpha$ 2-6 糖鎖) に対して高い親和性を持つ一方、トリ IFV は  $\alpha$ 2-3 結合型のシアロ糖鎖 (Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖) に対して高い親和性を持つことが明らかとなっている [2-4]。さらに IFV 受容体認識はシアル酸が結合する内部糖鎖構造によっても影響を受けることが近年報告されている [4, 5]。このような結合親和性の違いがトリーヒト間などの異種間感染において重要になると考えられている [6]。IFV 受容体の分子実体、受容体の生体内分布など、感染過程に関与する因子の網羅的探索研究は、新たな作用機序を有する抗インフルエンザ薬の開発など予防対策の物質的基盤を確立するうえで重要な知見となることが期待されている。

Flavivirus 属のデングウイルス (DENV) は広範囲におけるエピデミックの引き金となる病原体であり、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) により人から人へ媒介される。熱帯・亜熱帯地域を中心に公衆衛生上の重要な問題となっている [7]。毎年 1 億人がデング熱を発症し、そのうち 50 万人がデング出血熱を発病している。DENV の感染者数は拡大の一途を示している。発展途上国における、人口の都市部への集中増加、温暖化による媒介動物の生息地域の拡大、航空機に代表される交通の発達など種々の要因により、世界的な流行が危惧されている [8]。DENV には 1~4 型の 4 つの血清型があり、いずれの血清型の感染によっても同様の感染症状を示すため、病態から感染した血清型を推定することはできない。初感染時、患者体内には同型に対する中和抗体は産生されるが、他型に対する交叉防御免疫が成立しない。そのため、他の血清型による再感染時の免疫応答がデング出血熱の発生リスクを上昇させていると考えられている [9]。その疫学的な複雑さから、病態の解明、ワクチンの開発が非常に困難である。現在、特異的な治療法もなく、対症療法が中心である。

これまでに chondroitin sulfate E (CSE) や heparin などの硫酸化グリコサミノグリカン分子がデングウイルスの宿主への結合・侵入に関わると予想されている。これらの物質は強力な感染阻害活性を示すことから、DENV 感染阻害、結合性を示す硫酸化糖鎖分子には、受容体活性を保持した共通の糖鎖構造が存在していることが推測されている。グリコサミノグリカンは直鎖状高分子多糖であり、繰り返し 2 糖単位に結合した硫酸基の数とその結合位置の違いにより、構造に多様性を有する硫酸化糖鎖分子である。

本研究では宿主受容体糖鎖分子の構造とそれを生合成する糖転移酵素 (GT) に着目して、感染初期における宿主側因子の性状を明らかにすることで、異種間感染および病態形成機構の解明を目指すとともにウイルス機能阻害剤となる物質の探索・同定を目的とした。

## 対象と方法：

1) IFV 受容体に対する単クローン抗体の作製・性状解析および IFV 受容体探索への応用：

Sia  $\alpha$  2-3 糖鎖構造を有する糖脂質 (Sia  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc  $\beta$  1-1' Cer) を免疫原、*Salmonera Minnesota* R595 株の菌体膜をアジュバントとして C3H マウスに免疫した。定法により得られたハイブリドーマの培養上清をスクリーニングして、抗体陽性クローン HYB4 を取得した。HYB4 の詳細な反応特異性を確認した。さらに HYB4 を用いた Sia  $\alpha$  2-3 糖鎖検出法として、ELISA、Western blotting、Flow cytometry、細胞染色法を検討した。従来 Sia  $\alpha$  2-3 糖鎖検出プローブとして利用されていたレクチンとの糖鎖反応性の比較を行うことで、HYB4 の Sia  $\alpha$  2-3 糖鎖検出プローブとしての有用性の評価を行った。

2) ヒト IFV 受容体生合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子の取得、および組換え体酵素の発現：

ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリーから PCR 法により、ST6Gal I の cDNA (NCBI, GenBank Accession Number, BC031476) を取得した後、制限酵素 *EcoRI* で処理し、細胞質領域および膜貫通領域を除去することで可溶性体 ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子を得た。この遺伝子を低温で高いタンパク質発現効率を有するコールドショックベクター、pCold TF にクローン化、大腸菌へ導入し、ヒト ST6Gal I 発現大腸菌を作製した。作製したクローン化 hST6Gal I 大腸菌を用いて、温度、添加剤、培養時間などの誘導条件を検討することにより酵素タンパク質発現を行った。さらにキレートカラムを用いた酵素タンパク質の精製を行った。

3) DENV 受容体合成酵素遺伝子高発現細胞の樹立と性状解析：

HNK-1 合成酵素遺伝子 GlcAT-P を COS-7 細胞にトランスフェクションすることにより HNK-1 高発現細胞を取得した。対照として遺伝子を含まない pIRES ベクターをトランスフェクションした。これらの細胞表面における発現は Flow cytometry および Western blotting 法により確認した。これらの細胞に対する DENV の感染性を定法に従って Focus forming assay により評価した。

4) 低分子糖誘導体設計・合成および薬用・食用共通素材であるキノコの抗デングウイルス感染阻害効果の評価：

glycosaminoglycan を構成する硫酸基を持つ低分子糖鎖誘導体の構造活性相関解析からデザイン、化学合成合成された低分子硫酸化糖誘導体の DENV 感染阻害効果を Focus forming assay により評価した。また、16 種類のキノコの抽出物について ENV 感染阻害効果を Focus forming assay により評価した。

**結果：**

1) IFV 受容体に対する単クローン抗体の作製・性状解析および IFV 受容体探索への応用：

新規 Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖検出プローブとして単クローン抗体 (HYB4) を確立した。本抗体は抗糖鎖抗体ではまれな IgG3 クラスの抗体であった。HYB4 は、IFV 受容体構造である Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R を特異的に認識した。本抗体は、細胞表面にあるシアロ糖鎖を認識できること、さらに IFV の結合を有意に阻害できることが明らかとなった (図 1、2)。

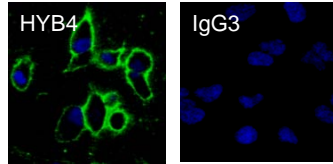


図1. HYB4によるA549細胞の免疫染色

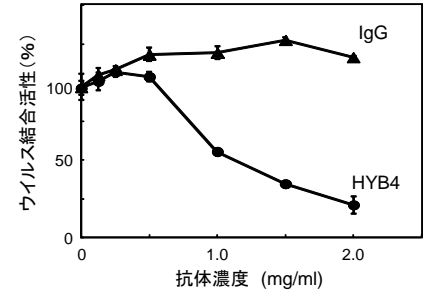


図2. HYB4によるIFVのA549細胞表面への結合阻害

2) ヒト IFV 受容体生合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子の取得、および組換え体酵素の発現：

ヒト IFV 受容体合成酵素 ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとって大腸菌で発現を行った。目的タンパク質の誘導時間の検討の結果、15 $^{\circ}$ C、24 時間のタンパク質誘導時間で目的タンパク質の発現量が増加することが明らかとなった (図 3)。同様の誘導条件で、従来用いていた pMAL-p2x vector を用いるタンパク質発現系との比較を行ったところ、今回用いた方法は従来の方法よりはるかに目的タンパク質の発現量が多いことが確認された。

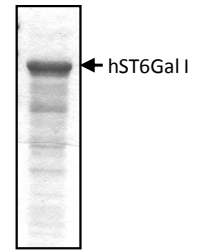


図3. 組換え体hST6Gal I CBB染色

3) DENV 受容体合成酵素遺伝子高発現細胞の樹立と性状解析：

Western blotting により、GlcAT-P 遺伝子導入 COS-7 細胞で HNK-1 糖鎖が合成されたことが確認された。また、Flow cytometry の結果から、合成された HNK-1 糖鎖は細胞表面に発現されていることが確認された。このとき、heparan sulfate や chondroitin sulfate など、他の糖鎖分子の発現量への影響は認められなかった。DENV 感染性を調べた結果、GlcAT-P 遺伝子導入 COS-7 細胞で有意に菅先生の上昇が観察されたことから、HNK-1 糖鎖が細胞表面上で受容体として機能していることが示唆された。

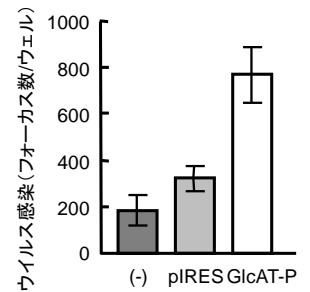


図4. HNK-1高発現細胞におけるDENV感染性の変化

4) 低分子糖誘導体設計・合成および薬用・食用共通素材であるキノコの抗 Dengue ウイルス感染阻害効果の評価：

糖鎖機能発現制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 特異的に相互作用を示す共通構造から、硫酸化グルクロン酸が推定された。種々の硫酸化グルクロン酸誘導体を化学合成し、阻害活性調べた。その結果、3-O-硫酸化体に阻害活性が認められた。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコ抽出液から抗 DENV 活性を探索した。その結果、オオヒラタケの熱水抽出物中に強力な Dengue ウイルス感染阻害活性を見出した。日本脳炎ウイルス感染を阻害しなかったことから特異的な阻害効果であることが示唆された (図 5)。

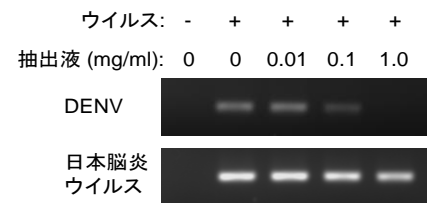


図5. オオヒラタケ抽出液によるDENV感染阻害

**考察：**

本研究では、Sia $\alpha$ 2-3 糖鎖に対する新規単クローン抗体 (HYB4) を樹立し、HYB4 を用いた生化学的な Sia $\alpha$

2-3 糖鎖検出法を確立した。HYB4 はトリ型インフルエンザウイルス (IFV) の細胞表面への結合を有意に阻害した。トリ→ヒトへの異種間感染機構を理解するうえで、トリ型 IFV 受容体分子のヒトでの局在性を明らかにする必要がある。本抗体は IFV の異種間感染機構の解明に大きく寄与することが期待される。ヒト IFV について、その受容体合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとって大腸菌を宿主として、より効率的かつ簡便に発現・精製できる系を確立した。本酵素を用いることによりヒト IFV 受容体糖鎖を有する様々な誘導体の効率的かつ大量合成が期待される。

デングウイルス (DENV) についてウイルスの結合性、感染阻害効果を示す HNK-1 糖鎖分子の合成酵素遺伝子を細胞に導入した HNK-1 糖鎖高発現細胞において DENV の有意な感染性の上昇が観察された。本糖鎖分子は調べたすべてのウイルス感受性細胞に発現している一方、感染非感受性の細胞株には発現していないことなどの知見から、機能的な DENV 受容体である可能性が示された。今後、ヒトの組織における本糖鎖分子の発現を調べることにより、デングウイルスの病態形成の機序の解明が進むものと考えられる。ウイルス機能制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 感染阻害活性を有する化合物として 3-*O*-硫酸化グルクロン酸を創出した。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコに強力な抗 DENV 活性を見出した。DENV の吸着に関わる糖鎖構造を明らかにすることは、DENV の宿主認識メカニズムを解明に重要であり、今回創出した化合物は抗 DENV 薬開発に繋がるリード化合物となることが期待できる。また、生薬・食用資源であるキノコから熱安定性の抗デングウイルス活性が見出されたことから、本資源は熱帯地域において有用な生薬製剤として利用できる可能性がある。

#### 参考文献：

1. Wiley, N. C., Skehel, J. J. 1987. The structure and function of the HA membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56, 365-394.
2. Rogers, G. N., Paulson, J. C. 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127, 361-373.
3. Rogers, G. N., Pritchett, T. J., Lane, J. L., Paulson, J. C. 1983. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* 131, 394-408.
4. Suzuki, Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28, 399-408.
5. Hidari, K. I., Murata, T., Yoshida, K., Takahashi, Y., Minamijima, Y. H., Miwa, Y., Adachi, S., Ogata, M., Usui, T., Suzuki, Y., Suzuki, T. 2008. Chemoenzymatic synthesis, characterization, and application of glycopolymers carrying lactosamine repeats as entry inhibitors against influenza virus infection. *Glycobiology* 18, 779-788.
6. Beare, A. S., Webster, R. G. 1991. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 119, 37-42.
7. Weaver, S. C. and Barrett, A. D. 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol.* 2, 789-801
8. WHO website <http://www.who.int/en/>
9. IDSC (Infectious Disease Surveillance center) 国立感染症研究所 感染情報センター website <http://idsc.nih.go.jp>

注：本研究は、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 424, 573-578 (2012) に掲載。

作成日：2013年3月2日



## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013 年 3 月 4 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 井 上 孝  
所属機関名： 東京歯科大学  
所属部署名：臨床検査病理学講座 職名：教授  
所 在 地：千葉県千葉市美浜区真砂 1-2-2  
電 話：043-270-3704 内線：直通



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

歯牙形成におけるシグナルカスケードの解析と生体外による歯牙硬組織、  
歯牙再生に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 井上 孝	職名：教授
所属機関名：東京歯科大学	部署名：臨床検査病理学講座
中国側研究者氏名： 白 玉娣	職名：講師
所属機関名：第四軍医大学口腔医院	部署名：小児歯科

4. 当該研究における発表論文等

---

Bone. 2011; 48 (6): 1417-1426 で発表以降はなし

---

---

---

—日中医学協会助成事業—

歯牙形成におけるシグナルカスケードの解析と生体外による歯牙硬組織、歯牙再生に関する研究

研究者氏名	教授 井上 孝
日本所属機関	東京歯科大学臨床検査病理学講座
共同研究者	松坂賢一
中国研究者氏名	講師 白 玉娣
中国所属機関	第四軍医大学口腔医院小児歯科

**要 旨**

再生医療の中で、三次元構造を持つ組織・臓器の生体外再生は難しく、その為に組織工学の応用が重要である。本プロジェクトでは、組織工学のための、足場の検討、そして歯牙形成に関与する未分化な間葉系細胞の抽出と、シグナルを起こすタンパクの検討を行うことを目的としたが、日中間における国際的問題のため、来日ができず研究は準備段階で終わってしまった。

**Key Words** 間葉系細胞, 足場, シグナル, 歯牙形成, 組織工学

**緒 言 :**

歯牙の再生には、上皮・間葉の相互作用が関係している。発生期歯牙の上皮細胞と間葉系細胞を分離採取し、増殖させ、コラーゲンゲル内に戻すと歯牙が発生するという報告はある。しかし、未だ生体外で細胞を用いて歯牙を再生させたという報告は少ない。本研究では、再生に使用する幹細胞を歯牙発生期の組織より抽出し、さらに適切な足場と成長因子を加えて、三次元構造を持つ再生歯を作ることであった。

**対象と方法 :**

対象はまず、抗体の多いラットを用いて、生後2週間までの臼歯の未完成歯牙を採取して、細胞を分離培養する。その分離した培養の株を解析し、未分化なものを選択する。また同時に、足場となる物質の検討と改良を加え、その足場に未分化な間葉系の細胞に、分化・増殖・成長因子を加え検討する。

**結 果 :**

現在、歯牙発生時の細胞を分離培養し、様々な抗体を用い、免疫組織化学的に検討し、未分化な株の存在を検討している。

**考 察 :**

日本における準備は以上で、白先生来日によりその先の目的を達成する予定であった。

**参考文献 :**

1. Bai Y., Matsuzaka K., Inoue T, et al. Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells. Cell Tissue Res., 342: 221-231, 2010.
2. Bai Y., Matsuzaka K., Inoue T, et al. Cementum- and periodontal ligament-like tissue formation by dental follicle cell sheets co-cultured with Hertwig's epithelial root sheath cells. Bone, 48: 1417-1426, 2011.

作成日 : 2013年 3月 4日

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

平成 25 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 八若保孝  
所属機関名： 北海道大学大学院歯学研究科  
所属部署名： 口腔機能学講座 職名： 教授  
小児・障害者歯科学教室  
所在地： 札幌市北区北 13 条西 7 丁目  
電話： 011-706-4290 内線：



1. 助成金額： 484,996 円

2. 研究テーマ

機能性ナノ材料および生体化学物質を応用した新しい修復材料の応用と評価

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 八若保孝

職名： 教授

所属機関名： 北海道大学大学院歯学研究科

部署名： 口腔機能学講座

小児・障害者歯科学教室

中国側研究者氏名： 趙 璋

職名： 教授

所属機関名： 中山大学附属口腔病院

部署名： 小児歯科学

4. 当該研究における発表論文等

なし。

## 機能的ナノ材料および生体化学物質を応用した新しい修復材料の応用と評価

研究者氏名	教授 八若 保孝
日本所属機関	北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 小児・障害者歯科学教室
共同研究者名	星野 恵
中国研究者氏名	教授 趙 璋
中国所属機関	中山大学附属口腔医院小児歯科学

### 要 旨

齲蝕現象の要因の一つに歯科診療における初期齲蝕小窩裂溝填塞処置（以下：シーラント）の普及があげられる。このシーラントには、レジン系シーラント（従来型）とガラスアイオノマーセメント系シーラントが広く臨床応用されている。しかし、それぞれのシーラントには長所、短所が存在しており、万能なものではない。このような背景の中で、改良型としてS-PRGフィラー含有レジン系シーラントが開発された。本研究は、文化、気候、生活習慣などが異なる2地点（日本と中国）での同じ条件での臨床応用における予後観察を行うことにより、S-PRGフィラー含有レジン系シーラントおよびガラスアイオノマー系シーラントの長期的な効果を評価すること、ならびにS-PRGフィラー含有レジン系シーラントの基礎的な特徴を明らかにした。

材料は、S-PRGフィラー含有シーラント（ビューティーシーラント（松風社）：BS）とガラスアイオノマー系シーラント（Fuji III LC（GC社）：LC）を用いた。基本的に、左右同名歯にそれぞれのシーラントを填塞することで、同一被験者での比較を可能とした、また、臨床応用する2地点を日本の札幌市と中国の広州市とし、両国の担当者が、術式および予後調査の基準を定め、臨床応用を実施した。また基礎的研究では、上記2種のシーラントに加え、従来型（ティースメイトF1（クラレ社）：TM）も含めて、歯質接着強さ、フッ素徐放性、酸緩衝能について調べた。

結果として、臨床応用に関しては、現在、症例が増加してきており、予後調査を継続する予定である。現在のところ、予後不良例は認めていない。基礎的研究では、歯質接着強さについては、従来型より小さい傾向が認められたが、接着という概念からは、期待する範囲内であった。フッ素徐放性は、従来型より多くのフッ素徐放性を示したが、豊富なフッ素徐放性を示すガラスアイオノマーセメント系シーラントには及ばないものであった。酸緩衝能については、材料の周囲のpHの変化から、使用するシーラントとガラスアイオノマーセメント系シーラントは有効な酸緩衝能を期待できることが示された。

以上のことから、基礎的な特徴からBSは、脱離の可能性、シーラント材辺縁での齲蝕抑制効果などが考えられ、長期観察において、この点を明確にする必要があることが示唆された。現在経過観察を行っている症例については、この点を中心に長期観察を継続する予定である。

**Key Words :** 従来型レジン系シーラント, グラスアイオノマー系シーラント, S-PRGフィラー, 長期経過観察

### 緒 言 :

我が国では、小児期における齲蝕の減少が顕著になってきている<sup>1)</sup>。この要因の一つに、歯科診療における初期齲蝕小窩裂溝填塞処置（以下：シーラント）の普及があげられる。このシーラントは、当初接着性レジンの応用によるレジン系シーラントのみであった。しかし、従来型のレジン系シーラントにおいては、そ

の長期観察例から、①エナメルエッチング処理が必要であり、幼若永久歯や乳歯の歯質にダメージを与える可能性がある。②歯質強化に関するフッ素徐放性を有していない。③湿潤状態に弱く、ラバーダム防湿が必要である。④咬合力によるシーラント材の辺縁破折や辺縁部での微小漏洩が生じる。⑤シーラント材の辺縁部に④による環境下で齶蝕が生じる。といった短所が認められるようになってきた。そのため、従来型レジン系シーラントの改良が始まり、フッ素徐放機構が組み込まれたシーラントが開発されてきた。しかし、フッ素情報機能は、填塞後からの数時間～数日にとどまり、継続的なフッ素徐放を獲得することはできていない。このような背景から、ガラスアイオノマーセメント系シーラントが開発され<sup>2)</sup>、徐々に臨床での使用頻度が増加してきている。ガラスアイオノマーセメントは、その製造過程から、フッ化物が材料内に存在するため、持続的なフッ素徐放が可能な材料であり、また、化学的歯質接着性を有するため、エナメルエッチング処理を必要としない利点を有している。さらに、従来型レジン系シーラントほど硬くないため、咬合などによる摩耗が生じ、辺縁部の破折や微小漏洩が生じない。このような利点を有してはいるが、煩雑な操作性の問題、歯質接着性があるとはいえ、接着性自体レジン系シーラントに劣ることによる脱落の問題、摩耗によりシーラントの寿命が短くなる問題などが認められている。このように、従来型レジン系シーラントとガラスアイオノマー系シーラントには、それぞれ長所、短所が存在している。

このような臨床的問題に対して両方の利点を有した改良型レジン系シーラントが開発された。このシーラントにはガラスアイオノマーセメントを改良した機能性ナノ材料であるS-PRGフィラーが含有されている。このフィラーの効果には、フッ素徐放性、酸緩衝能、抗菌性などがあると考えられており、研究が進んできている<sup>3,4)</sup>。

本研究では、文化、気候、生活などが異なる2地点、すなわち日本（北海道）と中国（広州）での同条件でのシーラントの臨床応用における予後観察を行うことにより、S-PRGフィラー含有レジン系シーラントおよびガラスアイオノマー系シーラントの長期的な効果を評価することを主たる目的とした。これと並行して、S-PRGフィラー含有レジン系シーラントの基礎的な特徴を明らかにするものである。

なお、生体化学物質を応用した材料については、改良を進めているが、現時点で臨床応用に値するだけの材料ではないため、機能性ナノ材料であるS-PRGフィラーについての研究とした。

## 対象と方法：

材料は、S-PRGフィラー含有シーラント（ビューティーシーラント（松風社）：BS）とガラスアイオノマー系シーラント（Fuji III LC（GC社）：LC）を用いた。シーラントの臨床応用については、一人の被験者に対し、基本的に左右同名歯にそれぞれのシーラントを填塞することとし、同一被験者での比較を可能とした。また、臨床応用する2地点を日本の札幌市と中国の広州市とし、両国の担当者が、術式および予後調査の基準を定め、臨床応用を実施した（図1～3）。

基礎的研究では、上記2種のシーラントに加え、従来型（ティースメイトF1（クラレ社）：TM）を材料として、せん断強さを用いた歯質接着強さ、フッ素徐放性、酸緩衝能について調べた。

## 結果：

臨床応用に関しては、2012年9月下旬からの開始となった。実施が遅れたことに関しては、中国の共同研究者であるZhao教授のアメリカ留学期間と重なった関係で、日程調整に時間を有したためであった。現在、症例が増加してきており、予後調査を継続する予定である。現在のところ、両国において予後不良例は認めない。

基礎的研究では、歯質接着強さについては、試料を作製24時間後のせん断力は、BS群（ $23.4 \pm 4.9$  MPa）とTM群（ $24.1 \pm 4.9$  Mpa）は有意さが認められず、LC群は（ $15.5 \pm 7.0$  MPa）であり、BS群およびLC群との間に有意差が認められた。試料作製3か月後でBS群の強さに著明な減少が認められた（ $16.99 \pm 5.99$  MPa）。しかし、接着という概念からは期待できる範囲であった。

フッ素徐放性については、LC群ははじめ38ppmで徐々に減少し、5ppmで安定した。BS群ははじめ5ppmで徐々に減少し、0ppmに近付いた。TM群ははじめ3ppmでBS群よりも早く減少を示し、0ppmに近付いた。BS群はTM群より多くのフッ素徐放性を示したが、豊富なフッ素徐放性を示すLC群には及ばなかった。

酸緩衝能については、材料の周囲のpHの変化から、充填時はどの材料も約pH4.0を示し、30分経過により、BS群でpH4.8を超え、LC群でpH4.6に上昇した。しかし、TM群では、逆にpHが徐々に減少を示した。BS群とLC群には有効な酸緩衝能を期待できることが示された。

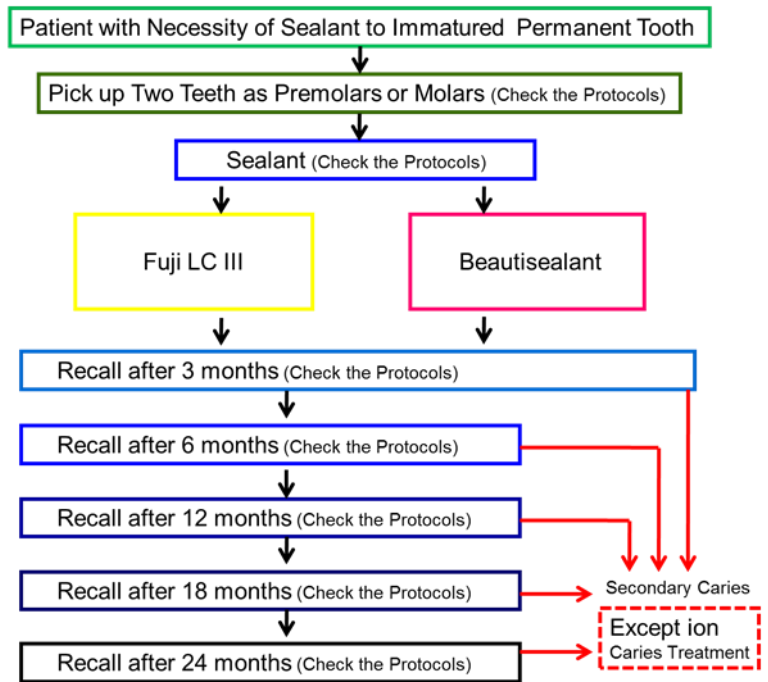


図1 臨床応用の流れ図

考察：

臨床における予後観察に関しては、現時点において残念ながら時間が不足しており、2種のシーラントの差が認められなかった。同様に、異なる地域での差についても明らかにできなかった。

基礎的研究から得た各種シーラントの特徴から、BS群は、従来型より歯質接着性が時間の経過とともに減少する傾向を示したことから、シーラント脱離の可能性が考えられた。また、フッ素徐放性は認められ、TM群より高かったもののLC群に及ばなかった。酸緩衝能については、有効な酸緩衝能を有していることが認められた。以上のことから、従来型の長期観察例で問題になっているシーラント材辺縁での破折や微小漏洩による齲蝕誘発に関して、抑制効果が期待できることが示された。

これらのことから、機能的ナノ材料であるS-PRGフィラーによる改良により、従来型の短所を補う作用を有することが示唆された。

得られた基礎的特徴が、実際の臨床においてどのような効果・影響を示すのかについては、今回の応用症例の長期観察が必要になってくる。経過観察の要点としては、前述したように2種のシーラントの長期的な変化が中心となり、特にシーラント材の脱離、シーラント辺縁の齲蝕発生についての詳細な観察が必要となる。

また、日本と中国の地域差による予後の違いが認められることも視野に入れておくべきである。文化、気

Name: \_\_\_\_\_ Sex: M F Age: \_\_\_\_\_

**First visit** Date: \_\_\_\_\_

Kind of Tooth: \_\_\_\_\_ Operator: \_\_\_\_\_

Caries: Sound CO (only coloration) C1 (only enamel defect) \_\_\_\_\_

Photograph: (+) (-) \_\_\_\_\_

Rubber-dam: (+) (-) \_\_\_\_\_

Tooth Cleaning: with Robinson's Brush with ENAC with NaOCl \_\_\_\_\_

Used Materials: LC III Beautisealant \_\_\_\_\_

**Recall** Date: \_\_\_\_\_

Kind of Tooth: \_\_\_\_\_ Operator: \_\_\_\_\_

Condition of Sealant: Perfect Retention (coloration: (+) (-)) Partial Retention Drop out \_\_\_\_\_

Part of Drop of Sealant (Only Partial Retention) \_\_\_\_\_

Occlusal Surface: Mesial Central Distal Other Fissure: Buccal Lingual \_\_\_\_\_

Photograph: (+) (-) \_\_\_\_\_

Secondary Caries: (+) (-) \_\_\_\_\_

Part of Secondary Caries: Near the Sealant Part of Drop out Under the Sealant \_\_\_\_\_

Convalescence: Good Seal again Seal additionally Caries Treatment \_\_\_\_\_

図2 プロトコール1

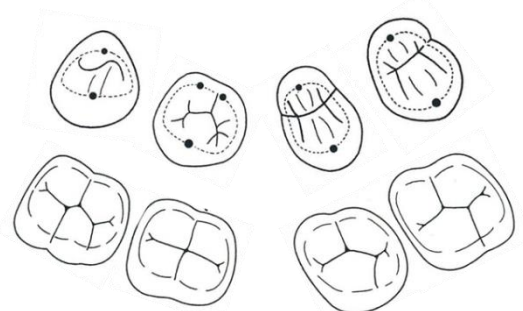


図3 プロトコール2

候、生活などが異なる2地点での予後の差は、地域の影響を加味した歯科材料開発の必要性を示すものである。本研究のような異なる2地点での同じ条件での予後観察を行った材料学研究はほとんど見られない。よって、現在進行している経過観察の長期的継続の必要性は重要であり、引き続き、両国間（2地点間）での情報交換を密にした研究継続を行う予定である。

今回、生体化学物質を応用した材料を研究に使用することができなかった。生体化学物質としては、N-acetylcysteinの応用<sup>5)</sup>を現在検討中である。この材料は、培養系において組織修復能を示すことが知られており、初期齲蝕の歯質に対してどのような効果を示すか、興味あるところである。この点についても、今後改良を重ね臨床応用に持っていく予定である。

#### 参考文献：

1. 厚生労働省：平成23年度歯科疾患実態調査．厚生労働省ホームページ．2012.
2. 堤 智紀, 小島 寛, 加我正行, 小口春久：小窩裂溝封鎖材として開発された光硬化型ガラスイオノマーセメントの保持に関する研究．小児歯科学雑誌, 33:1009-1016, 1995.
3. Genchou M. Kaga M. Hashimoto M. Yawaka Y.: Increase in pH by S-PRG filler containing sealant. 88<sup>th</sup> general session and exhibition of the IADR, abstract No. 4578, Barcelona, Spain. 2010.
4. Kaga M. Masuda J. Hoshino M. Genchou M. Minamikawa H. Hashimoto M. Yawaka Y.: Mechanical properties and ions release of S-PRG filler-containing pit and fissure sealant. Nano Biomedicine, 3:191-199, 2011.
5. Minamikawa H. Yamada M. Deyama Y. Suzuki K. Kaga M. Yawaka Y. Ogawa T.: Effect of N-acetylcystein on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. Journal of Endodontics, 37:637-641. 2011.

## 財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：片田 範子  
所属機関名：兵庫県立大学  
所属部署名：看護学部 職名：学部長  
所在地：〒651-8588 兵庫県明石市北王子 13-71  
電 話：078-925-9402 内線：



1. 助成金額： 368,073 円

2. 研究テーマ：肥満児童の体質と血圧との関連に関する日中比較研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：片田範子

職名：学部長

所属機関名：兵庫県立大学

部署名：看護学部

中国側研究者氏名：龐書勤

職名：研究室長

所属機関名：福建中医薬大学

部署名：護理学院

4. 当該研究における発表論文等

未だ無



## 肥満児童の体質と血圧との関連に関する日中比較研究(中国側に焦点をあて)

研究者氏名 教授 片田 範子  
所属機関 兵庫県立大学看護学部  
中国研究者氏名 助教授 龐 書勤  
中国所属機関 福建中医薬大学護理学院

### 要旨(600字)

**目的** 日中両国における児童の体質と、生活習慣と体格の関係性を明確し、肥満児童の健康管理側面からの介入研究に必要な要素を抽出する。**方法** 体質に関する質問票と学生の健康度、生活習慣に関する診断検査票を用いて、単純性肥満児が多くなる12-18歳児を対象とし、中国側では260名、日本側では50名程度を調査した。**結果** BMI>24の児は10歳から15歳までの研究協力者の収縮期血圧は標準値より有意に高かった。拡張期血圧は、13歳組のみ標準値より有意に高くなり、その他はいずれも有意差が見られなかった。学級による拡張期血圧の影響も見られ、小学校より中学校、高校より中学校の拡張期血圧は有意に高かった。体質種類の判断に関して、80.4%(209)の対象者はどちらでもない結果になり、2種類以上の病理体質を揃えた雑合質は21名、平和質6名、その他8種類の病理体質はそれぞれ1名~6名までであり、それぞれの体質の年齢は有意差は見られなかった。各種類の体質において、生活習慣の得点は有意差は見られなかった。**結論** 体重は血圧に影響があるが、児童期の体質は分類できない傾向が見られた。

**Key Words:** 肥満, 中医体質, 児童, 看護, 生活習慣

### 緒言(目的や研究背景)

平成20年文部科学省の調査では、肥満度+20%以上の肥満傾向児は、男児10~13.5%、女児8.4~9.8%にもなった<sup>[1]</sup>。県によって、20%までも達した所もある(宮崎県調査、2012年1月31日日新聞朝刊)。昭和52年以来、2~3倍に増えてきた。そして、思春期の肥満は70~80%が成人期に移行している<sup>[2]</sup>。さらに高血圧、糖尿病等の生活習慣病のリスクとの関連がある。中国では、子どもの肥満傾向は、大都市での出現率は男児25%、女児17%も越えた<sup>[3]</sup>。子ども肥満の増加に伴い、生活習慣病の発症の若年化が進んでいる。肥満児の高血圧は、非肥満児の7.7~11倍となる<sup>[4]</sup>。このような子どもの生活習慣病は日中とも子ども看護領域において重大な課題になっている。

生活視点から肥満をコントロールする手段の中に、中国伝統医学(以下は中医学とする)の体質からの方略がある。体質学説はその中の一つである。体質は中医学からの発想であり、遺伝要因と生活要因による形成された特定な形態、生理状態、心理状態の傾向である。生活要因を変えると体質も変わるようになる。その体質は9種類があり、それぞれ平和質、気虚質、陽虚質、陰虚質、痰湿質、湿熱質、瘀血質、気鬱質、特稟質である<sup>[5]</sup>。そのなかに、平和質を除く他の8種類質は病理体質となる。病理体質は未病の段階から身体からの早期兆しで、体質段階の介入は疾病の早期予防につながる。中医学では、8種類の病理的体質はそれぞれ生活習慣に対する食事療法、運動療法、等特定な介入の方法がある。そこで、8種類病理体質に対応したそれぞれの生活習慣を明らかにしておくべきである。病理体質に対して、不良生活習慣を見直すと同時に、体質によって生活習慣を調整する方策もある。

本研究の枠組 肥満と体質は生活習慣に関係があり、両方とも血圧に関係がある。中医学の体質で、肥満が若干種類の病理的体質に分類され、それぞれの体質に対応した血圧によって、危険性の優先順位が大別できる。次の段階では、生活習慣を見直すことと同時に、病理的体質を調整する。それによ

て、生活習慣の矯正、生活習慣の調整という二つの看護の手段で児童肥満を克服し、肥満による血圧や生活習慣病を予防することが期待できる。そこで、日中両国における児童の体質と、生活習慣と体格の関係性を明確し、肥満児童の健康管理側面からの介入研究に必要な要素を抽出することを目的とした。体質、生活習慣との関係性を明確するにあたって、日中とも直面した生活習慣病を克服するために、情報共有、解決方略の探索にお互いに参考できる。

## 対象と方法

単純性肥満児が多くなる 12-18 歳児を対象とする。対象数は中国側では 260 名、日本側では 50 名程度とする。

### 調査用紙

#### 1 中国側

##### 1) 中国語版『学生の健康度、生活習慣に関する診断検査票』<sup>1</sup>

日本語版の学生の健康度、生活習慣に関する診断検査票を用いて、105 名の調査対象者のデータで検証した結果、Cronbach's 係数は 0.86 である。

2) 中国語版体質に関する質問票 (CCMQ) Wong らが開発した体質に関する質問票 (2004to2005) であり、9 の体質について 60 項目からなる標準化された自問式尺度である。

#### 2 日本側

##### 1) 学生の健康度、生活習慣に関する診断検査票<sup>6</sup>

この調査票には、生活習慣行動(14 項目)、運動条件(7 項目)、食生活状況 (14 項目)、休養状況 (4 項目)、睡眠状況 (7 項目)、計 46 項目がある。信頼係数は 0.6-0.8 で、尺度としての信頼性が得られたものである。

##### 2) 日本語版体質に関する質問票 (CJMQ)<sup>7</sup>

中国語版体質に対する質問(CCMQ) の日本語版を開発したものである。Test-re-Test 法で検証した結果ファルファ係数は 0.65-0.79 であり、尺度としての信頼性が得られている。

### 調査方法

#### 1 中国側

校長と担任、保健室の看護師の口頭での同意を得てから、保健室の看護師に健診に BMI>24 生徒に対して、以下のように携帯へ発信してもらいます(保健室の看護師は既往同じ方法で集団健康指導や個別健康指導を実施したことがあります)。

「生活習慣病をよりよい予防するために、現在本保健室にて生活習慣と体質について調査を行っており、研究協力者を募集しています。研究協力者へはこちらの生活習慣調査票と体質調査票を用いて無記名で記入してもらい、体重と身長、血圧を測定させていただきます。調査にあたって、約 20~30 分間がかかります。研究協力者への謝礼として 500 円(人民幣:40 元にあたる)相当の粗品を贈ります。以上のことを踏まえ、ご家族と相談の上自由意思で研究協力者を応募します。」

研究協力者に応募される生徒に、調査についても一度詳しく口頭で説明を行い、口頭同意を得てから研究の対象者となる。調査場所は、保健室もあれば、自宅で記入した子どももあった。

#### 2 日本側

調査のアクセシビリティを考慮に入れ、コンビニエントサンプリングを基本とし、これまで他の研究で協力を得てきた学校(養護学校等を含める)に協力(許可)を求め、12 歳—18 歳の子供を持つ養育者(教職員)を通して対象となる 12 歳—18 歳の子どもへの任意アンケート調査を配布し、無記名での郵送・回答・回収を行った。当初中国側と同様の小児を対象とする予定であったが、倫理的配慮並びにアクセシビリティの困難から、研究対象を確定することに時間がかかり、現在調査票の回収中である。

## 調査期間

中国では、2012.6-2012.12

日本では、2013.3月

## 倫理的配慮

中国と日本側はそれぞれの研究者が所属する施設の研究倫理審査を受け研究の実施を行った。

1) 子どもの意思を尊重し、調査の目的が理解できるように口頭と文書で説明、子どもの同意を得てから調査と測定を実施した。

2) 子どものプライバシーを保護するためにプライバシーを守ることができる場所を確保、調査のデータは本人が特定されないような形で提示した。

3) 本調査の成果は、日本と中国の看護雑誌上で発表する可能性があることを伝え、その際には個人が特定されないよう匿名性を保持すると伝えた。

## 結果

### 1 中国側データ収集の状況

研究協力に応募した381名に調査用紙を配布し、352部が回収できた。有効回答は260部、有効回答率は73.86%であった。

### 2 研究協力者の一般状況

研究協力者の一般状況は表1に示した。

有効回答の協力者は計260名であった。そのうち男生は172名(66.2%)、女生88名(33.8%)、平均年齢14.00(1.95)、年齢分布、学校、学校所在地は表1に示した通りである。

表1 研究協力者の一般状況

		例数	比率	合計
性別	男生	172	66.2	260
	女生	88	33.8	
年齢分布	10歳	6	2.3	260
	11歳	34	13.1	
	12歳	40	15.4	
	13歳	7	2.7	
	14歳	39	15.0	
	15歳	74	28.5	
	16歳	41	15.8	
	17歳	18	6.9	
	18歳	1	.4	
学校	小学校	37	14.2	260
	中学校	182	70.0	
	高校	41	15.8	
所在地	城市	132	50.8	260
	市郊	128	49.2	

### 3 年齢別の血圧とその基準値との比較

年齢別において、それぞれの血圧を同期の標準値を比較し、検定した結果として、10歳から15歳ま

での研究協力者の収縮期血圧は標準値より有意に高くなった。拡張期血圧は、13歳組のみ標準値より有意に高くなり、その他はいずれも有意差が見られなかった(表2)。

表2 年齢別の血圧とその基準値との比較

	BMI	収縮期血圧	拡張期血圧	標準値
10歳(n=6)	23.41(2.31)	105.67(5.13) *	70.33(10.61)	100/66
11歳(n=34)	24.45(3.00)	107.00(13.48) *	68.74(10.09)	102/68
12歳(n=40)	25.23(3.72)	111.13(12.58) **	70.40(10.40)	104/69
13歳(n=7)	25.90(2.76)	125.57(13.56) **	80.71(8.06) *	106/71
14歳(n=39)	24.88(2.49)	117.00(14.18) **	72.90(11.98)	108/72
15歳(n=74)	25.43(2.31)	115.16(14.42) *	72.23(11.86)	110/73
16歳(n=41)	26.13(4.19)	113.71(12.39)	70.63(10.54)	112/74
17歳(n=18)	25.07(3.17)	115.39(9.81)	72.17(10.18)	
18歳(n=1)				

注: \*\* p<0.01, \* <0.05

#### 4 性別、学校等による各変数の得点

表3に示したように、性別、学校、学校所在地毎における体重、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧、生活習慣得点を計算し、それぞれ検証した。その結果、性別において、体重、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧は、女生より男生の得点は有意に高かった(p<0.01)。学校別において、体重は小学校、中学校、高校の3者との間にいずれも有意差がみれた(p<0.01)。BMIに関しては、小学校と高校との間に有意差がみれて、中学校と高校との間に有意差が見られなかった。また、学級による拡張期血圧の影響も見られ、小学校より中学校(p<0.05)、高校より中学校(p<0.01)の拡張期血圧は有意に高かった。学校所在地によって、市郊より都市部のほうは収縮期血圧が有意に高かった(p<0.05)、拡張期血圧も有意に高かった(p<0.01)。各項目において、生活習慣の得点は有意差が見られなかった。

表3 性別、学校等による各変数の得点

項目	体重	BMI	収縮期血圧	拡張期血圧	生活習慣	
性別	男生(n=172)	70.60(11.72)**	25.60(3.29)**	115.87(13.01)**	72.98(10.12)**	129.300(22.10)
	女生(n=88)	63.19(7.78)	24.54(2.58)	109.20(13.69)	68.76(12.26)	135.14(20.14)
学級	小学校(n=37)	61.11(11.42)	24.73(4.18)*	115.65(12.45)	78.19(6.77)	134.54(22.40)
	中学校(n=182)	67.74(9.79)	25.05(2.56)**	113.73(14.67)	71.14(11.86)	131.86(20.92)
	高校(n=41)	75.93(9.79)	26.54(3.84)	111.27(8.53)	67.37(7.30)	125.78(23.34)
所在地	都市	68.73 (11.91)	25.45 (3.51)	115.55 (12.62)*	73.80 (10.73) **	130.58 (23.15)
	市郊	67.43 (10.22)	25.02 (2.61)	111.62 (14.29)	69.23 (10.94)	132.00 (19.93)

注: \*\* p<0.01, \* <0.05

#### 4 研究協力者の体質分類

260名研究協力者の体質に関するデータを体質判定ソフトに導入し、判断した結果、9種類の体質に

はちらでもない判断は209名(80.4%)、2種類以上の病理体質を揃えた雑合質は21名、平和質6名、その他8類の病理体質はそれぞれ1名~6名までであった。具体的な分類は表2に示した通りである。また、それぞれの体質の年齢を検証した結果、 $P>0.05$ となり、有意差は見られなかった(表4)。

表4 研究協力者の体質分類

	例数	比率	年齢分布	平均年齢
どちらでもない	209	80.4	10~18	13.97(1.88)
平和質	6	2.3	10~16	13.83(2.04)
気虚質	6	2.3	11~17	13.83(2.04)
陽虚質	1	.4	17	17.00
陰虚質	5	1.9	10~17	13.00(3.24)
痰湿質	2	.8	17	17.00
湿熱質	1	.4	11	11.00
瘀血質	2	.8	10~16	13.00(4.24)
気鬱質	4	1.5	14~17	15.00(1.41)
特稟質	3	1.2	11~15	13.67 (2.31)
雑合質	21	8.1	10~17	14.38 (1.91)
合計	260	100.0		$P=.26$

#### 5 研究協力者の体質における各変数の得点

体質類毎に、それぞれBMI、収縮期血圧、拡張期血圧、生活習慣得点を計算し、検証した。その結果、 $P$ は.51、.45、.06、.76で、いずれも $>0.05$ となった(表5)。

表5 研究協力者の体質における得点

	例数	BMI	収縮期血圧	拡張期血圧	生活習慣
どちらでもない	209	25.29 (3.11)	113.6 (13.73)	71.40(10.79)	130.84 (21.85)
平和質	6	24.46 (3.68)	120.67 (22.80)	78.33(17.64)	126.67 (23.25)
気虚質	6	26.01 (3.23)	103.00 (8.08)	62.33 (4.08)	132.00 (18.43)
陽虚質	1	24.39	104.00	62.00	116.00
陰虚質	5	23.34 (2.75)	115.60 (12.78)	79.00(11.31)	128.80 (22.30)
痰湿質	2	28.09 (7.52)	127.00 (4.24)	84.50 (3.54)	130.00 (25.46)
湿熱質	1	22.66	119.00	89.00	146.00
瘀血質	2	27.32(.099)	115.00(7.07)	81.50(2.12)	155.00(4.24)
気鬱質	4	24.44(1.66)	117.50(6.40)	73.50(7.85)	134.75(15.84)
特稟質	3	23.67(2.35)	108.67(10.26)	66.67(11.55)	126.33(8.33)
雑合質	21	25.25(3.00)	112.48(12.20)	69.71(11.37)	135.14(23.84)
$P$		.51	.45	.06	.76

## 考察

### 1 BMIは血圧に対する影響

研究協力者の血圧を同年齢時期の標準値と比較した結果、10歳から15歳までの収縮期血圧は標準値

より有意に高くなった。それは、BMIの高さが血圧へ影響するのではないかと考える他の研究結果と一致している<sup>[8-9]</sup>。そして、年齢が低い程、BMIからの影響が高いという傾向が本研究の中に見られた。

## 2 性別、学級、地域によるBMIと血圧への影響

本研究では、女生より男生のほうは、体重、BMI、収縮期血圧、拡張期血圧が有意に高い結果が得られた。体重とBMIは血圧に影響するため、体重とBMIの高い男生のほうは、血圧も高くなったと言える。学年による体重の相違に関しては、低学年の子どもは、より幼いため、体重もなれなりに高学年の子ども達より低くなると考えられる。

学年によるBMIに関しては、小学生と高校生との間に、有意差が見られた。それはサンプリングの偏差によるものなのか、それとも各学年による肥満比率の相違によるものなのかは明らかではない。

学級による血圧の変化に関しては、収縮期血圧は、各学年において、有意差は見られない。にもかかわらず、拡張期血圧のほうは高校生より中学生、中学生より小学生のほうが高いという結果が見られた。植物神経系への調整機能が低学年ほど未熟であるため、収縮期血圧より拡張期血圧のほうは影響されやすいのではないかと考えられる。都市部の子どもの拡張期血圧は都市部を離れた市郊の子どもより有意に高かった。

体質に関しては、80.4%の研究協力者の体質は判断できない状態で、どの種類でも入れない結果になった。この判断の年齢分布は10歳から18歳までの子ども達が含まれた。体質が判断できた8類の病理体質はそれぞれ1名～6名までで、いずれも少なかった。そして、体質判断できない部分とそうでない部分のこどもは年齢に有意差がないと見られた。この時期の子どもは、発達途中なので、体質も形成されている途中ではないかと推測される。類似な文献はまだ見付かれっていないため、今後の課題として、検討していく必要がある。また、今回の報告は血圧と体質との関係を中心に行っているが、それぞれの年齢に応じた生活習慣との関係についてさらに分析を加えることとなる。

## 引用参考文献

1. 平成20年度学校保健統計調査速報: [http://www.mext.go.jp/b\\_menu/toukei](http://www.mext.go.jp/b_menu/toukei).
2. 劉新彦, 北池正. 中学生の適正体重を維持する生活習慣及び自己効力感に関する研究, 千葉看護誌, 2009, 15(1):27-34.
3. 候冬青. 北京児童青少年血圧与肥胖及肥胖类型的关联分析, 北京协和医学院硕士论文, 2010.
4. 方初玉. 学龄儿童单纯性肥胖发生情况及相关因素分析. 科技信, 2009, 15(1):502, 485.
5. 靳琦, 王琦 “辨体 - 辨病 - 辨证诊疗模式” 的理论要素与临床应用, 北京中医药大学学报, 2006, 29(1):41-55.
6. 徳永乾雄, 橋本公雄. 学生健康度、生活習慣に関する診断検査の開発, 健康科学, 2001, 23:53-63.
7. 朱燕波, 折秀樹, 上馬場和夫他. 体質に関するCCMQ質問票日本語版の臨床開発とその妥当性の検証, 日東医誌, 2010:59(6), 783-792.
8. 常虹, 杨柳, 崔琴子. 儿童青少年单纯性肥胖症与血压关系分析, 中国学校卫生, 2008, 29(2):164-165.
9. 高曼, 肖纫霞, 孙寒. 单纯性肥胖儿童血压与体重指数的关系, 中国妇幼保健, 2010, 25(36):5414-5416.

作成日: 2013-3-14

## 財団法人 日中医学協会

2012年度共同研究等助成金報告書—トラベルグラント—

2012年 12月 5日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った会議について報告いたします。

受給者氏名： 山内 広平  
所属機関名：岩手医科大学医学部  
所属部署名：呼吸器・アレルギー・  
膠原病内科  
職名：教授  
所在地：岩手県盛岡市内丸 19-1  
電 話：019-651-5111 内線：2331



1. 助成金額： 200,000 円

2. 会議名称・テーマ

第62回日本アレルギー学会秋季学術大会

3. 会議の概要

11月29日～12月1日まで大阪国際会議場にて開催された本会において、当科と共同研究を行っている中国・延辺大学の朴紅梅先生と延光海先生に、「ピリン組み替え蛋白のマウス喘息モデルにおけるアレルギー性気道炎症及びリモデリングに対する効果」(第2日目11月30日 演題番号046-2)と題し、研究発表を行っていただきました。

4. 被招聘者概要

- |                |           |
|----------------|-----------|
| 1. 被招聘者氏名：朴紅梅  | 職名：副教授    |
| 所属機関名：延辺大学附属医院 | 部署名：呼吸内科  |
| 2. 被招聘者氏名：延光海  | 職名：副教授    |
| 所属機関名：延辺大学医学部  | 部署名：基礎医学院 |
| 3. 被招聘者氏名：     | 職名：       |
| 所属機関名：         | 部署名：      |